

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**Regulación de la elongación transcripcional en los genes
del VIH-1 y c-myc**

**Immaculada Montanuy Sellart
Madrid, 2008**

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Regulación de la elongación transcripcional en los genes
del VIH-1 y c-myc**

Memoria presentada por Immaculada Montanuy Sellart
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular por
la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2008.

El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC) y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (IPBLN, CSIC) bajo la dirección del Doctor Carles Suñé Negre.

Madrid, 2008.

Fdo: Carles Suñé Negre

Als meus pares

Espero haber sabido mostrar mi agradecimiento y cariño a aquellos con los que he compartido estos años y que de muchas maneras han contribuido a este trabajo. Gracias por todo.

A Carles Suñé, mi director de Tesis, que me ha dado la oportunidad de descubrir este mundo de la ciencia. Por la confianza depositada en mi desde el principio, su orientación y su apoyo en lo profesional y personal.

A mis compañeros de laboratorio, que son mucho más que eso. Me siento muy afortunada de haber compartido el día a día con Marta, Miguel, Noe, Marta y Laura. Por su generosidad y sus aportaciones a esta Tesis.

A Cristina Hernández, por sus consejos y su valiosa ayuda. A Bea, Piia y Ana, no sólo por vecinas, sino también por ayudarnos desde el primer día a “volver a empezar”.

A los compañeros del CNB, a los de la primera planta y a nuestros laboratorios compartidos, por los buenos ratos y por echar siempre una mano. A Luis Enjuanes y su laboratorio, con los que me he sentido como una más.

A los compañeros del “López”, por su acogida, su ayuda y enseñarme lo mejor de Granada.

A las personas que conforman los muchos servicios, tanto del Centro Nacional de Biotecnología como del Instituto López Neyra, por hacernos las cosas más fáciles a los demás.

A Lucía, Gadah, Uxi, Belén, Raffi y Sergio, Marta, Miguel, Maricarmen, Rosana, Marcos, Ana, Sole, Carmen, Cristina, Jose Luis, Sara, Alejo, Bea, Marco, Miriam, Ramon, Angels... por las visitas, las charlas, los cafés, los conciertos y muchos etc.

A mi familia. A mis padres y mi hermana, porque a pesar de unos cuantos kilómetros hacen que siempre los sienta cerca. A mis padres, por su esfuerzo, su apoyo y su confianza en todo momento. Y a Adrián, por entre tantas cosas, contagiarme su entusiasmo y optimismo cada día, estar a mi lado, aquí y en cualquier otra parte.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN EN INGLÉS	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS	3
2. LA RNA POLIMERASA II Y LA TRANSCRIPCIÓN	4
3. CICLO DE TRANSCRIPCIÓN	6
3.1. Iniciación de la transcripción	7
3.1.1. El núcleo del promotor	7
3.1.2. Activación de la transcripción	9
3.2. Escape del promotor: Transición desde la iniciación a la elongación	10
3.3. Elongación de la transcripción	10
3.4. Terminación de la transcripción	10
4. REGULACIÓN DE LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL	11
4.1. Ciclo de fosforilación del CTD de la RNAPII	11
4.2. Evidencias de regulación de la elongación transcripcional en eucariotas	14
4.2.1 Regulación de la elongación transcripcional del VIH-1	14
4.3. Factores que regulan la etapa de elongación de la transcripción	17
4.4. Acoplamiento entre elongación de la transcripción y <i>splicing</i> del mRNA	19
4.4.1. El factor CA150/TCERG1	20
5. PARADA PRÓXIMA AL PROMOTOR (<i>PROMOTER PRÓXIMAL PAUSING</i>)	21
5.1. El complejo P-TEFb	22
5.2. Reclutamiento de P-TEFb a complejos transcripcionales	24
6. INFLUENCIA DE LA ZONA PROMOTORA EN LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL	25
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29

1. CÉLULAS EUCARIÓTICAS	29
1.1. Líneas celulares	29
1.2. Cultivo de líneas celulares	27
1.3. Transfecciones transitorias de células HeLa y 293T	29
1.4. Estimulación de células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8	30
2. BACTERIAS	31
2.1. Cepas y cultivos de bacterias	31
2.2. Preparación de bacterias competentes para transformación por choque térmico	31
2.3. Transformación de bacterias por choque térmico	31
3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA	32
3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
3.2. Electroferesis de DNA en geles de agarosa	32
3.3. Purificación de DNA	32
3.4. Enzimas de restricción y modificación del DNA	33
3.5. Marcaje radioactivo del DNA	33
4. PLÁSMIDOS	34
5. MOLDES BIOTINILADOS	36
6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA	37
6.1. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	37
6.2. Extracción de RNA intracelular	37
6.3. RT-PCR	37
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	38
7.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	38
7.2. Tinción de <i>coomassie</i>	38
7.3. WB	38
7.4. Cuantificación de proteínas	39
8. PROTEÍNAS RECOMBINANTES	39
8.1. Purificación de la proteína Tat recombinante	39
9. ANTICUERPOS	41
9.1. Purificación de inmunoglobulinas (IgGs)	42
9.2. Purificación de anti-CA150-AP	42

10. ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN-ELONGACIÓN <i>IN VITRO</i>	43
11. INMUNODEPLECIÓN DE CDK9	44
12. AISLAMIENTO DE COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES	46
12.1. Aislamiento y purificación de PICs	46
12.2. Aislamiento y purificación de ECs	46
13. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)	47
13.1. Fijación de células Jurkat	47
13.2. Preparación de muestras: lisis y sonicación	48
13.3. Inmunoprecipitación	48
13.4. Obtención de DNA inmunoprecipitado y PCR	49
IV. RESULTADOS	51
1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEBIDO A LA PARADA DE LOS COMPLEJOS DE LA RNAPII	51
1.1. Activación de la elongación transcripcional por la proteína Tat del VIH-1	51
1.2. Reproducción del bloqueo en la elongación transcripcional del gen <i>c-myc in vitro</i>	56
1.3. Efecto de la proteína Tat sobre la procesividad del complejo de la RNAPII que transcribe el gen <i>c-myc</i>	58
1.4. Efecto de la depleción del complejo P-TEFb del extracto nuclear sobre la transcripción de los genes del VIH-1 y <i>c-myc</i>	61
1.5. Estudio de la presencia de CDK9 en los PICs formados sobre los promotores del VIH-1 y <i>c-myc in vitro</i>	65
1.6. Estudio de la asociación de CDK9 a regiones promotoras del VIH-1 y <i>c-myc in vivo</i>	68
1.7. Relevancia de las secuencias de factores de unión a DNA y el núcleo de la región promotora para la activación transcripcional mediada por CDK9	72
2. ESTUDIO DEL RECLUTAMIENTO DE CA150 A UNA UNIDAD GÉNICA	76
2.1. Estudio de la presencia de CA150 en los complejos de transcripción	76

del VIH-1 <i>in vitro</i>	
2.2. Estudio de la presencia de CA150 en los complejos de transcripción del VIH-1 <i>in vivo</i>	80
2.3. Efecto de la depleción de CA150 del extracto nuclear sobre la transcripción de los genes del VIH-1 y su activación por Tat	84
V. DISCUSIÓN	87
1. P-TEFb PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA ELONGACIÓN DE LOS GENES DEL VIH-1 Y C-MYC	88
2. ASOCIACIÓN DE CA150 CON LOS COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES DE LOS GENES DEL VIH-1	94
VI. CONCLUSIONES	97
VII. BIBLIOGRAFÍA	99
VIII. ANEXO	

ABREVIATURAS

ΔNE	extracto nuclear deplecionado
aa	aminoácido
Amp	ampicilina
b	biotina
BL	<i>bulge less</i> , sin protuberancia
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
BrEt	bromuro de etidio
BSA	albúmina de suero bovina
CAT	cloranfenicol acetil transferasa
ChIP	inmunoprecipitación de cromatina
CMV	citomegalovirus
CTD	dominio carboxi terminal
DBD	dominio de unión a DNA
DCE	<i>downstream core elements</i>
dGless	<i>double G less</i> (referido al vector con dos cassettes (doble) carentes de guanina)
DMEM	medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DMP	dimetil pipelimidato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
DPE	<i>downstream promoter element</i>
DRB	5,6-dicloro-1-β-ribofuranosilbencimidazol
DSIF	<i>DRB-Sensitive Inducing Factor</i>
DTBP	dimetil-3-3'-ditiobispropionimidato-2HCl
DTT	1,4-ditiotreitol
EC	complejo de elongación
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FBS	suero fetal bovino
GFP	proteína verde fluorescente
GST	glutación-S-transferasa
GTF	factor de transcripción general
IgG	inmunoglobulina de clase G
Inr	iniciador
IP	inmunoprecipitación
IPTG	isopropil-tio-β-D-galactosidasa
IST	inductor de transcritos cortos
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LUC	luciferasa
min	minuto
mRNA	RNA mensajero
MTE	<i>motif ten element</i>
NE	extracto nuclear
NELF	factor negativo de elongación
nm	nanometro
NP40	nonidet fosfato 40
nt	nucleótido
N-TEF	factor negativo de la elongación transcripcional
NTP	nucleótido trifosfato
nuc	nucleosoma
pb	pares de bases
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
P-CTD	dominio carboxi terminal fosforilado
PIC	complejo de pre-iniciación
PK	polinucleótido quinasa del fago T4

PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
P-TEF	factor positivo de la elongación transcripcional
P-TEFb	factor positivo de elongación transcripción b
RNA	ácido ribonucleico
RNAP (I, II, III)	RNA Polimerasa (I, II, III)
RNAsa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
RT	transcripción reversa
RT-PCR	RT acoplada a una PCR
SDS	dodecil sulfato sódico
seg	segundo
snRNA	RNA nuclear de pequeño tamaño
SV-40	virus del simio 40
TAE	solución Tris-acetato EDTA
TAF	factor asociado a TBP
TAR	<i>trans-activation-response</i>
TBE	solución Tris-borato EDTA
TBP	proteína de unión a la caja TATA
TCERG1	factor regulador de la elongación transcripcional 1
TdT	deoxinucleotidiltransferasa terminal
TE	solución Tris EDTA
Tm	temperatura de fusión
TNFα	factor de necrosis tumoral α
TRF	factor relacionado con TBP
tRNA	RNA de transferencia
U	unidades
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
vol	volumen
WB	<i>western blot</i>
WT	<i>wild type</i> , salvaje
XCPE1	<i>X Core Promoter Element 1</i>

Algunos términos han sido incluidos en su lengua de origen y escritos en cursiva, por no tener una clara traducción al español o ser ésta poco empleada.

resumen en inglés

The regulation of gene expression is crucial for all organisms, and to achieve it, it is necessary the coordination of multiple processes in the cell. It is now believed that rather than being independent, the different levels of gene regulation are extensively related and influence each other.

The most direct regulation of gene expression occurs during transcription. The transcription of protein-coding genes in eukaryotes is performed by RNA Polymerase II (RNAPII), and includes different stages, from the assembly of the pre-initiation complex at the promoter to the dissociation of the elongating complex at the end of the transcription cycle.

It has become clear that pausing of RNAPII during transcript elongation is an important mechanism for regulating gene expression at many genes. In this work, we have investigated the mechanism of regulated elongation of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) and c-myc using an *in vitro* transcription assay that reproduces the conditional block to elongation. We have shown that HIV-1 Tat can modify the elongation efficiency of transcription complexes that synthesize the RNA on c-myc gene, and we have determined that P-TEFb complex regulates transcription elongation of c-myc, as it has been shown for HIV-1 genes. We have also determined that CDK9, the kinase subunit of P-TEFb, is present in pre-initiation complexes formed on both promoters isolated *in vitro* and is recruited to a genome-integrated HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR) and chromosomal c-myc promoter *in vivo*. This observation gave rise to ask whether upstream elements of these promoters have a role in CDK9-activated transcription elongation. By using target recruitment of CDK9 to promoters, we have found a requirement of the TATA-box for CDK9 activation to occur. Our results suggest that the TATA-box element mediates the assembly of processive transcription complexes responsive to CDK9 and that upstream activator binding sequences collaborate in the recruitment of elongation-competent transcription complexes at the promoter region.

It has been previously shown that the transcriptional coactivator CA150 (also termed TCERG1, for Transcription Elongation Regulator 1) affects elongation of transcription complexes assembled on HIV-1 promoter in a TATA-box-dependent manner. However different aspects regarding the molecular mechanisms of its function as well as the recruitment and mapping of this factor along a gene unit remain largely unknown. To further characterize this factor we have studied in this work the recruitment of CA150 to HIV-1 RNAPII complex. We have used a RNAPII step-walking approach to determine

the association of CA150 with pre-initiation and elongation complexes isolated *in vitro* and ChIP assays to study these interactions in an *in vivo* setting. The results obtained indicate that CA150 is recruited to pre-initiation complexes and remains bound to elongation complexes as RNAPII transcribes the RNA on HIV-1 genes, which is fully consistent with previous observations that link CA150 to transcription elongation modulation and pre-mRNA processing.

introducción

1. EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS

La regulación de la expresión génica es fundamental para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de un organismo, y por tanto, un área del conocimiento intensamente estudiada. En eucariotas, la información genética almacenada en la molécula de DNA se transcribe en el núcleo celular para dar lugar a un RNA mensajero (mRNA), que debe procesarse para formar un mRNA maduro. El procesamiento de un mRNA incluye la adición de una estructura m⁷G (7-metil guanina), denominada *cap*, en el extremo 5' del transcrito nascente (*capping*), la eliminación de los intrones (*splicing*) y la formación del extremo 3' con el corte del transcrito y la adición de una cola de adeninas (*polyA*) en el proceso denominado poliadenilación. Finalmente, el mRNA es exportado al citoplasma donde será traducido dando lugar a una proteína (Komili *et al.* 2008).

Cada uno de los procesos que suceden en la célula para dar lugar a la expresión génica - transcripción, procesamiento del mRNA, transporte núcleo-citoplasma y traducción - están muy regulados, y aunque bioquímicamente es posible separarlos entre sí, datos recientes sugieren que están estrechamente interconectados (Komili *et al.* 2008).

Un nivel adicional de complejidad en células eucariotas resulta de la compactación del DNA en la estructura de cromatina ya que ésta condiciona en gran medida todos los procesos dependientes de la hebra de DNA. La estructura básica de cromatina está compuesta por unidades repetidas, llamadas nucleosomas, consistentes en un octámero de histonas envuelto por 147 pares de bases (pb) de DNA. Los nucleosomas contienen un tetrámero de las histonas H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B, y están conectados por una secuencia nexo de DNA que puede o no interaccionar con la histona H1, jugando esta interacción un importante papel en el nivel de compactación de la cromatina (Woodcock 2006).

La cromatina no sólo tiene una función estructural empaquetadora de DNA, sino también reguladora. Los nucleosomas pueden ser desensamblados/reensamblados o desplazados, mediante la acción de ciertos factores, en un proceso denominado remodelación de cromatina (Li *et al.* 2007). Las propiedades fisicoquímicas de los nucleosomas se pueden ver alteradas mediante distintas modificaciones (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, etc.) la mayoría ejercidas de manera reversible por una gran variedad de enzimas específicas de sustrato (Kouzarides 2007). Las combinaciones entre estas diferentes modificaciones pueden alterar las interacciones DNA-histona, así como las interacciones entre nucleosomas, afectando

tanto directamente el empaquetamiento de la cromatina como indirectamente el reclutamiento de factores a un determinado gen (Kouzarides 2007; Li *et al.* 2007). Se ha propuesto que las modificaciones ejercidas sobre las histonas generan el llamado “código o lenguaje de histonas”, capaz de ser “leído” a su vez por otros factores (proteínas de unión a cromatina) que ejercen funciones reguladoras (Berger 2007).

2. LA RNA POLIMERASA II Y LA TRANSCRIPCIÓN

La RNA Polimerasa (RNAP) es la enzima encargada de llevar a cabo la transcripción, uno de los procesos celulares que de manera más directa controla la expresión génica. A diferencia de los organismos procariotas, que sólo tienen una RNAP, en eucariotas existen tres (RNAPI, II y III) las cuales se encargan de producir diferentes tipos de RNAs. La RNAPI es la responsable de la síntesis de una parte del RNA ribosómico (rRNA). Los genes que codifican para todos los mRNAs y algunos RNAs no codificantes son transcritos por la RNAPII, y la RNAPIII se encarga de transcribir RNAs de pequeño tamaño, como son el RNA de transferencia (tRNA), U6 snRNA (*small nuclear RNA*) o 5S rRNA. Aunque cada una de las RNAPs se ha especializado en la transcripción de un tipo de RNA, estas enzimas guardan muchas similitudes entre ellas, incluso con la RNAP procariótica. Las RNAPs constituyen una misma familia de proteínas y contienen múltiples subunidades, algunas conservadas entre todas ellas y otras características de cada una en particular; la disposición de las subunidades en la molécula y la arquitectura del núcleo enzimático también se encuentran conservadas, como lo determinan las estructuras cristalográficas que se han obtenido a lo largo de la última década (Cramer 2002; Hirata *et al.* 2008).

La RNAPII de eucariotas, que es la encargada de transcribir los genes que codifican proteínas, está formada por doce subunidades que se conocen como RPB1 a RPB12, de mayor a menor tamaño respectivamente (Cramer 2002). Un rasgo que la diferencia del resto de las RNAPs es el extenso dominio carboxiterminal (CTD) de la subunidad mayor (RPB1), un dominio sin una estructura definida y evolutivamente conservado. Este dominio está formado por repeticiones de un heptapéptido, de secuencia consenso Y1S2P3T4S5P6S7, que aumentan en número con la complejidad de los organismos. Este heptapéptido se encuentra repetido, por ejemplo, 26 veces en la RNAPII de levaduras y 52 veces en el caso de la humana (Chapman *et al.* 2008). El CTD es modificado por fosforilación, y además, se observó que dichas modificaciones cambian a lo largo del ciclo de transcripción teniendo implicaciones funcionales (Kang *et al.*

1993); por lo tanto, la regulación del estado fosforilado del CTD de la RNAPII se ha reconocido como un punto clave durante la transcripción y es objeto de estudio desde entonces.

Experimentos realizados demostraron que la presencia del CTD es indispensable para la vida de los organismos, aunque deleciones parciales permitían la viabilidad de los mismos (Nonet *et al.* 1987; Litington *et al.* 1999; Meininghaus *et al.* 2000). Mientras que es requerido *in vivo*, se observó que no es estrictamente necesario para la iniciación y síntesis del RNA *in vitro* (Zehring *et al.* 1988; Kim *et al.* 1989) sugiriendo que no forma parte del núcleo catalítico de la RNAPII sino que ejecuta otras funciones. Así, se vio que ciertas deleciones resultan en la falta de respuesta a activadores así como en una disminución significativa del procesamiento del mRNA (Gerber *et al.* 1995; Cho *et al.* 1997; McCracken *et al.* 1997).

Aunque las reacciones de *capping*, *splicing* y poliadenilación son procesos bioquímicamente distintos, y son llevadas a cabo por maquinarias diferentes, estos procesos están conectados entre sí y con el proceso de transcripción; en los últimos años se ha descrito que el procesamiento de un mRNA se produce de manera “co-transcripcional”. La idea emergente del “acoplamiento” entre la transcripción, el procesamiento del mRNA y su transporte al citoplasma ha dado un nuevo enfoque al estudio de la regulación de la expresión génica en general, y al del mecanismo de transcripción en particular, reconociéndose ahora como una compleja red de interacciones que permiten una intercomunicación durante dichos procesos, siendo el CTD de la RNAPII un vínculo fundamental entre ellos (Maniatis *et al.* 2002; Neugebauer 2002; Kornblihtt 2007). Este modelo interpreta al CTD de la RNAPII como una plataforma extensa y flexible para el reclutamiento de factores involucrados en los diferentes procesos. La modificación del CTD, especialmente lo que se conoce hasta el momento acerca de su patrón de fosforilación, afecta a su conformación y a la habilidad de asociarse a las distintas maquinarias involucradas en la formación, control y transporte de un mRNA maduro (Phatnani *et al.* 2006). En la Figura 1 se representa un modelo hipotético de este complejo de la RNAPII. Estudios recientes han sugerido que las funciones del CTD podrían representar una modificación cualitativa en la maquinaria de síntesis del mRNA, quizás un prerrequisito para la evolución de organismos con complejos patrones de diferenciación y desarrollo (Stiller *et al.* 2002).

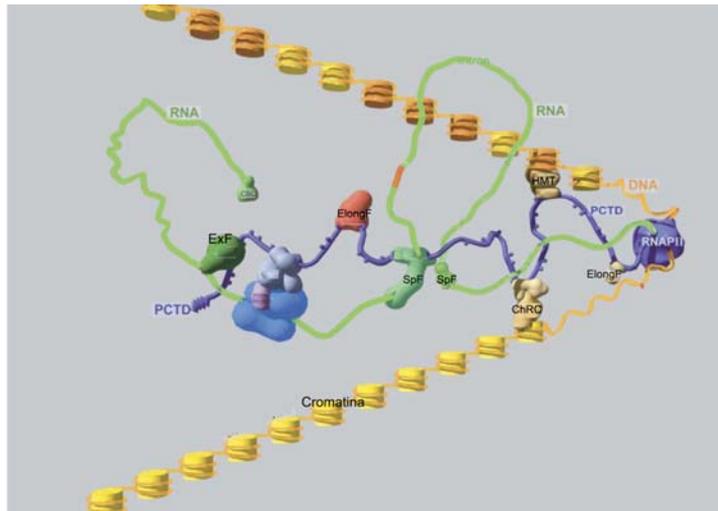


Figura 1. Modelo hipotético de un complejo de la RNAPII que se encuentra activamente elongando (Phatnani *et al.* 2006). Se muestra la RNAPII, con el dominio CTD fosforilado de color violeta (P-CTD). Está representada de manera arbitraria la unión simultánea de diversas proteínas asociadas al P-CTD en un determinado momento. El DNA, en color naranja, se encuentra formando parte de la cromatina, donde los nucleosomas están representados en color amarillo. Los nucleosomas sombreados han sido modificados por enzimas específicas. La molécula de RNA naciente está representada en color verde, y está siendo eliminado un intrón. HMT, metil transferasa de histonas; ElongF, factor de elongación; ChRC, complejo remodelador de cromatina; SpF, factor de *splicing*; ExF, factor de transporte del RNA; CBC, complejo de unión a *cap*.

3. CICLO DE TRANSCRIPCIÓN

El proceso de transcripción llevado a cabo por la RNAPII se divide clásicamente en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (Figura 2). Cada etapa está altamente regulada y puede ser un paso limitante en la expresión de un determinado gen respondiendo a diferentes condiciones celulares y extracelulares.

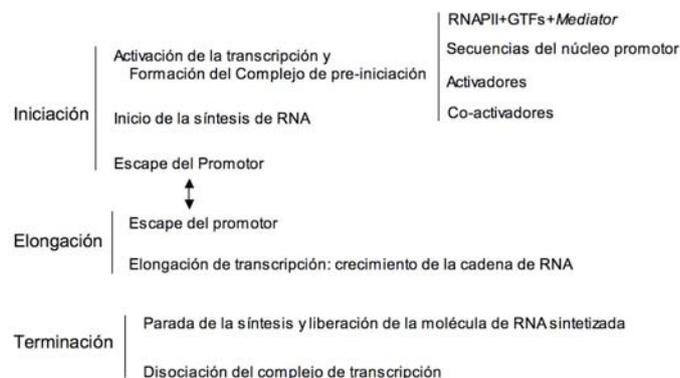


Figura 2. Representación esquemática de un ciclo de transcripción. Se indican las tres etapas del ciclo y los pasos que se van sucediendo en cada una de ellas.

3.1. Iniciación de la transcripción

Un ciclo de transcripción típico llevado a cabo por la RNAPII se inicia con la unión de proteínas activadoras a una zona de DNA determinada, desde donde transmiten las señales reguladoras para la activación de la transcripción y formación del complejo de pre-iniciación (PIC). La formación del PIC supone el ensamblaje de la maquinaria transcripcional sobre un promotor y el reconocimiento del sitio de inicio de la transcripción.

La RNAPII no es capaz de reconocer un promotor e iniciar la síntesis de RNA por sí sola, sino que un gran número de factores de transcripción y complejos proteicos le asisten para llevar a cabo su función. En primer lugar, los factores generales de transcripción (GTFs) -TFIIA,TFIIB,TFIID,TFIIE,TFIIF Y TFIIFH-, evolutivamente muy conservados, y definidos *in vitro* como el mínimo conjunto de proteínas auxiliares necesarias y suficientes para iniciar una transcripción precisa desde un promotor. La función principal de los GTFs es orientar y posicionar a la RNAPII sobre los elementos reguladores de DNA en el promotor, determinando así el sitio de inicio de la transcripción. Sin embargo, la RNAPII junto con los GTFs son capaces sólo de mantener niveles basales de transcripción *in vitro*, y se requiere la presencia de factores adicionales encargados de regular positiva o negativamente la transcripción (Roeder 1998).

Se ha descrito también la participación de un complejo multiproteico denominado *Mediator*, conservado evolutivamente desde levaduras a mamíferos, el cual es necesario tanto para el ensamblaje del PIC como para la respuesta a factores reguladores de la transcripción. Además, se sugiere la existencia de diferentes formas funcionales del complejo *Mediator*, dependiendo de la composición proteica, que serían importantes para ejercer funciones reguladoras (Conaway *et al.* 2005).

3.1.1. El núcleo del promotor

Típicamente, las secuencias de DNA que son suficientes para dirigir la iniciación de la transcripción por la maquinaria de la RNAPII conforman el *core promoter* o núcleo promotor. A diferencia de lo supuesto clásicamente, los datos surgidos en los últimos años indican que en eucariotas, y particularmente en vertebrados, existe una considerable diversidad en los elementos que componen el núcleo promotor la cual podría estar involucrada en diferentes mecanismos de transcripción y respuestas a activadores o represores (Butler *et al.* 2002; Juven-Gershon *et al.* 2008).

Uno de los elementos del núcleo promotor, y el más estudiado, es la caja TATA, una región rica en nucleótidos AT generalmente con la secuencia consenso TATAAA. Esta caja constituye el primer elemento que se identificó en eucariotas y el más conservado evolutivamente en regiones promotoras (Goldberg 1979) que normalmente está situado entre 28 y 34 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Además de la caja TATA, se han identificado otros tipos de secuencias capaces de dirigir la transcripción (Figura 3): a) el elemento Iniciador (Inr), que consiste en una secuencia rica en pirimidinas alrededor del sitio de inicio de la transcripción (Smale *et al.* 1989); b) el elemento DPE (*Downstream Promoter Element*), situado generalmente 28-32 nucleótidos río abajo del sitio de iniciación (Burke *et al.* 1997) y c) el elemento BRE (*TFIIB Recognition Element*), que cuando está presente generalmente se encuentra adyacente a la TATA box (Lagrange *et al.* 1998). Otros elementos identificados más recientemente son los denominados DCE (*Downstream Core Elements*), MTE (*Motif Ten Element*) y el elemento XCPE1 (*X Core Promoter Element 1*) (Lewis *et al.* 2000; Lim *et al.* 2004; Tokusumi *et al.* 2007). Dichos elementos no están siempre presentes en la región promotora de un gen, de forma que un núcleo promotor puede contener alguno, todos, o ninguno de dichos elementos (Figura 3) (Butler *et al.* 2002; Juven-Gershon *et al.* 2008).

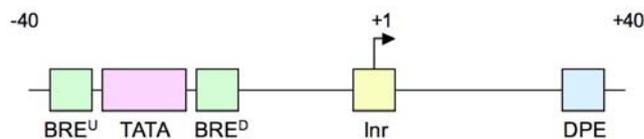


Figura 3. Elementos más comunes presentes en el núcleo promotor descritos en el texto (Modificado de (Butler *et al.* 2002).

De los GTFs, los que se considera que tienen un papel principal en el reconocimiento del núcleo promotor son el TFIID y el TFIIB. El factor TFIID está formado por la proteína TBP (*TATA-binding protein*) y 12 factores asociados a TBP, denominados TAFs (*TBP-associated proteins*) (Albright *et al.* 2000; Tora 2002). TFIID reconoce la caja TATA a través de la proteína TBP, pero también puede reconocer el elemento Inr, el elemento DPE y el elemento DCE mediante el uso de distintos TAFs. Se han identificado una variedad de complejos TFIID los cuales se diferencian por la presencia o ausencia no sólo de los diferentes TAFs, sino también de la propia TBP. Por este motivo, la composición del TFIID podría ser considerada no sólo como importante para

el reconocimiento de secuencias promotoras, sino también como reguladora. Es posible que distintos complejos TFIID estén involucrados en la regulación de la transcripción específica de cada gen (Muller *et al.* 2004). Por otro lado, se han identificado diferentes factores, denominados TRFs (*TBP-Related Factors*), capaces de mediar la transcripción en ausencia de TBP (Muller *et al.* 2004; Muller *et al.* 2007). Todo esto permite la formación de múltiples complejos que reconocen el núcleo del promotor, y que difieren en composición y función.

TFIIB contiene un solo polipéptido que interacciona con TBP y entra en contacto con la región promotora reconociendo la secuencia BRE adyacente a la caja TATA. Se ha descrito que puede actuar de manera positiva o negativa sobre la transcripción dependiendo del contexto del promotor (Deng *et al.* 2007).

3.1.2. Activación de la transcripción

La formación del PIC y la iniciación de la transcripción es una etapa altamente regulada. Los mecanismos que llevan a la activación, o represión, de los genes eucarióticos son complejos dado el gran número y tipo de factores reguladores que intervienen y funcionan juntos para iniciar la transcripción (Taatjes *et al.* 2004).

Los mediadores de la activación transcripcional se podrían clasificar en distintos grupos: a) Los factores de transcripción basales, definidos por su capacidad de iniciar la transcripción *in vitro* de manera precisa; b) proteínas activadoras: se unen generalmente a secuencias específicas del DNA y estimulan la transcripción en respuesta a diferentes estímulos y cascadas de señalización; por ejemplo, factores de transcripción como NF- κ B, ATF2-cjun, E2F, etc. c) coactivadores: proporcionan la interacción entre activadores y la maquinaria de transcripción basal y facilitan su acceso al DNA. Dentro de este último se encuentran el complejo TFIID; el complejo *Mediator*; complejos remodeladores de cromatina, y complejos que modifican post-traduccionalmente las histonas creando un ambiente favorecedor de la transcripción (Taatjes *et al.* 2004; Li *et al.* 2007).

La activación transcripcional se produce mediante el reclutamiento ordenado de los elementos que intervienen en la transcripción de un gen en particular (Cosma 2002), aunque también se ha identificado el llamado holoenzima de la RNAPII, en el cual la propia RNAPII se encuentra asociada con complejos activadores/represores previamente a su reclutamiento al promotor (Greenblatt 1997).

3.2. Escape del promotor: Transición desde la iniciación a la elongación

Una vez se ha ensamblado el PIC, y la RNAPII se encuentra en la posición adecuada, se inicia la síntesis del RNA. En primer lugar se forma la llamada “burbuja de transcripción” alrededor de las posiciones -9 y +2 relativas al sitio de inicio de la transcripción (posición +1) y la incorporación de los nuevos nucleótidos en la molécula de RNA (Holstege *et al.* 1997; Gnatt *et al.* 2001). Este complejo intermediario es bastante inestable y puede dar lugar a una síntesis abortiva acumulando unos pocos nucleótidos (nt). Se cree que la inestabilidad continúa hasta que la hebra de RNA alcanza un tamaño de 9-11 nt y se forma un heterodúplex estable de RNA:DNA. Para que la RNAPII pueda seguir transcribiendo se ha propuesto que debe producirse una reorganización del complejo transcripcional, un cambio en los contactos RNAPII-GTFs-secuencias promotoras. Este proceso se conoce como *promoter clearance* o escape del promotor, y se define como una transición al siguiente estadio, la elongación (Saunders *et al.* 2006).

3.3. Elongación de la transcripción

La elongación transcripcional consiste en la adición de ribonucleótidos a la cadena creciente de RNA. Éste no es, sin embargo, un proceso continuo; el complejo de la RNAPII que sintetiza los transcritos puede ver interrumpida su actividad produciéndose paradas en el proceso que pueden ser temporales o permanentes. Por ejemplo, el tipo de secuencia a transcribir puede dar inestabilidad al complejo transcripcional (Izban *et al.* 1993); obstáculos en la hebra de DNA afectan la eficiencia de la transcripción, como el propio empaquetamiento de la hebra de DNA en la estructura de cromatina (Studitsky *et al.* 2004) o proteínas de unión a DNA, que son potenciales limitaciones para una elongación transcripcional eficiente; también las lesiones en la hebra de DNA impiden la transcripción (Charlet-Berguerand *et al.* 2006). Además, como durante la elongación transcripcional se produce el *capping* y el *splicing* del mRNA que se transcribe, la coordinación entre estos procesos podría repercutir en la eficiencia de elongación del complejo transcripcional (Fededa *et al.* 2008; Lin *et al.* 2008).

Los mecanismos que regulan la elongación transcripcional están descritos de manera más detallada en el *apartado 4* de esta sección.

3. 4. Terminación de la transcripción

La terminación de la transcripción ocurre cuando el complejo de la RNAPII que está transcribiendo se disocia del molde de DNA y del RNA que ha sintetizado. Es un paso esencial no sólo para evitar la transcripción de genes que estén corriente abajo sino también para reciclar la RNAPII. La terminación de la transcripción está asociada al procesamiento del extremo 3' del mRNA, que consiste en el corte del mRNA sintetizado y la adición de una cola *polyA*, realizados por complejos de proteínas que se asocian a la maquinaria de transcripción (Rosonina *et al.* 2006).

4. REGULACIÓN DE LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL

La iniciación de la transcripción y la formación del PIC constituyen un paso limitante para la activación transcripcional (ver *apartado 3* de esta sección). Sin embargo, la etapa de elongación de la transcripción es también un estadio muy controlado; se han identificado una gran variedad de genes regulados a este nivel así como proteínas y complejos que pueden afectar dicha etapa positiva o negativamente (Sims *et al.* 2004).

Los estudios realizados en este campo han establecido que durante la elongación transcripcional la estabilidad y el comportamiento del complejo de transcripción es variable, así como el repertorio de factores con los que se asocia y que le van a proporcionar sus características particulares (Saunders *et al.* 2006). El estudio de la etapa de elongación de la transcripción en eucariotas ha ido ligada al descubrimiento del llamado ciclo de fosforilación del CTD de la RNAPII.

4.1 Ciclo de fosforilación del CTD de la RNAPII

Hasta hace relativamente pocos años, se había descrito que la RNAPII, en concreto su CTD, se encuentra en una forma hipofosforilada en la zona promotora, e hiperfosforilada en zonas codificantes de los genes (Dahmus 1994), sin embargo, se ha visto que esta situación es más compleja. Las dos modificaciones principales son la fosforilación de la S2 y la S5 del heptapéptido presente en el CTD (Dahmus 1995), residuos fofo-aceptores que son esenciales en levaduras (West *et al.* 1995). Las técnicas de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y el desarrollo de anticuerpos monoclonales para analizar el estado de fosforilación de la RNAPII a lo largo de un gen han permitido detectar la distribución de dichas modificaciones. Así, la fosforilación de la S5 del heptapéptido conservado predomina en regiones al inicio de las unidades de transcripción, mientras que al final de las zonas codificantes de los genes predomina la

fosforilación en la S2 (Komarnitsky *et al.* 2000; Morris *et al.* 2005). Por lo tanto, distintas marcas de fosforilación se han visto asociadas con diferentes estadios de transcripción, lo cual ha llevado a proponer la existencia de un equilibrio dinámico entre la fosforilación y desfosforilación del CTD de la RNAPII que permitiría cambios conformacionales al complejo de la RNAPII, dándole unas características particulares (Phatnani *et al.* 2006). En este sentido, tiene un interés muy especial el estudio de las proteínas quinasas y fosfatasas capaces de ejercer dichas modificaciones en el CTD de la RNAPII (Kobor *et al.* 2002; Oelgeschlager 2002; Meinhart *et al.* 2005).

TABLA I. Principales quinasas y fosfatasas del CTD de la RNAPII identificadas en humanos con un papel relevante durante la transcripción

<i>Quinasa del CTD</i>	<i>Modificación</i>	<i>Principal función descrita</i>
CDK7 (TFIIH)	Principalmente S5	Favorece el escape del promotor
CDK8 (<i>Mediator</i>)	S5 y S2	Bloqueo de la iniciación
CDK9 (P-TEFb)	Principalmente S2	Elongación de la transcripción
<i>Fosfatasa del CTD</i>		
FCP1	S5 y S2	Reciclaje de la RNAPII
SCPs (SCP1, 2 y 3)	Preferencia por S5	Implicada en el silenciamiento de genes neuronales (Yeo <i>et al.</i> 2005)*. Implicadas en atenuación transcripcional dependiente del receptor de andrógenos (Thompson <i>et al.</i> 2006)*.
Ssu72	Preferencia por S5	Involucrada en elongación (función descrita en levaduras) (Reyes-Reyes <i>et al.</i> 2007)*.

* Se indican las referencias no incluidas en las revisiones sugeridas. SCPs, *Small CTD Phosphatases*.

Entre las quinasas identificadas en humanos, las que tienen un papel más destacado durante el ciclo de transcripción son las quinasas dependientes de cicilina CDK7 y CDK9. La proteína CDK7, componente del complejo TFIIH, fosforila la S5 del CTD poco después de iniciarse la transcripción, y dicha modificación se encuentra implicada en el escape del promotor (Akoulitchev *et al.* 1995; Dvir *et al.* 1997; Komarnitsky *et al.* 2000; Saunders *et al.* 2006). La proteína quinasa CDK9, subunidad del complejo denominado factor positivo de la elongación transcripcional b (P-TEFb), fosforila la S2 del CTD de la RNAPII (Marshall *et al.* 1996). Dicha modificación define la transición que ocurre en el complejo de transcripción desde un estado no competente para la elongación a un estado procesivo o competente en elongación, capaz de transcribir por completo el molde de DNA (Peterlin *et al.* 2006).

La principal fosfatasa del CTD descrita en humanos es la proteína FCP1, capaz de defosforilar la S2 y la S5 (Lin *et al.* 2002) y de estimular la elongación transcripcional *in vitro* (Cho *et al.* 1999; Mandal *et al.* 2002). Se cree que la función principal de FCP1

es reciclar las moléculas de RNAPII para permitir así el inicio de un nuevo ciclo de transcripción (Mandal *et al.* 2002).

En la Figura 4 se esquematizan las reacciones de fosforilación y defosforilación del CTD de la RNAPII a lo largo del ciclo de transcripción, dando lugar a cambios conformacionales que cambian la composición y características del complejo. La visión simplificada de los procesos de fosforilación/defosforilación descrita puede ser en realidad mucho más compleja. El CTD de la RNAPII está formado en humanos por 52 repeticiones del heptapéptido consenso, que sin embargo no son idénticas en secuencia y, dependiendo de la posición que ocupan en el propio CTD, algunas repeticiones son más degeneradas que otras (Chapman *et al.* 2008). Como consecuencia, la fosforilación en cada una de ellas sería diferente, y este patrón diferencial de fosforilación del CTD podría también tener un papel regulador (Phatnani *et al.* 2006). Añadiendo mayor complejidad, se ha descrito la modificación del CTD por fosforilación en la S7 del heptapéptido (Chapman *et al.* 2007; Egloff *et al.* 2007), así como otro tipo de modificaciones -como la glicosilación, ubiquitinación o isomerización de prolinas- que generan diferentes patrones de modificación en el CTD. Por todo ello, se ha postulado la existencia del llamado “código del CTD”, comparable al propuesto “código de histonas”, que sería reconocido o “leído” por diferentes complejos proteicos en las etapas adecuadas de la transcripción (Buratowski 2003; Phatnani *et al.* 2006; Corden 2007; Egloff *et al.* 2008).

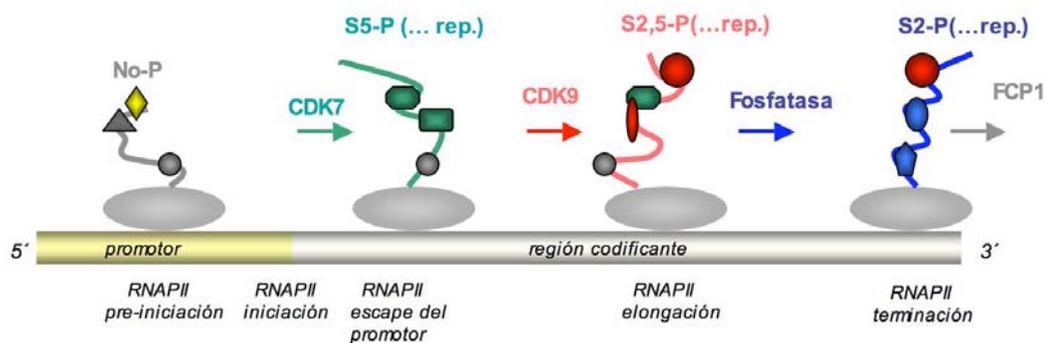


Figura 4. Esquema de los procesos de fosforilación y defosforilación del CTD de la RNAPII durante el ciclo de transcripción (Modificado de (Phatnani *et al.* 2006)). Se muestran la RNAPII (óvalo gris) con el dominio CTD (línea) en diferentes colores según su estado de fosforilación. Gris, no fosforilado (No-P); verde, fosforilado en la S5 (S5-P); rojo, fosforilado en la S5 y S2 (S2,5-P) y azul, fosforilado en la S2 (S2-P). En cada estado del complejo esquematizado, (...rep.) indica un número posible de repeticiones del CTD en ese estado de fosforilación. La línea representando el CTD de la RNAPII tiene diferente forma indicando posibles cambios conformacionales. Las figuras geométricas representan proteínas asociadas al complejo. Se indican las quinasas y fosfatasas descritas que ejercen la modificación.

4.2. Evidencias de regulación de la elongación transcripcional en eucariotas

La regulación de la elongación transcripcional se estableció hace tiempo como un mecanismo de control de la transcripción en organismos procariotas pero no se ha definido como tal en eucariotas hasta más recientemente. El primer ejemplo donde se observó que la etapa de la elongación de la transcripción en eucariotas debía ser un paso regulado fue en el gen inducido por choque térmico (*heat-shock*) hsp70 de *Drosophila melanogaster*. En este gen, se observó que la RNAPII que había iniciado la síntesis de RNA, se encontraba acumulada en la zona proximal al promotor en condiciones en las que no existía inducción, y no era capaz de producir moléculas de mRNA completo (Rougvie *et al.* 1988). A esa acumulación de moléculas de RNAPII en la zona próxima al inicio de la transcripción se le llamó “parada próxima al promotor” (*promoter-proximal pausing*) (Lis 1998). Este proceso está descrito en más detalle en el apartado 5 de esta sección.

El mismo fenómeno se observó en genes humanos como por ejemplo c-myc (Krumm *et al.* 1992). El gen c-myc codifica una proteína de unión a DNA involucrada en el control de la proliferación celular y su expresión se ha visto alterada en una gran variedad de tumores. En este gen se vio que, mientras los niveles de mRNA en células que están proliferando son elevados, estos niveles se reducen dramáticamente cuando las células se diferencian (Spencer *et al.* 1991). Experimentos de “*nuclear run-on*” y “*footprinting in vivo*” determinaron que los niveles de expresión del gen c-myc se encuentran en parte asociados a mecanismos que controlan la elongación de la transcripción (Bentley *et al.* 1986; Eick *et al.* 1986; Krumm *et al.* 1992). Otros ejemplos en los que se ha estudiado la elongación transcripcional como mecanismo de control de la expresión génica son el gen de la adenosina deaminasa (ADA), del factor de necrosis tumoral TNF- α , el gen jun-b, c-fos o los genes del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-1) (Spencer *et al.* 1990; Uptain *et al.* 1997).

4.2.1. Regulación de la elongación transcripcional del VIH-1

El VIH-1 pertenece a la familia de los retrovirus complejos y durante su ciclo infectivo se integra en el genoma celular. Una vez integrado, el VIH-1 puede permanecer en un estado latente o replicarse de forma activa dando lugar a nuevas partículas virales (McCune 1995). La expresión génica del provirus está regulada, durante la transcripción, mediante un proceso complejo en el que intervienen tres

elementos claves: a) el DNA proviral asociado a cromatina, b) factores de transcripción celulares y c) el factor de trans-activación viral Tat (Wu 2004).

La fase inicial de la transcripción está regulada por la interacción de factores de transcripción celulares con las secuencias de DNA presentes en la región promotora del LTR (*Long Terminal Repeat*) inducidos durante la activación linfocitaria T. Entre ellos, NF-κB representa el principal factor regulador de la transcripción en linfocitos T-CD4⁺ (Alcami *et al.* 1995). Independientemente del sitio de integración, el promotor del VIH-1 está ensamblado entre tres nucleosomas: nuc-0, -1 y -2. El nucleosoma nuc-1 se encuentra inmediatamente “aguas abajo” del sitio de inicio de la transcripción y se desestructura rápidamente cuando el promotor se activa. La región del LTR entre los nucleosomas nuc-0 y nuc-1 es lo suficientemente grande para permitir que ciertos factores de transcripción celulares interactúen con la secuencias de DNA permitiendo la desestructuración de los nucleosomas y el inicio de la transcripción (Verdin *et al.* 1993; Steger *et al.* 1997).

El LTR viral contiene los elementos típicos reguladores de un promotor eucariótico, con secuencias potenciadoras de la transcripción (*enhancer*) y sitios de unión para distintos factores de transcripción (Jones *et al.* 1994) (Figura 5). La transcripción dirigida desde el promotor del VIH-1 es, sin embargo, muy ineficiente *in vivo* y es

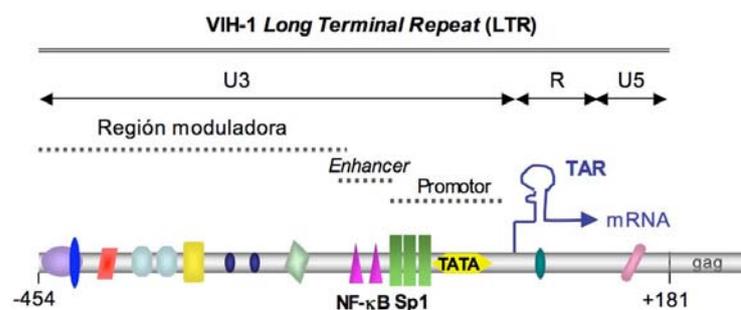


Figura 5. Estructura del promotor VIH-1 (5'LTR). Se indica la posición de las regiones U3, R y U5 que integran el LTR viral. El LTR contiene sitios de unión para numerosos factores de transcripción, representados aquí con formas geométricas. Con una línea azul se indica el sitio de inicio de la transcripción y la estructura de RNA TAR presente en el extremo 5' de los mRNAs virales.

necesaria la proteína viral trans-activadora viral Tat para estimular la transcripción, incrementando en más de 500 veces el nivel de los mRNAs del VIH-1 (Marciniak *et al.* 1990; Cullen 1992). Tat es una proteína reguladora que se expresa en tiempos tempranos del ciclo viral, y se ha visto implicada en diferentes procesos que son claves para el virus (Brigati *et al.* 2003); la delección del gen que codifica Tat demostró que es esencial para

la replicación viral (Dayton *et al.* 1986). Se observó que en ausencia de Tat sólo se producen transcritos cortos no poliadenilados, sin embargo, en presencia de esta proteína se produce una estimulación de la eficiencia de elongación del complejo transcripcional la cual resulta en un aumento de los niveles de transcrito completo (Cullen 1992). Este tipo de control transcripcional no se había observado previamente, por lo que el trabajo con la proteína Tat significó un nuevo modelo acerca del mecanismo de regulación transcripcional. Tat se une a una secuencia de RNA en forma de tallo y horquilla (*stem-loop*) que se forma en el extremo 5' de los transcritos virales, denominada TAR (*Trans-Activation-Response RNA element*) (Jones *et al.* 1994; Price 2000). El estudio del mecanismo de acción de Tat a través de su interacción con TAR reveló que se asocia con una actividad quinasa presente en las células huésped y que es finalmente responsable de la estimulación transcripcional ejercida sobre el LTR (Herrmann *et al.* 1993, 1995). El complejo P-TEFb, formado por la proteína quinasa CDK9 y la subunidad reguladora CiclinaT1, fue encontrado como el complejo asociado a Tat que contiene dicha actividad (Mancebo *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997; Zhu *et al.* 1997). Tat interacciona con la proteína Ciclina T1, y esta unión es necesaria y suficiente para el reconocimiento del elemento TAR (Wei *et al.* 1998). De esta forma, la quinasa CDK9 es capaz de fosforilar el CTD de la RNAPII favoreciendo la expresión de los genes virales, ya que incrementando la fosforilación del CTD se estimula la eficiencia de elongación de la RNAPII (Lee *et al.* 1997). El mecanismo de activación de la elongación transcripcional ejercido por Tat a través de TAR está esquematizado en la Figura 6.

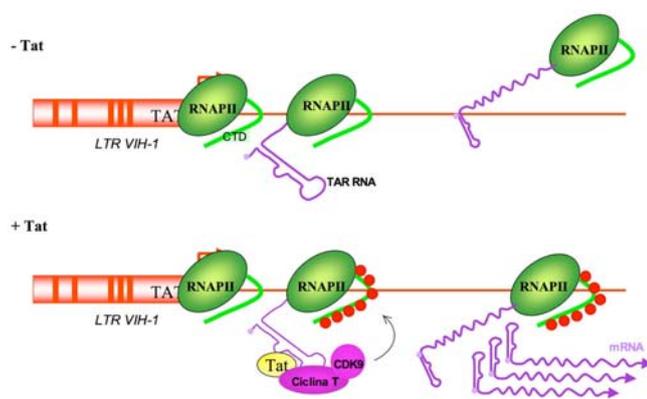


Figura 6. Esquema del mecanismo de activación transcripcional de los genes del VIH-1 por la proteína Tat a través del elemento de RNA TAR. Se representan dos situaciones, ausencia de Tat (-Tat), y presencia de Tat (+Tat). Los círculos rojos indican la fosforilación del CTD de la RNAPII ejercida por CDK9. Es un modelo simplificado ya que no se representan otras proteínas celulares implicadas en el proceso de trans-activación mediada por Tat.

Durante la transcripción se ha visto que Tat puede actuar a través de otros mecanismos; Tat es capaz de interactuar con factores de transcripción generales y específicos y promover el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de cromatina, favoreciendo así la transcripción viral (Brigati *et al.* 2003).

4.3 Factores que regulan la etapa de elongación de la transcripción

Son numerosos los factores identificados que regulan la elongación transcripcional. De manera general, se podrían clasificar en dos grandes categorías: Factores negativos de elongación (N-TEFs, *Negative Transcription Elongation Factors*) y factores positivos de elongación (P-TEFs, *Positive Transcription Elongation Factors*) (Price 2000).

Entre los N-TEFs, se han identificado los complejos multiproteicos DSIF y NELF, que promueven la pausa o parada del complejo de la RNAPII en la zona próxima al promotor (Wada *et al.* 1998; Yamaguchi *et al.* 1999); y más recientemente la proteína Pcf11, capaz de producir una terminación prematura de la transcripción (Zhang *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007).

Entre los P-TEFs, los primeros factores identificados se describieron en base a estudios bioquímicos en los que se apreciaba una modificación en la actividad catalítica de la RNAPII en sistemas de transcripción purificados, como por ejemplo, la función ejercida por los factores TFIIS, TFIIF, ELL, Elonginas o CSB (Shilatifard *et al.* 2003; Sims *et al.* 2004). Sin embargo, durante los últimos años se han descrito una gran variedad de proteínas asociadas con el complejo de la RNAPII que se encuentra transcribiendo y potencialmente participan en la elongación. –típicamente, experimentos basados en la asociación con la RNAPII hiperfosforilada (aislamiento bioquímico), y en la asociación con la región codificante del gen en estudio (immunoprecipitación de cromatina o ChIP)-. La implicación funcional de dichas proteínas ha hecho aumentar el número de factores capaces de influenciar la etapa de la elongación transcripcional, englobando junto con los anteriores a) las quinasas/fosfatasa encargadas de modificar el CTD de la RNAPII, que ejercen un control sobre los distintos estadios de la transcripción, y b) aquellos factores que facilitan la elongación transcripcional a través del molde de cromatina, como son los complejos remodeladores de cromatina o los implicados en el desensamblaje y reensamblaje o recambio de histonas (Sims *et al.* 2004).

Los factores más representativos están agrupados en la TABLA II. Algunos de ellos

TABLA II. Principales factores moduladores de la elongación descritos en humanos

<i>Factor</i>	<i>Propiedades en la elongación transcripcional</i>
<i>Factor de elongación</i>	
TFIIS	Estimula la eficiencia de elongación induciendo el corte del transcrito naciente y reposicionando el extremo 3' en el centro catalítico de la RNAPII. Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Pokholok <i>et al.</i> 2002).
ELLS	Estimulan la tasa de elongación de la RNAPII <i>in vitro</i> (Shilatifard <i>et al.</i> 1996). Se asocian con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Gerber <i>et al.</i> 2001).
Elonginas	Estimulan la tasa de elongación de la RNAPII <i>in vitro</i> (Bradsher <i>et al.</i> 1993; Bradsher <i>et al.</i> 1993). Se asocian con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Gerber <i>et al.</i> 2004).
TFIIF	Estimula la elongación de la RNAPII <i>in vitro</i> (Flores <i>et al.</i> 1989; Tan <i>et al.</i> 1994). Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Krogan <i>et al.</i> 2002).
CSB	Estimula la tasa de elongación de la RNAPII <i>in vitro</i> (Selby <i>et al.</i> 1997). Actividad remodeladora de cromatina (Citterio <i>et al.</i> 2000).
DSIF	Promueve la parada próxima al promotor junto con NELF <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Wada <i>et al.</i> 1998; Wu <i>et al.</i> 2003). Es fosforilado por P-TEFb y así estimula la elongación transcripcional. Está presente en complejos de elongación (Yamada <i>et al.</i> 2006).
NELF	Promueve la parada próxima al promotor junto con DSIF (Wada <i>et al.</i> 1998; Wu <i>et al.</i> 2003). Es fosforilado por P-TEFb y se disocia del complejo de transcripción (Fujinaga <i>et al.</i> 2004).
FCP1	Estimula la elongación transcripcional <i>in vitro</i> (Cho <i>et al.</i> 1999). Desfosforila la S2 y la S5 del CTD, permite el reciclaje de la RNAPII (Mandal <i>et al.</i> 2002). Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Cho <i>et al.</i> 2001).
TFIIH	Fosforila la S5 del CTD RNAPII y favorece escape del promotor (Dvir <i>et al.</i> 1997). Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Schwartz <i>et al.</i> 2003).
P-TEFb	Fosforila la S2 del CTD RNAPII y otros factores de elongación, DSIF y NELF. Permite superar la parada próxima al promotor y alcanzar una elongación productiva. Se asocia con complejos de elongación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Peterlin <i>et al.</i> 2006).
Pcf11	Implicada en la disociación de los complejos de elongación del molde de DNA (Zhang <i>et al.</i> 2005). Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Zhang <i>et al.</i> 2007).
Tat-SF1	Cofactor de Tat para la estimulación de la elongación de los genes del VIH-1 (Zhou <i>et al.</i> 1996). Factor general de elongación <i>in vitro</i> (Li <i>et al.</i> 1998).
FACT	Facilita la elongación a través de cromatina y en moldes de DNA desnudo (Orphanides <i>et al.</i> 1998; Wada <i>et al.</i> 2000). Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Saunders <i>et al.</i> 2003). Actividad chaperona de histonas, elimina/reemplaza dímeros H2A/H2B y mantiene la arquitectura de la cromatina durante la transcripción (Belotserkovskaya <i>et al.</i> 2003).
Spt6	Estimula la tasa de elongación de la RNAPII <i>in vitro</i> sobre DNA desnudo (Endoh <i>et al.</i> 2004). Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Andrulis <i>et al.</i> 2000). Actividad chaperona de histonas, mantiene la estructura de la cromatina durante la elongación transcripcional (Kaplan <i>et al.</i> 2003).
ASF1	Chaperona de histonas, elimina/reemplaza tetrámeros H3/H4 durante la elongación transcripcional (Schwabish <i>et al.</i> 2006).
CHD1	Remodela la cromatina dependiente de ATP. Se asocia con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Simic <i>et al.</i> 2003).
SWI/SNF	Remodelan cromatina de manera dependiente de ATP. Se asocian con complejos de elongación <i>in vivo</i> (Corey <i>et al.</i> 2003).

parecen tener funciones redundantes *in vitro*, aunque no se conoce en profundidad ni el contexto específico en el cual podrían actuar ni los requerimientos de cada uno de ellos *in vivo* (Sims *et al.* 2004; Armstrong 2007).

Además de los factores que directamente modulan la elongación de la transcripción existen otros que están relacionados con la regulación de ésta de manera indirecta, por ejemplo el gran número de factores que ejercen diversas modificaciones de histonas (acetilación, metilación, etc.) las cuales permiten mantener un ambiente de cromatina que favorece, o no, el paso de la RNAPII, controlando también el reclutamiento de factores implicados en elongación (Li *et al.* 2007). Dentro de este grupo de moduladores indirectos también se podrían incluir por ejemplo las proteínas topoisomerasas, que regulan las torsiones producidas en la hebra de DNA durante la transcripción (Ljungman *et al.* 1995).

Añadiendo mayor complejidad, se ha propuesto que algunos factores implicados en otros procesos podrían tener también un papel regulador sobre la elongación, como son las proteínas implicadas en reparación de DNA, proteínas de transporte de mRNA, la subunidad 19S del proteasoma, o los factores de *splicing* (Ferdous *et al.* 2001; Fong *et al.* 2001; Reed 2003; Svejstrup 2003; Lin *et al.* 2008). Todo ello ha extendido la idea acerca la elongación transcripcional constituye un estadio central para integrar y coordinar múltiples eventos que suceden co-transcripcionalmente (Sims *et al.* 2004).

4.4. Acoplamiento entre elongación de la transcripción y *splicing* del mRNA

Como se ha comentado anteriormente, mientras se produce la transcripción del mRNA, éste va siendo procesado por las distintas maquinarias específicas para dar lugar al transcrito maduro. Existen numerosas evidencias que sugieren no sólo una asociación temporal entre los procesos, sino también una interdependencia funcional (Pandit *et al.* 2008). Se han propuesto dos posibles mecanismos no excluyentes entre sí que explicarían las distintas observaciones experimentales.

Por un lado, el modelo cinético postula que la procesividad del complejo de la RNAPII que está elongando influenciaría en determinados genes la selección de los sitios de *splicing in vivo*, teniendo un profundo impacto en el *splicing* alternativo. Así, según este modelo, cuando el complejo transcripcional es procesivo, se presentarían simultáneamente dos sitios de *splicing* correspondientes a dos exones; y en este caso, se elegiría el sitio de reconocimiento más “fuerte”. El reconocimiento de sitios de *splicing* “débiles” en un exón particular estaría favorecido por un complejo poco procesivo, ya

que no competiría con un sitio de *splicing* “fuerte” a la hora de ser reconocido por el *spliceosoma* (complejo macromolecular que cataliza y lleva a cabo las reacciones de *splicing* (Kornblihtt 2006). Por otro lado, el modelo de reclutamiento se centraría en el papel del CTD de la RNAPII como elemento esencial al que se unirían los distintos componentes de las maquinarias de síntesis y procesamiento del mRNA. Según este modelo, existirían factores “acopladores”, que potencialmente podrían participar en una regulación coordinada entre transcripción y *splicing*. Entre ellos, se han propuesto el factor de elongación Tat-SF1, el cofactor transcripcional CA150/TCERG1, o los factores SKIP, PSF o p54_{nrb} (Kornblihtt *et al.* 2004; Pandit *et al.* 2008).

4.4.1. El factor CA150/TCERG1

CA150, también denominado TCERG1 (*Transcription Elongation Regulator Factor 1*, nomenclatura del comité HUGO), fue aislado por primera vez como un componente de fracciones de extracto nuclear de células HeLa purificadas mediante cromatografía de afinidad a la proteína viral Tat del VIH-1 y se comprobó que *in vitro* es un cofactor para la transactivación del LTR mediada por Tat (Sune *et al.* 1997). La mayoría de los estudios funcionales *in vivo* se han basado en el uso de reporteros transfectados de forma transitoria en líneas celulares y la sobre-expresión de construcciones derivadas de CA150. Este tipo de ensayos evidenció que la sobre-expresión de CA150 puede ejercer sobre el complejo transcripcional una acción represora sobre ciertos promotores, a nivel de elongación. Se observó que el LTR del VIH-1 y el promotor α -4-integrina eran mucho más sensibles que otros como CMV o SV-40, y dicha modulación de la actividad dependía en gran medida de la integridad de la caja TATA (Sune *et al.* 1999).

CA150 es una proteína especialmente rica en motivos y dominios implicados en mediación de interacciones proteína-proteína, siendo los elementos más notables en su composición estructural los dominios WW y los dominios FF (Sune *et al.* 1997). Los datos experimentales disponibles hasta la fecha demuestran la asociación física con la maquinaria transcripcional: se asocia con factores de elongación (Sanchez-Alvarez *et al.* 2006), e *in vitro* se ha descrito una interacción directa con el CTD de la RNAPII fosforilado (P-CTD) (Carty *et al.* 2000). Se ha demostrado que CA150 se encuentra asociada, además de con componentes de la maquinaria transcripcional, con componentes de la maquinaria de *splicing* (Sanchez-Alvarez *et al.* 2006). Se la ha encontrado formada parte del *spliceosoma* en la práctica totalidad de los análisis proteómicos, tanto en complejos ensamblados *in vitro* (Zhou *et al.* 2002) como *in vivo*

(Chen *et al.* 2007). Además *in vitro* interacciona directamente con SF1, un factor esencial de *splicing* (Goldstrohm *et al.* 2001).

5. PARADA PRÓXIMA AL PROMOTOR (*PROMOTER-PROXIMAL PAUSING*)

Se conoce como parada próxima al promotor o *promoter-proximal-pausing* el fenómeno por el cual el complejo de la RNAPII sufre una parada en la zona 5' de una unidad transcripcional particular y sólo progresa de manera eficiente dando lugar a una elongación productiva si se produce una estimulación o señal apropiada.

Estudios de la transcripción realizados con el análogo de ATP, el 5,6-dicloro-1- β -ribofuranosilbencimidazol (DRB), inhibidor de varias proteínas quinasas, mostraron que el tratamiento de las células con dicho compuesto producía una disminución dramática de los niveles de mRNA, dando lugar a la aparición de transcritos cortos que ya habían adicionado la estructura *cap* (Sehgal *et al.* 1976; Tamm *et al.* 1980). Estudios posteriores realizados *in vitro* e *in vivo* concluyeron que el DRB inhibía la elongación de la transcripción pero no la iniciación (Chodosh *et al.* 1989; Marshall *et al.* 1992). Estos trabajos predijeron la existencia de factores sensibles a DRB que influyen la elongación proponiendo así la existencia de un mecanismo regulador en esta etapa de la transcripción. Así, después de iniciarse la transcripción, el complejo de la RNAPII sufre una pausa debida a la influencia de factores negativos de la elongación, N-TEFs, quedando pausado cerca del promotor (parada próxima al promotor). Estudios recientes sitúan esta pausa en posiciones alrededor del +45 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Se necesita la acción de un factor positivo, P-TEF, que permita superar los efectos negativos, y así la RNAPII entraría en una fase de elongación productiva. Un factor positivo, o P-TEF, sería de esta manera la principal diana de DRB (Marshall *et al.* 1992). En resumen, el uso del DRB utilizando como modelo los genes del VIH-1, y el gen *hsp70* de *Drosophila melanogaster* permitió la identificación de los factores de elongación positivos, P-TEFb, y negativos, DSIF (*DRB-Sensitive Inducing Factor*) y NELF (Factor negativo de elongación) (Marshall *et al.* 1996; Wada *et al.* 1998; Yamaguchi *et al.* 1999).

A continuación se describe el modelo actual sobre el fenómeno de parada próxima al promotor, el cual se ve esquematizado en la Figura 7. Una vez que se ha iniciado la síntesis del RNA y después de la fase de escape del promotor, los factores DSIF y NELF se asocian con el complejo de transcripción y actúan en un primer paso

cooperativamente para provocar la pausa del complejo transcripcional. Esta asociación es dependiente de la fosforilación de la S5 del CTD. P-TEFb es necesario para la transición del complejo hacia una elongación productiva (Ni *et al.* 2008) y ejecuta su función fosforilando el CTD de la RNAPII, en la S2, así como los factores DSIF y NELF. P-TEFb permanece asociado al complejo transcripcional, mientras que NELF se disocia, y DSIF fosforilado permanece también asociado al complejo transcripcional. Se ha observado que DSIF, una vez fosforilado por P-TEFb, estimula la elongación de la transcripción (Peterlin *et al.* 2006).

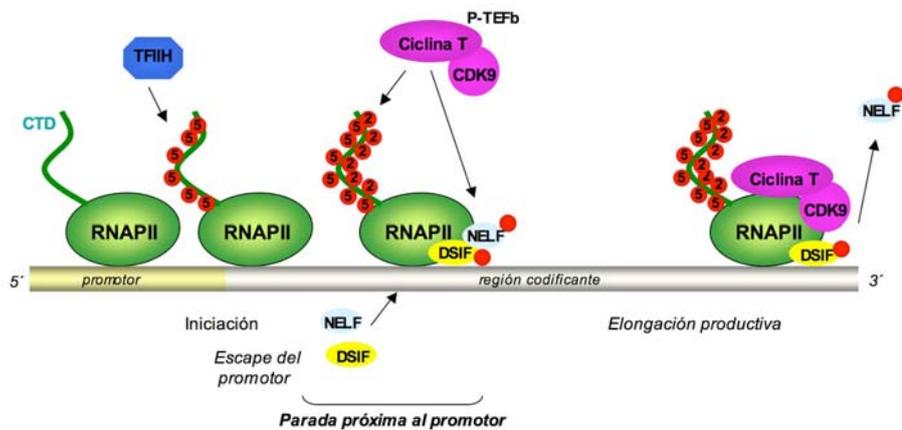


Figura 7. Representación esquemática del proceso de parada próxima al promotor (Modificado de (Zhou *et al.* 2006). La modificación por fosforilación está representada por un círculo rojo. En el caso del CTD de la RNAPII, el número 5 indica la fosforilación de la S5 y el número 2 la de la S2.

Aunque durante las dos últimas décadas se han descrito ejemplos de genes regulados a nivel del proceso de la parada próxima al promotor, esto se había considerado como excepcional. Sin embargo, recientes estudios genómicos sugieren que esta regulación es mucho más frecuente de lo previamente supuesto (Muse *et al.* 2007; Zeitlinger *et al.* 2007; Core *et al.* 2008).

5.1. El complejo P-TEFb

El papel del complejo P-TEFb está siendo ampliamente estudiado debido a su implicación en la fosforilación del CTD de la RNAPII, y al reconocimiento de esta modificación como un punto central en el control de la transcripción (Peterlin *et al.* 2006; Bres *et al.* 2008).

Distintos tipos de complejos P-TEFb han sido descritos aunque los efectos y dianas de cada uno de ellos no se conocen en profundidad. Como se ha comentado

anteriormente, P-TEFb está formado por dos subunidades: la proteína quinasa CDK9 y la subunidad reguladora Ciclina T. Existen cuatro tipos de Ciclinas, T1, T2a, T2b y K, siendo la mayoritaria la Ciclina T1 (Peng *et al.* 1998; Fu *et al.* 1999); y dos isoformas de CDK9 (Shore *et al.* 2003). Se ha visto que ambas proteínas se expresan de manera ubicua aunque con diferencias en los patrones de expresión de los diferentes tipos e isoformas en los tejidos analizados (Grana *et al.* 1994; Peng *et al.* 1998). Tanto CDK9 como la Ciclina T pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que pueden afectar a su funciones (Peterlin *et al.* 2006); por ejemplo, la auto-fosforilación en la zona carboxilo terminal de CDK9 se requiere para la asociación con la proteína viral Tat y la estructura TAR en los genes del VIH-1 (Fong *et al.* 2000; Garber *et al.* 2000).

Un mecanismo importante por el cual se regula la función de P-TEFb es mediante su asociación, de manera reversible, a complejos inactivos. Diversos estudios destinados a identificar proteínas nucleares con capacidad de unión a P-TEFb y por tanto, controlar así su actividad, han revelado que en células humanas (HeLa) aproximadamente el 50% de P-TEFb se encuentra formando parte de grandes complejos inactivos. Éstos están formados por el RNA nuclear de pequeño tamaño 7SK snRNA, un dímero de la proteína HEXIM 1 o HEXIM 2, y las proteínas MEPCE y LARP7 (Price 2008). Aunque no se conocen en detalle los mecanismos que llevan a la liberación de P-TEFb de estos complejos, se ha visto que la población de P-TEFb inactiva no permanece estática en la célula sino que se encuentra en equilibrio permanente con la forma activa dependiendo de las condiciones celulares (Yang *et al.* 2005) (Figura 8).

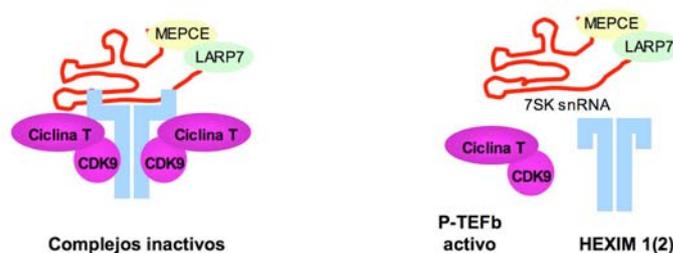


Figura 8. Esquema representando los complejos inactivos de P-TEFb y su disociación reversible (modificado de (Price 2008)). En azul se representa un homo/hetero-dímero de las proteínas HEXIM, que presentan diferente forma debido a un cambio conformacional. La línea dibujada en rojo representa la molécula de RNA 7SK snRNA.

Estudios sobre la relevancia funcional de P-TEFb durante el desarrollo de organismos complejos han mostrado que cuando P-TEFb se inactiva genéticamente en *Caenorhabditis elegans* se pierde la fosforilación en la S2 del CTD de la RNAPII y se

ve dramáticamente afectado el desarrollo de este nematodo (Shim *et al.* 2002). Resultados similares se han observado cuando se inactiva CDK9 en *Drosophila melanogaster* (Eissenberg *et al.* 2007). Consistente con tales observaciones, se vio que el tratamiento de células HeLa con flavopiridol, un potente inhibidor de CDK9, elimina la transcripción de la RNAPII más de un 80 % (Chao *et al.* 2001). Sin embargo, no parece ser absolutamente requerido para la elongación de todos los genes dependientes de la RNAPII, ya que han descrito ejemplos para los que no es necesario, como por ejemplo algunos de la ruta p53 (Gomes *et al.* 2006) o el gen de la histona H2b y U2 snRNA (Medlin *et al.* 2005).

5.2. Reclutamiento de P-TEFb a complejos transcripcionales

Para ejercer sus efectos sobre la RNAPII, P-TEFb debe ser incorporado a las unidades transcripcionales. El primer ejemplo descrito de reclutamiento del complejo P-TEFb fue en los genes del VIH-1 donde la proteína viral Tat, a través de su interacción mediada por RNA, sitúa a P-TEFb próximo al complejo de la RNAPII donde producirá la fosforilación del CTD.

Existe un gran interés por conocer proteínas de unión a P-TEFb que puedan mediar su reclutamiento al complejo transcripcional. Hasta el momento no se ha descrito ninguna que ejerza su función vía RNA de manera análoga a Tat; sin embargo, sí se han encontrado interacciones entre P-TEFb y numerosas proteínas implicadas en transcripción y procesamiento del mRNA. Entre ellos, se han identificado algunos factores de transcripción como NF- κ B, Myc o el co-activador CTIIA, que incorporarían al complejo P-TEFb a la zona promotora para favorecer la posterior estimulación de la transcripción de genes específicos (ver TABLA III).

Recientemente, se ha descrito la interacción de P-TEFb con Brd4 (Jang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005), una proteína involucrada en el reconocimiento de modificaciones post-traduccionales de histonas. La proteína Brd4 interacciona con histonas acetiladas, que están consideradas una marca de transcripción activa (Dey *et al.* 2003), y también se ha visto asociada con componentes del complejo *Mediator* (Houzelstein *et al.* 2002; Jang *et al.* 2005). El reclutamiento de P-TEFb al complejo transcripcional a través de Brd4 se ha propuesto como un mecanismo general que podría cooperar con el reclutamiento mediado por activadores gen-específicos (Peterlin *et al.* 2006; Bres *et al.* 2008).

Además de ser un cofactor esencial en la activación de los genes del VIH-1 mediada por Tat, la mayor o menor disponibilidad de P-TEFb y su reclutamiento hacia genes diana se han visto relacionados con crecimiento celular y diferenciación (Sano *et al.* 2002; Bellan *et al.* 2004; De Falco *et al.* 2005; He *et al.* 2006), por lo que parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular (Zhou *et al.* 2006).

TABLA III. Factores identificados para el reclutamiento de P-TEFb a genes específicos

<i>Complejo P-TEFb</i>	<i>Proteína de unión</i>	<i>Gen diana</i>	<i>Referencias</i>
CiclinaT1/CDK9	CTHIA (A)	Genes del MHC clase II	(Kanazawa <i>et al.</i> 2000)
	NF-κB (FT)	IL-8 Genes NF-κB-dependientes	(Barboric <i>et al.</i> 2001) (Nowak <i>et al.</i> 2008)
	Receptor de andrógeno (FT)	PSA	(Lee <i>et al.</i> 2001)
	Myc (FT)	cad	(Eberhardy <i>et al.</i> 2001, 2002) (Kanazawa <i>et al.</i> 2003)
	Receptor aril hidrocarburo (FT)	Cyp1a1	(Tian <i>et al.</i> 2003)
	STAT3 (FT)	p21waf1 γ-fibrinógeno	(Giraud <i>et al.</i> 2004) (Hou <i>et al.</i> 2007)
	VP16 (A)	Genes del VIH-1	(Kurosu <i>et al.</i> 2004)
	MEF2 (FT)	Genes MEF2-dependientes	(Nojima <i>et al.</i> 2008)
	AIRE	Ints2, Spt1	(Oven <i>et al.</i> 2007)
	Tat	Genes del VIH-1	(Mancebo <i>et al.</i> 1997; Yang <i>et al.</i> 1997)
Ciclina T2/CDK9	MyoD (FT)	Genes miogénicos	(Simone <i>et al.</i> 2002; Giacinti <i>et al.</i> 2006)

A: activador, FT: factor de transcripción

6. INFLUENCIA DE LA ZONA PROMOTORA EN LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL.

El proceso de parada del complejo transcripcional en regiones próximas al promotor de una unidad génica es un fenómeno extendido (ver *apartado 5* de esta sección) y en base a similitudes en el control de la elongación en algunos de los genes estudiados, se ha propuesto un modelo sobre el control de la expresión génica durante la fase de la elongación transcripcional (Cullen 1993; Krumm *et al.* 1993). Este modelo sugiere que distintos elementos del promotor podrían nuclear el ensamblaje de complejos de transcripción que se diferencian en su eficiencia de elongación.

La idea acerca de que las zonas promotoras regulan la transcripción solamente reclutando los complejos multiproteicos que llevan a cabo el inicio de la transcripción

está cambiando actualmente. Distintas evidencias apuntan a la existencia de una comunicación entre los eventos que tienen lugar en la zona promotora durante el reclutamiento del PIC y etapas posteriores al inicio de la transcripción. Por ejemplo, dominios de activación de diversos factores que promueven la formación de un PIC, como el activador transcripcional de herpesvirus VP16, pueden afectar tanto la elongación como el *splicing* de un mRNA (Nogues *et al.* 2002). Asimismo, co-reguladores de los receptores nucleares de la hormona esteroidea, como CoAA, afectan el *splicing* del mRNA en un modo dependiente del promotor (Auboeuf *et al.* 2004; Auboeuf *et al.* 2007). También se ha descrito que el factor Brm, componente del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, que actúa sobre las regiones promotoras, puede afectar las decisiones de *splicing* modificando la tasa de elongación transcripcional (Corey *et al.* 2003; Batsche *et al.* 2006; Allemand *et al.* 2008). CA150 sería otro caso para citar ya que su influencia sobre la elongación depende de la caja TATA (Sune *et al.* 1999). Por lo tanto, estas observaciones parecen indicar que la estructura del promotor y su ocupación por factores de transcripción específicos puede influenciar el desarrollo de la etapa de elongación así como el procesamiento co-transcripcional del mRNA.

Durante el desarrollo de esta Tesis se han obtenido resultados que están en la línea del modelo descrito sobre el control de la elongación y que a su vez refuerzan el papel determinante del promotor en la elongación transcripcional.

objetivos

El objetivo general de esta tesis se centra en el estudio los mecanismos moleculares de la elongación transcripcional llevada a cabo por la RNAPII, utilizando como modelos los genes del virus VIH-1 y c-myc. Los objetivos concretos abordados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Establecer un sistema de transcripción-elongación *in vitro* para el estudio de la regulación transcripcional de los genes del VIH-1 y c-myc.
2. Estudiar el requerimiento funcional del complejo P-TEFb en la regulación transcripcional del gen c-myc.
 - 2.1. Examinar el papel de P-TEFb en la elongación transcripcional del gen c-myc.
 - 2.2. Determinar la localización de P-TEFb en los complejos de transcripción ensamblados sobre el promotor del gen c-myc.
3. Analizar el posible requerimiento de secuencias del promotor en la activación transcripcional mediada por P-TEFb.
4. Estudiar el reclutamiento del cofactor transcripcional CA150/TCERG1 a un gen. Analizar la asociación de CA150 con complejos transcripcionales en los genes del VIH-1.

materiales y métodos

1. CÉLULAS EUCARIÓTICAS

1.1. Líneas celulares

La línea celular HeLa (ATCC CCL-2), procedente de un carcinoma cervical humano, fue cedida al laboratorio por el Dr. J. Ortín (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España). La línea celular 293T (HEK 293T/17), procedente de riñón embrionario humano, fue adquirida por el laboratorio a la *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-11268). La línea celular Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8 es derivada de la línea celular Jurkat, procedente de un linfoma T humano. Fue creada, y cedida al laboratorio, por el laboratorio del Dr. E. Muñoz (Universidad de Córdoba, Córdoba, España). Se generaron los virus derivados de VIH-1 en células productoras 293T y posteriormente se infectaron células Jurkat. Se utilizó el vector pHR⁻2xTat.Flag-IRES-eGFP (Jordan *et al.* 2001).

1.2. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares HeLa, 293T y Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8 se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % (v/v) y una humedad del 95 % en el medio de cultivo correspondiente. Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con aminoácidos no esenciales al 1 % (Sigma), 4 mM de L-glutamina (Sigma), penicilina-estreptomicina a 100 unidades y 100 µg/ml respectivamente y 5 % de suero fetal bovino (FBS) (Bio-Whittaker, Cambrex). Las células 293T se mantuvieron del mismo modo que las HeLa excepto que se suplementó el medio DMEM con 10 % de FBS. Las células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8 se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Cambrex) suplementado como se ha descrito para las células HeLa excepto que añadió 10 % de FBS.

Las líneas celulares se almacenaron mediante congelación a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido a una densidad 5-6 millones células/ml en FBS al 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO).

1.3. Transfecciones transitorias de células HeLa y 293T

Las transfecciones transitorias de células HeLa se realizaron por el método de precipitación por fosfato cálcico en placas de 35 mm de diámetro (Falcon/Becton Dickinson Labware). Los pocillos se sembraron con 4-5 x 10⁵ células en medio de cultivo completo 20 horas antes de la transfección, 4 horas antes se les cambió el medio

y pasado este tiempo llegaron a una confluencia del 50-60 %. Para las transfecciones se mezclaron en cada caso 200 μ l la solución A (250 mM CaCl_2) con el DNA correspondiente, se añadieron 200 μ l de solución B (50 mM Hepes, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 140 mM NaCl; pH ajustado a 7.05) y se incubaron exactamente durante 1 min a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se distribuyó uniformemente en cada pocillo y las células se mantuvieron en cultivo aproximadamente 14 horas, tras las cuales se retiró la solución de transfección y se añadió medio de cultivo completo. Se utilizaron 1-2 μ g de cada vector reportero y 2 μ g del vector de expresión de la proteína efectora. Como control interno de la transfección se usó 1 μ g del vector reportero CMV-CAT, y el plásmido pSV β GAL se utilizó para mantener constante la cantidad de ácidos nucleicos. Las transfecciones se realizaron al menos con dos preparaciones distintas de los plásmidos purificados. Las células se recogieron manualmente con una paleta 40-42 horas después de la transfección en tampón fosfato salino (PBS) frío, se lavaron con el mismo tampón y se lisaron con 250 μ l de tampón T (20 mM Hepes pH 7.9, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 5 mM EDTA, 1 mM DTT e inhibidores de proteasas *Complete* (Roche) durante 30 min a 4°C, agitando suavemente cada 5 min. Se utilizaron 100 μ l del extracto para la medida de la actividad luciferasa en un luminómetro de placa (Berthold Detection Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante del reactivo *Luciferase Assay Reagent* (Promega). La actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se midió con 100 μ l del extracto utilizando los reactivos *Kit CAT Elisa* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante en un espectrofotómetro de placa.

Las células 293T se transfectaron en placas de 35 mm de diámetro utilizando el reactivo comercial *PolyFect* (Quiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Estos experimentos se realizaron junto con Rosana Torremocha.

1.4. Estimulación de células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8

Las células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8 se contaron utilizando una cámara *Neubauer* y estando a 1 millón/ml se estimularon con 25-50 μ g/ μ l de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma) disuelto en DMSO. Como control, las células fueron tratadas con la misma cantidad de vehículo DMSO. Se mantuvieron en cultivo y se recogieron en los tiempos indicados después de la estimulación.

2. BACTERIAS

2.1. Cepas y cultivos de bacterias

El clonaje de los plásmidos utilizados en este trabajo se realizó de rutina en la cepa bacteriana DH5 α de *E. coli*. Para la obtención del plásmido pGEX2TKHIVTat utilizado para la purificación de la proteína Tat se utilizó la cepa de bacterias BL21(DE3)pLysS competentes de *E. Coli* (Stratagene).

Las bacterias se crecieron en medio líquido *Luria-Bertani* o LB (bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l). Para el aislamiento de colonias se utilizó medio LB sólido (15 g de agar por litro de LB). El medio, líquido o sólido, se suplementó con el antibiótico adecuado (ampicilina 100 μ g/ml, LB-Amp) para la selección de bacterias transformadas con los plásmidos. Las bacterias se crecieron a 37°C en agitación.

2.2. Preparación de bacterias competentes para transformación por choque térmico

Las bacterias DH5 α competentes se prepararon a partir de una colonia única crecida en medio sólido, que se amplificó en 5 ml de medio LB durante la noche a 37°C y posteriormente en un litro de medio SOB (20 g/l bactotripton, 5 g/l extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) a 18°C durante aproximadamente 30 horas hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,6. Las bacterias se incubaron en hielo 10 min y se sedimentaron por centrifugación a 4000 g durante 10 min a 4°C, tras lo cual se resuspendieron en 80 ml de solución TB fría (10 mM Pipes pH 6.7, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) y se incubaron 10 min en hielo. Tras centrifugar las bacterias a 4000g, éstas se resuspendieron en 20 ml de solución TB conteniendo 7 % DMSO, se incubaron en hielo otros 10 min y se repartieron en alícuotas para congelarlas a -80°C.

2.3. Transformación de bacterias por choque térmico

Para la transformación de 3 bacterias por choque térmico se utilizaron 50 μ l de bacterias DH5 α o BL21(DE3)pLysS competentes y 50-100 ng de plásmido purificado, o 5 μ l de reacción de ligación. La mezcla se incubó durante 20 min en hielo y posteriormente se transformaron calentando a 42 °C durante 90 seg. Después del choque por calor se incubaron durante 1 min en hielo, se añadieron 950 μ l de medio LB y las bacterias se incubaron en agitación durante 1 hora a 37°C. 100-200 μ l de bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con el

antibiótico adecuado. En el caso de la transformación de las bacterias BL21(DE3)pLysS se añadió, además, cloranfenicol (34 µg/ml).

3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar DNA por PCR se utilizaron entre 50-100 ng de molde por reacción. Para todas las amplificaciones analíticas o para las preparativas de fragmentos de DNA se añadieron, en un volumen final de 50 µl, los oligonucleótidos específicos (0,6 µM)(sintetizados por Sigma-Genosys o en el servicio de síntesis de oligonucleótidos del IPBLN), deoxinucleótidos trifosfato dATP, dTTP, dGTP y dCTP (50 µM) (New England Biolabs), MgCl₂ (1,5 mM), tampón de PCR suministrado por el fabricante y 2.5 U de enzima *Taq DNA Polymerase* (Roche) o *Taq DNA Polymerase, High Fidelity PCR system*) que posee actividad exonucleasa correctora 3'-5'. Las reacciones se realizaron en un termociclador, la temperatura de hibridación se ajustó según la secuencia del oligonucleótido, y el tiempo de elongación se modificó en función del tamaño del fragmento a amplificar y de la enzima utilizada, según las indicaciones del fabricante. Se realizaron 25 ciclos en caso de la amplificación preparativa de fragmentos, y 35 ciclos en caso de las analíticas.

3.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para la separación analítica de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa *D-1 Media EEO* (Pronadisa) al 0.7-2 %, con 1 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt) (Sigma), en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Como marcadores se utilizaron *1Kb DNA Ladder* y *100 bp DNA Ladder* (New England Biolabs).

3.3. Purificación de DNA

Los fragmentos de DNA, procedentes de reacciones de PCR o restricción, se separaron en geles de agarosa y la banda de DNA de interés se cortó y se purificó con el reactivo *GeneClean Kit* (Q-Biogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la purificación de fragmentos de < 100 pb, los fragmentos de DNA se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Éstos se tiñeron con BrEt durante 20', y se lavaron varias veces con H₂O. Los productos visualizados en un transiluminador se cortaron y se incubaron con 2 volúmenes del tampón de elución (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). Después de centrifugar se recogió el eluido y se precipitó con

con 0,1 volúmenes de 3 M NaOAc y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (100 % EtOH) frío durante 2 horas a -80°C. Después de un lavado con EtOH al 80 %, el precipitado de DNA se secó a temperatura ambiente o en un concentrador de vacío (*SpeedVac*) y se resuspendió en el volumen adecuado de H₂O.

Para la purificación del DNA en solución, se realizó una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), seguida de una extracción con cloroformo. Se precipitó el DNA como se ha indicado y se resuspendió en el volumen adecuado de H₂O.

El DNA plasmídico, crecido en bacterias en presencia del antibiótico de selección adecuado, se purificó utilizando los sistemas (i) *Plasmid Mini Kit* (Quiagen) para la preparación de volúmenes pequeños de cultivo (1.5-3 ml) o (ii) *Plasmid Maxi Kit* (Quiagen) para la preparación de grandes volúmenes de cultivo (250 ml).

El DNA de los plásmidos purificados se secuenció para confirmar la correcta secuencia e introducción de los insertos durante el clonaje.

3.4 Enzimas de restricción y modificación del DNA

Las enzimas de restricción y modificación de DNA utilizadas en la manipulación de DNA se adquirieron de New England Biolabs o Roche. Para la generación de extremos romos se utilizó el Fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I. La desfosforilación de los extremos de DNA se realizó con la enzima fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (USB). Para la ligación de DNA se empleó la DNA ligasa del fago T4. Los tratamientos enzimáticos se realizaron siguiendo protocolos estándar (Sambrook *et al.* 2001).

3.5. Marcaje radioactivo del DNA

El plásmido comercial *pBR22 DNA-MspI digest* (New England Biolabs) se marcó con [α -³²P]dCTP (Amersham), y utilizado como marcador de tamaño de fragmentos. Para realizar el marcaje se utilizó el Fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I de *E.coli*, según las indicaciones del fabricante. Para separar del DNA marcado radiactivamente del nucleótido libre se realizó una cromatografía de filtración en gel utilizando una columna en la que se depositó 1 ml de la matriz *Sephadex G-50* (Amersham). Se recogió el volumen deseado de la columna y se midió la radiactividad incorporada con un contador de centelleo.

También se utilizaron oligonucleótidos de distinto tamaño marcados con [γ -³²P]ATP (Amersham) como marcadores de tamaño. Para realizar el marcaje se utilizó la enzima

Polinucleótido Quinasa del Fago T4 (PK) (New England Biolabs), según las indicaciones del fabricante. Para separar del DNA marcado radiactivamente del nucleótido libre se realizó una cromatografía de filtración en gel utilizando una columna en la que se depositó 1 ml de la matriz *Sephadex G-25* (Amersham). Se recogió el volumen deseado de la columna y se midió la radiactividad incorporada con un contador de centelleo

4. PLÁSMIDOS

Para la construcción de los plásmidos conteniendo los *cassettes* dGless se cortó el vector pTZHIVdGless (Sune *et al.* 2000) con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* y se insertaron los fragmentos de PCR correspondientes a cada promotor. Los plásmidos dGless, las secuencias de la región promotora que contiene, (referidas al sitio de inicio de la transcripción), los plásmidos de donde provienen dichas secuencias y los oligonucleótidos (Olig.) utilizados se indican a continuación:

-HIVdGless: -133,+100 a partir de pTZHIVdGless. Olig., csn-2F/csn-3R

-HIVBLdGless: -133,+100 a partir de pTZHIVBLdGless ((Liu *et al.* 1999). Olig., csn-2F/csn-3R

-P1P2dGless: -346,+42 a partir de pX-2,8myc. Cedido por la Dra. A. Aranda, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España. Olig., csn-10F/csn11R.

-P2dGless: -94,+42 a partir de pX-2,8myc. Olig., csn-9F/csn-11R.

Los plásmidos P1P2[TAR]dGless y P2[TAR]dGless se prepararon por técnicas estándar sustituyendo las secuencias +1,+42 de dichos plásmidos por las secuencias +1,+100 del plásmido HIVdGless. Para la construcción del plásmido P2TARBLdGless se siguió la misma estrategia pero se sustituyeron las secuencias de DNA por las secuencias +1,+100 del plásmido HIVBLdGless.

El plásmido pGHIV-LUC se preparó insertando un fragmento cortado con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII* del plásmido HIVdGless (secuencias -133,+78) en el vector pGl3 comercial (Promega) digerido con las mismas enzimas. El plásmido pGP2[TAR]-LUC se preparó siguiendo la misma estrategia, se insertaron las secuencias -42,+78 correspondientes del plásmido P2[TAR]dGless.

Los plásmidos reporteros derivados de G5-LUC se prepararon insertando las secuencias promotoras correspondientes en el vector G5pGl3 digerido con las enzimas de restricción *MluI* y *NheI*. El vector G5pGl3 se preparó insertando 5 repeticiones del

sitio de unión de DNA para la proteína GAL4 en el vector pGI3 comercial, digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI*. Las secuencias de unión de GAL4 se obtuvieron amplificando por PCR dichas repeticiones a partir del vector G5E1bCAT utilizando los oligonucleótidos csn-68F y csn-69R.

Los plásmidos derivados de G5-LUC, las secuencias que contienen las regiones promotoras (referidas al sitio de inicio de la transcripción), los plásmidos de donde provienen dichas secuencias y los oligonucleótidos (Olig.) utilizados se indican a continuación:

-G5HIV-LUC: -133, +76 a partir de HIVdGless. Olig., csn-67F/csn61R

-G5HIVTATAm-LUC: Se sustituyó la secuencia TATAA por GTCAC mediante técnicas estándar.

Los plásmidos conteniendo las mutaciones en los sitios NF- κ B y Sp1 así como los que contienen las regiones TdT y NF/SpTdT fueron modificados a partir de los plásmidos originales cedidos por el Dr. K. T Jeang (National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Bethesda, Maryland, USA) y han sido descritos previamente (Berkhout *et al.* 1992).

-G5HIVNF- κ Bm-LUC: En primer lugar se generó la construcción G5HIVNF-I-LUC, secuencias -101, +76 a partir del plásmido original conteniendo una mutación en el primer sitio de unión a NF- κ B. La secuencia AGGGACTTTCC fue mutada por ACTCACTTTCC mediante técnicas estándar. Olig., csn-66F/csn-61R.

-G5HIVSp1m-LUC: -133,+76 a partir del plásmido original conteniendo una mutación en los tres sitios de unión para el factor Sp1. Olig., csn-65F/csn-61

-G5TdT-LUC: -6,+76 a partir del plásmido original. Olig., csn-64F/csn-61R.

-G5TdTNF- κ BSp1-LUC: -101,+76 a partir del plásmido original. Olig., csn-65F/csn-61R.

-G5mycP2-LUC: contiene las secuencias de unión de GAL4 y el promotor P2 de c-myc (-95, +42). Fue cedido por G. Napolitano y L. Lania (Universidad de Nápoles, Nápoles, Italia).

-G5mycP2Sp1m: -95,+42 a partir del plásmido pmycX Δ Nmut-CAT, cedido por G.Napolitano y L. Lania. Olig., csn-83F/csn-80R.

-G5mycP2E2Fm: Se sustituyó la secuencia núcleo GGCGGG por ATAGGG mediante técnicas estándar.

-G5mycP2TATAm-LUC: Se sustituyó la secuencia TATAA por GTCAC mediante técnicas estándar.

Los plásmidos de expresión GAL4-CDK9 y GAL4-CDK9dn fueron descritos previamente (Majello *et al.* 1999) y cedidos por G. Napolitano y L. Lania. El plásmido pcTat contiene la secuencia de la proteína Tat (86 aminoácidos (aa)) bajo la expresión del promotor de citomegalovirus (CMV) y ha sido descrito previamente (Sune *et al.* 1995).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de PCR indicados se especifican en la TABLA IV.

TABLA IV: Oligonucleótidos utilizados para la generación de los plásmidos descritos

Oligonucleótido ^(a)	Secuencia 5'-3' ^(b)
Csn-2F	GGG- <u>GGT-ACC</u> -GCT-GAC-ATC-GAG-CTT-GCT
Csn-3R	GGG- <u>TCT-AGA</u> -CAA-CAG-ACG-GGC-ACA-CAC
Csn-9F	CTC- <u>GGT-ACC</u> -CTC-GAG-AAG-GGC-AGG-GCT
Csn-10F	CAC- <u>GGT-ACC</u> -GAG-CAG-CAG-AGA-AAG-GGA
Csn-11R	GGG- <u>TCT-AGA</u> -GCT-CGC-TCC-CTC-TGC-CTC
Csn-61R	GGG-GAA-TTC- <u>GCT-AGC</u> -TAT-TGA-GGC-TTA
Csn-64F	GGG- <u>ACG-CGT</u> -GCC-CTC-ATT-CTG-GAG
Csn-65F	GGG- <u>ACG-CGT</u> -AGG-GAC-TTT-CCG-CTG
Csn-66F	GGG- <u>AGG-CCT</u> -ACT-CAC-TTT-CCG-CTG
Csn-67F	GGG- <u>ACG-CGT</u> -GCT-GAC-ATC-GAG
Csn-68F	GGG- <u>GGT-ACC</u> -CTG-CAG-GTC-GGA
Csn-69R	GGG- <u>GAG-CTC</u> -GCA-TGC-TCT-AGA-GTC-TCC-GCT-CGG
Csn-80R	GGG- <u>GCT-AGC</u> -GCT-CGC-TCC-CTC-TGC-CTC
Csn-83F	CTC- <u>ACG-CGT</u> -CTC-GAG-AAG-GGG-AGG-GCT

^(a) F (*Forward*), oligonucleótido sentido, R (*Reverse*), oligonucleótido antisentido

^(b) Las bases subrayadas indican sitios de restricción.

5. MOLDES BIOTINILADOS

Los moldes biotinilados se obtuvieron amplificando los fragmentos del molde correspondiente. En la TABLA V se detallan los moldes biotinilados preparados, las regiones que contiene (referidas al sitio de inicio de la transcripción) y los oligonucleótidos utilizados.

TABLA V: Oligonucleótidos utilizados para la obtención de los moldes biotinilados

<i>Molde biotinilado</i>	<i>Oligonucleótido</i> ^(a)	<i>Secuencia 5'-3'</i>
b-HIVcassette (-139,+2024)	Csn-2bioF Csn-4R	b-CTC-GGT-ACC-CTC-GAG-AAG-GGC-AGG-GCT ACG-GCC-AGT-GCC-AAG-CTT
b-P2cassette (-94,+1960)	Csn9-bioF Csn-4R	b-CTC-GGT-ACC-CTC-GAG-AAG-GGC ACG-GCC-AGT-GCC-AAG-CTT
b-HIV (-139,+92)	Csn-2bioF Csn-55R	b-CTC-GGT-ACC-CTC-GAG-AAG-GGC-AGG-GCT GGG-AGG-CCT-AAG-CTT-TAT-TGA-GGC-TTA
b-P2 (-107,+ 118)	Csn-56bio Csn-36R	b-CTC-GGT-ACC-TCC-CCTCCT-GCC-TCG TTG-GAA-GGA-GAT-GGA-TGG
b-TdT ^(b) (-15,+92)	Csn-47bioF Csn-55R	b-GGG-GGT-ACC-GCC-CTC-ATT-CTG-GAG GGG-AGG-CCT-AAG-CTT-TAT-TGA-GGC-TTA
b-HIVTATAm (-139,+92)	Csn-2bioF Csn-55R	b-CTC-GGT-ACC-CTC-GAG-AAG-GGC-AGG-GCT GGG-AGG-CCT-AAG-CTT-TAT-TGA-GGC-TTA
b-HIVPless (+26,+92)	Csn-41bioF Csn-55R	b-AGC-CTG-GGA-GCT-CTC-TGG GGG-AGG-CCT-AAG-CTT-TAT-TGA-GGC-TTA
b-P2Pless (+50,+118)	Csn-40bioF Csn-36R	b-CCA-GAA-TTC-GAT-CCA-CTT-ACC TTG-GAA-GGA-GAT-GGA-TGG

^(a) F (*Forward*), oligonucleótido sentido, R (*Reverse*), oligonucleótido antisentido. Los oligonucleótidos modificados con biotina (b-) en el extremo 5' se adquirieron en Sigma-Genosys.

^(b) El plásmido original fue cedido por K. T. Jeang. (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA) y descrito previamente (Berkhout *et al.* 1992).

6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA

6.1. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Los productos de RNA obtenidos a partir de las reacciones de transcripción *in vitro* se analizaron en geles de poliacrilamida al 6-20 % y 7 M Urea, en tampón TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA).

6.2. Extracción de RNA intracelular

El RNA total intracelular se extrajo utilizando el reactivo *Rneasy Plus Kit* (Quiagen) según el protocolo del fabricante. El RNA purificado se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NaNodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, USA) y se guardó en alícuotas a -80°C hasta su utilización.

6.3. RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando el reactivo *SuperScript One Step RT-PCR with Platinum Taq Kit* (Invitrogen) partiendo de 50 ng de RNA purificado.

Los oligonucleótidos utilizados para el análisis del RNA mediante RT-PCR se especifican en la TABLA VI.

TABLA VI: Oligonucleótidos utilizados para el análisis del RNA mediante RT-PCR

<i>Fragmento</i>	<i>Oligonucleótido</i> ^(a)	<i>Secuencia 5´-3</i>
GFP	Csn-140F	AAGCTGGAGTACAACACTACAAC
	Csn-141R	ATGTGATCGCGCTTCTCGTTG
Tat	Csn-151F	AGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGC
	Csn-152R	CTTGATGAGTCTGACTGCCTTGAG
b-actina	Csn-165F	GCAACTAAGTCATAGTCCGC
	Csn-166R	CTGTCTGGCGGCACCACCAT
c-myc	Csn-124F	CTGGAAGAAATTCGAGCTGCTGCC
	Csn-125R	TGATGAAGGTCTCGTCGTCGGGT

^(a) F (*Forward*), oligonucleótido sentido, R (*Reverse*), oligonucleótido antisentido

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

7.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Las muestras de proteínas se calentaron durante 3 min a 95°C en tampón de carga (0.2 % azul de bromofenol, 10 % glicerol, 0.1 M Tris pH 6.8, 2% SDS, 50 mM DTT) y se separaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 10-15 % utilizando la solución tampón R (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % dodecil sulfato sódico (SDS)). Como marcadores de peso molecular se utilizó *Prestained Protein Marker Broad Range* (New England Biolabs)

7.2. Tinción de *coomassie*

Después de la electroforesis el gel se tiñó con una solución conteniendo el colorante azul de *coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue R250*) durante 30 min en un agitador. Se realizaron varios lavados con solución de destinción (25 % metanol, 7 % ácido acético), tras lo cual los geles se secaron entre dos hojas de celofán (BioRad).

7.3. WB

Después de la electroforesis, los geles se lavaron con solución T (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % (v/v) metanol) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Hybond-C Extra* (Amersham) a 300 mA, durante 1-1.5 horas. Las membranas se tiñeron con solución *Ponceau* (0.2 % colorante *Ponceau S* (Sigma), 3 % v/v ácido tricloroacético) durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación para comprobar la transferencia, y se lavaron posteriormente con H₂O varias veces. Las membranas se

bloquearon en la solución B (5 % leche en polvo, 0.1 % Tween-20 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario se realizaron en solución B durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidas de 3 lavados de 10 min con la misma solución después de cada incubación. En algunos casos, la solución B utilizada se sustituyó por la solución PB1 (3 % albúmina sérica bovina (BSA), 0.1 % Tween-20 en PBS) para el paso de bloqueo, y por la solución PB2 (0.1 % BSA, 0.05 % Tween-20 en PBS) para las incubaciones con los anticuerpos y los lavados. Todas las incubaciones se realizaron en agitación. Para el revelado se utilizó el reactivo *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (Perkin Elmer) según las indicaciones del fabricante.

Cuando fue necesario, se realizó un *stripping* de las membranas para su reutilización. Las membranas, preferiblemente sin haberse secado, se lavaron 5 veces con solución PBST (0.1 % Tween-20 en PBS) durante 10 min, tras lo cual se incubaron 2 veces con solución ST (62.5 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS, 100 mM β -mercaptoetanol (Sigma)) durante 15 min cada vez a 50°C. Se realizaron 6 lavados de 10 min con solución PBST, y se incubaron con el reactivo de revelado, para comprobar la pérdida de la señal. La membrana fue lavada 6 veces con solución PBST, y utilizada entonces del mismo modo descrito empezando por el paso de bloqueo.

7.4. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el ensayo de *Bradford*. Se utilizó el colorante *Bradford* (Bio-Rad) y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

8. PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas recombinantes utilizadas son la proteína Tat (preparada en esta Tesis), el complejo P-TEFb (Sune *et al.* 2000), y la proteína GST (Goldstrohm *et al.* 2001).

8.1. Purificación de la proteína Tat recombinante.

La proteína Tat se obtuvo a partir de cultivos bacterianos de la cepa *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene) transformados con el plásmido pGEX2TK-HIVTat (Sune *et al.* 1995). Una colonia aislada se creció en 25 ml de LB-Amp durante 16 horas a 37°C en agitación. El cultivo fue refrescado añadiendo 0.475 L de LB-Amp precalentado a 37°C y se mantuvo en crecimiento hasta que la densidad óptica del

cultivo DO₆₀₀ fue de 0.8. En ese momento se añadió isopropil-tio-β-D-galactosidasa (IPTG) a una concentración de 0.1 mM y se creció el cultivo durante 3 horas a 37°C en agitación. La inducción se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y posterior tinción de *coomassie* de 20 µl de cultivo recogido antes y después de la inducción. Tras este tiempo se recolectaron las bacterias mediante centrifugación a 4000g, se resuspendieron en 10 ml de PBS con inhibidores de proteasas *Complete* y se incubaron en hielo 10 min. Las bacterias se lisaron por sonicación, manteniéndolas en hielo y realizando 10 ciclos de 10 seg a potencia media, con un intervalo de 2 min en hielo entre cada ciclo. El lisado se centrifugó a 12000g a 4°C, se decantó el sobrenadante al que se añadió Triton X-100 (Sigma) al 1% y se mantuvo en hielo. La proteína de fusión GST-Tat es muy insoluble y para liberarla de los cuerpos de inclusión se utilizó un protocolo de solubilización con el detergente *Sarkosil* ya utilizado previamente para la purificación de GST-Tat (Sune *et al.* 1995). Así, el precipitado restante se resuspendió con 8 ml una solución SK (1.5 % N-lauroilsarcosina o *Sarkosil* (Fluka), 25 mM Trietanolamina, 1 mM EDTA pH 8) y se utilizó un vórtex para la agitación durante 2 min hasta obtener una suspensión, que se incubó 20 minutos en hielo. Tras centrifugar la suspensión a 15000g durante 20 min a 4°C se obtuvo un segundo sobrenadante al que se añadió 1% Triton X-100, 1mM CaCl₂ y 1 mM de DTT. Los dos sobrenadantes obtenidos se incubaron con 0,5 ml de una resina de agarosa acoplada a glutatión *Glutathione-agarose* (Sigma) previamente preparada según las indicaciones del fabricante. Tras 1.5 horas de incubación a 4°C en rotación continua en una noria, la resina se lavó tres veces en tubos tipo *falcon* con 15 ml de buffer W frío (1 % Triton X-100, 1% Tween-20, 1mM DTT y fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) a 1 mM en PBS) manteniéndola a 4°C, y 3 veces con buffer TB (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1mM PMSF). Todos los lavados se realizaron incubando durante 5 min en rotación continua en la noria y centrifugando después la resina a 1000 rpm en una centrífuga de mesa durante 5 min. El último lavado con buffer TB se realizó a temperatura ambiente y en ausencia de PMSF. La resina se recogió en tubo tipo *ependorf* de 2 ml con 1 ml de buffer TB y se añadieron 10 NIH U/ ml de Trombina (Sigma. NIH U, unidades definidas por el *National Institute of Health*, USA) para liberar la proteína Tat. Después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente en la noria se paró la reacción añadiendo PMSF a 200 µg/ml. La resina se centrifugó a 4000 rpm 10 min para recoger el sobrenadante, se añadió 1 ml más de buffer TB y se repitió la centrifugación. La proteína obtenida se concentró utilizando un

centricón *YM-10* (Millipore). Los pasos de purificación se comprobaron mediante electroforesis y tinción de *coomassie*.

9. ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados y su uso se detallan en la TABLA VII.

TABLA VII. Anticuerpos utilizados en esta Tesis

<i>Anticuerpos</i>	<i>Especie</i>	<i>Origen</i> ^(a)	<i>Uso</i> ^(b)
anti-CDK9 (sc-484)	conejo	SCBT	WB (1:500), IP
anti-Ciclina T1 (sc-8127)	cabra	SCBT	WB (1:1000), IP
anti-RNAPII(N-20)(sc-899)	conejo	SCBT	WB (1:1000), IP
anti-RNAPII (Dahmus)	conejo	cedidos por el Dr. J. Ortín (CNB, Madrid, España)	WB (1:2000)
anti-TFIID(TBP) (sc-204)	conejo	SCBT	WB (1:200)
anti-CDK2 (sc-163)	conejo	SCBT	WB (1:1000)
anti-nucleolina (sc-13057)	conejo	SCBT	WB (1:1000)
anti-GAL4 (sc-577)	conejo	SCBT	WB (1:500)
anti-GFP (3E6)	ratón	Invitrogen	WB (1:1000)
anti-actina (sc-1616)	cabra	SCBT	WB (1:1000)
anti-U2AF ⁶⁵	ratón	cedidos por el Dr. Juan Valcárcel (CRG, Barcelona, España)	WB (1:1000)
anti-Sp1	conejo	cedidos por el Dr. J. Horowitz (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA)	WB (1:5000)
anti-Tat-BD6	ratón	cedidos por el Dr. K.T. Jeang (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, USA)	WB (1:1000)
anti-Tat-Suero	conejo	cedidos por el Dr. M. García-Blanco (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA)	IP
anti-CA150-Suero1	conejo	reparados por Research Genetics Inc., Huntsville, Ala, USA (Sune <i>et al.</i> 1997)	WB (1:2000), IP
anti-CA150-Suero2	conejo	preparados por Pineda-Antikörper Service, Berlin, Alemania.	Purificación anti-CA150-AP
anti-CA150-AP	conejo	esta Tesis	IP
suero pre-inmune	conejo	preparados por Pineda-Antikörper Service, Berlin, Alemania.	IP
rIgGs	conejo	esta Tesis	IP
gIgGs (sc-2028)	cabra	SCBT	IP
anti-Myc (sc-764)	conejo	cedidos por el Dr. J. León (Universidad de Cantabria, Santander, España)	WB (1:500)
anti-Sm (Y12)	ratón	Abcam	WB (1:500)
anti-mouse IgG-HRP ^(c)	cabra	Perkin Elmer	WB (1:5000)
anti-rabbit IgG-HRP	cabra	Perkin Elmer	WB (1:5000)
anti-goat IgG-HRP	conejo	Sigma	WB (1:8000)

^(a) SCBT, Santa Cruz Biotechnology

^(b) Se indican las diluciones usadas en WB. IP, inmunoprecipitación.

^(c) -HRP, *-Horseradish peroxidase*, conjugado a peroxidasa.

9.1 Purificación de inmunoglobulinas (IgGs)

Las IgGs se purificaron a partir de un suero pre-inmune de conejo mediante cromatografía de afinidad a una matriz de proteína A siguiendo un protocolo estándar (Harlow *et al.* 1999). Se utilizó 1 ml de la matriz *Protein A Sepharose* (GE Healthcare), previamente lavada con 0.1 M Tris pH 8, y preparada sobre una columna para controlar la velocidad del flujo. 1 ml de suero previamente centrifugado se equilibró a pH 8 añadiendo 1/10 1 M Tris. El suero se pasó por la columna a < 0.3 ml/min. La columna se lavó con 10 ml de 0.1 M Tris pH 8, y con 10 ml de 0.01 M Tris pH 8. La elución de las IgGs se realizó con 0.1 M glicina pH 3, pasándola por la columna a 0.3 ml/min, y recogiendo las fracciones en tubos de 1.5 ml conteniendo 1/10 1 M Tris pH 8 para su neutralización. La concentración de las fracciones recogidas se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro, y se dializaron contra 2 L de PBS conteniendo 0.1 % de azida sódica, dos veces. Las IgGs obtenidas se guardaron a -80°C a una concentración 2 mg/ml con 50 % de glicerol. La columna se restableció para una posible reutilización lavándola con 10 ml de 0.01 M Tris pH 8, con 10 ml de 0.1 M Tris pH 8 y con 10 ml de 0.1 M Tris pH 8 conteniendo 0.1 % azida sódica. Se guardó a 4°C.

9.2. Purificación de anti-CA150-AP

El anticuerpo anti-CA150-AP se purificó por afinidad a antígeno utilizando proteínas unidas a una membrana de nitrocelulosa, modificando el método de Lai y cols. (Lai *et al.* 2000). Se separaron 200 µg de proteína recombinante CA150-carboxi en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 10 %, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Ésta se tiñó con solución *Ponceau*, y se cortó la parte de la membrana donde se visualiza la proteína. Se incubó 5 min con 0.2 M glicina pH 2.5, y posteriormente se lavó dos veces con tampón TBS (20 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20). La parte de la membrana cortada se incubó con TBS conteniendo 3 % BSA durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente se lavó 2 veces con TBS. Se incubó con 1 ml de anti-CA150-Suero2, previamente centrifugado, a 4°C durante la noche en agitación. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS, y se eluyeron los anticuerpos específicos mediante una incubación con 1 ml de 0.2 M glicina a pH 2.5, durante menos de 5 minutos, recogéndolos con 1/10 volúmenes de 1 M Tris pH 8 para su neutralización. La elución se repitió una vez más y las muestras obtenidas se dializaron durante 2 horas contra PBS conteniendo un 15 % de glicerol, dos veces. Se

obtuvo la concentración midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro, y se guardaron los anticuerpos obtenidos a -80°C.

10. ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN-ELONGACIÓN *IN VITRO*

Los extractos nucleares de células HeLa (NE) utilizados fueron preparados en el laboratorio por el método de Dignam y cols. (Dignam *et al.* 1983). Las reacciones de transcripción-elongación *in vitro* fueron llevadas a cabo durante 45 minutos a 30°C en un volumen final de reacción de 25 µl. La mezcla de reacción contenía en todos los casos el molde de DNA dGless (se indican las cantidades utilizadas en el texto de las figuras), 10 µl HeLa NE (aprox. 8 mg/ml de proteína), 14 mM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico)-KOH pH 7.9, 14% (vol/vol) glicerol, 68 mM KCl, 7mM MgCl₂, 4 mM de citrato sódico a pH 6.7, 250 ng *poly(I)·poly(C)* (Amersham), 300 ng *poly(dI)·poly(dC)* (Amersham), 1mM DTT, 10 mM fosfato de creatina (Sigma), 0,1 mM EDTA, 4 unidades de inhibidor de RNAsas *rRNasin* (Promega), y nucleótidos: 625 µM ATP, CTP y GTP, 40 µM UTP y 10 µCi de [³²P]UTP (3,000 Ci/mmol, 1 µl. Amersham). Se añadió la proteína Tat, GST o el factor P-TEFb recombinantes cuando fue necesario, así como el inhibidor α-aminitina (Sigma) (ver figuras). Después de la incubación, los RNAs producidos se digirieron con 1000 U de RNasa T1 (Ambion) durante 6 minutos a 37°C, y seguido de la digestión con 20 µg de proteinasa K (Ambion) durante 15 minutos a la misma temperatura. Se añadió a la reacción 100 µl del tampón ST (200 mM NaCl, 300 mM NaOAc, 10 mM EDTA, 0,75 % SDS, 25 µg tRNA de levadura/ml, 100 mM Tris-HCl pH 7.5) y 50 µl del tampón HS (7 M Urea, 100 mM LiCl, 50 mM EDTA, 0.5 % SDS y 100 mM Tris-HCl pH 7.5). Los productos de RNA digeridos se purificaron mediante una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) seguida de una extracción con cloroformo utilizando tubos *Phase Lock Gel* (Eppendorf) según las recomendaciones del fabricante, tras lo cual se precipitaron con 50 µl de acetato de amonio 7.5 M y etanol absoluto frío durante 2 horas a -80°C. Después de lavar dos veces con una solución al 80 % etanol los precipitados de RNA se secaron en un concentrador de vacío *SpeedVac* y se resuspendieron en 4 µl de tampón de carga (98 % formamida, 10 mM EDTA, 0.025 % xilencianol, 0.025 % azul de bromofenol). Las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida (19:1) al 6 % y 7 M de Urea, que fueron secados y expuestos en películas X-OMAT AR (Kodak). Las bandas específicas se cuantificaron usando un *PhosporImager* (Molecular Dynamics). Como marcadores de peso molecular se utilizó

el plásmido comercial *pBR22 DNA-MspI digest* (New England Biolabs) marcado con [α - 32 P]dCTP (ver apartado 3.5 de esta sección).

La radioactividad medida para cada producto se normalizó por el contenido de uridina de cada fragmento, 24 residuos de uridina en el primer *cassette* (corto) y 138 para el segundo *cassette* (largo) (Lee *et al.* 1997). La eficiencia de elongación se calculó como el cociente del valor de radiactividad que da el transcrito largo, entre el valor que se corresponde con el transcrito corto en cada reacción. Y la trans-activación mediada por Tat se calculó dividiendo el valor de radiactividad de la banda que se corresponde con cada transcrito en presencia de la proteína Tat, por el valor de radiactividad de los mismos pero en ausencia de Tat.

Para las reacciones de transcripción-elongación *in vitro* con PICs aislados, los moldes de DNA biotinilado correspondientes se inmovilizaron del mismo modo que se describe más abajo (apartado 12.1 de esta sección) excepto que se utilizaron 500 ng de molde en 50 μ l de solución de unión, y se añadieron 20 μ l de NE (aprox. 8 μ g/ml). Los PICs aislados se resuspendieron en 25 μ l de tampón IVT-68 (14 mM Hepes pH 7.9, 14 % glicerol, 7 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA y 10 mM fosfato de creatina, 250 ng *poly(I)·poly(C)* y 300 ng *poly(dI)·poly(dC)*, 1mM PMSF) que contenía 625 μ M ATP, CTP y GTP, 40 μ M UTP y 10 μ Ci de [α - 32 P]UTP y 4 unidades de *RNasin*. Después de una incubación a 30°C durante 30 min las reacciones se trataron y se analizaron como se ha descrito.

11. INMUNODEPLECIÓN DE CDK9

La depleción de la proteína CDK9 del extracto nuclear se realizó mediante una purificación por inmunoafinidad. 100 μ l de una matriz magnética recubierta de Proteína A *Dynabeads Protein A* (DynaL Biotech.) se incubaron con 170 μ l de anticuerpo anti-CDK9 (0.2 μ g/ml) en PBS durante 1 hora en hielo. Las incubaciones se realizaron siempre resuspendiendo las perlas muy suavemente (vórtex) cada 5-10 min para evitar que sedimentaran. Como control, se utilizaron en paralelo 100 μ l de perlas magnéticas de proteína A tratadas del mismo modo en ausencia de anticuerpo. Para evitar uniones inespecíficas, la matriz de proteína A se había lavado previamente tres veces con PBS, siendo los volúmenes de lavado siempre de 200 μ l, e incubado con 180 μ l NE (aprox. 8 μ g/ μ l) diluido 1:2 en tampón D (20 mM Hepes pH 7.9, 0.1 M KCl, 20 (vol/vol) glicerol, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF) durante 1 hora en hielo. Después de la incubación con el anticuerpo, las perlas magnéticas se lavaron tres veces con PBS y se

realizó un *cross-linking* con dimetil pipelimidato (DMP) (Sigma) para unir covalentemente el anticuerpo a la matriz. Para ello, las perlas magnéticas se lavaron tres veces con una solución 0.2 M trietanolamina a pH 8.2, y se incubaron con 40 mM DMP en 200 μ l de la misma solución de trietanolamina, preparada en el momento, durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente las perlas magnéticas se resuspendieron en 200 μ l de un tampón 50 mM Tris pH 7.5 y se incubaron 15 min a temperatura ambiente para parar la reacción. Se lavaron dos veces con PBS, y otras dos veces con 200 μ l de PBS conteniendo 0.05 % de azida sódica para guardarlas en dicha solución a 4°C. Se comprobó la eficiencia de la reacción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturallizante y posterior tinción de *coomassie* de 10 μ l de la matriz unida al anticuerpo antes y después del tratamiento de *cross-linking*.

Las matrices magnéticas unidas covalentemente al anticuerpo, o matrices control, se utilizaron en dos rondas de inmunodepleción. Se lavaron una vez con PBS, tres veces con una solución de 0.1 M glicina pH 3, tres veces más con PBS, y por último se realizaron tres lavados con tampon D conteniendo 0.8 M KCl y 0.1 % NP40. Después de los lavados, se incubaron 1 hora en hielo con 180 μ l de NE, cuyo contenido en sales había sido previamente aumentado hasta una concentración de 0.8 M KCl añadiendo KCl sólido, y 0.1 % NP40. Se guardaron los sobrenadantes de la unión a 4°C mientras se prepararon las matrices magnéticas para una segunda incubación. Las matrices magnéticas se lavaron dos veces con PBS conteniendo 0.025 % Tween-20 y se incubaron tres veces durante 5 min con la solución 0.1 M glicina pH 3 para la elución de la proteína unida al anticuerpo. Seguidamente se lavaron una vez con PBS conteniendo 0.025 Tween-20, tres veces con PBS y por último con tampón D conteniendo 0,8 M KCl y 0.1 % NP40. Se añadió otra vez el NE a las matrices magnéticas correspondientes y se incubaron 1 hora más en hielo. Después de esta segunda ronda, se guardó el NE para dializarlo y con las matrices magnéticas se siguió el mismo procedimiento anterior sólo que a los lavados con PBS se añadió 0.05 % de azida sódica y se almacenaron a 4°C.

Para su uso en las reacciones de transcripción *in vitro*, los extractos nucleares, control y deplecionado, se dializaron durante 45 min contra 2 L de tampón D , dos veces, y se almacenaron a -80°C. Se comprobó la depleción de los extractos mediante WB.

12. AISLAMIENTO DE COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES

12.1 Aislamiento y purificación de PICs

La obtención de PICs se realizó incubando el molde biotinilado correspondiente inmovilizado a una matriz magnética de estreptavidina *Dynabeads M-280 Streptavidin* (Dyna) con extractos nucleares de células Hela (NE), y aislándolos usando una base magnética. Para cada reacción se incubaron 25 μ l de bolas magnéticas, previamente pre-equilibradas, con 250 ng de molde biotinilado en un volumen de 25 μ l de tampón de unión BB (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1m M EDTA y 1 M NaCl) durante 30 min a temperatura ambiente. Los moldes inmovilizados con la matriz magnética se lavaron tres veces con solución IVT-68 (14 mM Hepes pH 7.9, 14 % glicerol, 7 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA y 10 mM fosfato de creatina, 250 ng *poly(I)·poly(C)* y 300 ng *poly(dI)·poly(dC)*, 1mM PMSF) y se bloquearon 30 min a temperatura ambiente con 1 % BSA (Sigma) en solución IVT-68. Se lavaron tres veces con solución IVT-68 al que se añadió 0.05 % NP40 y se incubaron 30 min a 30°C con 8-10 μ l de NE (aprox 8 μ g/ml) en una mezcla de reacción (25 μ l) conteniendo IVT-68. El NE que se añadió fue previamente incubado con DNA, 10 min a temperatura ambiente, para minimizar las uniones inespecíficas. Para ello, se utilizó el plásmido *pGl3* (Promega) digerido con la enzima *TaqI*. Se utilizó 1 μ g DNA/100 μ l NE. Posteriormente, los moldes biotinilados con los complejos formados se lavaron 5 veces con IVT-150 (tampón IVT que contiene 150 mM KCl en lugar de 68 mM KCl) al que se añadió 0.1 % NP40).

Para el análisis de los complejos por WB, las proteínas unidas se disociaron resuspendiendo en tampón de carga (0.2 % azul de bromofenol, 10 % glicerol, 0.1 M Tris pH 6.8, 2% SDS, 50 mM DTT) y calentando las muestras a 95°C durante 5 min.

12.2. Aislamiento y purificación de ECs

Los PICs fueron aislados como se ha descrito pero se lavaron con solución tampón IVT-68 para continuar con el aislamiento de los TECs. Éstos se incubaron con 50 μ M ATP en solución tampón IVT-68 conteniendo 0,05 % NP40 y 4 unidades de inhibidores de RNAsas *rRNasin*, durante 10 min a 30°C. Se lavaron con IVT-68 conteniendo 0.05 % NP40, y se incubaron con 1mM CTP, 1mM GTP, 10 μ Ci de [α -³²P]UTP en solución tampón conteniendo 4 *rRNasin* durante 5 min a 30°C. En este punto, se lavaron con IVT-68 conteniendo 0.05 % NP40 y se analizaron por WB (complejos en la posición U14), como se ha descrito para los PICs, o se continuó con el aislamiento de los TECs. Para ello, se incubaron con IVT-68 conteniendo 0.05 % NP40, 1 mM ATP, 1mM CTP,

1mM GTP, 10 μ Ci de [α -³²P]UTP durante 10 min a 30°C. Después de lavarlos con IVT-68 conteniendo 0.05 % NP40 se analizaron por WB (complejos en la posición 92).

Para la purificación del RNA obtenido en estas reacciones de transcripción, se procesaron tanto la fracción unida a la matriz magnética como el sobrenadante. Además, se unieron las muestras de dos reacciones independientes. Se añadieron 20 μ g de proteínasa K y se incubaron las muestras durante 15 min a 37°C. A partir de este punto se trataron del mismo modo descrito en el *apartado 10* de esta sección. Los fragmentos de RNA obtenidos se resolvieron en geles de poliacrilamida (19:1) al 20 % y 7 M de Urea, que fueron secados y expuestos en películas X-OMAT AR (Kodak). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el plásmido *pBR22 DNA-MspI digest* (New England Biolabs) marcado con [α -³²P]dCTP, y un oligonucleótido de 14 pb marcado con [γ -³²P]ATP (ver *apartado 3.5* de esta sección).

13. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

13.1. Fijación de células Jurkat.

Los ensayos de ChIP se realizaron con la línea celular Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8. Las células, estimuladas o control (ver *apartado 1.4* de esta sección, donde se describe el protocolo de estimulación), se recogieron después de 20 horas de estimulación y se resuspendieron en PBS frío. Los pasos de lavado de las células se realizaron siempre centrifugando a 1200g. Se utilizó una fijación doble, modificando el método descrito por Fujita et al (Fujita *et al.* 2004). Tras el recuento utilizando una cámara *Neubauer*, el volumen total de células cultivadas se diluyó hasta una densidad de 1 millón células/ml y posteriormente las células se resuspendieron en la solución de fijación (5 mM dimetil-3-3'-ditiobispropionimidato-2HCl (DTBP) (Pierce) en PBS preparada en el momento) y se incubaron 30 min a 4°C en una noria. Las células se lavaron con PBS, y se incubaron durante 10 min en solución QB (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl). Después de otro lavado con PBS, se realizó un nuevo recuento asegurando mantenerlas a 1 millón/ml y se realizó un segundo paso de fijación con 1 % de formaldehído durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo glicina a una concentración de 0.125 M. Las células se lavaron tres veces con PBS conteniendo inhibidores de proteasas *Complete* y se congelaron los precipitados de células a -80°C en alícuotas adecuadamente preparadas para su posterior uso.

13.2. Preparación de muestras: lisis y sonicación

Para cada experimento de ChIP, se descongeló el número de células fijadas necesario: 1 millón de células para cada inmunoprecipitación. Se lisaron en el volumen apropiado de solución tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.1, 1% deoxicolato sódico, 0.1 % SDS, 1 % NP40, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, inhibidores de proteasas *Complete*) durante 30 min en hielo: cada 10 millones de células en 2 ml de tampón RIPA. Los lisados se repartieron en tubos de 15 ml (Falcon) conteniendo 2 ml de lisado cada uno y se sonicaron utilizando un protocolo en dos pasos: en primer lugar 12 ciclos de 20 seg, con intervalos de 5 min en agua con hielo, en el sonicador *Branson Sonifier 450*; y después, utilizando un sonicador *Biorruptor* (Diagenode) 2 periodos de 15 min en los cuales se produjeron ciclos de sonicación de 30 seg, con intervalos en agua con hielo de 1 min. Las muestras se almacenaron a -80°C. Para comprobar la eficiencia de la sonicación, se purificó el DNA correspondiente de 250 µl de muestra, tal y como se describe más abajo, y se resolvieron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa. También se comprobó la integridad del extracto mediante WB antes y después del paso de sonicación.

Los experimentos de sonicación comparando el efecto del tampón de lisis utilizado se llevaron a cabo lisando el volumen de células adecuado con tampón SDS (1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.1, 1 mM DTT, inhibidores de proteasas *Complete*) o tampón RIPA como se ha descrito. Para el paso de sonicación se repartieron las muestras en tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml, en un volumen de 500 µl (2 millones células), y se realizaron 5, 10 o 15 ciclos de sonicación en el sonicador *Branson Sonifier 450* con intervalos de 5 min en agua con hielo. Se comprobó la integridad del extracto mediante WB.

13.3. Inmunoprecipitación

Las inmunoprecipitaciones se realizaron utilizando los anticuerpos adecuados y una resina de agarosa acoplada a proteína A o Proteína G *50% slurry Protein A/G Agarosa Beads* (Upstate Biotechnology). La resina fue previamente incubada con solución bloqueante (1 mg/ml BSA, 0,4 mg/ml de DNA de esperma de salmón en tampón TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA) conteniendo 0.05 % azida sódica) y almacenada a 4°C. Todas las incubaciones se realizaron en rotación, y la resina se sedimentó centrifugando a 1000g. Se descongelaron los extractos de células fijadas (estimuladas o control): 200 µl de extracto para cada inmunoprecipitación; se centrifugaron 10 min a 12000g para eliminar posibles agregados de proteínas y se diluyeron 3 veces en solución tampón

RIPA. En este momento se recogió un 1 % del extracto diluido y se almacenó a -80°C (INPUT). Para minimizar las uniones inespecíficas, se realizaron dos preaclerados de las muestras incubándolas con 30 μl de resina acoplada a proteína A o G/inmunoprecipitación durante 2 horas a 4°C en una noria. Después de centrifugar las muestras, se realizó la inmunoprecipitación incubando 600 μl de extracto preaclerado con 10 μg del anticuerpo correspondiente a 4°C durante la noche. A continuación, cada muestra se incubó con 30 μl de resina durante 1 hora a 4°C . Los complejos anticuerpo-cromatina unidos a la resina se lavaron 5 veces con soluciones tampón conteniendo diferentes concentraciones de sales y detergentes. Se realizó un lavado con LSB (0.1 % SDS, 1 % Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, inhibidores de proteasas *Complete*), uno con HSB (0.1 % SDS, 1 % Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl, 1 mM DTT), uno con LiClB (0.25 M LiCl, 1 % NP40, 1 % deoxicolato sódico, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM DTT) y dos con tampón TE. Los lavados fueron incubaciones con 1.5 ml de solución durante 5 min a 4°C . Los complejos se eluyeron mediante 2 incubaciones de 15 min a temperatura ambiente con 200 μl de una solución conteniendo 1% SDS y 0.1 M NaHCO_3 preparada en el momento.

13.4. Obtención de DNA inmunoprecipitado y PCR

Se revirtió la fijación en cada muestra resultante de la inmunoprecipitación añadiendo 16 μl de NaCl 5 M a los 400 μl eluidos y calentando a 65°C 16-18 horas en agitación. Se trató del mismo modo la muestra almacenada como INPUT. Seguidamente se trataron las muestras con una mezcla de RNasas, *RNase cocktail* (0.5 U RNase A y 20 U RNase T1), incubando a 37°C durante 1 hora, y después se degradaron las proteínas incubando las muestras con 20 μg proteínasa K durante 1 hora a 45°C . Se purificaron los fragmentos de DNA realizando dos extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y una con cloroformo, seguido de una precipitación con 0.3 M de acetato sódico y etanol absoluto frío durante 2 horas a -80°C . Se añadieron 10 μg de glicógeno unido a un colorante como co-precipitante, *Glicoblue* (Ambion). Después de lavar dos veces con una solución al 80 % etanol, los precipitados de DNA se secaron en un concentrador de vacío *SpeedVac*, y se resuspendieron en 50 μl de H_2O . Las muestras se calentaron a 50°C en agitación para la correcta resuspensión de los fragmentos de DNA purificados y se almacenaron a -20°C .

Las reacciones de PCR para el análisis de los fragmentos de DNA en las muestras inmunoprecipitadas se llevaron a cabo utilizando la enzima *Taq polimerasa* (Roche). Los oligonucleótidos correspondientes a la región de DNA a amplificar se muestran en la TABLA VIII.

TABLA VIII. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de ChIP

<i>Región</i>	<i>Oligonucleótido</i> ^(a)	<i>Secuencia 5'-3'</i>
VIH (5' LTR)	Csn-228F	TGTACTGGGTCTCTCTGGTT
	Csn-255R	TCGCTTTCAAGTCCCTGTTC
eGFP	Csn-230F	CCATCTTCTTCAAGGACGAC
	Csn-231R	TGAAGTTCACCTTGATGCC
c-myc	Csn-122F	CTCGAGAAGGGCAGGGCTTCTCAG
	Csn-123R	AGAGGCGAAGCCCCCTATTCGCTC
Región intergénica	Csn-179F	TGATCCACTAAGGGGTCATCA
	Csn-180R	GGTCATTCCAGATGAATTGCC
OCT-2	Csn-173F	TGACAAGCCGATAGCCGAGTG
	Csn-174R	TATCCTCAGCTGTGGGGACGC

^(a) F (*Forward*), oligonucleótido sentido, R (*Reverse*), oligonucleótido antisentido

resultados

1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEBIDO A LA PARADA DE LOS COMPLEJOS DE LA RNAPII

1.1. Activación de la elongación transcripcional por la proteína Tat del VIH-1

Entre los ejemplos más característicos en los que se ha observado una regulación a nivel de la elongación transcripcional están los genes del VIH-1 (ver *Introducción*). La activación de la expresión de los genes del VIH-1 es dependiente de las secuencias de DNA presentes en el promotor, de la proteína viral Tat y de factores celulares específicos. Tat activa la transcripción promoviendo la elongación de los transcritos virales sintetizados mediante el reclutamiento del complejo P-TEFb al elemento de RNA TAR.

Para reproducir *in vitro* la activación transcripcional del promotor del VIH-1 por la proteína Tat y estudiar sus requerimientos en cuanto a los factores celulares involucrados y su mecanismo de acción se han utilizado extractos nucleares de células HeLa, que aportan todos los componentes necesarios para que tenga lugar la formación del transcrito a partir de un molde de DNA purificado. Históricamente, la mayoría de ensayos de transcripción *in vitro* usando extractos nucleares se han basado en la medida de la transcripción general en los llamados ensayos *run-off*. Sin embargo, y con el fin de medir de una manera directa la eficiencia de elongación de los complejos de RNAPII que se encuentran transcribiendo, se estableció un sistema de transcripción-elongación *in vitro* que utiliza el extracto nuclear de células HeLa y un molde de DNA conteniendo el promotor del VIH-1 y dos regiones o *cassettes* carentes de residuos de guanosina (dGless, del inglés *double G-less*) (Lee *et al.* 1997; Sune *et al.* 2000). Los fragmentos generados durante la reacción de transcripción correspondientes a las regiones “libres de G” de los transcritos sintetizados son, de esta forma, insensibles a la acción de la enzima RNasa T1. Este endoribonucleasa actúa específicamente sobre el RNA de cadena simple cortando el enlace fosfodiéster entre la guanina y el nucleótido adyacente. El tamaño diferente y la localización de esas regiones dentro del molde de DNA permite seguir la evolución del complejo de la RNAPII conforme va transcribiendo el RNA. El primer *cassette*, de 83 nt, está situado en una región próxima al sitio del inicio de la transcripción, y el segundo *cassette*, de 377 nt, está situado en una posición más alejada del inicio de la transcripción. El diseño experimental permite, por tanto, medir la capacidad de los complejos de la RNAPII para transcribir esas regiones, es decir, conocer la procesividad de esos complejos. La cuantificación de los transcritos

correspondientes a las regiones proximal (fragmento de 83 nt) y distal (fragmento de 377 nt) permite obtener un valor que define la eficiencia de la elongación. Los parámetros considerados para obtener dicho valor están descritos en Materiales y Métodos. En la Figura 9 se muestra de una forma gráfica el sistema de transcripción-elongación *in vitro*.

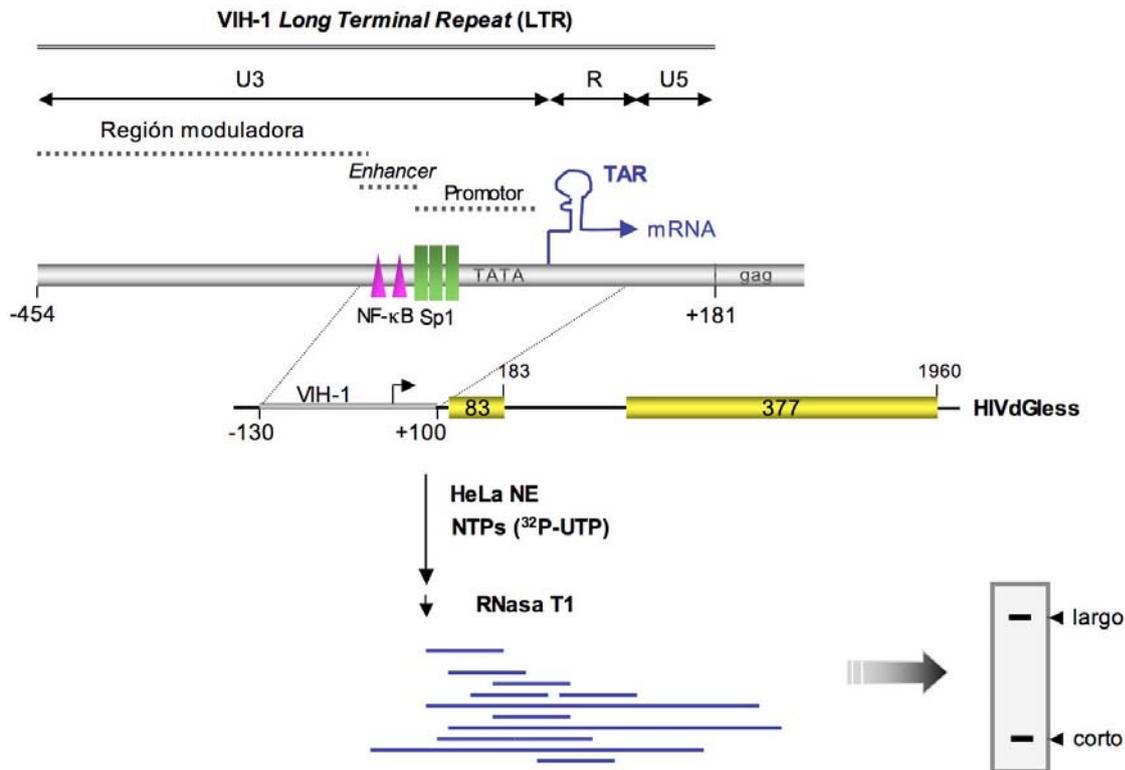


Figura 9. Representación esquemática del sistema de transcripción-elongación *in vitro*. Se muestra el esquema del vector HIVdGless indicando los dos *cassettes* carentes de guanina y las regiones del promotor LTR viral que contiene. El molde dGless se incuba con extracto nuclear y nucleótidos, uno de ellos marcado radiactivamente (³²P-UTP). Tras la adición de RNasa T1 y purificación de los RNAs obtenidos, éstos se resuelven en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6%. La visualización y cuantificación de los productos se realiza en un *PhosphorImager*.

Como molde de DNA se generó una construcción dGless conteniendo, además de las regiones que codifican el elemento TAR, el promotor mínimo descrito del VIH-1 (HIVdGless). Dicho promotor está formado por dos sitios de unión para el factor NF-κB, tres sitios de unión para el factor Sp1 y las secuencias de la caja TATA (Berkhout *et al.* 1992; Lu *et al.* 1993)(Figura 9).

Asimismo, se puso a punto la expresión y purificación de la proteína viral Tat, que se obtuvo a partir de cultivos bacterianos transformados con el vector de expresión pGEX2TK-HIVTat (Sune *et al.* 1995). Este vector permite la expresión de Tat como proteína de fusión con la Glutación-S-Transferasa (GST). Las secuencias de ambas

proteínas están separadas por un sitio de corte para la enzima trombina humana. Utilizando protocolos estándar (ver *Materiales y Métodos*), se obtuvo la proteína GST-Tat purificada y la liberación de la proteína Tat soluble carente del fragmento GST se realizó mediante un último paso de corte con trombina. El análisis final de la fracción proteica determinó la presencia mayoritaria de la proteína Tat así como de proteína GST residual, la cual es inerte en los ensayos utilizados (ver Figura 12B)

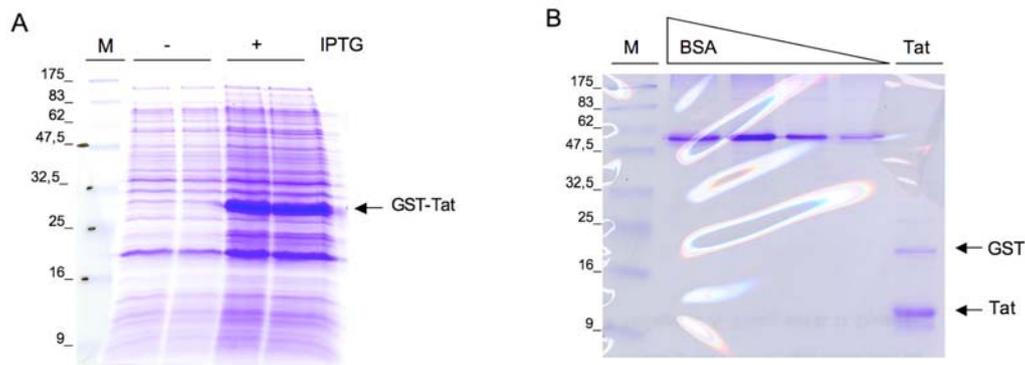


Figura 10. Purificación de la proteína recombinante Tat. A) Inducción de los cultivos bacterianos transformados con el vector pGEX2TK-HIVTat tras la adición de 0,1 mM de isopropil-tio- β -D-galactosidasa (IPTG). Se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante y posterior tinción de *coomassie* de 20 μ l de cultivo. B) Análisis de la fracción proteica purificada. Se utilizaron 1000, 500, 250 y 100 ng de proteína albúmina sérica bovina (BSA) y 1 μ l del eluido final de la resina de purificación después de concentrarlo.(ver *Materiales y Métodos*).

A continuación se ensayó la activación de la transcripción del promotor viral por la proteína Tat así purificada en el ensayo *in vitro*. La adición de la proteína Tat recombinante estimuló la producción de transcritos largos, representada por la señal correspondiente a la banda de 377 nt (fragmento largo en la Figura 11), con un menor efecto sobre el nivel de los transcritos cortos, representados por la banda de 83 nt (fragmento corto en la Figura 11). La cuantificación de las señales obtenidas (ver *Materiales y Métodos*) refleja el aumento en la eficiencia de elongación de los complejos transcripcionales de la RNAPII, que se indica para cada reacción en la parte inferior de la figura. La misma activación preferencial de los transcritos largos respecto a los cortos se muestra en la Figura 11 (panel B) en términos de trans-activación. El ensayo aquí descrito mide la densidad de las moléculas de RNAPII que están transcribiendo un gen, por tanto, constituye una herramienta de gran utilidad para conocer la eficiencia de elongación de los complejos transcripcionales de la RNAPII.

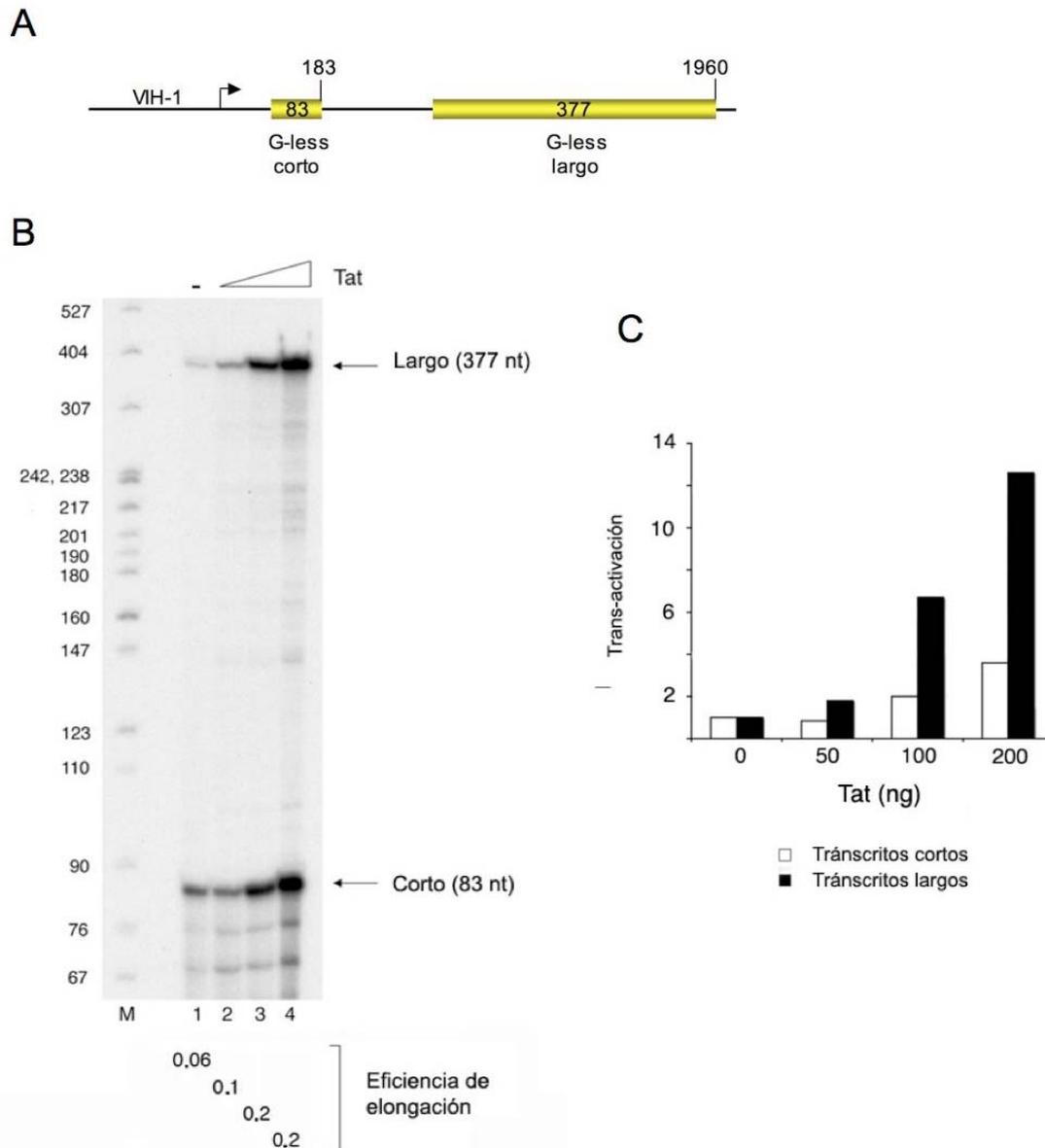


Figura 11. Trans-activación del promotor mínimo del VIH-1 por la proteína Tat recombinante. A) Esquema del molde HIVdGless utilizado. B) Las reacciones se llevaron a cabo con 200 ng del molde HIVdGless en ausencia (-) o presencia de cantidades crecientes de la proteína Tat recombinante (100, 200 y 400 ng). Los productos de RNA purificados se resolvieron por electroforesis en gel desnaturalizante y las flechas indican la migración de los tránscrios largos y cortos. Los marcadores del tamaño de los fragmentos (carril M, indicando los pares de bases correspondientes) son el plásmido *pBR322 MspI digested* (New England Biolabs) marcado con [α - 32 P]-dCTP. Los datos se cuantificaron con un *PhosphorImager*, y se normalizaron por el contenido de uridinas en cada fragmento. Las eficiencias de elongación se calcularon como la relación entre los fragmentos largos y cortos en cada reacción tal y como se indica en Materiales y Métodos. (B) Cuantificación de los datos experimentales obtenidos indicada de forma de gráfica. La trans-activación mediada por Tat se calculó dividiendo el valor normalizado de radiactividad de la banda que se corresponde con cada tráncrito en presencia de la proteína Tat, por el valor de radiactividad normalizado de los mismos pero en ausencia de Tat.

Para comprobar que el incremento observado en la eficiencia de elongación de los complejos transcripcionales de la RNAPII se debe a la interacción de la proteína Tat con su secuencia diana, la región TAR del RNA del VIH-1, se generó el plásmido HIVBLdGless donde se elimina la secuencia de unión a Tat (Liu *et al.* 1999)(Figura 12A). Se observó que el efecto de la proteína Tat es dependiente de TAR en este sistema ya que el mutante HIVBLdGless no es activado por Tat. Asimismo y como control, la activación del promotor del VIH-1 mediada por Tat no se produce por la adición de la proteína GST no relacionada (Figura 12B). Finalmente, y para comprobar que los

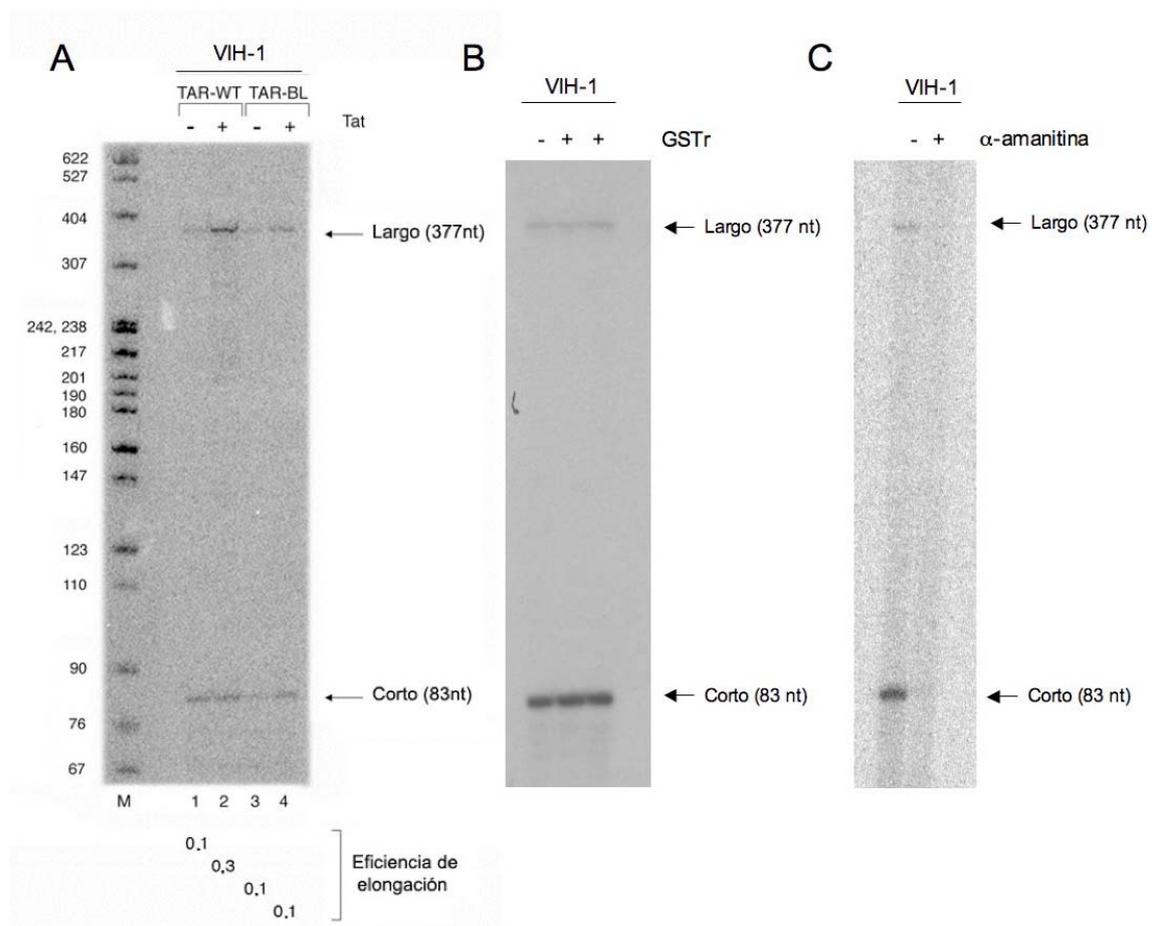


Figura 12. Especificidad de la activación transcripcional mediada por Tat del promotor del VIH-1. A) Comparación de la trans-activación por Tat cuando se utilizaron las construcciones HIVdGless WT o BL (*bulge less*). Se llevaron a cabo las reacciones con 200 ng de molde de DNA en ausencia (-) o presencia (+) de 200 ng de proteína Tat recombinante. Las eficiencias de elongación se calcularon como se indica en la Figura 11. B) Reacciones de transcripción-elongación con 200 ng de molde HIVdGless en ausencia (-) o presencia (+) de 200 ng de proteína recombinante GST (GSTr). C) Reacciones de transcripción-elongación con 200 ng de molde HIVdGless en ausencia (-) o presencia (+) de 4 μ g/ml de α -amanitina. Los productos de RNA se analizaron y cuantificaron como se describe en la Figura 11. Las eficiencias de elongación indicadas se calcularon como se indica en Materiales y Métodos. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores del tamaño de los fragmentos utilizados (M) están descritos en la Figura 11.

tránscritos que observamos en el ensayo *in vitro* son generados por la RNAPII, se realizó un experimento de transcripción-elongación en presencia del inhibidor transcripcional α -amanitina. La transcripción se eliminó con 4 microgramos de α -amanitina por ml. (Figura 12C), concentración a la cual se inhibe específicamente la actividad de la RNAPII.

1.2. Reproducción del bloqueo en la elongación transcripcional del gen c-myc *in vitro*

Además de los genes del VIH-1 se han descrito genes celulares en los que el control de la elongación transcripcional tiene un papel destacado, entre ellos, el del proto-oncogen c-myc (ver *Introducción*). Nos propusimos emplear el sistema de transcripción-elongación *in vitro* desarrollado para conocer la eficiencia de elongación de los complejos de la RNAPII ensamblados en ambos promotores y el estudio de su mecanismo de control.

En el gen c-myc se han descrito cuatro promotores, P0, P1, P2 y P3, siendo los promotores P1 y P2 los que dirigen la síntesis de la mayor parte de los tránscrios, un 10 y un 80 % respectivamente del total de los niveles de mRNA en la célula en condiciones normales (Battey *et al.* 1983; Wierstra *et al.* 2008). Asimismo, se ha descrito que la transcripción dirigida por el promotor P2 está regulada a nivel de la elongación, detectándose una alta densidad de moléculas de RNAPII próxima al sitio +1 relativo a P2 poco después de haberse iniciado la transcripción; además, también se ha descrito la contribución del promotor P1 en la actividad del promotor P2 (DesJardins *et al.* 1993; Wierstra *et al.* 2008). Por las razones expuestas, se decidió generar dos construcciones diferentes del DNA de c-myc, una conteniendo el promotor P2, y otra conteniendo además la región del promotor P1 (esquema en la Figura 13A).

Las condiciones de la reacción se optimizaron y se realizaron ensayos de transcripción-elongación *in vitro* utilizando los moldes de c-myc y extractos nucleares de células HeLa. Se observó que la eficiencia de elongación de los complejos transcripcionales variaba en cada reacción en función de la cantidad de molde utilizada. En la Figura 13 se puede ver la disminución en la eficiencia de elongación reflejada en el incremento de la señal correspondiente a los tránscrios cortos con respecto a los tránscrios largos (Figura 13B, carriles 2 y 3 y carriles 5 y 6). El mismo resultado se observó utilizando los moldes P1/P2 o P2. Estos resultados indicaron que la parada prematura durante la elongación de los complejos de la RNAPII formados en el

promotor del gen c-myc incrementa en función de la cantidad de DNA, sugiriendo que algún factor o factores importantes para la elongación procesiva es limitante en el extracto nuclear.

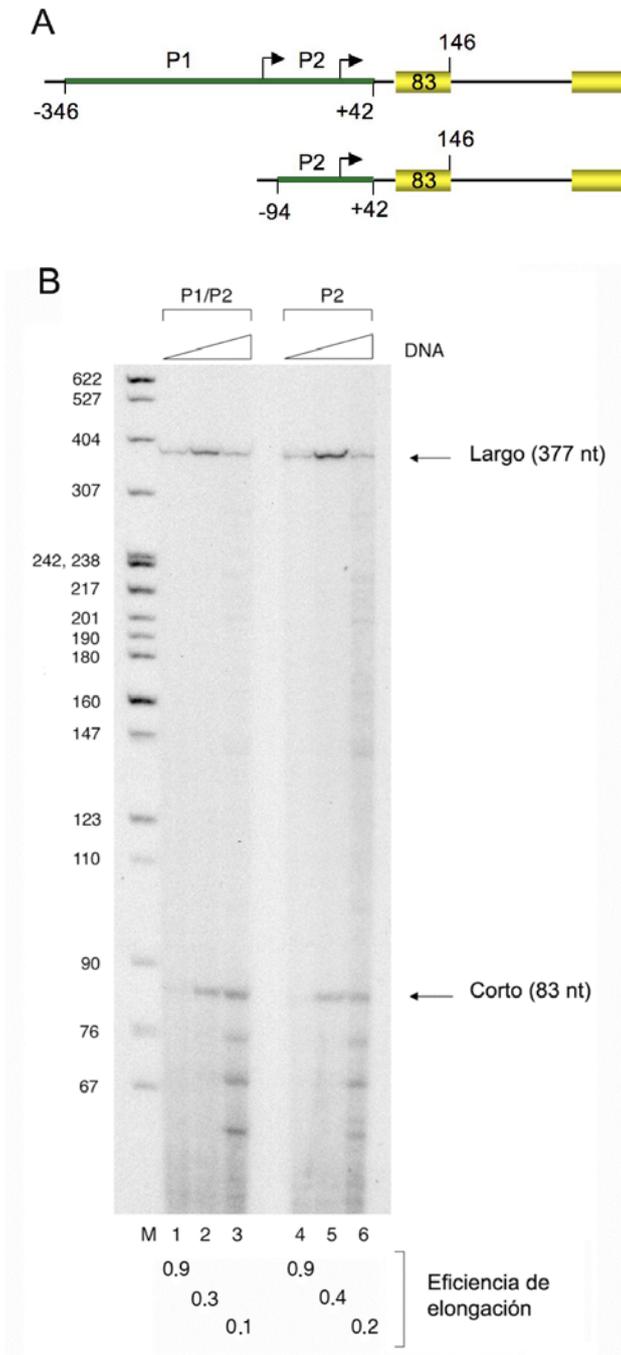
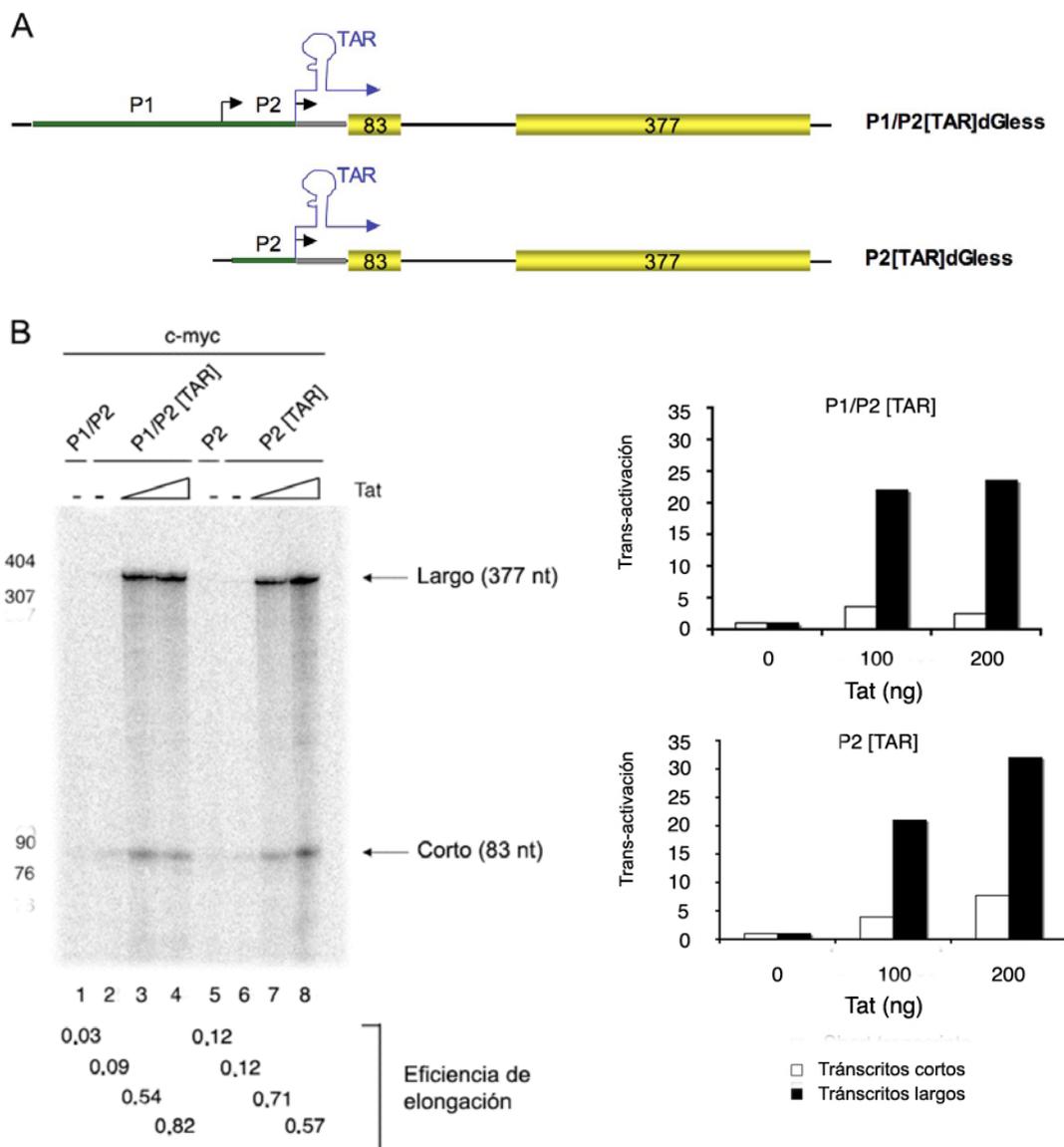


Figura 13. Análisis de la elongación durante la transcripción del gen c-myc. A) Representación esquemática de los moldes P1/P2dGless y P2dGless donde se indican las regiones promotoras del gen c-myc. La región P1P2 contiene las secuencias -346,+42 (relativas al sitio de inicio de la transcripción, +1) y la región P2, las secuencias -94,+42. También se inician las posiciones que ocupan los *cassettes* en los plásmidos derivados de c-myc B) Reacciones de transcripción-elongación *in vitro* utilizando 50, 100 y 200 ng de los moldes P1P2dGless (carriles 1-3) y P2dGless (carriles 4-6). Los productos de RNA se analizaron y cuantificaron como se describe en la Figura 11. Las eficiencias de elongación se calcularon como se indica en Materiales y Métodos. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores utilizados (M) están descritos en la Figura 11.

1. 3. Efecto de la proteína Tat sobre la procesividad del complejo de la RNAPII que transcribe el gen c-myc.

Las similitudes en el bloqueo de la elongación transcripcional observado en los genes del c-myc y VIH-1 sugieren que factores celulares que son importantes en la regulación de éste último podrían tener un papel también en la regulación del gen c-myc. Para estudiar este punto, se introdujo la secuencia que codifica la estructura TAR del VIH-1 en las construcciones que contienen las regiones promotoras del gen c-myc, después del sitio +1 de inicio de la transcripción, en una posición similar a su sitio natural en el LTR viral (Figura 14). Los experimentos de transcripción *in vitro* se llevaron a cabo usando estos moldes de DNA en condiciones donde se había observado una baja eficiencia de elongación de los complejos de la RNAPII. La adición de la proteína Tat recombinante



produjo una estimulación de la transcripción y un aumento en la eficiencia de la elongación, como lo indica el incremento preferentemente de la síntesis de transcritos largos (Figura 14B). Los mismos resultados se obtuvieron utilizando los moldes de DNA conteniendo el promotor P1/P2 y el promotor P2. El panel C de la Figura 14 muestra la cuantificación de los datos de la Figura 14B.

Como control se realizó un experimento en presencia de α -amanitina, que inhibió la transcripción en las mismas condiciones descritas anteriormente (Figura 15A). De la misma manera, cuando se realizó el experimento utilizando un molde conteniendo un elemento TAR incapaz de unir la proteína Tat, P2[TAR]BLdGless, no se observó dicha estimulación (Figura 15B).

Los datos obtenidos se corroboraron *in vivo* en experimentos de transfección transitoria. En primer lugar, se prepararon las construcciones conteniendo la región promotora del VIH-1 así como la región P2 del gen c-myc junto con el elemento TAR dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa. Se realizaron las transfecciones en células 293T en ausencia o presencia de un plásmido de expresión de la proteína Tat. En ambos casos, Tat estimuló significativamente la transcripción, como se aprecia en la Figura 16. Estos resultados indican que la proteína Tat puede modificar los complejos de la RNAPII formados en el promotor del gen c-myc para activar la eficiencia de elongación.

Figura 14. Activación de la transcripción del gen c-myc por la proteína Tat *in vitro* A) Representación esquemática de los moldes P1P2[TAR]dGless y P2[TAR]dGless utilizados en el ensayo. B) Reacciones de transcripción-elongación llevadas a cabo con los moldes indicados en ausencia (-) o presencia de 100 y 200 ng de proteína Tat recombinante. C) La cuantificación de los datos experimentales obtenidos está indicada de forma de gráfica. La trans-activación mediada por Tat se calculó dividiendo el valor normalizado de radiactividad de la banda que se corresponde con cada transcrito en presencia de la proteína Tat, por el valor de radiactividad normalizado de los mismos pero en ausencia de Tat. El análisis y la cuantificación de los productos de RNA así como el cálculo de las eficiencias de elongación se realizaron como se describe en la Figura 11. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores (M) utilizados están descritos en la Figura 11.

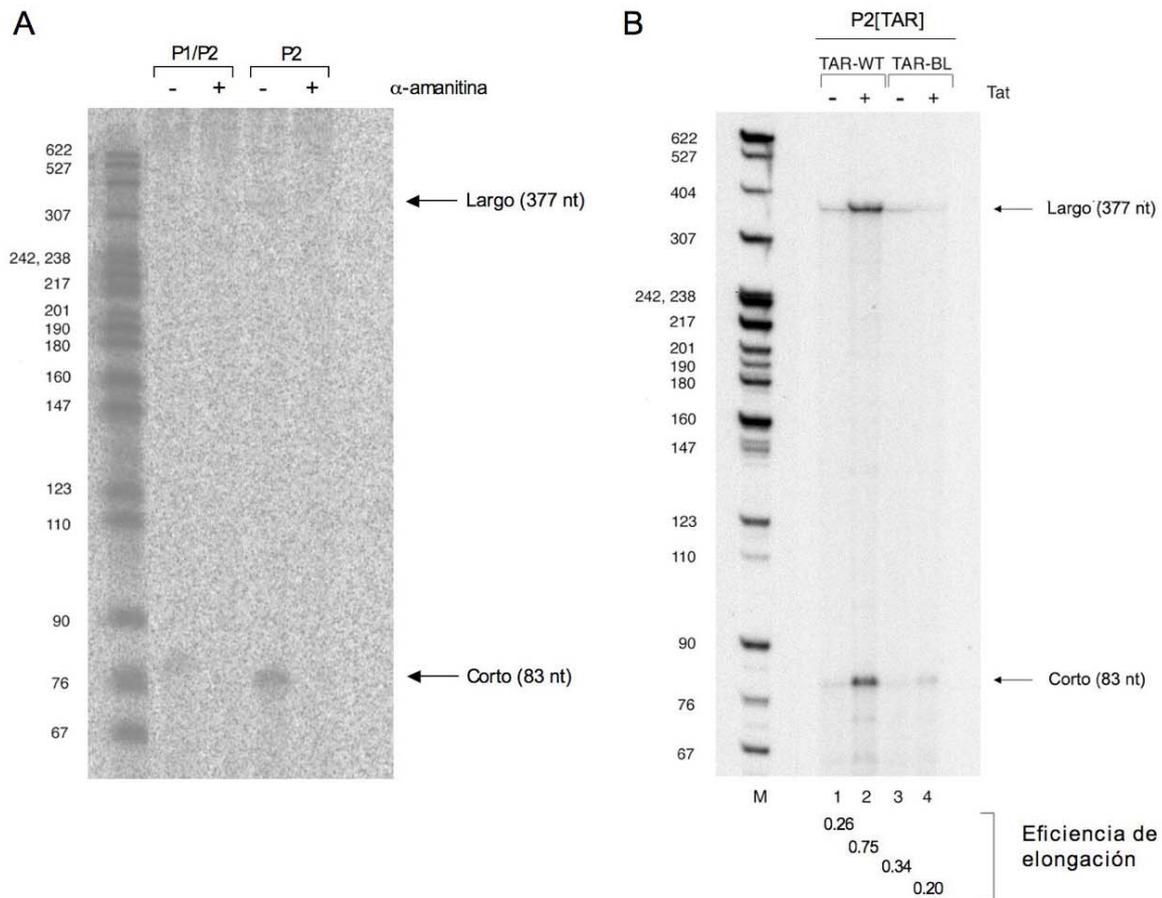
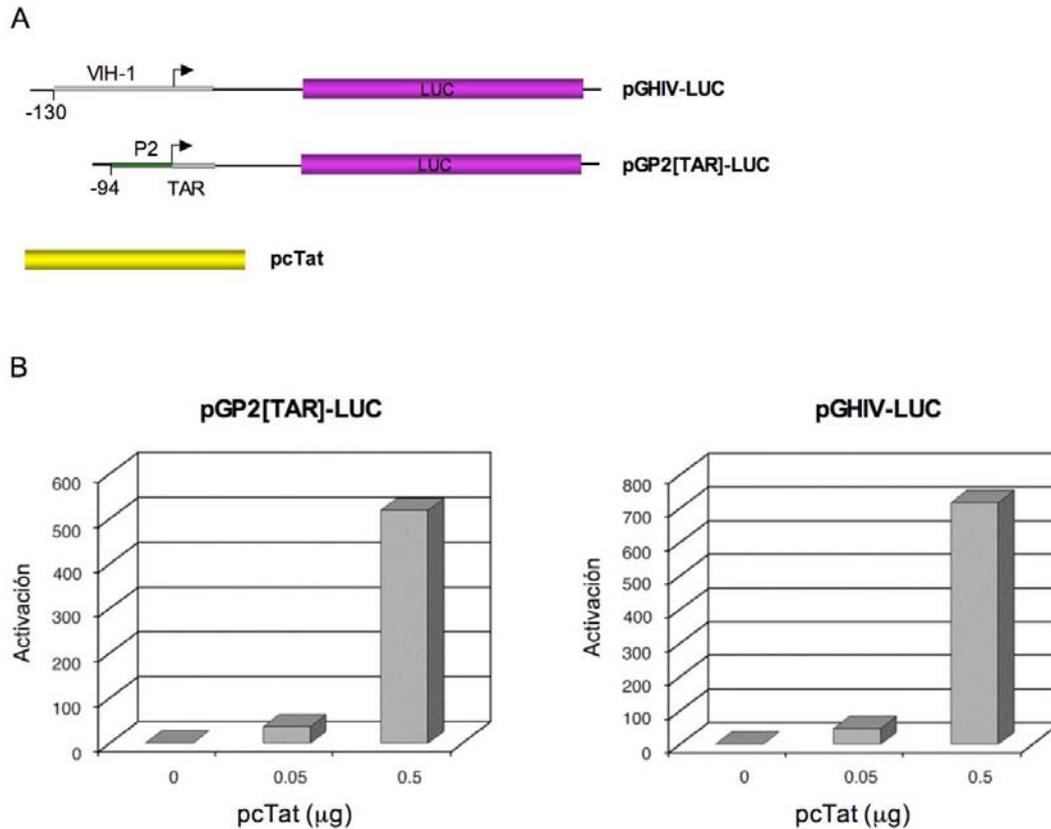


Figura 15. Especificidad de la activación transcripcional mediada por Tat del promotor P2 del gen *c-myc*. A) Reacciones de transcripción-elongación con 200 ng de molde P1P2dGless o P2dGless en ausencia (-) o presencia (+) de 4 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina. B) Comparación de la trans-activación por Tat cuando se utilizaron las construcciones P2[TAR]dGless WT o BL (*bulge less*). Se llevaron a cabo las reacciones con 200 ng de molde de DNA en ausencia (-) o presencia (+) de 200 ng de proteína Tat recombinante. El análisis y cuantificación de los productos de RNA y el cálculo de las eficiencias de elongación se realizó como se indica en la Figura 11. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores (M) utilizados están descritos en la Figura 11.

Figura 16. Activación de la transcripción del VIH-1 y el gen *c-myc* por la proteína Tat *in vivo*. A) Representación esquemática de las construcciones reporteras utilizadas en el experimento, pGHIV-LUC y pGP2[TAR]-LUC así como del plásmido de expresión de la proteína Tat (pcTat). B) Análisis de la actividad luciferasa en ensayos de transfección transitoria en células 293T. Los plásmidos reporteros conteniendo las regiones promotoras del VIH-1 y *c-myc*/TAR dirigiendo la expresión del gen luciferasa se co-transfectaron con las cantidades indicadas del plásmido de expresión de la proteína Tat, pcTat. Se muestran los datos de activación sobre la actividad del reportero en ausencia del plásmido efector. La transfección y la medida de la actividad se realizó como se indica en Materiales y Métodos.



1.4. Efecto de la depleción del complejo P-TEFb del extracto nuclear sobre la transcripción de los genes del VIH-1 y c-myc

Los resultados anteriores sugieren que Tat, a través de TAR, está reclutando el complejo P-TEFb, estimulando así la elongación transcripcional de los complejos de la RNAPII formados en el promotor del gen c-myc. Para determinar el requerimiento funcional de P-TEFb en la regulación transcripcional del gen c-myc y VIH-1 decidimos estudiar el efecto de la inmunodepleción del complejo P-TEFb de un extracto nuclear sobre la capacidad de éste último de llevar a cabo el proceso de elongación transcripcional.

La inmunodepleción del complejo se llevó a cabo usando un anticuerpo específico contra CDK9, uno de los componentes del complejo P-TEFb. La depleción se realizó en extractos nucleares de células HeLa y en condiciones de alta sal para asegurar una óptima especificidad (Figura 17). Se utilizó para ello una resina comercial con propiedades magnéticas recubierta de proteína A a la que se unieron covalentemente inmunoglobulinas específicas para la proteína CDK9, permitiendo su reutilización en

una segunda ronda inmunodepleción (Figura 17B). La eficiencia y la especificidad en la depleción de CDK9 se comprobaron visualizando ambos componentes del complejo P-TEFb (CDK9 y Ciclina T1) y otros factores nucleares mediante técnicas de WB (Figura 17C). Se obtuvo una depleción de aproximadamente el 90 % de las proteínas CDK9 y Ciclina T1. No se observó una disminución en otras proteínas analizadas del extracto así deplecionado como el factor de *splicing* U2AF⁶⁵ o el coactivador transcripcional CA150/TCERG1. El sobrenadante de los extractos control de la depleción tenía niveles de CDK9 y Ciclina T1 similares a los presentes en el extracto sin deplecionar (Figura 17C, carriles 1 y 6).

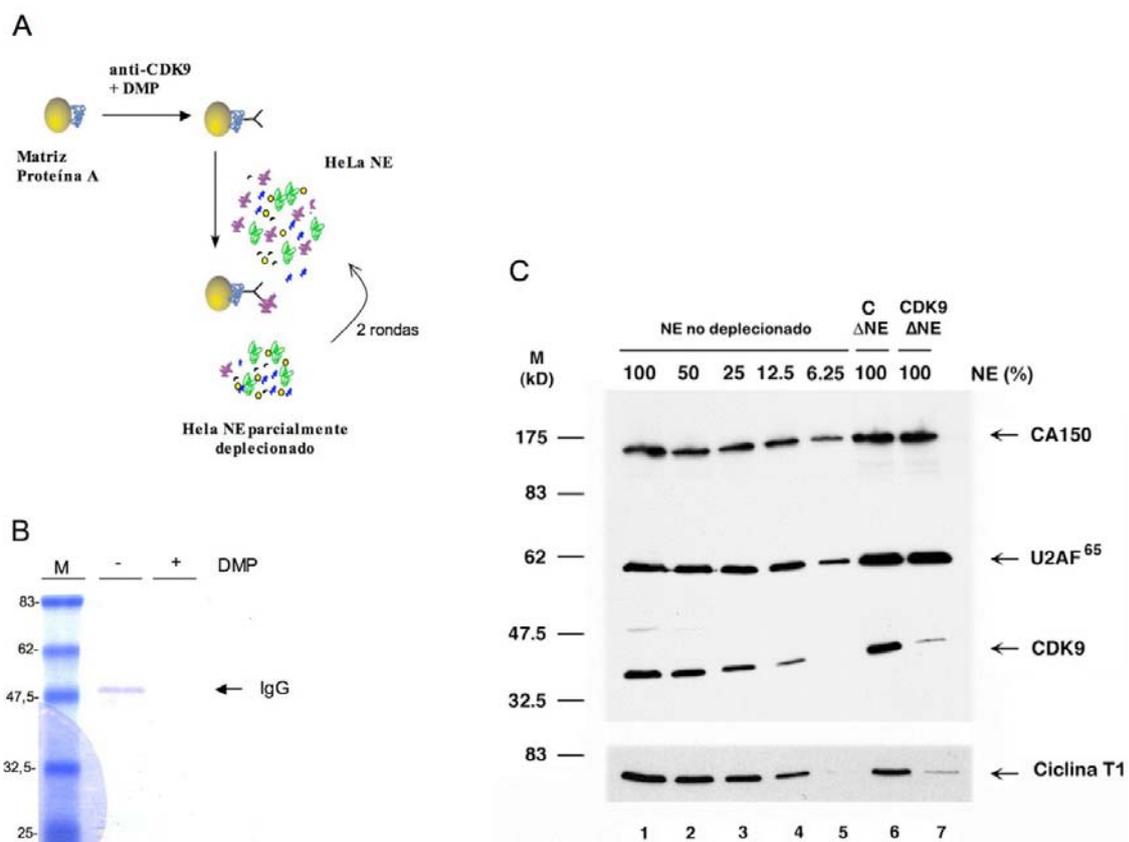


Figura 17. Inmunodepleción de la proteína CDK9 del extracto nuclear de células HeLa. A) Esquema del proceso de la inmunodepleción tal y como se detalla en el texto y en Materiales y Métodos. B) Comprobación de la unión covalente del anticuerpo anti-CDK9 a la matriz de proteína A con el reactivo dimetil pipelimidato (DMP); electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de la matriz de proteína A unida al anticuerpo antes y después de la unión covalente del anticuerpo a la matriz; las inmunoglobulinas quedan unidas a la proteína A y no se detectan en el gel. C) Resultados de un análisis por WB del extracto deplecionado específicamente (CDK9 ΔNE) y control (C ΔNE). Se utilizaron anticuerpos específicos para la localización de las proteínas específicas; las posiciones relativas de éstas están indicadas en la parte derecha del panel, y el peso molecular de los marcadores (M) en la parte izquierda. NE, extracto nuclear de células HeLa.

Los extractos nucleares deplecionados se utilizaron para evaluar el efecto de la ausencia de CDK9 en la actividad transcripcional de los promotores del VIH-1 y c-myc realizando ensayos de transcripción-elongación *in vitro*. En primer lugar, se comparó la actividad de los extractos durante la transcripción del promotor del VIH-1 en ausencia o presencia de la proteína Tat, modelo en el que se conoce la implicación de CDK9 en su regulación transcripcional (ver *Introducción*), para después examinar el efecto de la proteína en la transcripción del gen c-myc. Como se aprecia en la Figura 18, la depleción de CDK9 tuvo un efecto negativo sobre la transcripción, siendo su efecto más acusado en fases tardías de la elongación, como se refleja en la disminución preferente de la banda de 377 nt correspondiente a los transcritos largos y en el valor de la eficiencia de elongación de los complejos transcripcionales (Figura 18A, carril 3. También Figura 18B carril 2). La disminución del nivel de transcripción en los extractos deplecionados de CDK9 en ausencia de Tat apoyaría el modelo del reclutamiento de CDK9 al promotor del VIH-1 independientemente de Tat, probablemente a través de la interacción con componentes del PIC (ver *Discusión*). En presencia de Tat se observó una activación de la transcripción en los extractos deplecionados, indicando que la fracción de P-TEFb presente en el extracto deplecionado (aproximadamente un 10 %) es reclutada eficientemente por Tat para activar la transcripción del promotor viral en este sistema. (Figura 18A carril 4). Para comprobar si el complejo P-TEFb podía recuperar la capacidad de elongación en los extractos deplecionados de CDK9, las proteínas CDK9 y Ciclina T1 se expresaron en un sistema de baculovirus y se añadieron a los extractos deplecionados. La adición del complejo P-TEFb recombinante a las reacciones de transcripción incrementó la eficiencia de elongación en los extractos deplecionados (Figura 18A, carril 5 y Figura 18B, carril 3), apoyando de nuevo el papel esencial de este complejo en la activación de la elongación transcripcional del VIH-1.

Con el fin de conocer el efecto de la depleción de CDK9 en la transcripción del gen c-myc, se llevaron a cabo reacciones de transcripción-elongación *in vitro* con el molde de DNA basado en el promotor P2 del gen c-myc. Se utilizó la construcción P2dGless, ya que en los experimentos anteriores habíamos observado que los promotores P1P2 y P2 se comportaban de manera similar en el sistema de transcripción-elongación *in vitro* y, por lo tanto, decidimos continuar con el promotor más sencillo. La ausencia de CDK9 en los extractos se tradujo en una disminución acusada en el nivel de transcritos largos y un menor efecto en el nivel de los transcritos cortos sintetizados (Figura 18B carril 5).

Asimismo, la adición del factor P-TEFb recombinante fue suficiente para recuperar la actividad inicial del extracto deplecionado, como se puede apreciar en la Figura 17B.

Los resultados obtenidos apoyan un papel funcional importante de P-TEFb en la regulación de los genes del VIH-1 y c-myc ya que demuestran que se requiere de dicho complejo para una eficiente entrada en un estado procesivo del complejo de la RNAPII en ambos modelos.

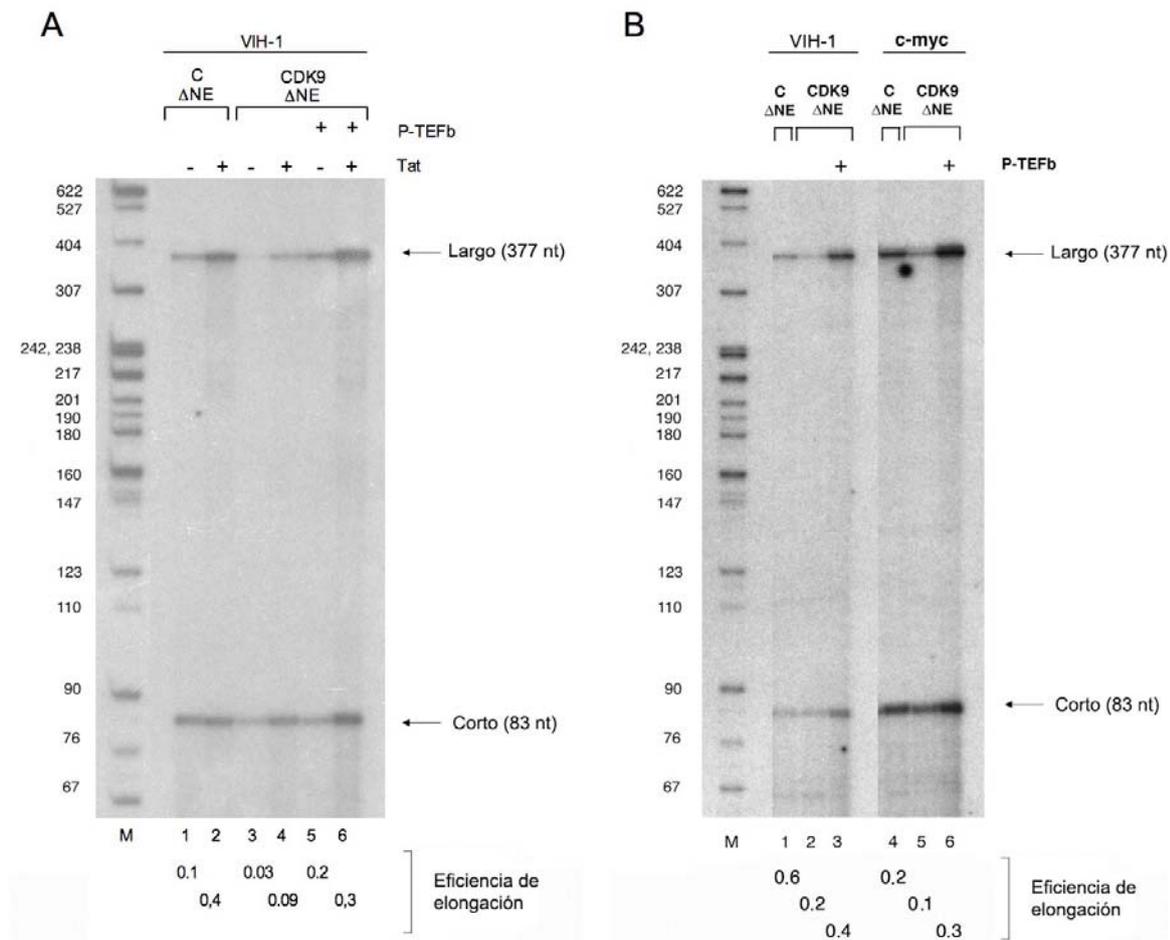


Figura 18. P-TEFb regula la elongación transcripcional de los genes del VIH-1 y c-myc. A) Las reacciones de transcripción-elongación *in vitro* se llevaron a cabo con extractos control (C ΔNE) y deplecionados de CDK9 (CDK9 ΔNE) y el molde HIVdGless en ausencia o presencia de 200 ng de proteína Tat recombinante. Se añadieron 80 ng de P-TEFb recombinante cuando se indica (carriles 5 y 6). B) Las reacciones de transcripción-elongación *in vitro* se llevaron a cabo con extractos control (C ΔNE) y deplecionados de CDK9 (CDK9 ΔNE) y los moldes HIVdGless (VIH-1) y P2dGless (c-myc). Se añadieron 80 ng de P-TEFb recombinante cuando se indica (carriles 3 y 6). El análisis y cuantificación de los productos de RNA así como el cálculo de las eficiencias de elongación se realizaron como se indica en la Figura 11. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores (M) utilizados están descritos en la Figura 11.

1.5. Estudio de la presencia de CDK9 en los PICs formados sobre los promotores del VIH-1 y c-myc *in vitro*

Los experimentos mostrados sugieren que podría existir en el gen c-myc un control de la elongación transcripcional mediado por CDK9 similar al descrito para los genes del VIH-1. Estudios previos habían demostrado que CDK9 está presente no sólo en complejos de elongación (Mancebo *et al.* 1997; Wei *et al.* 1998) sino que se asocia a los PICs que se ensamblan en la región promotora del VIH-1 (Ping *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2001). Debido a ello, nos propusimos examinar si CDK9 se asocia también con los PICs que se forman sobre el promotor del gen c-myc. Para tal fin, pusimos a punto un sistema de aislamiento de complejos transcripcionales *in vitro* para poder analizar así sus componentes. La metodología elegida se basa en la utilización de moldes de DNA que incluyen en su secuencia las regiones promotoras de los genes en estudio y que son sintetizados por PCR con oligonucleótidos modificados mediante la adición de biotina en su extremo 5' (ver *Materiales y Métodos*). Tras la incubación de dichos moldes con el extracto nuclear, la presencia de biotina permite su inmovilización en resinas de estreptavidina y el aislamiento de los PICs, cuya composición proteica se analiza posteriormente mediante técnicas de WB (Figura 20).

Antes del análisis bioquímico y para comprobar la funcionalidad de los PICs, se realizaron experimentos de transcripción-elongación *in vitro* con PICs aislados de moldes biotinilados de DNA conteniendo, además de las regiones promotoras, las secuencias de los *cassettes* dGless. (Figura 19). Así, tras el aislamiento de los PICs del extracto nuclear y una vez lavados, se adicionaron los ribonucleótidos (uno de ellos marcado radioactivamente) en condiciones de transcripción, y se procedió al análisis de los transcritos generados tal y como se describió previamente en el *apartado 1.1* de esta sección. El análisis de los RNAs resultantes reveló que los PICs aislados según la metodología descrita eran funcionales y capaces de sintetizar transcritos de una manera eficiente y, por tanto, que los PICs así aislados contenían todos los factores requeridos para transcribir ese DNA (Figura 19B).

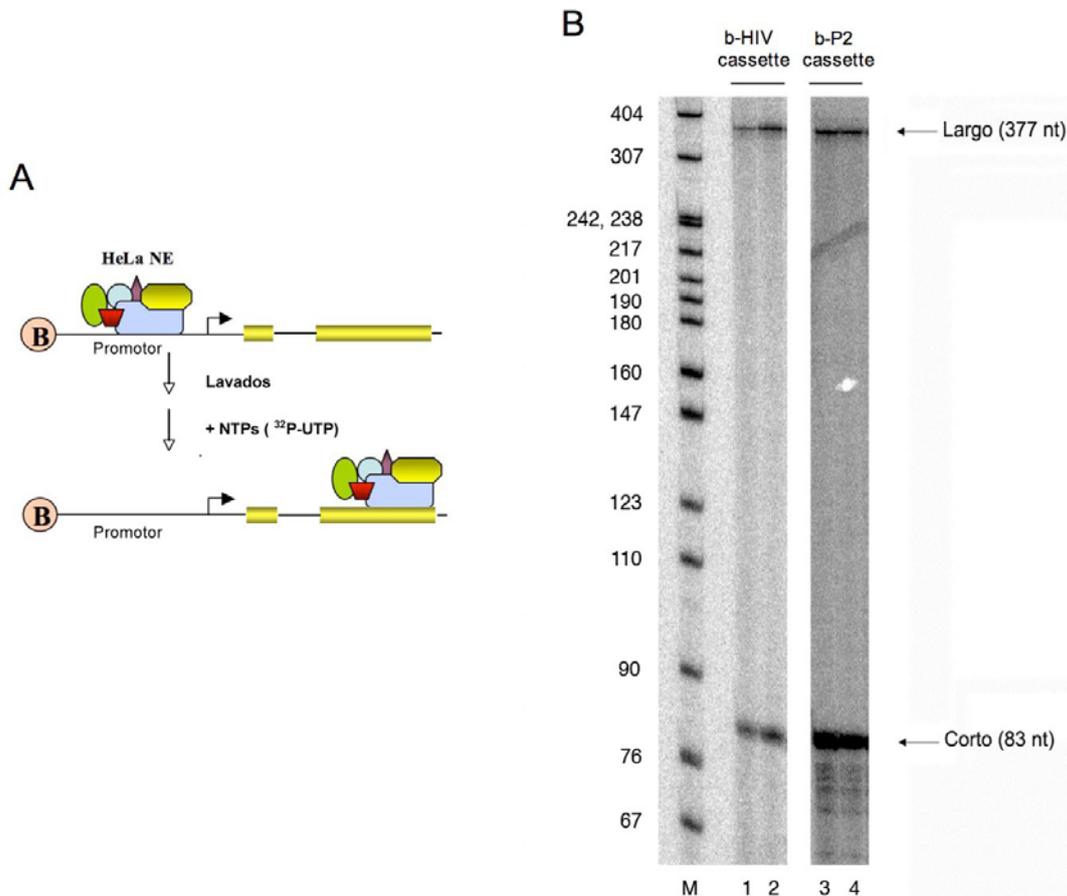


Figura 19. Análisis de la funcionalidad de los PICs aislados *in vitro*. A) Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de los PICs y posterior ensayo de actividad transcripcional. Se incuban los moldes biotinilados con el extracto nuclear (HeLa NE) y se aíslan utilizando una matriz magnética. Tras el lavado, se incuban con nucleótidos, uno de ellos marcado radiactivamente (^{32}P -UTP). Los RNAs obtenidos se procesan tal y como esquematiza en la Figura 11. B) Reacciones de transcripción-elongación *in vitro* utilizando los moldes biotinilados conteniendo las regiones promotoras del VIH-1 y c-myc usadas, b-HIVcassette y b-P2cassette. En la figura se muestran dos reacciones independientes utilizando en cada caso los moldes indicados. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores (M) utilizados están descritos en la Figura 11.

La caracterización bioquímica de los PICs por WB se muestra en la Figura 20. Como era de esperar, las proteínas CDK9 y Ciclina T1 se detectaron en los complejos formados sobre el promotor del VIH-1 (Figura 20, carril 3) y sobre el promotor P2 del gen c-myc. (Figura 20, carril 5). Como control del experimento se analizó la presencia de TBP (proteína de unión a la caja TATA) y del factor de transcripción Sp1. Ambos promotores contienen una caja TATA consenso y tres sitios de unión al DNA para el factor Sp1 en el promotor del VIH-1 y una única caja rica en CT, identificada como sitio de unión para Sp1, en el promotor del gen c-myc (DesJardins *et al.* 1993; Majello *et al.* 1995). Tanto TBP como Sp1 se detectaron en los complejos formados sobre ambos

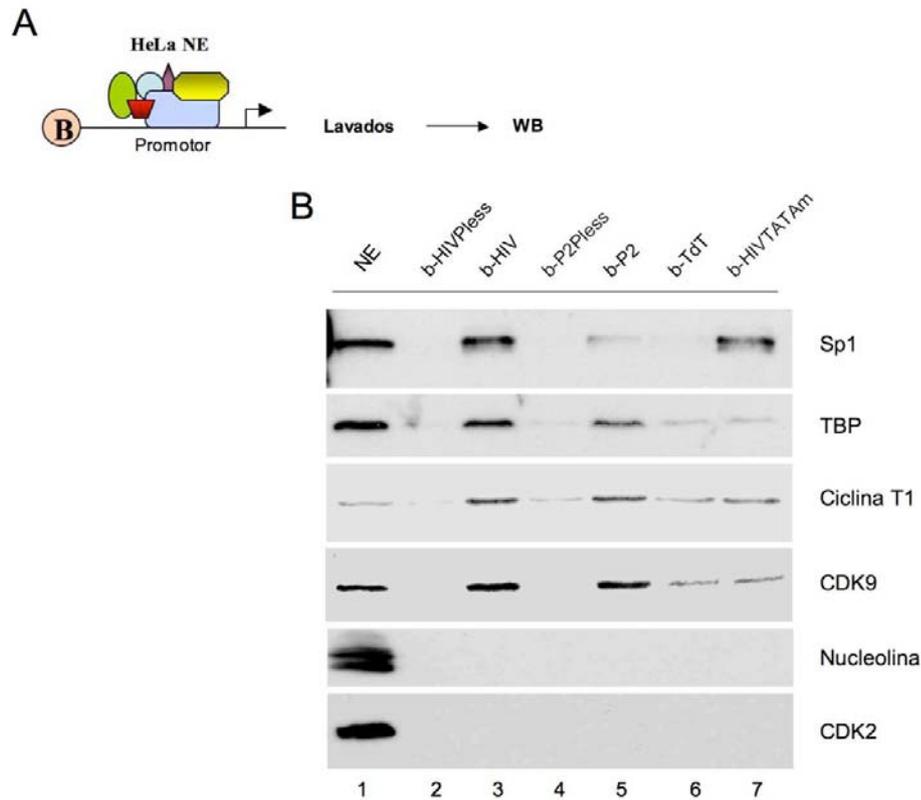


Figura 20. Análisis de la composición proteica de los PICs formados sobre los promotores del VIH-1 y c-myc. A) Esquema del molde biotinilado y el procedimiento utilizado para el aislamiento de los PICs. C) Se formaron los PICs utilizando los siguientes moldes biotinilados: 1- molde derivado del VIH-1 en ausencia de promotor (b-HIVPless), 2- molde del VIH-1 (b-HIV-1), 3- molde derivado de c-myc en ausencia de promotor (b-P2Pless), 4- b-TdT y 5- molde del VIH-1 sustituyendo la secuencia TATAA por GTCAC (b-HIVTATAm). Las proteínas aisladas se analizaron por WB utilizando los anticuerpos específicos para la localización de las proteínas indicadas. NE, extracto nuclear de células HeLa.

promotores (Figura 20), y aunque el ensayo no es cuantitativo, la reproducible intensidad de señal obtenida para la unión de Sp1 se correlaciona con el número de secuencias de unión a DNA presentes en ambos promotores. También se analizaron los PICs purificados con anticuerpos específicos para la RNAPII. Los resultados obtenidos son similares a los de TBP, sin embargo, la calidad de los anticuerpos utilizados no permitió obtener una señal de calidad aceptable. La especificidad de los PICs formados se examinó utilizando además construcciones de DNA que no contenían las secuencias promotoras (Pless), una construcción con la secuencia de la caja TATA mutada (b-HIVTATAm), y una construcción donde se sustituyó el promotor del VIH por la región promotora del gen de la deoxinucleotidiltransferasa terminal murina (b-TdT). El promotor TdT carece de la secuencia TATA y contiene únicamente un elemento iniciador que dirige la transcripción (Smale *et al.* 1989; Berkhout *et al.* 1992).

Corroborando la especificidad del sistema empleado, la señal obtenida para la proteína TBP en todas esas construcciones fue mínima, sin embargo, sí se observó la presencia del factor Sp1 en los PICs formados sobre el promotor HIVTATAm como era esperable ya que la secuencia de unión a DNA de ese factor sigue permaneciendo en ese molde de DNA. En dichos promotores se observó una menor asociación tanto de la proteína CDK9 como Ciclina T1 (Figura 20 carriles 6 y 7). Además, no se detectó la presencia de proteínas no implicadas en la formación de complejos transcripcionales, como la nucleolina o la quinasa CDK2 en los PICs purificados (Figura 20).

Estos resultados demuestran la presencia de P-TEFb en los complejos de la RNAPII ensamblados *in vitro* sobre los promotores del VIH-1 y c-myc, y sugieren el requerimiento de una secuencia TATA funcional para su reclutamiento.

1.6. Estudio de la asociación de CDK9 a regiones promotoras del VIH y c-myc *in vivo*.

Los resultados obtenidos *in vitro* mostraban que el complejo P-TEFb está presente en los PICs formados en los promotores del VIH-1 y c-myc. Para conocer si el complejo P-TEFb es reclutado a las regiones promotoras de esos genes *in vivo* se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para estos experimentos se utilizó la línea celular Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8 que contiene una construcción integrada en el genoma celular conteniendo el LTR viral dirigiendo la expresión de las proteínas eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) y Tat. Esta línea celular exhibe un fenotipo de infección latente de forma que, en ausencia de estímulo, la producción de eGFP es menor del 10 % y se incrementa a más del 95 % después de la estimulación de la expresión génica por el éster de forbol PMA o TNF α (Dr E. Muñoz, Universidad de Córdoba, comunicación personal y (Marquez *et al.* 2008).

Para comprobar las condiciones en las que se producía la activación transcripcional del LTR viral integrado se realizó una estimulación de las células con PMA y se analizó la producción de eGFP y Tat por RT-PCR y WB. No se detectaron las proteínas eGFP y Tat en ausencia de inducción por PMA, sin embargo, después de la estimulación sí se detectaron ambas proteínas en los extractos así preparados (Figura 21B). Cuando se analizaron las muestras por RT-PCR se observó una baja señal de los mRNAs correspondientes a la eGFP y Tat en ausencia de estimulación (Figura 21C, carriles 1 y 4), indicando cierta actividad basal del promotor del LTR. Esta actividad transcripcional residual ha sido descrita en numerosos sistemas celulares inducibles.

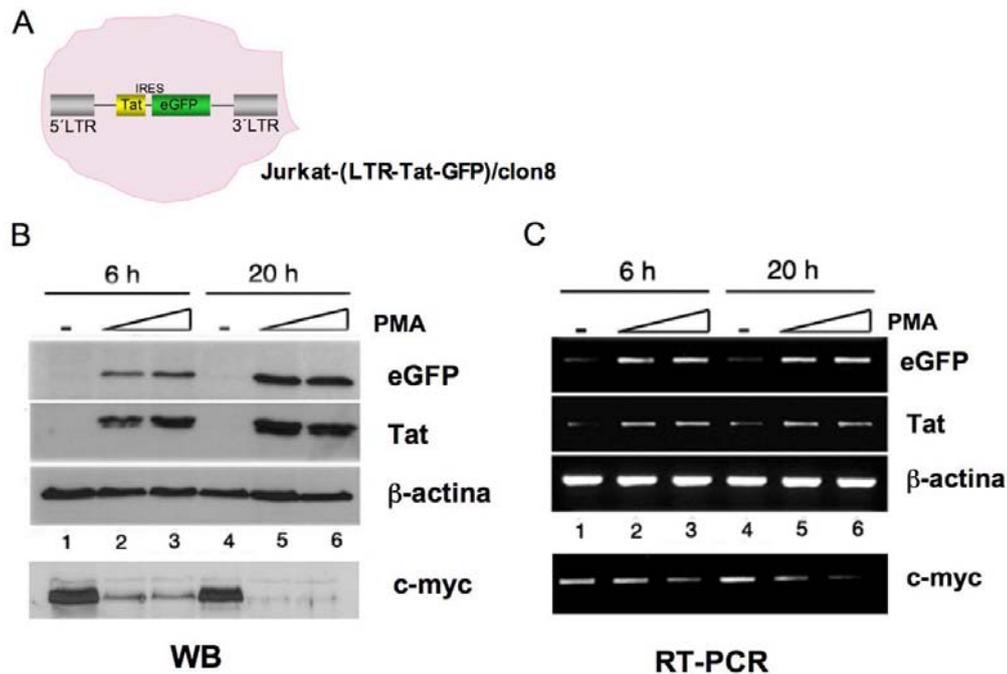


Figura 21. Análisis de la estimulación con PMA de las células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8. A) Representación esquemática de la construcción integrada en el genoma celular conteniendo el LTR viral 5', las secuencias que codifican para las proteínas Tat y eGFP separadas por una secuencia IRES. B) Análisis por WB de los extractos preparados a partir de células sin tratar (-) o tratadas con 25 y 50 ng/ μ l de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante los tiempos indicados. La detección de las proteínas de interés se realizó mediante el uso de anticuerpos específicos. C) Análisis por RT-PCR del RNA obtenido a partir de células sin tratar (-) o tratadas con 25 y 50 ng/ μ l de PMA durante los tiempos indicados. La expresión de los genes de interés se indica a la derecha del panel.

El efecto de la estimulación por PMA del gen c-myc fue también estudiado. Los experimentos de RT-PCR mostraron una cierta reducción de los niveles del mRNA de c-myc a las 6 y 20 horas de la inducción, y prácticamente no se detectaron niveles de proteína después de las 20 horas de estimulación (Figura 21). La disminución observada de la expresión del gen c-myc en células Jurkat después de una estimulación con PMA ha sido ya descrita (Herrant *et al.* 2002).

Mediante ChIP se analizó la localización de las proteínas de interés en condiciones basales (ausencia de tratamiento con PMA), así como en células que habían sido sometidas a un tratamiento de estimulación con PMA y que por tanto presentaban una fuerte activación del LTR. En este tipo de ensayo, se somete a las células a un proceso de fijación para asegurar el aislamiento de fragmentos genómicos de interés mediante la inmunoprecipitación específica de los factores en estudio, para su posterior purificación

y detección mediante PCR (Figura 22). La puesta a punto de esta tecnología requirió el uso de diferentes protocolos de experimentación. En la Tesis se describe el protocolo de ChIP que mejores resultados dio con el sistema experimental usado (ver *Materiales y Métodos*).

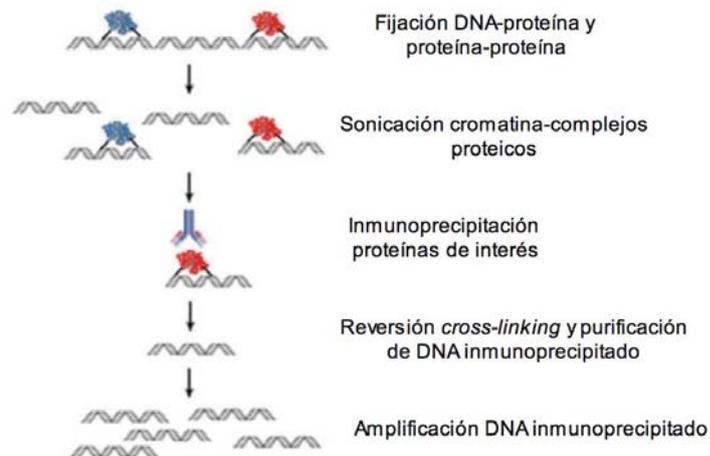


Figura 22. Esquema del ensayo de ChIP. En azul y rojo se muestran dos proteínas diferentes, siendo la de color rojo la proteína de interés.

Dado que la proteína de estudio (CDK9) no se une directamente al DNA sino que requiere de interacciones proteína-proteína, la fijación se llevó a cabo con el agente dimetil 3,3'-ditiobispropionimidatox2HCl (DTBP) y formaldehído. Asimismo, se optimizaron las condiciones de lisis celular y sonicación (ver *Materiales y Métodos* y apartado 2.2 de esta sección) para asegurar la obtención de fragmentos de DNA genómico adecuados que permitieran delimitar de manera apropiada las distintas regiones del gen. Como se aprecia en la Figura 23, los fragmentos obtenidos tienen un tamaño reproducible de entre 100 y 500 pb .

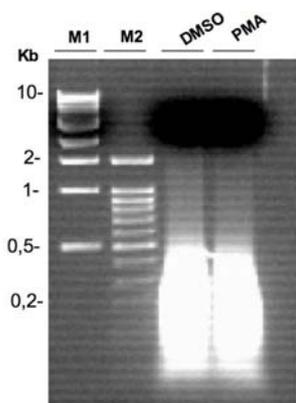


Figura 23. Análisis de los fragmentos de DNA tras el protocolo de sonicación. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de 5 μ g de DNA purificado de los extractos sonicados a partir de células sin tratar (DMSO) o tratadas con PMA. Se indica el tamaño en Kilobases (Kb) de los marcadores del tamaño utilizados (M1 y M2).

La cromatina se aisló de las células en ausencia o presencia del tratamiento con PMA y las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo con anticuerpos específicos para CDK9, la RNAPII (como control positivo) e inmunoglobulinas de conejo (rIgG) (como control negativo). La PCR se llevó a cabo con oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones promotoras del LTR viral y del gen c-myc. Los resultados se muestran en la Figura 24 donde se observa la presencia específica de CDK9 y RNAPII en ambos promotores *in vivo*, tanto en células estimuladas como sin estimular. Sobre las mismas muestras inmunoprecipitadas se amplificaron dos fragmentos sobre los que cabía esperar un resultado negativo de asociación de la maquinaria transcripcional: una región intergénica situada 10 kb aguas arriba del gen c-myc, y una región exónica perteneciente al gen OCT-2, que se encuentra activo únicamente en linfocitos B (Bhargava *et al.* 1993; Marafioti *et al.* 2003). No se detectó la presencia de CDK9 o RNAPII en esas regiones, como se muestra en la Figura 24, lo que añade mayor especificidad a los resultados

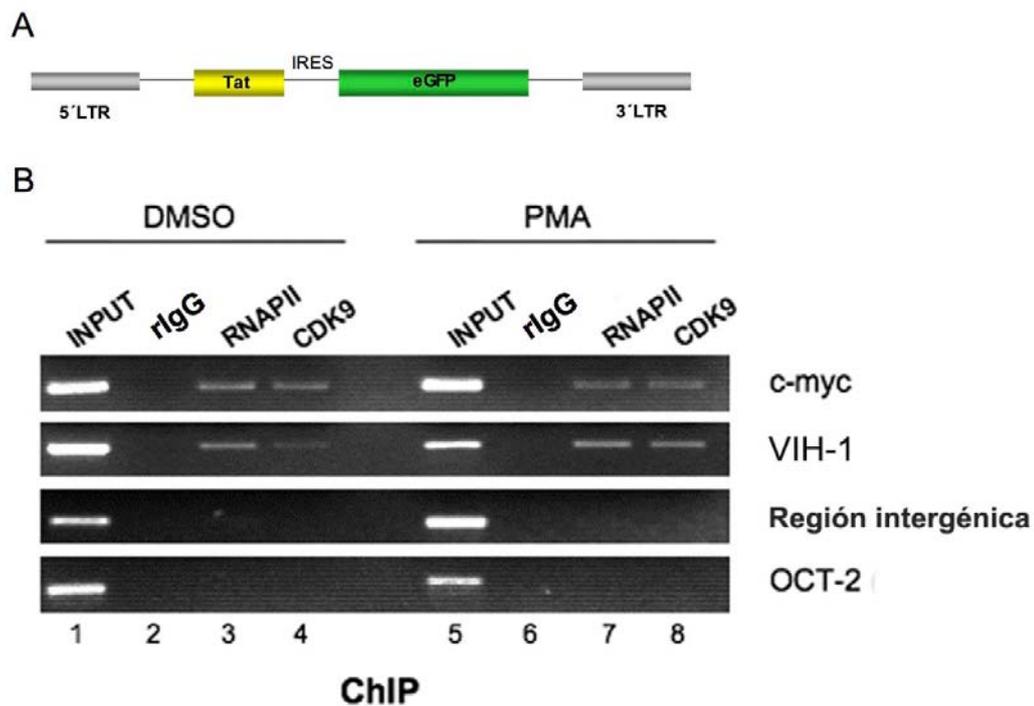


Figura 24. Análisis por ChIP del reclutamiento de factores de transcripción a la región promotora del VIH-1 y c-myc. A) Esquema de la región integrada derivada del VIH-1 en las células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8. B) Los extractos preparados a partir de células sin tratar (DMSO) o tratadas con 50 ng/μl de PMA y fijadas, se sonicaron y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos indicados. Se purificó el DNA de las muestras y se analizaron los fragmentos obtenidos por PCR, amplificando las regiones correspondientes: la región promotora del gen c-myc endógeno, la región promotora del LTR viral integrado; una región intergénica 10 kb aguas arriba del promotor P2 del gen c-myc, y una región exónica del gen OCT-2. La señal INPUT (carriles 1 y 5) muestra la amplificación de los fragmentos correspondientes a partir de las muestras antes de la inmunoprecipitación.

obtenidos. Estos resultados indican que CDK9 se asocia a los complejos transcripcionales que se forman en la región promotora del gen *c-myc*, de la misma manera que en los complejos transcripcionales formados sobre el LTR del VIH-1 *in vivo*. Observamos una señal positiva tanto en el caso de células estimuladas y sin estimular, indicando un reclutamiento a dichas regiones en ausencia de activación transcripcional. Para examinar diferencias en las dos condiciones sería necesario analizar el DNA inmunoprecipitado de manera cuantitativa.

1.7. Relevancia de las secuencias de factores de unión a DNA en las regiones promotoras para la activación transcripcional mediada por CDK9.

La región próxima al promotor del VIH-1 y del gen *c-myc* acumula complejos de RNAPII cuya capacidad de elongación es deficiente para transcribir el completo conjunto de secuencias del gen. Es posible que la composición de esos complejos sea diferente, y que se requiera de la presencia de un activador (por ejemplo Tat en el caso del VIH-1) y de secuencias específicas del DNA para ensamblar el correcto complejo transcripcional que será procesivo en elongación a través de la fosforilación de la CTD de la RNAPII por CDK9. En este contexto, es interesante señalar que las secuencias de la caja TATA y adyacentes del gen *c-myc* son muy similares a los genes del VIH-1, *hsp70* y otros que son regulados a través de un bloqueo en la elongación transcripcional (Krumm *et al.* 1993). Con esos datos presentes, nos propusimos como objetivo determinar el requerimiento de las secuencias del promotor del VIH-1 y *c-myc* en la activación transcripcional mediada por CDK9.

Se había demostrado con anterioridad que el reclutamiento artificial del factor P-TEFb a la región promotora del VIH-1 activa la elongación transcripcional (Majello *et al.* 1999). La adición de motivos de secuencia específicos para el dominio de unión a DNA del activador de levaduras GAL4 a un promotor determinado es un sistema ampliamente utilizado para el reclutamiento de factores celulares y para el estudio de su actividad transcripcional. Utilizamos este sistema para conocer si la naturaleza del promotor tiene un papel relevante en la capacidad de activación transcripcional por parte de CDK9. Para ello, se prepararon construcciones conteniendo un fragmento que incluye 5 sitios consecutivos de unión específica para el dominio de unión a DNA (DBD) de GAL4 junto a las secuencias promotoras del VIH-1 y *c-myc* (promotor P2), que dirigen la expresión del gen reportero de luciferasa (Figura 25A). Se realizaron

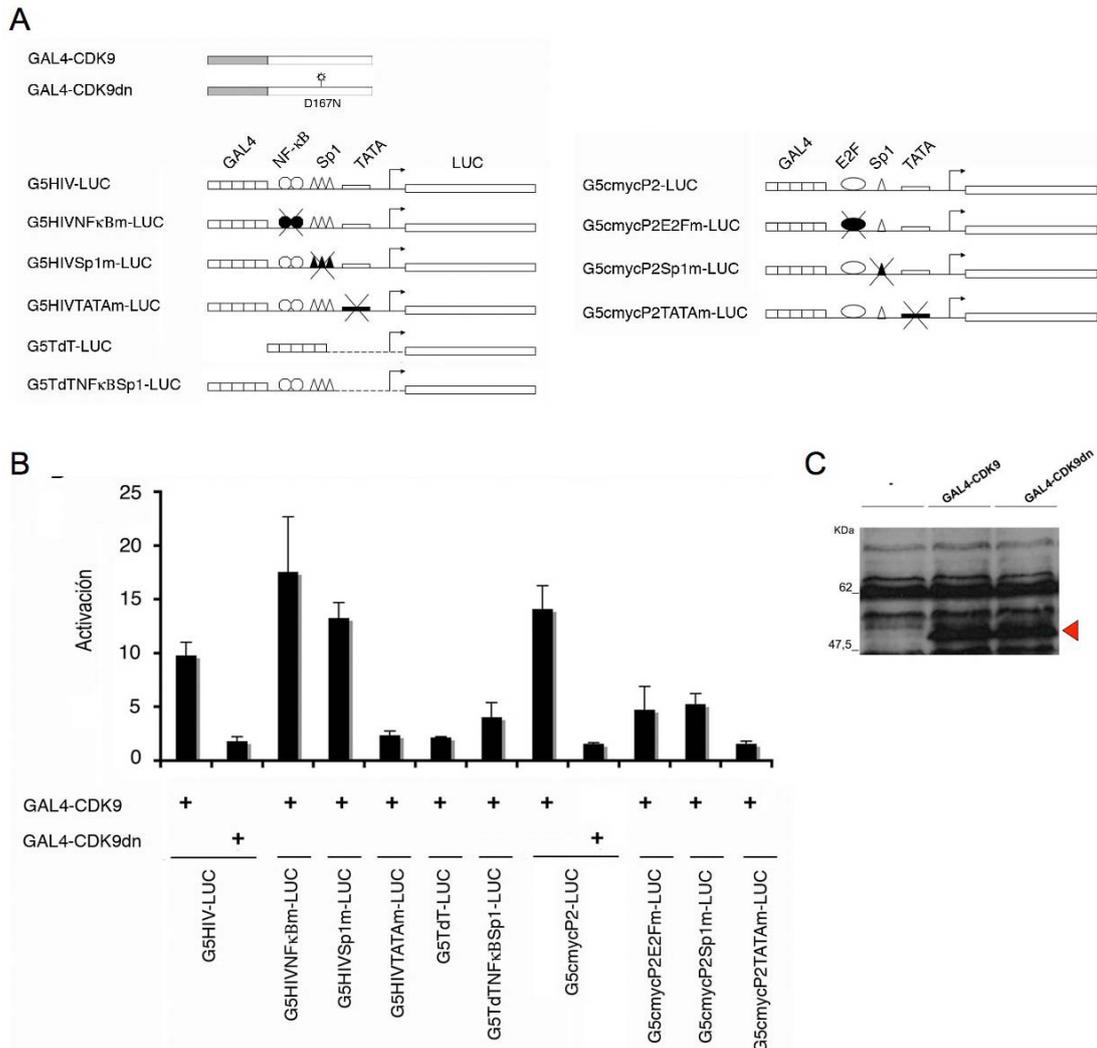


Figura 25. Evaluación del papel de las secuencias de un unión de factores de transcripción de la región promotora en la activación de la transcripcional mediada por GAL4-CDK9. A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas en el ensayo. GAL4-CDK9, expresa la proteína CDK9 fusionada al dominio de unión a DNA de la proteína GAL 4 (GAL4DBD); GAL4-CDK9dn expresa una proteína CDK9 con un cambio en el aa Asp-167 por Asn y es catalíticamente inactiva. Todas las construcciones reporteras contienen cinco sitios de unión para el dominio GAL4DBD aguas arriba de la región promotora. Las construcciones derivadas del VIH-1 son G5HIV-LUC, con las secuencias de unión para NF-κB, Sp1 y la caja TATA, *wild type*; G5HIVNFκBm-LUC, con una mutación en cada uno de los dos sitios de unión para este factor; G5HIVSp1m-LUC, con una mutación en cada uno de los tres sitios de unión para Sp1, G5HIVTATAm-LUC con una mutación en la caja TATA. G5TdT-LUC contiene la región iniciadora del gen TdT y G5TdTNFκBSp1-LUC contiene las de unión para los factores NF-κB y Sp1 del VIH-1 aguas arriba del promotor TdT. Las construcciones derivadas del gen c-myc son G5mycP2-LUC, con las secuencias del promotor P2 *wild type*; G5mycP2E2Fm-LUC, con una mutación en el sitio de unión del factor E2F; G5mycP2Sp1m-LUC, con una mutación en el sitio de unión de Sp1 y G5mycP2TATAm-LUC que contiene una mutación en la caja TATA. B) Análisis de la actividad luciferasa en ensayos de transfección transitoria de células HeLa. Como control se utilizó el plásmido CMV-CAT. Se muestran los datos de activación sobre la actividad del reportero en ausencia del plásmido efector. Las barras representan la media de al menos tres experimentos independientes, y se utilizaron al menos dos preparaciones de cada plásmido de DNA. C) Análisis por WB de la expresión de las proteínas efectoras GAL4-CDK9 y GAL4-CDK9dn.

cotransfecciones en células HeLa de esas construcciones junto con un plásmido que codifica la proteína de fusión GAL4-CDK9 y, después de obtener los extractos celulares, se midió la actividad luciferasa de cada muestra. Como se observa en la Figura 25B el reclutamiento de GAL4-CDK9 produce un incremento de la actividad transcripcional de ambos promotores (G5HIV-LUC y G5P2-LUC respectivamente). Por el contrario, una versión de la construcción GAL4-CDK9 que tiene una mutación en su dominio de fosforilación y es catalíticamente inactiva (GAL4-CDK9dn) (Majello *et al.* 1999) no es capaz de estimular la transcripción desde esos promotores. El nivel de expresión de proteínas de ambas construcciones en las células transfectadas era comparable tal y como se muestra en el análisis por WB de los extractos celulares (Figura 25C).

Para examinar el posible papel de las secuencias de DNA del promotor en la activación mediada por la proteína GAL4-CDK9, se prepararon construcciones reporteras con diferentes mutaciones en la zona promotora (Figura 25A), las cuales se cotransfectaron en las células junto con el plásmido efector. Los resultados se muestran en la misma figura. En el caso de las construcciones que contienen la región promotora del VIH-1, se observó que la mutación de los dos sitios de unión para el factor NF- κ B, o los tres sitios de unión para el factor Sp1 no afectaban negativamente a la capacidad de estimulación de GAL4-CDK9. Estos resultados indicaron que los sitios de unión para los factores NF- κ B o Sp1, individualmente considerados, no son necesarios para la activación mediada por el reclutamiento artificial de GAL4-CDK9 a la región promotora del VIH-1. Sin embargo, la mutación de la caja TATA produjo una disminución considerable de la activación transcripcional mediada por GAL4-CDK9.

En las condiciones experimentales usadas se observó que tanto el promotor sin mutar como el mutante en la caja TATA exhibían unos niveles de transcripción basal similares (TABLA IX), indicando que el ensamblaje de los PICs en ambos promotores no se encuentra restringido. El mantenimiento de la actividad transcripcional del promotor del VIH-1 con la secuencia TATA mutada se ha observado previamente y puede deberse a la existencia de una compleja regulación de la transcripción basal de dicho promotor, al menos en determinados contextos (ver *Discusión*).

TABLA IX. Análisis de la actividad reportera en células HeLa del efecto de GAL4-CDK9 sobre las construcciones derivadas del VIH-1 y c-myc, *wild type* y mutante de la caja TATA. Se muestra la actividad de las construcciones reporteras G5HIV-LUC y G5HIVTATAm-LUC obtenida a partir de tres experimentos independientes (Exp.). Los valores se normalizaron por la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) del reportero CMV-CAT, y representan la media de muestras realizadas por duplicado.

	VIH-1 <i>wild type</i>			VIH-1 mutante caja TATA		
	-CDK9	+CDK9	Activación	-CDK9	+CDK9	Activación
Exp. 1	165	1798	10.91	184	404	2.1
Exp. 2	395	3898	9.86	201	446	2.2
Exp. 3	5610	47845	8.52	10022	30019	2.9
	P2c-myc <i>wild type</i>			P2c-myc mutante caja TATA		
	-CDK9	+CDK9	Activación	-CDK9	+CDK9	Activación
Exp. 1	88	1404	15.9	64	87	1.3
Exp. 2	132	1716	13.0	84	144	1.7
Exp. 3	1806	20984	11.6	1335	2302	1.7

Para examinar mejor el papel de la caja TATA se analizó la activación de GAL4-CDK9 sobre el promotor TdT (G5TdT-LUC), que como se ha indicado previamente, carece de una secuencia TATA y contiene una región iniciadora. La construcción G5TdT-LUC no mostró una capacidad de respuesta significativa al reclutamiento de Gal4-CDK9. La adición de los elementos NF- κ B y Sp1 procedentes del LTR del VIH-1 a este promotor (G5TdTNFkBSp1-LUC), aún potenciando la transcripción basal, no supuso un incremento de su actividad transcripcional mediada por GAL4-CDK9. Estos resultados demuestran que un conjunto de secuencias *enhancer* de la transcripción no son requeridas *per se* para la activación mediada por CDK9 y que dicha activación requiere de una secuencia TATA consenso.

En el caso de la región promotora P2 del gen c-myc, se prepararon construcciones que contienen una mutación en el sitio de unión para el factor de transcripción E2F, en el sitio de unión del factor Sp1 (Majello *et al.* 1995), ambos elementos reguladores positivos del promotor P2 (Moberg *et al.* 1992; DesJardins *et al.* 1993), así como en la caja TATA (Figura 25A). La activación mediada por GAL4-CDK9 disminuyó parcialmente cuando se utilizaron las construcciones que contienen las mutaciones de los sitios de unión para los factores de transcripción E2F o Sp1 (Figura 25B), sugiriendo que ambos elementos colaboran en la activación mediada por CDK9. No obstante, cuando se

utilizó la construcción mutante de la secuencia TATA se observó una disminución de la trans-activación por GAL4-CDK9 notablemente mayor (Figura 25B). Estos resultados indican, de nuevo, un estricto requerimiento de la secuencia TATA para la activación transcripcional mediada por CDK9, corroborando las observaciones anteriores.

2. ESTUDIO DEL RECLUTAMIENTO DE CA150 A UNA UNIDAD GÉNICA

Como se ha mencionado en la Introducción, el factor de transcripción CA150 regula el promotor del VIH-1 actuando en la etapa de la elongación. El efecto transcripcional ejercido por CA150 depende, sin embargo, de la integridad de la secuencia de la caja TATA del promotor, indicando de nuevo una comunicación entre el promotor génico y lo que sucede durante la fase de elongación e incluso en etapas posteriores del procesamiento del mRNA (ver *Introducción*). En este objetivo nos propusimos estudiar el reclutamiento de CA150 al complejo de la RNAPII usando como modelo experimental el VIH-1 y las herramientas generadas a lo largo del desarrollo del anterior objetivo descrito en la memoria.

2.1. Estudio de la presencia de CA150 en los complejos de transcripción del VIH-1 *in vitro*

Para determinar si CA150 es un componente del PIC que se ensambla en el promotor del VIH-1 se aislaron dichos complejos utilizando los moldes biotinilados descritos en el apartado 1.5 de esta sección. El análisis bioquímico de las proteínas aisladas mostró la presencia de CA150 en los PICs (Figura 26). Se detectó también la proteína Sp1, TBP y la RNAPII como controles positivos de los complejos aislados. También se observó, como se mostró anteriormente, la presencia en los PICs del factor P-TEFb ya que se detectaron las proteínas CDK9 y Ciclina T1 (Figura 26, y Figura 20). Sin embargo, no se detectaron otras proteínas como CDK2 o nucleolina. La especificidad de los PICs formados se examinó utilizando la construcción de DNA que no contiene la secuencia promotora (b-Pless). Este resultado sugiere que el reclutamiento de CA150 es a través de la formación de los PICs, a pesar de que su efecto funcional tenga lugar durante la fase de la elongación y etapas posteriores de la maduración del mRNA. Estos resultados pueden explicar el requerimiento de una secuencia TATA para el efecto funcional de CA150 (Sune *et al.* 1999) y están de acuerdo con la asociación descrita de este factor con el complejo holoenzima (Sune *et al.* 1997).

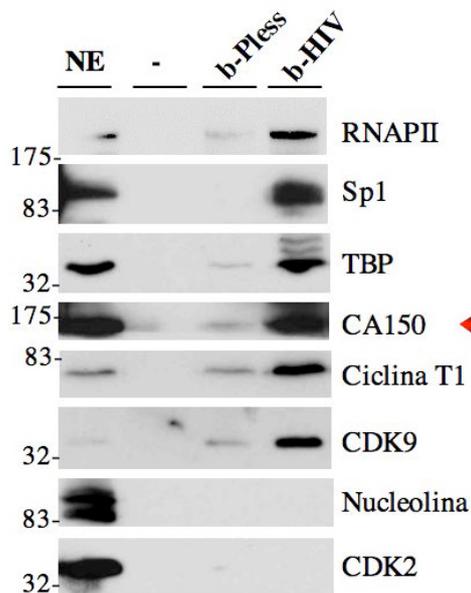


Figura 26. Análisis de la composición proteica de los PICs formados sobre el promotor del VIH-1. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 1.5 de esta sección. Se utilizó un molde biotinilado del promotor del VIH-1(b-HIV) y un molde biotinilado derivado del VIH-1 en ausencia de promotor (b-Pless). En paralelo se realizó una reacción en ausencia de molde de DNA (-). Las proteínas aisladas se analizaron por WB utilizando los anticuerpos específicos para la localización de las proteínas indicadas. NE, extracto nuclear de células HeLa.

Recientemente se ha sugerido un modelo donde CA150 se encuentra asociado al complejo transcripcional a lo largo de varias etapas durante la maduración del mRNA (Carty *et al.* 2002). Los experimentos anteriores demuestran la presencia de CA150 en los PICs aislados *in vitro*. Con el fin de estudiar la presencia de CA150 en los complejos de la RNAPII que transcriben el RNA, se diseñaron y realizaron experimentos para aislar los complejos de elongación (ECs) que transcriben el gen del VIH *in vitro*. Para ello, primero se aíslan los PICs a partir de los moldes biotinilados. Posteriormente, la adición de mezclas específicas de los ribonucleótidos durante la reacción de transcripción permite mover y detener al complejo de la RNAPII en posiciones determinadas del molde de DNA (ver *Materiales y Métodos*). Así, la adición de una mezcla conteniendo todos los NTPs a excepción de la adenina permitirá avanzar al complejo transcripcional hasta la posición 14, donde se debería introducir una adenina en el RNA sintetizado (de 14 nt). El complejo de elongación detenido en posición 14 puede ser ahora aislado a través de la unión del molde biotinilado con las matrices magnéticas de estreptavidina. Si a continuación se añaden los cuatro NTPs, el complejo transcripcional puede continuar la síntesis de RNA hasta el final del molde (92 nt) (Figura 27A).

Los ensayos de aislamiento de los ECs se llevaron a cabo usando los moldes biotinilados descritos anteriormente b-HIV y b-HIVTATAm, ambos idénticos en secuencia a excepción de la caja TATA, que se encuentra mutada en la segunda

construcción. Para conocer la funcionalidad de los complejos se analizaron los RNAs sintetizados a partir del protocolo anteriormente descrito. Como se puede apreciar en la Figura 27B se detectó una banda de 14 nucleótidos que corresponde al RNA sintetizado cuando los PICs se incubaron con una mezcla de NTPs que no contenía adenina. El transcrito permanecía “detenido” sobre el molde de DNA ya que no se pudo detectar su presencia en el medio soluble (sobrenadante) de la reacción (Figura 27B, carriles 9 y 10). Este resultado indica que los PICs aislados son funcionales y pueden transcribir el molde de DNA hasta la posición +14, donde se detienen. El transcrito de 14 nt se observó tanto con el molde sin mutar como con el molde donde la secuencia de la caja TATA estaba mutada, indicando que el promotor del VIH-1 puede iniciar la síntesis del RNA *in vitro* en ausencia de una caja TATA consenso. Cuando los ECs detenidos en la posición +14 se aíslan y se someten a una nueva incubación con una mezcla de los cuatro NTPs en condiciones de transcripción, éstos son capaces de iniciar de nuevo la síntesis del RNA y producir transcritos del tamaño del molde (92 nt). En este caso, se detectó el transcrito tanto unido al molde de DNA como en la fracción soluble de la reacción de transcripción (Figura 27B, carriles 6 y 12). Este resultado indica, de nuevo, que los ECs aislados en posición +14 son funcionales para la síntesis del RNA. Además, únicamente se observó el transcrito de 92 nt en las reacciones que contenían DNA con una caja TATA sin mutar y no en las que tenían el molde con la secuencia mutada, indicando que el complejo con capacidad para elongar (procesivo) es el que se forma en presencia de la caja TATA.

Una vez comprobada la funcionalidad de los diferentes complejos aislados se procedió al estudio de la composición proteica del mismo con anticuerpos específicos para CA150, TBP, Sp1, RNAPII y CDK9 (Figura 27C). En los complejos aislados en la posición +14 se detectaron tanto la RNAPII como CA150 y CDK9 cuando se utilizó la construcción sin mutar. También se detectaron TBP y Sp1, los cuales son partes integrantes de los PICs y se unen directamente a secuencias de DNA presentes en la región promotora; por lo tanto, siguen presentes en el molde de DNA cuando se aíslan y analizan los componentes de los ECs. Comparando la construcción *wild type* y TATAmutante se observa en los ECs aislados en la posición +14 una menor asociación de RNAPII y CDK9, que coincide con los datos de los PICs aislados previamente (Figura 26C y Figura 20). En cambio, la señal que se detecta para CA150 en estos experimentos es la misma en ambos casos, similar a la obtenida con el factor Sp1. El análisis de los PICs cuando se utilizó la construcción mutante de la caja TATA dio el

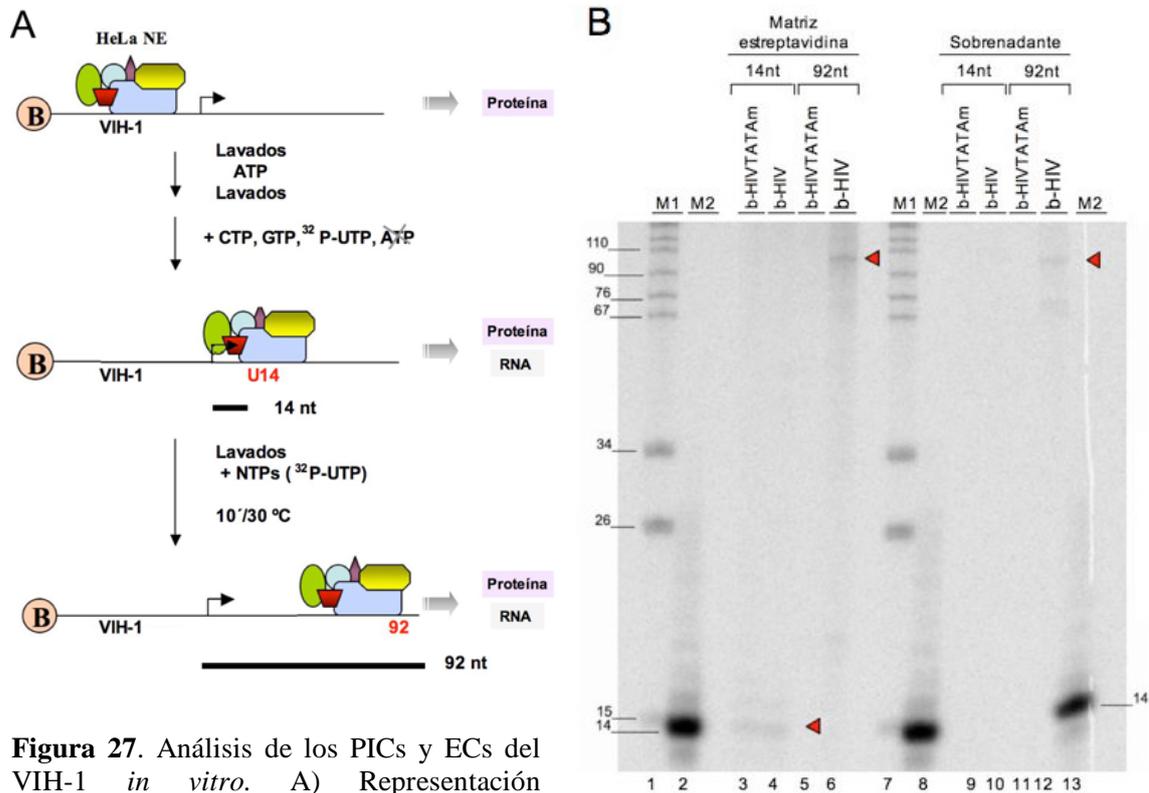
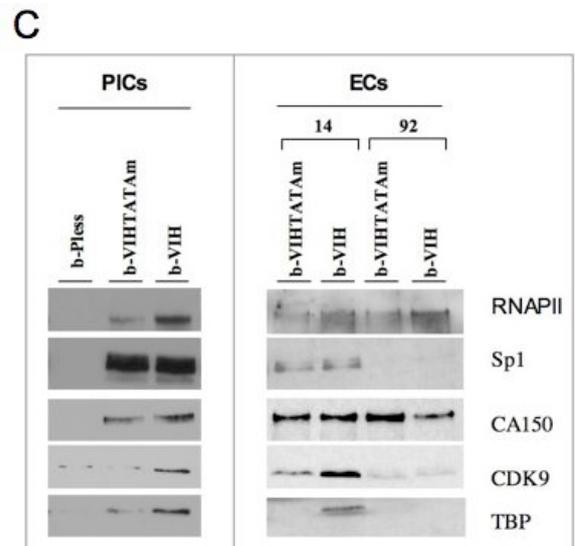


Figura 27. Análisis de los PICs y ECs del VIH-1 *in vitro*. A) Representación esquemática del procedimiento seguido para aislar los complejos de transcripción. Se incubaron los moldes biotinilados de DNA (b-HIV y b-HIVTATAm) con extracto nuclear de células HeLa para la formación de los PICs. Éstos se aislaron y se analizó su composición proteica. Posteriormente se movieron hasta la posición +14 adicionando una mezcla de nucleótidos sin adenina; se aislaron y se purificó tanto el RNA como las proteínas para su análisis. Finalmente, los complejos detenidos en la posición +14 se incubaron con una mezcla de todos los nucleótidos, uno de ellos marcado radiactivamente (^{32}P -UTP) para después aislarlos y analizar el RNA sintetizado y las proteínas del complejo transcripcional. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 20 % de los RNA purificados de las reacciones de transcripción *in vitro* realizadas tal y como se indica en el esquema A. Los productos obtenidos se visualizaron con un *PhosphorImager*. Se indican los moldes utilizados en cada reacción y la posición de los complejos aislados (+14 y +92). Se purificó el RNA sintetizado a partir de la fracción aislada con la matriz magnética y que permanece con el complejo transcripcional y el molde de DNA (matriz estreptavidina), así como a partir de la fracción soluble (sobrenadante). M1 y M2 representan los marcadores del tamaño de los fragmentos. M1 están descritos en la Figura 11. M2 corresponde a un oligonucleótido de 14 pb de longitud marcado con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. C) Análisis por WB de la composición proteica de los complejos transcripcionales. Se indican los moldes utilizados en cada reacción y los complejos aislados (PICs, ECs +14 y ECs +92). Se utilizaron anticuerpos específicos para la localización de las proteínas de interés.



mismo resultado (Figura 26C, panel de la izquierda). Cuando se analizó la composición de los ECs que habían sido detenidos en la posición +14 y posteriormente “movidos” hasta la posición +92, se observó una señal positiva para la RNAPII y para CA150. No se detectó CDK9 en dichos complejos, probablemente por los pasos de lavado que se introducen en el protocolo. Igualmente en estos complejos no se detectaron ni TBP ni Sp1. Estos experimentos indican la presencia de CA150 en los PICs y en los complejos que llegan a transcribir hasta la posición +92 de los genes del VIH-1. Se observa una asociación de CA150 con el complejo transcripcional aún cuando se muta la caja TATA, lo que puede indicar que para su reclutamiento no es necesaria una caja TATA funcional. La modificación y mejora de la técnica así como el análisis del estado de fosforilación de la RNAPII con anticuerpos específicos y otros componentes de los complejos transcripcionales, permitirán conocer con mayor precisión el reclutamiento de CA150 al gen que regula.

2.2 Estudio de la presencia de CA150 en los complejos de transcripción del VIH-1 *in vivo*

Para validar los resultados anteriores nos propusimos analizar la presencia de CA150 en un DNA cromatinizado usando para ello la línea celular Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8 descrita en el *apartado 1.6* de esta sección.

Hemos considerado de interés señalar en la memoria que durante el desarrollo de la técnica ChIP se observó que el procedimiento estándar de sonicación de los extractos producía la degradación de CA150 en las muestras fijadas. La reactividad del anticuerpo específico para CA150 en las muestras fijadas y sonicadas detectaba la desaparición de la banda correspondiente a la proteína y la aparición de un nuevo producto reactivo de menor tamaño (Figura 28A). Esta degradación parece específica de proteínas de elevado peso molecular ya que, además de CA150, la RNAPII tuvo un comportamiento similar mientras que proteínas de menor tamaño como CDK9 o la TBP permanecían inalterables (Figura 28A). Para aclarar la diferencia observada, se realizaron diferentes ensayos de sonicación sobre los lisados celulares confirmando la posible degradación de proteínas de elevado peso molecular en función de los ciclos de sonicación (Figura 28B).

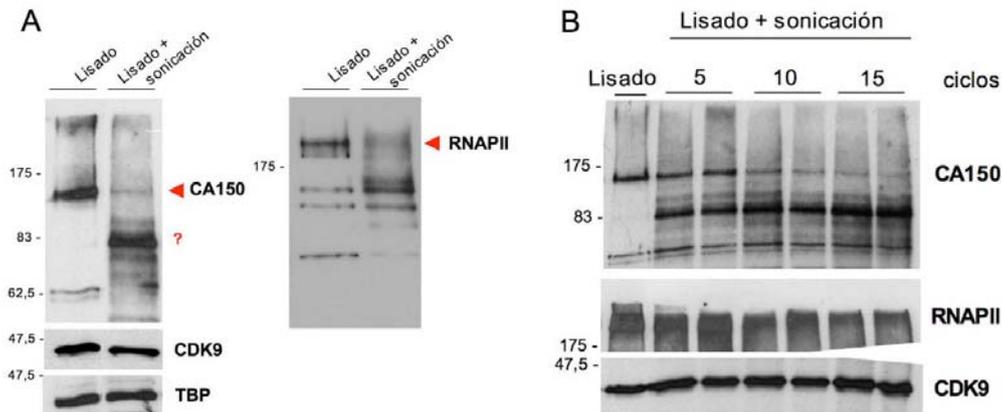


Figura 28. Efecto de la sonicación sobre la integridad de un extracto previamente fijado. A) Los extractos obtenidos a partir de células que han sufrido una fijación fueron sonicadas siguiendo protocolos estándar, y se analizaron las proteínas indicadas mediante WB antes y después del proceso de sonicación. B) Los extractos obtenidos fueron sonicados y se analizaron las proteínas indicadas tras 5, 10 y 15 ciclos de sonicación estándar.

Dado que el efecto observado podía suponer una limitación a la hora de inmunoprecipitar las proteínas del extracto después de la etapa de sonicación, se examinó el efecto del tampón de lisis celular con respecto a la sonicación. El tampón de lisis usado en los experimentos anteriores es el usado clásicamente en los experimentos de ChIP y contiene SDS al 1 % (tampón SDS). Aunque no se consiguió una protección total de la degradación de proteínas, se obtuvieron resultados aceptables con el tampón RIPA en las condiciones ensayadas (Figura 29). Debido a estos resultados, los experimentos de ChIP se continuaron usando el tampón RIPA para la lisis de las células y posterior sonicación de los extractos.

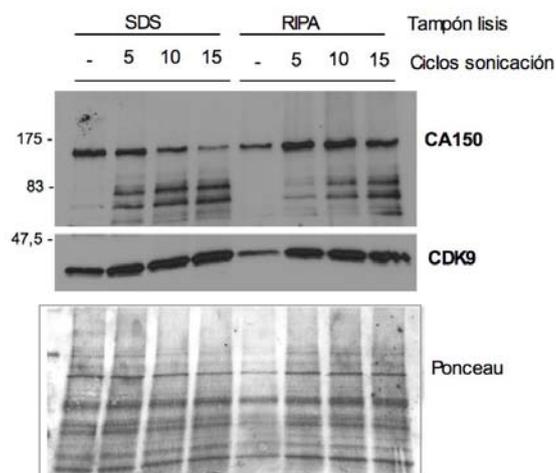


Figura 29. Comparación del efecto de la sonicación sobre la integridad de un extracto previamente fijado, y lisado con diferente tampón de lisis. Los extractos obtenidos tras la lisis de las células con tampón SDS o tampón RIPA fueron sonicados y se analizaron las proteínas indicadas mediante WB tras 5, 10 y 15 ciclos de sonicación estándar. Se muestra la tinción de *ponceau* de la membrana de nitrocelulosa realizada después de la transferencia de proteínas.

Los experimentos de ChIP se llevaron a cabo analizando tanto la región próxima al promotor como una región más distal dentro de la zona codificante de la eGFP. La posición de los fragmentos amplificadas está esquematizada en la Figura 26A. Se obtuvieron los extractos procedentes de las células que habían sido o no tratadas con PMA y se llevaron a cabo las inmunoprecipitaciones con anticuerpos específicos. En el caso de CA150, se utilizaron dos anticuerpos diferentes, anti-CA150-Suero1 y anti-CA150-AP. El primero corresponde a un suero completo de conejo inmunizado contra CA150; el segundo fue purificado, por afinidad a antígeno, a partir de un suero independiente procedente de animales igualmente inmunizados contra CA150, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Esta purificación permitía enriquecer la preparación en inmunoglobulinas específicas contra el antígeno de interés, aumentando a priori la eficacia del ensayo. Como controles del experimento se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos para la RNAPII, así como CDK9, Ciclina T1 y Tat. Como controles negativos para los distintos anticuerpos, y de distintas procedencias, se utilizaron, por un lado, inmunoglobulinas de conejo (rIgG, purificadas como se describe en Materiales y Métodos) como control de RNAPII, CDK9 y CA150 (AP); por otro lado, inmunoglobulinas de cabra (gIgG) como control de Ciclina T1; o finalmente suero pre-inmune de conejo como control de CA150 (suero) y Tat.

Los resultados se muestran en la Figura 30B. Tanto en ausencia de estimulación como después de la estimulación con PMA se detectó la presencia de proteínas en la región 5'LTR del VIH-1. Como era de esperar, se detectaron la RNAPII, CDK9, como se había visto anteriormente (Figura 24), y Ciclina T1 en ambos casos. Fue posible detectar también CA150 (Figura 30B, carriles 5,7 y 15,17). Después de la estimulación se detectó también la proteína Tat en la región 5'LTR, sin embargo ésta no se detectó en ausencia de estimulación (Figura 30B, comparar carril 18 y carril 8), ya que en ese caso, no se produce proteína Tat en las células (ver Figura 21). La señal positiva observada tanto en el caso de células estimuladas y sin estimular indica, como se comentó en el apartado 1.6 de esta sección, que ocurre un reclutamiento de factores a dichas regiones en ausencia de la activación transcripcional por PMA; para examinar diferencias en las dos condiciones sería necesario analizar el DNA inmunoprecipitado de manera cuantitativa. Cuando se analizó la presencia de proteínas en la región distal del promotor, en la región codificante de la proteína eGFP, no se detectaron proteínas en ausencia de estimulación; sin embargo, RNAPII, CDK9, Ciclina T1, Tat, y también CA150 se vieron asociadas a esa zona. Asimismo, se amplificaron dos fragmentos como

controles negativos de asociación de la maquinaria transcripcional, una región intergénica y una región exónica del factor OCT-2 específico de linfocitos B. Como ya se había observado previamente (Figura 24), no se detectó la asociación de las proteínas a dichas regiones, añadiendo mayor especificidad a los resultados obtenidos. Estos resultados indican que CA150 se asocia a los complejos transcripcionales tanto en las regiones próximas al promotor del VIH-1 como a complejos que se encuentran en posiciones más distales *in vivo*.

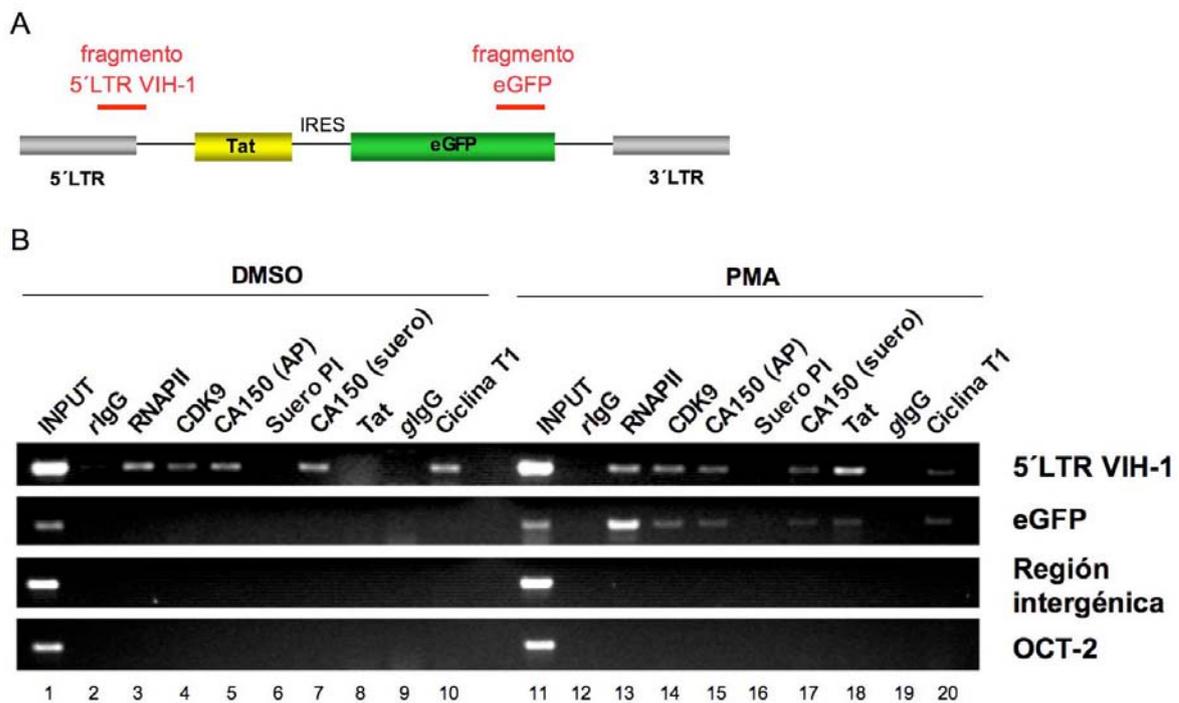


Figura 30. Análisis por CHIP del reclutamiento de factores de transcripción a construcción derivada del VIH-1 integrada en las células Jurkat. A) Esquema de la región integrada derivada del VIH-1 en las células Jurkat-(LTR-Tat-GFP)/clon8. Se indica la posición de los fragmentos 5'LTR y eGFP amplificados. B) Los extractos preparados a partir de células sin tratar (DMSO) o tratadas con 50 ng/ μ l de PMA y fijadas, se sonicaron y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos indicados. Se purificó el DNA de las muestras y se analizaron los fragmentos obtenidos por PCR, amplificando las regiones correspondientes: la región 5 del LTR viral integrado (posición); la región codificante de la eGFP (posición) una región intergénica 10 kb aguas arriba del promotor P2 del gen *c-myc*, y una región exónica del gen OCT-2. La señal INPUT (carriles 1 y 11) muestra la amplificación de los fragmentos correspondientes a partir de las muestras antes de la inmunoprecipitación. CA150 (AP) y CA150 (suero) corresponden a dos inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-CA150 diferentes, anticuerpos purificados por afinidad a antígeno, y anticuerpos procedentes de un suero de conejo inmunizado con CA150 (ver *Materiales y Métodos*).

2.3. Efecto de la depleción de CA150 del extracto nuclear sobre la transcripción de los genes del VIH-1 y su activación por Tat

Con el fin de aportar mayor información del papel de CA150 durante la elongación transcripcional, se llevaron a cabo experimentos de depleción de este factor usando extractos nucleares de células HeLa para evaluar el efecto de CA150 en ensayos de transcripción-elongación *in vitro*. Los extractos inmunodeplecionados fueron preparados por Miguel Sánchez en condiciones análogas a las descritas anteriormente para el estudio de P-TEFb (Miguel Sánchez, resultados no publicados). Como se aprecia en la

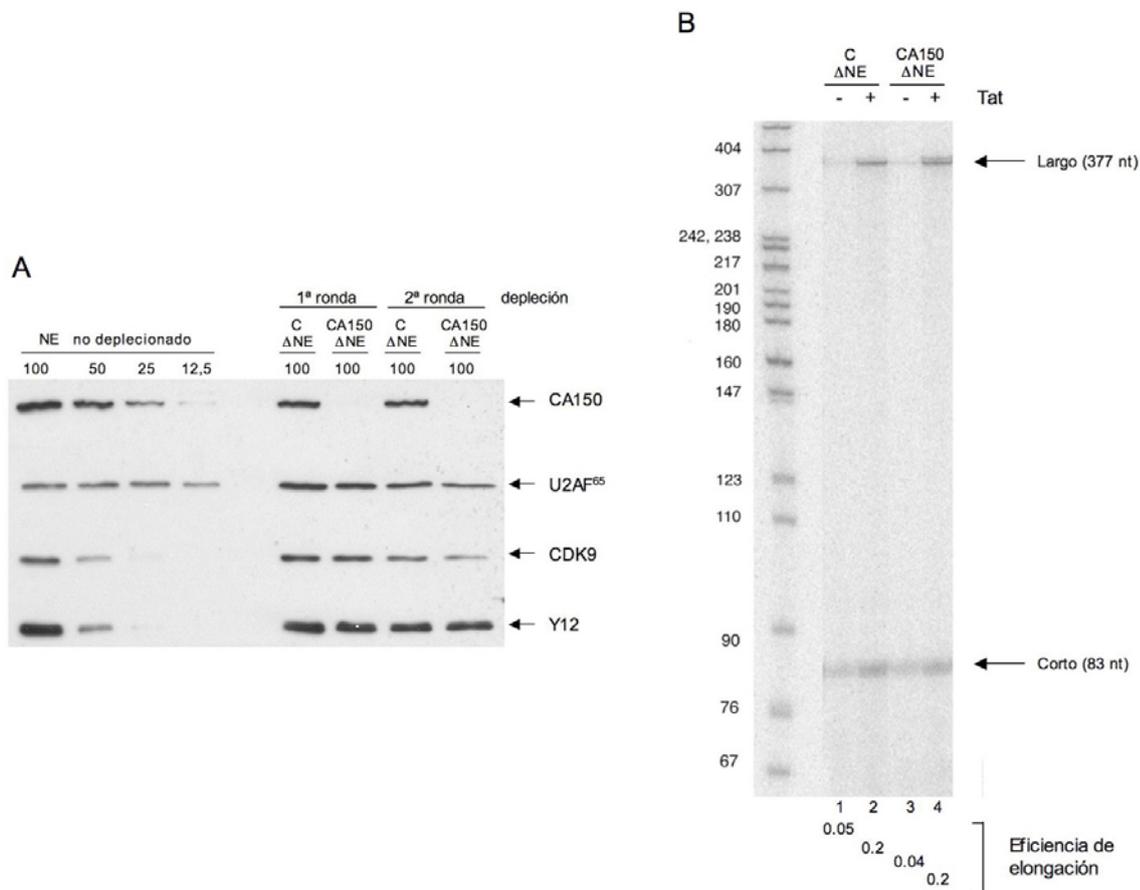


Figura 31. Estudio de la depleción del factor CA150 en el sistema de transcripción elongación *in vitro*. A) Inmunodepleción de CA150 del extracto nuclear de células HeLa. Se muestran los resultados de un análisis por WB del extracto deplecionado específicamente (CA150 ΔNE) y control (C ΔNE). Se utilizaron anticuerpos específicos para la localización de las proteínas específicas; las posiciones relativas de éstas están indicadas en la parte derecha del panel, y el peso molecular de los marcadores (M) en la parte izquierda. B) Las reacciones de transcripción-elongación *in vitro* se llevaron a cabo con los extractos indicados y el molde HIVdGless en ausencia o presencia de 200 ng de proteína Tat recombinante. El análisis y cuantificación de los productos de RNA así como el cálculo de las eficiencias de elongación se realizaron como se indica en la Figura 11. Las flechas indican la migración de los transcritos largos y cortos. Los marcadores (M) utilizados están descritos en la Figura 11.

Figura 31A, los niveles de CA150 en el extracto inmunodeplecionado se aproximan como máximo a un ~5% de los niveles presentes en el extracto control, sin pérdidas cualitativamente visibles de otros factores nucleares relacionados, el factor de *splicing* U2AF⁶⁵, la proteína CDK9 o Sm. Se utilizaron dichos extractos en reacciones de transcripción-elongación *in vitro* sobre el molde HIVdGless en ausencia o presencia de la proteína Tat recombinante. No se observó ninguna diferencia en la transcripción en cuanto a la eficiencia de elongación entre el extracto control y el extracto deplecionado de CA150. Este resultado indica que, en el sistema descrito, CA150 no es requerido para la activación de la elongación transcripcional, ni en la activación mediada por Tat.

discusión

Existen numerosas evidencias que apoyan la importancia del control de la elongación transcripcional en la regulación de la expresión génica en los organismos eucariotas. Una elongación eficiente requiere superar determinados “bloqueos” que tienen lugar durante la transcripción, lo cual se lleva a cabo con la ayuda de los factores de elongación. En los últimos años, se han identificado múltiples factores involucrados y se han descrito muchos ejemplos de genes regulados a este nivel; por ello, la regulación de este proceso se considera actualmente como una norma y no como una excepción. Se ha profundizado en el estudio de los mecanismos que regulan la elongación transcripcional, sin embargo, muchas preguntas quedan abiertas. ¿Hay un sólo mecanismo por el cual se favorece una elongación procesiva?, ¿qué influencia tiene el contexto del promotor, o la naturaleza de un gen en particular en la elongación transcripcional?, ¿P-TEFb es un factor requerido de manera general en esta regulación?

En esta Tesis se han utilizado como modelos experimentales los genes del VIH-1 y c-myc para estudiar aspectos básicos del control de la elongación transcripcional. En primer lugar se ha establecido un sistema de transcripción-elongación *in vitro* para el análisis de la funcionalidad de complejos transcripcionales y la medida directa de las eficiencias de elongación de dichos complejos, reproduciendo *in vitro* el bloqueo descrito durante este proceso en ambos modelos. El uso del sistema de transcripción-elongación *in vitro* junto con el aislamiento de complejos de pre-iniciación y técnicas de ChIP han permitido involucrar al factor P-TEFb en la regulación de la elongación transcripcional del gen c-myc. Se ha abordado, asimismo, una posible conexión entre la composición del promotor y la elongación transcripcional; los resultados obtenidos son consistentes con la hipótesis de que los elementos del promotor dictan el ensamblaje de complejos transcripcionales con funcionalidades diferentes.

Finalmente, se ha iniciado una línea de trabajo enfocada a examinar el papel del co-activador transcripcional CA150/TCERG1 en la regulación de la expresión génica del VIH-1. Los resultados de esta Tesis han permitido mostrar que CA150 se localiza en complejos transcripcionales en diferentes momentos a lo largo del proceso de transcripción, lo cual, junto con otros datos del laboratorio, sugiere que podría ejercer funciones duales o interconectar distintos factores durante la formación de un mRNA maduro.

1. P-TEFb PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA ELONGACIÓN DE LOS GENES DEL VIH-1 Y C-MYC

Hemos utilizado un sistema de transcripción-elongación *in vitro* que reproduce el bloqueo que sufre el complejo de la RNAPII durante la elongación de los genes del VIH-1 y c-myc. El sistema permite reproducir el efecto de Tat a través del elemento TAR sobre el LTR viral, viéndose de manera clara la estimulación preferente de la elongación transcripcional. En estos experimentos observamos también cierto incremento en la banda de 83 nt correspondiente al primer *G-less cassette*. El incremento en la señal (2-3 veces) después de la adición de la proteína Tat podría indicar que durante el tiempo en que transcurren las reacciones *in vitro*, una fracción de polimerasas que inicia la transcripción en ausencia de Tat quede detenida antes del primer *cassette*, quizás antes de transcribir completamente el elemento TAR. Esto estaría de acuerdo con datos recientes que describen cierta acumulación de RNAPII en posiciones alrededor del nt +45 en el promotor del VIH-1, dependiente de la acción del factor de elongación negativo NELF (Zhang *et al.* 2007), y probablemente regulada por P-TEFb. Este mecanismo es muy interesante y sería adicional e independiente a la estimulación ejercida por Tat a través del elemento TAR. Además, esta parada de la RNAPII coincidiría con la posición en la que se ha visto una parada próxima al promotor (*promoter proximal pausing*) en diferentes modelos tanto de genes humanos como de *Drosophila melanogaster* (Price 2008). Entonces, si así fuera, y no se hubiera sintetizado el elemento TAR, la pregunta que surge es: ¿cómo llegaría Tat a activar dichos complejos? Como se ha sugerido previamente, el hecho de que en células infectadas por el VIH-1 se acumulen transcritos de alrededor de 60 nt de longitud demuestra un bajo nivel basal de transcripción dirigida por el promotor viral. La represión transcripcional sería parcial, de tal manera que se podrían producir unos niveles de transcrito suficientes para la formación del TAR y la síntesis de la proteína Tat. En este contexto tendrían un papel importante los factores inducibles como NF- κ B, que como se ha demostrado, contribuyen fuertemente a la activación génica. Otra posibilidad que se ha propuesto, y que es de interés para nuestro trabajo, es la que apoya que Tat y/o P-TEFb se reclutan a zonas promotoras del LTR viral asociándose a factores del PIC y contribuyen, como se ha demostrado, a formar un complejo capaz de llevar a cabo una elongación productiva (García-Martínez *et al.* 1997; Sune *et al.* 1997; Jeang *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2007). El incremento de la señal de la banda de 83 nt también podría deberse a una estimulación de la iniciación por la proteína Tat que fuera reclutada al

promotor en este sistema. En este sentido ha existido cierta discrepancia por la presencia de Tat en los PICs (Brady *et al.* 2005), y se ha propuesto para Tat un papel aumentando la estabilidad del complejo reclutado, o estimulando su ensamblaje. De hecho, en un trabajo reciente se ha descrito mediante experimentos de CHIP en moldes no cromatinizados que Tat favorece también la formación del complejo transcripcional sobre el promotor del VIH-1 (Raha *et al.* 2005).

En este trabajo también nos planteamos estudiar si P-TEFb participa en la regulación transcripcional del gen c-myc. En primer lugar, la activación del promotor del gen c-myc por la proteína Tat a través del elemento TAR, en condiciones en las cuales la RNAPII no es procesiva, apoyó la idea de que P-TEFb era, presumiblemente, el factor limitante en el sistema. Y además, el hecho de que la inmunodepleción específica de P-TEFb del extracto nuclear produjera una disminución significativa en la eficiencia de elongación de los complejos, tanto los dirigidos por el promotor del VIH-1 como los dirigidos por el promotor P2 del gen c-myc, confirmaron que c-myc es una diana del factor P-TEFb. Es de interés señalar que Tat, en combinación con TAR, no es suficiente para activar de manera potente un promotor. En el caso del VIH-1, son necesarias, además de la secuencia de la caja TATA, las secuencias de unión para los factores de transcripción NF- κ B y Sp1 (Berkhout *et al.* 1990). No obstante, se ha descrito la estimulación por Tat de promotores heterólogos, por ejemplo el promotor de la β -actina de pollo que no contiene otras secuencias virales a parte del TAR (Han *et al.* 1991). Otros promotores, sin embargo, no son activados a través de Tat/TAR (Peterlin *et al.* 1986), sugiriendo de nuevo la relevancia de los sitios de unión a DNA de factores de transcripción celulares. Nuestros resultados con el gen c-myc demuestran que su promotor contiene los motivos de DNA suficientes para la activación por Tat/TAR.

Dado que en la regulación de la transcripción de ambos modelos participa P-TEFb, nos interesó examinar si dicho factor es reclutado al promotor del gen c-myc como se ha demostrado en el caso del promotor del VIH-1 (Ping *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2001). Tanto *in vitro* como *in vivo* fue posible localizar P-TEFb en los complejos ensamblados sobre los promotores de ambos genes. El aislamiento *in vitro* de los PICs permitió localizar a P-TEFb en las zonas promotoras; y en concreto, se localizó en complejos formados sobre construcciones derivadas de los promotores conteniendo el promotor mínimo del VIH-1 y el promotor P2 del gen c-myc, indicando que dichas regiones son suficientes para reclutamiento de tales complejos. Los experimentos de CHIP corroboraron los resultados *in vitro*, demostrando la asociación del complejo a dicha

región *in vivo*. Una de las limitaciones de la técnica de ChIP viene dada por el tamaño de los fragmentos de DNA purificados. En los datos mostrados, aún con el tamaño homogéneo adecuado de los fragmentos que asegura la reproducibilidad (Figura 23) no es posible diferenciar entre la zona estrictamente promotora y la zona inmediatamente después del sitio de inicio de la transcripción, por lo tanto no permite identificar *in vivo* posiciones concretas.

La identificación de P-TEFb en los PICs plantea la pregunta de cómo los promotores celulares regulados a nivel de elongación reclutan P-TEFb. Este aspecto ha tenido mucho interés durante los últimos años y durante el transcurso de esta Tesis. Se han descrito varios mecanismos (ver apartado 5 de *Introducción*). En el caso del VIH-1, se ha demostrado su reclutamiento a través del elemento TAR, y alternativamente, se ha postulado una posible unión al PIC mediante la asociación con el factor de transcripción NF- κ B, especialmente por los datos obtenidos en el estudio del gen de la interleuquina 8 (IL-8) (Barboric *et al.* 2001). Por otro lado, se ha descrito también un reclutamiento dependiente de los sitios Sp1 (Yedavalli *et al.* 2003). En el caso del gen c-myc, no se ha descrito una asociación previamente. Tampoco se han realizado estudios profundizando acerca de la función de las secuencias promotoras influyendo en la incorporación de P-TEFb a dichos complejos. Nuestros datos apoyan la idea de que las secuencias promotoras ejercen un papel regulador reclutando factores de elongación, y en concreto que los complejos que se ensamblan dirigidos por una caja TATA apropiada median el reclutamiento de P-TEFb. En primer lugar, en los experimentos de análisis de PICs *in vitro* se observó una menor asociación de P-TEFb cuando se utilizó la construcción que contenía una mutación en la caja TATA, o la región promotora del gen TdT (Figura 20). Aunque no son datos cuantitativos podrían indicar la necesidad de una caja TATA funcional para el ensamblaje de dichos complejos. No es posible descartar en este punto una menor asociación global de factores integrantes del PIC en estos promotores, pero dado que ambos promotores son activos transcripcionalmente, como se ha demostrado en otros ensayos (Figura 25, (Berkhout *et al.* 1992), sería posible que fuera indicativo de una diferente composición de dichos complejos. En segundo lugar y, en un sistema de reclutamiento artificial de CDK9 a los promotores en estudio, la mutación de la caja TATA hace que no respondan a la activación mediada por CDK9 (Figura 25), sin tener un gran impacto en el nivel basal de transcripción (TABLA IX). El hecho de que la mutación de la caja TATA no afectase significativamente a la actividad basal del promotor del VIH-1 puede deberse al reclutamiento de la proteína TBP a regiones

promotoras, aun no existiendo una secuencia consenso, por otros mecanismos. En nuestros experimentos, sin embargo, la alteración de la caja TATA implicó una reducción de la proteína TBP en los PICs formados *in vitro*, como se ha comentado anteriormente (Figura 20). Adicionalmente, se han descrito proteínas TRFs (*TBP-related factors*) capaces de sustituir a TBP para llevar a cabo la transcripción, cuestionando el papel “universal” de la proteína TBP (Muller *et al.* 2004; Muller *et al.* 2007). Esta variabilidad/estos datos? sugieren que otros elementos en el promotor, así como interacciones proteína-proteína podrían compensar las mutaciones en la caja TATA a la hora de nuclear o formar un PIC estable. En el caso del promotor del VIH-1, el núcleo del promotor contiene un elemento iniciador (Inr) solapando el sitio de inicio de la transcripción, y se ha descrito que es esencial para la actividad promotora (Zenise-Gregory *et al.* 1993). Añadiendo mayor complejidad a la transcripción dirigida por el LTR viral, otras secuencias contribuyen a la transcripción: las regiones entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción (Zeichner *et al.* 1991), así como la región corriente abajo del sitio de inicio, donde se encuentra un elemento denominado inductor de transcritos cortos (IST, *Inducer of Short Transcripts*) (Ratnasabapathy *et al.* 1990; Sheldon *et al.* 1993)(Figura 32). Parece que el promotor del VIH-1 ha desarrollado cierta flexibilidad a la hora de tolerar eventos de iniciación y mantener un nivel basal de transcripción. Esta flexibilidad también podría explicar el hecho de que la caja TATA en el VIH-1 no sea necesaria para especificar el sitio de inicio de la transcripción (Bielinska *et al.* 1989). De la misma manera explicaría algunas observaciones tanto en nuestro trabajo, como en otros: por ejemplo, la sustitución de la caja TATA por una secuencia elegida al azar, incluso su eliminación, o el reemplazo por la caja TATA del promotor temprano del virus del simio SV40 o el virus de la leucemia murina (MLV) afectan a la activación mediada por Tat pero no afectan a la actividad basal del promotor ni al sitio de inicio de la transcripción en determinados sistemas experimentales (Berkhout *et al.* 1992; Olsen *et al.* 1992) esta Tesis). En conjunto, estos datos reflejan una complejidad en la actividad y regulación del núcleo del promotor del VIH-1 que todavía no se conoce en detalle.

En el caso del gen *c-myc*, también se han descrito dos elementos iniciadores (Inr) de la transcripción (Krumm *et al.* 1993) (Figura 32) y se ha observado actividad transcripcional determinada por ensayos de *run-on* cuando se elimina la secuencia de la caja TATA (Krumm *et al.* 1995); la sustitución de ésta por una secuencia al azar, en el sistema de transfecciones transitorias utilizado en este trabajo, solamente produjo una

disminución del 20-30 % (TABLA IX). Estos resultados podrían indicar también un papel de regiones alternativas, como el elemento iniciador (Inr), para mantener los niveles de transcripción.

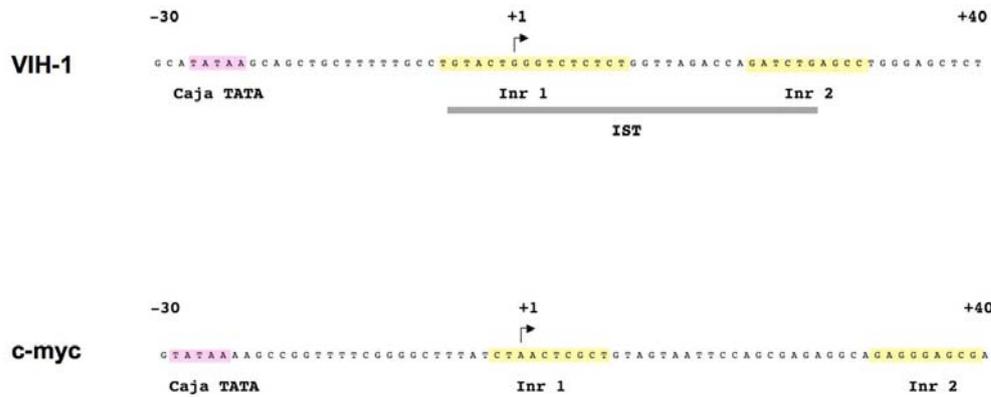


Figura 32. Representación esquemática de elementos reguladores en las secuencias del núcleo del promotor del VIH-1 y del promotor P2 del gen c-myc. Se muestran las secuencias desde -30 a +40 relativas al sitio de inicio de la transcripción (+1) en ambos promotores. Están indicados la caja TATA, los elementos iniciadores (Inr1 y 2) (Zenzie-Gregory *et al.* 1993), y la mínima secuencia IST descrita (-5,+26) (Sheldon *et al.* 1993) en el caso del VIH-1. En el promotor P2 del gen c-myc se indica la caja TATA y los dos elementos iniciadores descritos (Krumm *et al.* 1993; Krumm *et al.* 1995).

Nuestros datos también están de acuerdo con un trabajo publicado recientemente en el que curiosamente, mediante técnicas de CHIP, describen como P-TEFb se ensambla en un complejo de transcripción en el promotor del VIH-1 que contiene TBP pero no TAFs (Raha *et al.* 2005). El mecanismo por el que sucedería este reclutamiento selectivo no se conoce, pero nuestros datos sugieren el uso de la caja TATA para la activación transcripcional. Sería interesante examinar si el promotor del gen c-myc, también regulado por P-TEFb como se muestra en este trabajo, especifica la formación de complejos que contienen TBP sin TAFs. Esta idea apoyaría la hipótesis de la formación de complejos de transcripción que varían en función de la composición proteica y que tendrán características particulares. La diversidad de elementos del núcleo del promotor, la variabilidad capaces de reconocer dichas secuencias marcarían el ensamblaje de distintos complejos de transcripción.

Los datos presentados también definen un papel para las secuencias de unión de factores de transcripción en la activación mediada por CDK9. En el caso del VIH-1, el reclutamiento artificial de esta proteína al promotor estimula la transcripción, aún con los sitios de unión de los factores NF- κ B o Sp1 mutados individualmente (Figura 25).

Estas secuencias son importantes para la activación mediada por el factor P-TEFb (Barboric *et al.* 2001; Yedavalli *et al.* 2003); es posible que su función esté relacionada con el reclutamiento de P-TEFb al promotor, pero en el sistema utilizado en este trabajo estas secuencias serían dispensables ya que el factor está siendo reclutado de manera artificial. Es posible, además, que dichos factores cooperen simultáneamente para que tenga lugar la activación transcripcional. Es interesante comentar que la adición de los sitios de unión para NF- κ B y Sp1 no favoreció la activación de la construcción que contenía la región iniciadora del gen TdT (Figura 25) en el sistema estudiado, lo cual apoya el papel de la caja TATA en este proceso. En el caso del promotor P2 del gen *c-myc*, las mutaciones en los sitios de unión de los factores E2F y Sp1 provocaron una disminución significativa en la respuesta de activación transcripcional, indicando que podrían participar o cooperar en la formación de complejos responsivos a GAL4-CDK9.

En relación con los datos obtenidos en esta Tesis, y apoyando nuestro trabajo, es interesante comentar que el grupo del Dr. R. Dikstein y del Dr. H. Handa han descrito recientemente un reclutamiento de P-TEFb dependiente del núcleo del promotor. En el sistema analizado, utilizando un modelo de genes regulados por NF- κ B, observan diferencias en el reclutamiento de P-TEFb en función de la presencia de una caja TATA en las regiones promotoras (Amir-Zilberstein *et al.* 2007). Sería interesante realizar experimentos de ChIP en las construcciones mutantes y examinar un posible reclutamiento diferencial *in vivo* en los casos *wild tipe* y TATAmutante del VIH-1 y del gen *c-myc*, que corroboraría los resultados obtenidos.

El trabajo presentado sugiere un modelo de reclutamiento de P-TEFb a las regiones promotoras que complementa los datos previos publicados (Figura 33). En primer lugar, los factores de transcripción generales y otros cofactores presentes en el complejo *Mediator* forman un PIC en la región promotora, en el cual la RNAPII se encuentra en su forma hipofosforilada y se recluta P-TEFb (Figura 33a). La secuencia de la caja TATA juega un papel importante en el ensamblaje de dicho complejo y proteínas que se unen a otras secuencias de unión de factores de transcripción estabilizan la unión de P-TEFb y/o cooperan en su reclutamiento. La ausencia de la secuencia de la caja TATA impide la unión de P-TEFb y otros factores al PIC (Figura 33a). La RNAPII inicia la transcripción y los complejos competentes para llevar a cabo una elongación productiva se detienen en sitios próximos al promotor debido a la acción de los N-TEFs (Figura 33b). Superar dicho obstáculo requiere la acción de la quinasa del factor P-TEFb, la cual fosforila el CTD de la RNAPII resultando en la elongación transcripcional (Figura 33c).

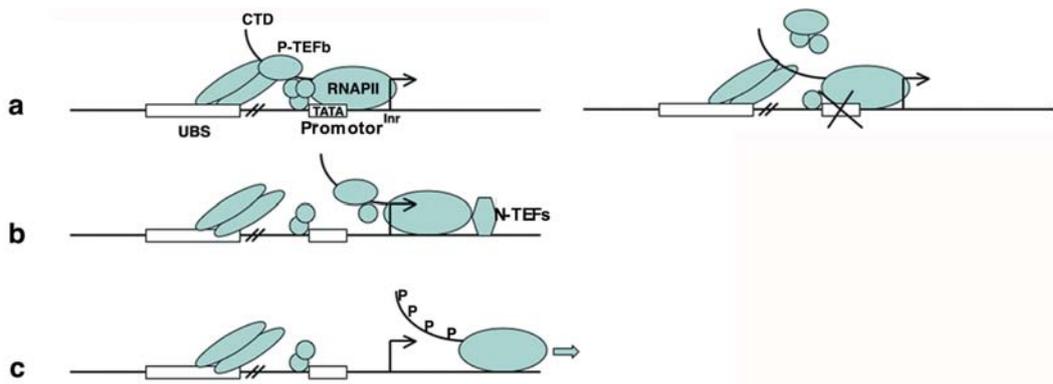


Figura 33. Modelo de la activación de la elongación transcripcional por P-TEFb. Se muestra una representación esquemática de una unidad transcripcional donde se indica el promotor y secuencias de unión para factores de transcripción (aquí indicados como UBS, por *Upstream Binding Sequences*). *Paso a.* Los factores de transcripción generales y el complejo *Mediator* forman el PIC, en el cual el CTD de la RNAPII se encuentra en la forma hipofosforilada en la región promotora con una caja TATA funcional. P-TEFb podría ser reclutado al PIC mediante la interacción con activadores específicos, proteínas remodeladoras de cromatina, proteínas de unión a histonas modificadas o activadores de unión a DNA o RNA (Peterlin 06). Los activadores de unión a DNA podrían también estabilizar la asociación de P-TEFb con el PIC. La ausencia de una caja TATA funcional Inr, elemento iniciador. *Paso b.* El complejo de transcripción que inicia la síntesis de RNA se detiene en la región próxima al promotor debido a la acción de los N-TEFs. *Paso c.* La reanudación de la transcripción y la elongación productiva ocurre cuando los N-TEFs se disocian del complejo transcripcional, lo cual se produce por la fosforilación del CTD de la RNAPII ejercida por P-TEFb.

En conjunto, nuestros datos establecen un papel importante para la caja TATA en el ensamblaje de complejos en los que P-TEFb va a ser capaz de estimular la transcripción; y que la estructura única de los diferentes promotores modularía el ensamblaje de este complejo multiproteico. Así, la combinación de las proteínas unidas a la caja TATA y a las secuencias reguladoras corriente arriba generarían las superficies o contactos específicos para reclutar complejos de transcripción de la RNAPII competentes para la elongación.

2. ASOCIACIÓN DE CA150 CON LOS COMPLEJOS TRANSCRIPCIONALES DE LOS GENES DEL VIH-1

La proteína CA150 modula la elongación de la RNAPII y procesamiento del mRNA, por lo que se ha postulado que actúa como un factor acoplador de la síntesis y maduración del mRNA. CA150 interacciona con el CTD fosforilado de la RNAPII y, sin

embargo, su efecto sobre la elongación depende de la presencia de una caja TATA funcional. Además, la sobre-expresión de la proteína TBP es capaz de revertir los efectos negativos de CA150 sobre la transcripción en el modelo de los genes del VIH-1 (Sune *et al.* 1999), ver *Introducción*). Los diferentes efectos de CA150 en la síntesis del mRNA plantean la pregunta de cuándo CA150 interacciona con la maquinaria de la RNAPII, o en qué etapa de la transcripción interviene CA150.

Para contestar esa cuestión se han aislado en esta Tesis los complejos de pre-iniciación y elongación de la RNAPII y se ha observado la presencia de CA150 en ambos. Estos resultados *in vitro* se corroboraron con experimentos de ChIP en células Jurkat. Nuestros datos indican que CA150 se incorpora al PIC de la RNAPII y se asocia con el complejo transcripcional que se encuentra activamente elongando. Es posible que la proteína establezca interacciones recurrentes con distintos elementos del complejo durante la transcripción, en los momentos que sea necesaria, o que establezca una asociación estable con el complejo transcripcional. La composición en módulos de unión proteína-proteína, como son los dominios WW y FF, podría hacer que permaneciera en el complejo interaccionando con la RNAPII y simultáneamente se asociara a otras proteínas. Por ejemplo, la interacción con el CTD de la RNAPII se ha descrito a través de la región carboxi-terminal, y con el factor de *splicing* SF1, con la región amino-terminal (Carty *et al.* 2000; Goldstrohm *et al.* 2001). Además, los dominios WW son capaces de interaccionar con complejos multiproteicos con funciones diferentes (transcripción, procesamiento del mRNA, remodelación de cromatina o polimerización de actina) y se les ha propuesto como capaces de establecer una red de interacciones proteína-proteína *in vivo* (Ingham *et al.* 2005).

Recientemente, se ha descrito también el reclutamiento de CA150 a regiones promotoras de genes específicos que son reprimidos por el factor transcripcional C/EBP α (McFie *et al.* 2006). Apoyando los datos preliminares de esta Tesis, se ha observado la co-localización de CA150 con el mRNA viral naciente en sitios de transcripción activos del VIH-1 (Dr. E. Bertrand, Institute of Molecular Genetics of Montpellier- CNRS, comunicación personal). Además, CA150 modifica el patrón de *splicing* alternativo en un minigen derivado del VIH-1; es interesante destacar que la alteración del patrón de *splicing* observado es específico del promotor usado (Dr. H. Schaal, Institut für Virologie, Düsseldorf, comunicación personal). Más experimentos de nuestro laboratorio en el futuro inmediato y la colaboración con los grupos del Dr.

Bertrand y el Dr. Schaal aportarán nuevos datos acerca del papel de CA150 en la expresión génica del VIH-1 en particular y de genes celulares en general.

CA150 se ha detectado en los complejos de preiniciación y elongación *in vitro* independientemente de la integridad de la caja TATA, aunque su efecto en la elongación de los genes del VIH-1 sí lo es (Sune *et al.* 1999). Este resultado sugiere que para el reclutamiento de CA150, en el sistema que testamos, no es indispensable una caja TATA funcional; quizás otros elementos del promotor intervengan en el proceso.

La inmunodepleción de CA150 de un extracto nuclear en condiciones astringentes evidenció que CA150 no es requerido *per se* para la activación de la elongación en el sistema *in vitro* de transcripción-elongación. Igualmente, la adición de CA150 recombinante purificada a partir de células 293T no afectó la transcripción en el mismo modelo basado en el VIH-1 (Aaron Goldstrohm, Carles Suñé, Mariano García-Blanco, datos no publicados). Resultados paralelos se han obtenido cuando se ha analizado la actividad de CA150 en el proceso de *splicing*. La sobre-expresión o silenciamiento de esta proteína en células tiene un impacto amplio en la expresión génica celular, e influye sobre diversos modelos de *splicing in vivo* (Pearson *et al.* 2008) (Lin *et al.* 2004). Sin embargo, *in vitro*, los niveles de este factor en un extracto nuclear no influyen en la actividad de *splicing* del mismo ((Lin *et al.* 2004), Miguel Sánchez, datos no publicados). En conjunto, estos datos sugieren que CA150 no tiene una actividad intrínseca *in vitro*, y podrían indicar que los efectos observados en los sistemas *in vivo* descritos tienen lugar a través de su asociación con otros factores, en el contexto de complejos multiproteicos. Es posible también que otros elementos obviados en un sistema *in vitro* sean parte de los mecanismos a través de los cuales CA150 ejerza su efecto. Experimentos futuros permitirán describir en mayor detalle los mecanismos moleculares implicados en las funciones de CA150.

conclusiones

1. Se ha establecido un sistema de transcripción-elongación *in vitro* para ensayar la actividad de los complejos transcripcionales.
2. Ha sido posible reproducir *in vitro* un bloqueo en la elongación transcripcional del gen c-myc.
3. La proteína recombinante Tat es capaz de estimular la procesividad de los complejos de la RNAPII de los genes del VIH-1 y c-myc a través del elemento TAR.
4. El complejo P-TEFb es requerido para la elongación transcripcional de los genes del VIH-1 y c-myc.
5. P-TEFb está presente en complejos de pre-iniciación ensamblados y aislados *in vitro* sobre los promotores del VIH-1 y c-myc estudiados, así como en regiones promotoras de ambos genes *in vivo*.
6. La caja TATA tiene un papel relevante en la activación transcripcional mediada por CDK9 cuando ésta es reclutada artificialmente a los promotores del VIH-1 y c-myc. Otras secuencias del promotor parecen contribuir a dicha activación.
7. Estudios preliminares han localizado al cofactor transcripcional CA150/TCERG1 en complejos de pre-iniciación y elongación ensamblados *in vitro* en el promotor del VIH-1. *In vivo*, se ha localizado específicamente CA150 en la zona promotora y en la zona distal de una unidad génica derivada del VIH-1.
8. No se ha encontrado un requerimiento del cofactor CA150 para la elongación transcripcional del VIH-1 *in vitro*.

bibliografía

- Akoulitchev, S., T. P. Makela, R. A. Weinberg and D. Reinberg (1995). "Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II." *Nature* **377**(6549): 557-60.
- Albright, S. R. and R. Tjian (2000). "TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas." *Gene* **242**(1-2): 1-13.
- Alcami, J., T. Lain de Lera, L. Folgueira, M. A. Pedraza, J. M. Jacque, F. Bachelerie, A. R. Noriega, R. T. Hay, D. Harrich, R. B. Gaynor and et al. (1995). "Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes." *Embo J* **14**(7): 1552-60.
- Allemand, E., E. Batsche and C. Muchardt (2008). "Splicing, transcription, and chromatin: a menage a trois." *Curr Opin Genet Dev* **18**(2): 145-51.
- Amir-Zilberstein, L., E. Ainbinder, L. Toube, Y. Yamaguchi, H. Handa and R. Dikstein (2007). "Differential regulation of NF-kappaB by elongation factors is determined by core promoter type." *Mol Cell Biol* **27**(14): 5246-59.
- Andrulis, E. D., E. Guzman, P. Doring, J. Werner and J. T. Lis (2000). "High-resolution localization of Drosophila Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation." *Genes Dev* **14**(20): 2635-49.
- Armstrong, J. A. (2007). "Negotiating the nucleosome: factors that allow RNA polymerase II to elongate through chromatin." *Biochem Cell Biol* **85**(4): 426-34.
- Auboeuf, D., E. Batsche, M. Dutertre, C. Muchardt and B. W. O'Malley (2007). "Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing." *Trends Endocrinol Metab* **18**(3): 122-9.
- Auboeuf, D., D. H. Dowhan, X. Li, K. Larkin, L. Ko, S. M. Berget and B. W. O'Malley (2004). "CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing." *Mol Cell Biol* **24**(1): 442-53.
- Barboric, M., R. M. Nissen, S. Kanazawa, N. Jabrane-Ferrat and B. M. Peterlin (2001). "NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell* **8**(2): 327-37.
- Batsche, E., M. Yaniv and C. Muchardt (2006). "The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing." *Nat Struct Mol Biol* **13**(1): 22-9.
- Batley, J., C. Moulding, R. Taub, W. Murphy, T. Stewart, H. Potter, G. Lenoir and P. Leder (1983). "The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma." *Cell* **34**(3): 779-87.
- Bellan, C., G. De Falco, S. Lazzi, P. Micheli, S. Vicidomini, K. Schurfeld, T. Amato, A. Palumbo, L. Bagella, E. Sabattini, S. Bartolommei, M. Hummel, S. Pileri, P. Tosi, L. Leoncini and A. Giordano (2004). "CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation." *J Pathol* **203**(4): 946-52.
- Belotserkovskaya, R., S. Oh, V. A. Bondarenko, G. Orphanides, V. M. Studitsky and D. Reinberg (2003). "FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration." *Science* **301**(5636): 1090-3.
- Bentley, D. L. and M. Groudine (1986). "A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells." *Nature* **321**(6071): 702-6.
- Berger, S. L. (2007). "The complex language of chromatin regulation during transcription." *Nature* **447**(7143): 407-12.

- Berkhout, B., A. Gatignol, A. B. Rabson and K. T. Jeang (1990). "TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter." *Cell* **62**(4): 757-67.
- Berkhout, B. and K. T. Jeang (1992). "Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat." *J Virol* **66**(1): 139-49.
- Bhargava, A. K., Z. Li and S. M. Weissman (1993). "Differential expression of four members of the POU family of proteins in activated and phorbol 12-myristate 13-acetate-treated Jurkat T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10260-4.
- Bielinska, A., S. Krasnow and G. J. Nabel (1989). "NF-kappa B-mediated activation of the human immunodeficiency virus enhancer: site of transcriptional initiation is independent of the TATA box." *J Virol* **63**(9): 4097-100.
- Bradsher, J. N., K. W. Jackson, R. C. Conaway and J. W. Conaway (1993). "RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties." *J Biol Chem* **268**(34): 25587-93.
- Bradsher, J. N., S. Tan, H. J. McLaury, J. W. Conaway and R. C. Conaway (1993). "RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation." *J Biol Chem* **268**(34): 25594-603.
- Brady, J. and F. Kashanchi (2005). "Tat gets the "green" light on transcription initiation." *Retrovirology* **2**: 69.
- Bres, V., S. M. Yoh and K. A. Jones (2008). "The multi-tasking P-TEFb complex." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 334-40.
- Brigati, C., M. Giacca, D. M. Noonan and A. Albin (2003). "HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression." *FEMS Microbiol Lett* **220**(1): 57-65.
- Buratowski, S. (2003). "The CTD code." *Nat Struct Biol* **10**(9): 679-80.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1997). "The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila." *Genes Dev* **11**(22): 3020-31.
- Butler, J. E. and J. T. Kadonaga (2002). "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression." *Genes Dev* **16**(20): 2583-92.
- Carty, S. M., A. C. Goldstrohm, C. Sune, M. A. Garcia-Blanco and A. L. Greenleaf (2000). "Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9015-20.
- Carty, S. M. and A. L. Greenleaf (2002). "Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing." *Mol Cell Proteomics* **1**(8): 598-610.
- Chao, S. H. and D. H. Price (2001). "Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo." *J Biol Chem* **276**(34): 31793-9.
- Chapman, R. D., M. Heidemann, T. K. Albert, R. Mailhammer, A. Flatley, M. Meisterernst, E. Kremmer and D. Eick (2007). "Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7." *Science* **318**(5857): 1780-2.
- Chapman, R. D., M. Heidemann, C. Hintermair and D. Eick (2008). "Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD." *Trends Genet* **24**(6): 289-96.
- Charlet-Berguerand, N., S. Feuerhahn, S. E. Kong, H. Ziserman, J. W. Conaway, R. Conaway and J. M. Egly (2006). "RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors." *Embo J* **25**(23): 5481-91.

- Chen, Y. I., R. E. Moore, H. Y. Ge, M. K. Young, T. D. Lee and S. W. Stevens (2007). "Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors." *Nucleic Acids Res* **35**(12): 3928-44.
- Cho, E. J., M. S. Kobor, M. Kim, J. Greenblatt and S. Buratowski (2001). "Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain." *Genes Dev* **15**(24): 3319-29.
- Cho, E. J., T. Takagi, C. R. Moore and S. Buratowski (1997). "mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain." *Genes Dev* **11**(24): 3319-26.
- Cho, H., T. K. Kim, H. Mancebo, W. S. Lane, O. Flores and D. Reinberg (1999). "A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II." *Genes Dev* **13**(12): 1540-52.
- Chodosh, L. A., A. Fire, M. Samuels and P. A. Sharp (1989). "5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro." *J Biol Chem* **264**(4): 2250-7.
- Citterio, E., V. Van Den Boom, G. Schnitzler, R. Kanaar, E. Bonte, R. E. Kingston, J. H. Hoeijmakers and W. Vermeulen (2000). "ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor." *Mol Cell Biol* **20**(20): 7643-53.
- Conaway, R. C., S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. Yao and J. W. Conaway (2005). "The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation." *Trends Biochem Sci* **30**(5): 250-5.
- Corden, J. L. (2007). "Transcription. Seven ups the code." *Science* **318**(5857): 1735-6.
- Core, L. J. and J. T. Lis (2008). "Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II." *Science* **319**(5871): 1791-2.
- Corey, L. L., C. S. Weirich, I. J. Benjamin and R. E. Kingston (2003). "Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation." *Genes Dev* **17**(11): 1392-401.
- Cosma, M. P. (2002). "Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation." *Mol Cell* **10**(2): 227-36.
- Cramer, P. (2002). "Multisubunit RNA polymerases." *Curr Opin Struct Biol* **12**(1): 89-97.
- Cullen, B. R. (1992). "Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses." *Microbiol Rev* **56**(3): 375-94.
- Cullen, B. R. (1993). "Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights?" *Cell* **73**(3): 417-20.
- Dahmus, M. E. (1994). "The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **48**: 143-79.
- Dahmus, M. E. (1995). "Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II." *Biochim Biophys Acta* **1261**(2): 171-82.
- Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh and W. A. Haseltine (1986). "The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication." *Cell* **44**(6): 941-7.
- De Falco, G., C. Bellan, A. D'Amuri, G. Angeloni, E. Leucci, A. Giordano and L. Leoncini (2005). "Cdk9 regulates neural differentiation and its expression correlates with the differentiation grade of neuroblastoma and PNET tumors." *Cancer Biol Ther* **4**(3): 277-81.
- Deng, W. and S. G. Roberts (2007). "TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II." *Chromosoma* **116**(5): 417-29.

- DesJardins, E. and N. Hay (1993). "Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters." Mol Cell Biol **13**(9): 5710-24.
- Dey, A., F. Chitsaz, A. Abbasi, T. Misteli and K. Ozato (2003). "The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8758-63.
- Dignam, J. D., R. N. Levovitz and R. G. Roeder (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." Nucleic Acids Res **11**: 1475-1489.
- Dvir, A., S. Tan, J. W. Conaway and R. C. Conaway (1997). "Promoter escape by RNA polymerase II. Formation of an escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter." J Biol Chem **272**(45): 28175-8.
- Eberhardy, S. R. and P. J. Farnham (2001). "c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism." J Biol Chem **276**(51): 48562-71.
- Eberhardy, S. R. and P. J. Farnham (2002). "Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter." J Biol Chem **277**(42): 40156-62.
- Egloff, S. and S. Murphy (2008). "Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes." Biochem Soc Trans **36**(Pt 3): 537-9.
- Egloff, S., D. O'Reilly, R. D. Chapman, A. Taylor, K. Tanzhaus, L. Pitts, D. Eick and S. Murphy (2007). "Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression." Science **318**(5857): 1777-9.
- Eick, D. and G. W. Bornkamm (1986). "Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression." Nucleic Acids Res **14**(21): 8331-46.
- Eissenberg, J. C., A. Shilatifard, N. Dorokhov and D. E. Michener (2007). "Cdk9 is an essential kinase in Drosophila that is required for heat shock gene expression, histone methylation and elongation factor recruitment." Mol Genet Genomics **277**(2): 101-14.
- Endoh, M., W. Zhu, J. Hasegawa, H. Watanabe, D. K. Kim, M. Aida, N. Inukai, T. Narita, T. Yamada, A. Furuya, H. Sato, Y. Yamaguchi, S. S. Mandal, D. Reinberg, T. Wada and H. Handa (2004). "Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro." Mol Cell Biol **24**(8): 3324-36.
- Fededa, J. P. and A. R. Kornblihtt (2008). "A splicing regulator promotes transcriptional elongation." Nat Struct Mol Biol **15**(8): 779-81.
- Ferdous, A., F. Gonzalez, L. Sun, T. Kodadek and S. A. Johnston (2001). "The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II." Mol Cell **7**(5): 981-91.
- Flores, O., E. Maldonado and D. Reinberg (1989). "Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Factors IIE and IIF independently interact with RNA polymerase II." J Biol Chem **264**(15): 8913-21.
- Fong, Y. W. and Q. Zhou (2000). "Relief of two built-in autoinhibitory mechanisms in P-TEFb is required for assembly of a multicomponent transcription elongation complex at the human immunodeficiency virus type 1 promoter." Mol Cell Biol **20**(16): 5897-907.
- Fong, Y. W. and Q. Zhou (2001). "Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation." Nature **414**(6866): 929-33.

- Fu, T. J., J. Peng, G. Lee, D. H. Price and O. Flores (1999). "Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription." *J Biol Chem* **274**(49): 34527-30.
- Fujinaga, K., D. Irwin, Y. Huang, R. Taube, T. Kurosu and B. M. Peterlin (2004). "Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element." *Mol Cell Biol* **24**(2): 787-95.
- Fujita, N. and P. A. Wade (2004). "Use of bifunctional cross-linking reagents in mapping genomic distribution of chromatin remodeling complexes." *Methods* **33**(1): 81-5.
- Garber, M. E., T. P. Mayall, E. M. Suess, J. Meisenhelder, N. E. Thompson and K. A. Jones (2000). "CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6958-69.
- Garcia-Martinez, L. F., D. Ivanov and R. B. Gaynor (1997). "Association of Tat with purified HIV-1 and HIV-2 transcription preinitiation complexes." *J Biol Chem* **272**(11): 6951-8.
- Gerber, H. P., M. Hagmann, K. Seipel, O. Georgiev, M. A. West, Y. Litington, W. Schaffner and J. L. Corden (1995). "RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription." *Nature* **374**(6523): 660-2.
- Gerber, M., J. C. Eissenberg, S. Kong, K. Tenney, J. W. Conaway, R. C. Conaway and A. Shilatifard (2004). "In vivo requirement of the RNA polymerase II elongation factor elongin A for proper gene expression and development." *Mol Cell Biol* **24**(22): 9911-9.
- Gerber, M., J. Ma, K. Dean, J. C. Eissenberg and A. Shilatifard (2001). "Drosophila ELL is associated with actively elongating RNA polymerase II on transcriptionally active sites in vivo." *Embo J* **20**(21): 6104-14.
- Giacinti, C., L. Bagella, P. L. Puri, A. Giordano and C. Simone (2006). "MyoD recruits the cdk9/cyclin T2 complex on myogenic-genes regulatory regions." *J Cell Physiol* **206**(3): 807-13.
- Giraud, S., A. Hurlstone, S. Avril and O. Coqueret (2004). "Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene." *Oncogene* **23**(44): 7391-8.
- Gnatt, A. L., P. Cramer, J. Fu, D. A. Bushnell and R. D. Kornberg (2001). "Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution." *Science* **292**(5523): 1876-82.
- Goldberg, M. (1979). PhD Thesis, Stanford University.
- Goldstrohm, A. C., T. R. Albrecht, C. Sune, M. T. Bedford and M. A. Garcia-Blanco (2001). "The transcription elongation factor CA150 interacts with RNA polymerase II and the pre-mRNA splicing factor SF1." *Mol Cell Biol* **21**(22): 7617-28.
- Gomes, N. P., G. Bjerke, B. Llorente, S. A. Szostek, B. M. Emerson and J. M. Espinosa (2006). "Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program." *Genes Dev* **20**(5): 601-12.
- Grana, X., A. De Luca, N. Sang, Y. Fu, P. P. Claudio, J. Rosenblatt, D. O. Morgan and A. Giordano (1994). "PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3834-8.

- Greenblatt, J. (1997). "RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(3): 310-9.
- Han, P., R. Brown and J. Barsoum (1991). "Transactivation of heterologous promoters by HIV-1 tat." Nucleic Acids Res **19**(25): 7225-9.
- Harlow, E. and D. Lane (1999). Using Antibodies: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- He, N., A. C. Pezda and Q. Zhou (2006). "Modulation of a P-TEFb functional equilibrium for the global control of cell growth and differentiation." Mol Cell Biol **26**(19): 7068-76.
- Herrant, M., F. Luciano, A. Loubat and P. Auberger (2002). "The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation." Oncogene **21**(32): 4957-68.
- Herrmann, C. H. and A. P. Rice (1993). "Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase." Virology **197**(2): 601-8.
- Herrmann, C. H. and A. P. Rice (1995). "Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor." J Virol **69**(3): 1612-20.
- Hirata, A., B. J. Klein and K. S. Murakami (2008). "The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea." Nature **451**(7180): 851-4.
- Holstege, F. C., U. Fiedler and H. T. Timmers (1997). "Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation." Embo J **16**(24): 7468-80.
- Hou, T., S. Ray and A. R. Brasier (2007). "The functional role of an interleukin 6-inducible CDK9/STAT3 complex in human gamma-fibrinogen gene expression." J Biol Chem **282**(51): 37091-102.
- Houzelstein, D., S. L. Bullock, D. E. Lynch, E. F. Grigorieva, V. A. Wilson and R. S. Beddington (2002). "Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4." Mol Cell Biol **22**(11): 3794-802.
- Ingham, R. J., K. Colwill, C. Howard, S. Dettwiler, C. S. Lim, J. Yu, K. Hersi, J. Raaijmakers, G. Gish, G. Mbamalu, L. Taylor, B. Yeung, G. Vassilovski, M. Amin, F. Chen, L. Matskova, G. Winberg, I. Ernberg, R. Linding, P. O'Donnell, A. Starostine, W. Keller, P. Metalnikov, C. Stark and T. Pawson (2005). "WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks." Mol Cell Biol **25**(16): 7092-106.
- Izban, M. G. and D. S. Luse (1993). "The increment of SII-facilitated transcript cleavage varies dramatically between elongation competent and incompetent RNA polymerase II ternary complexes." J Biol Chem **268**(17): 12874-85.
- Jang, M. K., K. Mochizuki, M. Zhou, H. S. Jeong, J. N. Brady and K. Ozato (2005). "The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription." Mol Cell **19**(4): 523-34.
- Jeang, K. T., H. Xiao and E. A. Rich (1999). "Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat." J Biol Chem **274**(41): 28837-40.
- Jones, K. A. and B. M. Peterlin (1994). "Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter." Annu Rev Biochem **63**: 717-43.
- Jordan, A., P. Defechereux and E. Verdin (2001). "The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation." Embo J **20**(7): 1726-38.

- Juven-Gershon, T., J. Y. Hsu, J. W. Theisen and J. T. Kadonaga (2008). "The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 253-9.
- Kanazawa, S., T. Okamoto and B. M. Peterlin (2000). "Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection." *Immunity* **12**(1): 61-70.
- Kanazawa, S., L. Soucek, G. Evan, T. Okamoto and B. M. Peterlin (2003). "c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis." *Oncogene* **22**(36): 5707-11.
- Kang, M. E. and M. E. Dahmus (1993). "RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter." *J Biol Chem* **268**(33): 25033-40.
- Kaplan, C. D., L. Laprade and F. Winston (2003). "Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites." *Science* **301**(5636): 1096-9.
- Kim, W. Y. and M. E. Dahmus (1989). "The major late promoter of adenovirus-2 is accurately transcribed by RNA polymerases IIO, IIA, and IIB." *J Biol Chem* **264**(6): 3169-76.
- Kobor, M. S. and J. Greenblatt (2002). "Regulation of transcription elongation by phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1577**(2): 261-275.
- Komarnitsky, P., E. J. Cho and S. Buratowski (2000). "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." *Genes Dev* **14**(19): 2452-60.
- Komili, S. and P. A. Silver (2008). "Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view." *Nat Rev Genet* **9**(1): 38-48.
- Kornblihtt, A. R. (2006). "Chromatin, transcript elongation and alternative splicing." *Nat Struct Mol Biol* **13**(1): 5-7.
- Kornblihtt, A. R. (2007). "Coupling transcription and alternative splicing." *Adv Exp Med Biol* **623**: 175-89.
- Kornblihtt, A. R., M. de la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz and G. Nogues (2004). "Multiple links between transcription and splicing." *Rna* **10**(10): 1489-98.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* **128**(4): 693-705.
- Krogan, N. J., M. Kim, S. H. Ahn, G. Zhong, M. S. Kobor, G. Cagney, A. Emili, A. Shilatifard, S. Buratowski and J. F. Greenblatt (2002). "RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach." *Mol Cell Biol* **22**(20): 6979-92.
- Krumm, A., L. B. Hickey and M. Groudine (1995). "Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation." *Genes Dev* **9**(5): 559-72.
- Krumm, A., T. Meulia, M. Brunvand and M. Groudine (1992). "The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region." *Genes Dev* **6**(11): 2201-13.
- Krumm, A., T. Meulia and M. Groudine (1993). "Common mechanisms for the control of eukaryotic transcriptional elongation." *Bioessays* **15**(10): 659-65.
- Kurosu, T. and B. M. Peterlin (2004). "VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes." *Curr Biol* **14**(12): 1112-6.
- Lagrange, T., A. N. Kapanidis, H. Tang, D. Reinberg and R. H. Ebright (1998). "New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB." *Genes Dev* **12**(1): 34-44.

- Lai, M. C., R. I. Lin, S. Y. Huang, C. W. Tsai and W. Y. Tarn (2000). "A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins." *J Biol Chem* **275**(11): 7950-7.
- Lee, D. K., H. O. Duan and C. Chang (2001). "Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation." *J Biol Chem* **276**(13): 9978-84.
- Lee, J. M. and A. L. Greenleaf (1997). "Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I." *J Biol Chem* **272**(17): 10990-3.
- Lewis, B. A., T. K. Kim and S. H. Orkin (2000). "A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7172-7.
- Li, B., M. Carey and J. L. Workman (2007). "The role of chromatin during transcription." *Cell* **128**(4): 707-19.
- Li, X. Y. and M. R. Green (1998). "The HIV-1 Tat cellular coactivator Tat-SF1 is a general transcription elongation factor." *Genes Dev* **12**(19): 2992-6.
- Lim, C. Y., B. Santoso, T. Boulay, E. Dong, U. Ohler and J. T. Kadonaga (2004). "The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II." *Genes Dev* **18**(13): 1606-17.
- Lin, K. T., R. M. Lu and W. Y. Tarn (2004). "The WW domain-containing proteins interact with the early spliceosome and participate in pre-mRNA splicing in vivo." *Mol Cell Biol* **24**(20): 9176-85.
- Lin, P. S., M. F. Dubois and M. E. Dahmus (2002). "TFIIF-associating carboxyl-terminal domain phosphatase dephosphorylates phosphoserines 2 and 5 of RNA polymerase II." *J Biol Chem* **277**(48): 45949-56.
- Lin, S., G. Coutinho-Mansfield, D. Wang, S. Pandit and X. D. Fu (2008). "The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation." *Nat Struct Mol Biol* **15**(8): 819-26.
- Lis, J. (1998). "Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 347-56.
- Litingtung, Y., A. M. Lawler, S. M. Sebald, E. Lee, J. D. Gearhart, H. Westphal and J. L. Corden (1999). "Growth retardation and neonatal lethality in mice with a homozygous deletion in the C-terminal domain of RNA polymerase II." *Mol Genet* **261**(1): 100-5.
- Liu, Y., C. Sune and M. A. Garcia-Blanco (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat-dependent activation of an arrested RNA polymerase II elongation complex." *Virology* **255**(2): 337-46.
- Ljungman, M. and P. C. Hanawalt (1995). "Presence of negative torsional tension in the promoter region of the transcriptionally poised dihydrofolate reductase gene in vivo." *Nucleic Acids Res* **23**(10): 1782-9.
- Lu, X., T. M. Welsh and B. M. Peterlin (1993). "The human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat specifies two different transcription complexes, only one of which is regulated by Tat." *J Virol* **67**(4): 1752-60.
- Majello, B., P. De Luca, G. Suske and L. Lania (1995). "Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins." *Oncogene* **10**(9): 1841-8.
- Majello, B., G. Napolitano, A. Giordano and L. Lania (1999). "Transcriptional regulation by targeted recruitment of cyclin-dependent CDK9 kinase in vivo." *Oncogene* **18**(32): 4598-605.

- Mancebo, H. S., G. Lee, J. Flygare, J. Tomassini, P. Luu, Y. Zhu, J. Peng, C. Blau, D. Hazuda, D. Price and O. Flores (1997). "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro." *Genes Dev* **11**(20): 2633-44.
- Mandal, S. S., H. Cho, S. Kim, K. Cabane and D. Reinberg (2002). "FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation." *Mol Cell Biol* **22**(21): 7543-52.
- Maniatis, T. and R. Reed (2002). "An extensive network of coupling among gene expression machines." *Nature* **416**(6880): 499-506.
- Marafioti, T., S. Ascani, K. Pulford, E. Sabbatini, M. Piccioli, M. Jones, P. L. Zinzani, G. Delsol, D. Y. Mason and S. A. Pileri (2003). "Expression of B-lymphocyte-associated transcription factors in human T-cell neoplasms." *Am J Pathol* **162**(3): 861-71.
- Marciniak, R. A., M. A. Garcia-Blanco and P. A. Sharp (1990). "Identification and characterization of a HeLa nuclear protein that specifically binds to the transactivation-response (TAR) element of human immunodeficiency virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3624-8.
- Marquez, N., M. A. Calzado, G. Sanchez-Duffhues, M. Perez, A. Minassi, A. Pagani, G. Appendino, L. Diaz, M. A. Munoz-Fernandez and E. Munoz (2008). "Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation." *Biochem Pharmacol* **75**(6): 1370-80.
- Marshall, N. F., J. Peng, Z. Xie and D. H. Price (1996). "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase." *J Biol Chem* **271**(43): 27176-83.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1992). "Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes." *Mol Cell Biol* **12**(5): 2078-90.
- McCracken, S., N. Fong, K. Yankulov, S. Ballantyne, G. Pan, J. Greenblatt, S. D. Patterson, M. Wickens and D. L. Bentley (1997). "The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription." *Nature* **385**(6614): 357-61.
- McCune, J. M. (1995). "Viral latency in HIV disease." *Cell* **82**(2): 183-8.
- McFie, P. J., G. L. Wang, N. A. Timchenko, H. L. Wilson, X. Hu and W. J. Roesler (2006). "Identification of a co-repressor that inhibits the transcriptional and growth-arrest activities of CCAAT/enhancer-binding protein alpha." *J Biol Chem* **281**(26): 18069-80.
- Medlin, J., A. Scurry, A. Taylor, F. Zhang, B. M. Peterlin and S. Murphy (2005). "P-TEFb is not an essential elongation factor for the intronless human U2 snRNA and histone H2b genes." *Embo J* **24**(23): 4154-65.
- Meinhart, A., T. Kamenski, S. Hoepfner, S. Baumli and P. Cramer (2005). "A structural perspective of CTD function." *Genes Dev* **19**(12): 1401-15.
- Meininghaus, M., R. D. Chapman, M. Horndasch and D. Eick (2000). "Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription." *J Biol Chem* **275**(32): 24375-82.
- Moberg, K. H., T. J. Logan, W. A. Tyndall and D. J. Hall (1992). "Three distinct elements within the murine c-myc promoter are required for transcription." *Oncogene* **7**(3): 411-21.
- Morris, D. P., G. A. Michelotti and D. A. Schwinn (2005). "Evidence that phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeats is similar in yeast and humans." *J Biol Chem* **280**(36): 31368-77.

- Muller, F., M. A. Demeny and L. Tora (2007). "New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors." *J Biol Chem* **282**(20): 14685-9.
- Muller, F. and L. Tora (2004). "The multicoloured world of promoter recognition complexes." *Embo J* **23**(1): 2-8.
- Muse, G. W., D. A. Gilchrist, S. Nechaev, R. Shah, J. S. Parker, S. F. Grissom, J. Zeitlinger and K. Adelman (2007). "RNA polymerase is poised for activation across the genome." *Nat Genet* **39**(12): 1507-11.
- Neugebauer, K. M. (2002). "On the importance of being co-transcriptional." *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3865-71.
- Ni, Z., A. Saunders, N. J. Fuda, J. Yao, J. R. Suarez, W. W. Webb and J. T. Lis (2008). "P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation in vivo." *Mol Cell Biol* **28**(3): 1161-70.
- Nogues, G., S. Kadener, P. Cramer, D. Bentley and A. R. Kornblihtt (2002). "Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing." *J Biol Chem* **277**(45): 43110-4.
- Nojima, M., Y. Huang, M. Tyagi, H. Y. Kao and K. Fujinaga (2008). "The Positive Transcription Elongation Factor b Is an Essential Cofactor for the Activation of Transcription by Myocyte Enhancer Factor 2." *J Mol Biol*.
- Nonet, M., C. Scafe, J. Sexton and R. Young (1987). "Eucaryotic RNA polymerase conditional mutant that rapidly ceases mRNA synthesis." *Mol Cell Biol* **7**(5): 1602-11.
- Nowak, D. E., B. Tian, M. Jamaluddin, I. Boldogh, L. A. Vergara, S. Choudhary and A. R. Brasier (2008). "RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes." *Mol Cell Biol* **28**(11): 3623-38.
- Oelgeschlager, T. (2002). "Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control." *J Cell Physiol* **190**(2): 160-9.
- Olsen, H. S. and C. A. Rosen (1992). "Contribution of the TATA motif to Tat-mediated transcriptional activation of human immunodeficiency virus gene expression." *J Virol* **66**(9): 5594-7.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse and D. Reinberg (1998). "FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes." *Cell* **92**(1): 105-16.
- Oven, I., N. Brdickova, J. Kohoutek, T. Vaupotic, M. Narat and B. M. Peterlin (2007). "AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8815-23.
- Pandit, S., D. Wang and X. D. Fu (2008). "Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 260-5.
- Pearson, J. L., T. J. Robinson, M. J. Munoz, A. R. Kornblihtt and M. A. Garcia-Blanco (2008). "Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing." *J Biol Chem* **283**(12): 7949-61.
- Peng, J., Y. Zhu, J. T. Milton and D. H. Price (1998). "Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb." *Genes Dev* **12**(5): 755-62.
- Peterlin, B. M., P. A. Luciw, P. J. Barr and M. D. Walker (1986). "Elevated levels of mRNA can account for the trans-activation of human immunodeficiency virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9734-8.
- Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." *Mol Cell* **23**(3): 297-305.

- Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf (2006). "Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD." *Genes Dev* **20**(21): 2922-36.
- Ping, Y. H. and T. M. Rana (1999). "Tat-associated kinase (P-TEFb): a component of transcription preinitiation and elongation complexes." *J Biol Chem* **274**(11): 7399-404.
- Pokholok, D. K., N. M. Hannett and R. A. Young (2002). "Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo." *Mol Cell* **9**(4): 799-809.
- Price, D. H. (2000). "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2629-34.
- Price, D. H. (2008). "Poised polymerases: on your mark...get set...go!" *Mol Cell* **30**(1): 7-10.
- Raha, T., S. W. Cheng and M. R. Green (2005). "HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs." *PLoS Biol* **3**(2): e44.
- Ratnasabapathy, R., M. Sheldon, L. Johal and N. Hernandez (1990). "The HIV-1 long terminal repeat contains an unusual element that induces the synthesis of short RNAs from various mRNA and snRNA promoters." *Genes Dev* **4**(12A): 2061-74.
- Reed, R. (2003). "Coupling transcription, splicing and mRNA export." *Curr Opin Cell Biol* **15**(3): 326-31.
- Reyes-Reyes, M. and M. Hampsey (2007). "Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation." *Mol Cell Biol* **27**(3): 926-36.
- Roeder, R. G. (1998). "Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eukaryotic transcription." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 201-18.
- Rosonina, E., S. Kaneko and J. L. Manley (2006). "Terminating the transcript: breaking up is hard to do." *Genes Dev* **20**(9): 1050-6.
- Rougvie, A. E. and J. T. Lis (1988). "The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged." *Cell* **54**(6): 795-804.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Press.
- Sanchez-Alvarez, M., A. C. Goldstrohm, M. A. Garcia-Blanco and C. Sune (2006). "Human transcription elongation factor CA150 localizes to splicing factor-rich nuclear speckles and assembles transcription and splicing components into complexes through its amino and carboxyl regions." *Mol Cell Biol* **26**(13): 4998-5014.
- Sano, M., M. Abdellatif, H. Oh, M. Xie, L. Bagella, A. Giordano, L. H. Michael, F. J. DeMayo and M. D. Schneider (2002). "Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy." *Nat Med* **8**(11): 1310-7.
- Saunders, A., L. J. Core and J. T. Lis (2006). "Breaking barriers to transcription elongation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 557-67.
- Saunders, A., J. Werner, E. D. Andrulis, T. Nakayama, S. Hirose, D. Reinberg and J. T. Lis (2003). "Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo." *Science* **301**(5636): 1094-6.
- Schwabish, M. A. and K. Struhl (2006). "Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell* **22**(3): 415-22.

- Schwartz, B. E., S. Larochelle, B. Suter and J. T. Lis (2003). "Cdk7 is required for full activation of *Drosophila* heat shock genes and RNA polymerase II phosphorylation in vivo." Mol Cell Biol **23**(19): 6876-86.
- Sehgal, P. B., J. E. Darnell, Jr. and I. Tamm (1976). "The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells." Cell **9**(3): 473-80.
- Selby, C. P. and A. Sancar (1997). "Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11205-9.
- Sheldon, M., R. Ratnasabapathy and N. Hernandez (1993). "Characterization of the inducer of short transcripts, a human immunodeficiency virus type 1 transcriptional element that activates the synthesis of short RNAs." Mol Cell Biol **13**(2): 1251-63.
- Shilatifard, A., R. C. Conaway and J. W. Conaway (2003). "The RNA polymerase II elongation complex." Annu Rev Biochem **72**: 693-715.
- Shilatifard, A., W. S. Lane, K. W. Jackson, R. C. Conaway and J. W. Conaway (1996). "An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene." Science **271**(5257): 1873-6.
- Shim, E. Y., A. K. Walker, Y. Shi and T. K. Blackwell (2002). "CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo." Genes Dev **16**(16): 2135-46.
- Shore, S. M., S. A. Byers, W. Maury and D. H. Price (2003). "Identification of a novel isoform of Cdk9." Gene **307**: 175-82.
- Simic, R., D. L. Lindstrom, H. G. Tran, K. L. Roinick, P. J. Costa, A. D. Johnson, G. A. Hartzog and K. M. Arndt (2003). "Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes." Embo J **22**(8): 1846-56.
- Simone, C., L. Bagella, C. Bellan and A. Giordano (2002). "Physical interaction between pRb and cdk9/cyclinT2 complex." Oncogene **21**(26): 4158-65.
- Sims, R. J., 3rd, R. Belotserkovskaya and D. Reinberg (2004). "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." Genes Dev **18**(20): 2437-68.
- Smale, S. T. and D. Baltimore (1989). "The "initiator" as a transcription control element." Cell **57**(1): 103-13.
- Spencer, C. A. and M. Groudine (1990). "Transcription elongation and eukaryotic gene regulation." Oncogene **5**(6): 777-85.
- Spencer, C. A. and M. Groudine (1991). "Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells." Adv Cancer Res **56**: 1-48.
- Steger, D. J. and J. L. Workman (1997). "Stable co-occupancy of transcription factors and histones at the HIV-1 enhancer." Embo J **16**(9): 2463-72.
- Stiller, J. W. and B. D. Hall (2002). "Evolution of the RNA polymerase II C-terminal domain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6091-6.
- Studitsky, V. M., W. Walter, M. Kireeva, M. Kashlev and G. Felsenfeld (2004). "Chromatin remodeling by RNA polymerases." Trends Biochem Sci **29**(3): 127-35.
- Sune, C. and M. A. Garcia-Blanco (1995). "Transcriptional trans activation by human immunodeficiency virus type 1 Tat requires specific coactivators that are not basal factors." J Virol **69**(5): 3098-107.
- Sune, C. and M. A. Garcia-Blanco (1999). "Transcriptional cofactor CA150 regulates RNA polymerase II elongation in a TATA-box-dependent manner." Mol Cell Biol **19**(7): 4719-28.

- Sune, C., A. C. Goldstrohm, J. Peng, D. H. Price and M. A. Garcia-Blanco (2000). "An in vitro transcription system that recapitulates equine infectious anemia virus tat-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Tat activity demonstrates a role for positive transcription elongation factor b and associated proteins in the mechanism of Tat activation." *Virology* **274**(2): 356-66.
- Sune, C., T. Hayashi, Y. Liu, W. S. Lane, R. A. Young and M. A. Garcia-Blanco (1997). "CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription." *Mol Cell Biol* **17**(10): 6029-39.
- Svejstrup, J. Q. (2003). "Rescue of arrested RNA polymerase II complexes." *J Cell Sci* **116**(Pt 3): 447-51.
- Taatjes, D. J., M. T. Marr and R. Tjian (2004). "Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 403-10.
- Tamm, I., T. Kikuchi, J. E. Darnell, Jr. and M. Salditt-Georgieff (1980). "Short capped hnRNA precursor chains in HeLa cells: continued synthesis in the presence of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole." *Biochemistry* **19**(12): 2743-8.
- Tan, S., T. Aso, R. C. Conaway and J. W. Conaway (1994). "Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II." *J Biol Chem* **269**(41): 25684-91.
- Thompson, J., T. Lepikhova, N. Teixido-Travesa, M. A. Whitehead, J. J. Palvimo and O. A. Janne (2006). "Small carboxyl-terminal domain phosphatase 2 attenuates androgen-dependent transcription." *Embo J* **25**(12): 2757-67.
- Tian, Y., S. Ke, M. Chen and T. Sheng (2003). "Interactions between the aryl hydrocarbon receptor and P-TEFb. Sequential recruitment of transcription factors and differential phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II at cyp1a1 promoter." *J Biol Chem* **278**(45): 44041-8.
- Tokusumi, Y., Y. Ma, X. Song, R. H. Jacobson and S. Takada (2007). "The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters." *Mol Cell Biol* **27**(5): 1844-58.
- Tora, L. (2002). "A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription." *Genes Dev* **16**(6): 673-5.
- Uptain, S. M., C. M. Kane and M. J. Chamberlin (1997). "Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation." *Annu Rev Biochem* **66**: 117-72.
- Verdin, E., P. Paras, Jr. and C. Van Lint (1993). "Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation." *Embo J* **12**(8): 3249-59.
- Wada, T., G. Orphanides, J. Hasegawa, D. K. Kim, D. Shima, Y. Yamaguchi, A. Fukuda, K. Hisatake, S. Oh, D. Reinberg and H. Handa (2000). "FACT relieves DSIF/NELF-mediated inhibition of transcriptional elongation and reveals functional differences between P-TEFb and TFIIF." *Mol Cell* **5**(6): 1067-72.
- Wada, T., T. Takagi, Y. Yamaguchi, A. Ferdous, T. Imai, S. Hirose, S. Sugimoto, K. Yano, G. A. Hartzog, F. Winston, S. Buratowski and H. Handa (1998). "DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs." *Genes Dev* **12**(3): 343-56.

- Wada, T., T. Takagi, Y. Yamaguchi, D. Watanabe and H. Handa (1998). "Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro." *Embo J* **17**(24): 7395-403.
- Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer and K. A. Jones (1998). "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA." *Cell* **92**(4): 451-62.
- West, M. L. and J. L. Corden (1995). "Construction and analysis of yeast RNA polymerase II CTD deletion and substitution mutations." *Genetics* **140**(4): 1223-33.
- Wierstra, I. and J. Alves (2008). "The c-myc promoter: still MysterY and challenge." *Adv Cancer Res* **99**: 113-333.
- Woodcock, C. L. (2006). "Chromatin architecture." *Curr Opin Struct Biol* **16**(2): 213-20.
- Wu, C. H., Y. Yamaguchi, L. R. Benjamin, M. Horvat-Gordon, J. Washinsky, E. Enerly, J. Larsson, A. Lambertsson, H. Handa and D. Gilmour (2003). "NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in Drosophila." *Genes Dev* **17**(11): 1402-14.
- Wu, Y. (2004). "HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA." *Retrovirology* **1**: 13.
- Yamada, T., Y. Yamaguchi, N. Inukai, S. Okamoto, T. Mura and H. Handa (2006). "P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation." *Mol Cell* **21**(2): 227-37.
- Yamaguchi, Y., T. Takagi, T. Wada, K. Yano, A. Furuya, S. Sugimoto, J. Hasegawa and H. Handa (1999). "NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation." *Cell* **97**(1): 41-51.
- Yang, X., M. O. Gold, D. N. Tang, D. E. Lewis, E. Aguilar-Cordova, A. P. Rice and C. H. Herrmann (1997). "TAK, an HIV Tat-associated kinase, is a member of the cyclin-dependent family of protein kinases and is induced by activation of peripheral blood lymphocytes and differentiation of promonocytic cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12331-6.
- Yang, Z., J. H. Yik, R. Chen, N. He, M. K. Jang, K. Ozato and Q. Zhou (2005). "Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4." *Mol Cell* **19**(4): 535-45.
- Yedavalli, V. S., M. Benkirane and K. T. Jeang (2003). "Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1." *J Biol Chem* **278**(8): 6404-10.
- Yeo, M., S. K. Lee, B. Lee, E. C. Ruiz, S. L. Pfaff and G. N. Gill (2005). "Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression." *Science* **307**(5709): 596-600.
- Zehring, W. A., J. M. Lee, J. R. Weeks, R. S. Jokerst and A. L. Greenleaf (1988). "The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(11): 3698-702.
- Zeichner, S. L., J. Y. Kim and J. C. Alwine (1991). "Linker-scanning mutational analysis of the transcriptional activity of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat." *J Virol* **65**(5): 2436-44.
- Zeitlinger, J., A. Stark, M. Kellis, J. W. Hong, S. Nechaev, K. Adelman, M. Levine and R. A. Young (2007). "RNA polymerase stalling at developmental control genes in the Drosophila melanogaster embryo." *Nat Genet* **39**(12): 1512-6.

- Zenzie-Gregory, B., P. Sheridan, K. A. Jones and S. T. Smale (1993). "HIV-1 core promoter lacks a simple initiator element but contains a bipartite activator at the transcription start site." *J Biol Chem* **268**(21): 15823-32.
- Zhang, Z., J. Fu and D. S. Gilmour (2005). "CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11." *Genes Dev* **19**(13): 1572-80.
- Zhang, Z., A. Klatt, D. S. Gilmour and A. J. Henderson (2007). "Negative elongation factor NELF represses human immunodeficiency virus transcription by pausing the RNA polymerase II complex." *J Biol Chem* **282**(23): 16981-8.
- Zhang, Z., A. Klatt, A. J. Henderson and D. S. Gilmour (2007). "Transcription termination factor Pcf11 limits the processivity of Pol II on an HIV provirus to repress gene expression." *Genes Dev* **21**(13): 1609-14.
- Zhou, M., M. A. Halanski, M. F. Radonovich, F. Kashanchi, J. Peng, D. H. Price and J. N. Brady (2000). "Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription." *Mol Cell Biol* **20**(14): 5077-86.
- Zhou, M., S. Nekhai, D. C. Bharucha, A. Kumar, H. Ge, D. H. Price, J. M. Egly and J. N. Brady (2001). "TFIIH inhibits CDK9 phosphorylation during human immunodeficiency virus type 1 transcription." *J Biol Chem* **276**(48): 44633-40.
- Zhou, Q. and P. A. Sharp (1996). "Tat-SF1: cofactor for stimulation of transcriptional elongation by HIV-1 Tat." *Science* **274**(5287): 605-10.
- Zhou, Q. and J. H. Yik (2006). "The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(3): 646-59.
- Zhou, Z., J. Sim, J. Griffith and R. Reed (2002). "Purification and electron microscopic visualization of functional human spliceosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12203-7.
- Zhu, Y., T. Pe'ery, J. Peng, Y. Ramanathan, N. Marshall, T. Marshall, B. Amendt, M. B. Mathews and D. H. Price (1997). "Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro." *Genes Dev* **11**(20): 2622-32.

anexo

Promoter Influences Transcription Elongation

TATA-BOX ELEMENT MEDIATES THE ASSEMBLY OF PROGRESSIVE TRANSCRIPTION COMPLEXES RESPONSIVE TO CYCLIN-DEPENDENT KINASE 9*

Received for publication, July 30, 2007, and in revised form, January 23, 2008. Published, JBC Papers in Press, January 24, 2008, DOI 10.1074/jbc.M706243200

Immaculada Montanuy^{†1}, Rosana Torremocha^{‡2}, Cristina Hernández-Munain[§], and Carlos Suñé^{†3}

From the Departments of [†]Molecular Biology and [§]Cell Biology and Immunology, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18100 Granada, Spain

Pausing of RNA polymerase II (RNAPII) during transcript elongation is an important mechanism for regulating gene expression at many genes. In this study we investigated the mechanism of regulated elongation of *c-myc* and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) using an *in vitro* elongation assay that reproduces the conditional block to elongation. We found that HIV-1 Tat can activate the RNAPII transcription complexes paused on *c-myc* by enhancing their elongation efficiency. We determined that cyclin-dependent kinase 9 (CDK9), the kinase subunit of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) complex, regulates transcriptional elongation of *c-myc* and is present in transcription pre-initiation complexes formed on the *c-myc* promoter, which emphasizes a common mechanism of elongation control between HIV-1 and *c-myc* genes. We also investigated the roles of upstream elements of the HIV-1 and *c-myc* promoters in CDK9-activated transcriptional elongation. We found that the TATA-box element mediates the assembly of progressive transcription complexes responsive to CDK9 and that specific combinations of upstream activation binding sites contribute to the recruitment of these complexes. We propose a common mechanism for elongation control at the *c-myc* and HIV-1 genes with an essential role for the TATA-box and specific modulatory contribution of upstream regulatory sequences, derived from the unique structure of the promoters, to form a composite surface for efficient recruitment of elongation-competent transcription complexes.

The once commonly held view that promoters regulate transcription only by recruiting RNAPII⁴ initiation complexes has

been challenged by recent findings that demonstrate a significant cross-talk between events occurring at the promoter and the process of elongation. For example, activation domains of factors that can promote the formation of pre-initiation complexes (PIC) can affect elongation and mRNA splicing events (1–3). Also, the Brm component of the SWI/SNF complex involved in chromatin remodeling on promoters dramatically affects alternative splicing choice decisions by modifying RNAPII elongation rate (4). Therefore, promoter structure and occupancy by transcription factors can affect the process of elongation and coupled mRNA processing events.

Elongation can be regulated by both positive and negative acting factors. For instance, negative transcription elongation factors such as the 5,6-dichloro-1 β -D-ribofuranosylbenzimidazole-sensitive inducing factor and the negative elongation factor (5, 6) can enhance pausing and/or arrest of RNAPII elongation complexes. Positive transcription elongation factors such as positive transcription elongation factor b (P-TEFb) enhance the overall rate of transcription elongation. P-TEFb is composed of the CDK9 kinase and cyclin T1 (7). At present, the mode of action of these negative and positive-acting factors is not well understood. Negative transcription elongation factors somehow pause RNAPII complexes in the 5' region of the transcription unit, resulting in arrested transcription, whereas positive transcription elongation factors overcome the effects of negative transcription elongation factors by releasing RNAPII complexes from its arrest (5, 6). This is in part accomplished by multiple phosphorylation events of the carboxyl-terminal domain of the largest subunit of the RNAPII. A hyperphosphorylated carboxyl-terminal domain correlates with the presence of RNAPII at the coding regions of genes and, thus, is considered a mark of elongating polymerases (8).

Among the most notable examples of promoter-proximal pausing, where RNAPII complexes are stalled in the 5' region of the transcription unit, are the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genes and the proto-oncogene *c-myc*. HIV-1 regulates its gene expression through the interplay of specific DNA cis-acting elements located within the long terminal repeat (LTR), the trans-acting viral protein Tat, and cellular factors. Tat activates viral gene expression by enhancing the elongation efficiency of RNAPII complexes in a process that is

* This research was supported in part by Spanish Ministry of Health Grants FIS04/0488 and FIS05/0355, Spanish Ministry of Education and Science Grant BFU2005-02806, and Fundación para la investigación y la prevención del SIDA en España (FIPSE) Grant 36473/05 (to C. S.) and by Spanish Ministry of Education and Science Grant BFU2005-01715 (to C. H. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by a fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (I3P Program).

² Present address: Unidad de Genómica-PCM, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain.

³ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra," CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, Armilla, 18100 Granada, Spain. Tel.: 34-958181645; Fax: 34-958181632; E-mail: csune@ipb.csic.es.

⁴ The abbreviations used are: RNAPII, RNA polymerase II; CDK9, cyclin-dependent kinase 9; PICs, pre-initiation complexes; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; ChIP, chromatin immunoprecipitation; nt, nucleo-

tide(s); P-TEFb, positive transcription elongation factor b; LTR, long terminal repeat; TAR, trans-activation response element; TBP, TATA-box-binding protein; GFP, green fluorescent protein; eGFP, enhanced GFP; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

mediated by the interaction of Tat with P-TEFb, which enhances RNAPII elongation by phosphorylating the carboxyl-terminal domain of RNAPII (9). Tat activates transcription through an unusual mechanism; it binds to an RNA element designated TAR (for *trans*-activation response element) in the 5' end of the HIV-1 transcript.

The *c-myc* proto-oncogene encodes a DNA-binding protein that is involved in the control of cellular proliferation, and its expression is altered in a wide variety of human tumors including breast, colon, cervical carcinomas, small lung carcinomas, osteosarcomas, glioblastomas, and myeloid leukemias (10). In normal cells, *c-myc* RNA is expressed at high levels during proliferative growth, but its levels decrease significantly during cellular differentiation. The decrease in *c-myc* RNA levels has been attributed to mechanisms operating at the level of elongation. *In vivo* RNAPII footprinting experiments have shown promoter-proximal pausing of transcription complexes in the *c-myc* gene (11), which suggests that the previously described block to elongation is due to paused RNAPII complexes in the *c-myc* promoter region (12). In this context it is possible that the phosphorylation state of the RNAPII carboxyl-terminal domain might contribute to the promoter proximal pausing of transcription complexes. The mechanism and factors that regulate transcriptional elongation and promoter-proximal pausing of *c-myc*, however, remain to be elucidated.

The pausing of RNAPII at discrete sites in the 5' region of the transcription unit is a widespread phenomenon that takes place at many other genes (for review, see Ref. 13), and based upon similarities in elongation control among some of these genes, a model for control of expression of these genes at the elongation phase of transcription has been proposed (12, 14). This model suggests that distinct promoter elements can nucleate the assembly of RNAPII transcription complexes that differ in their elongation efficiency. However, the influence that promoters have on promoter-proximal pausing and elongation factor recruitment has not been investigated yet.

In the study presented here we have developed an *in vitro* transcription elongation assay that reproduces promoter-proximal pausing of *c-myc* gene. We used this assay to carry out an analysis of the regulation of the *c-myc* and HIV-1 transcription elongation. We found that HIV-1 Tat can activate the *c-myc*-paused RNAPII transcription complexes, which are then able to elongate more efficiently. We also found that CDK9 regulates transcription elongation of *c-myc* and show that this factor is present in pre-initiation complexes formed on the *c-myc* promoter. Finally, we analyzed the different roles of upstream elements of the HIV-1 and *c-myc* promoters in CDK9-activated elongation by targeted recruitment of this cyclin-dependent kinase *in vivo*. In our experiments changes engineered into the HIV-1 and *c-myc* TATA-box sequences greatly alter CDK9 transcriptional induction, which suggest an essential role of this element in nucleate active, elongation-competent transcription complexes. In addition, the specific combinations of upstream activator binding sites present at each promoter contribute to this process by modulating the efficiency of the recruitment of these complexes to the TATA-box. Our data argue that proteins bound to the TATA-box and upstream sequences make

simultaneous and stereospecific contacts that are necessary for efficient recruitment of processive transcription complexes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids—The parental template HIVdGless was constructed by inserting a PCR fragment containing HIV LTR sequences (from -133 to +120) into KpnI/XbaI-digested pTZHIVdGless plasmid (15). The HIVBLdGless contains a deletion of the TAR bulge. In the HIVTATAdGless plasmid the TATA-box has been changed to GTCAC by standard techniques. The TdTdGless plasmid contains the initiator element (-6 to +11) from the TATA-less promoter of the TdT gene. The parental P1P2mycdGless and P2mycdGless plasmids were constructed by inserting PCR fragments containing human *c-myc* sequences (from -346 to +42 and from -94 to +42, respectively) into KpnI/XbaI-digested pTZHIVdGless plasmid. Human *c-myc* DNA was kindly provided by Ana Aranda (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," Madrid, Spain). The *c-myc*TARdGless plasmids were constructed by inserting PCR fragments containing the HIV TAR or mutated bulge sequences (from +1 to +120) into the parental plasmids by standard techniques. Oligonucleotide sequences and protocols are available upon request.

For the transient transfection experiments, the G5HIV-LUC reporter plasmid was constructed by inserting HIV sequences (from -133 to +120) into MluI/NheI-digested G5pGL3 vector. G5pGL3 vector was created by inserting five repeats of GAL4 DNA-binding sequences between KpnI and SacI sites of the pGL3 plasmid (Promega). The HIV mutant promoter plasmids NFI+II, Sp1I+II+III, and TATAm contain mutations that destroy the NF- κ B, Sp1, and TATA-box DNA binding sites, respectively. To engineer those mutations we used DNA templates that have been described before (16, 17) and were kindly provided by Kuan-Teh Jeang (NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, MD). The *c-myc*-based luciferase plasmid G5mycP2-LUC contains the P2 promoter with five GAL4 binding sites and was kindly provided by G. Napolitano and L. Lania (University of Naples, Naples, Italy). The G5mycP2Sp1m was constructed by inserting appropriate DNA sequences from the pmycCAT-X Δ Nmut (18), which was provided by G. Napolitano and L. Lania. G5mycE2Fm was constructed by changing the core E2F DNA binding sequence from GGCGGG to ATAGGG, which abolishes transcription factor binding as previously described (19). Sequence analysis was used to confirm the presence of the appropriate mutations. Finally, GAL4-CDK9 and GAL4-CDK9dn were described previously (20) and were kindly provided by G. Napolitano and L. Lania.

Biotinylation of DNA Templates—For the biotinylation of DNA templates used in Western blot analysis, we amplified by PCR the appropriate promoter sequences in the corresponding dGless plasmid. Primer sequences are available upon request.

Antibodies and Recombinant Proteins—Antibodies against CDK9, cyclin T1, RNAPII (N-20), TFIID (TATA-box-binding protein (TBP)), CDK2, nucleolin, and rabbit IgGs were all purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Antibodies against U2AF65 were kindly provided by J. Valcárcel (CRG, Barcelona, Spain). The CA150 antibodies used in this study were described previously (21). Antibodies against Sp1 were originally pro-

Control of *c-myc* and HIV-1 Elongation by CDK9

vided by J. Horowitz (Duke University Medical Center, Durham, NC). Anti-Tat antibodies were a generous gift of K. T. Jeang, and anti-GFP antibodies were from Invitrogen. Expression and purification of recombinant Tat and P-TEFb proteins have been described previously (15, 22).

Purification of PICs—25 μ l of streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads; Dynal) pre-equilibrated in 25 μ l of binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, and 1 M NaCl) were incubated with 250 ng of biotinylated templates for 30 min at room temperature. DNA-containing beads were subsequently incubated in IVT buffer (14 mM HEPES, pH 7.9, 14% glycerol, 7 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 10 mM creatine phosphate, 250 ng of poly(I)-poly(C), 300 ng of poly(dI)-poly(dC), and phenylmethylsulfonyl fluoride at 100 μ g/ml) containing 68 mM KCl (IVT-68) and 1% bovine serum albumin for 30 min at room temperature. After the blocking step beads were washed with IVT-68 buffer containing 0.05% Nonidet P-40 and incubated with 10 μ l of HeLa nuclear extracts (8 μ g/ μ l) prepared by the method of Dignam *et al.* (23) in a reaction mixture (25 μ l) containing IVT-68 buffer for 30 min at 30 °C. HeLa nuclear extract was first treated with 0.1 μ g/ml TaqI-digested pGI3 plasmid (Promega) to minimize nonspecific binding. The immobilized templates were then harvested using a magnetic device, and the PICs were washed extensively with IVT buffer containing 150 mM KCl (IVT-150) and 0.1% Nonidet P-40. *In vitro* transcription and Western blot analysis could then be performed using the purified PICs assembled on the immobilized templates.

In Vitro Transcription/Elongation Assay—The *in vitro* transcription/elongation assay was performed as previously described (15). The trans-activation of short and long transcripts was calculated by measuring the radioactivity for each product with phosphorimaging. Data were normalized for uridine content by dividing the radioactivity of the product by the number of uridine residues in the fragment (24 for the 83-nt cassette and 138 for the 377-nt cassette) (24). Elongation efficiency was calculated as the molar ratio of long to short transcripts. For the *in vitro* transcription/elongation reactions with the purified PICs, immobilized DNA templates were prepared as described before, but 500 ng of DNA in 50 μ l of binding buffer were used. Purified PICs were resuspended in 25 μ l of IVT-68 buffer containing 625 μ M (each) ATP, CTP, and GTP, 40 μ M UTP, 10 μ Ci of [α -³²P]UTP (3000 Ci/mmol, 1 μ l), and 4 units of RNasin (Promega). After incubating for 30 min at 30 °C, transcription reactions were processed and analyzed as described previously (22).

Immunodepletion of CDK9—Affinity matrices were prepared by binding 170 μ l (0.2 μ g/ml) of anti-CDK9 antibodies to 100 μ l of magnetic Protein A beads (Dynal Biotech) following the manufacturer's recommendations. After washing, immunoglobulins were linked to the matrix with dimethyl pimelidate as previously described (25). CDK9-containing magnetic beads were incubated with 180 μ l of HeLa nuclear extract in buffer D (20 mM HEPES, pH 7.9, 20% (V/V) glycerol, 0.2 mM EDTA, pH 8.0, and 0.5 mM dithiothreitol) containing 0.8 M KCl and 0.1% Nonidet P-40 for 1 h at 4 °C. Magnetic beads were collected using a magnet, and the supernatant was saved for a subsequent round of depletion after eluting the immune complexes with 0.1

M glycine, pH 3.0, washing, and equilibrating the beads. The final supernatant was dialyzed against buffer D containing 0.1 M KCl and used in Western blotting and transcription reactions.

ChIP Assay—The stably transfected Jurkat cell line pHR'-2xTat.Flag-IRES-eGFP, which simultaneously expresses the enhanced green fluorescent protein (eGFP) and Tat genes, was obtained from Eduardo Muñoz (Universidad de Córdoba). We carried out the ChIP experiments following guidelines from Upstate Biotechnology with some modifications. Briefly, cells were fixed with 5 mM dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate-2 HCl (DTBP) (Pierce) for 30 min on ice and with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Cells were lysed in radio-immune precipitation assay buffer and sonicated in a two-step protocol using a Branson Sonifer 450 and the Diagenode Bioruptor. Appropriate DNA size fragments of an average of about 250 bp were obtained. Chromatin was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C. After immunoprecipitation, PCR was used to amplify the immunoprecipitated DNA. The following primers spanning the promoter region of the *c-myc* and HIV-1 LTR were used: 5'-CTCGAGAAGGGCAGGGCTTCTCAG-3' (forward), 5'-AGAGGCGAAGCCCCCTATTCGCTC-3' (reverse) and 5'-CATCCGGAGTACTTCAAGAACTGC-3' (forward), and 5'-GGCTTAGCAGTGGGTTCCCTAG-3' (reverse), respectively. The sequence of the control primers for the amplification of an intergenic region upstream of the *c-myc* gene and the exonic region of the B-cell transcription factor OCT-2 were: 5'-TGATCCACTAAGGGGTCATCA-3' (forward), 5'-GGTCATTCCAGATGAATTGCC-3' (reverse) and 5'-TGACAAGCCGATAGCCGAGTG-3' (forward) and 5'-TATCCTCAGCTGTGGG-GACGC-3' (reverse), respectively.

Cell Culture and Transfections—The human cell lines HeLa or 293T were used in cell transfection experiments. Transfections were performed as described previously (17). The reporter vector CMV-CAT was used as an internal control for transfection, and pSV2 β GAL plasmid was used to keep constant the total amount of nucleic acid.

RESULTS

The study of the mechanisms governing transcriptional elongation has been hindered by the lack of appropriate methods to measure RNAPII efficiency. We, therefore, sought to establish an *in vitro* system that would allow us to biochemically and functionally dissect the regulation of transcription elongation due to promoter proximal pausing in the human *c-myc* gene. Transcription driven by the *c-myc* promoter can be observed *in vitro* by using HeLa nuclear extracts (26). In those *in vitro* cell-free assays, transcription from the *c-myc* promoter is measured as run-off products. To directly measure the elongation efficiencies of transcribing polymerases, we established an *in vitro* elongation assay that utilizes a double G-less cassette template (24) driven by the *c-myc* promoter. This template synthesizes transcripts that contain two regions (cassettes) of different sizes that lack guanosine residues; therefore, these G-less cassettes are resistant to digestion with RNase T1. One G-less cassette is located proximal to the promoter so as to measure the numbers of transcription complexes that reach nt +146 (short), and the second, downstream, G-less cassette measures the number of transcripts beyond nucleotide +1910 (long) (see

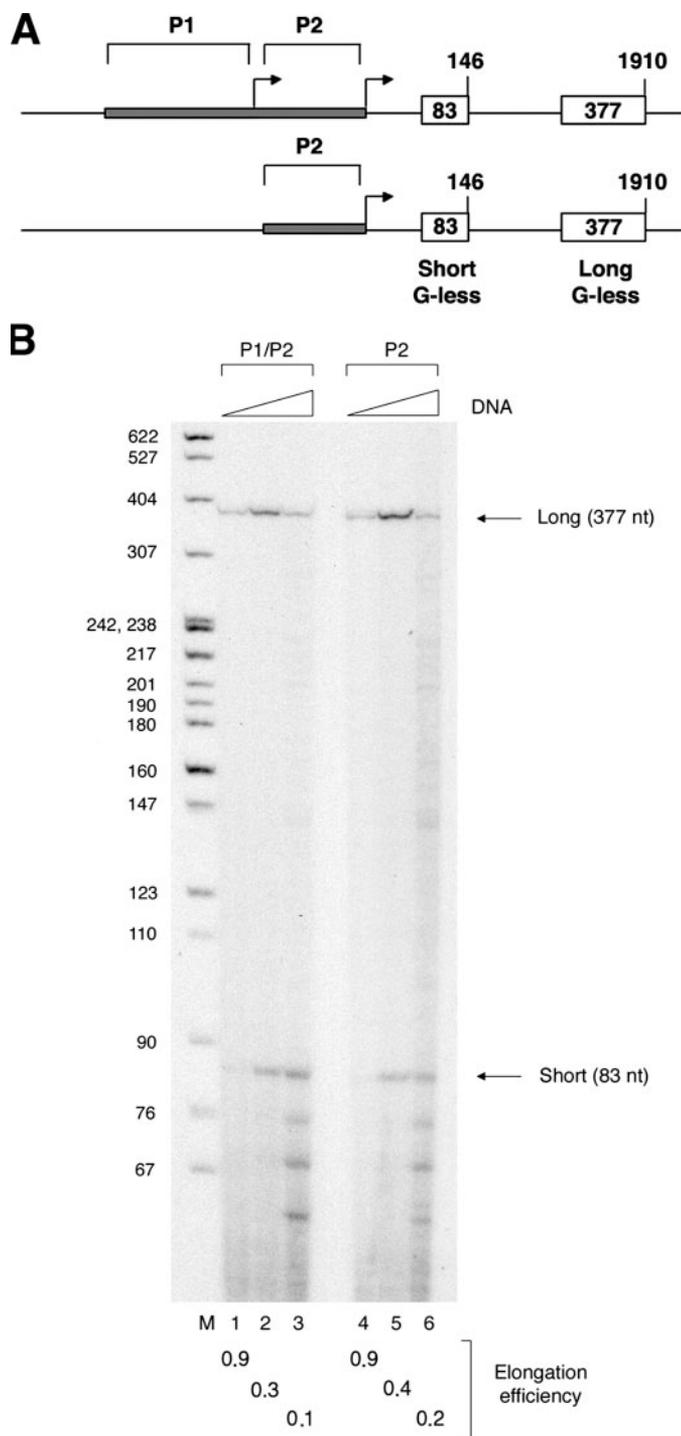


FIGURE 1. Conditional elongation efficiency during *c-myc* transcription. *A*, schematic representation of the *c-myc* double G-less cassette templates used in the experiment shown in *panel B*. *B*, elongation efficiency of *c-myc* transcription *in vitro*. Transcription reactions were carried out with a double G-less cassette in the presence of 50, 100, and 200 ng of template containing the P1/P2 (*lanes 1–3*) or the P2 promoter (*lanes 4–6*), respectively. RNA products were resolved by electrophoresis, and *arrows* indicate the migration of long and short transcripts. Molecular size markers (*lane M*, in base pairs) were the pBR322 DNA-MspI digest (New England Biolabs) labeled with [α - 32 P]dCTP. Molar elongation efficiencies were calculated as described under "Experimental Procedures."

Fig. 1A). The *c-myc* gene is transcribed from four different promoters and the major ones, P1 and P2, accounting for ~10 and 80%, respectively, of total *c-myc* steady-state RNA in normal

cells (27). Thus, we decided to construct two different *c-myc* promoter templates containing either the P2 promoter alone or both the P1 and P2 promoters (Fig. 1A).

Transcription from the *c-myc* promoters was efficient (Fig. 1B, *lanes 1* and 4), reflecting efficiency of RNAPII complexes formed on the *c-myc* promoter. However, increasing the concentration of DNA template in the transcription reaction dramatically reduced the levels of *c-myc* elongation as observed by the increase in the amount of short transcripts relative to long (Fig. 1B, *lanes 2* and 3 and *lanes 5* and 6). We observed the same result when using P1/P2 or P2 DNA templates. At present, the nature of the bands smaller than 83 nucleotides detected at high DNA concentration (*lanes 3* and 6) is unknown. As a control, we performed the *in vitro* transcription/elongation assay in the presence of α -amanitin, which strongly inhibits RNAPII-dependent transcription. Transcription was completely eliminated by 4 μ g of α -amanitin per ml, which indicates that RNA synthesis was carried out by RNAPII (data not shown). Those results indicate that premature pausing/termination of transcription complexes assembled on the *c-myc* promoter increases as a function of the amount of template, suggesting that a factor(s) essential for fully processive elongation may be limiting in the nuclear extract.

HIV-1 Tat Activates RNAPII Transcription Complexes Assembled on the *c-myc* Promoter—The block to elongation in the human *c-myc* gene is similar to HIV-1 transcription. Activation of HIV-1 gene expression is dependent on the presence of the viral Tat protein, which activates viral gene expression by enhancing the elongation efficiency of RNAPII complexes. This process is mediated by the interaction of Tat with its RNA target called TAR and with P-TEFb (9). We reproduced this effect in nuclear extracts of HeLa cells by transcribing a template containing the wild type HIV-1 promoter and the two G-less cassettes. In this elongation assay, exogenous recombinant Tat protein strongly increased the level of long transcripts with less effect on the level of short transcripts (Fig. 2A). Quantification of the long and short transcripts shows a bigger effect on the activation of long transcripts by Tat (Fig. 2A), which indicates an increase in the elongation efficiency of RNAPII complexes formed on the HIV-1 promoter. This activation was dependent on a functional TAR element since Tat was unable to activate an HIV-1 promoter containing a deletion in the bulge sequence (Tat binding site) of this element (Fig. 2B).

The similarities in elongation control between *c-myc* and HIV-1 suggest a common mechanism for the control of this phase of transcription. This predicts that cellular proteins regulating HIV elongation would function similarly for *c-myc*. To test this hypothesis, we cloned the HIV-1 TAR element downstream of the *c-myc* promoter at a position similar to its natural site in the HIV-1 gene and examined the effect of Tat in *c-myc* read-through transcription using the elongation assay. Transcription reactions were performed in conditions where the elongation efficiency of the RNAPII complexes formed on the *c-myc* promoter was low (Fig. 2C, *lanes 1* and 2 and *lanes 5* and 6). The addition of Tat strongly activated *c-myc* transcription as reflected by the preferential increase in the level of the long transcripts (Fig. 2C). Quantification of these data is also shown in graph form (Fig. 2C). Activation of transcriptional elongation

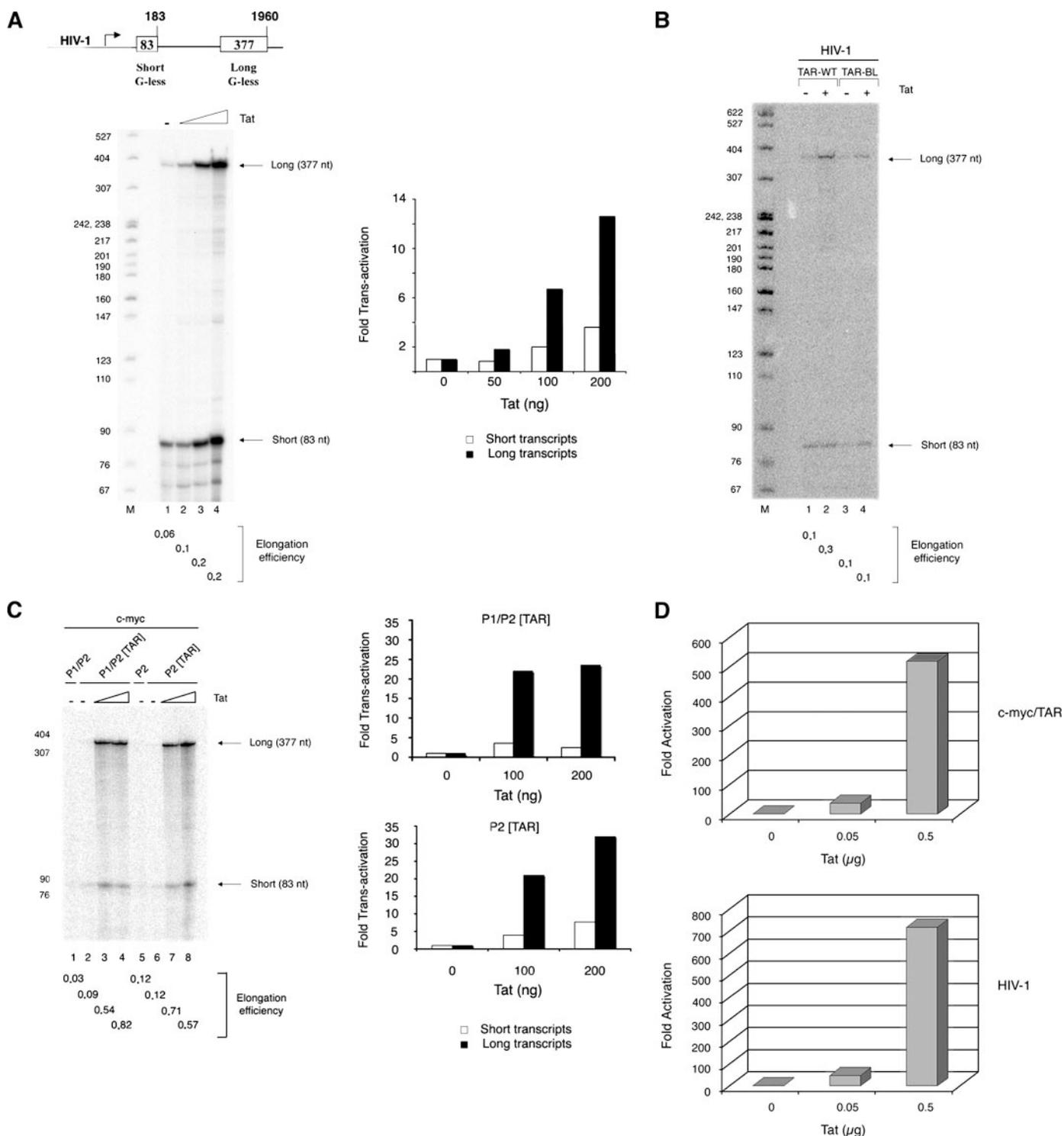


FIGURE 2. Activation of *c-myc* transcription by HIV-1 Tat protein. *A*, the transcriptional activity of Tat protein was assayed using an *in vitro* transcription system. Transcription reactions were carried out with a double G-less cassette containing the HIV-1 LTR and in the absence (*lane 1*) or in the presence of 50, 100, and 200 ng of recombinant Tat (*lanes 2–4*). Arrows indicate the position of long and short transcripts. A schematic representation of the HIV-1 LTR double G-less cassette template used in the experiment is shown on top of the panel. Quantification of the experimental data by PhosphorImager is shown in graphic form. *B*, TAR dependence of Tat-mediated HIV-1 transcriptional activation. The experiment described for panel *A* was carried out with a double G-less cassette containing a wild type (*WT*) or mutant (*BL*, bulge-less) TAR element in the absence (–) or presence (+) of 200 ng of recombinant Tat. Arrows indicate the position of long and short transcripts. *C*, HIV-1 Tat increases read-through transcription at sites of pausing within the *c-myc* gene *in vitro*. Transcription elongation reactions were performed with DNA templates without or with a TAR element within *c-myc* gene (P1/P2, P2, and P1/P2[TAR], P2[TAR], respectively) in the absence (–) and presence of 100 and 200 ng of recombinant Tat as indicated on top of the figure. Arrows indicate the migration of long and short transcripts. Experimental data from the experiment shown in this panel were quantified with phosphorimaging. *D*, reporter gene analysis of the activity of HIV-1 Tat in cells. DNA templates containing the HIV-1 and *c-myc*/TAR promoter elements driving the expression of the luciferase reporter gene were cotransfected in cells with the indicated amounts of Tat. Data are shown as the -fold activation of reporter activity. The experiment was performed three times independently, and values from one representative experiment are shown.

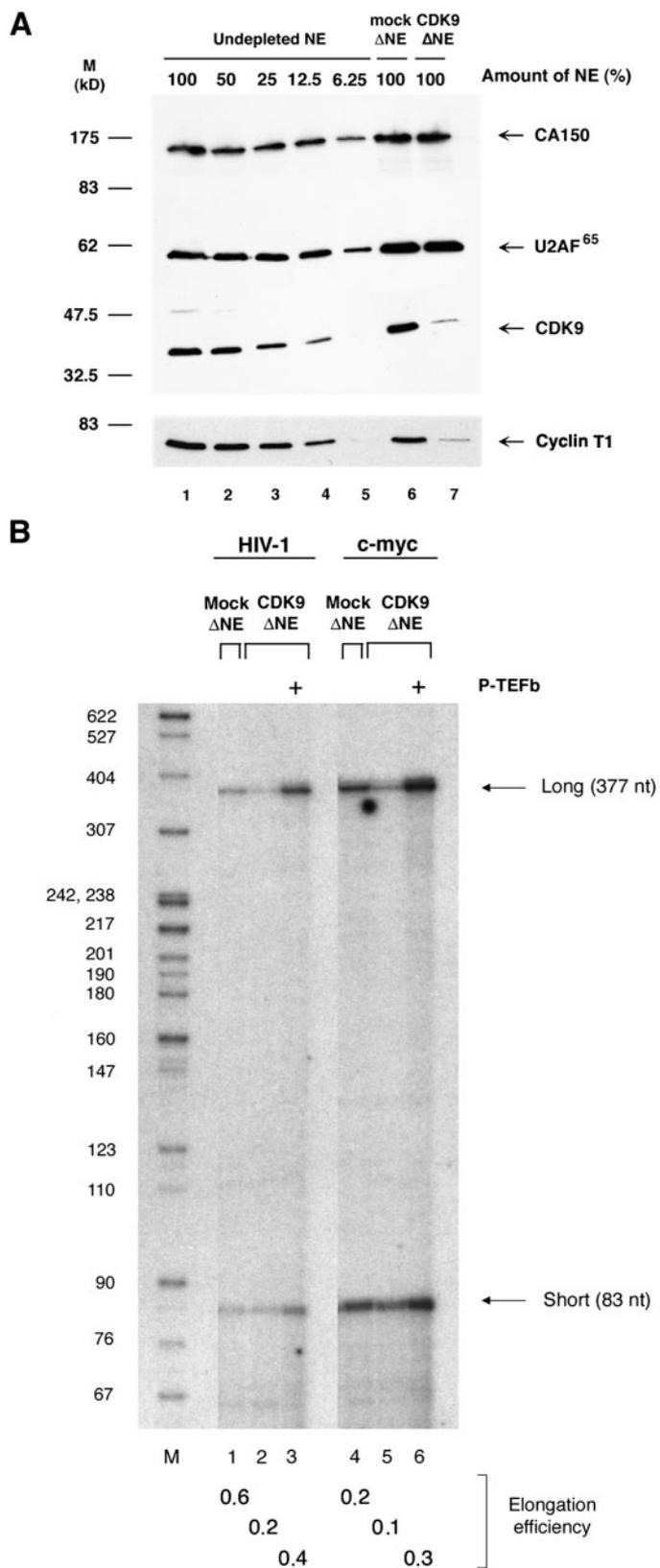


FIGURE 3. *c-myc* gene is regulated through a P-TEFb-dependent elongation pathway. *A*, immunodepletion of CDK9 from HeLa nuclear extract. Shown are the results of Western blot analysis of undepleted, mock, and CDK9-depleted nuclear extract (NE). Specific antibodies against CA150, U2AF⁶⁵, CDK9, and cyclin T1 were used to localize the proteins. The positions of the proteins and the relative mobilities (in kDa) of the molecular mass markers (M) are shown on the right and left sides of the panel, respectively.

of the *c-myc* gene by Tat was dependent on a functional TAR element (data not shown). Corroborating data were obtained using *in vivo* transient transfection experiments. The TAR-containing *c-myc* construct and the HIV promoter construct linked to a luciferase reporter gene were transiently transfected in cells in the absence or presence of a Tat-expressing plasmid. As shown in Fig. 2D, Tat strongly activated transcription driven by both promoters. In this transfection assay Tat failed to activate a *c-myc* promoter template containing a deletion in the bulge sequence of TAR (data not shown). These data demonstrate that Tat can modify the RNAPII complexes formed on the *c-myc* promoter to activate elongation efficiency.

In the cell-free system described here, Tat stimulates transcription by 3–10-fold, which is consistent with previous *in vitro* results (22, 28). *In vivo* studies have shown, however, that Tat increases transcription by several hundred-fold (such as the data shown in Fig. 2D). The high basal levels of HIV transcription or the inefficient re-initiation observed *in vitro* and the lack of an appropriate chromatin environment may account for those differences.

P-TEFb Regulates Transcriptional Elongation of c-myc in Vitro—The results of our *in vitro* and *in vivo* assays suggest that targeted recruitment of P-TEFb to the *c-myc* promoter by Tat/TAR increases the elongation efficiency of RNAPII complexes. If so, depletion of P-TEFb should lead to an abrogation of *c-myc* transcriptional activity. To test this hypothesis, we specifically immunodepleted CDK9 from HeLa cell nuclear extract. The supernatant fraction from the anti-CDK9 precipitation showed a 90% depletion of CDK9 and cyclin T1 (Fig. 3A and data not shown) but no effect on the levels of other proteins such as transcription elongation factor CA150 or splicing factor U2AF⁶⁵ (Fig. 3A). The supernatant fraction from mock-depleted extract had levels of CDK9 and cyclin T1 similar to those in the original load (Fig. 3A). To evaluate the effect of the depletion on the transcriptional activity of HIV-1 and *c-myc* promoters, *in vitro* transcription elongation reactions were carried out with the supernatant fractions from the depleted extracts. Immunodepletion of CDK9 from the extract significantly reduced the level of long transcripts with minimal effect on the level of short transcripts synthesized from the HIV-1 and *c-myc* promoters (Fig. 3B, lanes 2 and 5, respectively). This result clearly shows the specific role of CDK9 in the elongation efficiency of RNAPII complexes formed on the HIV-1 and *c-myc* genes, which supports previous studies that have shown that P-TEFb is critical for RNAPII transcription elongation (29–31).

Next, we sought to test whether P-TEFb could recover the level of transcriptional elongation in the CDK9-depleted extracts. To achieve this, CDK9 and cyclin T1 were co-expressed using a recombinant baculovirus system and added to the CDK9-depleted nuclear extract. The addition of recombinant purified P-TEFb to the reactions increased the elongation efficiency (Fig. 3B, lanes 3 and 6, respectively). Those results

B, analysis of transcriptional elongation activity in the immunodepleted extracts. Transcription elongation reactions were performed with the indicated fractions and the HIV-1 LTR or the *c-myc* double G-less cassette templates. Lanes 3 and 6 show that the addition of recombinant P-TEFb (80 ng) increased elongation efficiency of both HIV-1 and *c-myc* transcription in the immunodepleted extracts. Arrows indicate migration of long and short transcripts.

Control of *c-myc* and HIV-1 Elongation by CDK9

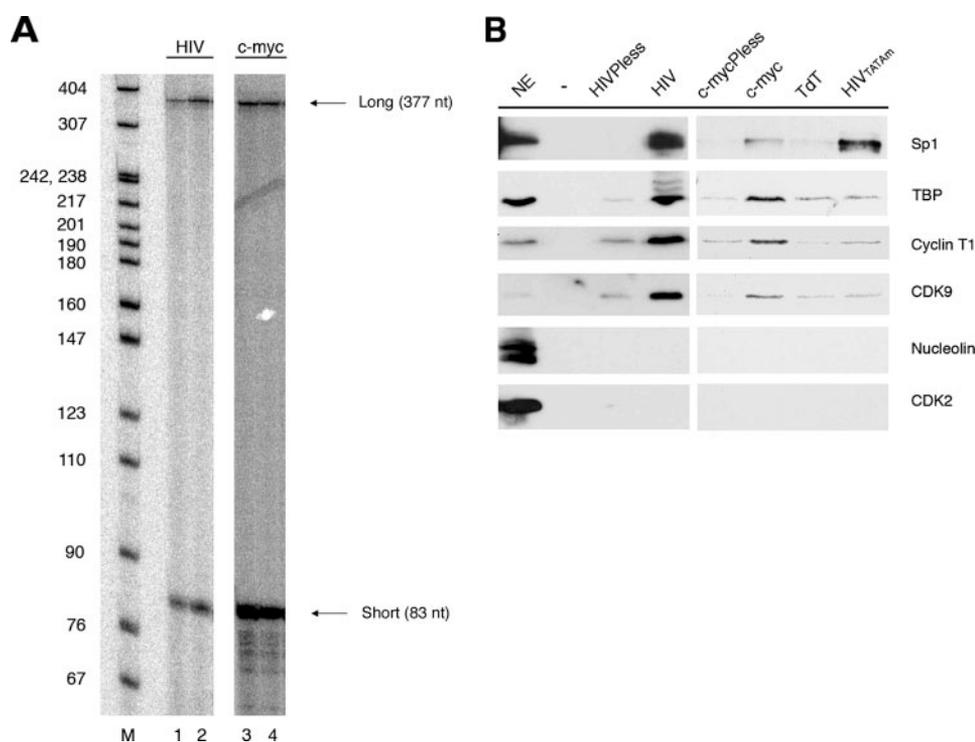


FIGURE 4. Analysis of PICs assembled on the HIV-1 and *c-myc* promoters *in vitro*. *A*, biotinylated HIV-1 and *c-myc* templates were incubated with nuclear extract, and PICs were purified with streptavidin-coated magnetic beads. *In vitro* transcription elongation reactions were performed with the purified PICs, and the transcripts were labeled with [α - 32 P]UTP and resolved by electrophoresis. Lanes 1–4 are two independent reactions performed with the HIV-1 and *c-myc* templates as indicated on top of the figure, respectively. Arrows indicate the migration of long and short transcripts. *B*, CDK9 and cyclin T1 are components of the HIV-1 and *c-myc* PICs. PICs were formed on the following templates: HIV-1 promoter less (*HIV^{Pless}*), HIV-1, *c-myc* promoter less (*c-myc^{Pless}*), *c-myc*, TdT, and HIV-1 with a TATA-box mutated (*HIV^{TATAm}*). An association reaction with no template added was also carried out as a parallel control (–). PICs were purified with streptavidin-coated magnetic beads, and Western blot analysis of the purified PICs was then done with the specific antibodies shown at the right side of the panel. NE, nuclear extract.

demonstrate that CDK9 and cyclin T1 are sufficient to restore elongation in the depleted extract and that P-TEFb is a limiting factor for elongation from both *c-myc* and HIV-1 promoters.

CDK9 Is Present in *c-myc* Transcription PICs—The experiments shown above suggest a common mechanism for the control of transcription elongation of HIV-1 and *c-myc* genes by CDK9. Previous studies have shown that CDK9 associate with HIV-1 PICs (32). We tested whether CDK9 could associate with PICs assembled on the *c-myc* promoter *in vitro*. We used immobilized DNA templates to purify PICs and analyze their functional characteristics. HIV-1- and *c-myc*-biotinylated templates were incubated with HeLa nuclear extract, and PICs were subsequently isolated using streptavidin-coated magnetic beads. *In vitro* transcription elongation reactions were then performed. Purified RNAPII transcription complexes were able to reach the short and long cassettes, which demonstrate that PICs assembled on both promoters were functional and contained factors required to extend long distances (Fig. 4A). Next, we sought to characterize the protein composition of the PICs assembled on the HIV-1 and *c-myc* promoters, especially with respect to P-TEFb. In parallel, control reactions were carried out with a promoter-less template or an HIV-1 TATA-box mutant template (*Pless* and *HIV^{TATAm}* in Fig. 4B). We also examined PICs assembled by an alternative initiator element (–6 to +11) from the TATA-less promoter of the TdT gene

(33). Fig. 4B shows a representative Western blot analysis of PICs using Sp1-, TBP-, cyclin T1-, CDK9-, nucleolin-, and CDK2-specific antibodies. As expected, we observed cyclin T1 and CDK9 in the PICs formed on the HIV-1 promoter. Interestingly, both proteins were also found in the PICs formed on the P2 *c-myc* promoter template. Proteins associated with the P-TEFb complex failed to precipitate with the promoter-less, HIV-1 TATA-box mutant, and TdT templates, which demonstrates the specificity of our assay. The absence of P-TEFb complex in the PICs formed using the TdT promoter could indicate a requirement for a recognizable TATA element to recruit this transcription complex (see below). The TdT construct was transcriptionally active in separate functional assays (data not shown; see also Fig. 6). The presence of binding of Sp1 to the TATA-box mutant template adds further specificity to the assay (Fig. 4B). Similarly, we detected only trace amounts of TBP in the PICs formed onto the TATA-box mutant and TdT templates (Fig. 4B). Sp1 was weakly detected in the *c-myc* PICs,

which agrees with the presence of a single CT-rich functional Sp1-binding sequence upstream of the P2 promoter (18). Finally, we did not detect binding of nucleolin or CDK2 to the PICs (Fig. 4B). Those results demonstrate the presence of P-TEFb in the RNAPII complexes assembled onto the *c-myc* promoter *in vitro* and the requirement for a TATA-box sequence in P-TEFb recruitment to promoters.

To determine whether P-TEFb is recruited to the integrated HIV-1 LTR and chromosomal *c-myc* promoters *in vivo*, ChIP experiments were carried out using a Tat-inducible Jurkat cell line. This cell line simultaneously expresses the eGFP and Tat genes upon transcription activation. Induction of eGFP and Tat in PMA-treated cells was confirmed by reverse transcription-PCR and immunoblotting using anti-eGFP and anti-Tat antibodies (Fig. 5A). We could detect a weak positive signal by reverse transcription-PCR in the absence of induction (Fig. 5A), which demonstrate that those inducible systems are always a bit leaky. No signal could be detected by Western blotting analysis in the absence of PMA (Fig. 5A). Chromatin was isolated from these cells in the absence or presence of PMA treatment, immunoprecipitated with the specific antibodies, and subjected to PCR using primer sets specific for the *c-myc* and the HIV-1 LTR promoter regions. Fig. 5B shows the results obtained from the non-induced (Me₂SO) and induced cells (PMA). As a control of the ChIP experiment, we detected RNAPII at the HIV-1 and

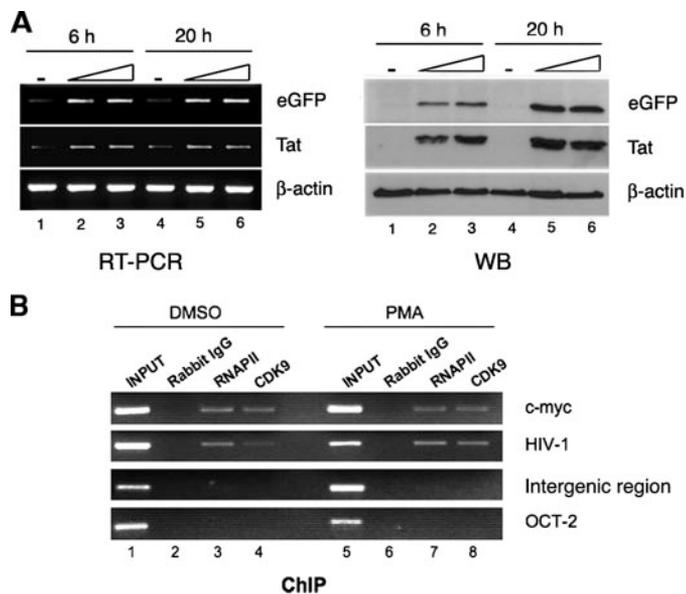


FIGURE 5. ChIP analysis of the recruitment of transcription factors to the *c-myc* and HIV-1 promoters. *A*, induction of eGFP and Tat after PMA treatment in a stable cell line containing an integrated HIV-1 LTR-eGFP-Tat reporter gene was analyzed by reverse transcription (RT)-PCR and Western blotting (WB). RNA and protein extracts were prepared from cells cultured with Me₂SO (lanes 1 and 4) or PMA at 25 ng/μl (lanes 2 and 5) or 50 ng/μl (lanes 3 and 6) for the different times indicated above each lane. The different proteins are indicated to the right of each panel. *B*, CDK9 binds to the *c-myc* and HIV-1 genes *in vivo*. Cross-linked and sheared chromatin from non-induced (Me₂SO (DMSO)) and induced cells (PMA) was immunoprecipitated with the indicated antibodies. After reversal of cross-linking and purification of DNA, PCR was used to detect sequences corresponding to the endogenous *c-myc* promoter, the integrated HIV-1 LTR a DNA region upstream the *c-myc* gene, and the exonic region of the B-cell associated factor OCT-2. Input shows the signal from the chromatin before immunoprecipitation. Primers used in ChIP assays are as described under "Experimental Procedures."

c-myc promoters. Importantly, we detected CDK9 at both promoters *in vivo*. No proteins were detected using control IgG antibodies (Fig. 5B). Control regions of an intergenic region upstream the *c-myc* gene or the OCT-2 gene were unaffected (Fig. 5B). Thus, we concluded that P-TEFb is recruited to both promoters *in vivo*.

Targeted Recruitment of CDK9 to Promoters Reveals a Strict Requirement of the TATA-box for CDK9 Activity—To further examine the role of CDK9 in transcription, we targeted CDK9 to a promoter by fusing it to a sequence-specific DNA binding domain (GAL4 1–147). We then tested the ability of the fusion protein to activate the HIV-1 and *c-myc* promoter elements containing appropriate GAL4-DNA binding sequences. As shown in Fig. 6B, GAL4-CDK9 effectively activated transcription when tested on the GAL4-containing HIV-1 (G5HIV-LUC) and *c-myc* (G5cmyp2-LUC) reporter constructs. In contrast, a catalytically inactive CDK9 fusion protein (GAL4-CDK9dn) failed to activate the reporter constructs (Fig. 6B). We, therefore, conclude that recruitment of CDK9 to the HIV-1 and *c-myc* promoters can activate gene transcription, which supports previous published studies (20).

To better understand the transcription binding site requirement for CDK9 activation, we constructed several HIV-1 and *c-myc* mutant reporter constructs, with GAL4 binding sites, and tested the effect of those changes for proper functioning of the GAL4-CDK9. Mutations were individually introduced into

Control of *c-myc* and HIV-1 Elongation by CDK9

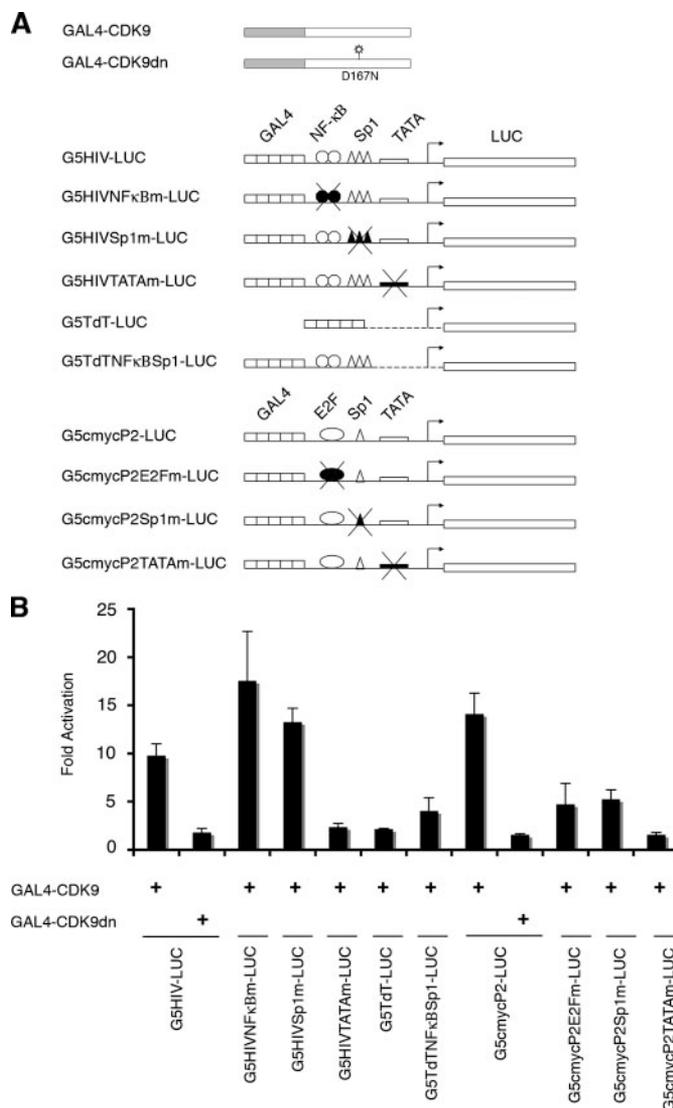


FIGURE 6. The role of promoter and proximal promoter elements in the activation of transcriptional elongation by DNA-tethered P-TEFb. *A*, diagrammatic representation of the constructs used. The activator plasmid GAL4-CDK9 directed the expression of the full-length CDK9 protein fused to the Gal4 DNA binding domain. GAL4-CDK9dn expresses a kinase-inactive CDK9 protein bearing a single amino acid change (Asp-167 to Asn) in its catalytic domain. The target plasmids contained the HIV-1, TdT, and *c-myc* promoter sequences linked to the luciferase reporter gene. *B*, reporter gene analysis of the activities of the indicated GAL4-CDK9 proteins on the GAL4-driven promoter-reporter constructs in HeLa cells. Expression plasmids encoding GAL4-CDK9 or GAL4-CDK9dn fusion proteins were cotransfected into HeLa cells with the indicated reporter plasmids and CMV-CAT control reporter plasmid. Cells were harvested, and activity assays were done as described under "Experimental Procedures." The data are presented as -fold activation relative to the GAL4 reporter sample without effector. Each histogram bar represents the mean of at least three independent transfections with at least two different preparations of each plasmid DNA.

the NF-κB, Sp1, TATA-box, and E2F motifs of the HIV-1 and *c-myc* promoters as diagrammed in Fig. 6A. Mutations of either of the two NF-κB binding sites or any of the three Sp1 binding sites or the complete ablation of NF-κB or Sp1 binding sites of the HIV-1 promoter did not impair the magnitude of GAL4-CDK9 response (Fig. 6B and data not shown). These results suggest that NF-κB and Sp1 *per se* are not needed for proper GAL4-CDK9 activation of the HIV-1 promoter. Interestingly, a much smaller increase in activity was seen after mutating the

Control of *c-myc* and HIV-1 Elongation by CDK9

TABLE 1

Reporter gene analysis of the activity of CDK9 on the HIV-1 wild type and TATA-box-mutated reporter constructs in HeLa cells

Activity from the wild-type and TATA-mutated G5HIV-LUC reporter plasmids is shown for three independent experiments (Exp.). Values are shown after normalization for the internal control chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity of the CMV-CAT reporter vector. All results shown represent the averages of data from duplicate specimens.

	HIV-1 wild type			HIV-1 TATA-box mutant		
	-CDK9	+CDK9	-Fold activation	-CDK9	+CDK9	-Fold activation
Exp. 1	165	1,798	10.91	184	404	2.1
Exp. 2	395	3,898	9.86	201	446	2.2
Exp. 3	5,610	47,845	8.52	10,022	30,019	2.9

TATA-box (Fig. 6B), which indicates that this sequence was strictly required for CDK9 activity. It is important to point out that in our experimental conditions, HIV-1 TATA-mutated and wild type constructs had similar transcription levels (Table 1), which indicates that both promoters are not restricted for PIC formation, and they can be stimulated at later steps like elongation (see "Discussion"). We also explored the role of the TATA-less TdT initiator in CDK9 activation by using just the initiator or the initiator plus two NF- κ B and three Sp1 binding sites (NF/Sp TdT, Fig. 6A). We found no detectable activation by GAL4-CDK9 when either TdT or NF/Sp TdT was used (Fig. 6B). This result demonstrates that a complete set of enhancer sequences is not required *per se* for CDK9-mediated transcription activation and that the former requires a canonical TATA-box sequence.

To explore the functional consequences of the *c-myc* DNA binding sites in CDK9 activation, each of the *c-myc* reporters drawn in Fig. 6A was cotransfected into cells together with the GAL4-CDK9 expression vector. We found that activation by CDK9 was diminished when a plasmid containing a mutation at either the Sp1 or E2F site was used. However, a more dramatic effect was observed when a mutant in the TATA-box sequence was used (Fig. 6B). Those results indicate that a strict requirement for the TATA-box element is again needed for CDK9 activation to occur. These studies indicate a critical role for this sequence element in assembling a functional transcription complex responsive to CDK9. In addition, our data indicate that the unique structure of different promoters has an important role in modulating efficiently the recruitment of elongation transcription complexes to the TATA-box. Hence, the combination of proteins bound to the TATA-box and upstream sequences provides specific surfaces to recruit elongation competent transcription complexes.

DISCUSSION

A growing body of evidence supports that control of transcriptional elongation plays a prominent role in regulating gene expression in eukaryotes (34). Efficient transcript elongation by RNAPII requires overcoming "blocks," which is accomplished with the help of elongation factors. In addition to the widely studied *c-myc* and HIV-1 genes, there are many examples of genes where transcriptional pausing occurs, such as the genes for adenosine deaminase (35), tumor necrosis factor- α (36), Ig κ (37), *c-myb* (38), *c-fos* (39), *c-mos* (40), and others (13), suggesting that what happens in those genes is more the rule than the exception. Although we have gained considerable knowledge about the biochemical mecha-

nisms underlying elongation and identified many factors involved in its regulation, several questions arise. Is there a unique mechanism of facilitating productive elongation upon pausing? What are the role of promoter context and the nature of the gene itself in transcript elongation? And are the same "set" of factors involved in this process, *i.e.* is the P-TEFb complex generally required to relieve RNAPII pausing?

Here we have studied the transcriptional elongation of *c-myc* and HIV-1 genes to gain further insights into the mechanisms of transcriptional pausing. We have used an *in vitro* transcription elongation system that reproduces promoter-proximal pausing of HIV-1 and *c-myc* genes. Our data indicate that a fraction of RNAPII complexes paused before the first HIV-1 G-less cassette since there was also an ~3-fold increase in the intensity of the 83-nucleotide band (Fig. 2A). This is consistent with recent data that demonstrate that RNAPII complexes preferentially accumulate at approximately +41 to +45 downstream from the HIV-1 transcription site (41). This poses an intriguing question; if RNAPII pauses upstream of the 3' end of TAR, as suggested by our results, then how does Tat stimulate HIV-1 transcription? The same question arose from the results by Zhang *et al.* (41). As those authors discussed, we can argue that the finding that HIV-1-infected cells accumulate short transcripts beyond +60 nucleotides in length demonstrate a low basal level transcription from the HIV-1 promoter. The incomplete block to HIV-1 transcription elongation may allow limited TAR formation and Tat expression, which could then recruit P-TEFb complex and release the paused RNAPII. Inducible factors, such as NF- κ B, may contribute to the viral gene activation. As also suggested by Zhang *et al.* (41), an alternative mechanism is possible; Tat and P-TEFb are recruited to the HIV-1 promoter by interacting with components of the pre-initiation complex, which has been reported from several independent investigators including ourselves (42–45), and this might contribute to overcoming the block to elongation occurring downstream from the start site.

Our experiments were also designed to investigate whether P-TEFb was an essential elongation factor for the human *c-myc* gene. We have described a reproducible *in vitro* transcription/elongation assay using HeLa nuclear extracts that shows premature pausing of transcription complexes assembled on the *c-myc* promoter as a function of the amount of template. This suggested that a factor(s) essential for efficient transcript elongation was limiting in the extract. We suspected that this factor(s) was P-TEFb, which was first identified as a complex that was critical for overcoming an early block to transcriptional elongation (29). This hypothesis was supported by the fact that HIV-1 Tat, which depends on P-TEFb to activate, stimulates production of full-length transcripts when located at the vicinities of the start site of transcription at the *c-myc* promoter (Fig. 2C), a result that expands similar observations (46). We demonstrated an essential role for P-TEFb in the transcriptional elongation of *c-myc* gene and located CDK9 in the PICs assembled on the *c-myc* promoter *in vitro*. We have also demonstrated the binding of P-TEFb to the *c-myc* promoter *in vivo* by chromatin immunoprecipitation (Fig. 5B). This observation raises the question of how cellular promoters that are regulated by RNAPII pausing recruit P-TEFb.

Different mechanisms have been postulated for P-TEFb recruitment to transcription complexes. Some specific co-activators, DNA- and RNA-bound activators and chromatin-bound activators, have been proposed to mediate the recruitment of P-TEFb to genes (47). However, very little is known about the promoter sequences that mediate the incorporation of P-TEFb to transcription units. Our results strongly suggest that the RNAPII transcription complex that assembles on a proper TATA-box sequence mediates recruitment of P-TEFb. We have found that P-TEFb is present only in PICs formed on the HIV-1 promoter with a canonical TATA-box sequence. Taking into account that the HIV-1 core promoter region also contains an initiator element (48, 49), this result suggests that P-TEFb is recruited to the HIV-1 promoter through interactions with a TATA-box dependent and Inr-independent transcription complex. The critical requirement of the TATA-box is also suggested by the fact that P-TEFb complex is not present in PICs formed using the TdT promoter (Fig. 4B). Finally, TATA-box mutant HIV-1 and *c-myc* templates are unresponsive to GAL4-CDK9 activation (Fig. 6), which suggests a critical role of this sequence in assembling a functional transcription complex responsive to the activator *in vivo*. In the experimental system used in this work, changes in HIV-1 TATA modulated the magnitude of CDK9-induced transcription but had a much smaller influence on basal transcription (Table 1). Several authors have shown the importance of TBP for TATA-dependent and TATA-independent transcription by all three nuclear polymerases. Recruitment of TBP to regions lacking a consensus TATA box may be possible by (i) the direct binding of TBP to low affinity non-consensus binding sites in the promoter region, (ii) the tethering of TBP by upstream promoter-bound activators, (iii) the interaction of TBP with sequence-specific initiator-binding proteins, and (iv) the tethering of TBP by TBP-associated factors. In the case of the HIV-1 promoter, the core region contains a nonconventional initiator element overlapping the transcriptional start site that is essential for promoter activity (48). Adding further complexity to the LTR-driven transcription, the region between the TATA-box and the start site of transcription and the promoter-proximal element called IST (inducer of short transcripts) has also been reported to be important for efficient transcription (50, 51). It appears that the HIV-1 LTR has evolved some flexibility in tolerating alternative transcriptional initiating events for its basal transcription. This flexibility may explain why in the HIV-1 LTR the TATA-box sequence is not needed to specify the site of transcriptional initiation (52). It also may explain why the replacement of the HIV-1 TATA sequence with a randomly chosen sequence, a complete deletion of the wild type sequence, or the substitution of the TATA sequence from the SV40 early promoter or with that of the murine leukemia virus greatly reduced Tat-dependent transcriptional activation without affecting the basal promoter activity or the location of the RNA start site in some experimental systems (Refs 16 and 53 and this work). Together, those data reflect a complexity in the activity of the HIV-1 core promoter region that awaits further analysis in well defined systems. Also consistent with our data, it has been recently shown that P-TEFb stimulates transcription complex assembly through recruitment of the TBP and,

surprisingly, in the absence of TBP-associated factors (54). Although the mechanism by which P-TEFb selectively recruits TBP and not TBP-associated factors remains to be elucidated, our data indicate a prominent role for the TATA-box sequence in this recruitment. It will be interesting to learn whether the *c-myc* promoter, which we show is regulated by CDK9, specifies transcription complexes that contain TBP but not TBP-associated factors. In our experiments, we show that alterations in the HIV-1 TATA-box reduced the amount of TBP present into the pre-initiation complexes. Similar levels of TBP were detected associated with transcription complexes assembled on immobilized TdT templates (Fig. 4). Although the role of the TATA-box as a target for TBP binding is firmly established, no studies on PIC assembly have directly monitored the effects of TATA mutations together with the removal of other HIV-1 sequences implicated in transcription. In a seminal study, Ranish *et al.* (55) described that deletion of the yeast HIS4 TATA-box decreased by only 2–4-fold the PIC assembly, therefore suggesting that other elements present at the promoter as well as protein-protein interactions compensate for the TATA-box mutation to permit recruitment of factors to form a stable PIC.

Our data also define the role of transcription factor binding sequences in CDK9-mediated transcriptional activation. In the case of HIV-1, targeted recruitment of CDK9 to the HIV-1 promoter activates transcription when NF- κ B or Sp1 binding sequences are individually mutated. Because both sequences are required for proper P-TEFb activation (20, 56, 57), it is possible that both factors simultaneously cooperate for promoter activation. Interestingly, activation of the initiator construct by GAL4-CDK9 was not significantly improved with the inclusion of NF- κ B and Sp1 binding sequences (Fig. 6), which further supports an essential role of the TATA-box in CDK9 activation. In *c-myc*, mutations in Sp1 and E2F binding sequences partially impaired activation, which suggests a role for those factors in assembling a functional RNAPII transcription complex responsive to GAL4-CDK9.

In summary, our findings complement current views from previous published data and establish an important role for the TATA-box sequence in assembling the P-TEFb-containing transcription complex that activates transcription. Thus, our study suggests a common mechanism of elongation control between *c-myc* and HIV-1 genes. Our data also indicate that upstream activator binding sequences collaborate in the recruitment of elongation-competent transcription complexes at the promoter region. We propose a common mechanism for elongation control at *c-myc* and HIV-1 genes with an essential role for the TATA-box and specific modulator contribution of upstream regulatory sequences, derived from the unique structure of the promoters, to form a composite surface for efficient recruitment of elongation transcriptional complexes.

Acknowledgments—We thank G. Napolitano, L. Lania, K. T. Jeang, E. Muñoz, A. Aranda, and J. Valcárcel for providing reagents, A. Goldstrohm, J. León, and M. A. García-Blanco for critical reading of the manuscript, and Miguel Sánchez-Álvarez and Marta Gutiérrez for useful insights and discussion.

REFERENCES

- Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A. R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43110–43114
- Rosonina, E., Bakowski, M. A., McCracken, S., and Blencowe, B. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 43034–43040
- Kornblihtt, A. R. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 262–268
- Batsche, E., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 22–29
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S., and Handa, H. (1998) *Genes Dev.* **12**, 343–356
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999) *Cell* **97**, 41–51
- Price, D. H. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2629–2634
- Komarnitsky, P., Cho, E. J., and Buratowski, S. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2452–2460
- Cullen, B. R. (1998) *Cell* **93**, 685–692
- Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998) *FASEB J.* **12**, 633–651
- Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M., and Groudine, M. (1992) *Genes Dev.* **6**, 2201–2213
- Krumm, A., Meulia, T., and Groudine, M. (1993) *BioEssays* **15**, 659–665
- Spencer, C. A., and Groudine, M. (1990) *Oncogene* **5**, 777–785
- Cullen, B. R. (1993) *Cell* **73**, 417–420
- Suñé, C., Goldstrohm, A. C., Peng, J., Price, D. H., and Garcia-Blanco, M. A. (2000) *Virology* **274**, 356–366
- Berkhout, B., and Jeang, K. T. (1992) *J. Virol.* **66**, 139–149
- Suñé, C., and Garcia-Blanco, M. A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4719–4728
- Majello, B., De Luca, P., Suske, G., and Lania, L. (1995) *Oncogene* **10**, 1841–1848
- Campanero, M. R., Armstrong, M., and Flemington, E. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8442–8450
- Majello, B., Napolitano, G., Giordano, A., and Lania, L. (1999) *Oncogene* **18**, 4598–4605
- Sánchez-Álvarez, M., Goldstrohm, A. C., Garcia-Blanco, M. A., and Suñé, C. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4998–5014
- Suñé, C., and Garcia-Blanco, M. A. (1995) *J. Virol.* **69**, 3098–3107
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. N., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475–1489
- Lee, J. M., and Greenleaf, A. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 10990–10993
- Harlow, E., and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, pp. 521–523, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- London, L., Keene, R. G., and Landick, R. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4599–4615
- Battey, J., Moulding, C., Taub, R., Murphy, W., Stewart, T., Potter, H., Lenoir, G., and Leder, P. (1983) *Cell* **34**, 779–787
- Marciniak, R. A., Calnan, B. J., Frankel, A. D., and Sharp, P. A. (1990) *Cell* **63**, 791–802
- Marshall, N. F., and Price, D. H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12335–12338
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B., and Price, D. H. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2622–2632
- Mancebo, H. S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., and Flores, O. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2633–2644
- Ping, Y. H., and Rana, T. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7399–7404
- Smale, S. T., and Baltimore, D. (1989) *Cell* **57**, 103–113
- Sims, R. J., III, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004) *Genes Dev.* **18**, 2437–2468
- Chinsky, J. M., Maa, M. C., Ramamurthy, V., and Kellems, R. E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14561–14565
- Biragyn, A., and Nedospasov, S. A. (1995) *J. Immunol.* **155**, 674–683
- Raschke, E. E., Albert, T., and Eick, D. (1999) *J. Immunol.* **163**, 4375–4382
- Bender, T. P., Thompson, C. B., and Kuehl, W. M. (1987) *Science* **237**, 1473–1476
- Pinaud, S., and Mirkovitch, J. (1998) *J. Mol. Biol.* **280**, 785–798
- McGeady, M. L., Wood, T. G., Maizel, J. V., and Vande Woude, G. F. (1986) *DNA (N. Y.)* **5**, 289–298
- Zhang, Z., Klatt, A., Gilmour, D. S., and Henderson, A. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 16981–16988
- Garcia-Martinez, L. F., Ivanov, D., and Gaynor, R. B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6951–6958
- Suñé, C., Hayashi, T., Liu, Y., Lane, W. S., Young, R. A., and Garcia-Blanco, M. A. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6029–6039
- Jeang, K. T., Xiao, H., and Rich, E. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28837–28840
- Zhou, M., Halanski, M. A., Radonovich, M. F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D. H., and Brady, J. N. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5077–5086
- Wright, S., Lu, X., and Peterlin, B. M. (1994) *J. Mol. Biol.* **243**, 568–573
- Peterlin, B. M., and Price, D. H. (2006) *Mol. Cell* **23**, 297–305
- Zenzie-Gregory, B., Sheridan, P., Jones, K. A., and Smale, S. T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15823–15832
- Rittner, K., Churcher, M. J., Gait, M. J., and Karn, J. (1995) *J. Mol. Biol.* **248**, 562–580
- Zeichner, S. L., Kim, J. Y., and Alwine, J. C. (1991) *J. Virol.* **65**, 2436–2444
- Ratnasabapathy, R., Sheldon, M., Johal, L., and Hernandez, N. (1990) *Genes Dev.* **4**, 2061–2074
- Bielinska, A., Krasnow, S., and Nabel, G. J. (1989) *J. Virol.* **63**, 4097–4100
- Olsen, H. S., and Rosen, C. A. (1992) *J. Virol.* **66**, 5594–5597
- Raha, T., Cheng, S. W., and Green, M. R. (2005) *PLoS Biol* **3**, e44
- Ranish, J. A., Yudkovsky, N., and Hahn, S. (1999) *Genes Dev.* **13**, 49–63
- Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B. M. (2001) *Mol. Cell* **8**, 327–337
- Yedavalli, V. S., Benkirane, M., and Jeang, K. T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 6404–6410

