



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos de regulación de la expresión de la exonucleasa TREX2

Diana Lucía Gómez Fernández

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Medicina

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Programa de Doctorat en Biomedicina

**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
LA EXONUCLEASA TREX2**

Tesis Doctoral

Diana Lucía Gómez Fernández

Barcelona, 2015

Memoria presentada por:

Diana Lucía Gómez Fernández
para optar al grado de **Doctora** por la **Universitat de Barcelona**

Tesis realizada bajo la dirección de:

Dra. Concepció Soler
Profesora Agregada
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental
Universitat de Barcelona

y

Dra. Sònia Forcales
Investigadora Associada
Institut de Medicina Predictiva i
Personalitzada del Càncer (IMPPC)

Diana Lucía Gómez Fernández

Dra. Concepció Soler

Dra. Sònia Forcales

-“La diferencia entre el hombre y el mono está en la regulación génica”-.

Leroy Hood.

Dedicado a
la triada más fantabulosa
que conozco,
Álvaro, Olga y Camila.

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido; <i>aminoacids</i>
AP1	Proteína activadora 1; <i>activator protein-1</i>
APS	Amonio persulfato; <i>ammonium persulfate</i>
BCA	Ácido bicinconínico; <i>bicinchoninic acid</i>
BER	Reparación por escisión de bases; <i>base excision repair</i>
BrEt	Bromuro de etidio; <i>ethidium bromide</i>
BSA	Sero albúmina bovina; <i>bovine serum albumin</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario; <i>complementary deoxiribonucleic acid</i>
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina; <i>chromatin immunoprecipitation</i>
CIP	Fosfatasa intestinal de ternera; <i>calf intestinal phosphatase</i>
CRE	Elemento de respuesta a cAMP; <i>cAMP response element</i>
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP; <i>cAMP response element-binding protein</i>
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno; <i>7, 12-dimethylbenz(a)anthracene</i>
DMEM	Medio esencial mínimo modificado; <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido; <i>dimethylsulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico; <i>deoxiribonucleic acid</i>
DPE	Elemento ubicado abajo del promotor; <i>downstream core promotor element</i>
DSBR	Reparación de roturas de doble cadena; <i>double Strand brake repair</i>
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena; <i>double Strand deoxiribonucleic acid</i>
EF-PRR	Reparación post- replicativa libre de errores; <i>Error-free post-replication repair</i>
Elf5	<i>E74-like factor 5</i>
ES	Células madre embrionarias; <i>Embryonic Stem cells</i>
ETS	<i>E26-Transformation-Specific</i>
FBS	Suero fetal bovino; <i>fetal bovine serum</i>
FCS:	Suero fetal de ternera; <i>fetal calf serum</i>
Fra-2	<i>Fos-Related antigen 2</i>
GATA	<i>Globin transcription factor</i>
GFP	Proteína verde fluorescente; <i>green fluorescent protein</i>
HAUS7	<i>Augmin-like complex subunit 7</i>
HNSCC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello; <i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa; <i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase</i>
HR	Recombinación homóloga; <i>Homologous recombination</i>
HRP	Peroxidasa de rábano; <i>horse radish peroxidase</i>

ICL	Entrecruzamiento de cadenas; <i>interstrands crosslinks</i>
ICQ	Inmunocitoquímica; <i>immunocytochemistry</i>
IHQ	Inmunohistoquímica; <i>immunohistochemistry</i>
Inr	Elemento iniciador; <i>initiator element</i>
IRS	Capa interna del folículo piloso; <i>inner root sheath</i>
K	Queratina; <i>keratin</i>
KO	Knockout; <i>knockout</i>
MBP	Proteína de unión a la maltosa; <i>maltose binding protein</i>
ml	Mililitros; mililitres
MMR	Reparación de bases mal apareadas; <i>mismatch repair</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero; <i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTE	Motivo elemento diez; <i>Motif ten element</i>
Na₃VO₄	Ortovanadato de sodio; <i>sodium orthovanadate</i>
NaF	Fluoruro de sodio; <i>sodium fluoride</i>
NCBI	Centro Nacional para la información Biotecnológica; <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	Reparación por escisión de nucleótido; <i>Nucleotide excision repair</i>
NHEJ	Unión de extremos no-homólogos; <i>non-homologous end joining</i>
NHEK	Queratinocitos humanos epidérmicos normales; <i>normal human epidermal keratinocytes</i>
PBS	Buffer fosfato salino; <i>phosphate buffered saline</i>
PDVF	Di-fluoruro de polivinilideno; <i>polyvinylidene fluoride</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo; <i>phenylmethylsulfonylfluoride</i>
Polζ	Polimerasa zeta; <i>polymerase zeta</i>
Polη	Polimerasa eta; <i>polymerase eta</i>
Pre-C	Preconfluentes; <i>preconfluent</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RACE	Amplificación rápida de extremos 5'-3' de cDNA; <i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ácido ribonucleico; <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Revoluciones por minuto; <i>revolution per minute</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal; <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	Transcripción reversa, <i>reverse transcription</i>
SCC	Carcinoma de las células escamosas; <i>squamous cell carcinoma</i>
Seg	Segundos; <i>seconds</i>
SEM	Error estándar de la media; <i>standard error of the mean</i>
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido; <i>single nucleotide polymorphism</i>
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena simple; <i>single strand deoxiribonucleic acid</i>

TAP	Pirofosfatasa ácida de tabaco; <i>tobacco acid pyrophosphatase</i>
TFBS	Sitio de unión de factores de transcripción; <i>transcription factor binding site</i>
TREX2	Exonucleasa 2 reparadora de extremos tres prima (3'); <i>three-prime repair exonuclease 2</i>
tRNA	RNA de transferencia; <i>transfer ribonucleic acid</i>
TSS	Sitio de inicio de la transcripción; <i>transcription start site</i>
UTR	Región no traducida; <i>untranslated region</i>
UV	Ultravioleta; <i>ultraviolet</i>
wt	Silvestre; <i>wild-type</i>
YFP	Proteína fluorescente amarilla; <i>yellow fluorescent protein</i>

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Síntesis del DNA.....	3
1.2 Degradación del DNA.....	4
1.3 Reparación del DNA.....	5
1.3.1 Reparación por escisión de bases (BER, <i>Base Excision Repair</i>).....	6
1.3.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER, <i>Nucleotide Excision Repair</i>).....	7
1.3.3 Reparación de bases no apareadas (MMR, <i>Mismatch Repair</i>).....	7
1.3.4 Reparación de cortes de doble cadena (DSBR, <i>Double Strand Break Repair</i>) por Recombinación Homóloga (HR, <i>Homologous Recombination</i>) o por Unión de extremos no homólogos (NHEJ, <i>Non-Homologous End Joining</i>).....	7
1.3.5 Reparación de uniones intercatenarias (ICLR, <i>Interstrand crosslink repair</i>).....	8
1.3.6 Reparación post-replicativa (PRR, <i>Post-replication repair</i>).....	8
1.4 Exonucleasas en la reparación del DNA y en el mantenimiento de la estabilidad genómica.....	9
1.5 TREX2 (<i>Three-Prime Repair Exonuclease 2</i>).....	12
1.5.1 Características bioquímicas y estructurales de TREX2.....	12
1.5.2 Expresión de TREX2.....	15
1.5.3 Funciones y mecanismos de TREX2.....	17
1.5.4 El gen <i>TREX2</i>	19
1.6 La Piel.....	21
1.6.1 El proceso de diferenciación.....	25
1.6.2 La piel humana y de ratón.....	27
1.7 Regulación de la expresión génica.....	28
1.7.1 Tipos de promotores.....	30
1.7.2 Regulación epigenética.....	32
1.7.3 Factores de transcripción implicados en la expresión específica en queratinocitos.....	34
1.7.3.1 La familia de proteínas AP1.....	35
1.7.3.2 La familia de proteínas ETS.....	38
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Cultivos celulares.....	47
3.1.1 Cultivos de líneas celulares.....	47
3.1.2 Cultivo primario de queratinocitos humanos.....	48
3.1.3 Cultivo primario de queratinocitos de ratón.....	48
3.1.4 Tripsinización y congelación de células.....	49
3.2 <i>Knockdown</i> de ELF5.....	50

3.3 Muestras de queratinocitos <i>knockdown</i> de c-Fos, Jun-B, Fra-2 y c-Jun.....	51
3.4 Análisis del DNA.....	52
3.4.1 Extracción y purificación de DNA.....	53
3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.....	53
3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	54
3.4.4 Secuenciación automática.....	55
3.4.5 Genotipaje del gen <i>TREX2</i>	55
3.5 Análisis del RNA.....	56
3.5.1 Purificación de RNA y transcripción reversa (RT).....	56
3.5.2 Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR).....	57
3.6 Análisis de la expresión proteica.....	58
3.6.1 Extractos totales.....	58
3.6.2 Cuantificación de proteínas.....	59
3.6.3 Preparación de las muestras para western blot.....	60
3.6.4 Separación de proteínas mediante SDS-PAGE.....	60
3.6.5 Transferencia de proteínas a soportes membranosos.....	61
3.6.6 Bloqueo de las membranas.....	62
3.6.7 Detección de proteínas con anticuerpos específicos.....	62
3.6.8 Detección por quimioluminiscencia.....	63
3.7 Inmunotinción.....	64
3.8 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	66
3.8.1 <i>Crosslinking</i> del DNA.....	66
3.8.2 Sonicación.....	68
3.8.3 <i>Reverse-crosslinking</i> del DNA.....	68
3.8.4 Inmunoprecipitación.....	69
3.8.5 Elución de los complejos DNA/proteína/anticuerpo.....	70
3.9 Análisis por amplificación de extremos 5´ y 3´ de DNA complementario (RACE).....	70
3.10 Generación de construcciones plasmídicas.....	71
3.10.1 Amplificación por PCR.....	72
3.10.2 Subclonaje de fragmentos de DNA en el vector pSTBlueI.....	72
3.10.3 Transformación bacteriana.....	73
3.10.4 Extracción y purificación de DNA plasmídico a pequeña escala (Miniprep).....	74
3.10.5 Obtención de bacterias competentes.....	74
3.10.6 Digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción.....	75
3.10.7 Extracción y purificación de DNA plasmídico a gran escala (Maxiprep).....	76
3.10.8 Defosforilación de los extremos 5´ y 3´ del vector de expresión.....	76
3.10.9 Subclonaje de fragmentos de DNA en vectores de expresión.....	76
3.10.10 Mutagénesis dirigida.....	79
3.11 Expresión y purificación de la proteína recombinante MBP-TREX2.....	82
3.11.1 Crecimiento de MBP-TREX2.....	82
3.11.2 Solubilización y purificación de MBP-TREX2.....	83

3.11.3	Tinción de geles con <i>Comassie</i>	83
3.12	Análisis actividad promotor.....	84
3.12.1	Actividad Luciferasa.....	85
3.12.2	Actividad β -galactosidasa.....	85
3.13	Análisis de la metilación del promotor.....	86
3.14	Ensayos exonucleasa.....	87
3.14.1	Ensayos de la actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA.....	87
3.14.2	Ensayos de la actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA y ssDNA.....	88
3.15	Análisis estadísticos.....	89
4.	RESULTADOS.....	91
4.1	Expresión de TREX2.....	93
4.1.1	Expresión de TREX2 en piel.....	93
4.1.2	Expresión de TREX2 en queratinocitos.....	96
4.1.3	Localización subcelular de TREX2.....	105
4.1.4	Actividad exonucleasa de las isoformas de TREX2.....	109
4.2	Caracterización del promotor del gen <i>TREX2</i>	113
4.2.1	Identificación de los inicios transcripcionales del gen <i>TREX2</i>	113
4.2.2	Análisis <i>in silico</i> de la región promotora putativa del gen <i>TREX2</i>	116
4.2.3	Análisis de la actividad transcripcional del promotor del gen <i>Trex2</i> murino.....	123
4.2.4	Caracterización de los sitios de unión de los factores identificados <i>in silico</i> en la regulación de la transcripción del gen <i>Trex2</i> murino.....	128
4.2.4.1	Análisis de la relevancia del factor de transcripción Elf5 en la expresión de <i>Trex2</i>	131
4.2.4.2	Análisis de la relevancia de AP1 en la expresión de <i>Trex2</i>	135
4.3	Regulación epigenética del gen <i>TREX2</i>	140
4.4	Variabilidad genética de <i>TREX2</i> en tumores escamosos.....	150
5.	DISCUSIÓN.....	155
5.1	Expresión, localización y actividad de la proteína TREX2.....	157
5.2	Regulación del gen <i>TREX2</i>	162
5.3	Alteraciones de <i>TREX2</i> en tumores.....	169
6.	CONCLUSIONES.....	173
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	177
8.	ANEXOS.....	191
A.	<i>Primers</i>	193
B.	Sondas.....	198
9.	AGRADECIMIENTOS.....	199

ÍNDICE DE TABLAS

Página

1. INTRODUCCIÓN

Tabla I1. Genes esenciales en los mecanismos de reparación principales.....	7
Tabla I2. Tipos de promotores.....	31
Tabla I3. Funciones de las proteínas Jun y Fos.....	38

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M1. Líneas celulares.....	50
Tabla M2. Inhibidores de proteasas y fosfatasas.....	59
Tabla M3. Soluciones utilizadas para la preparación de un gel para western blot.....	61
Tabla M4. Listado de anticuerpos primarios.....	63
Tabla M5. Construcciones plasmídicas.....	81

4. RESULTADOS

Tabla R1. Inicios y finales de transcripción del gen <i>TREX2</i> humano y murino.....	116
Tabla R2. Principales TFBS de miembros de las familias AP1, AP-2, ETS, CREB y GATA en la secuencia <i>upstream</i> del gen <i>TREX2</i> de ratón y humano.....	122
Tabla R3. Variaciones genéticas y frecuencias del gen <i>TREX2</i> humano en pacientes con HNSCC y en individuos sanos.....	153
Tabla R4. Frecuencia de las mutaciones de <i>TREX2</i> en HNSCC y controles.....	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. INTRODUCCIÓN

Figura I1. Principales agentes nocivos, tipos de daño en el DNA y mecanismos de reparación.....	6
Figura I2. Vías del metabolismo del DNA que involucran exonucleasas.....	10
Figura I3. Estructura tridimensional dimérica de TREX2 y su sitio activo.....	13
Figura I4. Modelo de unión entre TREX2 y el DNA.....	15
Figura I5. Expresión de <i>Trex2</i> en ratón.....	16
Figura I6. Carcinogénesis en ratones wt y <i>Trex2</i> ^{-/-}	18
Figura I7. Gen y transcritos de <i>TREX2</i>	21
Figura I8. Características de la piel humana y de ratón.....	24
Figura I9. Representación esquemática de las diversas fases del crecimiento del pelo en ratón.....	26
Figura I10. Esquema de la región reguladora típica de un gen.....	32
Figura I11. AP1 se compone de las proteínas Jun y Fos.....	36
Figura I12. Expresión de Fos y Jun en la epidermis humana.....	37

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. Clonaje del promotor de <i>Trex2</i> murino.....	80
Figura M2. Efecto del tratamiento con bisulfito.....	87

4. RESULTADOS

Figura R1. Inmunodetección de TREX2 en piel humana.....	93
Figura R2. Inmunodetección de TREX2 en piel murina.....	95
Figura R3. Expresión de <i>Trex2</i> en la piel durante las diferentes fases de crecimiento del pelo.....	96
Figura R4. Expresión de TREX2, Involucrina, Loricrina y K10 en queratinocitos de ratón wt y <i>Trex2</i> ^{-/-}	99
Figura R5. Expresión de TREX2, Involucrina y K10 en queratinocitos humanos.....	102
Figura R6. Niveles de mRNA y proteína de las isoformas L1 y S de TREX2 en piel y células humanas.....	103
Figura R7. Expresión de TREX2 en queratinocitos inmortalizados.....	104
Figura R8. Expresión heteróloga de las proteínas recombinantes de TREX2 en células humanas.....	107
Figura R9. Distribución subcelular de las proteínas recombinantes de TREX2.....	108
Figura R10. Análisis SDS-PAGE de las proteínas de fusión de TREX2 purificadas.....	110

Figura R11. Actividad exonucleasa de las isoformas humanas y murina de TREX2 a diferentes pHs.....	112
Figura R12. Representación de los inicios de transcripción identificados en los transcritos de <i>Trex2</i>	115
Figura R13. Análisis <i>in silico</i> de los TFBS putativos presentes en la región 5' <i>upstream</i> del gen <i>TREX2</i> humano y murino.....	120
Figura R14. Actividad transcripcional del promotor murino de <i>Trex2</i>	126
Figura R15. TFBS en el promotor proximal de <i>Trex2</i> murino.....	127
Figura R16. Análisis comparativo de los TFBS de las familias ETS y AP1 en el promotor murino y humano de <i>TREX2</i>	128
Figura R17. Elementos <i>cis</i> AP1, Elf5 y CREB implicados en la regulación del promotor del gen <i>Trex2</i>	130
Figura R18. El factor de transcripción Elf5 modula la actividad del promotor de <i>Trex2</i> en queratinocitos.....	133
Figura R19. El factor de transcripción AP1 modula la actividad del promotor de <i>Trex2</i>	136
Figura R20. AP1 modula la actividad del promotor de <i>TREX2</i>	138
Figura R21. Regiones ricas en CGs en el gen <i>Trex2</i> murino.....	141
Figura R22. Regiones ricas en CGs del gen <i>TREX2</i> humano.....	144
Figura R23. Análisis de metilación de las dos regiones del gen <i>Trex2</i> de ratón.....	145
Figura R24. Análisis de metilación de las regiones I y II del gen <i>TREX2</i> humano.....	147
Figura R25. Análisis de metilación de de la región III del gen <i>TREX2</i> humano.....	149
Figura R26. SNPs en el gen <i>TREX2</i> encontrados en muestras de pacientes con HNSCC.....	151
Figura R27. Actividad exonucleasa de las variantes de TREX2 wt y mutante.....	152

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síntesis del DNA

Los seres vivos se enfrentan a la difícil tarea de mantener el genoma intacto en procesos celulares como la replicación del DNA (Guo-Min et al., 2008). La incapacidad de replicar el DNA es letal para una célula en crecimiento. Existen dos tipos básicos de síntesis de DNA, el primero consiste en la replicación semiconservativa, en donde las dos cadenas de la molécula parental de DNA se separan sirviendo cada una como molde para la síntesis de una nueva cadena, la molécula parental es entonces reemplazada con dos cadenas hijas, cada una de las cuales tiene una cadena parental y una cadena recién sintetizada. El segundo es la síntesis de DNA por la reacción de reparación, en el cual cuando una cadena de DNA sufre daño, este es eliminado y nuevo material genético se sintetiza para reemplazarlo (Lewin, 2004). De otro lado, los organismos pueden beneficiarse de las mutaciones para generar diversidad, por ejemplo, a lo largo de la evolución o en la hipermutación de los genes de las inmunoglobulinas, lo que indica la necesidad de mantener un balance entre evitar e introducir mutaciones (Sancar et al., 2004; Friedberg & Meira, 2004). De manera que, el mantenimiento de la estabilidad genómica depende en una gran mayoría de la precisión de los mecanismos de reparación que reconocen y eliminan anomalías introducidas en el DNA durante la replicación. Estas anomalías son inducidas por la exposición del DNA a agentes físicos y químicos, ya sean ambientales o intracelulares que introducen de forma directa o indirecta, un amplio rango de modificaciones entre las que se incluyen: radiación ultravioleta, radiación ionizante, rayos X, radicales libres, agentes químicos genotóxicos y errores en la replicación o recombinación del DNA (Dexheimer, 2013).

La enzima que puede sintetizar una nueva cadena de DNA a partir de una cadena molde es la DNA polimerasa. Tanto células procariotas como eucariotas contienen múltiples actividades DNA polimerasa, pero sólo algunas de estas enzimas pueden llevar a cabo la replicación. Son conocidas como DNA polimerasas replicativas y en células eucariotas son: Pol α , Pol β , Pol δ , Pol ϵ y Pol γ . La DNA polimerasa δ y la ϵ por ejemplo, son requeridas para la replicación nuclear; a la DNA polimerasa α le concierne el *priming* o inicio de la replicación. Otras DNA polimerasas como la β y también la ϵ están involucradas

en la reparación del DNA nuclear dañado, o la Pol γ en la replicación del DNA mitocondrial (Lewin, 2004). Las demás DNA polimerasas están involucradas en roles complementarios en la replicación o participan en la replicación por reparación. Todas las DNA polimerasas comparten el mismo fundamento de actividad sintética; cada una puede extender una cadena de DNA adicionando un nucleótido a la vez a un extremo 3'-OH, la elección del nucleótido a añadir está dictada por el apareamiento de bases con la cadena molde. Algunas DNA polimerasas funcionan como enzimas independientes y otras están incorporadas en grandes complejos de proteínas.

1.2 Degradación del DNA

Al igual que para la síntesis de DNA, la degradación de ácidos nucleicos también requiere enzimas específicas como las nucleasas. Estas enzimas producen un corte en un puente fosfodiéster entre el azúcar y el grupo fosfato del DNA. Están divididas usualmente en endonucleasas; las cuales tienen la capacidad de hidrolizar el esqueleto azúcar-fosfato dentro de la cadena sin necesidad de un extremo libre de DNA; y las exonucleasas que catalizan la escisión de nucleósidos monofosfatos (dNMPs) hidrolizando la cadena de DNA ya sea por el extremo 3' o 5' (Shevelev & Hübscher, 2002) siendo necesario un extremo libre de DNA. Tras el corte quedará un extremo fosfato 5'-terminal y otro grupo hidroxilo 3'-terminal.

Las exonucleasas 3'-5' pueden procesar extremos del DNA en muchas vías de reparación de las células humanas. Pueden actuar como correctoras de errores, actividad que ha sido denominada *proofreading*, eliminando nucleótidos del extremo 3' cuando las bases nitrogenadas no están correctamente apareadas o cuando hay nucleótidos modificados, fragmentados o normales. Esto es crucial para la generación del extremo 3' terminal apropiado para varios procesos de pasos subsiguientes (Shevelev & Hübscher, 2002). Las exonucleasas 3'-5' pueden actuar en múltiples vías metabólicas del DNA, que van desde la síntesis y reparación a la degradación y, de esta manera desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la prevención del

cáncer, así como en el envejecimiento, anormalidades inmunológicas y trastornos hereditarios (Kavanagh et al., 2008; Mason & Cox, 2012).

1.3 Reparación del DNA

Para asegurarse de la fidelidad en la replicación y herencia del material genético, la célula ha evolucionado con la capacidad de detectar y propagar la señal inicial de daño en el DNA y provocar respuestas celulares que incluyen paro en el ciclo celular, senescencia, apoptosis (Huen & Chen 2008; Friedberg, 2008; Tang et al., 2012) o cambios neoplásicos que conducen al envejecimiento del organismo (Mason & Cox, 2012). La desregulación de los componentes involucrados en la respuesta al daño del DNA y defectos en genes claves en los mecanismos de reparación contribuyen a la inestabilidad genómica y pueden dar lugar a carcinogénesis, inmunodeficiencias o una respuesta inmunitaria alterada (Friedberg & Meira 2004; Rao & Yamada, 2013). Los efectos a corto plazo del daño en el DNA dan lugar a una parada transitoria del ciclo celular (fases G1, S, G2 o M) para permitir la reparación de las lesiones causadas antes de convertirse en mutaciones permanentes, o bien, si el daño es demasiado elevado ocasionan muerte celular o apoptosis. Los efectos a largo plazo están promovidos por mutaciones irreversibles (mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas) que contribuyen a la oncogénesis (Khare & Eckert, 2002; Kastan & Bartek, 2004; Bernheim, 2010).

Para hacer frente a los efectos del daño al DNA, los organismos han desarrollado una serie de sistemas de reparación para mantener la integridad génica (Hoeijmakers, 2001; Dexheimer, 2013). La figura I1 resume los principales agentes nocivos que pueden activar diferentes mecanismos de reparación de la célula. Las células de mamíferos utilizan cinco diferentes vías de reparación del DNA principales, en función del tipo de lesión que se haya producido (Helleday et al., 2008; Dexheimer, 2013). La desregulación de los mecanismos de reparación del DNA puede contribuir a la iniciación y progresión del cáncer (Dexheimer, 2013). Como referencia, la Tabla I1 recapitula los principales genes asociados con cada mecanismo de reparación, entre los que se encuentran algunos que codifican para exonucleasas.

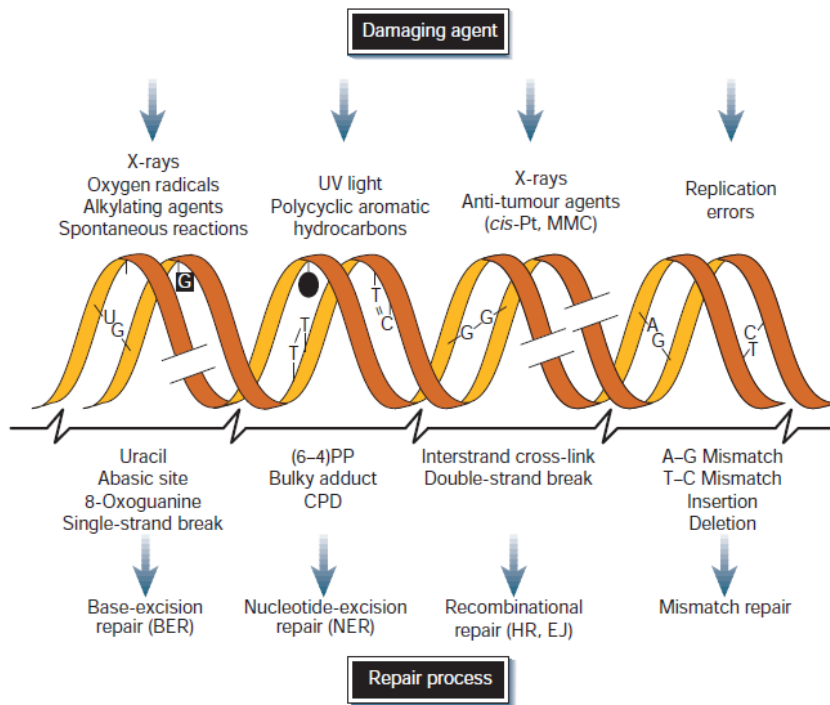


Figura 11. Principales agentes nocivos, tipos de daño en el DNA y mecanismos de reparación. Agentes comunes de daño en el DNA (arriba), lesiones inducidas por estos agentes (medio), principales mecanismos de reparación (abajo). *X rays*, rayos X; *Oxygen radicals*, radicales de oxígeno; *Alkylating agents*, agentes alquilantes; *Spontaneous reactions*, reacciones espontáneas; *UV light*, luz UV; *Polycyclic aromatic hydrocarbons*, policíclicos aromáticos; *Hydrocarbons*, hidrocarburos; *Anti-tumour agents*, agentes antitumorales; *cis-Pt*, cisplatina; *MMC*, mitomicina C; *Replication errors*, errores de replicación; *Uracil*, uracilo; *Abasic site*, sitio abásico; *8-Oxoguanine*, 8-Oxoguanina; *Single strand break*, corte cadena simple; *(6-4)PP*; 6-4 fotoproducto; *CPD*, dímero de pirimidina tipo ciclobutano; *Interstrand cross-link*, unión intercatenaria; *Double-strand break*, corte de cadena doble; *Mismatch*, base no apareada; *Insertion*, inserción; *Deletion*, delección; *BER*, Reparación por escisión de bases; *NER*, Reparación por escisión de nucleótidos; *HR*, recombinación homóloga; *EJ*, unión de extremos; *Mismatch repair*, reparación de bases no apareadas. Fuente: Hoeijmakers (2001).

1.3.1 Reparación por escisión de bases (BER, *Base Excision Repair*): Vía que permite reparar lesiones producidas principalmente por el metabolismo celular como: metilaciones, desaminaciones, hidroxilaciones o rupturas simples del DNA producidas por la acción de rayos X o radicales libres del oxígeno (Almeida & Sobol, 2007).

1.3.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*): Reparar distorsiones voluminosas en la doble hélice como entrecruzamientos (*crosslinks*) entre las cadenas de DNA, surgidas de fotolesiones inducidas por luz ultravioleta (UV) o por la exposición a genotóxicos. Este sistema está conformado por dos sub-vías, la TCR-NER (*Transcriptional-Coupled Repair*) que se activa dependiendo de si el daño ha ocurrido durante la transcripción o la GGR-NER (*Global Genomic Repair*) si el daño se produce en ausencia de replicación (Wood et al., 2001; Li et al., 2011).

1.3.3 Reparación de bases no apareadas (MMR, *Mismatch Repair*): Corrige errores ocasionales originados durante la replicación del DNA y heterologías formadas durante la recombinación, concretamente *loops* insertados/delecionados y nucleótidos mal apareados por la DNA polimerasa durante la replicación (Lyer et al., 2006).

Tabla I1. Genes esenciales en los mecanismos de reparación principales. Fuente: Dexheimer (2013).

BER	DNA glicosilasa, APE1, XRCC1, PNKP, Tdp1, APTX, DNA polimerasa β , FEN1, DNA polimerasa δ o ϵ , PCNA-RFC, PARP
MMR	MutS α (MSH2-MSH6), MutS β (MSH2-MSH3), MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-PMS2), MutLy (MLH1-MLH3), Exo1, PCNA-RFC
NER	XPC-Rad23B-CEN2, UV-DDB (DDB1-XPE), CSA, CSB, TFIIH, XPB, XPD, XPA, RPA, XPG, ERCC1-XPF, DNA polimerasa δ or ϵ
HR	Mre11-Rad50-Nbs1, CtIP, RPA, Rad51, Rad52, BRCA1, BRCA2, Exo1, BLM-TopIII α , GEN1-Yen1, Slx1-Slx4, Mus81/Eme1
NHEJ	Ku70-Ku80, DNA-PKc, XRCC4-DNA ligasa IV, XLF

1.3.4 Reparación de cortes de doble cadena (DSBR, *Double Strand Break Repair*) por Recombinación Homóloga (HR, *Homologous Recombination*) o por Unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*): Consiste en la unión de la doble cadena de DNA cuando se produce una ruptura de las dos cadenas (DSB). La vía HR utiliza la cadena homóloga como patrón para reparar el DSB, evitando la introducción de errores en la secuencia. La vía NHEJ permite la unión de las cadenas sin necesidad de homología

entre las secuencias de DNA (Hoeijmakers, 2001). Los DSBs son la forma más letal de daño para las células eucariotas, si esta lesión no es apropiadamente reparada puede conducir a la apoptosis, inestabilidad genómica o cáncer. Por ejemplo, pueden dar lugar a material genético acéntrico que en la siguiente división no podrá ser arrastrado a uno de los dos polos del huso mitótico durante la anafase. Este material genético "náufrago" es envuelto por la membrana nuclear y se queda en forma de micronúcleo en el citoplasma de una de las dos células hijas. Si hay problemas en la formación del huso o en las proteínas del centrosoma los micronúcleos pueden contener cromosomas enteros (Fenech et al., 2011). Los micronúcleos son marcadores de exposición a genotóxicos, indican inestabilidad cromosómica y están presentes en elevada frecuencia en tumores. La radiación UV que genera directa o indirectamente DSB, es un agente inductor de micronúcleos y de inestabilidad cromosómica (Wischermann, 2008).

1.3.5 Reparación de uniones intercatenarias (ICLR, *Interstrand crosslink repair*):

Consiste en la reparación de enlaces químicos entre las bases de cadenas opuestas de la doble hélice de DNA. Estas uniones intercatenarias bloquean el progreso de la horquilla de replicación causando estancamiento, por lo que deben ser removidas para permitir la proliferación celular y supervivencia (Mason & Cox, 2012).

1.3.6 Reparación post-replicativa (PRR, *Post-replication repair*): Además de los mencionados mecanismos de reparación, la célula posee rutas de tolerancia al daño, también extremadamente importantes para el mantenimiento de la integridad genómica y la supervivencia celular frente a los diferentes tipos de lesiones que bloquean el avance de las horquillas de replicación. En estas situaciones, las rutas de tolerancia permiten a las horquillas atravesar la lesión sin tener que eliminarla de la cadena molde, evitando la formación de DSBs por colapso de la horquilla, que desde el punto de vista de la estabilidad genómica puede ser preferible (Andersen et al., 2008). Dentro de estos mecanismos se distinguen dos alternativas que se encuentran bajo el control de Rad6/Rad18.

- **Vía de síntesis a través de la lesión (TLS, *Translesion Synthesis*):** La tolerancia al daño por la ruta TLS la realizan polimerasas especiales conservadas evolutivamente que, a diferencia de las polimerasas replicativas, presentan sitios catalíticos más relajados que pueden acomodar lesiones de la cadena molde sin quedar bloqueadas en el momento de catalizar la incorporación del nuevo nucleótido. Estas polimerasas se caracterizan por sintetizar DNA con tasas de error mucho más altas que las replicativas (Kunkel, 2004; Prakash et al., 2005). Al igual que las polimerasas replicativas, las polimerasas de la ruta TLS utilizan a PCNA como plataforma central al cual se unen para tener acceso al replisoma detenido en la lesión y catalizar la síntesis de DNA (Zhuang et al., 2008).
- **Vía de tolerancia al daño libre de errores o de cambio de molde (EF-PRR, *Error free post-replication repair o template switch*):** Esta ruta esquiva las incongruencias del DNA que impiden la replicación, permitiendo el paso de la horquilla a través de la lesión del DNA sin repararla de la cadena molde (Hasty & Montagna, 2014), evitando así la formación de DSBs por colapso de la horquilla (Andersen et al., 2008). La ruta se beneficia de la información no dañada y recién sintetizada de la cromátida hermana para restaurar sin mutaciones la secuencia de la cadena opuesta a la lesión (Smirnova & Klein, 2003).

1.4 Exonucleasas en la reparación del DNA y en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

Entre los genes que participan en los diferentes mecanismos de reparación se encuentran las exonucleasas 3'-5'. Las exonucleasas juegan un papel importante en los complejos de reparación, eliminando los nucleótidos dañados o mal apareados, además reconocen productos intermediarios de la replicación y la recombinación que facilitan los pasos sucesivos para la hidrólisis de las cadenas de DNA (Figura 12). Las propiedades principales requeridas para la actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores o *proofreading* radican en: que actúe unidireccionalmente sobre el extremo 3', que actúe de forma no procesiva sobre el DNA, que elimine los dNTPs de una cadena sencilla de DNA

(ssDNA) y que interactúe funcionalmente con alguna polimerasa para aumentar la fidelidad de la síntesis de DNA (Kunkel, 1988).

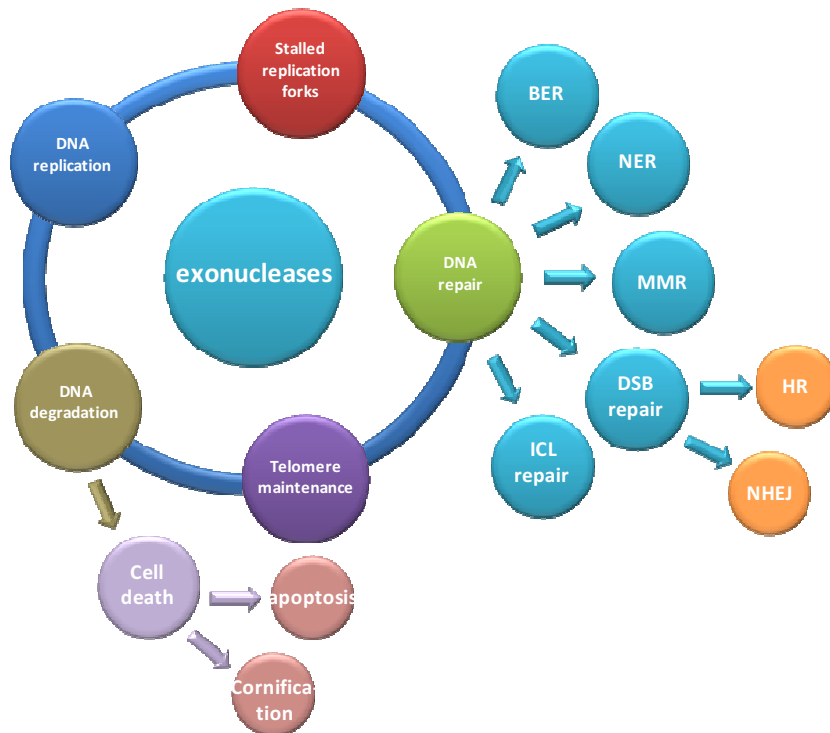


Figura 12. Vías del metabolismo del DNA que involucran exonucleasas. Las exonucleasas son fundamentales para muchos procesos del metabolismo del DNA. *Exonucleases*, exonucleasas; *Stalled replication fork*, horquilla de replicación estancada; *DNA repair*; reparación del DNA; *Telomere maintenance*, mantenimiento de telómeros; *DNA degradation*; degradación del DNA; *DNA replication*, replicación del DNA; *Cell death*, muerte celular; *Cornification*, cornificación; BER, *reparación por escisión de bases*; NER, *reparación por escisión de nucleótidos*; MMR, *reparación de bases no apareadas*; DSB repair, *reparación de cortes de doble cadena*; ICL *repair*, *reparación de uniones intercatenarias*; HR, *recombinación homóloga*; NHEJ, *unión de extremos no homólogos*. Adaptado de Mason & Cox (2012).

Diversos genes que codifican proteínas con actividad exonucleasa han sido identificados en procariontes y eucariotes (Shevelev & Hübscher, 2002; Marti & Fleck, 2004; Mason & Cox, 2012). En mamíferos, en comparación con las dos únicas exonucleasas 5'-3' identificadas hasta el momento (FEN1 y EXO1), se han descrito numerosos genes con actividad exonucleasa 3'-5' autónoma, asociada a polimerasas o a proteínas multifuncionales (helicasas y supresores de tumores) que codifican para proteínas como:

endonucleasas de escisión de bases apurínicas/apirimidínicas APE1 y APE2; proteínas de reparación de rupturas dobles de DNA, MRE11; los supresores de tumores como NM23-H1 y el factor de transcripción p53; helicasas WRN y Dna2; y proteínas de control del ciclo celular como RAD9 y RAD1 (Shevelev & Hübscher, 2002; Mason & Cox, 2012). Además se han identificado dos proteínas, TREX1 y TREX2 (*Three Prime Repair Exonuclease*) que tienen como única actividad enzimática la actividad exonucleasa 3'-5'.

De las 14 polimerasas activas en eucariotas sólo tres (Pol δ , Pol ϵ y Pol γ) tienen actividad *proofreading* intrínseca (Burgers et al., 2001). La pérdida de la actividad *proofreading* de la mayoría de las DNA polimerasas replicativas es letal en *E. coli* (Fijalkowska & Schaaper, 1996; Shevelev, 2002), en las levaduras deriva en un alto porcentaje de mutaciones y defectos en la reparación (Morrison et al., 1993). En ratón la pérdida de la actividad exonucleasa intrínseca de la polimerasa δ predispone al desarrollo del cáncer (Goldsby et al., 2001, 2002) y la inactivación de la polimerasa γ necesaria para la replicación mitocondrial produce un fenotipo mutante mitocondrial (Trifunovic et al., 2004). Aunque la actividad correctora de errores puede ser suficiente para una buena replicación en condiciones normales, en condiciones de estrés, otras exonucleasas con la misma actividad pueden tener un papel relevante y ayudar (Shevelev & Hübscher, 2002; Marti & Fleck, 2004; Mason & Cox, 2012). Concretamente, entre las exonucleasas con actividad 3'-5' se ha descrito que mutaciones en el gen TREX1 humano están relacionadas con el síndrome Aicardi-Goutières (Yang et al., 2007) con síntomas de la ataxia telangiectasia (síndrome de Louis-Barr) (Lindahl et al., 2009) y lupus eritematoso sistémico (SLE) (Namjou et al., 2011; Grieves et al., 2015), entre otros; pero no con una predisposición al cáncer. Las exonucleasas WRN y EXO1 participan en la resolución de las estructuras aberrantes para permitir el reinicio de la horquilla de replicación. El mantenimiento de los telómeros requiere también la acción de las exonucleasas, posiblemente utilizando las mismas nucleasas WRN y EXO1. Recientemente, se ha implicado TREX2 en la vía EF-PRR (Hasty & Montagna, 2014) y en la degradación del DNA, durante los procesos de muerte celular en condiciones de estrés celular (Parra et al.,

2009; Manils et al., 2015). Además, TREX1 se ha implicado en la degradación del DNA durante la muerte celular mediada por Granzyma A (Chowdhury et al., 2006).

Deficiencias en genes con actividad exonucleasa se relacionan con inestabilidad genómica, cáncer y alteraciones en la respuesta inmunitaria (Mason & Cox, 2012) indicando su papel crucial y no redundante en diferentes vías del metabolismo del DNA.

1.5 TREX2 (Three-Prime Repair Exonuclease 2)

TREX2 es una proteína con actividad exonucleasa 3'-5' (Mazur & Perrino 1999, 2001a) de la que todavía se desconocen varios aspectos tanto de su función fisiológica como del mecanismo de acción y regulación. La actividad exonucleasa 3'-5' que la caracteriza puede ser importante en muchos procesos de la célula relacionados con el metabolismo del DNA; desde la síntesis, garantizando que el proceso de replicación sea fiel pues ayuda a corregir los errores de las polimerasas, hasta la recombinación, reparación del daño y degradación, ayudando a mantener la estabilidad del genoma y garantizando la viabilidad de la célula y del organismo.

1.5.1 Características bioquímicas y estructurales de TREX2

TREX2 pertenece a la superfamilia de dominio 3'-5' exonucleasa *DnaQ-like*, el cual es un grupo de exonucleasas 3'-5' conservado estructuralmente que cataliza la escisión de nucleósidos monofosfatos en los extremos del DNA o RNA en dirección 3'-5'. También es llamada superfamilia DEDD, debido a los 4 residuos ácidos invariables presentes en el sitio catalítico de sus miembros. La superfamilia se compone de enzimas que procesan RNA y DNA como los dominios *proofreading* de las DNA polimerasas, otras DNA exonucleasas RNasaD, RNasaT, oligoribonucleasas y RNA exonucleasas (REX). El dominio exonucleasa *DnaQ-like* contiene tres motivos de secuencias conservadas denominados ExI, ExII y ExIII los cuales se agrupan alrededor del sitio activo y contienen cuatro residuos ácidos conservados que sirven como ligandos para los dos iones metálicos necesarios para la catálisis. Los patrones de conservación de los tres motivos pueden variar entre diferentes

subfamilias (Marchler-Bauer et al., 2013). La superfamilia *DnaQ-like* ha sido dividida en dos subfamilias caracterizadas por la presencia de cuatro residuos carboxilato conservados y una histidina (DEDD-h) o una tirosina (DEDD-y) posicionada en el sitio activo (de Silva et al., 2009).

La estructura tridimensional de TREX2 se determinó mediante cristalografía de rayos X por Perrino y colaboradores (2005). La proteína forma un dímero, del cual cada monómero está formado por cinco láminas β antiparalelas enrolladas en 9 hélices α (Figura I3A). Basándose en el alineamiento de la secuencia peptídica y en la similitud estructural observada entre TREX2 y la subunidad epsilon de la DNA Pol III de bacterias, se han identificado TREX2 tres dominios funcionales: homodimerización, unión al DNA y actividad exonucleasa (Perrino et al., 2005; Chen et al., 2007a; Perrino et al., 2008, de Silva et al., 2009). Los residuos que comprenden el sitio activo para la actividad exonucleasa son (Figura I3B): Asp¹⁴ (D14), Glu¹⁶ (E16), Asp¹²³ (D123) y Asp¹⁹³ (D193) en conjunto con la His¹⁸⁸ (H188). Los residuos para la dimerización son: Glu²⁹ (E29), Arg⁵⁵ (R55), Lys⁵⁹ (K59), Asp⁹⁴ (D94), Arg¹⁰⁷(R107) y Glu¹⁹¹ (E191). Para la habilidad de unión al DNA los residuos serían: Arg¹⁶³ (R163), Arg¹⁶⁵ (R165) y Arg¹⁶⁷ (R167).

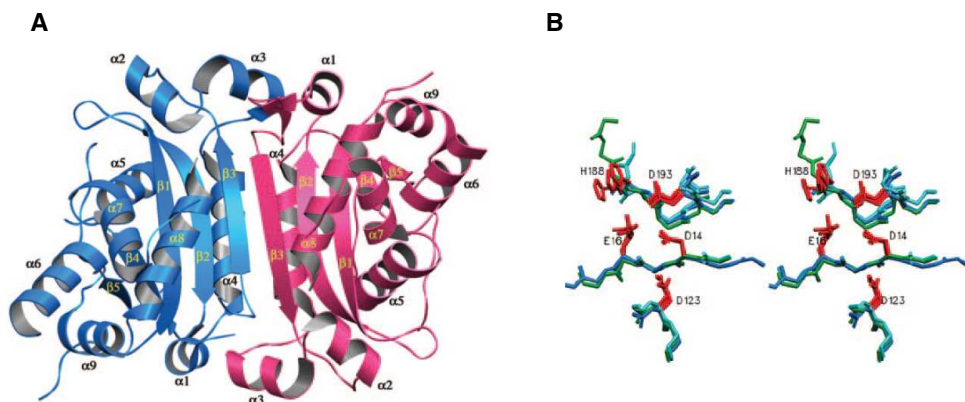


Figura I3. Estructura tridimensional dimérica de TREX2 y su sitio activo. (A) La estructura de TREX2 muestra cinco láminas β enrolladas antiparalelas envueltas por nueve hélices α . La proteína dimeriza sobre un plano perpendicular a la estructura de láminas β que se extienden a través del dímero; los monómeros se muestran en rojo y azul. (B) El sitio activo de TREX2 contiene los residuos conservados de los motivos Exol,

ExoII y ExoIII (en rojo). Los residuos ácidos (Asp¹⁴, Glu¹⁶, Asp¹²³ y Asp¹⁹³) en conjunto con His¹⁸⁸ son necesarios para coordinar los dos iones magnesio involucrados en la unión al DNA y la catálisis. Los motivos EXO están estructuralmente conservados en todos los miembros de la familia de 3' exonucleasas *DnaQ-like* que comparten un mecanismo catalítico común. En la figura se muestra la superposición de los residuos del sitio activo de las proteínas de *E. coli*, epsilon (cian o azul saturado) y ExoI (verde), superpuestas sobre la estructura de TREX2 (azul). Fuente: Perrino y colaboradores (2005).

La proteína TREX2 fue identificada a partir de búsquedas en bases de datos por homología de secuencia con dominios exonucleasas (EXO) presentes en TREX1 y otras exonucleasas con actividad correctora 3'-5' como las polimerasas de DNA ϵ , δ y γ de mamíferos (Hoss et al., 1999; Mazur & Perrino, 1999). La homología con la secuencia proteica de TREX1 es del 40% pero en sus dominios EXO es del 80%. La caracterización bioquímica *in vitro* de TREX2 muestra semejanzas con TREX1 en la actividad exonucleasa y la preferencia de sustratos (Hoss et al., 1999, Mazur & Perrino, 1999). Además, las dos exonucleasas tienen estructura dimerica (de Silva et al., 2007; Perrino et al., 2005) siendo las únicas dentro de la familia *DnaQ* que forman dímeros. Estas dos enzimas son las únicas desoxirribonucleasas conocidas en mamíferos miembros de la subfamilia DEDD-h que prefieren la escisión de sustratos deoxinucleótidos por encima (alrededor de 1000 veces más) de ribonucleótidos (Mazur & Perrino, 1999). Sin embargo, varias diferencias entre las proteínas relacionadas con la cinética enzimática, dominios estructurales y distribución subcelular apoyan la idea de funciones celulares independientes por parte de las dos exonucleasas (Mazur & Perrino, 2001a; Mazur & Perrino, 2001b; de Silva et al., 2007; Perrino et al., 2005; Parra et al., 2009). Entre las principales diferencias que distinguen a TREX2 de esta proteína consisten en que, TREX1 tiene en el extremo C-terminal 76 aa (aminoácidos) que contienen motivos de interacción proteína-proteína que no están presentes en TREX2 (de Silva et al., 2007) y que juegan un papel putativo en el anclaje de TREX1 en el lado citosólico de la membrana del retículo endoplasmático (Lee-Kirsch et al., 2007) en contraste con TREX2 localizada principalmente en el núcleo (Parra et al., 2009). Además, TREX2 presenta una afinidad diez veces inferior por sustratos de DNA *in vitro* comparada con TREX1 (Mazur & Perrino, 2001b).

El mecanismo de interacción de TREX2 con el DNA ha sido caracterizado *in vitro* en detalle (Perrino et al., 2005; Chen et al., 2007a; de Silva et al., 2007; Perrino et al., 2008).

De hecho, para realizar su función nucleasa, primero necesita dimerizar y unirse al DNA, tanto a DNA de cadena simple (ssDNA) como a extremos y cortes de DNA de cadena doble (dsDNA) (Figura 14). Esta unión se realiza mediante interacciones hidrofóbicas y formación de puentes de hidrógeno de manera independiente a la secuencia en un *loop* rico en arginina. Una vez el extremo libre 3'-OH del DNA se ha unido al sitio activo, éste cambia de conformación y gracias a un efecto sinérgico el cambio conformacional también se produce en la otra proteína formadora del dímero aumentando así su afinidad por el sustrato y consecuentemente, la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto, tiene una actividad 3'-5' exonucleasa robusta, no procesiva, que podría corregir los errores introducidos por las polimerasas procesando los extremos 3' libres. Mutaciones en el dominio para la homodimerización producen un descenso en la unión al DNA y en la actividad catalítica (Chen et al., 2007b). Por otra parte, se han identificado diversos SNPs pero que no afectan la actividad de la exonucleasa *in vitro* (Perrino et al., 2004).

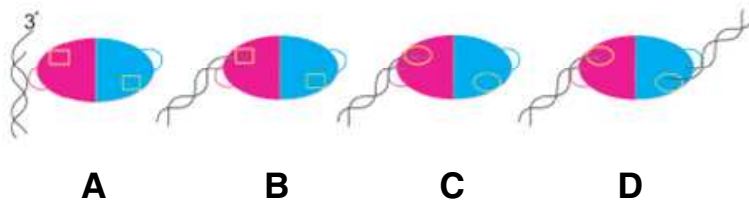


Figura 14. Modelo de unión entre TREX2 y el DNA. (A) El DNA es reconocido por el *loop* rico en arginina. (B) El *loop* posiciona el extremo 3'-OH del sustrato en el sitio activo (rectángulo amarillo). (C) La presencia de ssDNA en el sitio activo induce cambios conformacionales en el sitio activo (óvalos amarillos) de ambos monómeros. (D) Ambos monómeros presentan una mayor afinidad por el DNA y una mayor eficiencia catalítica. Fuente: de Silva y colaboradores (2009).

1.5.2 Expresión de TREX2

Los estudios iniciales de expresión de TREX2 mediante RT-PCR no cuantitativa sugerían una expresión ubícuca en la mayoría de los tejidos analizados (Mazur & Perrino, 2001b). Sin embargo, posteriores análisis cuantitativos por RT-qPCR llevados a cabo en nuestro grupo demostraron una expresión diferencial. La exonucleasa TREX2 se expresa principalmente en tejidos con epitelio escamoso estratificado como esófago y piel,

expresándose concretamente en los queratinocitos que integran mayoritariamente este tejido. En queratinocitos, TREX2 se localiza mayoritariamente en el núcleo (Figura 15) (Parra et al., 2009). La expresión de TREX2 también ha sido estudiada en diferentes tipos celulares de ratón como en el cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en el que se encontró relativamente baja expresión, además en macrófagos aislados de médula ósea (BMM) donde no se detectó expresión cuantificable. Tampoco se halló expresión detectable en células madre embrionarias ni en la línea de fibroblastos L929 (Parra et al., 2009). Asimismo, en humanos se detecta elevada expresión en piel, moderada expresión en lengua y cervix, baja expresión en riñón, bazo, estómago y tiroides. No se ha detectado expresión en hígado (Parra et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que en células HeLa la expresión de TREX2 parece regularse a lo largo del ciclo celular, disminuyendo en la fase M/G2 (Chen et al., 2007a).

Se desconocen hasta el momento los mecanismos de regulación de la expresión de TREX2 tejido-célula específico y en respuesta al daño al DNA.

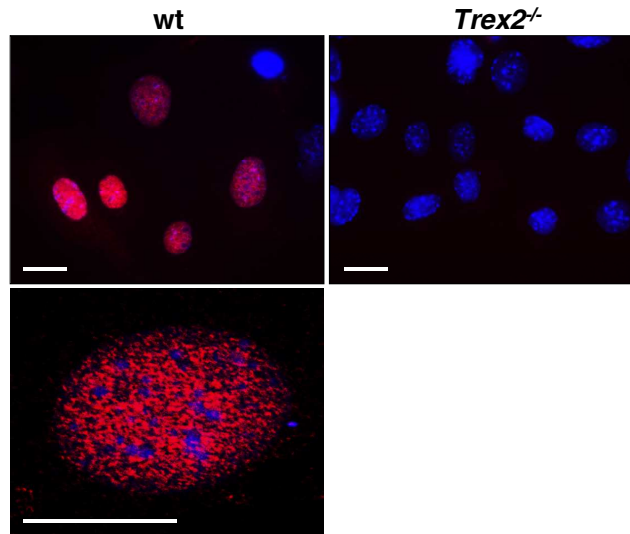


Figura 15. Expresión de *Trex2* en ratón. La inmunocitoquímica muestra cómo TREX2 (rojo) se expresa en queratinocitos de ratón wt principalmente en el núcleo mostrando una distribución punteada. Como modelo de expresión negativa se indican células *Trex2*^{-/-}. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Fuente: Parra y colaboradores (2009).

1.5.3 Funciones y mecanismos de TREX2

La biología, los mecanismos en los que participa y la función de la exonucleasa TREX2 son aún poco conocidos. Por las características de su actividad, inicialmente se infirió que TREX2 podía tener un papel relevante durante la síntesis del DNA, aumentando la fidelidad de las polimerasas faltas de actividad *proofreading* (Hoss et al., 1999; Mazur & Perrino, 1999). De hecho, se ha sugerido que TREX2 podría interactuar con la polimerasa δ incrementando su fidelidad cuando hay desajustes en la concentración de dNTPs (Shevelev & Hübscher, 2002). En este contexto, la eliminación de TREX2 en células ES (*embryonic stem cells*) causa graves reordenamientos cromosómicos y compromete la proliferación celular, sugiriendo que esta exonucleasa tiene un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Chen et al., 2007b). Ahora bien, sorprendentemente esta acción no dependería de la actividad exonucleasa ni de la unión al DNA, sino que sería atribuible a una actividad bioquímica no caracterizada. En este orden de ideas, la inactivación de la actividad exonucleasa en células ES, sólo parece causar un ligero aumento de rupturas dobles (Dumitrache et al., 2009). Por otro lado, nuestro grupo ha obtenido datos sobre la relevancia funcional de TREX2 a partir de la generación y la caracterización del ratón *knockout* de TREX2 (*Trex2*^{-/-}) (Parra et al., 2009). El ratón *Trex2*^{-/-} es viable y fértil, no lleva a una inestabilidad cromosómica general al menos en ausencia de estrés genotóxico y tampoco muestra un incremento significativo de la incidencia espontánea de tumores, aunque la deficiencia de TREX2 incrementa la susceptibilidad a desarrollar tumores de piel cuando son inducidos por carcinógenos (Figura I6). Este incremento en la susceptibilidad se correlaciona con un defecto en la apoptosis por parte de queratinocitos deficientes de TREX2 (Parra et al., 2009; Manils et al., 2015).

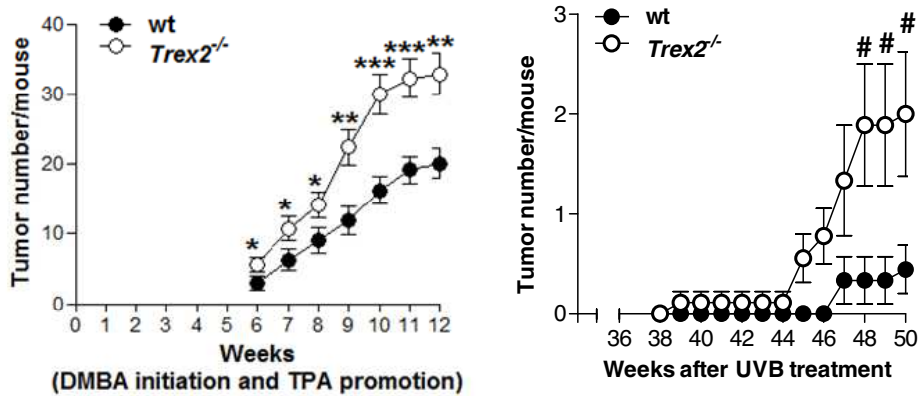


Figura 16. Carcinogénesis en ratones wt y *Trex2*^{-/-}. Número promedio de tumores por ratón en la piel de ratones wt y *Trex2*^{-/-} tratados con los carcinogénicos DMBA+TPA o con UVB. Los ratones *Trex2*^{-/-} son más susceptibles a desarrollar una carcinogénesis en piel.

Por otra parte, también se ha visto que la co-expresión heteróloga de TREX2 y de la endonucleasas Sce-I, afecta los mecanismos de reparación de roturas dobles NHEJ (Aubert et al., 2014). El procesamiento de los extremos 3' libres por TREX2, evita la exacta recuperación de las roturas inducidas por las endonucleasas, no restableciéndose la secuencia original una vez reparada la ruptura (Bennardo et al., 2009; Certo et al., 2012).

Recientemente, como hemos comentado anteriormente, se ha descrito que TREX2 puede participar en la vía de reparación del DNA, EF-PRR (Hu et al., 2013). Los complejos Rad6/Rad18 y ubiquitin-ligasa Ubc13-Mms2-RAD5 controlan la vía de reparación evitando el bloqueo del avance de las horquillas de replicación. El dímero Ubc13/Mms2 es un complejo con actividad conjugadora de ubiquitina capaz de formar cadenas de multiubiquitina unidas a través del residuo K64, esenciales para la activación de la vía. Son proteínas citoplasmáticas que ingresan en el núcleo cuando aparecen lesiones en el DNA. Rad5 puede considerarse una proteína central en la ruta, presenta actividad ubiquitin-ligasa con un dominio *RING finger* que promueve la unión a Ubc13/Mms2 y además posee actividad de unión al DNA y un dominio ATPasa dependiente de ssDNA. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) también actúa en esta vía, como plataforma de anclaje de la actividad polimerasa que se requiere para evitar el daño (Smirnova & Klein, 2003).

Hu y colaboradores (2013) han descrito que en respuesta a la luz UV, TREX2 parece asociarse con Ubc13 e intensificar la ubiquitinización de PCNA. La actividad catalítica de TREX2 resulta importante al eliminar bucles o bases mal apareadas a 3' que pueden ocurrir en el DNA durante el intercambio y desplazamiento de las cadenas.

En resumen, TREX2 podría tener un papel como supresor de tumores bajo condiciones de estrés genotóxico en queratinocitos. Además, los análisis parecen indicar que cuando se produce daño en el DNA por estrés celular o genotóxico, TREX2 puede participar en diferentes vías de reparación imprescindibles en el mantenimiento de la estabilidad genómica, no obstante su funcionamiento podría ser determinado por el tipo de lesión y el contexto celular. La información disponible actualmente sigue siendo insuficiente para entender la importancia fisiológica, función y mecanismos moleculares de esta exonucleasa.

1.5.4 El gen *TREX2*

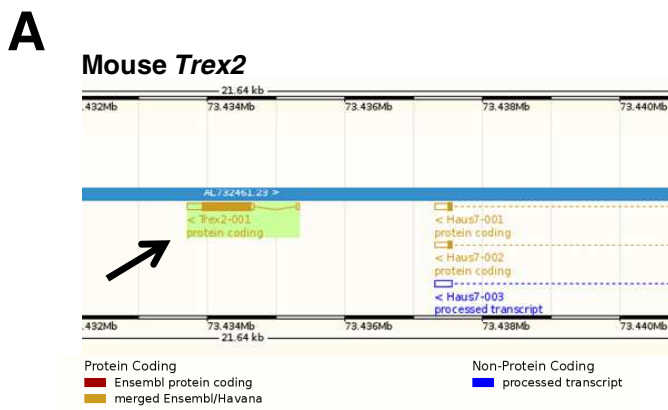
Hasta el momento es aún menos lo que se conoce sobre la regulación génica de la exonucleasa TREX2. En humanos el gen *TREX2* se localiza en la región Xq28 y en ratón se sitúa en la región A7.3 del cromosoma X. La estructura genómica del gen es similar en humanos y ratones pero no idéntica. En el ratón, el gen está constituido por dos exones, localizándose la región codificante íntegramente en el exón 2 (Figura 17A). El *splicing* del intrón de 623 pb genera el mRNA que codifica para una proteína de 236 aa con un peso molecular calculado de 25,9 kDa (Mazur & Perrino, 2001b).

En humanos, se han descrito al menos tres transcritos generados a partir de tres exones y un *splicing* diferencial (Chen et al., 2007a) que dan lugar a tres isoformas proteicas diferentes de 279 aa, 278 aa y 236 aa (Figura 17B). Inicialmente, se creyó que TREX2 podía estar compuesto por 16 exones debido a transcritos hipotéticos encontrados mediante análisis *in silico* (Höss et al., 1999) y el hallazgo de cDNAs conteniendo secuencias generadas a partir de exones posicionados en el DNA genómico hasta a 25 kilobases de distancia del marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) a 5' de

TREX2 (Mazur & Perrino, 2001a). Sin embargo, posteriormente se ha observado que estos exones corresponden al gen *HAUS7*, situado a 5' del gen *TREX2*.

Las isoformas proteicas descritas para el gen *TREX2* humano son:

- La isoforma corta (*S*, *Short*) de 236 aa, es equivalente a la proteína murina y se forma a partir de un transcrito generado por un *splicing* de 513 pb o de 544 pb entre los exones 1 y 2.
- La isoforma larga (*L1*, *Long*) de 279 aa, se genera a partir de un transcrito generado por dos exones y un *splicing* de 2283 pb. Las isoformas L1 y S se diferencian únicamente en la región N-terminal que contiene 43 aa adicionales, pero las dos tienen las mismas propiedades bioquímicas (Chen et al., 2007b).
- La isoforma larga L2, de 278 aa, se formaría a partir de un transcrito generado a partir de tres exones y dos *splicings*, uno de 2103 pb y otro de 134 pb (Chen et al., 2007a).



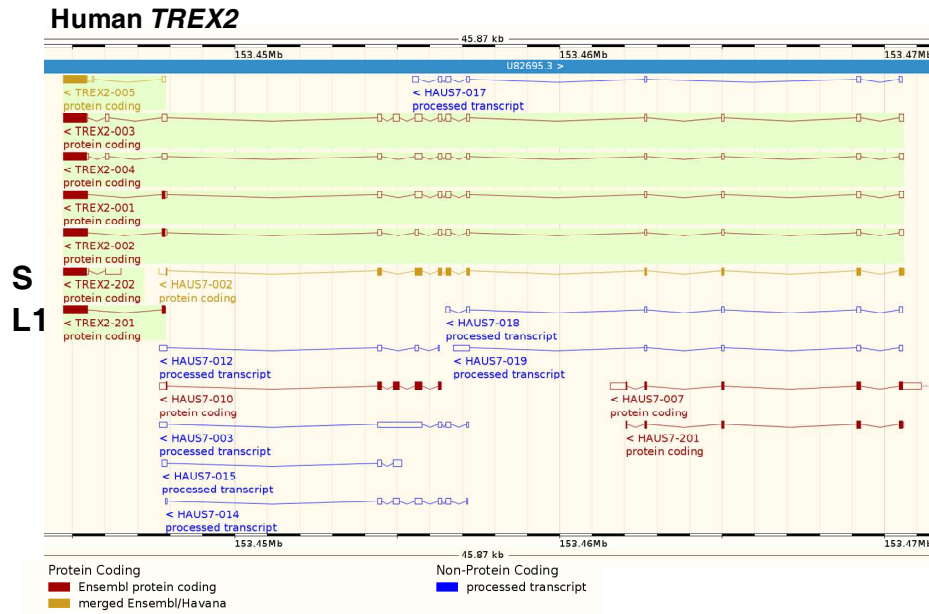
B

Figura 17. Gen y transcritos de *TREX2*. (A) Gen y transcritos de *Trex2* murino. El gen *Trex2* de ratón consta de dos exones siendo el segundo exón el que contiene toda la región codificante. El transcrito generado por un *splicing* de 623 pb da lugar a una proteína de 236 aa equivalente a la isoforma corta humana. La flecha azul indica la dirección del gen. **(B)** Gen y transcritos de *TREX2* humano. Se han descrito diferentes transcritos generados por *splicing* alternativo que dan lugar a dos isoformas proteicas diferentes, la variante 1 de 236 aa (S) y 26 kDa, la variante 2 de 279 aa (L1). La flecha azul indica la dirección del gen.

1.6 La piel

La piel es una efectiva barrera formada entre el organismo y el medio ambiente que proporciona protección ante la invasión de patógenos y ayuda a defenderse de las agresiones físicas y químicas, así como de la pérdida no regulada de solutos (Proksch et al., 2008). La piel como estructura dinámica y de constante renovación, está constituida por tres capas superpuestas que son, de la más superficial a la más profunda: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo. La epidermis, que se constituye como la más externa de las capas ha evolucionado para proporcionar permeabilidad y una barrera física esencial para la supervivencia como una adaptación a la vida terrestre en

mamíferos. Esta barrera contra el medio ambiente es regenerada continuamente por queratinocitos terminales diferenciados (Candi et al., 2005) que forman un epitelio pavimentoso pluriestratificado. Durante el desarrollo del ratón, la epidermis embrionaria comienza como una simple capa de células hasta el día 12,5 de desarrollo embrionario, momento en el que los queratinocitos inician la estratificación y el establecimiento de múltiples capas (Eckert et al., 2013a). Además de los queratinocitos, la epidermis contiene otros tipos celulares como melanocitos (con melanina), células de Langerhans (con funciones inmunológicas) y células de Merkel (mecanorreceptores). A pesar de esto, los queratinocitos son el tipo celular mayoritario de la epidermis y son los responsables de su estructura. Al inicio son células proliferativas que se mueven desde el estrato basal, siendo las únicas células de la epidermis que permanecen en continua división. A medida que se mueven hacia la superficie epidérmica, las células dejan de dividirse y experimentan cambios morfológicos para formar los estratos espinoso, granular o granuloso, lúcido (sólo en zonas de epidermis muy gruesa) y córneo (Eckert et al., 2004; Candi et al., 2005). Las capas de la epidermis, desde la más interna a la más externa se describen a continuación y se ilustran en la Figura 18.

Estrato basal o germinativo: Compuesto por queratinocitos mitóticamente muy activos, que descansan sobre una lámina basal hecha de material extracelular. Se pueden considerar las células madre de la epidermis y dan lugar a las células que migran hacia arriba para formar el estrato espinoso. Esta capa es responsable de la constante renovación del epitelio y no suele tener más de una célula de espesor. Se calcula que la epidermis humana se renueva cada 2-3 semanas (Ovaere et al., 2009).

Estrato espinoso: Se llama así por la apariencia espinosa de las células debido a que se han despegado de la lámina basal. La única adhesión que tienen es por medio de desmosomas entre células vecinas, esto les confiere una forma estrellada. En esta capa los queratinocitos comienzan el proceso de diferenciación llamado cornificación. En humanos, el estrato espinoso se compone de varias capas de queratinocitos, sin embargo,

en la epidermis del ratón el estrato espinoso es típicamente una sola capa de células (Sundberg et al., 2012)

Estrato granuloso: Los queratinocitos de esta capa empiezan a sintetizar elementos estructurales y aparecen con presencia de gránulos en el citoplasma que contienen queratohialina, la cual ayuda a unir los filamentos intermedios del citoplasma de la célula. Los queratinocitos también excretan cuerpos lamelares, que son estructuras rodeadas de una membrana con el contenido de lípidos y proteínas que ayudarán a formar el estrato córneo una vez liberados al espacio extracelular y que confieren a la piel las propiedades de barrera impermeable. Así mismo, las células de esta fase pierden el núcleo y los orgánulos celulares haciendo que lleguen al estrato córneo como células muertas.

Estrato lúcido: Sólo presente en la palma de las manos o en los pies, es una fina capa de células muertas.

Estrato córneo: La más externa de las capas, hecha de queratinocitos llenos de sustancias hidrófobas (queratina) sin núcleo y muertas. Estas células (corneocitos) tienen unos desmosomas modificados (corneodesmosomas) que les confieren más adhesión a las células vecinas. Llegados a un punto los corneodesmosomas serán destruidos por medio de una cascada de proteólisis y se despegarán por descamación.

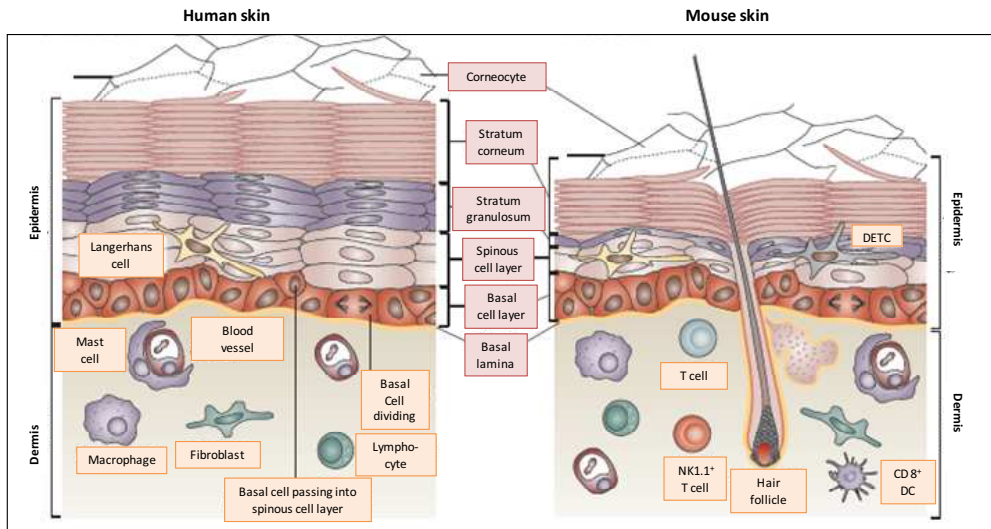


Figura 18. Características de la piel humana y de ratón. Se muestra la estructura de la epidermis humana (derecha) y de ratón (izquierda) y los diferentes tipos de células y estratos que la componen. *Langerhans cell*, células de langerhans; *Blood vessel*, vaso sanguíneo; *Macrophage*, macrófago; *Mast cell*, mastocito; *Fibroblast*, fibroblasto; *Basal cell dividing*, célula basal en división; *Lymphocyte*, linfocito; *Corneocyte*, corneocito; *Basal cell passing into spinous cell layer*, célula basal pasando al estrato espinoso; *Stratum corneum*, estrato córneo; *Stratum granulosum*, estrato granuloso; *Spinous cell layer*, estrato espinoso; *Basal cell layer*, estrato basal; *Basal lamina*, lámina basal; *T cell*, célula T; *Nk1.1⁺ T cell*, célula NK1.1⁺; *Hair follicle*, folículo piloso. Abreviaturas: DC, célula dendrítica; DETC, célula dendrítica epidérmica T; NK, *natural killer*. Adaptado de Wagner y colaboradores (2010).

Proliferación celular, diferenciación y muerte celular ocurren secuencialmente en la epidermis y cada proceso es caracterizado por la expresión de proteínas específicas, pero también enfermedades específicas pueden resultar de anomalías en estas proteínas. En la epidermis normal, la tasa de proliferación del estrato basal es balanceada por la descamación del estrato córneo, de esta manera se rejuvenece constantemente la epidermis (Candi et al., 2005). El logro de los cambios morfológicos que experimentan las células para formar los diferentes estratos se basa en la ejecución de un programa preestablecido de diferenciación que requiere una estrecha regulación génica (Eckert et al., 2004). Muchos de los genes codifican proteínas que son usadas para ensamblar la envoltura córnea (*cornified envelope*). La envoltura córnea forma el punto final de la diferenciación epidérmica y la muerte celular. Reemplaza la membrana plasmática de los queratinocitos diferenciados y consta de queratinas que son incluidas dentro de una

amalgama de proteínas insolubles las cuales se entrecruzan con transglutaminasas y están rodeadas por una envoltura lipídica (Candi et al., 2005).

1.6.1 El proceso de diferenciación

El proceso de migración y diferenciación de los queratinocitos desde el estrato basal al estrato córneo se denomina cornificación o queratinización. Además de la formación de corneocitos, los queratinocitos pueden diferenciarse a través de distintos programas y por diferentes vías de cornificación originando diferentes productos como: las uñas, los pelos, las papilas filiformes de la lengua e incluso los sebocitos que conforman la glándula sebácea accesoria al pelo. Los pelos son mini órganos con múltiples funciones como protección, regulación de temperatura, extensión del sebo y el sudor por la piel, funciones táctiles o reparación de heridas. Es posible separar la epidermis en interfolicular (entre folículos, mayoritaria en humanos) y folicular (la epidermis del folículo piloso, mayoritaria en ratones). Durante el proceso de cornificación, los queratinocitos del pelo y las uñas sufren uniones más extensivas del citoesqueleto con diferentes proteínas resultando en estructuras mucho más duras que el estrato córneo (Eckhart et al., 2013b). Se originan a partir de células madre que forman un folículo piloso que profundiza en la dermis. El folículo piloso es un conjunto de células dérmicas especializadas que se encuentran justo debajo de la epidermis. Estas células se encuentran separadas de la dermis por una membrana basal rica en matriz extracelular y factores de crecimiento sintetizados y depositados principalmente por células epiteliales (Alonso & Fuchs, 2006). Está compuesta por la glándula sebácea, el músculo piloerector, y el pelo en si. Sufre ciclos de crecimiento rápido (anágeno), regresión mediada por apoptosis (catágeno) y relativa quiescencia (telógeno) (Muller-Rover et al., 2001). En la figura I9 se muestra cómo en cada ciclo se renueva el pelo y el viejo cae. En ratones las fases del crecimiento del pelo se dan de manera sincronizada, lo cual no ocurre en humanos (Wagner et al., 2010).

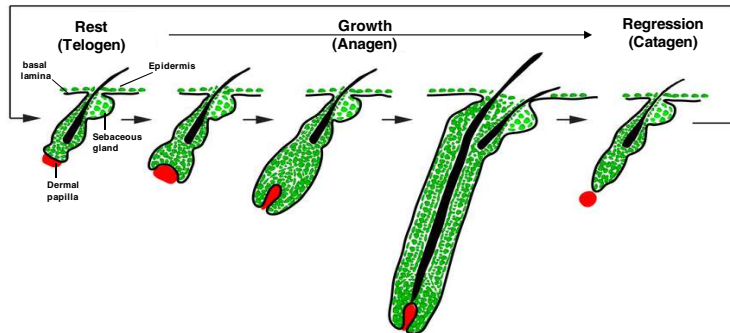


Figura 19. Representación esquemática de las diversas fases del crecimiento del pelo en ratón. En condiciones normales el folículo piloso experimenta ciclos repetidos de regeneración. Un ciclo completo del pelo alterna entre las fases de reposo (telógeno), crecimiento (anágeno) y regresión o transición (catágeno). *Basal lamina*, lámina basal; *Dermal papilla*, papila dermal; *Sebaceous gland*, glándula sebácea; *Rest*, reposo; *Growth*, crecimiento; *Regression*, regresión; *Telogen*, telógeno; *Anagen*, anágeno; *Catagen*, catágeno. Fuente: Rompolas y colaboradores (2013).

Los profundos cambios morfológicos que tienen lugar en los queratinocitos durante la diferenciación están conducidos por cambios en la expresión génica. Durante el proceso, un set específico de genes de diferenciación se encienden o se apagan como parte del programa de diferenciación en diferentes etapas (Crish et al., 2006). La Queratina 5 (K5) y la Queratina 14 (K14) son la estructura principal en los queratinocitos basales en proliferación. Activado por señales pobremente entendidas, ciertos queratinocitos basales migran desde la capa basal a la capa espinosa, pierden su actividad mitótica y comienzan a sintetizar una nueva serie de proteínas estructurales y enzimas que son características de la cornificación. La Queratina 1 (K1) y Queratina 10 (K10) se encuentran entre las primeras proteínas en ser expresadas durante la queratinización. En el estrato espinoso filamentos de K1 y K10 reemplazan la red de K5 y K14 pre-existente, de esta manera las queratinas se van sustituyendo a lo largo del proceso de diferenciación y son un buen marcador para identificar las diferentes capas de la epidermis. Al mismo tiempo, una serie de otras proteínas estructurales incluyendo Involucrina, Loricrina, Trichialina (THH) y la clase de pequeñas proteínas ricas en prolina (SPRs, *small proline-rich proteins*) son sintetizadas en el estrato granular (Sinha et al., 2000; Candi et al., 2005). La Involucrina no se expresa en las células basales pero su expresión ocurre en la capa suprabasal (estrato espinoso) y se mantiene hasta el estrato granular. Por lo tanto, es

considerada un marcador del proceso de diferenciación temprana (Crish et al., 2006). La Loricrina es un componente principal de la envoltura córnea y se expresa sólo en los queratinocitos diferenciados terminalmente, también llamados corneocitos (Kawachi et al., 2012).

Los patrones de expresión celular específicos de la diferenciación sugieren mecanismos de regulación específicos para la activación de la transcripción de genes como la Loricrina, Involucrina y K10 en los queratinocitos diferenciados, o de otros genes que no necesariamente están involucrados en el programa de diferenciación pero que también son gobernados por mecanismos de regulación tejido-específica o de expresión génica específica de la diferenciación.

1.6.2 La piel humana y de ratón

Aunque los estratos de la piel humana y de ratón son muy similares, existen notables diferencias como el grosor de la piel humana, considerablemente mayor en comparación con la del ratón (Figura 18). La epidermis del ratón en la gran proporción del cuerpo es relativamente gruesa al momento del nacimiento, pero a medida que el pelo comienza a crecer se vuelve rápidamente más delgada durante las siguientes dos semanas, y luego se mantiene constante por el resto de la vida (Sundberg et al., 2012). La piel del hocico del ratón tiene vibrisas, un órgano somatosensorial que no se encuentra en los humanos. Tanto la cola y la piel del hocico presentan epidermis más gruesas que el tronco, esta última presumiblemente porque es un área de mayor fricción. Los humanos en cambio tienen bigote, una forma de pelo terminal en la cara de los machos que no se encuentra en ratones aunque usualmente, las vibrisas se consideran erróneamente como el homólogo del bigote en humanos. La gruesa epidermis de las palmas de las manos y plantas de los pies humanos es igualmente gruesa en estas regiones en ratón, ambas de las cuales tienen glándulas sudoríparas eccrinas encargadas del control de la producción del sudor. Mientras que los seres humanos tienen huellas digitales (crestas epiteliales y clavijas en las palmas, plantas y dígitos) los ratones tienen superficies relativamente lisas en las plantas y palmas de sus almohadillas (Sundberg et al., 2012). Aunque los

queratinocitos representan más del 95% de la población de las células epidérmicas, otros tipos celulares menores están presentes en la piel normal y saludable. En la epidermis interfolicular humana, los melanocitos, que producen la proteína protectora melanina se intercalan entre los queratinocitos en una proporción aproximada de 1:30. Organelas subcelulares que contienen melanina (melanosomas) se exportan y son fagocitadas por los queratinocitos. En la epidermis interfolicular la piel de ratón carece de melanocitos y glándulas sudoríparas, en contraste, posee un ciclo del pelo bastante sincronizado, rápida renovación epidérmica y la presencia de células $\gamma\text{-}\delta$ intraepidérmicas (Khavari, 2006). En la piel pueden ser encontrados prácticamente todos los tipos celulares del sistema inmunitario. En cuanto al sistema inmune murino, subtipos particulares de células pueden ser encontrados: células dendríticas CD8^+ , células dendríticas epidérmicas T y células asesinas naturales NK1.1^+ (NK, *natural killer*), ausentes en la piel humana.

A pesar de las diferencias entre la piel del ratón y la piel humana, hoy en día los modelos de ratón se emplean con éxito para reproducir la piel humana pues claramente tienen muchos aspectos y vías moleculares comunes (Wagner et al., 2010).

1.7 Regulación de la expresión génica

La regulación génica ha sido considerada una línea de investigación primordial debido a su fundamental importancia biológica. El desarrollo, crecimiento y supervivencia de los organismos eucariotas requiere la adecuada regulación de decenas de miles de genes mediante fórmulas complejas que aún tienen que ser resueltas. La expresión de cada uno de estos miles de genes está controlada por una amplia variedad de mecanismos de regulación (Butler & Kadonaga, 2002; Yilmaz & Grotewold, 2010) de los cuales hasta la fecha sorprendentemente aún falta mucho por conocer. Por otro lado, cada vez existe más evidencia de que la regulación génica es una de las principales fuentes de diversidad en los fenotipos observados en la naturaleza (Carroll, 2000). Aunque todas las células de un organismo contienen más o menos la misma información genética, la diferenciación celular en distintos tejidos y órganos requiere la expresión de genes específicos en cada

etapa de desarrollo y tipo celular (Hardison & Taylor, 2012). Identificar las secuencias de DNA requeridas para la regulación de la expresión génica, llamadas módulos *cis*-reguladores (CRMs, *cis*-regulatory *modules*) es primordial para la comprensión de las funciones celulares normales y patológicas, para mejorar el diseño de los sistemas de expresión (Moshonov et al., 2008) y diseñar aplicaciones en diferentes campos de la biología y medicina (Hardison & Taylor, 2012).

La región promotora de un gen es una de sus regiones reguladoras esenciales, por tal razón, el reconocimiento de las regiones promotoras además de otras regiones reguladoras, es fundamental para entender el correcto funcionamiento de la expresión génica (Htike & Win, 2013). En general, el promotor se considera como un segmento de DNA no codificante que se superpone con el sitio de inicio de la transcripción (TSS, *transcription start site*) de un gen en particular. (Werner, 1999; Lenhard et al., 2012). Promotores aberrantes pueden causar un amplio rango de enfermedades incluyendo cáncer (Htike & Win, 2013).

La regulación de la expresión génica se produce a través de la acción combinatoria entre los CRMs y múltiples factores de transcripción que se acoplan a sus sitios de unión (TFBSs, *transcription factor binding sites*) específicos, presentes en la región promotora del gen (Chowdhary, 2006; Hardison & Taylor, 2012). Su función se basa en activar o reprimir la transcripción mediante la unión a las secuencias de DNA presentes en genes diana. La mayoría de los TFBS conocidos son relativamente cortos (~6-20 pb de longitud) (Werner, 1999; Hardison & Taylor, 2012) y se encuentran intercalados en los promotores dando funcionalidad a estas regiones. Los patrones de los TFBSs están usualmente conservados entre especies. Debido al pequeño tamaño de los motivos de los TFBS, estos tienden a aparecer frecuentemente en cualquier parte del genoma, sin embargo, sólo los que están presentes en las regiones regulatorias pueden ser funcionalmente activos. Promotores de diferentes especies pueden variar teniendo TFBSs que otros no tienen. Entre promotores, los TFBSs no muestran una preferencia intrínseca hacia la localización u orientación en específico, sin embargo, para una clase de promotores en particular tal preferencia puede ser observada. La naturaleza de la función de los TFBSs puede

dependen de su contexto o localización dentro del promotor. Algunas veces la función particular de un TFBS, a menudo depende de su ubicación relativa. Los TFBSs pueden solaparse con otros elementos y este solapamiento puede ser crucial para la función represora o activadora (Chatterjee et al., 2012). Además, el patrón de expresión de factores de transcripción activadores y/o represores determinará la actividad celular de un determinado promotor.

Aparte del promotor, existen regiones regulatorias adicionales en el DNA que trabajan cohesivamente con el promotor para regular un gen a nivel transcripcional. Estas regiones están usualmente localizadas miles de bases antes o después del TSS y regulan la tasa de transcripción del gen asociado. Ejemplos de tales regiones incluyen potenciadores (*enhancers*), aisladores (*insulators*) y silenciadores (*silencers*). Los potenciadores incrementan la tasa de transcripción génica, mientras que los silenciadores la disminuyen. Un potenciador contiene múltiples TFBSs y ésta multiplicidad se requiere para la función potenciadora. Los aisladores son CRMs que restringen el efecto de módulos reguladores de largo alcance como los potenciadores, para que actúen en el promotor diana apropiado (Hardison & Taylor, 2012).

1.7.1 Tipos de promotores

La región promotora en eucariotas es usualmente difícil de caracterizar debido a su alta variabilidad. Por ejemplo, el tamaño de los promotores puede variar desde unos cientos de pares de bases en algunos genes, hasta varias kilobases en otros. Clásicamente se consideran principalmente tres tipos de promotores (Tabla I2; Figura I10) (revisado en Lenhard et al., 2012):

- a. Promotor mínimo (*Core promoter*): Por lo general incluye el TSS y puede ser de hasta ~100 pb. Puede ser definido como el mínimo segmento de DNA suficiente para iniciar la transcripción basal exacta mediante la maquinaria de la RNA polimerasa II (Werner, 1999; Butler & Kadonaga, 2002; Lenhard et al., 2012). Contiene el sitio de unión para la RNA polimerasa y sitios generales de unión (comúnmente encontrados

en muchos tipos de promotores). Ejemplos de sitios de inicio en esta región son: caja TATA, elemento iniciador (Inr), elemento promotor *downstream* (DPE, *downstream promoter element*) entre otros (Maston et al., 2006; Lenhard et al., 2012). No obstante, muchos promotores de genomas de mamíferos no contienen caja TATA y contienen regiones ricas en GC o CpG.

- b. Promotor proximal: Esta región es en parte, responsable de la modulación de la transcripción. Por lo general se encuentra entre los 200-300 pb anteriores al TSS. Habitualmente contiene múltiples TFBSs específicos para factores de transcripción. Un ejemplo de un sitio de unión en esta región es la caja CAAT (Werner, 1999).
- c. Promotor distal: Es la parte más variable del promotor con respecto a la composición y longitud. Se encuentra ubicado antes del promotor proximal (a 5') y puede estar localizado hasta a miles de bases de distancia del TSS (Werner, 1999; Lenhard et al., 2012). Contiene sitios específicos de unión que controlan la expresión espacial y temporal de un gen.

Tabla I2. Tipos de promotores. Fuente: Lenhard y colaboradores (2012).

Tipo de promotor	Función génica dominante	Propiedades comunes	Específico en vertebrados
Tipo I "adulto"	expresión tejido-específica en tejidos periféricos adultos	agudo (centrado) TSS, enriquecimiento caja TATA, nucleosomas desordenados	sin islas CpG, en su mayoría
Tipo II "ubicuo"	amplia expresión durante todo el ciclo del organismo	amplio (disperso) TSS, configuración de nucleosomas ordenada	islas CpG, caja TATA reducida
Tipo III (regulados en el desarrollo)	genes diferencialmente regulados, reguladores en desarrollo multicelular y diferenciación	represión de genes regulados por Polycomb, amplias marcas H3K27me3	muchas islas CpG extendiéndose a lo largo del gen

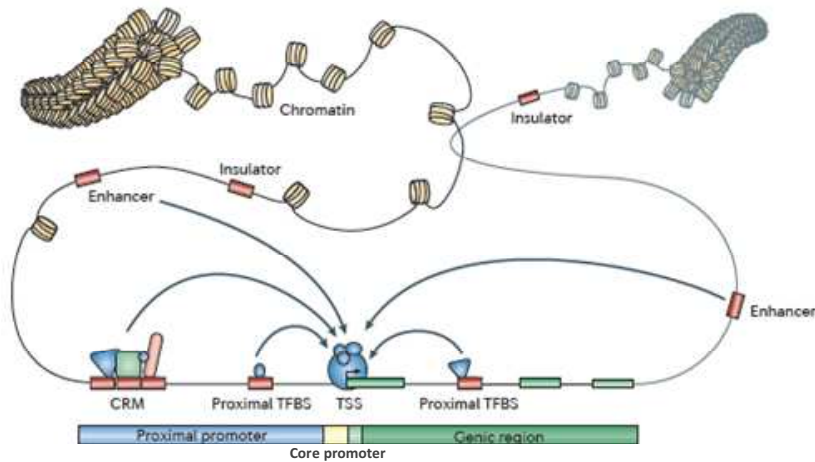


Figura 110. Esquema de la región reguladora típica de un gen. Resumen de los elementos del promotor y las señales que lo afectan. La cromatina (*chromatin*) está compuesta de DNA condensado que da forma a los nucleosomas. La estructura de la cromatina puede estar fuertemente empaquetada o ser accesible a proteínas, los límites de estos estados pueden ser marcados por los aisladores (*insulators*). La región cercana al TSS se compone usualmente de un pequeño promotor mínimo (*core promoter*) y el promotor proximal (*proximal promoter*), esta parte normalmente abarca menos de 1kb. Para activar la transcripción y reclutar la RNA polimerasa II los factores de transcripción se unen a patrones de secuencia específicos cercanos al TSS (*proximal TFBSs*) o hasta a 1Mb de distancia (*enhancers* o potenciadores). Estos elementos distales pueden conectarse con el promotor mínimo o el promotor proximal a través de un mecanismo que consiste en un bucle de DNA. TFBSs actúan en grupos para formar los CRMs (*cis-regulatory modules*). Fuente: Lenhard y colaboradores (2012).

1.7.2 Regulación epigenética

La regulación epigenética implica la modificación química del DNA como la metilación y cambios en las moléculas asociadas al DNA, tales como modificaciones de histonas y complejos de remodelación de la cromatina (Chatterjee & Vinson, 2012). Las modificaciones epigenéticas pueden regular la expresión génica (Vinci, 2012; Wagner et al., 2014). La metilación de la citosina en dinucleótidos CpG modula la expresión de múltiples genes (Messerschmidt et al., 2014). Esta modificación epigenética postreplicativa se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina (5mC) (Wu & Zhang, 2011; Perdigo et al., 2014). Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En el 98% del genoma están

presentes en promedio una vez cada 80 dinucleótidos existiendo regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen un elevado porcentaje de C y Gs y una frecuencia relativamente mayor de dinucleótidos CpG, denominadas "islas CpG". Aproximadamente 60 a 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma de mamíferos están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están (Bogdanović & Veenstra, 2009). Además de los TFBS, éstas modificaciones están asociadas con secuencias promotoras y pueden influenciar su función (Phillips, 2008; Wagner et al., 2014). En general, las islas CpG se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas (Maston et al., 2006). La metilación cerca del promotor de un gen varía considerablemente dependiendo del tipo celular así, una mayor metilación del promotor se correlaciona con poca transcripción o nula (Suzuki & Bird, 2008). Mientras que los niveles de metilación global de promotores particulares son similares en humanos, existen diferencias significativas en los niveles de metilación globales y específicos entre diferentes tipos de tejidos y entre células cancerígenas y normales del mismo tejido (Phillips, 2008). Inicialmente se pensó que la metilación CG era una marca epigenética represora general en genomas de vertebrados que actuaba mediante el bloqueo de elementos reguladores de los genes (promotores, potenciadores, aisladores y represores), a los cuales ciertos factores de transcripción activadores debían unirse (Phillips et al., 2008). Es el ejemplo de factores de transcripción tales como E2F, CREB (*cAMP response element-binding*), AP-2 (*activator protein 2*), c-Myc/Myn y NF- κ B, para los cuales la 5mC impide las actividades de unión al DNA pues inhibe la unión de los factores de transcripción al contener secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento (Qiao & May, 2011). Sin embargo, recientes estudios demuestran un nuevo papel como marca activadora que origina sitios de unión de otros factores de transcripción (Rishi et al., 2010). La 5mC parece mediar la expresión génica mediante el reclutamiento de la proteína C/EBP α (*CRE enhancer-binding protein alpha*) la cual funciona como activador transcripcional.

Es bien sabido que la adecuada metilación del DNA es esencial para la diferenciación celular y el desarrollo embrionario. A pesar de esto, de qué forma se generan los patrones de DNA metilado y desmetilado durante el desarrollo y cómo se mantienen en las células diferenciadas continúa siendo una gran incógnita. Estos procesos parecen ser el resultado de la acción combinada de enzimas (metiltransferasas) que se encargan de metilar y mantener los patrones de metilación (Arand et al., 2012).

Por otra parte, las histonas pueden sufrir modificaciones covalentes del tipo acetilación, metilación, fosforilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación, sumoilación, isomerización de prolina o desaminación de arginina en sus colas N-terminales, regiones más susceptibles de ser modificadas químicamente para variar su carga y alterar las interacciones entre el DNA y las histonas. Tanto el tipo de modificación como su localización determina el efecto en la transcripción génica (Perdigoto et al., 2014). En la epidermis, la metilación de histonas dinámicamente regulada por enzimas metiltransferasas y demetilasas para establecer y remover respectivamente la modificación ha sido bien caracterizada (Wang et al., 2009). Los marcadores de metilación de histonas pueden tener papeles represores o activadores dependiendo de cual haya sido el residuo modificado en la cola de la histona (Perdigoto et al., 2014). La metilación del DNA y la modificación de histonas han sido inversamente correlacionadas. Por un lado la metilación del DNA previene la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3), un marcador epigenético generalmente asociado con promotores activos, y de la misma manera, la H3K4me3 previene la metilación del DNA. Así, la H3K4me3 parece estar vinculada a la transcripción activa en células humanas y por ende a los TSS de genes con promotores activos (Okitsu et al., 2010).

1.7.3 Factores de transcripción implicados en la expresión específica en queratinocitos

Aunque muchas de las proteínas estructurales y enzimas involucradas en el programa de diferenciación tales como Queratinas, Involucrina, Loricrina, Filagrina o Transglutaminasas están bien caracterizadas, los factores de transcripción y modificaciones del DNA y la cromatina que regulan la compleja expresión específica y

temporal de estos y otros genes durante la proliferación y diferenciación de los queratinocitos aún están en el proceso de caracterización. Diversos factores de transcripción pertenecientes a múltiples familias están implicados en la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de queratinocitos (Mizuno et al., 2006; Eckert et al., 1997; Fuchs & Raghavan, 2002; Dai & Segre, 2004; Eckert et al., 2004; Wagner et al., 2010). Entre las familias implicadas se encuentran AP1 (*activator protein 1*) (Nakamura et al., 2007) que incluye los factores de transcripción c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 (*Fos-related antigen 1*), y Fra-2 (*Fos-related antigen 2*) (Eckert & Welter, 1996; Eckert et al., 2013b), AP-2 (Maytin et al., 1999; Wang et al., 2008), SP1 (*trans-acting transcription factor 1*) (Nakamura et al., 2007; You et al., 2007), los miembros de la familia de dominio POU (*POU domain*); Oct6 (Faus et al., 1994) y Oct11 (Andersen et al., 1997), la familia C/EBP (Maytin et al., 1999; Borreli et al., 2007; House et al., 2010) y la familia de factores de transcripción ETS (Tummala & Sinha, 2006). La potencial redundancia funcional entre los miembros de las familias AP-2, SP1 y AP1 ha hecho difícil la exploración de sus funciones en la epidermis de la piel. Sin embargo, siempre que se han mapeado proteínas de unión a queratinocitos en genes expresados a nivel epidérmico, sitios para AP-2, SP1 y/o AP1 han sido frecuentemente encontrados (Sinha et al., 2001). Algunos otros factores de transcripción que han sido implicados en la diferenciación epidérmica son klf4 (*kruppel-like factor 4*) (Segre et al., 1999; Sen et al., 2012), Brn2 (Shi et al., 2010) y en la proliferación de queratinocitos, CREB (Rozenberg et al., 2009).

1.7.3.1 La familia de proteínas AP1

AP1 consiste en heterodímeros formados entre miembros de la familia de factores de transcripción Jun (c-Jun, JunB y JunD) y Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) y de homodímeros entre las diferentes proteínas Jun (Rossi et al., 1998) (Figura I11) aunque también puede establecer heterodímeros con proteínas de otras familias. Estos complejos pueden interactuar con sitios de unión del factor AP1 en el DNA y son capaces tanto de activar como de reprimir la transcripción génica. La capacidad de formar heterodímeros

entre proteínas con diferente especificidad de unión a DNA hace que el abanico de secuencias que pueden ser diana de AP1 sea extenso. Las regiones principales de unión a DNA de los diferentes dímeros de AP1 son el elemento de respuesta a TPA, TRE (*TPA-response element*) con la secuencia 5'-TGAG/CTCA-3' y CRE (*cAMP response element*) con la secuencia 5'-TGACGTCA-3'. Los diferentes factores de transcripción miembros de la familia pueden expresarse en capas específicas de la epidermis y controlar múltiples funciones importantes para la célula (Eckert et al., 2013b).

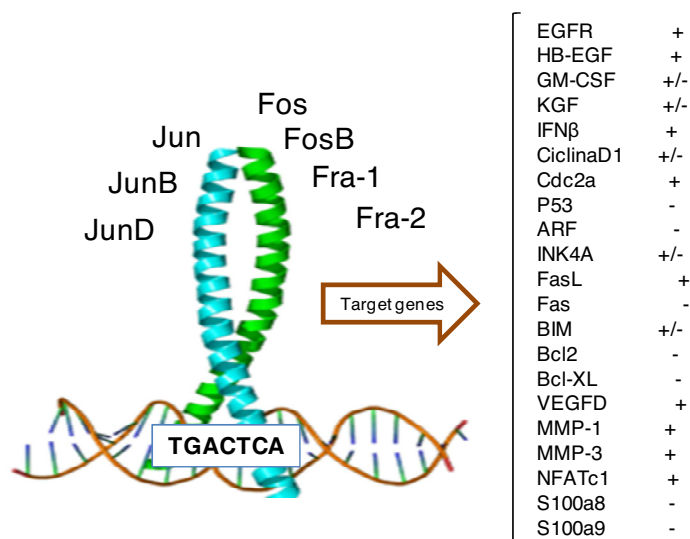


Figura I11. AP1 se compone de las proteínas Jun y Fos. Proteínas Jun forman homodímeros o heterodímeros con proteínas Fos. Las diferentes combinaciones diméricas reconocen diferentes elementos de secuencia en los promotores y potenciadores de los genes diana. Sólo se muestra el elemento de respuesta a TPA (*12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato*) con su secuencia consenso TGACTCA. Entre los genes diana de AP1 se encuentran importantes reguladores de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Los genes pueden ser regulados positivamente (+) y negativamente (-) o positiva y negativamente (+/-) según la composición del dímero. Modificado de Zenz y colaboradores (2008).

En la Figura I12 se representa de forma detallada la distribución de la expresión de cada factor de transcripción en la epidermis. Estos factores de transcripción son de los más importantes e interesantes reguladores en la epidermis pues están implicados en el control de la proliferación de queratinocitos (Mizuno et al., 2006; Rorke et al., 2010), la

diferenciación (Eckert et al., 2004; Rorke et al., 2010), la apoptosis (Raj et al., 2006; Zenz et al., 2008), y la transformación (Canetti et al., 2009).

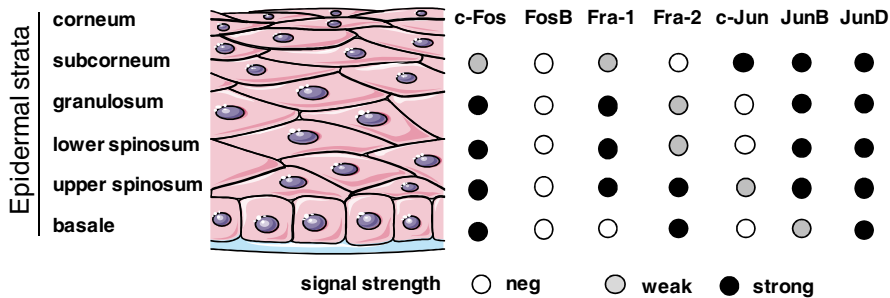


Figura I12. Expresión de Fos y Jun en la epidermis humana. Representación esquemática de la expresión de las proteínas Fos y Jun en epidermis normal a día 8 de diferenciación. La intensidad de la expresión se indica en los círculos y la señal de color indicada. *Epidermal strata*, estratos de la epidermis; *corneum*, córneo; *subcorneum*, subcórneo; *granulosum*, granuloso; *lower spinosum*, espinoso inferior; *upper spinosum*, espinoso superior; *basale*, basal; *signal strength*, intensidad de señal; *neg*, negativa; *weak*, débil; *strong*, fuerte. Fuente: Mehic y colaboradores (2005).

A partir de ratones modificados genéticamente y de células derivadas de los mismos se han desarrollado importantes ideas acerca de las funciones específicas de las proteínas AP1 en el desarrollo o en enfermedades. La Tabla I3 reúne las principales aproximaciones utilizadas en el estudio de las proteínas Jun y Fos. Diferentes fenotipos se han obtenido a partir de experimentos de ganancia y pérdida de función (Zenz et al., 2008).

Los factores de transcripción AP1 en la epidermis actúan como piezas importantes en el control de la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos y el trastorno de estos procesos puede resultar en el desarrollo de enfermedades como psoriasis y cáncer (Zenz & Wagner, 2006; Wagner et al., 2010; Eckert et al., 2013b).

Tabla I3. Funciones de las proteínas Jun y Fos. *Knockout*, *knockout* condicional y ganancia de función (transgénico) son las aplicaciones que han sido utilizadas para estudiar el papel de las proteínas Jun y Fos durante el desarrollo y en enfermedades. Fuente: Zenz y colaboradores (2008).

Proteína AP1	Fenotipo	Órgano/Célula afectada
Transgénico		
H2Kb-Jun	Ninguno	Ninguno
Ubiquitina C-JunB	Incremento masa ósea	Indefinido
CD4-JunB	Maduración células Th2 "intensificada"	Timo, timocitos CD4
Ubiquitina C-JunD	Células periféricas T y B reducidas	Linfocitos
H2Kb-Fos	Osteosarcoma	Hueso, osteoblastos
H2Kb-Fos/Rsk-2 ^{ly}	Osteosarcoma reducido	Hueso, osteoblastos
H2Kb-FosB	Ninguno	Hueso
TCRβ-ΔFosB	Diferenciación células T dañado	Timo, timocitos inmaduros
NSE-ΔFosB	Osteosclerosis	Hueso, osteoblastos
H2Kb-Fra-1	Osteosclerosis	Hueso, osteoblastos
CMV-Fra-2	Malformaciones oculares	Estructura anterior del ojo
H2Kb-Fra-2	Masa ósea incrementada, fibrosis	Hueso, órganos internos, piel
Knockout		
Jun	Embrión letal día 12,5	Hígado, corazón,
JunB	Embrión letal día 10	Tejido extraembrionario
JunD	Macho estéril	Testículos, espermátidas
c-Fos	Osteopetrosis	Hueso, osteoclastos
FosB	Defecto en la crianza	Cerebelo, hipotálamo
Fra-1	Embrión letal día 9,5	Tejido extraembrionario
Fra-2	Letal al nacimiento	Hueso, osteoclastos
Condicional		
Alfp-cre Jun	Defecto regeneración de hígado	Hígado, hepatocitos
Col2a1-cre Jun	Escoliosis	Hueso, células notocordales
Nestin-cre Jun	Defecto regeneración axonal	Sistema nervioso central, motoneuronas
MORE-cre JunB	Osteopenia	Hueso, osteoclastos, osteoblastos
K5-cre Jun	Ojos abiertos al nacer, tumores piel reducidos	Queratinocitos
Nestin-cre Fos	Defectos en aprendizaje	Cerebro, neuronas hipocampo
MORE-cre Fra-1	Osteopenia	Hueso, osteoblastos
Inducible		
K5-creER ^T JunB+Jun	Psoriasis	Piel, articulaciones, queratinocitos

1.7.3.2 La familia de proteínas ETS

ETS es una amplia familia de factores de transcripción evolutivamente relacionados presente en un rango de especies que van desde las esponjas hasta los humanos. Todos los miembros de la familia contienen un dominio de unión al DNA de aproximadamente

85 aa llamado el dominio ETS (*E26 transformation-specific*) (Setmenchenko & Watson, 2000). Este dominio altamente conservado define la familia y es el responsable del reconocimiento específico de secuencias de DNA ricas en purinas con un motivo común, 5'-GGA(A/T)-3' (Setmenchenko & Watson, 2000; Hollenhorst et al., 2011). La familia está compuesta por 27 y 26 miembros en humanos y ratón respectivamente, conocidos por regular la expresión de genes que son críticos en varios procesos biológicos, incluyendo la proliferación celular, diferenciación celular, desarrollo embrionario, transformación, apoptosis (Setmenchenko & Watson, 2000; Oliver et al., 2012), neoplasia, hematopoyésis, angiogénesis e inflamación (Oliver et al., 2012). Los factores de transcripción de esta familia interactúan con una multitud de elementos correguladores para obtener respuestas de genes específicos y conducir los distintos procesos biológicos en los que participa. Estas proteínas están controladas por una serie compleja de interacciones inter e intramoleculares y vías de señalización inciden en ellas para regular aún más su acción (Sharrocks, 2001). Pueden dirigir la expresión génica en estado normal o de enfermedad mediante la unión a promotores y potenciadores específicos facilitando el ensamblaje de otros componentes de la maquinaria transcripcional (Hollenhorst et al., 2011).

El reciente descubrimiento de los miembros de la familia ETS que se expresan exclusivamente en células y tejidos de origen epitelial ha despertado un gran interés en el papel que pueden desempeñar factores de transcripción ETS en células epiteliales. Los factores ETS-específicos epiteliales (*ESE, Epithelium-specific Ets transcription factor*); ESE-1 (ERT, Jen, Elf3, Esx), ESE-2 (Elf5), ESE-3 (EHF), y PDEF (PSE) se expresan principalmente en tejidos de origen epitelial (Andreoli et al., 1997; Kas et al., 2000; Feldman et al., 2003). ESE-1 y ESE-3 se expresan ampliamente en la mayoría de tipos de células epiteliales, mientras que la expresión de ESE-2 (Elf5) está restringida a los queratinocitos diferenciados y el epitelio glandular (Tummala & Sinha, 2006).

La expresión de Elf5 (*E74-like factor 5*) está altamente restringida al ectodermo extraembrionario, esencial para la formación de la placenta de mamíferos y la supervivencia del embrión en el útero (Donnison et al., 2005). De hecho, la generación de ratones Elf5 *knockout* ha demostrado que los embriones que carecen de ambos alelos de

Elf5 mueren muy temprano durante la embriogénesis, incluso antes del día 7.5 de desarrollo embrionario (Donnison et al., 2005; Zhou et al., 2005). Estudios recientes han demostrado que la pérdida de Elf5 está frecuentemente asociada con células de carcinoma mamario humano y con tejidos que presentan cáncer de mama, sugiriendo un papel potencial para actuar como supresor tumoral en cáncer de mama (He et al., 2007; Chakrabarti et al., 2012; Mathsyaraja & Ostrowski, 2012; Frend & Watson, 2013). En neonatos y adultos la expresión de Elf5 se restringe a tejidos ricos en células glandulares o epiteliales como piel, glándula mamaria, glándulas salivares, riñón, pulmón o estómago (Oettgen et al., 1999; Lapinskas et al., 2004; Metzger et al., 2007). En la piel, Elf5 se expresa mayoritariamente en la envoltura interna de la raíz del folículo piloso y en los queratinocitos diferenciados suprabasales (Tummala & Sinha, 2006; Choi et al., 2008).

Muchos miembros de la familia ETS contribuyen no sólo al desarrollo celular normal, sino que tienen además actividad oncogénica y supresora de tumores, de hecho su incorrecta regulación se asocia con muchos de los procesos que conducen a la iniciación, progreso y metástasis del cáncer (Rostad et al., 2007; Switzer et al., 2012).

2. OBJETIVOS

El objetivo global se ha centrado en determinar los mecanismos de regulación de la expresión de TREX2 en queratinocitos, siendo los objetivos concretos:

- 2.1** Analizar la expresión de TREX2 en piel y queratinocitos.
- 2.2** Caracterizar el promotor y los factores de transcripción implicados en la regulación de *Trex2*.
- 2.3** Evaluar la regulación epigenética del gen *TREX2*.
- 2.4** Determinar posibles alteraciones genéticas del gen *TREX2* en tumores derivados de queratinocitos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

3.1.1 Cultivos de líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas han sido las líneas de células murinas MCA3D y NIH3T3 y las líneas de células humanas HaCaT, HeLa y HEK-293 (Tabla M1). La línea MCA3D corresponde a una línea de queratinocitos inmortalizados no tumorigénicos de origen murino seleccionados en medio alto en Ca^{2+} . Fueron derivadas de cultivos epidermales de ratón neonato Balb/c y se desarrollaron al exponer cultivos primarios al carcinogénico DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) y al promotor de tumores TPA (*12-O-Tetradecanoylforbol-13-acetato*) (Kulesz-Martin et al., 1983). Estas células se crecen en medio F12-Ham (GIBCO-Invitrogen) suplementado con 10% de FBS y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma Aldrich). NIH3T3 es una línea celular fibroblástica establecida a partir de cultivos de embriones de ratón Swiss NIH (ATCC CRL-1658). Para su crecimiento se usa el medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FCS (Biowest) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P/S.

Para el cultivo de las células humanas HEK-293 (células embrionarias de riñón), HeLa (células epiteliales de cérvix) y HaCaT (queratinocitos humanos) se usó medio DMEM suplementado con 10% de FBS (PAA Laboratories) y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P/S. Las células HEK-293 se generaron por la transformación de cultivos primarios de células de riñón de embrión humano con el genoma esquilado del adenovirus (Ad)5 (Shaw et al., 2002). La línea celular HeLa fue derivada de un carcinoma de cérvix epidermoide humano (Lucey et al., 2009). Las células HaCaT son una línea celular epitelial humana no tumorigénica ni invasiva, originadas por la transformación espontánea de piel adulta que exhibe diferenciación normal (Boukamp et al., 1988).

Para la expansión de los cultivos, las células se procesan al alcanzar una confluencia del 90-100%. Se lavan con PBS y se les adiciona tripsina-EDTA (GIBCO, Invitrogen) durante el tiempo necesario para que se despeguen. La tripsinización se detiene añadiendo medio de cultivo específico del tipo celular (relación $\frac{1}{4}$ respecto a la tripsina). El volumen total obtenido se transfiere a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifuga a 1250 rpm durante 5 min. El pellet celular se resuspende en medio de cultivo, finalmente

las células se cuentan y siembran en placas de cultivo a la densidad deseada. Todos los cultivos celulares se mantienen en incubadores a 37°C y atmósfera 5% de CO₂.

3.1.2 Cultivo primario de queratinocitos humanos

Para los experimentos en cultivos primarios humanos se usaron queratinocitos epidérmicos normales humanos (NHEK, *normal humal epidermal keratinocytes*) (CellnTEc). El cultivo se hizo en medio basal CnT-02 o CnT-07 (CellnTec), ambos bajos en calcio (0.07 mM), suplementados con factores de crecimiento específicos para queratinocitos (CnT-02), 6 µg/ml de extracto pituitario bovino (CnT-57) y antibiótico/antimicótico (A/A) al 1% (PAA Laboratories, GmbH). Para favorecer la siembra se usó medio CnT-57 y para el crecimiento del cultivo se usó medio CnT-02. El medio del cultivo fue cambiado cada 2-3 días. El cultivo se mantuvo en un incubador a 37°C y atmósfera 5% de CO₂, para la expansión se siguió el mismo procedimiento aplicado en las líneas celulares.

3.1.3 Cultivo primario de queratinocitos de ratón

Para el cultivo primario de queratinocitos de ratón se adaptaron los protocolos utilizados por Blanco y colaboradores (2007) y Pirrone y colaboradores (2005). Los cultivos se realizaron a partir del aislamiento de la piel de ratones de la cepa C57BL/6 (neonatos de ~0-2 días) wt (*Trex2^{+/+}*) y *knockout* de *Trex2* (*Trex2^{-/-}*) (Parra et al., 2009). El protocolo es el siguiente: sacrificar los ratones por decapitación y amputar las extremidades usando material quirúrgico estéril. Esterilizar los cuerpos en etanol 70% ~1 min y conservarlos en PBS con A/A al 1% (PSA 1%) (PAA Laboratories) a 4°C entre 15-60 min. Posteriormente, separar la piel del cuerpo de cada ratón dejándola 1 min en PSA 1% y cambiarla a un nuevo recipiente con PSA 1%. Cada piel debe ser transferida con la cara de la dermis hacia abajo a una solución enzimática de dispasa (2.5 mg/ml) (Gibco, Life Technologies) y medio de cultivo especial para queratinocitos CnT-02 para su posterior incubación durante 4h a 4°C. El tiempo de acción enzimática es crucial para reducir la pérdida de la viabilidad de las

células basales de la epidermis pero deberá ser suficiente para conseguir separar la dermis de la epidermis. La separación del tejido se realiza fácilmente con la ayuda de pinzas quirúrgicas estériles. Una vez separadas incubar las epidermis 10 min a 37°C con solución enzimática de tripsina (Tryple, Invitrogen) diluida 1:1 en medio CnT-02. Rápidamente las células liberadas se filtran usando un colador celular estéril de malla de nylon con un tamaño de poro de 70 μm (Fisher Scientific) para deshacerse de restos epiteliales o células cornificadas y se recogen en tubos Falcon, luego se centrifugan a 1250 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Aspirar el medio y resuspender el pellet en medio CnT-02. Para liberar más células se adiciona medio CnT-02 a las placas conteniendo las epidermis durante 10-15 min. Estas células aisladas también se filtran, centrifugan y se resuspende el pellet conseguido. Se cuenta el número de queratinocitos aislados en una cámara de Neubauer y se siembran a una densidad de ~ 100000 - 200000 células/ml en placas previamente colagenadas con 7 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno I (Millipore). El cultivo se debe mantener en incubación a 37°C y atmósfera de 5% de CO_2 cambiando el medio cada 2-3 días hasta alcanzar 80-90% de confluencia a los 7-9 días. A partir del día 7, el cultivo está formado mayoritariamente por queratinocitos, únicas células capaces de crecer en el medio CnT-02, con baja concentración de calcio y factores de crecimiento específicos para queratinocitos.

Adicionalmente, se realizaron experimentos en queratinocitos primarios de ratón inmortalizados en el laboratorio. El protocolo de inmortalización consistió en realizar pases sucesivos del cultivo celular hasta conseguir células proliferantes que permitieran la continuidad del cultivo de queratinocitos de ratón wt o *Trex2^{-/-}*, obteniéndose las líneas inmortalizadas wt: wt-B2, wt-14/4, o wt-27/3 y *knockout*, KO-B. Estas células se mantuvieron en las mismas condiciones que los queratinocitos aislados de ratón.

3.1.4. Tripsinización y congelación de células

- Retirar el medio de los frascos de cultivo celular.
- Lavar con PBS (para un frasco de cultivo celular de 75 cm^2 se añaden 7 ml).

- Tripsinizar con 3.5 ml de tripsina-EDTA a 37°C. La concentración y el tiempo de exposición a la tripsina deben ser determinados empíricamente para cada tipo celular. Para parar la acción de la tripsina, añadir medio suplementado con FBS al 10 % en una relación de 1:4 con respecto a la tripsina.
- Recoger el máximo de células posible pipeteando hacia arriba y abajo.
- Centrifugar a 1250 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, descartar sobrenadante.
- Resuspender en 0.5 ml de medio de cultivo y añadir 175 µl FBS y 75 µl DMSO (para NIH3T3 usar FCS). En el caso de los queratinocitos de ratón o NHEK resuspender las células en 250 µl de medio y adicionar 250 µl de medio de congelación (CellnTec).
- Congelar inmediatamente a -80°C o/n (*overnight*) y posteriormente en nitrógeno líquido.

Tabla M1. Líneas celulares

Línea celular	Tipo celular	Origen
HaCaT	Queratinocitos	humano
HEK-293	Epiteliales riñón	humano
HeLa	Epiteliales cérvix	humano
MCA3D	Queratinocitos	ratón
NIH3T3	Fibroblastos	ratón
Cultivo primario	Tipo celular	Origen
Queratinocitos	Queratinocitos epidérmicos	ratón
NHEK	Queratinocitos epidérmicos	humano

3.2 Knockdown de ELF5

Los ensayos de *knockdown* de Elf5 en NHEK se realizaron utilizando partículas lentivirales productoras de shRNA-Elf5 (Santa Cruz) y como control shRNA-GFP (Santa Cruz). El protocolo se describe a continuación:

Día 1. Sembrar NHEK en una placa de 12 pocillos 24 horas antes de la infección viral con las partículas lentivirales. Añadir 1 ml de medio completo (con suplementos y

antibióticos) a las células o/n. Las células deben tener una confluencia aproximada del 50% el día de la infección.

Día 2. Preparar medio completo mezclado con *polybrene* (Invitrogen) a una concentración final de 5 µg/ml. Eliminar el medio de los pocillos y reemplazarlo con 1 ml de la mezcla de medio y *polybrene*. El *polybrene* es un poli-cation que neutraliza interacciones de carga aumentando la unión entre la cápsida pseudoviral y la membrana celular. Tener en cuenta que la exposición excesiva a *polybrene* (> 12 horas) puede ser tóxica para algunas células. Descongelar las partículas lentivirales a temperatura ambiente y mezclar suavemente antes de usar, una vez descongeladas mantenerlas en hielo. Infeccionar las células añadiendo 10 µl de las partículas lentivirales de shRNA al cultivo. Agitar cuidadosamente la placa para mezclar e incubar o/n. La cantidad de partículas virales necesarias varía mucho dependiendo de las características de la línea celular utilizada.

Día 3. Eliminar el medio de cultivo y reemplazar con 1 ml de medio completo (sin *polybrene*). Incubar células durante 2 noches.

Día 5-6 y en adelante. Si se quieren seleccionar los clones que expresan de forma estable el shRNA adicionar puomicina (2-10 µg/ml). Nosotros determinamos empíricamente que la concentración necesaria para que sólo las células no transducidas murieran era 0.5 µg/ml. Reemplazar el medio con puomicina cada 3-4 días hasta que las colonias resistentes puedan ser identificadas. En los experimentos de transducción transitoria, a partir del día 3 se cambió el medio de las células por medio completo sin *polybrene*, cada 3-4 días hasta alcanzar el día 7 de postconfluencia.

3.3 Muestras de queratinocitos *knockdown* de c-Fos, Jun-B, Fra-2 y c-Jun.

Las muestras de queratinocitos primarios de ratón con las deleciones condicionales de Fra-2 (Fra2^{f/f}) (Eferl et al., 2007), c-Fos (c-Fos^{f/f}) (Fleischmann et al., 1998), c-Jun/JunB (c-Jun^{f/f}/JunB^{f/f}) (Zenz et al., 2005) o c-Jun^{f/+}/JunB^{f/f} y c-Jun^{f/f}/JunB^{f/+} (Guinea-Viniegra et al., 2009) mediante infección con adenovirus que expresan la recombinasa Cre (AdCre) y como control, infectadas con adenovirus que expresan la proteína GFP (AdGFP), fueron

cedidas por el laboratorio de Genes, Desarrollo y Enfermedad (CNIO, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid).

3.4 Análisis del DNA

3.4.1. Extracción y purificación de DNA

Este método de extracción permite obtener ácidos nucleicos a partir de diversas fuentes, de gran calidad y pureza para su posterior análisis. Si la extracción se hace a partir de células es aconsejable usar $\sim 5-10 \times 10^6$ y si es a partir de tejido entre 30-50 μg .

- Lavar las células o el tejido con PBS y centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos.
- Resuspender el pellet en 0.5 ml de tampón de digestión (20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS y agua bidestilada) y añadir 40 $\mu\text{l/ml}$ de proteinasa K (stock 10 mg/ml). Dejar Incubando a 55°C o/n.
- Añadir 300 μl de NaCl saturado y agitar por inversión 25-50 veces.
- Dejar 10 minutos en hielo y centrifugar 30 minutos a 4°C y 15000 rpm.
- Pasar el sobrenadante ($\sim 700 \mu\text{l}$) a nuevos eppendorf de 1.5 ml, descartar el pellet.
- Centrifugar 1 minuto y repetir el paso anterior usando tubos eppendorf nuevos.
- Agregar 800 μl de isopropanol.
- Agitar por inversión y dejar 15 minutos en un rotador a 4°C.
- Centrifugar a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C para observar el pellet de DNA, decantar la solución.
- Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70%, agitar por inversión $\sim 10-20$ veces, centrifugar 2 minutos y decantar la solución nuevamente.
- Centrifugar el pellet 20 segundos para recoger el etanol y aspirarlo con la ayuda de una pipeta teniendo cuidado de no molestar el pellet.
- Dejar secar el etanol residual 15 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender en 70 μl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1mM EDTA pH 8.0).
- Hidratar 15 minutos a 55°C y conservar a -20°C.

3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR

Antes de preparar la reacción se deben preparar los reactivos y ponerlos en hielo, escoger los *primers* que serán utilizados para la amplificación del DNA. Encender el termociclador y preparar el programa deseado. Centrifugar el DNA molde y adicionar entre 100-500 ng a tubos eppendorf de 0.2 ml en hielo.

La reacción se prepara mezclando los siguientes reactivos:

	Reacción (μ l)
DNA molde	x
Tampón 10X	2.5
Oligonucleótido <i>forward</i> (20 μ M)	0.375
Oligonucleótido <i>reverse</i> (20 μ M)	0.375
dNTPs	0.5
agua bidestilada	y
Taq polimerasa	0.35
	25 μ l

El tipo de Taq DNA polimerasa empleada para la reacción de PCR fue la del sistema *High Fidelity PCR* (Roche). Se usaron diferentes programas dependiendo del tipo de DNA a amplificar, el tamaño del fragmento la T_m del oligo (T_m , temperatura de *melting* definida como la temperatura a la cual el 50% de los *primers* se encuentran unidos a su ácido nucleico diana y el otro 50% en solución). El programa estándar para la amplificación se basó en los siguientes ciclos y criterios: para la desnaturalización 1 ciclo a 97°C, 60 seg; 39 ciclos a 94°C por 45 seg, para la temperatura de anillamiento de cada *primer* usar la T_m recomendada por el fabricante durante 45 seg y para la elongación 68 °C y 1 minuto/Kb DNA. Para la elongación final hacer 1 ciclo a 72°C, 10 minutos. Este programa fue utilizado como plantilla y modificado para favorecer la amplificación según fuese necesario. Finalmente se corren las muestras en un gel de agarosa mediante electroforesis para su posterior caracterización y análisis.

3.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que permite separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Se basa en la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Además, permite la localización del DNA en el gel tiñendo con una concentración muy baja de bromuro de etidio (0.1 µg/ml), un agente intercalante fluorescente utilizado como colorante que suele incorporarse entre las bases nitrogenadas del DNA. Esta técnica permite detectar cantidades de hasta 2 ng de DNA teñido. El protocolo a seguir es el siguiente:

- Diluir tampón TBE 5x (Tris-Base, ácido bórico, 0.5M EDTA pH 8.0, agua bidestilada) y preparar la cantidad adecuada de TBE 1x (200 ml TBE 5x, 800 ml de agua destilada) para hacer el gel y rellenar la cubeta de electroforesis. Para preparar el gel, pesar la agarosa según porcentaje deseado. La concentración del gel dependerá del tamaño de las moléculas a separar, pero usualmente está entre 0.8-1%, para fragmentos entre 500 pb y 1000 pb.
- Calentar la mezcla durante 2-3 minutos hasta que la agarosa se disuelva, esperar un minuto para dejar enfriar el líquido y agregar bromuro de etidio al 1%. Mezclar suavemente y verter en la cubeta molde previamente delimitada con cinta adhesiva, poner el peine y dejar enfriar hasta que solidifique. Una vez formado el gel, quitar peine y cinta cuidadosamente y ubicar el gel en la cubeta de electroforesis cubriéndolo completamente con tampón TBE 1x.
- Para preparar la muestra adicionar tampón de carga 6x (0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol, trazas de xileno cianol y agua bidestilada) y cargar el gel. Reservar un pocillo para el marcador de peso molecular.
- Conectar los cables a la cubeta de forma que el DNA migre hacia el ánodo y aplicar un voltaje de 100-120V durante ~40-60 minutos.
- Mirar el gel en un transiluminador UV y sacar una fotografía.

3.4.4 Secuenciación automática de DNA

Antes de secuenciar la muestra, el DNA debe purificarse. Se utilizó el kit *Pure Link PCR purification* (Life Technologies) con el fin de eliminar enzimas, productos de PCR fallidos, dNTPs o sales derivadas de los productos. Este sistema permite purificar tanto productos de PCR en solución como en gel. Una vez purificado el DNA se procede con la reacción para la secuenciación. Los *primers* utilizados se relacionan en el Anexo A.

Inicialmente la reacción se prepara mezclando los siguientes componentes:

	Reacción (μ l)
DNA molde (100-500 ng)	x
Oligonucleótido (5 μ M)	1
<i>BigDye</i> 3.1	1
Tampón para el <i>BigDye</i> 3.1	3
agua bidestilada	y
	20 μ l

Una vez hecha la mezcla se pone la reacción en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 96°C por 1 minuto; 25 ciclos a 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg y 60°C durante 4 minutos; 4°C hasta recoger la muestra.

La obtención de las secuencias se llevó a cabo en un secuenciador *ABI prism 3730* (Applied Biosystems) en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) y éstas fueron analizadas con el software *sequence scanner v1.0* (Applied Biosystems).

3.4.5. Genotipaje del gen *TREX2*

Para el estudio del genotipaje del gen *TREX2* humano en tumores del epitelio escamoso (SCC, *Squamous Cell carcinoma*) se utilizaron muestras de sangre y tejido tumoral proveniente de pacientes diagnosticados con cáncer escamoso de cabeza y cuello (HNSCC, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*,) cedidas por el Banco Nacional de DNA (Universidad de Salamanca, España). Por otro lado, se analizaron también muestras de

individuos sanos con la misma distribución de edad y sexo para ser usadas como control. La extracción del DNA tumoral y de sangre fue llevada a cabo por el Banco Nacional de DNA siguiendo los procedimientos estándares. Para las reacciones de PCR se usaron 50 ng de DNA genómico y para la amplificación del gen *TREX2* se diseñaron parejas de oligonucleótidos diferentes (Anexo A, *primers*) que abarcaron la secuencia codificante completa de *TREX2* y de las regiones no codificantes (Cromosoma X: 152710145-152713410). La pareja AF1-DR2 resultaba en un amplicón de 3265 pb, el cual contenía los tres exones del gen, un fragmento 5'UTR de 88 pb y un fragmento 3'UTR de 33 pb. Las demás parejas se utilizaron sólo en algunas muestras donde la amplificación del fragmento de 3265 pb resultó difícil. El programa utilizado para la PCR fue el siguiente: Un ciclo de 3 minutos, 98°C, 30-40 ciclos de 15 seg, 98°C; 25 segundos, 60°C; 2-4 minutos, 68°C. Los productos de PCR resultantes se comprobaron en geles de agarosa, para comprobar la presencia de una sola banda y el tamaño esperado. Posteriormente, fueron purificados y secuenciados en las dos cadenas utilizando los *primers* reunidos en el anexo. Finalmente, fueron alineados con la secuencia conocida del DNA codificante. Los nuevos polimorfismos encontrados fueron introducidos en la base de datos NCBI.

3.5. Análisis del RNA

3.5.1. Purificación de RNA y transcripción reversa (RT)

El RNA total de tejidos o células usados en esta tesis se aisló usando el kit comercial de extracción de RNA *NucleoSpin RNA/Protein* (Macherey-Nagel) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Una vez purificado se cuantifica mediante un espectrofotómetro *Nanodrop* y el software *Nanodrop ND-1000 3.3* y se iguala la concentración de RNA. Posteriormente, para transformar el RNA a cDNA se realiza una reacción de retrotranscripción (Applied Biosystems) usando entre 0.8-1 µg de muestra del RNA purificado. Para la retrotranscripción se mezclan los siguientes componentes:

	Reacción (μ l)
RNA molde	x
RT Buffer 10X	1
<i>random primer</i> 10X	0.5
<i>primer</i> Oligo dT	0.5
dNTP's 25x	0.4
inhibidor RNasa	0.5
transcriptasa reversa	0.5
agua bidestilada	y
	10 μ l

En esta reacción se utilizan *random primers* (Applied Biosystems) (*primers* de secuencias al azar para amplificar cualquier secuencia) y *primer* Oligo dT (Applied Biosystems), el cual reconoce la cola poli-A de mRNA. Para aumentar la sensibilidad de detección del mRNA de *TREX2*, se realizó la retrotranscripción con *primers* específicos para *TREX2* y HPRT (Anexo A).

Los ciclos realizados en el termociclador fueron: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C durante 5 minutos y 4°C indefinidamente. Finalmente, a partir del cDNA obtenido se procede a realizar la PCR cuantitativa.

3.5.2. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa o qPCR permite analizar perfiles de expresión génica, evaluando la abundancia relativa de los transcritos para determinar patrones de expresión entre muestras. Los niveles de expresión se normalizaron con el mRNA del gen de expresión constitutiva HPRT. Las amplificaciones del cDNA se hicieron mediante el uso de sondas *TaqMan* o *SYBR Green* (Applied Biosystems) y *primers* específicos para cada gen en un volumen final de 5 μ l. Se utilizó 1-2 μ l de cada muestra de cDNA a la que se le añadió para el sistema *SYBR Green*: 0.4 μ l de oligonucleótidos específicos a 5 μ M, 2.5 μ l de *SYBR Master Mix* y agua bidestilada; y para las sondas *TaqMan*: 2.5 μ l de *TaqMan Master Mix*, 0.25 μ l de la sonda específica y agua bidestilada. En el Anexo A y B se resumen los *primers* y sondas utilizados, respectivamente. Como control negativo se usaron muestras sin transcriptasa reversa.

La cantidad de producto fluorescente se determina al final de cada ciclo mediante lectura única. El software *SDS2.2.2* (Applied Biosystems) fue usado para determinar las curvas de separación y el punto de cruce o “*crossing point*” (Cp) que corresponde al número de ciclos donde la fluorescencia del producto supera un límite determinado para cada transcrito. Cps superiores a 40 ciclos quedan fuera del límite de sensibilidad del sistema. La expresión relativa (R) de los genes analizados se calculó en base a la eficiencia de amplificación y la diferencia de Cp de la muestra respecto de su control en comparación con el gen de referencia, según la fórmula:

$$R = E(\text{problema})^{\Delta C_p(\text{control-muestra})} / E(\text{normalizador})^{\Delta C_p(\text{control-muestra})}$$

Donde E corresponde a la eficacia del gen problema y normalizador en la PCR en tiempo real y ΔC_p la diferencia entre el valor de Cp del control respecto a la muestra para el gen problema y normalizador. Los productos obtenidos de la PCR en tiempo real se analizaron en un gel de agarosa al 1% para comprobar la amplificación de un único producto del tamaño esperado. La qPCR se llevó a cabo en el equipo *Real Time ABI Prism 7900HT* (Applied Biosystems). El programa utilizado para la amplificación de la qPCR consiste en: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C; 1 ciclo de 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 60 seg a 60°C; 1 ciclo final de 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C y 15 seg a 95°C.

3.6. Análisis de la expresión proteica

3.6.1. Extractos totales

Los pasos para la obtención de extractos totales a partir de células adherentes en cultivo se describen a continuación.

- Poner las placas en hielo y lavar las células dos veces con PBS frío.
- Agregar tampón de lisis RIPA (1% deoxycolato de Na, 1% NP40, 0.1 % SDS, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, agua bidestilada) añadiendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (100µl de tampón por cada pocillo de placas de 6 pocillos). Este tampón debe guardarse a 4°C y mantenerse en frío durante la extracción. El reactivo de lisis RIPA es altamente efectivo para la extracción de proteínas a partir de una gran

variedad de tipos celulares. Las concentraciones utilizadas en los inhibidores de proteasas y fosfatasa se indican en la Tabla M2.

- Dejar actuar el tampón durante 2-3 minutos, con un raspador de células recoger el extracto en tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Centrifugar el lisado a 1200 rpm, a 4°C 5 minutos para obtener la fracción soluble.
- Extraer el sobrenadante y procesar o congelar inmediatamente.

Tabla M2. Inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Inhibidores de proteasas			
Inhibidor	Disolvente	Stock	Concentración final
Leupeptina	agua	10 mg/ml	10 µg/ml
PMSF	metanol ó isopropanol	200 mM	1 mM
Aprotinina	agua	10 mg/ml	10 µg/ml
Iodoacetamida	agua	86 µg/ml	0,46 mM
Inhibidores de fosfatasa			
NaF	agua	200 mM	1 mM
Na ₃ VO ₄	agua	200 mM	1 mM

3.6.2. Cuantificación de proteínas

Generalmente la valoración de proteínas se realiza utilizando dos métodos, principalmente en función de la composición del tampón de lisis de las muestras, la sensibilidad y la interferencia con determinados agentes. Los métodos de cuantificación de proteínas utilizados han sido el Bradford y BCA (*ácido bicinónico*). Si las muestras están lisadas en RIPA, se usa BCA porque con Bradford precipita.

Método Bradford

- Diluir 1:5 el reactivo Bradford (BioRad) en agua justo antes de empezar la valoración.
- Realizar el blanco con tampón de dilución de las muestras comprobando que no haya interferencia.
- Para la cuantificación de proteína se debe realizar una curva patrón con BSA. La recta patrón abarca entre 0 y 10 µg/ml.
- Añadir a cada pocillo 200 µl del reactivo de Bradford diluido.

- Para la valoración de la proteína de interés añadir 0.5-1 μ l de la muestra por 200 μ l del reactivo de Bradford diluido.
- Realizar la lectura de la absorbancia a 595 nm en el lector de placas, utilizando como blanco el tampón de dilución de las muestras.

Método BCA

Para la determinación de la concentración de proteína por BCA se usó el kit *Pierce BCA* (Thermo scientific) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

- Diluir 1:50 el reactivo A en el B.
- Obtener la recta patrón tal y como se ha explicado en el método Bradford pero reemplazando el reactivo de Bradford por el de BCA.
- Para la valoración de la proteína de interés añadir 0.5-1 μ l de la muestra por 200 μ l del reactivo BCA diluido.
- Incubar 30 minutos a 37°C.
- Realizar la lectura de la absorbancia a 595 nm en el lector de placas utilizando como blanco el tampón de dilución de las muestras.

3.6.3. Preparación de las muestras para western blot

Una vez cuantificada la cantidad de proteína proveniente de los extractos de tejido o cultivo celular se procede a preparar la muestra para su detección mediante western blot.

- Las muestras se desnaturalizan en el tampón Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.7% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, trazas de azul de bromofenol y agua) y se calientan durante 5 minutos a 95°C.

3.6.4 Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

El análisis de los extractos celulares se realiza por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando el sistema *Mini-Protean 3*

(BioRad- Laboratories) para el que se preparan geles de acrilamida. Para obtener los geles es necesario preparar dos capas: la del gel separador (*running*) y la del gel concentrador (*stacking*) como se describe a continuación:

- El gel separador se prepara mezclando las soluciones que se describen en la Tabla M3. Se recomienda empezar por el agua y continuar con el orden descendiente de la tabla agregando por último TEMED. Esperar unos minutos hasta conseguir la completa polimerización del gel (los volúmenes descritos se han ajustado para preparar 4 geles de SDS-acrilamida).
- Una vez polimerizado el gel separador se mezclan las soluciones del gel concentrador al 4% (Tabla M3) y se espera también hasta que el segundo gel quede completamente polimerizado.
- Cargar los extractos totales previamente obtenidos en el orden deseado.
- Los geles deben correrse en tampón SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1 % SDS) a 110V.

Tabla M3. Soluciones utilizadas para la preparación de un gel para western blot.

Soluciones (ml)	Gel separador			Gel concentrador
	Porcentaje acrilamida			
	8%	10%	12%	4%
Agua	13.9	11.9	9.9	9.15
Acrilamida	8.0	10	12	1.95
1.5 M Tris, pH 8.8	7.5	7.5	7.5	3.75 (pH 6.8)
10% SDS	0.3	0.3	0.3	0.15
10% APS	0.3	0.3	0.3	0.075
Temed	0.018	0.012	0.012	0.015

3.6.5 Transferencia de proteínas a soportes membranosos

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por medio de anticuerpos deben transferirse a membranas de PVDF o nitrocelulosa (BioRad-Laboratories).

Las membranas de PVDF se activan con metanol al 100% durante 10-15 segundos, lavarlas 5 minutos con agua y reservar en tampón de transferencia 1x (20% metanol, Tris-Glicina 1x).

- La transferencia se hace a 100V usando tampón de transferencia 1x, durante 60-90 minutos a 4°C.

3.6.6 Bloqueo de las membranas

- Preparar tampón TBST 1x (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 0.05% Tween 20).
- Bloquear las membranas con leche desnatada al 5% (5 g de leche en 100 ml de tampón TBST) a 4°C durante 1 h o o/n en agitación. Este procedimiento permite el bloqueo de lugares de unión no específicos del anticuerpo que hayan quedado libres en la membrana después de la transferencia, favoreciendo la unión específica anticuerpo-antígeno y evitando inespecificidad y falsos positivos.
- Lavar las membranas con el tampón TBST tres veces durante 5 minutos en agitación.

3.6.7 Detección de proteínas con anticuerpos específicos

Después del bloqueo, las membranas se hibridan con el anticuerpo primario. En general los anticuerpos reconocen una secuencia de aminoácidos pequeña o epítipo que queda expuesta al eliminar la estructura tridimensional de la proteína en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

- Para la primera hibridación, incubar las membranas con el anticuerpo primario durante 90 minutos a temperatura ambiente o a 4°C o/n, las membranas deben estar sumergidas en su totalidad y en agitación suave. El anticuerpo se diluye en TBST 1x y ácida sódica (NaAz) al 0.02% para su conservación. Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas se resumen en la Tabla M4. Lavar las membranas con TBST tres veces durante 5 minutos en agitación.
- Una vez hecha la incubación con el anticuerpo primario se incuban las membranas con el anticuerpo secundario durante 45 minutos a temperatura ambiente, teniendo en cuenta el origen del primario para evitar confusiones. Los anticuerpos secundarios y sus respectivas diluciones fueron: HRP- α -rabbit (1:15000), HRP- α -goat (1:20000), HRP- α -mouse (1:10000), HRP-A/G (1:100000) (Pierce).

- Al finalizar la incubación lavar las membranas cinco veces por cinco minutos con TBST y proceder con el revelado.

3.6.8 Detección por quimioluminiscencia

Finalmente se revelan las membranas con el producto *EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP* (Biological Industries) que permite detectar por quimioluminiscencia anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) usando películas de rayos X o *films X-omat* (Kodak).

- Mezclar los dos reactivos del ECL a una dilución 1:1 e incubar las membranas con el reactivo.
- Dejar actuar durante un minuto asegurándose de que toda la membrana entre en contacto con el producto.
- Montar las membranas en un casete de revelado usando film transparente para separar las membranas de la superficie.
- Poner una película de rayos X sobre las membranas y hacer diferentes tiempos de exposición y revelar.

Tabla M4. Listado de anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Dilución	Peso Molecular antígeno (kDa)	Distribuidor
β -actina	monoclonal	ratón	1/10000	45-50	GenScript
TREX2-ratón	policlonal	conejo	1/2000	28	Generado en el laboratorio
TREX2 humano	policlonal	goat	1/2000	28	Cedido por el Dr. Fred W Perrino
Elf5	policlonal	goat	1/1000	31	Santa Cruz Biotechnology
Flag	monoclonal	ratón	1/2000	2.7	Sigma-Aldrich
HA	monoclonal	ratón	1/1000	2.9	Cedido por el Dr. Raúl Estévez
Involucrina	monoclonal	ratón	1/3000	170	Sigma-Aldrich
GFP	policlonal	conejo	1/1000	27	Abcam
K10	monoclonal	ratón	1/200	60	Abcam

3.7 Inmunotinción

La técnica de inmunotinción permite demostrar la presencia de antígenos en células (Inmunocitoquímica) o tejidos (Inmunohistoquímica) utilizando anticuerpos marcados, basándose en la capacidad de los últimos para unirse específicamente a sus correspondientes antígenos. Los protocolos usados en el laboratorio se describen a continuación.

Inmunocitoquímica (ICQ)

Sembrar las células en placas multiwell de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos estériles. Para el caso de los queratinocitos primarios de ratón deben ser tratados previamente con colágeno I.

- Una vez en la confluencia deseada se realizan los tratamientos indicados.
- Lavar con PBS dos veces y fijar con 200 μ l/pocillo de paraformaldehído diluido en PBS al 4%, 10 minutos y a temperatura ambiente.
- Lavar dos veces con PBS.
- Permeabilizar añadiendo 200 μ l/pocillo de tritón X-100 (Fluka Biochemika) al 0.1% diluido en PBS sobre los cubres de vidrio e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar dos veces con PBS.
- Para el bloqueo de las uniones inespecíficas añadir 200 μ l/pocillo de una solución de bloqueo con FBS al 20% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar nuevamente dos veces con PBS.
- Para la inmunotinción incubar con 25 μ l del anticuerpo primario previamente diluido en solución de bloqueo, durante 1h y en cámara húmeda para evitar su evaporación.
- Lavar 3 veces con PBS.
- Incubar con el anticuerpo secundario marcado con fluorocromos, previamente diluido en solución de bloqueo, durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Lavar tres veces con PBS.

- Para el marcaje del DNA incubar los cubreobjetos 5 minutos a temperatura ambiente con 200 μ l/pocillo de una dilución de DAPI 1/20000 (Sigma) o DRAQ5 (1/2000) (Biostatus Limited) en PBS.
- Finalmente lavar una vez más con PBS y situar los cubres con células sobre portaobjetos estándar para microscopía con solución de montaje *ProLong Gold* (Invitrogen). Se dejan secar protegidos de la luz y se procede al análisis en un microscopio de fluorescencia.

Las imágenes se capturaron en un microscopio de fluorescencia *Nikon E-800* con objetivos de 40 y 100 aumentos (CCiTUB, Bellvitge) y un microscopio confocal de barrido láser *Leica TCS-SL filter-free* (Leica Microsystems, Germany) con objetivos de inmersión en aceite de 40 y 63 aumentos. Las imágenes fueron procesadas con el software *ProgRes CapturePro* (Jenoptik). Los anticuerpos primarios y sus respectivas diluciones fueron: rabbit- α -mouse TREX2 purificado por afinidad en el laboratorio (1/50), rabbit- α -humanTREX2 (1/500), mouse- α -Involucrin (1/200) (Acris). IgG goat- α -rabbit acoplada a *Alexa Fluor-555* e IgG goat- α -mouse acoplada a *Alexa Fluor-488* fueron los anticuerpos secundarios (Life Technologies) y todos se diluyeron 1/500.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Fijar las muestras de piel de ratón con paraformaldehído al 4% en PBS o/n. Al día siguiente cambiar a etanol 70% durante 24h, luego a etanol 96% 4h y posteriormente a etanol 99% durante 3h. Finalmente poner en xilol 1h.

- A continuación dejar las muestras en una bandeja con parafina fundida en una estufa a 60°C o/n. Al día siguiente se cambia la parafina por parafina nueva y se dejan 4h en la estufa. Para terminar se procede a montar los bloques de parafina (Leica Paraffin Embedding Station EG1140H, Leica). Los bloques solidificados se dejan a -20°C hasta el momento de cortar.
- Los cortes se hicieron de 5 μ m de grosor con un microtomo (Leica RM2235) y se dejaron secar sobre cubreobjetos recubiertos de polilisina al 5% (Sigma). Una vez secos se procede al desparafinado y la rehidratación. Los cortes se dejan 1h en la

estufa a 60°C para deshacer la parafina y después se sumergen en una serie de cubetas con diferentes concentraciones de alcoholes como sigue:

1. Xilol, se dejan 15 minutos en cada cubeta (x3)
2. Etanol absoluto, 3 minutos en cada cubeta (x3)
3. Etanol 96%, 3 minutos en cada cubeta (x3).
4. Etanol 70%, 3 minutos en cada cubeta (x3).
5. Etanol 50%, 3 minutos en cada cubeta (x3).
6. Agua destilada, 5 minutos (x1).

Una vez se tienen los tejidos en agua, se procede con la tinción por IHQ. Para esto, los cortes se someten al desenmascaramiento de epítomos llevándolos a ebullición 20 minutos en tampón citrato (10 mM Citrato de Na, pH 6.0) o tampón Tris-EDTA (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 9). Se dejan enfriar o/n y al día siguiente se hace la tinción. Los cortes se lavan dos veces con PBS y se delimita con un rotulador de trazo hidrofóbico *Dako pen* (Dako) el área de los tejidos para ajustar el volumen de las incubaciones. A partir de aquí se procede de igual forma que en la ICQ iniciando en el paso de bloqueo de las uniones inespecíficas.

3.8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

3.8.1 *Crosslinking* del DNA

El primer paso en el protocolo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation*) es el entrecruzamiento (*crosslinking*) del DNA. El *crosslinking* consiste en estabilizar las uniones DNA-proteína mediante enlaces covalentes. Este protocolo se ha estandarizado para aproximadamente 2×10^7 células adherentes totales.

- Adicionar paraformaldehído a una concentración final del 1% directamente al medio de cultivo celular o muestra de tejido. Incubar en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Parar la reacción con glicina a una concentración final de 0.125 M y mantener en agitación 5 minutos más. Ubicar las células en hielo, eliminar el medio y lavar dos veces con PBS frío.
- Barrer las células con la ayuda de un raspador en 1-4 ml de PBS frío. Centrifugar 5 minutos a 4°C y 2000 rpm y congelar el pellet a -80°C o resuspender en buffer de lisis celular frío (5 mM pipes pH 8.8, 5 mM KCl, 0.5% NP-40, agua bidestilada) a razón de 0.5 ml/50 mg de tejido o 3 millones de células, con inhibidores. Incubar en hielo 10-15 minutos.
- Centrifugar 5 minutos, 4°C y 2000 rpm y descartar el sobrenadante. Resuspender en buffer de lisis nuclear (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, agua bidestilada) a razón de 0.5 ml/50 mg de tejido o 3 millones de células, con inhibidores e incubar en hielo 15-20 minutos y proceder a sonicar las células.

En el caso de que el ChIP se haga a partir de tejido, el protocolo a seguir es el siguiente:

- Pesar el tejido y añadir 250 µl de PBS frío por 50 mg de tejido hasta un máximo de 2 ml, poner en hielo.
- Eliminar tejido necrótico o grasa de la muestra. Con la ayuda de dos bisturíes cortar el tejido en pequeños pedazos (lo más pequeño posible).
- Transferir el tejido en PBS a un Falcon de 50 ml y adicionar PBS a temperatura ambiente (200 µl PBS/50 mg tejido) con inhibidores y proceder con el *crosslinking*.
- Adicionar paraformaldehído a una concentración final de 1%.
- Mezclar suavemente e incubar en un rotador a temperatura ambiente durante 10 minutos y parar la reacción con glicina 0.125 M durante 5 minutos.
- Transferir los Falcon al hielo, centrifugar a 4°C, 2000 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y lavar el pellet con PBS frío.
- Centrifugar a 4°C, 2000 rpm durante 10 minutos y resuspender la muestra en 2 ml de PBS frío con inhibidores.
- En hielo, disgregar el tejido, moviendo repetidas veces el Falcon hacia arriba y abajo para homogeneizarlo y repetir tantas veces como sea necesario.

- Centrifugar a 2000 rpm, 10 minutos a 4°C, descartar el sobrenadante y lavar una vez con PBS frío. Centrifugar nuevamente, decantar el pellet y congelar a -80°C o proceder a lisar el tejido con los tampones de lisis como se explicó anteriormente, posteriormente pasar a sonicar.

3.8.2 Sonicación

El sonicador utilizado fue un *Branson Sonifier 250* y las condiciones de sonication siempre fueron: ciclo (*duty cycle*): 80%; control de salida (*output control*): 6. Sonicar haciendo 10 ciclos de 10 seg en el caso de la epidermis y 12 ciclos para el hígado, con intervalos de 30 seg entre ciclo y ciclo. Se deben mantener las muestras en hielo durante toda la sonicación. Una vez sonicado centrifugar a 4000 rpm, 5 minutos a 4°C y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. La muestra obtenida ahora es la cromatina, la cual se puede mantener en hielo hasta una semana. Se debe determinar empíricamente el punto de sonicación adecuado y para hallarlo hace falta comprobar el estado de la cromatina como se explica a continuación.

3.8.3 Reverse-crosslinking del DNA

Tomar una alícuota de la cromatina sonicada (20 µl) y añadir 20 µl de SDS 10% y 250 µl de TE. Incubar en agitación durante 3-4h o o/n a 65°C.

- Adicionar 6.25 µl de RNasa A a una concentración de 0.5 mg/ml, incubar a 37°C 1h.
- Añadir 250 µl TE y 10 µl de proteinasa K a una concentración de 0.4 mg/ml e incubar 1-2h a 37°C en agitación.
- Añadir 55 µl de 4M LiCl seguido de 500 µl de fenol-cloroformo, mezclar vigorosamente en un vórtex y centrifugar 15 minutos, 14000 rpm a temperatura ambiente. Extraer la fase acuosa (sobrenadante) y agregar 900 µl de etanol 96% y agregar 1 µl glicógeno (Roche) por muestra.
- Precipitar a -80°C por 10 minutos o a -20°C o/n.

- Centrifugar las muestras 30 minutos a 4°C, 13000 rpm y comprobar la presencia del pellet. Descartar el sobrenadante y adicionar 500 µl de etanol 70%. Mezclar y centrifugar nuevamente 5 minutos, descartar el sobrenadante.
- Hacer una centrifugación corta para coleccionar el etanol residual y eliminarlo con el fin de permitir que el pellet se seque a temperatura ambiente.
- Resuspender el pellet in 30 µl de agua o TE y analizar 20 µl por electroforesis para comprobar el tamaño de los nucleosomas (500-1000 pb) o proceder con la qPCR si la muestra se ha inmunoprecipitado.

3.8.4 Inmunoprecipitación

Los siguientes pasos deben realizarse en hielo durante todo el proceso.

- Medir la concentración de la cromatina sonicada y utilizar para la inmunoprecipitación 100 µg de cromatina por condición. Guardar una alícuota de 50 µl (10% de la IP) como el input y mantener a -20°C. Separar tantas muestras de cromatina como condiciones se tengan.
- Adicionar tampón de dilución (0.01% SDS, 1.1 Tritón x-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl) alcanzar 500 µl e incubar o/n a 4°C.
- Agregar *beads* magnéticas (*beads Magna ChIP protein A+G*; Millipore) (20-µl) previamente lavadas 2 veces con tampón de dilución de IP (volumen de lavado 1:1) resuspender las *beads* en el mismo buffer y distribuir las igualmente en las muestras inmunoprecipitadas. Incubar 2 horas a 4°C en una noria.

Los anticuerpos utilizados para el ChIP incluyen: α-Elf5 (Santa Cruz), α-H3K4me3 (Millipore), α-IgG (Millipore), α-c-Jun (Santa Cruz). Posteriormente se lava el complejo como se describe a continuación:

1^{er} lavado (x3): 1 ml de tampón bajo en sales (0.1% SDS, 1% Tritón x-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl).

2^{do} lavado (x2): 1 ml de tampón alto en sales (0.1% SDS, 1% Tritón x-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) dos veces.

3^{er} lavado (opcional, x1): 1 ml tampón de LiCl (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de Na, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1).

4^{to} lavado (x1): 1 ml TE frío.

Cada lavado debe hacerse a 4°C, 5-10 minutos (excepto el de LiCl, sólo durante 5 minutos) en una noria, centrifugar 1 minuto a 4°C y 4000 rpm las muestras y remover el tampón sin perturbar las *beads*. Proceder con la elución.

3.8.5 Elución de los complejos DNA/proteína/anticuerpo

Los siguientes pasos pueden hacerse a temperatura ambiente.

- Adicionar 150 µl de tampón de elución (1% SDS, 100 mM NaHCO₃, agua bidestilada) a cada muestra, incubar 20 minutos en una noria a temperatura ambiente, recoger sobrenadante en nuevos tubos eppendorf.
- A las *beads* adicionarles 100 µl de tampón de elución, incubar nuevamente 20 minutos en noria a temperatura ambiente, recoger el sobrenadante y mezclarlo con el obtenido anteriormente.

Eluidas las muestras (250µl), se debe liberar el DNA mediante *reverse crosslinking*, tanto de las muestras inmunoprecipitadas como del *input*, tal y como se describió previamente en el *reverse crosslinking*. Se inicia en la incubación o/n a 65°C sin añadir SDS pues este ha sido previamente adicionado en la elución. De esta manera obtendremos el DNA listo para hacer la qPCR. Los *primers* utilizados para la qPCR de las muestras del ChIP se describen en el anexo A.

3.9 Análisis por amplificación de extremos 5´ y 3´ de DNA complementario (RACE)

Para la caracterización de los extremos 5´ y 3´ no traducidos del gen *Trex2* murino y *TREX2* humano se utilizó RNA total procedente de piel y queratinocitos humanos y de ratón. Se empleó el kit *GeneRacer* (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Esta técnica se basa en el método *RLM-RACE* (*RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends*), el cual consiste en el pre-tratamiento del RNA total con el fin

de eliminar moléculas de mRNA incompletas, así como descartar cualquier RNA ribosomal o de transferencia mediante reacciones enzimáticas que seleccionan el mRNA completo y de buena calidad. Para ello, el RNA total se trata con fosfatasa intestinal de ternera (CIP), este paso remueve el fosfato del extremo 5' de los mRNAs truncados o no mRNAs seleccionando así mRNAs completos y en buen estado ya que el tratamiento con CIP no tiene efecto en mRNAs completos. Seguidamente el RNA desfosforilado se trata con la pirofosfatasa ácida de tabaco (TAP) con el fin de remover la estructura capsular 5' del mRNA completo y dejar un extremo fosfato 5' libre requerido para la ligación en el siguiente paso. A continuación se liga un *primer* sintético de RNA al extremo 5' de los mRNAs previamente seleccionados y éstos mRNAs quiméricos se transcriben mediante la transcriptasa reversa *Superscript III* (Invitrogen) y un cebador sintético Oligo dT (para obtener el extremo 3' se usa el RNA total directamente y se retrotranscribe). El cDNA resultante, complementario al mRNA, se usó para obtener los extremos 5' y 3' del gen. Para los extremos 5' de humano y ratón se utilizaron los cebadores que reconocen la secuencia del adaptador sintético en 5', uno externo y otro interno y además se diseñaron dos cebadores específicos reversos a partir del mRNA de TREX2. Para amplificar los extremos 3' se diseñaron dos cebadores específicos (uno externo e interno en dirección 5') y se usaron los oligonucleótidos sintéticos en dirección 3' complementarios al *Oligo dT* sintético. Para todos los casos el cebador externo se utilizó para la primera PCR y el interno para la PCR anidada. Los oligonucleótidos se encuentran listados en el anexo A.

3.10 Generación de construcciones plasmídicas

Se han generado construcciones plasmídicas para la producción de proteína recombinante, expresión heteróloga en células de mamífero y ensayos de actividad de promotor. La estrategia seguida ha sido:

- i) Amplificación por PCR del DNA de interés
- ii) Clonaje del fragmento de PCR en el vector pSTBluel
- iii) Secuenciación

iv) Subclonaje en el vector de interés.

3.10.1 Amplificación por PCR

El fragmento a clonar se sintetiza mediante PCR usando oligonucleótidos específicos. En el anexo A se indican todos los cebadores utilizados para amplificar el cDNA de las isoformas de TREX2 humanas, el promotor de *Trex2* murino y el cDNA de Elf5 de ratón. Se verifica el peso por electroforesis, se recorta y purifica por columna mediante el kit de purificación *Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel). Tras ello se subclona en el vector pSTBlueI (Novagen).

3.10.2 Subclonaje de fragmentos de DNA en el vector pSTBlueI

El vector pSTBlue I (Novagen) se utilizó para el clonaje de los productos de obtenidos por PCR. Para el subclonaje se convierten los extremos del fragmento en romos (*blunt end*) usando la enzima *end conversion* como se explica en la siguiente reacción:

	Reacción (μl)
Producto de PCR	2.0
Agua bidestilada	0.5
Enzima " <i>end conversion</i> "	2.5
	<hr/> 5.0 μl

- Se deja la reacción 15 minutos a 22°C, después 5 minutos a 75°C y enfriar 2 minutos a 4°C.
- Al obtener los extremos romos se procede con la reacción de ligación por medio de una DNA ligasa (Novagen) que permite la unión de los extremos del fragmento con el vector pSTBlueI.

	Reacción (μl)
Vector pSTBlue I	0.5
Ligasa T4	0.5
Reacción " <i>end conversion</i> "	5.0
	<hr/> 6.0 μl

- Dejar 15 minutos a 22°C y proceder con la propagación *in vivo*.

Es pertinente hacer un control negativo (c-) de las reacciones y transformarlo también. El DNA recombinante generado se inserta en bacterias competentes mediante la transformación bacteriana, para su posterior selección, aislamiento y digestión como se explica más adelante. Se comprueba la correspondencia del fragmento secuenciando con los oligonucleótidos universales SP6 y T7 presentes en la secuencia del vector pSTBluel.

3.10.3 Transformación bacteriana

Una vez ligado el fragmento al vector deseado se realiza la transformación bacteriana para la propagación y obtención del DNA plasmídico. En este estudio se utilizaron las cepas de bacterias competentes de *E. coli*, XL1-Blue o BL-21 obtenidas por el método de transformación por RbCl. Antes de empezar con la transformación se debe determinar el número de placas de petri con medio LB-Agar (medio LB con 1.5% Agar-Agar) con antibiótico a utilizar teniendo en cuenta la resistencia del vector. La concentración del antibiótico en las placas fue: ampicilina: 50 µg/ml, Kanamicina: 30 µg/ml. Todo el protocolo debe realizarse en condiciones de esterilidad.

- Para iniciar con la transformación adicionar 1.5 µl de DNA o de la reacción de ligación a 200 µl de bacterias competentes, pipetear suavemente para mezclar, dejar los tubos en hielo 30 minutos.
- Hacer un choque térmico en baño María a 42°C por exactamente 1 min y 45 seg e inmediatamente poner los tubos en hielo 2 minutos.
- Adicionar 1ml de medio de cultivo LB (triptona, extracto de levadura, NaCl) suplementado con Mg²⁺ a cada tubo en hielo y dejar en agitación a 3°C durante 1h.
- Centrifugar los tubos a 3200 rpm 5 minutos, decantar el medio dejando aproximadamente 200 µl y resuspender suavemente el pellet de bacterias. Sembrar en placas de petri con medio LB-Agar y el antibiótico deseado e incubar a 37°C o/n.
- Las colonias crecidas en la placa poseen el DNA plasmídico por presentar resistencia a antibióticos. Se escogen 12 colonias de la construcción y se dejan crecer en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de medio LB con antibiótico en un agitador a 37°C.
- Recoger 1.4 ml del cultivo y proceder a aislar el DNA plasmídico.

3.10.4 Extracción y purificación de DNA plasmídico a pequeña escala (Miniprep)

- Picar una bacteria e inocularla en medio de cultivo LB con el respectivo antibiótico y dejar creciendo o/n.
- Extraer 1.4 ml del cultivo, centrifugar 5 minutos a 2500 rpm y descartar el medio.
- Resuspender el pellet en 100µl de la solución I (10mM EDTA, 50mM Glucosa, 25mM Tris-Cl pH 8.0 y agua bidestilada -conservar a 4°C), despegar el pellet suavemente y dejar actuar 4 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 200µl de solución II fresca (0.2M NaOH, 1% SDS, agua bidestilada), mezclar suavemente y dejar actuar por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 150 µl de solución III (3M KOAc, 2M HOAc – conservar a 4°C), mezclar suavemente y dejar actuar por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 350µl de fenol-cloroformo, mezclar enérgicamente con la ayuda de un vórtex y centrifugar 3 minutos a máxima velocidad, transferir el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf.
- Precipitar la fase acuosa con 900µl de etanol 99%, dejar 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugar 5 minutos a máxima velocidad y decantar el etanol.
- Adicionar 700µl de etanol 70% al pellet, centrifugar 3 minutos a máxima velocidad, decantar el etanol, hacer un centrifugado corto para coleccionar el etanol residual.
- Dejar secar el pellet, disolverlo en 20µl TE e incubar ~5-30 minutos antes de hacer la digestión con enzimas de restricción. Se puede medir la concentración donde 1µl deberá contener ~0.5g de DNA plasmídico.

3.10.5 Obtención de bacterias competentes

Se ha usado el protocolo de transformación de *E. coli* por RbCl que se describe a continuación.

- Sembrar del *stock* de bacterias (en glicerol a -80°C) en una placa de petri con medio LB-Agar sin antibiótico, o/n a 37°C.

- Picar una colonia de la placa e inocular 30 ml de medio SOB (bactotripton, extracto de levadura, NaCl y KCl) sin antibiótico en un erlenmeyer estéril de 100 ml con 300 μ l de Mg^{++} 2M (dilución 1/100) e incubar en agitación o/n a 37°C.
- Separar 1 ml de medio SOB para usar como blanco.
- Añadir 8 ml del cultivo a un erlenmeyer con 200 ml de medio SOB sin antibiótico y 2ml de Mg^{++} 2M estéril (1M $MgCl_2$ y 1M $MgSO_4$). Dejar en agitación a 37°C y medir la OD_{550} en el espectrofotómetro hasta que alcance una densidad óptica de 0.45 (~2-3 h).
- Recoger el cultivo en 4 tubos Falcon de 50 ml, enfriar rápidamente en hielo y dejarlo durante 15 minutos adicionales.
- Centrifugar a 2500 rpm, 4°C durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las bacterias suavemente en 16 ml/Falcon de tampón de transformación I (RbCl, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, glicerol, KAc pH 7.5, agua bidestilada; ajustar pH a 5.8) e incubar en hielo 15 minutos.
- Centrifugar nuevamente y resuspender el pellet suavemente adicionando 4 ml/Falcon de tampón de transformación II (RbCl, MOPS pH 6.8, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, glicerol, agua bidestilada). Recoger todas las bacterias en el mismo Falcon y mantenerlas en hielo.
- Congelar tantos eppendorf como alícuotas de bacterias se vayan a preparar en nieve carbónica y adicionar pequeños volúmenes de la solución celular, cuando la solución está completamente congelada conservar a -80°C.

3.10.6 Digestión del DNA plasmídico con enzimas de restricción

Para comprobar la presencia del DNA plasmídico se hace un análisis de restricción con las enzimas adecuadas.

	Reacción (μ l)
DNA plasmídico	x
Tampón de restricción (10x)	2
Endonucleasa de restricción	0.5-1
RNasa A 20 μ g/ μ l	0.5
agua bidestilada	y
	<hr/> 20 μ l

La reacción debe dejarse incubando durante 1-1.5 h a 37°C, posteriormente se verifica la presencia del DNA plasmídico por medio de una electroforesis de acrilamida y el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos.

3.10.7 Extracción y purificación de DNA plasmídico a gran escala (Maxiprep)

Una vez identificadas las colonias de interés se prepara DNA plasmídico a gran escala (maxiprep) para los estudios de transfección en células de mamífero. Para comenzar, se extraen 2.5 ml del cultivo original en condiciones de esterilidad y adicionarlo a 250 ml de medio de cultivo LB (1/100) con el antibiótico adecuado. Dejar el cultivo a 37°C o/n y al día siguiente iniciar el protocolo. Para la extracción y purificación se usó el kit *Pure Link HiPure Plasmid Filter Purification* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el DNA plasmídico se mide la concentración del DNA en el espectrofotómetro *Nanodrop*, usualmente está entre 0.1-4 µg/µl y una ratio 260/280 > 1.6.

3.10.8 Defosforilación de los extremos 5´ y 3´ del vector de expresión

El principal fin de la defosforilación es eliminar el extremo 5´-fosfato del vector digerido evitando su recircularización y cierre durante la ligación con el objeto de aumentar la eficiencia de clonación. Para ello se adiciona fosfatasa alcalina de gamba (SAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase, USB*) al vector digerido durante 1h a 37°C, posteriormente, la enzima se desactiva a 65°C por 15 minutos. Después de purificar, se continúa con la ligación del inserto deseado como se describe a continuación.

3.10.9 Subclonaje de fragmentos de DNA en vectores de expresión

Los fragmentos de DNA subclonados en pSTBlueI se digieren con las endonucleasas indicadas en la Tabla M5 para el subclonaje en el vector de interés. Se verifica la banda y el peso mediante una electroforesis de agarosa desde donde se recorta y purifica el fragmento. Posteriormente, se procede a ligar el fragmento con el vector de interés en

una relación de 3:1 (inserto/vector) usando 0.5 µl de la DNA ligasa T4 (USB, Affymetrix) y 1 µl del tampón de T4 ligasa 10x hasta un volumen final de 10 µl. Una vez ligado el fragmento se transforma en bacterias competentes y se repiten los pasos de selección de colonias, aislamiento de DNA plasmídico.

Subclonaje de TREX2 en pMal

Para estudiar la actividad exonucleasa de *TREX2* desarrollamos una estrategia de expresión y purificación de tres proteínas recombinantes de *TREX2* humanas en *E. coli*. La estrategia consistió en amplificar mediante PCR los tres fragmentos de DNA que codifican para las isoformas de *TREX2*, uno de 837 pb equivalente a la isoforma L1 de 279 aa, el segundo de 708 pb equivalente a la isoforma proteica S y un tercero de 129 pb equivalente a la parte N-terminal de la proteína. El origen del DNA para la isoforma L1 y N-terminal fue cDNA de piel y cervix y para la isoforma S, DNA genómico. Para la amplificación, se diseñaron *primers* específicos flanqueantes a 5' y 3' de cada isoforma de *TREX2*, introduciendo dentro de la secuencia de los *primers*, sitios de restricción para *Sall* y *XhoI*, respectivamente. Los fragmentos amplificados fueron luego subclonados dirigidamente en el vector pSTBlueI y posteriormente en el vector de expresión de proteína de bacterias pMAL-c2, previamente cortado con las mismas enzimas y que expresa el tag MBP (*Maltose Binding Protein*).

Subclonaje de TREX2 en los vectores pcDNA3 y pEYFP-C1

Para la expresión heteróloga de las isoformas humanas codificadas por el gen humano de *TREX2* (L1, S, parte terminal de 43 aa) se escogieron dos vectores de expresión, pcDNA3 (Invitrogen) y pEYFP-C1 (Clontech). El plásmido pcDNA3 dispone de un promotor CMV que permite una elevada expresión de proteína en un amplio rango de células de mamífero. Contiene un sitio de clonaje múltiple donde se insertaron las secuencias de *TREX2* deseadas. El vector pEYFP-C1 posee una proteína fluorescente amarilla (EYFP, *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*,) derivada de la proteína fluorescente

verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*). Tiene un sitio de clonaje múltiple para introducir la secuencia de la proteína en el extremo C-terminal y además posee también un promotor CMV.

Subclonaje de Elf5 en el vector pHA

El cDNA del factor de transcripción Elf5 murino fue amplificado a partir de mRNA de queratinocitos de ratón usando *primers* específicos correspondientes al transcrito Elf5-202 (*Ensemble*: ENSMUST00000171693) y posteriormente subclonado en el vector de expresión en células de mamífero pHA. El esqueleto del vector es de pcDNA3 y posee el tag HA útil para la identificación de la proteína mediante western blot. Las dianas de clonación fueron BamHI-XhoI dando origen al constructo pHA-mElf5.

Subclonaje del promotor del gen *Trex2* murino

El fragmento genómico situado entre las posiciones -1633 y +48 respecto el inicio de transcripción del gen *Trex2* fue amplificado por PCR y subclonado en el vector pSTBlueI como se explicó anteriormente (Figura M1A). La digestión con las enzimas de restricción HindIII/MluI liberó el inserto que tras ser se recortado y purificado se introdujo de forma dirigida en el vector pGL2-Basic mediante ligación con la ligasa T4 (USB, Affimetrix) y las dianas HindIII/MluI compartidas por los dos plásmidos generando el constructo -1633/+48). El vector pGL2-Basic es un plásmido reportero de actividad transcripcional por poseer el gen marcador de la luciferasa de luciérnaga, carece de promotor eucariótico y posee una región con dianas únicas en posición 5' con respecto al gen marcador. El constructo generado se secuenció con los cebadores universales SP6 y T7 para comprobar la correspondencia con la secuencia genómica de origen la cual se encuentra disponible en la base de datos *Ensembl*. El fragmento de promotor de *Trex2* clonado se encuentra en las posiciones 73436930 y 73435297 del cromosoma X de ratón, según la numeración de *Ensembl* y el gen *Trex2* identificado como ENSMUSG00000031372.

A partir del fragmento genómico situado a 5' del inicio de transcripción de *Trex2* se generaron ocho constructos mediante deleciones sucesivas del extremo 5'. Para ello se diseñaron distintos cebadores en la hebra 5'-3' del fragmento, separados entre sí por distancias cortas (entre 5-10 nucleótidos) o más largas (entre 30-100 nucleótidos), acortando siempre por la parte 5'. Todos los fragmentos fueron clonados direccionalmente con las dianas HindIII/MluI (Figura M1B). Las posiciones de los *primers* son: -1633/-1614, -487/-468, -373/-356, -260/-240, -212/-191, -177/-159, -138/-120, -109/-90, -73/-56. Para el extremo 3' se utilizó el cebador ubicado en las posiciones +27/+48, a excepción de los constructos que incluyen el primer exón no codificante y el primer intrón (posiciones a 5': -487/-468, -260/-240, -177/-159) para los cuales se utilizó el *primer* ubicado en las posiciones +663/+682. El anexo A resume los *primers* utilizados para la construcción de los fragmentos. Los constructos generados comprenden las siguientes regiones: -1633/+48 (1681 pb); -487/+48 (535 pb); -373/+48 (421 pb); -260/+48 (308 pb); -212/+48 (260 pb); -177/+48 (225 pb); -138/+48 (186 pb), -109/+48 (157); -73/+48 (121 pb); -487/+682 (1169 pb); -260/+682 (942 pb); -177/+682 (859 pb). Los constructos se nombraron contando a partir del primer inicio (+1) de la transcripción del gen *Trex2* murino hacia 5' o 3'.

3.10.10. Mutagénesis dirigida

Para la obtención de mutaciones puntuales en el promotor de *Trex2* se empleó el kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para cada mutación que se quiso introducir se diseñó un par de *primers* complementarios conteniendo la mutación deseada. Brevemente, el protocolo consiste en replicar el plásmido con el inserto de interés mediante PCR usando la DNA polimerasa *Pfu Turbo* y los *primers* previamente diseñados. Como resultado de la reacción se amplifica el plásmido que ahora contiene la secuencia mutada. Tras la amplificación, la secuencia se digiere con la enzima de restricción *DpnI* de forma que se eliminan las cadenas parentales (metiladas) que no contienen la mutación deseada. Finalmente la PCR se purifica y se transforma en células competentes de *E. coli*,

posteriormente se obtiene el DNA plasmídico a gran escala. Las condiciones de amplificación fueron: Un ciclo de 95°C, 30 seg; seguido de 17 ciclos a 95°C, 30 seg, 55°C, 1 minuto y 68°C, 6.30 minutos y por último, 10 minutos a 72°C. Los *primers* utilizados para la mutagénesis se resumen en el anexo A. Dentro de la secuencia promotora -487/+48 se mutaron las cajas CREB y ETS de forma independiente dando lugar a los constructos mCREB -487/+48 y mETS -487/+48. Dentro de la secuencia -260/+48 se mutaron las cajas CREB, AP1 y ETS también de manera independiente y AP1 y ETS simultáneamente, originando los constructos mCREB -260/+48, mETS -260/+48, mAP1 -260/+48 y mETS/AP1 -260/+48. Las mutaciones fueron hechas principalmente en el *core* de las cajas. La secuencia de las mutaciones se encuentra indicada en la figura M1C.

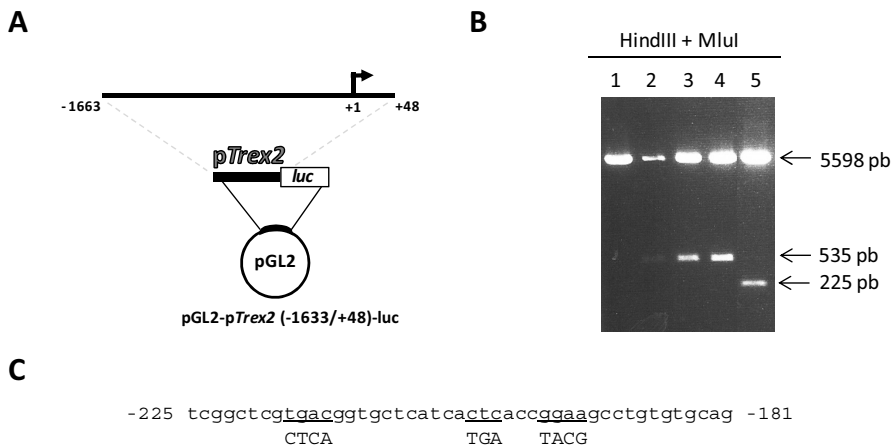


Figura M1. Clonaje del promotor de *Trex2* murino. (A) Representación esquemática del fragmento de promotor de *Trex2* clonado en el vector reportero de luciferasa pGL2-Basic. La posición del inicio de transcripción mayoritario (+1) se encuentra indicada. (B) Electroforesis del análisis de restricción de los clones recombinantes con algunas de las construcciones del promotor digeridas con las enzimas HindIII y MluI. Las flechas indican el tamaño del inserto. Carril 1. pGL2 lineal; Carril 2. -487/+48; Carril 3. mCREB -487/+48; Carril 4. mETS -487/+48; Carril 5. -177/+48. (C) Secuencia del promotor de *Trex2* murino con los residuos mutados puntuales (subrayados) y los correspondientes cambios de nucleótido (mayúscula). Las secuencias corresponden de izquierda a derecha, a las cajas CREB, AP1 y ETS.

Tabla M5. Construcciones plasmídicas.

Plásmido	DNA	Proteína	Enzimas de clonaje	Aplicación
pSTBlueI	-	-	-	Vector de clonación
pMAL-c2	<i>malE</i>	MBP	-	Producción proteína recombinante MBP en bacterias
pMAL-c2-mTREX2	<i>malE</i> -mTREX2	MBP-mTREX2	Sall-Sall	Expresión/purificación MBP-mTREX2 de bacterias
pMAL-c2-hTREX2	<i>malE</i> -hTREX2 (837pb)	MBP-hTREX2 (L1)	Sall-Sall	Expresión/purificación MBP-hTREX2 de bacterias
pMAL-c2- hTREX2	<i>malE</i> -hTREX2 (708 pb)	MBP-hTREX2 (S)	Sall-Sall	Expresión/purificación MBP-hTREX2 de bacterias
pMAL-c2- hTREX2	<i>malE</i> -hTREX2 (129 pb)	MBP-hTREX2 (N43)	Sall-Sall	Expresión/purificación MBP-hTREX2 de bacterias
pcDNA3	-	-	-	Expresión en células de mamífero
pcDNA3- hTREX2	hTREX2 (837pb)	hTREX2 (L1)	EcoRI-EcoRI	Expresión en células de mamífero
pcDNA3- hTREX2	hTREX2 (708 pb)	hTREX2 (S)	EcoRI-EcoRI	Expresión en células de mamífero
pEYFP-C1	YFP-	YFP	Sall-Sall	Expresión de YFP en células de mamífero
pEYFP-C1-hTREX2	YFP- hTREX2 (837pb)	YFP-hTREX2 (L1)	Sall-Sall	Expresión de YFP en células de mamífero
pEYFP-C1- hTREX2	YFP- hTREX2 (708 pb)	YFP-hTREX2 (S)	Sall-Sall	Expresión de YFP en células de mamífero
pEYFP-C1- hTREX2	YFP- hTREX2 (129 pb)	YFP-hTREX2 (N43)	Sall-Sall	Expresión de YFP en células de mamífero
pcDNA3-Flag-Fos-WT	c-Fos	Flag-Fos	EcoRI-EcoRI	Expresión de Fos en células de mamífero
pCS2-Flag-JunB	JunB	Flag-JunB	EcoRI-XhoI	Expresión de JunB en células mamífero
CMV500 A-Fos	Fos	FOS	NdeI-HindIII	Dominante negativo de AP1, expresión en células de mamífero
pCHA-Elf5	Elf5	HA-Elf5	BamHI-XhoI	Expresión Elf5 en células de mamífero
pGL2-Basic	-	Luciferasa	HindIII-MluI	Ensayos de promotor
pGI2-1633/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-MluI	Ensayos de promotor
pGI2-487/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-MluI	Ensayos de promotor
pGI2-373/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-MluI	Ensayos de promotor
pGI2-260/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-MluI	Ensayos de promotor
pGI2-212/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-MluI	Ensayos de promotor

pGI2-177/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-138/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-109/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-73/+48	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-487/+682	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-260/+682	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-177/+682	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor
pGI2-487/+48 mCREB	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor mutado
pGI2-487/+48 mETS	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor mutado
pGI2-260/+48 mCREB	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor mutado
pGI2-260/+48 mETS	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor mutado
pGI2-260/+48 mAP1	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor mutado
pGI2-260/+48 mETS/AP1	promotor <i>Trex2</i>	Luciferasa	HindIII-Mlul	Ensayos de promotor mutado
pCMV β	LacZ	β -galactosidasa	-	Ensayos de promotor

3.11 Expresión y purificación de la proteína recombinante MBP-TREX2

La purificación de las proteínas recombinantes con tag MBP se realizó mediante columnas de amilosa (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. MBP es un tag de expresión bastante común. En *E. coli* es conocido por haber mejorado significativamente la solubilidad de muchas proteínas a las cuales se ha fusionado.

3.11.1 Crecimiento de MBP-TREX2

Las proteínas de fusión humanas resultantes: MBP-hTREX2 (L1), MBP-hTREX2 (S), MBP-hTREX2 (N43) junto con MBP se produjeron en las cepas de bacterias competentes de *E. coli* XL1-Blue y BL-21, ésta última se utilizó para la expresión de las proteínas recombinantes humanas en bacterias. Brevemente, a partir del cultivo o/n, adicionar 12

ml del precultivo a 1.2 L de LB (dilución 1/100) con ampicilina (stock 50 mg/ml, dilución 1/100) y glucosa (stock 2%, dilución 1/100), a 37°C en un agitador hasta que la OD₅₅₀ del cultivo alcance 0.5 (entre 2-3 horas). Tomar 500 µl de la muestra (t=0). Inducir el crecimiento con 0.3 mM de IPTG durante 3 horas y leer la OD₅₅₀. Tomar 500 µl de la muestra (t=3h). Centrifugar el cultivo a 2500 rpm a 4°C, descartar el sobrenadante, resuspender el pellet en 60 ml del buffer de lavado *CB (column buffer)* (20 mM Tris pH 7.4, CB, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, agua bidestilada) y conservar a -80°C o seguir con la solubilización. En cuanto a las muestras, centrifugarlas 30 seg a máxima velocidad, descartar el sobrenadante, despegar el pellet y adicionar Laemmli 1x.

3.11.2 Solubilización y purificación de MBP-TREX2

Para solubilizar la proteína, en hielo, descongelar el cultivo, adicionar lisozima a una concentración final de 2 mg/ml (stock: 200 mg/ml, dilución 1/100), mantener en hielo durante 45 minutos, revolviendo cada 15 minutos y adicionar inhibidores de proteasas. Tomar 100 µl de muestra como control para medir la cantidad de proteína (después de la lisozima) y dejar en hielo. Sonicar 3 veces durante 30 seg y tomar nuevamente 100 µl de muestra, como control después de cada nueva sonicación. Centrifugar a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, descartar el pellet y congelar el sobrenadante o conservar en hielo y continuar con la purificación de la proteína. Para purificar, primero lavar la columna conteniendo 5 ml de resina de amilosa con 40 ml de CB. Adicionar a la columna los 60 ml del extracto (1 ml/minuto), lavar con 40 ml de CB y eluir adicionando 20 ml de la solución de maltosa (0.072 g/20 ml CB). Recoger la proteína recombinante purificada en fracciones de 1 ml.

3.11.3 Tinción de geles con *Comassie*

El análisis de la expresión de las proteínas de fusión (MBP-) se realizó mediante la tinción con *comassie*. Se toman alícuotas a diferentes tiempos de crecimiento del cultivo (t=0, 1.5 o 3 horas) o a tiempo final. Adicionar a las alícuotas Laemmli 1x, siguiendo la

fórmula: OD_{550} (alícuota) \times 200 = μ l Laemmli 1x y calentarlas a 95°C, 5 minutos. Después de resolver las muestras mediante SDS-PAGE, se tiñe el gel como sigue:

- Fijar el gel con ácido acético al 7% durante 5 minutos.
- Teñir con *Comassie Brilliant Blue* (SIGMA) (50% metanol, 10% ácido acético, 0.25% azul de *Comassie*) durante 5 minutos.
- Lavar el exceso de colorante con solución para desteñir (5% metanol y 7.5% ácido acético) hasta observar las bandas de las proteínas.
- Secar el gel durante 1.5 h con la ayuda de un secador al vacío.

3.12. Análisis actividad promotor

El análisis de la actividad del promotor se realizó en las líneas celulares MCA3D, como modelo de queratinocitos y NIH3T3, como modelo de fibroblastos. Las diferentes construcciones se transfirieron usando el reactivo Lipofectamine-LTX (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad transcripcional del reportero pGL2-luc se normalizó cotransfectando con el vector de expresión pCMVLacZ, el cual posee el gen reportero β -galactosidasa. La expresión β -galactosidasa se usó como control interno para normalizar la actividad luciferasa.

El siguiente protocolo se estandarizó para una placa de cultivo de 24 pocillos y células adherentes.

- Sembrar las células en 0.5 ml de medio específico 24 horas antes de la transfección de forma tal que se encuentren al 60-70% de confluencia al momento de transfectar. Las células MCA3D se plaquearon a 1.2×10^5 células/pocillo y las NIH3T3 a 7×10^4 células/pocillo. En el momento de transfectar, cambiar el medio por uno sin antibiótico (400 μ l). Para cada muestra a transfectar preparar los complejos de la siguiente forma:
 1. Diluir 1.2 μ g de DNA plasmídico (relación 1/5 entre el plásmido de interés y pCMVLacZ) en 100 μ l de medio carente de suero Opti-MEM (Invitrogen) y mezclar suavemente.

2. Adicionar el reactivo de transfección Lipofectamina-LTX (Invitrogen) al DNA previamente diluido. Se usan 2.5 μl de LTX en las células MCA3D y 2 μl en las NIH3T3. Mezclar suavemente e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Adicionar los 100 μl de medio conteniendo los complejos de DNA-Lipofectamina LTX a cada pocillo con células. Agitar suavemente la placa y dejar a 37°C en incubador con 5% CO₂ durante 24-48h antes de continuar con el análisis de la expresión transgénica.

3.12.1 Actividad Luciferasa

Para el ensayo de la actividad luciferasa se utilizó el kit comercial *Luciferase Assay System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Se aspira el medio de las células previamente transfectadas y se lavan con PBS.
- Añadir a cada pocillo 100 μl del tampón de lisis 1x del kit y dejar en agitación durante 15 minutos. Transferir las células lisadas a un tubo eppendorf y centrifugar brevemente a máxima velocidad.
- Transferir 30 μl del sobrenadante a un nuevo eppendorf, añadir 100 μl de reactivo para ensayo luciferasa del kit y mezclar para homogeneizar la muestra. Proceder con la lectura de la actividad luciferasa inmediatamente o congelar el lisado a -80°C.

3.12.2 Actividad β -galactosidasa

Para el ensayo de la actividad β -galactosidasa se utilizó el kit comercial *Luminescent β -gal* (Clontech). Se añade 1 μl de sustrato de reacción en 49 μl de reactivo de reacción. En un eppendorf se añaden 10 μl del lisado celular y se agregan los 50 μl de la mezcla de reactivos del kit. Incubar durante 1h protegiendo la reacción de la luz y obtener la lectura. Las actividades enzimáticas luciferasa/ β -galactosidasa se hicieron en un luminómetro TD 20/20 (Turner Designs) para tubos.

3.13 Análisis de la metilación del promotor

Para el análisis del estado de metilación del promotor se utilizó el kit *Methyl Code bisulfite Conversion* (Invitrogen). Aproximadamente 500 ng de DNA se trataron con bisulfito siguiendo las indicaciones del protocolo comercial. El tratamiento con bisulfito convierte citosinas no metiladas en timidinas mediante su desaminación y no provoca ningún cambio en las citosinas metiladas (Figura M2). Así, la metilación del DNA puede ser detectada mediante el reconocimiento de las citosinas que no cambian.

Para amplificar las regiones del DNA con secuencias CpG presentes en el promotor humano y murino de *TREX2* se diseñaron *primers* específicos (ver Anexo A, *primers*). Después de la conversión por bisulfito el DNA fue analizado mediante PCRs semi-anidadas, llevando a cabo dos etapas de amplificación con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 97°C por 2 minutos; 39 ciclos a 95°C por 45 seg, entre 43-55°C por 45 seg y 72°C durante 1 minuto; 10 minutos a 72°C la elongación final y a 4°C hasta recoger la muestra.

Los productos obtenidos en las primeras PCRs fueron usados para las segundas PCRs con el fin de incrementar la sensibilidad del método. Para la segunda PCR se usó un *primer* interno (nested) en *forward* y el mismo *primer reverse* de la primera PCR. Posteriormente, los productos fueron purificados, subclonados y secuenciados. El software *CpG viewer* (University of Leeds, <http://dna.leeds.ac.uk/cpgviewer/>) se utilizó para el análisis de las secuencias.

Los criterios utilizados para considerar una isla CpG son los siguientes (Chatterjee et al., 2012):

- % CGs superior al 50%
- longitud > 200 pb
- relación CpGs observadas/esperadas (Obs/Exp CpG) con ratio superior a 0.6

La ratio se calcula con la siguiente fórmula :

$$\text{Obs/Exp CpG} = \frac{\text{Número CpG} * N}{(\text{Número de C} * \text{Número de G})}$$

donde N = longitud de la secuencia.

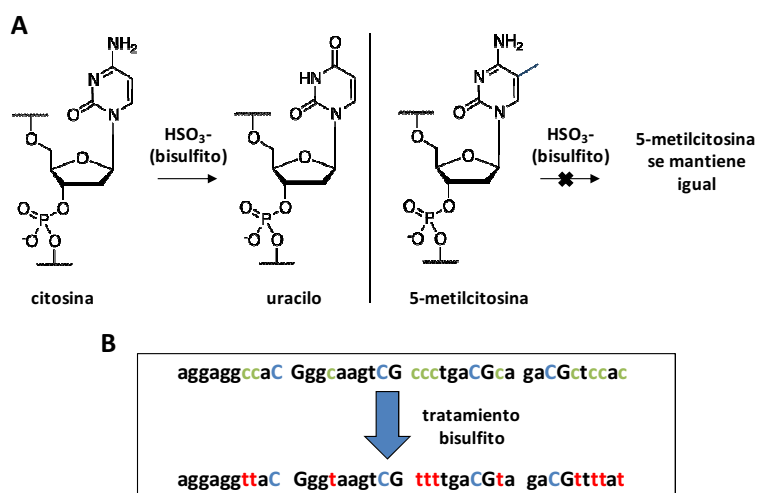


Figura M2. Efecto del tratamiento con bisulfito. (A) El bisulfito (HSO_3^-) convierte una citosina no metilada a uracilo, pero una citosina metilada permanece igual. (B) Esquema que ejemplifica cómo luciría una secuencia de DNA antes y después del tratamiento con bisulfito. Las citosinas metiladas (en azul) permaneces intactas y las no-metiladas (verdes) se convierten en uracilo y son detectadas como timinas (rojo) después de la PCR. Tomado del protocolo del Kit *MethylCode bisulfite Conversion Kit* (Invitrogen).

3.14 Ensayos exonucleasa

Para el análisis de la actividad exonucleasa se utilizaron dos métodos, como se describe a continuación.

3.14.1 Ensayos de la actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA

Las incubaciones se llevan a cabo en un volumen de 30 μl que contenía 100mM MES-NaOH pH 5.5, 100mM MES-NaOH pH 6.0 o 20mM Tris-HCl pH 7.4, además de 5 mM MgCl_2 , 2mM DTT (Roche) y 0.1 mg/ml BSA. Como sustrato de dsDNA se utilizaron $\sim 100\text{ng}$. Los ensayos de actividad exonucleasa se efectuaron con las variantes de TREX2 recombinantes MBP-hTREX2 (S), MBP-hTREX2 (L1) y MBP-mTREX2 (isoforma 236 aa). La cantidad de proteína (1 μg) debe ser ajustada para conseguir condiciones lineales de reacción. Las mezclas se incuban a 37°C durante los tiempos indicados sin exceder los 120 minutos y las reacciones son detenidas añadiendo tampón de carga 6x y situándolas inmediatamente en nieve carbónica. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel

de agarosa y las imágenes fueron obtenidas mediante un transiluminador UV (*Gel Doc XR, BioRad*) con la posterior densitometría de las fotografías obtenidas usando un software *Quantity One 1-D Analysis*.

3.14.2 Ensayos de la actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA y ssDNA

Los ensayos exonucleasa sobre ssDNA y dsDNA se realizaron en el laboratorio del Dr. Perrino (Departamento de Bioquímica, Wake Forest University Health Sciences). El protocolo utilizado se describe a continuación.

Las variantes de TREX2 humanas se generaron por mutagénesis dirigida y clonaron en el vector pLM303x para posteriormente ser purificadas como se describe en Perrino y colaboradores (2008). La variante R156L se había generado previamente en una construcción plasmídica con seis residuos menos en el extremo N-terminal comparada con las construcciones utilizadas para las otras variantes, dando como resultado un peso molecular más bajo. Los ensayos de las actividades exonucleasa de ssDNA y dsDNA se efectuaron como se describe en Perrino y colaboradores (2008). Para la actividad exonucleasa del ssDNA, se prepararon reacciones estándar con un oligonucleótido 30-mer de longitud marcado con fluoresceína y las variantes recombinantes de TREX2 se diluyeron a 10 veces su concentración final. Las muestras conteniendo las enzimas de TREX2 se añaden a las reacciones para alcanzar la concentración final indicada. Las incubaciones se hicieron durante 30 minutos a 25°C. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de urea-poliacrilamida al 23% y fueron cuantificados. Para la actividad exonucleasa de dsDNA se prepararon reacciones de titulación y *time-course* con el plásmido de dsDNA mellado, pMYC. Las reacciones se llevaron a cabo a las concentraciones indicadas durante 30 minutos y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa para ser visualizados por tinción con bromuro de etidio. El *time-course* se realizó con 200 nM de cada variante de TREX2 y las muestras se retiraron antes de adicionar la enzima (t=0) y en los tiempos de incubación indicados. Los productos de la reacción se paran en 15x SYBR Green II y se determina el

dsDNA remanente por emisión a 520 nm. La actividad de TREX2 se analizó usando *SigmaPlot 8.02 (SPSS Inc)*.

3.15. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados en el software *Graphpad Prism 5*. Los datos están expresados como la media \pm SEM (error estándar de la media) calculado como $SEM = SD/\sqrt{n}$, donde SD corresponde a la desviación estándar y n al tamaño de la muestra. Para determinar las diferencias en las medias se utilizó el test t-student. Los valores de significancia estadística se encuentran representados en las gráficas de la siguiente manera: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4. RESULTADOS

4.1 Expresión de TREX2

4.1.1 Expresión de TREX2 en piel

Se ha reportado previamente que TREX2 se expresa específicamente en tejidos con epitelio escamoso estratificado como la piel, el esófago o cérvix (Parra et al., 2009). Con el fin de profundizar en el conocimiento de la regulación de la expresión de TREX2 y con la premisa de que su expresión ocurre particularmente en tejidos con epitelio escamoso estratificado, caracterizamos el patrón de expresión de TREX2 en piel por inmunohistoquímica. La distribución de la expresión de TREX2 en piel humana y en piel de ratón se muestra en las figuras R1 y R2, respectivamente. En ratón, se analizó la expresión en la piel de la espalda en los estadios de anágeno (fase de crecimiento del pelo) y telógeno (fase de reposo del folículo piloso) en los modelos *Trex2^{+/+}* y *Trex2^{-/-}*. Tanto en piel humana como de ratón, se observa una intensa expresión de TREX2 principalmente en las capas suprabasales (estrato espinoso y granuloso) de la epidermis, donde se encuentran los queratinocitos más diferenciados.

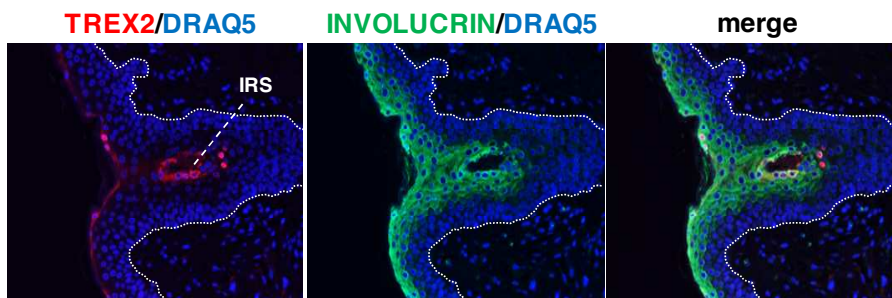


Figura R1. Inmunodetección de TREX2 en piel humana. Cortes histológicos de piel humana se procesaron para la inmunodetección de TREX2 (rojo) e Involucrina (verde). Para el marcaje nuclear se usó DRAQ5. La línea discontinua marca la membrana basal de la epidermis. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal a un aumento de 40x. *Involucrin*, Involucrina; *merge*, fusión de imágenes; IRS, capa interna del folículo piloso.

Destacar la elevada expresión de TREX2 en la capa interna del folículo piloso (IRS, *Inner root sheath*) en humano y ratón, observándose claramente en este último en el estadio de anágeno. Además, en la piel de ratón en la fase de telógeno se detectó una intensa inmunofluorescencia de TREX2 en la glándula sebácea (SG, *sebaceous gland*).

Concretamente en los sebocitos más diferenciados. Consistentemente, en humano y ratón, la tinción de TREX2 estuvo asociada con la inmunodetección de Involucrina y Queratina 10 (K10) respectivamente, ambos marcadores de estados avanzados de diferenciación de los queratinocitos (Eckert et al., 2004). En resumen, en piel humana y de ratón observamos que la expresión de TREX2 se correlaciona con el nivel de diferenciación de los queratinocitos.

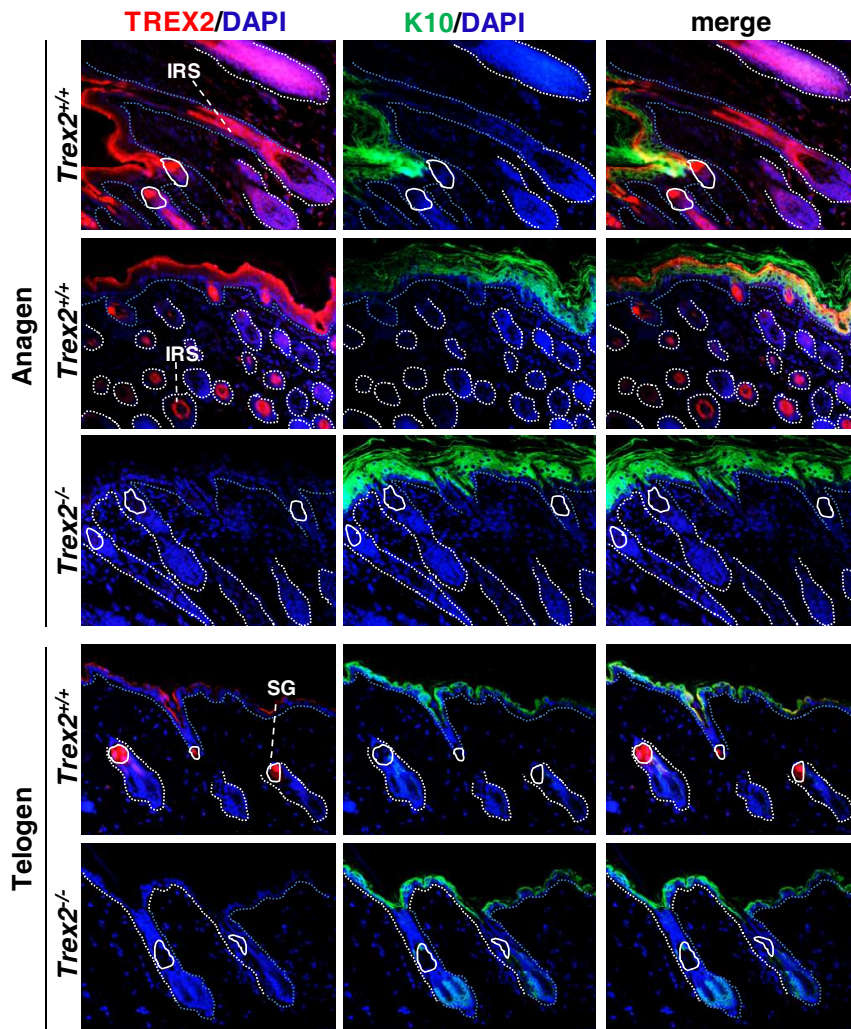


Figura R2. Inmunodetección de TREX2 en piel murina. Cortes histológicos de piel de espalda de ratón *Trex2*^{+/+} y *Trex2*^{-/-} se procesaron para la inmunodetección de TREX2 (rojo) y K10 (verde). La tinción de los núcleos fue hecha con DAPI (azul). Las imágenes corresponden a cortes longitudinales del tejido, a excepción de la fila dos (corte transversal) y fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 20x. Se han incluido cortes que muestran las fases de crecimiento del pelo en anágeno (*anagen*) y en telógeno (*telogen*). K10, Queratina 10; SG, glándula sebácea; IRS, capa interna del folículo piloso.

Aunque la deficiencia de TREX2 no repercutía aparentemente en la diferenciación de la piel, analizamos si la deficiencia de TREX2 en ratón afectaba los niveles de expresión de los principales marcadores de diferenciación durante las diferentes fases de crecimiento del pelo mediante RT-qPCR. En la figura R3A se encuentran representadas esquemáticamente las fases del crecimiento del pelo, que se encuentran altamente sincronizadas en la piel del ratón durante los dos primeros ciclos. Así, el pelo experimenta una fase de crecimiento (anágeno) en los primeros 2-14 días de vida, esta fase por lo general dura entre 1-3 semanas. Luego un ciclo de regresión por apoptosis (catágeno) con una duración de dos días aproximadamente, seguido de uno de quiescencia (telógeno) (Muller-Rover *et al.*, 2001) que durará dos semanas, para volver a repetirse todo el ciclo. Si bien se observan unos niveles ligeramente más elevados de expresión del mRNA de *Trex2* durante la fase intermedia de anágeno en relación a la fase de telógeno, las diferencias no son significativas (Figura R3B). Al analizar la expresión de los marcadores de diferenciación K10, Involucrina y Loricrina sólo se detectaron diferencias significativas entre wt y *Trex2*^{-/-} en la expresión del mRNA de Involucrina (Figura R3C). Concretamente, la deficiencia de TREX2 va acompañada de un aumento de la expresión de Involucrina durante las fases tempranas y medias de anágeno.

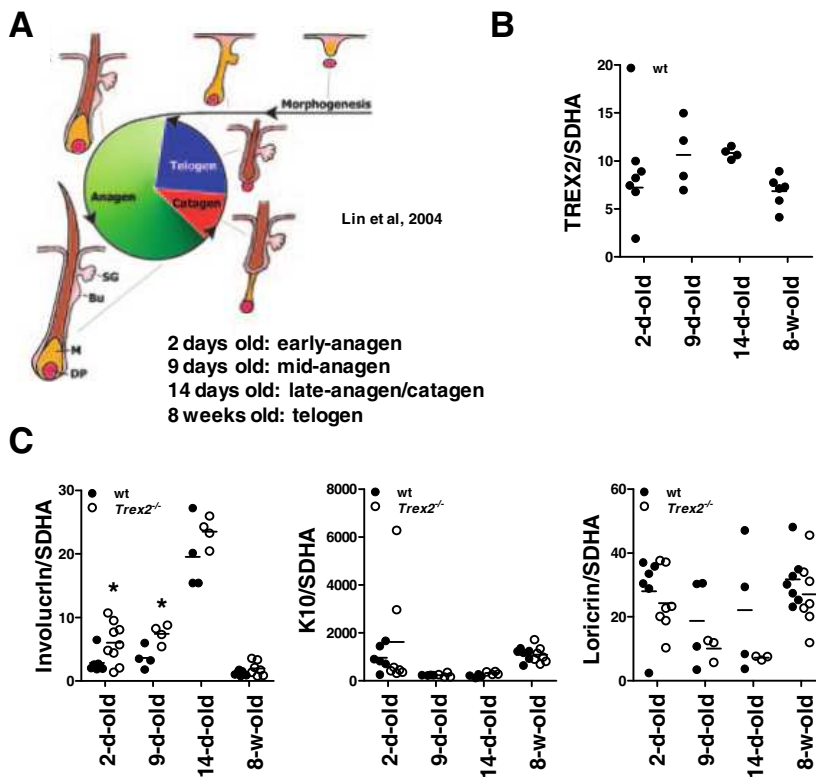


Figura R3. Expresión de *Trex2* en la piel durante las diferentes fases de crecimiento del pelo. (A) Fases del crecimiento del pelo en ratón (Li et al., 2004). (B, C) Análisis de la expresión del mRNA de (B) *Trex2*, (C) Involucrina, K10 y Loricrina en pieles de ratón wt o *Trex2*^{-/-} de diferentes edades correspondientes a diferentes fases de crecimiento del pelo. *Catagen*, catágeno; *Early-anagen*, anágeno temprano; *mid-anagen*, anágeno intermedio; *late-anagen*, anágeno tardío; *days old*, días de nacido; *weeks (w) old*, semanas de nacido, *morphogenesis*, morfogénesis; SG, glándula sebácea; Bu, protuberancia; M, matriz; DP, papila dermal.

4.1.2 Expresión de TREX2 en queratinocitos

Los queratinocitos de la epidermis proliferan en su base y se diferencian progresivamente a medida que son empujados hacia el exterior (Ovaere et al., 2009). Para conocer más a fondo cómo es la expresión de TREX2 en este tipo celular y cómo es su relación con la diferenciación de los queratinocitos, independientemente de la interacción con otros tipos celulares y estímulos presentes *in vivo*, se analizó la expresión de TREX2 y

de diferentes marcadores de diferenciación, tales como Involucrina, K10 y Loricrina en queratinocitos en cultivo, tanto de ratón (Figura R4) como humanos (Figura R5). En ratón también se evaluó la expresión de los genes marcadores del estado de diferenciación celular en queratinocitos *Trex2*^{-/-}. La figura R4A muestra imágenes del cultivo primario de queratinocitos de ratón a día 5 y día 9. Con los días de cultivo en medio selectivo para la proliferación de queratinocitos, los queratinocitos primarios de ratón van adquiriendo unas características fenotípicas de diferenciación. Consistentemente, los datos obtenidos mediante RT-qPCR (Figura R4B) indican que los niveles del mRNA de Involucrina y Loricrina aumentan conforme avanzan los días de cultivo. La expresión de Involucrina parece estabilizarse a partir del día 5 de cultivo celular, a diferencia de la Loricrina que se mantiene igual hasta el día 5, aumentando considerablemente a día 9. Curiosamente, los niveles de mRNA de K10 son más elevados en queratinocitos de día 1 que en los de día 5. Es posible que a día 1 detectemos la K10 expresada por queratinocitos disgregados de la piel de neonato que ya habían iniciado el proceso de diferenciación y que carecían de capacidad proliferativa. La K10 es uno de los primeros marcadores de diferenciación que expresan los queratinocitos. Sí que se observa un aumento de la expresión de K10 entre el día 5 y el día 9. En paralelo, los niveles de mRNA de *Trex2* desde el día 1 de cultivo, aumentan con los días de cultivo celular. Evidentemente, no se detectó expresión del mRNA de *Trex2* en los queratinocitos *Trex2*^{-/-}. Análogamente a lo observado en piel, los niveles de mRNA en la Involucrina son ligeramente más altos en las células *Trex2*^{-/-} que en las wt, sin detectarse cambios significativos en la expresión de K10 y Loricrina. Por lo tanto, la presencia de TREX2 afecta la expresión de la Involucrina y no podemos descartar que la diferenciación de los queratinocitos pueda estar alterada, pero en todo caso no de forma drástica ya que la expresión de otros marcadores de diferenciación como la K10 y la Loricrina no se ve afectada.

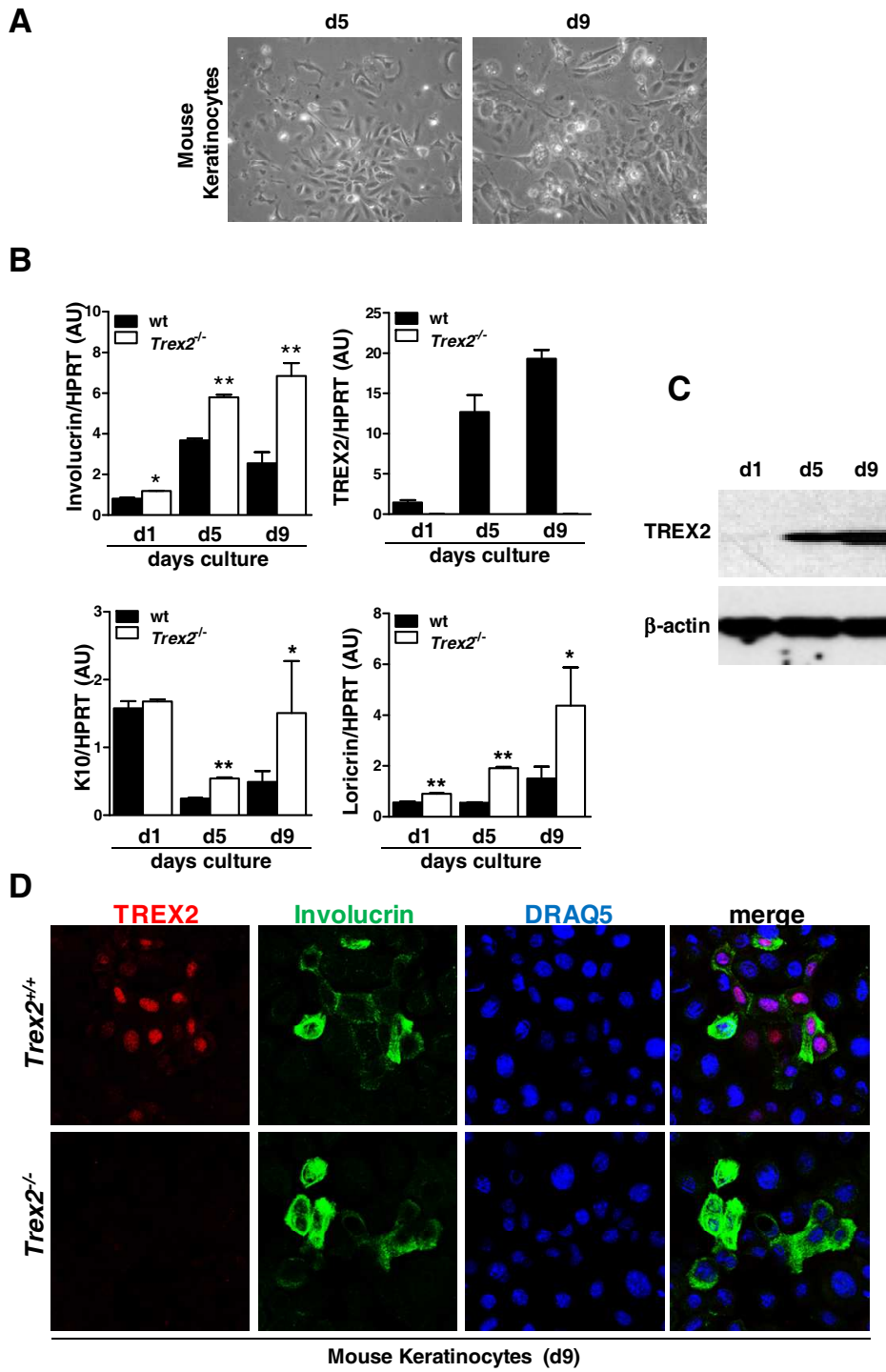


Figura R4. Expresión de TRES2, Involucrina, Loricrina y K10 en queratinocitos de ratón wt y *Trex2*^{-/-}. (A) Cultivo primario de queratinocitos wt de ratón a día 5 (d5) y día 9 (d9) de cultivo. Imágenes de contraste de fase obtenidas en un microscopio invertido a un aumento de 10x. (B) Análisis de la expresión del mRNA de Involucrina (*Involucrin*), TRES2, Queratina 10 (*K10*) y Loricrina (*Loricrin*) en queratinocitos de ratón wt y *Trex2*^{-/-} durante los días de cultivo indicados. Los valores están expresados en unidades arbitrarias tomando como gen de referencia HPRT. Los datos de d1 y d5 corresponden a un experimento. Los datos de d9 corresponden a la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes, * $P < 0.05$ determinado por el test *t-student*. (C) Análisis de la expresión de la proteína TRES2. Análisis western blot de los niveles de expresión de TRES2 en extractos totales del cultivo primario de queratinocitos wt de ratón a los días de cultivo indicados. La β actina se usó como control de carga. (D) Inmunotinción de TRES2 (rojo) e Involucrina (verde) en queratinocitos de ratón (*mouse keratinocytes*) a día 9 de cultivo. Los núcleos se han marcado con DRAQ5 (azul). Imágenes obtenidas en un microscopio confocal a 63x aumentos. *Merge*, fusión.

En conjunto, los datos en cultivos primarios de queratinocitos de ratón indican que la expresión del mRNA de TRES2 aumenta paralelamente al aumento de la expresión de del mRNA de marcadores de diferenciación en los queratinocitos. Consistentemente, la inducción del mRNA de TRES2 se correlaciona con un aumento en los niveles de proteína (Figura R4C). Asimismo, en la inmunodetección de TRES2 en queratinocitos que se muestra en la figura R4D, es visible e inequívoco que la mayoría de células que expresan TRES2, localizada principalmente en el núcleo, también expresan niveles elevados de Involucrina, localizada en el citoplasma. Por lo tanto, la expresión heterogénea de TRES2 en el cultivo primario de queratinocitos de ratón se correlaciona con el patrón de diferenciación también heterogéneo que muestra este cultivo. La especificidad del marcaje con el anticuerpo anti-TRES2 se demuestra por la ausencia de tinción en los queratinocitos *Trex2*^{-/-}. En ambos genotipos se observan unos niveles de expresión de Involucrina similares, siendo difícil determinar si hay leves cambios de expresión.

Los queratinocitos y la piel humana y de ratón tienen propiedades similares pero no idénticas (Wagner et al., 2010). La ausencia de Ca^{2+} es crítica para que no se diferencien terminalmente los cultivos primarios de queratinocitos tanto humanos como murinos. Sin embargo, las condiciones de diferenciación difieren entre ambas especies. Los queratinocitos humanos adquieren las características de diferenciación una vez han alcanzado la confluencia, hecho que no se requiere en los cultivos de queratinocitos de ratón. Las imágenes de la figura R5A muestran los cambios fenotípicos microscópicos observables en el cultivo primario de NHEK a diferentes días de postconfluencia. En la preconfluencia, las células se muestran refringentes y un tanto alargadas, por el contrario

al alcanzar la confluencia, la refringencia de los queratinocitos se ve disminuida y las células empiezan a mostrarse apretadas adquiriendo una forma poligonal y de tamaño regular. A partir del día 7/9 de postconfluencia los queratinocitos cambian de morfología y adquieren el máximo nivel de diferenciación.

Para determinar si en queratinocitos humanos la expresión de TREX2 se correlaciona con los parámetros de diferenciación de estas células se analizó la expresión de TREX2, K10 e Involucrina a partir del cultivo primario de NHEK preconfluentes y a diferentes días de postconfluencia (Figuras R5 y R6). En el caso de TREX2 se evaluó la expresión de las dos isoformas de mRNA que se detectan en piel humana (Parra et al., 2009; Figura R6A), la S correspondiente al mRNA que codifica para la isoforma corta de 236 aa (26 KDa) y equivalente a la forma murina y la L1 correspondiente al mRNA que codifica para la isoforma larga de 279 aa (31 KDa). Los niveles de mRNA que se muestran en la figura R5B corresponden a la isoforma corta, que es más abundante y se induce espectacularmente en los NHEK al aumentar el tiempo de confluencia. Los niveles de mRNA de la isoforma S de TREX2 se ven aumentados en los NHEK con los días de cultivo en postconfluencia. El incremento se inicia a partir del día 5, aumentando de forma espectacular a día 9 de postconfluencia, correspondiente con los días en que las células cambian de forma importante su morfología. El mRNA de la isoforma L1 sólo se detectó a día 8 de postconfluencia y a niveles relativamente bajos (Figura R6A). A nivel de proteína tampoco detectamos expresión de la isoforma de 31 kDa codificada por el transcrito L1 (Figura R6B), ni en extractos totales ni después de una inmunoprecipitación. Señalar que la expresión heteróloga del cDNA correspondiente a la isoforma L1 genera tres isoformas proteicas de 31, 29 y 26 kDa, que corresponden a los pesos moleculares generados a partir de las tres metioninas que se encuentran en la región N-terminal (Figura R6B y R6C).

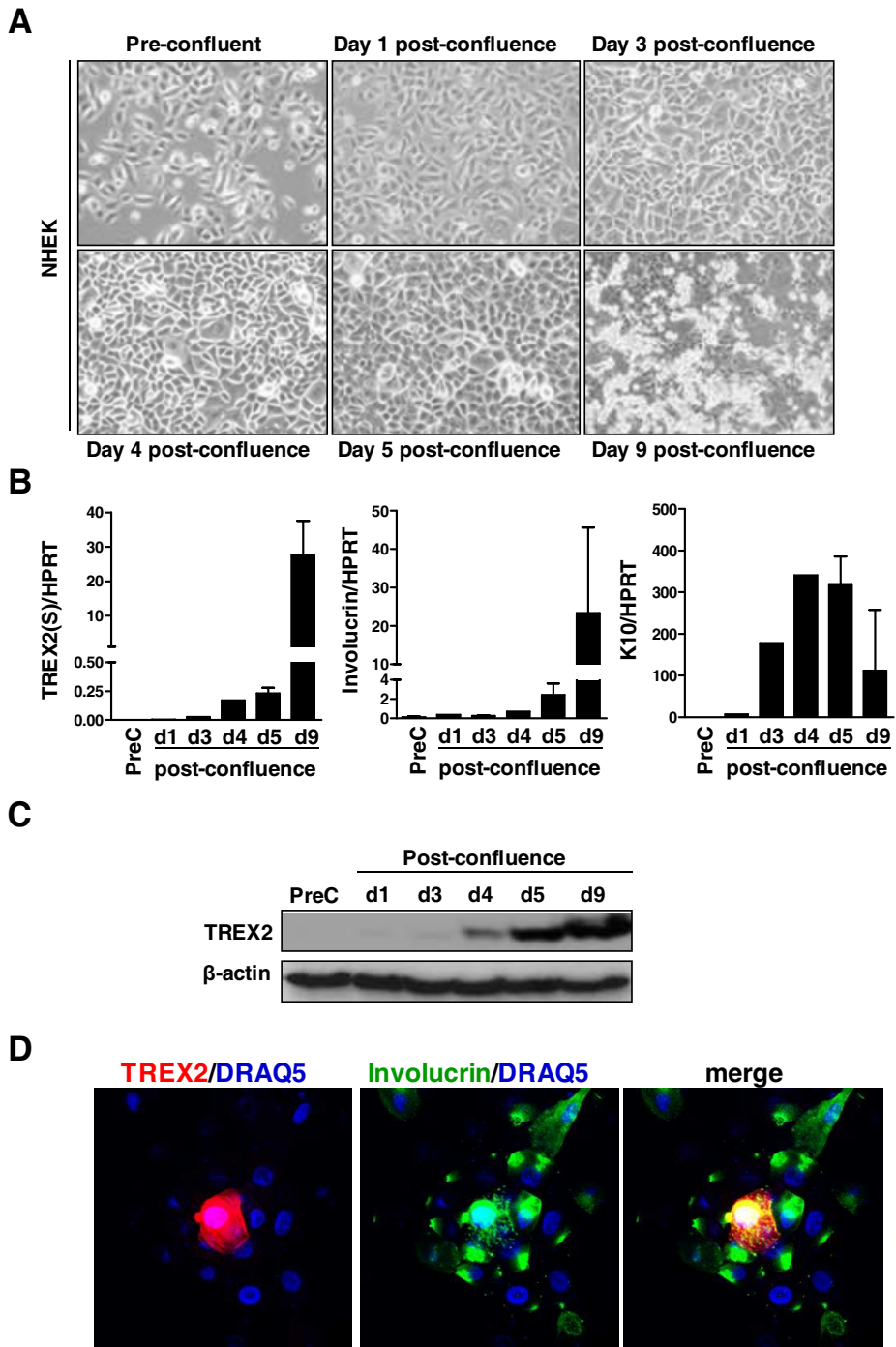


Figura R5. Expresión de TREX2, Involucrina y K10 en queratinocitos humanos. (A) Cultivo celular de NHEK. Micrografías de contraste de fase del cultivo celular de NHEK en medio específico bajo en Ca^{2+} que muestra los cambios morfológicos tras diferentes días de cultivo en preconfluencia (*pre-confluent*) y postconfluencia (*post-confluence*) a los días 1, 3, 4, 5 y 9. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio invertido con objetivo 10x. **(B)** Análisis de la expresión del mRNA de *TREX2* (isoforma S), Involucrina y K10. Los datos corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes. **(C)** Análisis de la expresión de la proteína TREX2. La β -actina se usó como control de carga. **(D)** Inmunodetección de TREX2 (rojo) e Involucrina (verde) en queratinocitos humanos a día 9 de postconfluencia del cultivo. Los núcleos se han marcado con DRAQ5 (azul). Imágenes obtenidas en un microscopio confocal a 63x aumentos.

En el patrón de diferenciación de la piel la expresión de la K10 es previa a la de la Involucrina (Crish et al., 2006). Consistentemente, la inducción de la K10 precede a la de la Involucrina, que alcanza niveles máximos de expresión a día 9 de postconfluencia. El mRNA de la K10 aumenta a partir del día 3 mostrando un pico máximo a día 4 de postconfluencia (Figura R5B).

El análisis a nivel proteico de la expresión de la exonucleasa TREX2 en NHEK demuestra que, tal y como sucede con los niveles de mRNA, los niveles de proteína aumentan con los subsiguientes días de cultivo celular paralelamente a la diferenciación de los queratinocitos (Figura R5C). Los máximos niveles de expresión de la proteína TREX2 se detectan a día 5 y 9 de postconfluencia. Adicionalmente se analizó la expresión de *TREX2* e Involucrina a nivel celular mediante inmunocitoquímica. TREX2 se expresa en células que también son positivas para la Involucrina (Figura R5D).

En resumen, tanto en queratinocitos de ratón como humanos, la expresión de TREX2 a nivel de mRNA y proteína se correlaciona con la expresión de marcadores de diferenciación de estas células. Consistentemente, los estudios de inmunocitoquímica demuestran que en los cultivos primarios de queratinocitos, que son altamente heterogéneos, las células que expresan TREX2 también expresan Involucrina, por lo tanto han iniciado el proceso de diferenciación.

Por otra parte, el análisis de la expresión de los transcritos S y L1 de TREX2 en líneas humanas inmortalizadas de queratinocitos (HaCaT), células epiteliales tumorales de cérvix (HeLa) y células embrionarias de riñón (HEK) reveló unos niveles de expresión de cada uno de estos transcritos prácticamente indetectables (Figura R6A).

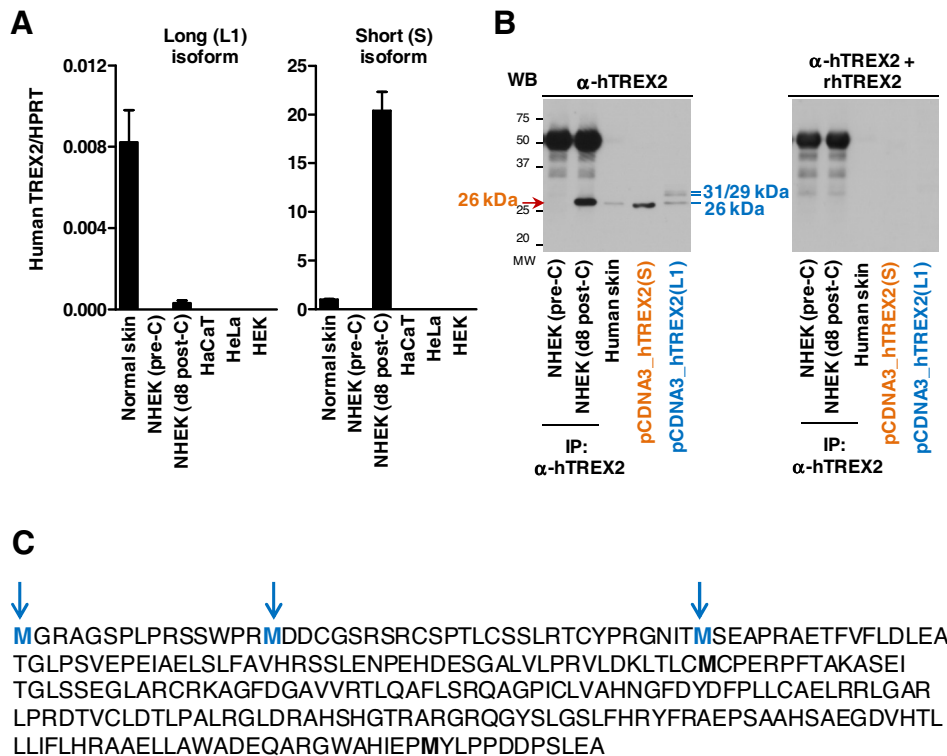


Figura R6. Niveles de mRNA y proteína de las isoformas L1 y S de TREX2 en piel y células humanas. (A) Expresión de los transcritos L1 y S de TREX2 a partir de mRNA de piel humana, el cultivo primario de queratinocitos humanos (NHEK) preconfluentes (pre-C) o al cabo de 8 días de postconfluencia (d8 post-C) y, las líneas muestra la media \pm SEM de tres experimentos independientes. La expresión se normalizó con el gen HPRT. **(B)** Análisis por western blot de la expresión de TREX2 en lisados totales e inmunoprecipitados de muestras de NHEK preconfluentes (pre-C) o al cabo de 8 días de postconfluencia (d8 post-C). Como control positivo se analizaron lisados de piel humana y de células HaCaT con expresión heteróloga estable de los transcritos L1 y S humanos de TREX2. La especificidad de la señal se comprobó preincubando el anticuerpo con proteína TREX2 humana recombinante (rhTREX2) que disminuye la señal de las bandas en los pesos esperados de TREX2 pero no de las bandas inespecíficas. **(C)** Secuencia proteica de la isoforma L1 donde se indican las tres metioninas ubicadas en la región N-terminal, que generan las isoformas proteicas de 31, 29 y 26 kDa.

Estos datos son consistentes con previos estudios de expresión del mRNA de TREX2 en diferentes líneas celulares de ratón los cuales demostraron que la expresión de TREX2 es indetectable en fibroblastos L929, células madre embrionarias R1 y macrófagos derivados de médula ósea (Parra et al., 2009). En este trabajo el estudio de expresión a nivel celular se ha hecho extensivo a la línea de queratinocitos murinos inmortalizados MCA3D y a cultivos de queratinocitos primarios inmortalizados generados en el

laboratorio a partir de los cultivos primarios de queratinocitos wt y *Trex2*^{-/-} (Figura R7). Cuando comparamos los niveles de expresión del mRNA (Figura R7A) y proteína (Figura R7B) de TREX2 en queratinocitos primarios wt, con queratinocitos inmortalizados a partir de estos cultivos primarios (wt-B2, wt-14/4, wt-27/3) y queratinocitos de la línea celular MCA3D inmortalizada después de un tratamiento con carcinógenos (Kulesz-Martin et al., 1983) se observa que la expresión en los queratinocitos inmortalizados es inferior a la de los cultivos primarios. Los diferentes cultivos inmortalizados expresan de 20 a 50 veces menos niveles de RNA que los queratinocitos primarios. Asimismo, la línea MCA3D tiene una expresión casi 100 veces menor en relación con la expresión en primarios. Los niveles inferiores de expresión de TREX2 a nivel de RNA en queratinocitos inmortalizados respecto a los primarios se confirmaron a nivel de expresión proteica (Figura R7B). De hecho, para detectar los bajos niveles de expresión proteica de TREX2 en MCA3D por western blot fue necesario realizar una exposición prolongada. Como control negativo se presenta la nula expresión en el cultivo de queratinocitos también inmortalizados en el laboratorio *Trex2*^{-/-} (KO-B).

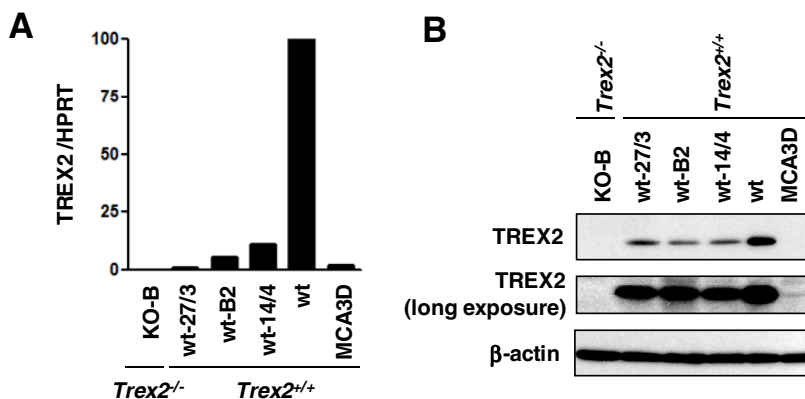


Figura R7. Expresión de TREX2 en queratinocitos inmortalizados. (A) Niveles de mRNA de TREX2 en queratinocitos primarios wt (*Trex2*^{+/+}), queratinocitos inmortalizados espontáneamente (wt-27/3, wt-B2, wt-14/4) y *Trex2*^{-/-} (KO-B) y queratinocitos de la línea celular MCA3D fueron analizados mediante RT-qPCR. La expresión relativa se normalizó con el gen HPRT. Se muestra la variación de la expresión con respecto a los queratinocitos primarios wt. (B) Niveles de expresión proteica de TREX2 en extractos totales de células descritas en A, se analizaron por western blot con el anticuerpo anti-TREX2. En el caso de la hibridación con anti-TREX2 se muestra una exposición larga (*long exposure*) para visualizar la expresión en MCA3D. La β -actina se usó como control de carga.

Por lo tanto, los niveles de mRNA y proteína de TREX2 señalan que la expresión en queratinocitos primarios es considerablemente superior a la que presentan células inmortalizadas, tanto las que hemos inmortalizado en el laboratorio, como la línea celular establecida MCA3D. Por otra parte, es relevante señalar que la deficiencia de TREX2 no condicionó la eficiencia de inmortalización de los queratinocitos primarios, sugiriendo que esta no es dependiente de la presencia de TREX2. En conjunto, estos resultados indican una vez más que la expresión de TREX2 se correlaciona con la diferenciación de los queratinocitos ya que durante la inmortalización se seleccionan características proliferativas más que de diferenciación.

4.1.3 Localización subcelular de TREX2

En piel murina (Figura R1) y humana (Figura R2) se observa una distribución heterogénea de TREX2 en el núcleo y el citoplasma de los queratinocitos. Por otra parte, TREX2 en queratinocitos murinos en cultivo se localiza predominantemente en el núcleo, distribuyéndose en forma de focis (Parra et al., 2009). Con el fin de caracterizar la expresión subcelular de TREX2 en queratinocitos y determinar si las diferentes isoformas humanas presentan patrones diferenciales de localización subcelular, expresamos de forma heteróloga las isoformas L1 y S humanas de TREX2 fusionadas con la proteína fluorescente YFP, YFP-hTREX2 (L1), YFP-hTREX2 (S) o sin fusionar, pcDNA3-hTREX2 (L1) y pcDNA3-hTREX2 (S) en las líneas celulares HEK (Figura R8B) y HaCaT (Figura R8C). Asimismo, se expresó el fragmento N-terminal de 43 aa presente sólo en la isoforma L1 fusionada con la YFP, YFP-hTREX2 (N-43) y la isoforma de TREX2 murina en posición C- o N-terminal (YFP-mTREX2 y mTREX2-YFP, respectivamente), equivalente a la isoforma S humana. Los pesos moleculares esperados de cada una de las proteínas recombinantes se indican en la figura R8A y se confirmaron en los análisis western blot utilizando los anticuerpos anti-GFP, anti-hTREX2 y anti-mTREX2 (Figuras R8B y R8C). Como se ha indicado anteriormente, la transcripción del cDNA de la isoforma L1 origina tres productos de un peso molecular de 31, 29 y 26 kDa que corresponden al peso molecular de las isoformas generadas a partir del uso de cada una de las tres metioninas que se

encuentran en el extremo N-terminal, siendo la tercera equivalente a la primera metionina presente en el cDNA de la isoforma S. El uso de ATGs internos para el inicio de la traducción también se detecta en el análisis western blot anti-TREX2 de la isoforma recombinante YFP-hTREX2 (L1) y en el análisis western blot anti-GFP de la isoforma mTREX2-YFP (Figura R8C).

Al analizar la expresión de YFP-mTREX2, YFP-hTREX2 (L1) y YFP-hTREX2 (S) por inmunofluorescencia (Figura R9) se observó una localización predominantemente nuclear de las formas recombinantes humanas y murina. Además, consistentemente se detecta una elevada concentración de TREX2 en micronúcleos, presentes de forma constitutiva en la línea celular HaCaT. Los micronúcleos son marcadores de inestabilidad genómica (Terrades et al., 2010) y están presentes en algunas líneas inmortalizadas. YFP presenta tanto una localización citoplasmática como nuclear, como se ha descrito en otros modelos (Seibel et al., 2007) pero en ningún caso se detecta en micronúcleos. Además, TREX2 está presente específicamente también en el DNA mitótico y en el DNA apoptótico. Por otra parte, la expresión del extremo N-terminal de la isoforma L1 humana, YFP-hTREX2 (N43) mostró una distribución difusa entre núcleo y citosol. Ahora bien, el patrón de expresión no difiere significativamente entre la isoforma larga, YFP-hTREX2 (L1) y la corta, YFP-hTREX2 (S) indicando que el extremo N-terminal presente en la isoforma L1 no determina un cambio de localización subcelular. Señalar que la localización subcelular de YFP-TREX2 coincide con la expresión endógena de TREX2 en cultivos primarios de queratinocitos, donde se observa un reclutamiento de TREX2 en micronúcleos, principalmente en células tratadas con radiación UVB (Manils et al., 2015).

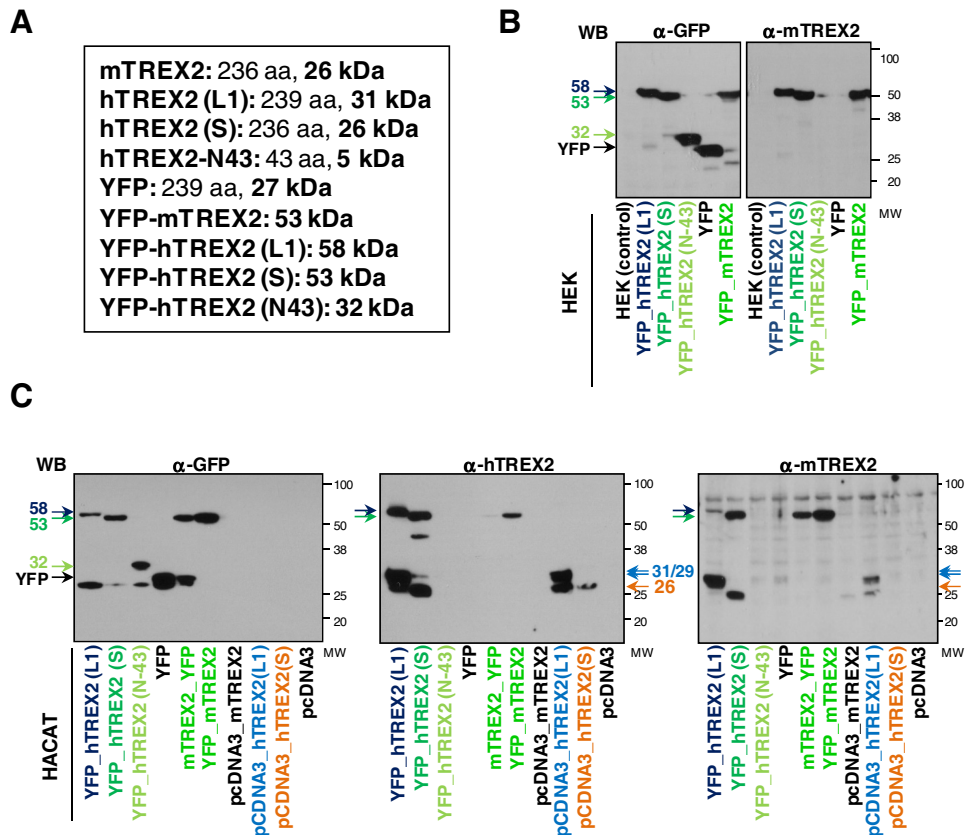


Figura R8. Expresión heteróloga de las proteínas recombinantes de TREX2 en células humanas. (A) Pesos moleculares esperados de las diferentes proteínas recombinantes de TREX2 fusionadas a YFP, YFP-mTREX2, YFP-hTREX2 (L1), YFP-hTREX2 (S), YFP-hTREX2 (N43) o sin fusionar, mTREX2, hTREX2 (L1), hTREX2 (S), hTREX2-N43. **(B)** Análisis western blot con los anticuerpos anti-GFP y anti-mTREX2 de las proteínas recombinantes de TREX2 fusionadas a YFP, YFP-mTREX2, YFP-hTREX2 (L1), YFP-hTREX2 (S), YFP-hTREX2 (N43), como control negativo se han usado extractos totales de células HEK que no expresan TREX2. **(C)** Análisis western blot con los anticuerpos anti-GFP, anti-hTREX2 y anti-mTREX2 de las proteínas recombinantes fusionadas a YFP, YFP-mTREX2, mTREX2-YFP, YFP-hTREX2 (L1), YFP-hTREX2 (S), YFP-hTREX2 (N43) o sin fusionar, pcDNA3-mTREX2, pcDNA3-hTREX2 (L1) y pcDNA3-hTREX2 (S) en células HaCaT.

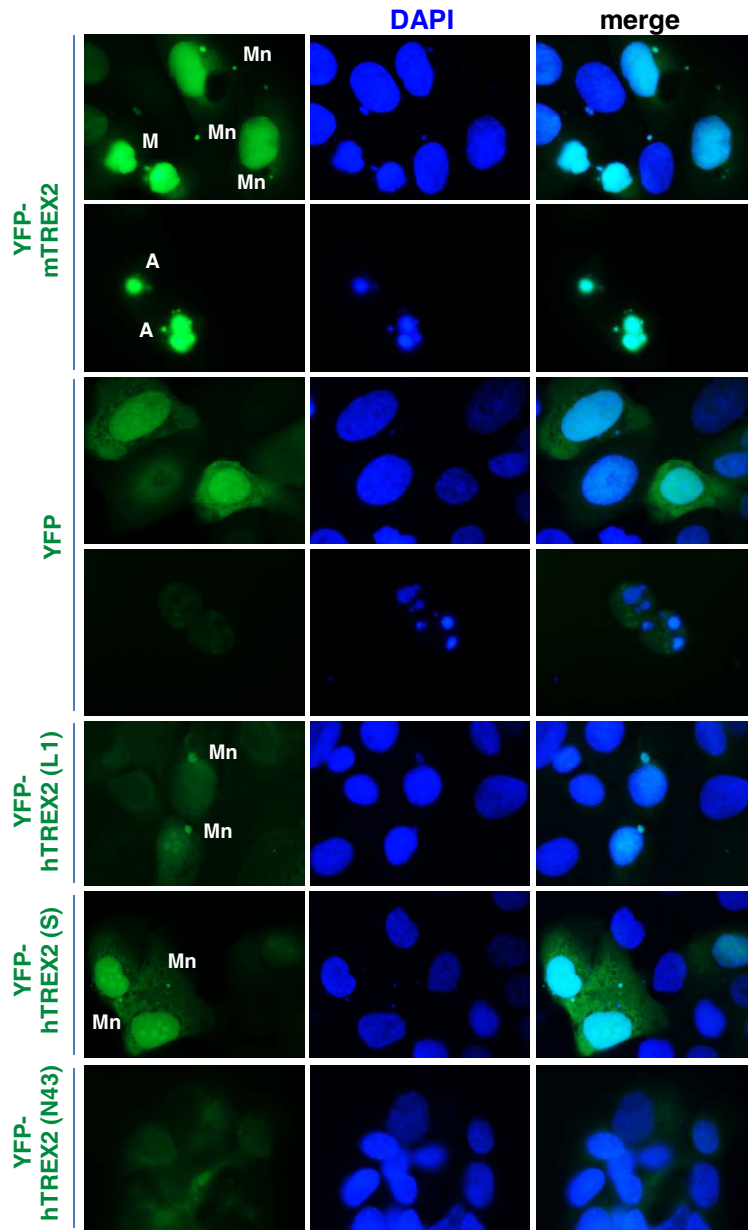


Figura R9. Distribución subcelular de las proteínas recombinantes de TREX2. Análisis de inmunofluorescencia en células HaCaT transfectadas transitoriamente con los cDNAs correspondientes a las formas recombinantes YFP-mTREX2, YFP-hTREX2 (L1), YFP-hTREX2 (S) y YFP-hTREX2 (N43). Como control negativo se incluye YFP sin fusionar. Los núcleos han sido marcados con DAPI. Las imágenes han sido obtenidas en un microscopio de fluorescencia a 100x aumentos. Mn, Micronúcleos; A, células en apoptosis; M, células en Mitosis.

4.1.4 Actividad exonucleasa de las isoformas de TREX2

Con el fin de determinar si las diferentes isoformas de TREX2 presentaban una actividad exonucleasa similar o no, y determinar la actividad de esta exonucleasa al pH relativamente ácido presente en la superficie de la piel, se generaron y purificaron las isoformas proteicas humanas y la murina fusionadas a MBP, MBP-hTREX2 (L1), MPB-hTREX2 (S), MBP-hTREX2 (N43) y MBP-mTREX2 (Figura R10). La proteína de ratón MBP-mTREX2 equivalente a la isoforma de 236 aa humana (S) había sido previamente generada en el laboratorio (Parra et al., 2009). La masa molecular estimada de las proteínas de fusión se muestra en la figura R10. La expresión de la proteína recombinante fusionada a MBP de las diferentes isoformas se desarrolló con éxito y se obtuvo una elevada producción y alto nivel de purificación de cada una de las proteínas recombinantes, excepto el fragmento N terminal de 43 aa presente en la MPB-hTREX2 (N43). Curiosamente, la expresión del extremo terminal que diferencia las isoformas humanas L1 y S también presentó dificultades cuando se intentó expresar de forma heteróloga en células HaCaT fusionada con YFP. Es posible que este fragmento contenga algún dominio que afecte a la estabilidad de la proteína. Una vez purificadas las proteínas recombinantes llevamos a cabo una serie de experimentos de actividad exonucleasa de las variantes humanas MBP-hTREX2 (L1) y MBP-hTREX2 (S) y de la variante de ratón MBP-mTREX2, utilizando como substrato DNA de doble cadena (dsDNA). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente en los tiempos indicados y a pHs 7.4, 6.0 y 5.5. Se ha descrito que el pH óptimo para la actividad exonucleasa de la isoforma de 236 aa está entre 7.5-8.0 (Mazur & Perrino, 2001b). El análisis a pHs más ácidos se realizó para determinar el nivel de actividad en las condiciones de pH presentes en el estrato córneo, donde podría liberarse desde los corneocitos o las glándulas sebáceas. La cinética de la actividad de cada una de las isoformas se encuentra representada en la figura R11A y la cuantificación en las figuras R11B y R11C. Como control negativo se analizó la actividad del tag de expresión MBP. La actividad de cada isoforma recombinante de TREX2 es claramente dependiente del pH, disminuyendo notoriamente a pH 5.5. Al comparar la actividad de las dos isoformas humanas y la de ratón se observa que a los diferentes pHs analizados la

isoforma de ratón es la que presenta menor actividad. Por otra parte, las diferencias entre las dos isoformas humanas son mínimas. A pH 7.4 presenta mayor actividad la isoforma L1, mientras que a pH 6.0 la isoforma S es la más activa, no observándose diferencias a pH de 5.5 (Figura R11C). Curiosamente, la isoforma humana S tiene una actividad similar a pH 6.0 y pH 7.4. (Figura R11B). Por lo tanto, en las condiciones ensayadas, la isoforma humana de 236 aa (S) sería menos sensible a la disminución de pH que la isoforma humana de 279 aa y la murina de 236 aa.

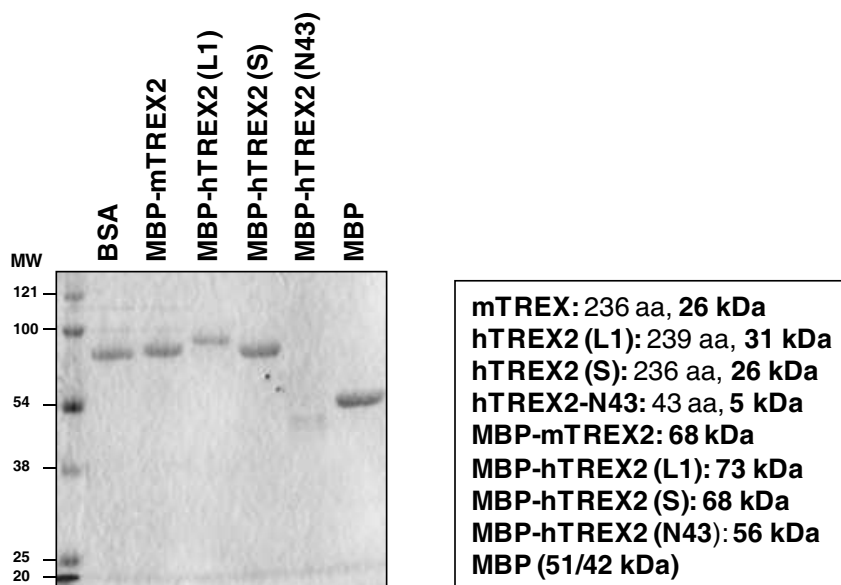


Figura R10. Análisis SDS-PAGE de las proteínas de fusión de TREX2 purificadas. Las proteínas de fusión MBP-hTREX2 (L1), MBP-hTREX2 (S), MBP-hTREX2 (N43), MBP-mTREX2 y MBP fueron generadas como se ha descrito en Materiales y Métodos. Aproximadamente 2 μ g de cada proteína fueron sometidos a SDS-PAGE al 12%, el gel fue teñido con *Comassie*. El BSA (62 kDa) se ha utilizado como control. Los aminoácidos y pesos moleculares de cada isoforma y los pesos moleculares de las diferentes proteínas de fusión se encuentran indicados. El fragmento MBP fusionado tiene un tamaño inferior al de la MBP ya que se elimina un fragmento C-terminal en la fusión.

En conjunto, los resultados indican que la máxima actividad exonucleasa de TREX2 se detecta a un pH neutro (pH 7.4), disminuyendo a pHs más ácidos sin que la actividad se bloquee completamente. Existen en el interior celular una gran cantidad de funciones que son estrechamente dependientes del pH, entre ellas están la síntesis de DNA, proliferación

celular, funcionamiento de los canales, etc. En este contexto, la actividad exonucleasa de TREX2 no parece ser la excepción. Otras proteínas intracelulares como canales de membrana o proteínas que también poseen actividad enzimática son muy sensibles al pH (Di Russo et al., 2012). El pH óptimo para una rápida y eficiente actividad exonucleasa por parte de TREX2 se halla entre 7.0-7.5, no obstante, la actividad a pHs más ácidos no es despreciable y podría jugar un papel relevante en el estrato córneo.

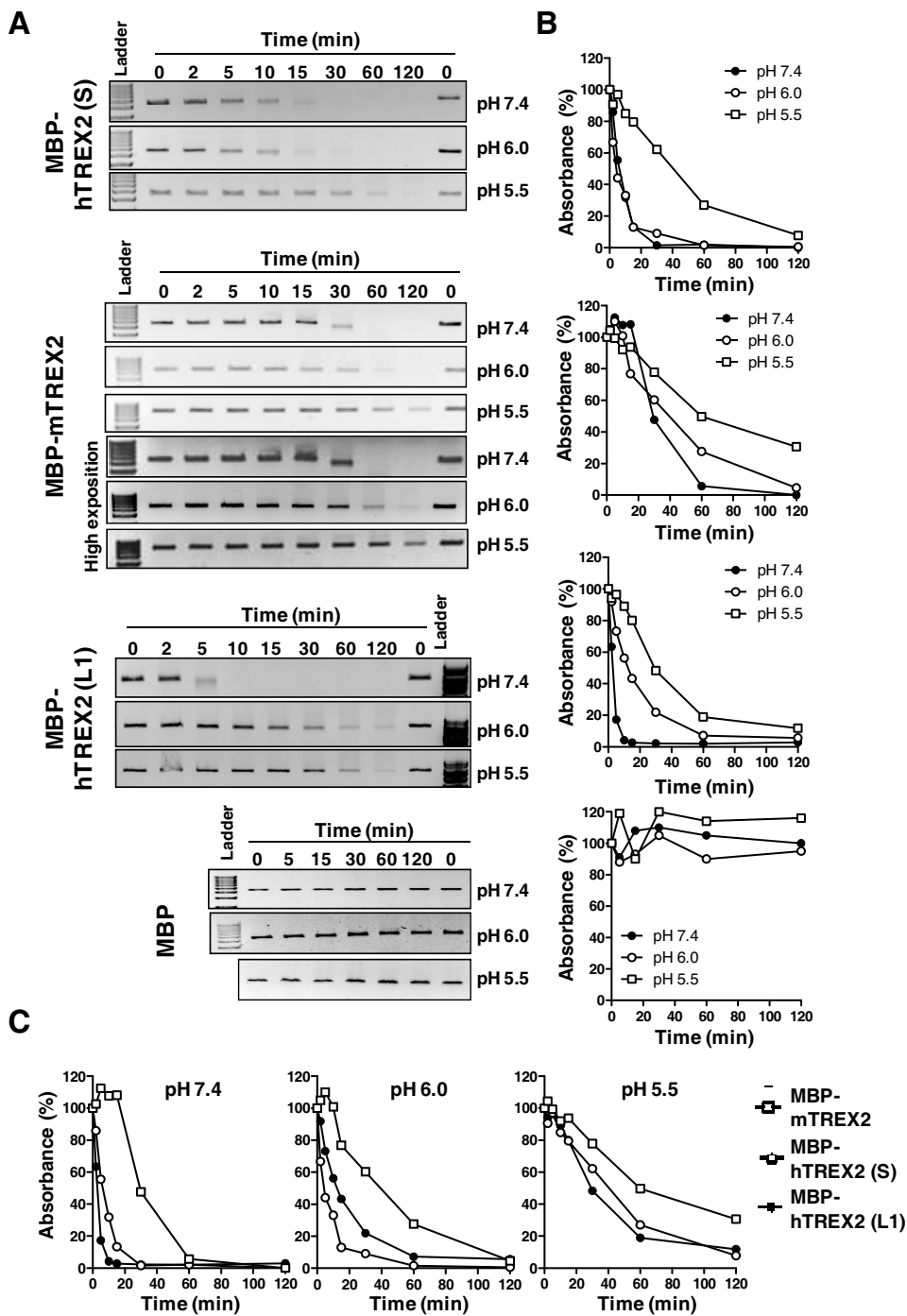


Figura R11. Actividad exonucleasa de las isoformas humanas y murina de TREX2 a diferentes pHs. (A) Actividad exonucleasa de las variantes humanas de TREX2; MBP-hTREX2 (S), MBP-hTREX2 (L1) y la de ratón, MBP-mTREX2, con 100 ng de dsDNA como sustrato a los tiempos indicados. Como control negativo se usó MBP no fusionada. Las reacciones se llevaron a cabo a los pHs 5.5, 6.0 y 7.4. (B, C) Cuantificación de las bandas de la electroforesis.

4.2 Caracterización del promotor del gen *TREX2*

4.2.1 Identificación de los inicios de transcripción del gen *TREX2*

Con miras a determinar la región promotora putativa del gen *TREX2* se analizaron los orígenes de transcripción del gen *TREX2* humano y murino a partir de mRNA de piel y queratinocitos humanos y de ratón. La identificación de los TSS del gen *TREX2* nos permite deducir la localización del promotor o promotores más utilizados. Para este estudio se utilizó la técnica del RACE, la cual permite obtener la secuencia de las regiones 5' (5' ENDS) y 3' (3' ENDS) del transcrito de RNA.

Respecto al gen *TREX2* humano, ya se ha comentado que se han descrito al menos tres transcritos generados a partir de diferentes exones y un *splicing* diferencial (Chen et al., 2007a) que codifican para las isoformas L1, L2 y S de 279 aa, 278 aa y 236 aa respectivamente, además de otros posibles transcritos que incluyen varios exones del gen *HAUS7* localizado a 5' de *TREX2*. En los ensayos 5' RACE-PCR que hemos realizado a partir de mRNA de piel y de queratinocitos humanos se identificaron cuatro inicios de transcripción localizados a -626 pb (inicio 1), -625 pb (inicio 2), -623 pb (inicio 3) y -621 pb (inicio 4) con respecto a la metionina de inicio de la traducción de la isoforma corta de 236 aa (Tabla R1). Estos inicios se han identificado en dos tipos de transcritos generados por un *splicing* diferencial de 513 o 544 pb de los dos exones que codifican para la isoforma S (236 aa). El inicio 3, identificado en el 63% de los clones, había sido previamente reportado por Mazur & Perrino (2001a). En el mismo estudio se reportó un inicio a -753 pb sin embargo, éste 5' END no fue hallado en nuestro análisis. Al comparar los sitios de inicio de transcripción encontrados mediante la técnica 5' RACE con aquellos descritos en los transcritos presentes en la base de datos Ensembl comprobamos que no había coincidencia. En la base de datos se asigna un inicio a -1057 pb del ATG de la isoforma de 236 aa y para las isoformas de 279 aa y 278 aa se muestran inicios a -22745 pb y 22794 pb

respectivamente de sus correspondientes ATGs, ninguno de los cuales fue encontrado en nuestro estudio. Ahora bien, los inicios de muestras humanas denominados inicio 1, inicio 2, inicio 3 e inicio 4 en particular, sí que son equivalentes a los identificados en la forma murina tal y como puede apreciarse al alinear los dos transcritos (Figura R12A y R12B). Adicionalmente, a partir de RNA de piel humana se localizaron también dos inicios de transcripción, a -8851 pb (inicio 5) y a -8735 pb (inicio 6) con respecto del ATG que marca el inicio de la traducción (Figura R12C). Estos inicios corresponderían a un nuevo transcrito que hemos denominado L3, el cual estaría compuesto por seis exones y daría lugar a una isoforma proteica de 273 aa. La nueva variante encontrada contendría exones de *TREX2* y *HAUS7* y utilizaría el mismo ATG de la isoforma L2. Por otra parte, no fue posible identificar los posibles inicios de transcripción para el transcrito que codifica para la isoforma larga de 279 aa, ni para el que codificaría la isoforma de 278 aa, puesto que no se detectaron los transcritos correspondientes. Estas isoformas posiblemente son muy poco abundantes ya que tampoco se detectó expresión a nivel proteico. Finalmente, se identificó un único 3' END en humano, a +246 pb contados a partir del codón STOP.

En ratón sólo hay evidencias de un único transcrito integrado por dos exones (Parra et al., 2009) que codifica para una proteína de 236 aa (Mazur & Perrino, 1999). Así pues, el gen *Trex2* murino está constituido por 2 exones y un intron de 623 pb, estando la región codificante íntegramente en el exón 2 (Figura R12A). A partir de las secuencias 5' RACE analizadas usando como molde mRNA de queratinocitos murinos, se identificaron dos 5' ENDS, uno a -705 pb (inicio1) y otro a -703 pb (inicio2) del codón ATG de inicio de la traducción (Tabla R1; Figura R12A). El 66% de los clones obtenidos correspondieron al punto de inicio 1 el cual coincide con el inicio del transcrito *Trex2-001* descrito en la base de datos de Ensembl (ID: ENSMUST00000033738). Ninguno de estos dos inicios coincide con la secuencia del mRNA disponible en la base de datos NCBI (NM_011907.4) en la cual el inicio de transcripción se ubica a -704 pb. Se escogió el inicio 1 como el TSS +1 a partir del cual se contarían las secuencias promotoras a 5' del gen en los ensayos del promotor descritos más adelante. Por otra parte, en este estudio reportamos tres diferentes 3'

ENDs: +212, +219 y +224 contados a partir del TGA o codón STOP del gen. El 3' END +224 coincide con el reportado en Ensembl (ID: ENSMUST00000033738).

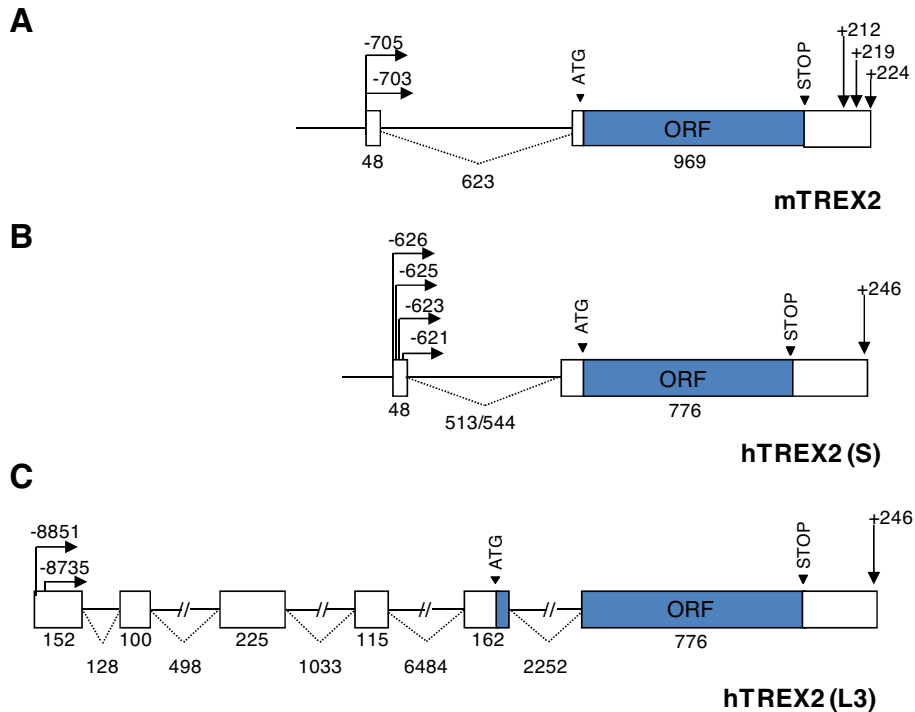


Figura R12. Representación de los inicios de transcripción identificados en los transcritos de *Trex2*. Los inicios (5' ENDS) y finales (3' ENDS) de transcripción fueron hallados mediante la técnica de RACE. **(A)** Transcrito del gen *Trex2* murino que codifica para la isoforma de 236 aa. **(B)** Transcrito del gen *TREX2* humano que codifica para la isoforma de 236 aa (S, short) **(C)** Transcrito del gen *TREX2* humano que codifica para la nueva isoforma de 273 aa, denominado L3. Las flechas horizontales indican los inicios o extremos 5' (5' ENDS) y las verticales los 3' (3' ENDS). Los extremos 5' han sido contados a partir del ATG de cada transcrito y los 3' a partir del codón STOP. El ATG, el tamaño de los exones y del *splicing* también se encuentran indicados. ORF, *open reading frame*.

En resumen, la estructura exónica e intrónica y los inicios de transcripción de los transcritos humanos y de ratón que codifican para la isoforma de 236 aa en queratinocitos son semejantes. Por otra parte, los transcritos humanos que codifican para otras isoformas de TREX2 son relativamente poco abundantes y prácticamente indetectables.

Por ello, la caracterización de la región promotora se realizó teniendo en cuenta el inicio de transcripción de la isoforma S.

Tabla R1. Inicios y finales de transcripción del gen *TREX2* humano y murino. Los inicios 5' (5' END) y extremos 3' (3' END) de transcripción fueron hallados mediante la técnica RACE a partir de RNA de piel, queratinocitos humanos y queratinocitos de ratón. Se indica el transcrito específico en el que fue hallado para cada 5' END y 3' END, el número de clones encontrado para cada inicio en particular y la distancia en pb contada a partir del ATG. Los inicios se han numerado de 1 a 6.

hTREX2 (human <i>TREX2</i>)								
	S Transcript (<i>splicing</i> 513 pb)		S Transcript (<i>splicing</i> 544 pb)		L3 Transcript (<i>splicing</i> 2252 pb)			
Cell/Tissue	5' END (pb from ATG)	clones (n)	5' END (pb from ATG)	clones (n)	5' END (pb from ATG)	clones (n)	3' END (pb from TCA)	clones (n)
Keratinocytes	1 (-626)	1	-	-	-	-	1 (+246)	1
	2 (-625)	2	2 (-625)	1	-	-	-	-
	3 (-623)	4	3 (-623)	5	-	-	-	-
	4 (-621)	1	-	-	-	-	-	-
Skin	3 (-623)	2	3 (-623)	3	-	-	-	-
	-	-	-	-	5 (-8851)	1	-	-
	-	-	-	-	6 (-8735)	2	-	-
mTREX2 (mouse <i>TREX2</i>)								
	Transcript (<i>splicing</i> 623)							
Keratinocytes	5' END (pb from ATG)	clones (n)					3' END (pb from TCA)	clones (n)
	1 (-705)	2					1 (+212)	1
	2 (-703)	1					2 (+219)	1
	-	-					3 (+224)	2

4.2.2 Análisis *in silico* de la región promotora putativa del gen *TREX2*

Como primera aproximación para identificar zonas del promotor del gen *TREX2* conservadas a través de la evolución se usó la base de datos ECRbase (ECRbase, *Database of Evolutionary Conserved Regions*) disponible online (<http://ecrbrowser.dcode.org/>). ECRbase es una interfase gráfica que permite visualizar y analizar regiones conservadas evolutivamente en genomas secuenciados de diferentes especies. Con este fin, se llevó a cabo una comparación de genes ortólogos al gen *Trex2* murino en diferentes especies de vertebrados: *Homo sapiens* (humano), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Bos taurus* (vaca), *Xenopus tropicalis* (rana) y *Tetraodon nigroviridis* (pez globo) escogiendo como secuencia

base el genoma de *Mus musculus* (ratón) a partir del cual se hizo el alineamiento de los demás genomas. Los resultados del análisis se muestran en la figura R13A donde es evidente la presencia de tres regiones conservadas (indicadas en color rojo) que se encuentran situadas a 5' del gen *TREX2* en ratón, humano y chimpancé, las cuales han sido designadas como ECR1, ECR2 y ECR3. Las secuencias de las especies de vertebrados más alejadas evolutivamente de ratón, es decir, pez globo y rana no muestran similitud alguna con las secuencias promotoras de los mamíferos. En *B. taurus* se aprecia una región adyacente al primer exón de ratón que se encuentra parcialmente conservada. En ratón, la longitud de la región ECR1 es de 242 pb, incluye parte del exón 1 y presenta una similitud aproximada al 80% con su secuencia homóloga humana. La región ECR2, adyacente al primer exón, tiene una longitud de 60 pb y comparte el 77% con la secuencia humana. La región conservada más distante del primer exón (ECR3) se encuentra aproximadamente a -1600 pb del inicio de transcripción, tiene una longitud de 119 pb y una similitud del 76% con la región correspondiente en humano.

El análisis de los elementos reguladores conservados en humano y ratón presente en estas tres regiones conservadas se muestra en la Figura R13B. El gen *TREX2* no posee una caja TATA, localizándose un motivo Inr (iniciador) y un motivo MTE (*Motif ten element*) en la región ECR1, a -57 y -103 pb respecto el TSS identificado en nuestros estudios (Figura R15A). La ECR1, adyacente al primer exón, arrojó un total de 33 TFBS putativos de los cuales el 55% se ubicó dentro de la región intergénica. La región ECR3 presentó un total de 8 TFBS conservados. No se encontraron TFBS conservados entre humano y ratón dentro de la ECR2.

Con el fin de contrastar la información obtenida en la base de datos de ECRbase, realizamos análisis *in silico* complementarios usando las bases de datos cisRED (www.cisred.org) (Figura R13C) y Genomatix (www.genomatix.de, Genomatics software GmbH) (Figura R13D). El análisis con cisRED de los elementos conservados en el promotor proximal murino incluye TFBS para los factores de transcripción AP-2, MTF1 (*Metal-regulatory transcription factor-1*), Ahr (*Arylhydrocarbon receptor*) y Pax6 (*Paired box 6*). En relación al análisis utilizando ECRbase, señalar la coincidencia para AhR, un factor de

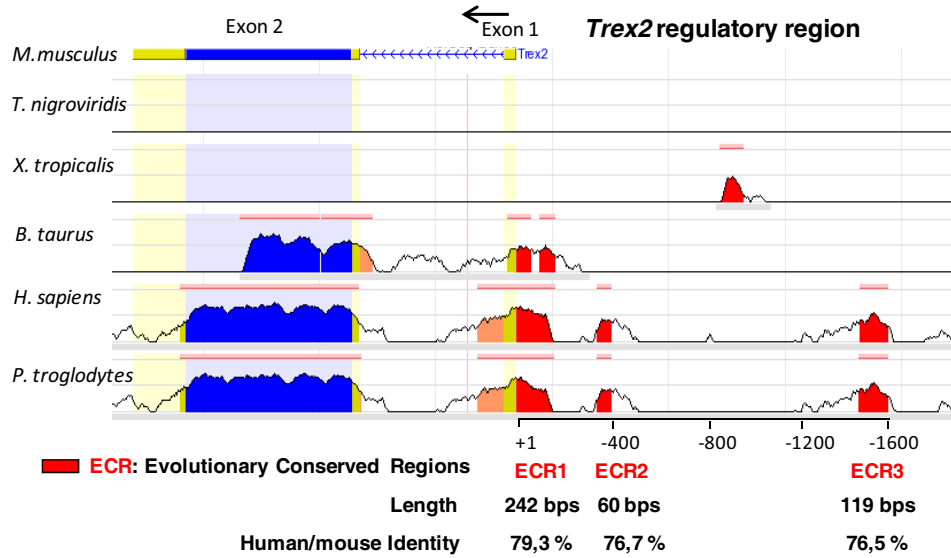
transcripción relacionado con la fisiología y patología de la piel (Furue et al., 2014). De hecho, muchos estudios indican que AhR puede mediar en la regulación de la diferenciación epidérmica (Ray & Swanson, 2003; Sutter et al., 2011).

Utilizando el software Genomatix MatInspector decidimos analizar la presencia de TFBS para factores de transcripción que por los datos en la bibliografía, están relacionados con la expresión específica en queratinocitos y/o con la expresión dependiente de diferenciación. Entre estos destacan las familias de factores de transcripción ETS, AP1, C/EBP (*CCAAT-Enhancer Binding protein*), Sp1 y AP-2 (Maytin et al., 1999; Tummala & Sinha, 2006; Chris et al, 2006; Borrelli et al., 2007; Nakamura et al., 2007; You et al., 2007; Choi et al., 2008; Wang et al., 2008; House et al., 2010; Rozenberg et al., 2013) para los que se predicen múltiples TFBS putativos en la región putativa del promotor de *TREX2* humano y ratón, situada a unos 1600 pb 5'-*upstream* del inicio de transcripción. Asimismo, se localizan TFBS potenciales para el factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding protein*), implicado en la proliferación de queratinocitos (Rozenberg et al., 2009) y GATA3 (*Globin transcription factor 3*), implicado en la activación de la expresión de genes específicos en queratinocitos diferenciados (Kawachi et al., 2012) (Figura R13D).

En resumen, el estudio *in silico* del gen *TREX2* revela que una región de 1600 pb situada 5'-*upstream* del gen, en la que se han identificado tres regiones conservadas en humano y ratón, se encuentran diversos sitios de unión para familias de factores de transcripción como son: AP1, Sp1, C/EBP, CREB, ETS, AP-2 y GATA3 que podrían tener un papel relevante en la expresión específica de *TREX2* en queratinocitos y su regulación durante la diferenciación.

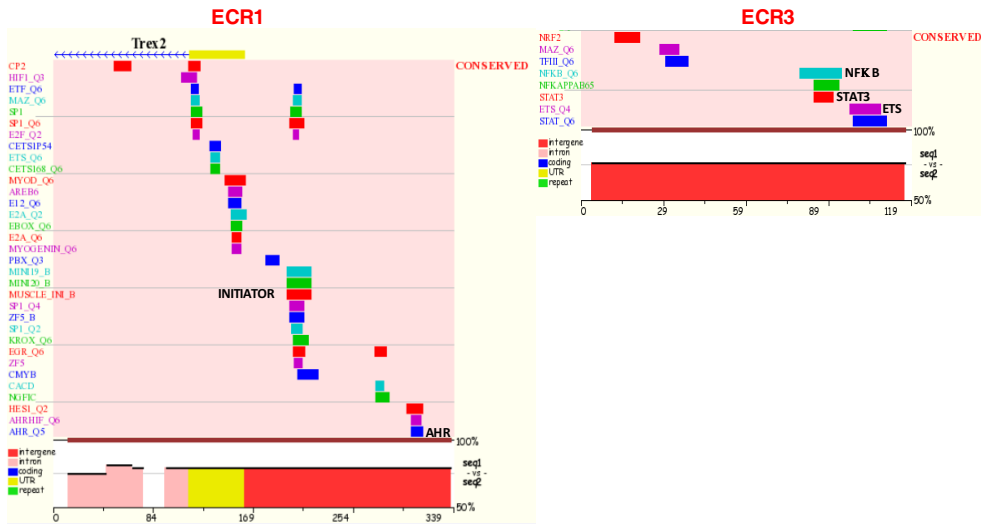
A

EVOLUTIONARY CONSERVED REGIONS



B

CONSERVED TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES



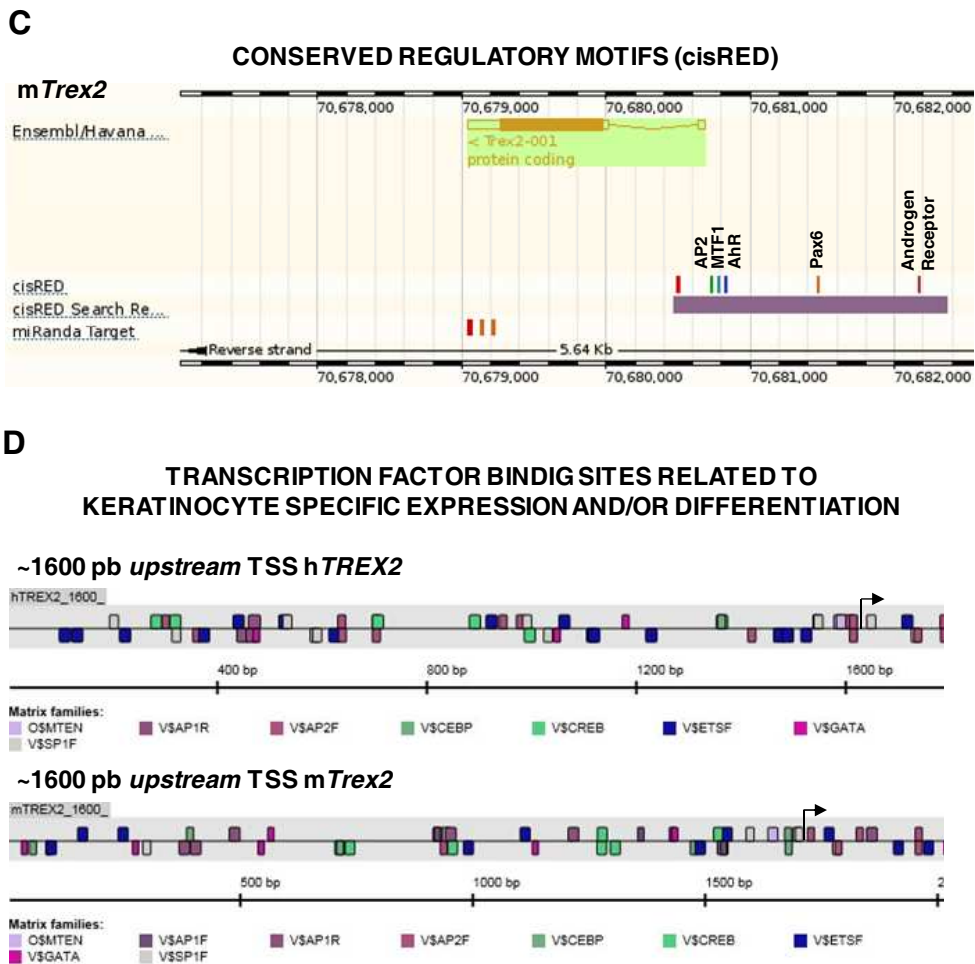


Figura R13. Análisis *in silico* de los TFBS putativos presentes en la región 5' upstream del gen *TREX2* humano y murino. Se presenta el análisis *in silico* de las secuencias reguladoras potenciales identificadas mediante las bases de datos (A, B) ECRbase (*Database of Evolutionary Conserved Regions*) (C) cisRED y (D) Genomatix. (A) Regiones conservadas evolutivamente (ECR) en la región promotora del gen *Trex2* murino comparado con otras especies. (B) TFBS conservados en ratón y humano en las regiones ECR. (C) Motivos reguladores del gen *Trex2* murino. (D) Elementos generales del promotor, MTE (*motif ten element*) y TFBS para las familias de factores de transcripción AP1, AP-2, C/EBP, CREB, ETS y GATA en la región de 1600 pb 5'-upstream del inicio de transcripción del gen *TREX2* humano y de ratón.

El análisis más exhaustivo de los factores de transcripción relevantes en la diferenciación y expresión específica en queratinocitos se realizó utilizando la base de datos JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>). Los miembros analizados relacionados con la expresión específica en queratinocitos y diferenciación fueron: Elf5 (ETS); Jun:Fos, JunD,

JunB, c-Jun, c-Fos (AP1); CREB1 (CREB), GATA3, GATA4 (GATA); AP-2 α , AP-2 γ (AP-2). De la familia ETS, la expresión de la proteína Elf5 se encuentra restringida a queratinocitos diferenciados (Tumala & Sinha, 2006) por lo cual fue la única integrante de la familia considerada en el análisis. Las proteínas pertenecientes a la familia AP1 se expresan en diferentes capas de la epidermis (Eckert et al., 2013b) y se ha adjudicado un papel importante a AP1 en la diferenciación de los queratinocitos (Eckert et al., 2004; Mizuno et al., 2006; Rorke et al., 2010) razón por la cual fueron consideradas en el análisis. CREB es un factor de transcripción importante para la proliferación de los queratinocitos (Rutberg et al., 1999; Ansari et al., 2008; Rozenberg et al., 2009) y algunos estudios reportan que los niveles de proteína de CREB se ven inducidos por la diferenciación de los queratinocitos (Rutberg et al., 1999; Rozenberg et al., 2013). GATA3 activa la transcripción del gen de la Loricrina en cooperación con c-Fos y Sp1 (Kawachi et al., 2012). Este gen se expresa específicamente en queratinocitos en diferenciación y la contribución de GATA3 en su transcripción lo convertía en un buen candidato a ser considerado. La deficiencia de AP-2 α y AP-2 γ en la epidermis perturba severamente la diferenciación terminal y suprime factores de transcripción adicionales y genes estructurales involucrados (Wang et al., 2008). Estos miembros de la familia AP-2 parecen tener un papel relevante en la diferenciación. En la Tabla R2 se detalla el número de sitios de unión para cada uno de estos factores dentro de la secuencia a 5' del gen *Trex2* comprendida entre los -1633 y +48 pb que incluía las tres regiones ECR conservadas. Además, se incluye también el análisis considerando dos segmentos más cortos, -487/+48 el cual contiene íntegramente la región ECR2 y, -260/+48, que contiene parte de la región ECR1. Los resultados del análisis muestran múltiples sitios teóricos de reconocimiento para estos factores de transcripción (*score* > 0,85). Complementario al estudio de ratón, alineamos las secuencias de cada uno de los segmentos escogidos con la secuencia humana para de esta manera, analizar los sitios de unión en los segmentos equivalentes (-1268/+70, -358/+70, -171/+70). El análisis pone de manifiesto que en la región 5'-*upstream* del gen *TREX2* humano y murino se encuentra un elevado número de TFBS putativos para Elf5 y para miembros de la familia AP1, entre los cuales se destaca Jun:Fos. Curiosamente, los TFBS

putativos para miembros de AP-2 están relativamente más representados en la secuencia del promotor de *TREX2* humano, lo que puede indicar algunas diferencias en la regulación entre el gen humano y el de ratón.

Tabla R2. Principales TFBS de miembros de las familias AP1, AP-2, ETS, CREB y GATA en la secuencia *upstream* del gen *TREX2* de ratón y humano. Análisis utilizando la base de datos Jaspar de los TFBS de diferentes miembros de familias de factores de transcripción relevantes en la expresión específica y durante la diferenciación de genes en queratinocitos, en la región 5'-*upstream* del gen *TREX2* humano y de ratón. El número de sitios (n) para cada factor de transcripción se indica.

TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES RELATED TO KERATINOCYTE SPECIFIC EXPRESSION AND/OR DIFFERENTIATION					
5' -upstream <i>mTrex2</i>	ETS (n)	AP1 (n)	CREB (n)	GATA (n)	AP-2 (n)
-1633/+48	Elf5 (7)	Jun:Fos (10) JunD (2) JunB (3) c-Jun (2) c-Fos (4)	CREB1 (2)	Gata3 (4) Gata4 (2)	AP-2 α (0) AP-2 γ (3)
-487/+48	Elf5 (4)	Jun:Fos (4) JunD (3) JunB (2) c-Jun (1) c-Fos (3)	CREB1 (2)	Gata3 (1) Gata4 (0)	AP-2 α (0) AP-2 γ (1)
-260/+48	Elf5 (2)	Jun:Fos (2) JunD (1) JunB (1) c-Jun (0) c-Fos (1)	CREB1 (0)	Gata3 (1) Gata4 (0)	AP-2 α (0) AP-2 γ (1)
5' -upstream <i>TREX2</i>	ETS (n)	AP1 (n)	CREB (n)	GATA (n)	AP-2 (n)
-1268/+70	Elf5 (3)	Jun:Fos (4) JunD (0) JunB (1) c-Jun (2) c-Fos (0)	CREB1 (1)	Gata3 (2) Gata4 (3)	AP-2 α (5) AP-2 γ (14)
-358/+70	Elf5 (1)	Jun:Fos (2) JunD (0) JunB (3) c-Jun (0) c-Fos (0)	CREB1 (0)	Gata3 (0) Gata4 (1)	AP-2 α (2) AP-2 γ (6)
-171/+70	Elf5 (1)	Jun:Fos (2) JunD (0) JunB (1) c-Jun (0) c-Fos (0)	CREB1 (0)	Gata3 (0) Gata4 (0)	AP-2 α (2) AP-2 γ (5)

4.2.3 Análisis de la actividad transcripcional del promotor del gen *Trex2* murino

Teniendo en cuenta los datos *in silico* y con el objeto de determinar experimentalmente las regiones reguladoras del promotor del gen *Trex2*, se clonó y analizó la actividad transcripcional de la región 5'-upstream del gen *Trex2* murino. Se generaron nueve fragmentos mediante deleciones sucesivas de la región de 1600 pb 5'-upstream analizada anteriormente y en el que se localizaban las tres regiones ECR y diversos TFBS que teóricamente podrían estar implicados en la regulación específica de

este gen en queratinocitos. Estos fragmentos se clonaron en el vector pGL2 y se analizó la actividad transcripcional de cada fragmento valorando la actividad luciferasa en la línea celular de queratinocitos murinos MCA3D, como modelo de expresión positiva, y en la línea de fibroblastos murinos NIH3T3, como modelo de expresión negativa endógena de *TREX2*. Consistentemente, los resultados obtenidos muestran que la actividad luciferasa de las diferentes construcciones del promotor de *Trex2* es significativamente superior en los queratinocitos MCA3D en comparación con los fibroblastos NIH3T3, indicando que la mínima región promotora analizada era sensible a la regulación dependiente de tipo celular (Figura R14A). La diferencia de actividad en MCA3D es de más de diez veces en las construcciones que incluyen el fragmento -260/+48, mientras que es de sólo tres en la construcción que incluye la región -212/+48 y no llega a duplicarla en las construcciones más cortas. Al comparar los niveles de actividad de los nueve fragmentos generados se distingue una actividad promotora equivalente de las construcciones -1633/+48, -487/+48 y -260/+48, indicando que las regiones conservada ECR3 y ECR2, no tendrían *in vitro* un papel regulador positivo ni negativo. Interesantemente, sí se produce una disminución significativa de la actividad específicamente en la línea MCA3D en el constructo -212/+48 y adicionalmente tanto en MCA3D como en NIH3T3 en el constructo -177/+48. Es decir, entre el fragmento -260/+48 y el -212/+48 existirían secuencias relevantes que potencian la actividad transcripcional específicamente en queratinocitos. Las deleciones adicionales (-109/+48,-73/+48) no muestran cambios relevantes respecto a la construcción -177/+48, a excepción de -138/+48 que presenta una actividad ligeramente superior, similar a la de la construcción -212/+48.

Además, evaluamos si la región intrónica contenía elementos que regularan la actividad del promotor de *Trex2* (Figura R14B). Los datos obtenidos indican que si bien la presencia de la región intrónica en la construcción plasmídica genera una mayor actividad del promotor proximal (-260/+48 en relación a -260/+682 y -487/+48 en relación a -487/+682), los elementos que contribuyen significativamente a la actividad del promotor se localizan en la región a 5' del inicio de transcripción, situada entre -260 y -177 (-260/+48 en relación a -177/+48 y -260/+682 vs -177/+682). Destacar que entre -260 y

-177 pb se concentran TFBS para AP1, Elf5 y CREB (Figura R15). Además, en esta región se encuentran secuencias CpG, cuyo estado de metilación se analizó para determinar si regulaba y/o influía en la expresión diferencial de TREX2 (ver apartado 4.3). Análogamente, en el promotor putativo humano, entre -240 y -120 pb se encuentra una región en la que también se observa una densidad relativamente elevada de TFBS para AP1 y Elf5 (Figura R16).

En resumen, el promotor proximal del gen *Trex2* se encuentra aproximadamente a 260 pb del inicio de la transcripción del gen y contiene elementos *cis* relacionados con la expresión diferencial de TREX2 en queratinocitos y fibroblastos.

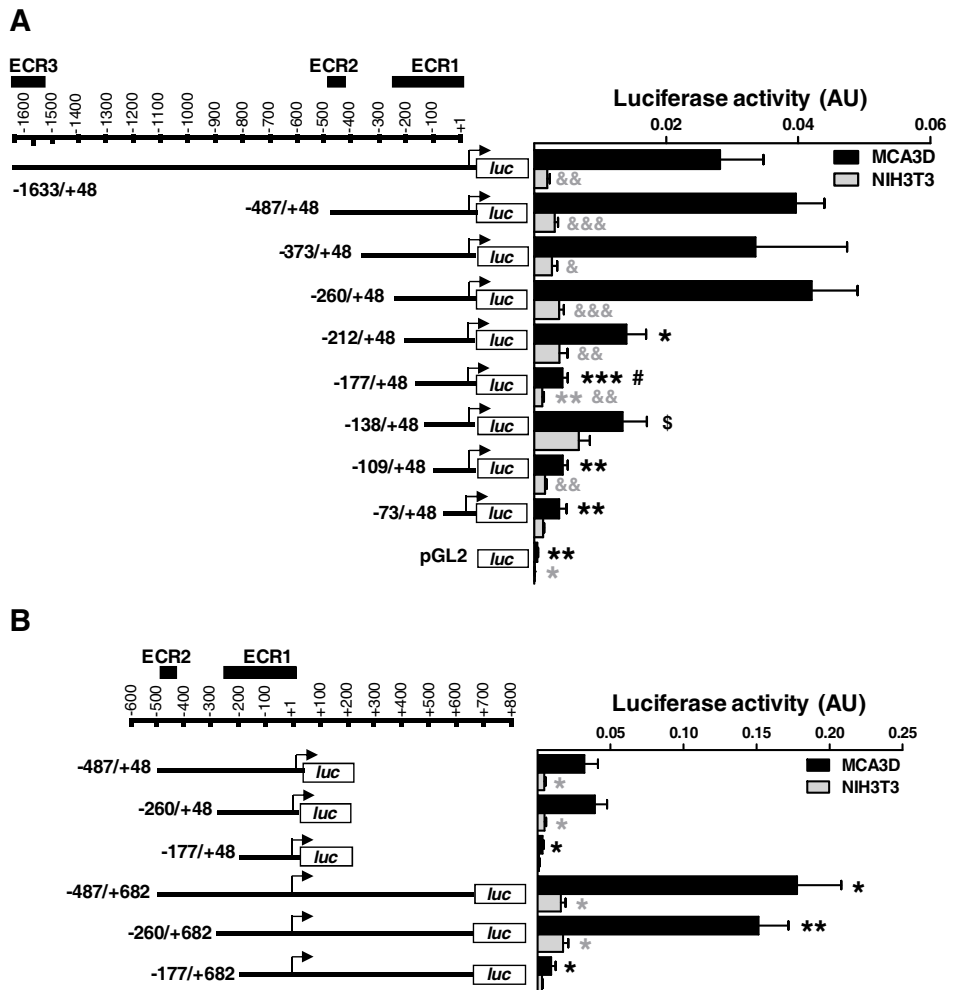


Figura R14. Actividad transcripcional del promotor murino de *Trex2*. Actividad luciferasa en células MCA3D y NIH3T3 de la región 5'-upstream del gen *Trex2* murino (A) en ausencia o (B) presencia del primer exón (no codificante) y la región intrónica. Los fragmentos de la región 5' promotora fueron clonados en el plásmido pGL2-Basic y co-transfectados transitoriamente con el vector pCMVlacZ reportero del gen β -galactosidasa. Los valores representan la media \pm SEM de (A) 6 y (B) 5 experimentos independientes. Los datos están representados como unidades arbitrarias (AU) de la actividad luciferasa con respecto a la actividad β -galactosidasa del vector normalizador. Test t-student apareada, * vs -487/+48 en MCA3D, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001; * vs -487/+48 en NIH3T3, * P <0.05, ** P <0.01; & vs MCA3D, & P <0.05; && P <0.01; &&& P <0.001; # vs -212/+48, # P <0.05; \$ vs -177/+48, \$ P <0.05. Símbolos en negro para MCA3D y en gris para NIH3T3. La posición del inicio de transcripción (flecha) y las regiones conservadas evolutivamente (ECR1, ECR2, ECR3) se encuentran indicadas. Luc, luciferasa.

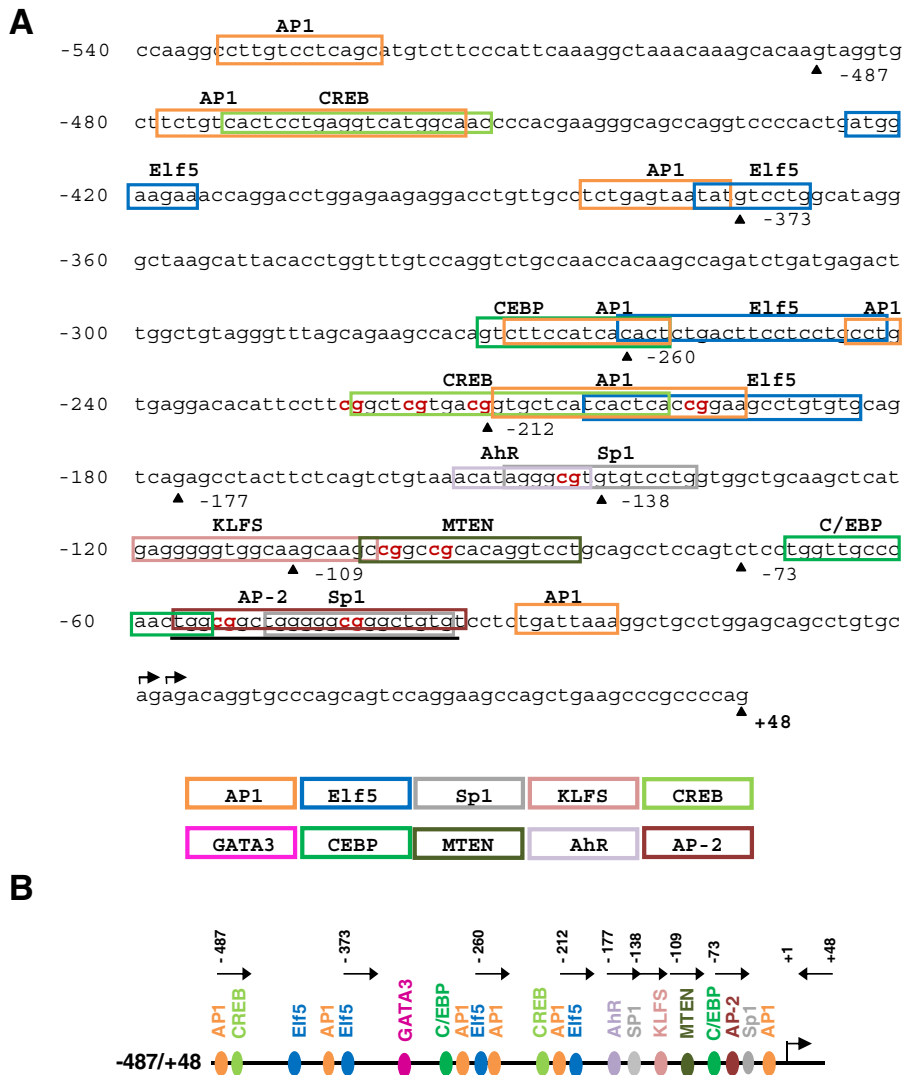


Figura R15. TFBS en el promotor proximal de *Trex2* murino. Localización de los TFBS identificados mediante el análisis *in silico* en la región de 540 pb 5'-*upstream* del gen *Trex2* murino que podrían estar relacionados con la regulación de la expresión génica específica en queratinocitos y/o en procesos de diferenciación celular. **(A)** La localización de los TFBS en la secuencia génica se visualiza con cajas de distintos colores o **(B)** se representa esquemáticamente por pequeños óvalos. El promotor de *Trex2* no contiene elementos CCAAT ni caja TATA canónica, pero contiene el motivo Sp1, una región rica en secuencias GC, típico de promotores sin caja TATA (*TATA-less promoters*), subrayado en la figura. La posición relativa de los fragmentos de promotor delecionados (-487/+48, -373/+48, -260/+48, -212/+48, -177/+48, -138/+48, -109/+48, -73/+48) también se encuentra indicada. Los dinucleótidos CpG se encuentran resaltados en rojo.

mTrex2-upstream region

```

-300  tggctgtagggtttagcagaagccacagtcctccatcacactctgacttcctcctcctcctg
      Elf5 (+) gacttcctc

-240  tgaggacacattccttcggtcgtgacggtgctcatcactcacggaagcctgtgtgcag
      JunD (-) gtagtgagtg
      JunB (-) tagtgagtggc
      Jun:Fos (+) tcactca
      Elf5 (-) ggccttcgg
      CREB (+) ggcctcgtgacggtgctcatcactca

-180  tcagagcctacttctcagtcctgtaaacatagggcgtgtgtcctggctgcaagctcat
      Fos (-) gtagtgagtg

-120  gagggggtggcaagcaagcggcggcacaggtcctgcagcctccagtcctcctgggtgcc

-60   aactggcggctggggcggtgtgtcctctgattaaaggctgctggagcagcctgtgc
      Jun:Fos (-) actaatt

+1   ──▶▶
      agagacaggtgccagcagtcaggaagccagctgaagcccgccccag

```

hTREX2-upstream region

```

-240  ctaggtggaggttactgccttcggcaccactctggcttctcccgtgctgtgaagagc

-180  tcggggcctgcttcttaatttgtaaacaeggggcgtgtgtctcagtggtgtgagctagc
      Elf5 (+) tgcttcta
      Jun:Fos (+) gtctca
      JunB (+) gtgtgtctcag
      Jun:Fos (+) tegtca

-120  gagggggtggcggagcggcggcgtgcggcaggtcctgagccccaggcctcattgttgcc

-60   aacaggcagctggggcggtgtgcggcggctgattaaaggcggcctagagcagcctgtgt

+1   ──▶▶
      gggacaggtgcccagaagcccaggaagcgggtcagtgccggccccag

```

Figura R16. Análisis comparativo de los TFBS de las familias ETS y AP1 en el promotor murino y humano de TREX2. Los TFBS para Elf5, CREB y AP1 (Jun:Fos, JunB, JunD, Fos) se han localizado en la secuencia de 300 pb y 240 pb 5'-upstream del gen murino y humano respectivamente. Los análisis se hicieron mediante la base de datos JASPAR. Las flechas horizontales indican los TSSs (+1), los dinucleótidos CpG (rojo) se encuentran indicados.

4.2.4 Caracterización de los sitios de unión de los factores identificados *in silico* en la regulación de la transcripción del gen *Trex2* murino

Los datos de la Figura R14A indicaban que los TFBS para Elf5, AP1 y CREB situados entre -260 y -212 jugaban un papel relevante en la actividad tejido específica del promotor de *Trex2*. Asimismo, los TFBS para AP1 y Elf5 situados entre -212 y -177 eran importantes para la actividad transcripcional del promotor. Para determinar la

importancia de estas cajas CREB, AP1 y Elf5 situadas entre -224 y -183 se llevaron a cabo estudios de mutagénesis dirigida.

Inicialmente, mutamos las cajas CREB y Elf5 en el contexto de la región de -487/+48 (Figura R17A). Los ensayos luciferasa en células MCA3D y NIH3T3 demuestran que la mutación de cada una de estas cajas causó una reducción significativa de la actividad de *Trex2*, llegando a ser de un 50% en la mutación de CREB y de hasta un 80% cuando se mutó Elf5. Señalar que la disminución de la actividad luciferasa de la región -487/+48 al mutarse los sitios CREB o Elf5 se observa tanto en MCA3D como en NIH3T3, y en estas últimas la actividad es relativamente muy inferior comparada con la observada en MCA3D. Estos datos confirman que estos elementos *cis* son importantes para la actividad del promotor pero probablemente no son suficientes para determinar la especificidad de expresión de TREX2 en queratinocitos. Además, estos resultados sugerían que el resto de TFBS para estas familias de factores de transcripción presentes en la región -487/+48 no tendrían una función relevante en la actividad promotora ni serían utilizados de forma compensatoria o alternativa.

Posteriormente, para complementar y confirmar estos resultados se evaluó el efecto de las mutaciones de las cajas CREB, AP1 y Elf5 en la actividad del promotor proximal de *Trex2* (-260/+48) (Figura R17B). Sorprendentemente, contrario a lo observado en el contexto de la región -487/+48, la mutación de la caja CREB causó un aumento significativo de la actividad promotora de la región -260/+48 en MCA3D. Esta diferencia curiosamente sólo se observa en MCA3D y no en NIH3T3, indicando una especificidad celular. Una explicación plausible podría ser que los factores que interaccionan con este sitio CREB regulan la expresión de TREX2 de forma dual, pudiendo interaccionar con elementos positivos y negativos, estos últimos ausentes en la región -260/+48. Por otra parte, las mutaciones de las cajas AP1 y Elf5 situadas entre -260 y -212, inhibieron la actividad transcripcional del promotor hasta un 50% y 75%, respectivamente en MCA3D. Consistentemente, la mutación simultánea de las cajas AP1/Elf5 contribuyó en mayor medida a la inhibición de la actividad promotora del gen *Trex2* murino, cuya actividad fue similar a la actividad del fragmento -177/+48. Significativamente, la actividad luciferasa es

menor en la construcción con la mutación simultánea de AP1/Elf5 en relación a las mutaciones individuales de Elf5 o AP1. Por otro lado, en NIH3T3 solamente se observó una disminución significativa de la actividad del promotor al mutar la caja Elf5. La mutación en AP1 no afectó a la relativamente reducida actividad del promotor en esta línea de fibroblastos. Así, estos resultados sugieren que el elemento AP1 situado a unos 202 pb del inicio de transcripción puede estar implicado en la regulación específica de TREX2 en queratinocitos y, junto con los elementos CREB y Elf5 adyacentes contribuir a una fina regulación de la expresión tejido específica y durante la diferenciación de los queratinocitos.

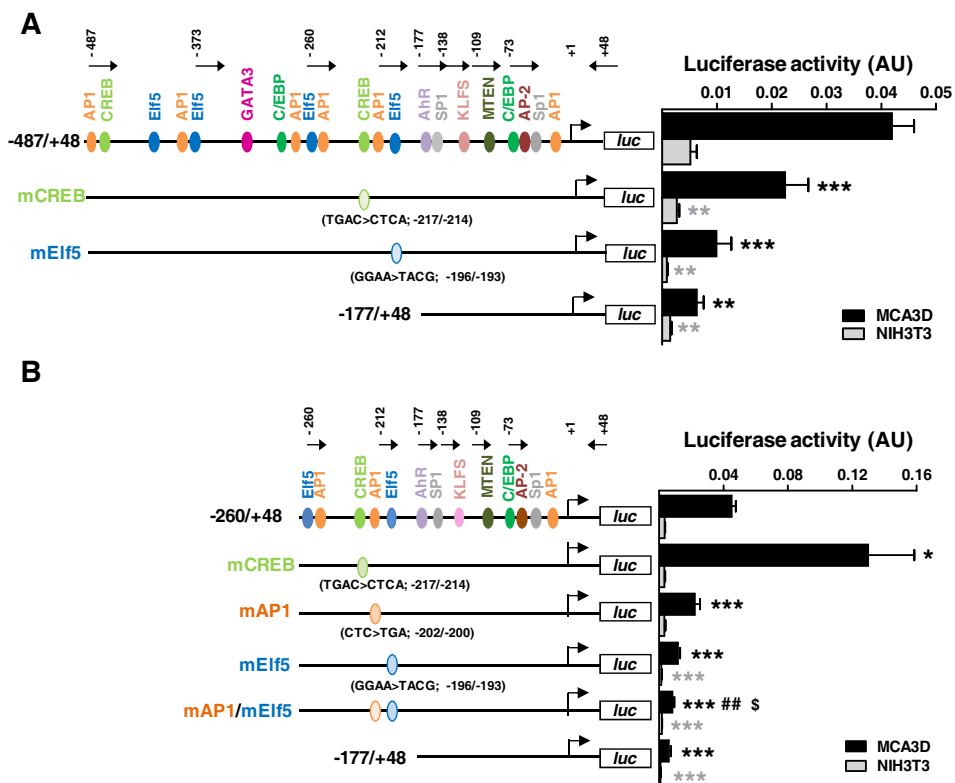


Figura R17. Elementos *cis* AP1, Elf5 y CREB implicados en la regulación del promotor del gen *Trex2*. Actividad luciferasa en células MCA3D y NIH3T3 de la región 5'-upstream del gen *Trex2* murino a (A) -487 pb o (B) -260 pb del TSS. Los fragmentos fueron clonados con la mutación insertada (mCREB, mAP1, mElf5, mAP1/mElf5) en el plásmido pGL2-Basic y co-transfectados transitoriamente con el vector pCMVLacZ

reportero del gen β -galactosidasa. Los valores representan la media \pm SEM de (A) 8 y (B) 6 experimentos independientes. Los datos están representados como unidades arbitrarias (AU) de la actividad luciferasa con respecto a la actividad β -galactosidasa del vector normalizador. Test *t*-student apareada, * vs -487/+48 en MCA3D; **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.; * vs -487/+48 en NIH3T3, ***P*<0.01; ****P*<0.001; ## vs mAP1, ## *P*<0.01; \$ vs mETS, \$ *P*<0.05. Símbolos en negro para MCA3D y en gris para NIH3T3. *Luc*, luciferasa. La posición de la mutación y los nucleótidos mutados se encuentran indicados.

En resumen, en la región promotora de 260 pb del gen *Trex2* se encuentran TFBS para los factores de transcripción CREB, E1f5 y AP1 que tienen un papel relevante en la actividad del promotor y en la expresión específica de TREX2 en queratinocitos.

4.2.4.1 Análisis de la relevancia del factor de transcripción E1f5 en la expresión de *Trex2*

La amplia familia ETS de factores de transcripción participa en la regulación de genes importantes en diferentes procesos biológicos, incluyendo proliferación y diferenciación celular en células de origen epitelial (Andreoli et al., 1997; Kas et al., 2000; Feldman et al., 2003). Entre todos los miembros de esta familia, la expresión de E1f5 se restringe a queratinocitos diferenciados y epitelio glandular (Tummala & Sinha, 2006; Choi et al., 2008).

Los estudios de expresión del mRNA de E1f5 en queratinocitos mostraron que la expresión de E1f5 era paralela a la de TREX2, aumentando con los días de cultivo celular tanto en queratinocitos primarios de ratón como humanos (Figura R18A). Remarcar que en la línea celular de queratinocitos MCA3D la expresión de E1f5 y también TREX2 fue muy inferior a la de los queratinocitos primarios, no obstante superior a los niveles de expresión en fibroblastos NIH3T3, en los que la expresión de ambos genes fue prácticamente nula. En tejidos, la expresión relativamente más elevada se observó en la glándula mamaria, acorde con Oettgen y colaboradores (1999) seguido de piel, epidermis y dermis. A excepción de la glándula mamaria, los niveles de expresión de E1f5 en estos tejidos se correlacionan con los niveles de expresión de *Trex2*.

Para determinar si E1f5 tenía un papel relevante en el control de la actividad del promotor de *Trex2* realizamos en primer lugar, experimentos de expresión ectópica en células MCA3D y NIH3T3 y analizamos la actividad del promotor sin y con la caja E1f5 mutada (Figura R18B). La actividad del promotor de *Trex2* aumentó de forma significativa

al sobreexpresar el gen Elf5 en la línea de queratinocitos MCA3D, pero no en la línea de fibroblastos NIH3T3. Las diferencias no podían atribuirse a la falta de expresión ya que los niveles de producción de proteína Elf5 fueron más elevados en fibroblastos que en queratinocitos, tal y como se comprobó en el análisis por western blot. Consistentemente, no se observó un aumento de la actividad del promotor al mutar el sitio de unión de la caja en presencia de Elf5. La mutación de la caja para Elf5, como se señaló anteriormente, dio lugar a una disminución significativa de la actividad promotora sugiriendo que se requiere el sitio Elf5 intacto para que la actividad no sea modificada. Estos resultados confirman la relevancia de Elf5 modulando la actividad del promotor de *Trex2* específicamente en queratinocitos. La sobreexpresión de Elf5 en fibroblastos no sería suficiente para aumentar la actividad del promotor. Otros factores condicionarían adicionalmente la actividad del promotor, como pueden ser factores inhibidores presentes en fibroblastos o la ausencia de factores estimuladores posiblemente específicos de queratinocitos.

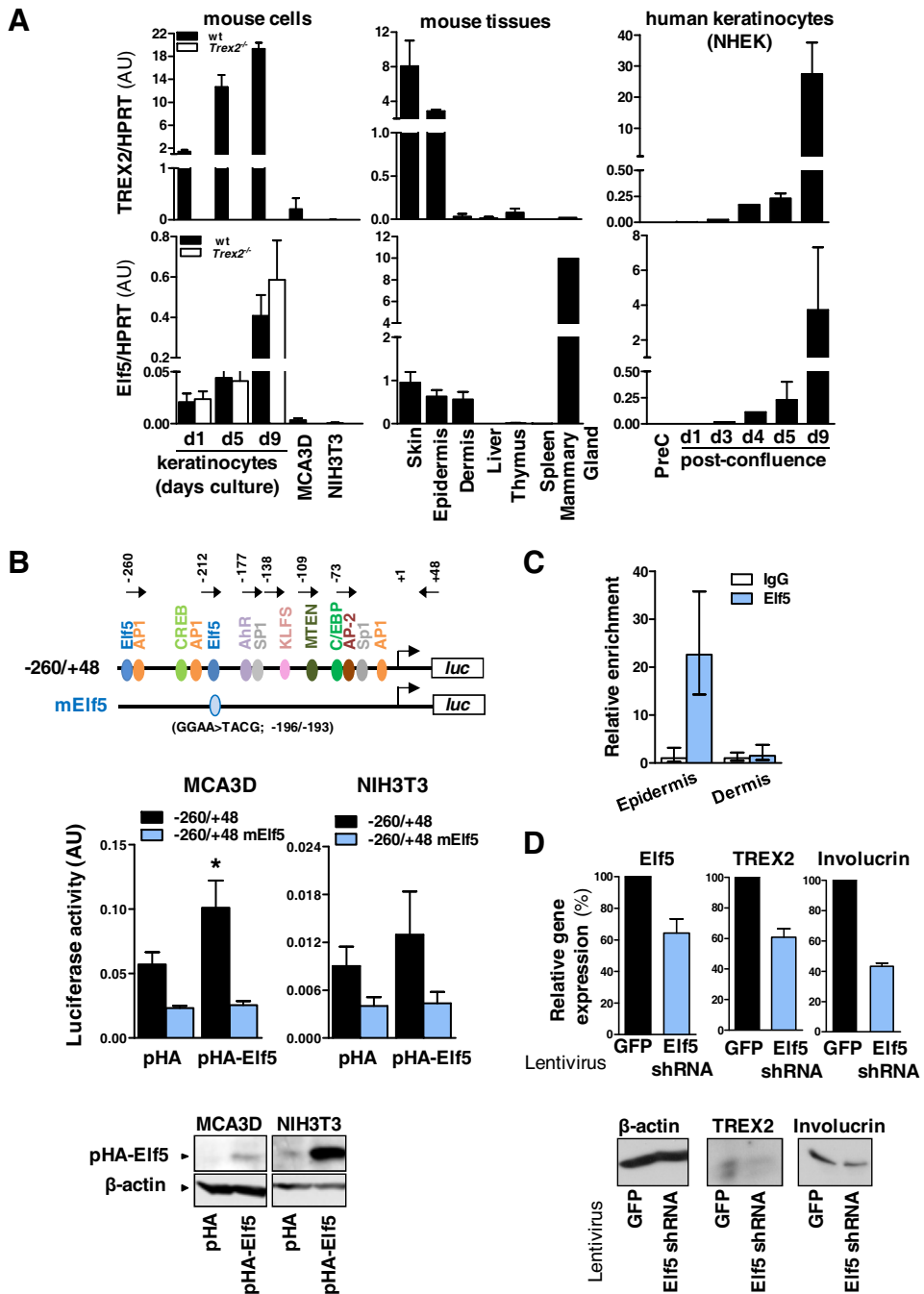


Figura R18. El factor de transcripción Elf5 modula la actividad del promotor de *Trex2* en queratinocitos. (A) Expresión del mRNA de Elf5 y TREX2 en cultivos primarios de queratinocitos de ratón y humanos y en diferentes células y tejidos murinos. **(B)** Efectos de la sobreexpresión de Elf5 en la actividad del promotor de *Trex2* en células MCA3D y NIH3T3, en presencia de la caja Elf5 wt (barras negras) o mutada (mElf5, barras azules). Los niveles de expresión de Elf5 analizados por western blot con el anticuerpo anti-HA se muestran en la parte inferior. Como control de carga se analizó la expresión de β -actina. **(C)** Análisis ChIP de la interacción de Elf5 con el promotor murino de *Trex2* en tejido epidérmico y dérmico. **(D)** Efectos del *knockdown* de Elf5 en la expresión de TREX2 e Involucrina. Se muestran los resultados representativos de los análisis de expresión del mRNA por RT-qPCR y de proteína por western blot correspondientes a dos experimentos independientes. Days culture: días de cultivo; skin: piel; epidermis: epidermis; dermis: dermis; liver: hígado, thymus: timo; spleen: bazo; mammary gland: glándula mamaria.

A continuación, para determinar si Elf5 formaba parte del complejo transcripcional que regula la expresión del promotor de *Trex2* se realizaron ensayos de ChIP en tejidos que expresan (epidermis) o no expresan (dermis) TREX2 (Figura R18C). El análisis del DNA inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-Elf5 por qPCR utilizando oligonucleótidos específicos del promotor de *Trex2* murino demostró un reclutamiento de Elf5 en el promotor de *Trex2* en las muestras de epidermis y no en las de dermis. Por lo tanto, la presencia de Elf5 en el promotor de *Trex2* se correlaciona con su expresión.

Finalmente, para comprobar si Elf5 tenía un papel determinante en la regulación de la expresión de TREX2 se realizaron experimentos de silenciamiento de *ELF5* en NHEK. El *knockdown* de *ELF5* se realizó mediante la infección de NHEK con partículas lentivirales productoras de shRNA-Elf5 (Figura R18D). Como control negativo de infección y positivo de transfección se infectaron las células con partículas lentivirales productoras de GFP. Como puede observarse en la figura R18D, la eficiencia del silenciamiento del mRNA de *ELF5* fue de aproximadamente un 40%, correlacionándose con una disminución similar del mRNA de *TREX2* y de Involucrina. Estos resultados se confirmaron al analizar la expresión de los niveles de proteína de TREX2 e Involucrina mediante western blot. No pudimos determinar los efectos sobre la expresión de *ELF5* a nivel de proteína ya que el anticuerpo no tenía suficiente sensibilidad para detectar los niveles relativamente bajos de *ELF5* endógeno. Por otra parte, indicar que si bien conseguimos seleccionar clones estables de NHEK trasfectados con GFP, no conseguimos clones estables con el *knockdown* de *ELF5*. Queríamos obtener clones estables *knockdown* de *ELF5* para poder analizar la expresión de TREX2 en queratinocitos postconfluentes. Probablemente *ELF5* es necesario para la

viabilidad celular, acorde con el hecho de que embriones *knockout* de Elf5 (Elf5^{-/-}) son letales a nivel prenatal (Donnison et al., 2005).

En resumen, el conjunto de estos resultados avalan un papel relevante de Elf5 en la regulación tejido específica de la actividad del promotor y en consecuencia en la expresión de TREX2. Así, nuestros resultados muestran que la expresión de Elf5 se correlaciona con la expresión de TREX2, la sobreexpresión de Elf5 aumenta la actividad del promotor de *Trex2* en queratinocitos, Elf5 interacciona con el promotor de *Trex2* murino únicamente en tejidos transcripcionalmente activos como la epidermis, indicando la presencia de esta proteína en los complejos proteicos presentes en el promotor del gen endógeno y, el silenciamiento de Elf5 provoca una disminución de la expresión de TREX2.

4.2.4.2 Análisis de la relevancia de AP1 en la expresión de *Trex2*

Inicialmente, para predecir qué miembros de la familia heteromérica AP1, podían tener un papel relevante en el control de la actividad del promotor de *Trex2*, evaluamos la expresión del mRNA de JunB, c-Fos, c-Jun y Fra-2 mediante qPCR en tejidos murinos, en queratinocitos primarios de ratón y en las líneas inmortalizadas de queratinocitos MCA3D y de fibroblastos NIH3T3 (Figura R19A). En queratinocitos primarios la expresión de c-Fos y c-Jun disminuye con los días de cultivo, mientras que prácticamente no se altera la expresión de Jun-B y Fra-2. No se observan diferencias significativas entre los queratinocitos wt y los deficientes de *Trex2*. Por otra parte, los niveles de expresión de estos factores de transcripción fueron relativamente muy inferiores en MCA3D y aún más en NIH3T3. Concretamente, c-Fos no se detectó en fibroblastos. A nivel tisular, los cuatro factores de transcripción presentan una expresión relativamente elevada en piel, pero sólo JunB y Fra-2 presentan mayor expresión en epidermis que en dermis. Por lo tanto, a diferencia de la elevada correlación que habíamos observado entre la expresión de Elf5 y TREX2, en el caso de los diferentes miembros de AP1 analizados no ocurre. En todo caso, la relación sería inversa en queratinocitos primarios en cultivo si se considera la reducción de la expresión de c-Fos y c-Jun al aumentar los días de cultivo de los queratinocitos.

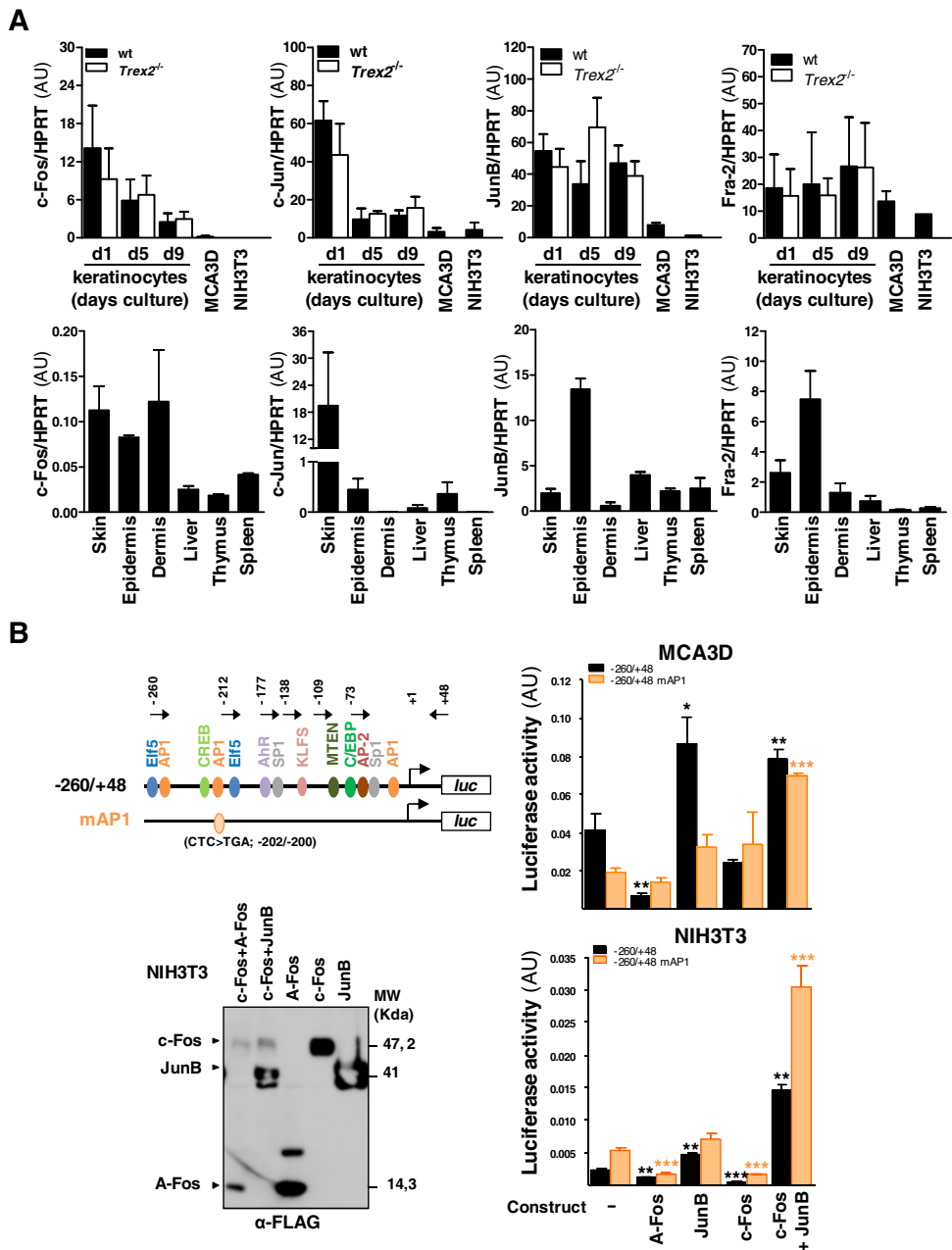


Figura R19. El factor de transcripción AP1 modula la actividad del promotor de *Trex2*. **(A)** Expresión del mRNA de c-Fos, c-Jun, JunB, Fra-2 y *TREX2* en cultivos primarios de queratinocitos de ratón y en diferentes células y tejidos murinos. **(B)** Efectos de la sobreexpresión de c-Fos, JunB y del dominante negativo de c-Jun (A-Fos) en la actividad del promotor de *Trex2* en células MCA3D y NIH3T3, en presencia de la caja AP1 wt

(barras negras) o mutada (mAP1, barras naranjas). En la parte inferior izquierda se muestra el western blot de células NIH3T3 transfectadas con los plásmidos indicados. Para la inmunodetección de la expresión de las proteínas recombinantes se usó un anticuerpo anti-FLAG. *Days culture*, días de cultivo; *skin*, piel; *liver*, hígado; *thymus*, timo; *spleen*, bazo.

Posteriormente, para conocer la importancia de AP1 en la expresión del promotor de *Trex2* se llevaron a cabo ensayos de sobreexpresión en las líneas MCA3D y NIH3T3 utilizadas para los ensayos de actividad del promotor (Figura R19B). La expresión ectópica de c-Fos y JunB se efectuó mediante la transfección de los plásmidos pcDNA3-Flag-FosWT y pCS2-Flag-JunB respectivamente. Además se transfectó un dominante negativo de c-Jun (CMV500 A-Fos) para inhibir AP1. La expresión de estas proteínas se comprobó por western blot como se muestra en la figura R19B (panel inferior) para las células NIH3T3. La actividad se evalúa en el promotor proximal de *Trex2* (-260/+48) wt y en el promotor con la secuencia de la caja AP1 situada a -202 pb mutada (-260/+48 mAP1) como se muestra en el esquema. Los datos obtenidos indican que la actividad del promotor de *Trex2* se ve significativamente aumentada en presencia de JunB, en los dos tipos celulares. En contraste, c-Fos disminuyó significativamente la actividad del promotor sólo en fibroblastos. Por otra parte, la co-transfección de c-Fos y JunB provoca un aumento de la actividad del promotor en MCA3D y NIH3T3. El hecho de que el efecto positivo se mantenga en el promotor con la caja AP1 (-202 pb) mutada sugiere que el efecto de la sobreexpresión de c-Fos/JunB estaría mediado por una de las dos o las dos otras cajas AP1 que están presentes en el promotor proximal. Por su parte, el efecto del dominante negativo de AP1 (A-Fos) resultó en una disminución significativa de la actividad del promotor tanto en MCA3D como en NIH3T3. Señalar que en MCA3D el efecto positivo de la sobreexpresión de JunB y el negativo del dominante negativo de AP1 están relacionados con la caja AP1 situada a -202 pb. En fibroblastos, en los que el promotor tiene una actividad relativamente muy inferior a la de los queratinocitos, como se ha comentado anteriormente, los efectos son independientes de esta caja AP1 situada a -202 pb y probablemente están mediados por el resto de cajas AP1 presentes en la región.

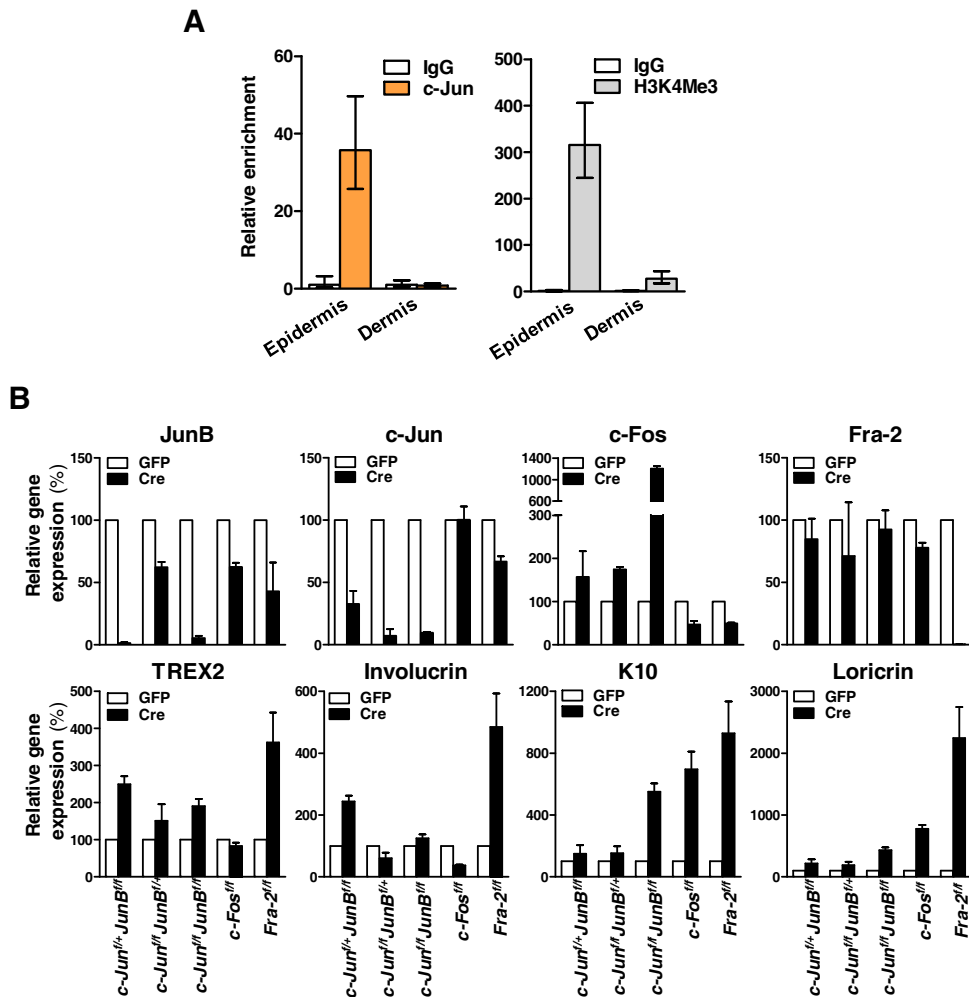


Figura R20. AP1 modula la actividad del promotor de *TREX2*. (A) Análisis ChIP de c-Jun y de la Histona H3K4Me3 en el promotor murino de *Trex2* en tejidos que expresan (epidermis) y no expresan (dermis) *Trex2*. (B) Efectos del *knockdown* de JunB, c-Jun, c-Fos y Fra-2 en la expresión del mRNA de *TREX2*, Involucrina, K10 y Loricrina en queratinocitos primarios de ratón. Se muestran los resultados de los análisis de expresión del mRNA por RT-qPCR correspondientes a dos experimentos independientes.

Los ensayos de ChIP (Figura R20A) mostraron un elevado enriquecimiento de c-Jun en el promotor de *Trex2* en la epidermis y no en la dermis indicando un reclutamiento diferencial de este factor de transcripción de la familia AP1 en el promotor proximal de *Trex2*.

Globalmente, estos datos indican que la transcripción del promotor de *Trex2* está modulada por AP1 de forma compleja y en la que pueden intervenir más de un elemento *cis* del promotor proximal, si bien en queratinocitos puede tener un papel clave la caja situada a -202 pb.

La regulación tisular/celular diferencial del promotor de *Trex2* se constata también al analizar la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3), un marcador epigenético común asociado a promotores activos (Okitsu et al., 2010). Como se observa en la Figura R20A, el enriquecimiento de H2K4me3 es relativamente mayor (> 100 veces) en el promotor de *Trex2* de las muestras de epidermis en relación a los de la dermis, indicando una mayor actividad transcripcional en el tejido epidérmico. Estos datos se correlacionan con la expresión específica de TREX2 en epidermis.

Finalmente, para corroborar qué miembro o miembros de la familia AP1 tendrían un papel relevante en el control de la expresión de TREX2 se realizaron estudios en queratinocitos primarios de ratón con deleciones simples para Fra2, c-Fos, c-Jun y JunB o, dobles para JunB y c-Jun, inducidas por infecciones con adenovirus expresando la recombinasa Cre (AdCre). Como control negativo se utilizaron los mismos queratinocitos infectados con adenovirus expresando la proteína GFP (AdGFP). Adicionalmente se evaluaron los marcadores de diferenciación Involucrina, Loricrina y K10. Los resultados del silenciamiento se muestran en la Figura R20B. El análisis mediante RT-qPCR de la expresión de cada uno de los *knockdown* demuestra la deleción de más del 90% de Fra-2, JunB, c-Jun y c-Jun/JunB y de aproximadamente un 40% de c-Fos. Sorprendentemente, la expresión del mRNA de *TREX2* incrementó con la deleción de Fra-2 y JunB, mientras que la disminución de c-Jun o c-Fos no causó ningún cambio importante en la expresión de TREX2. Precisamente Fra-2 y JunB están entre las proteínas que más se expresan en la capa granular de la epidermis altamente integrada por queratinocitos diferenciados (Figura I12) (Angel et al., 2001; Mehic., et al 2005). El patrón de expresión observado para TREX2 es prácticamente idéntico al de la Involucrina observándose un aumento de los niveles de mRNA en los queratinocitos deficientes para Fra-2 o JunB. Estos resultados indican que tanto Fra-2 como JunB podrían actuar como represores de la expresión de

TREX2 e Involucrina. Por otra parte, la expresión del mRNA de la K10 y la Loricrina mostraron un incremento en los queratinocitos deficientes de Fra-2 y c-Fos pero no en los deficientes de JunB. Curiosamente, la delección doble de c-Jun y JunB no provocó un aumento aditivo ni sinérgico de la expresión de *Trex2* ni de Involucrina, pero sí de K10 y de Loricrina. Estos datos demuestran que la pérdida de Fra-2 o JunB es suficiente para incrementar la expresión de *TREX2* en queratinocitos de ratón.

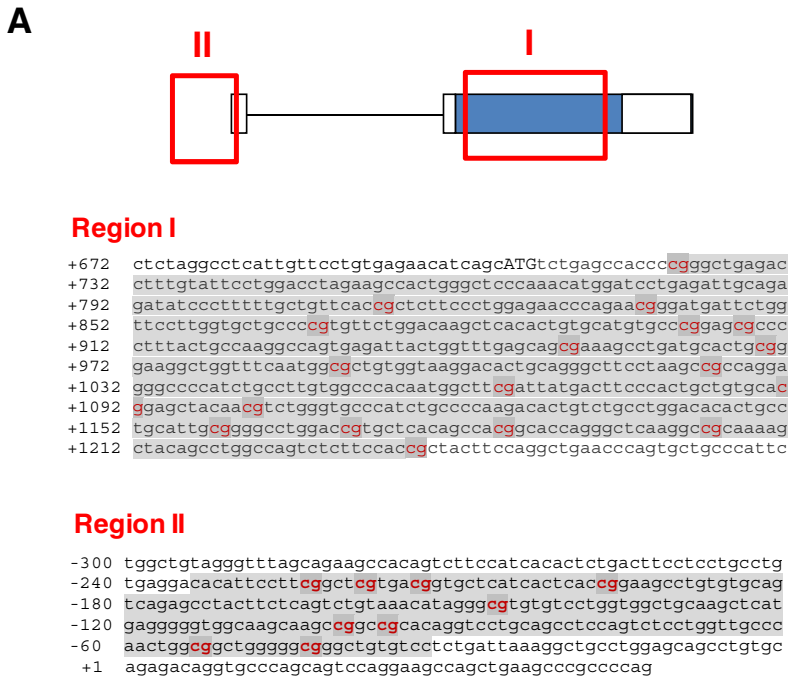
En conjunto, estos resultados indican que el factor de transcripción AP1 tiene un papel complejo en la regulación del promotor de *Trex2* en queratinocitos y durante la diferenciación. La aparente contradicción entre los resultados *in vitro* (actividad del promotor en MCA3D y NIH3T3) que indicaban una papel positivo de AP1 en la expresión de *TREX2*, en relación a la acción represora observada en los queratinocitos primarios deficientes para los diferentes miembros de la familia, podría venir determinada por las limitaciones del estudio *in vitro* de la actividad promotora utilizando regiones relativamente pequeñas del promotor y que no conservan la arquitectura cromatínica presente en las condiciones nativas; o bien ser dependiente del estado de diferenciación de los queratinocitos. En este sentido, se han descrito funciones diferenciales de diferentes miembros de AP1 en queratinocitos no diferenciados respecto a queratinocitos diferenciados (Jang & Steinert, 2002; Wurm et al., 2015).

4.3 Regulación epigenética del gen *TREX2*

Para determinar si la expresión celular específica de *TREX2* en queratinocitos estaba regulada a nivel epigenético, se evaluó el estado de metilación de regiones ricas en CGs presentes en la región codificante y en el promotor del gen *Trex2* de ratón (Figura R21) y humano (Figura R22) en diferentes tejidos y durante la diferenciación de los queratinocitos.

El análisis de la proporción de CpGs observadas en relación a las esperadas indica que sólo las regiones I y II del gen humano cumplen con los criterios de isla CpG (% CGs superior al 50%, longitud > 200 pb, y relación CpGs observadas/esperadas (Obs/Exp CpG) superior a 0.6) (Chatterjee et al., 2012) (Figura R21B y R22B). No obstante, ha sido

descrito que la metilación de regiones de DNA ricas en CpGs e incluso el estado de metilación de una única CpG puede comportar una expresión génica diferencial (Rao et al., 2013).



B

	Sequence Length	CGs (%)	Ratio (Obs/Exp CpG)	CpG frequency (%)
Region I	518	56	0.43	6.9
Region II	201	62	0.46	8.95

Figura R21. Regiones ricas en CGs en el gen *Trex2* murino. (A) Las CpGs se han resaltado (rojo) en la secuencia génica de la región del exón codificante (región I) y del promotor proximal (región II). El primer ATG se muestra en mayúscula. La numeración de la secuencia está hecha a partir del TSS (+1). En gris se indica la longitud de la secuencia en la que se han analizado los parámetros indicados en B. **(B)** Longitud secuencia génica, % CGs, relación CpGs observadas/esperadas y frecuencia CpGs.

En ratón, se encuentran dos regiones relativamente ricas en CpGs, una en la región codificante (región I) y otra en la región del promotor proximal (región II) (Figura R21A). El análisis de la metilación de estas dos regiones en diferentes tejidos, como hígado y

epidermis, o en queratinocitos de distintos días de cultivo (día 1 y día 9) se muestra en la figura R23. En todas las muestras se observó un 100% de CpG metiladas en la región I (Figura R23A). En contraposición, el estado de metilación cambiaba radicalmente dependiendo del tejido y el día de cultivo de los queratinocitos en la región II, en la que se localiza el promotor proximal de *Trex2*. Las CpGs de la región II se encontraron mayoritariamente metiladas en hígado (80%), parcialmente metiladas en queratinocitos de día 1 de cultivo (57%), débilmente metiladas en epidermis (16%) y completamente demetiladas en queratinocitos de día 9 (Figura R23B). Estos resultados evidenciaban que la disminución del porcentaje de CpGs metiladas se correlacionaba con un aumento de la expresión del gen. Claramente, la región promotora rica en CpG se encuentra altamente metilada en tejidos que no expresan mRNA ni proteína de TREX2, como en hígado y prácticamente demetilada en la epidermis, tejido donde TREX2 se expresa de manera predominante (Figura R23B y R23C). Asimismo, el grado de metilación de esta región en queratinocitos en cultivo se correlaciona inversamente con los niveles de expresión de TREX2 a diferentes días de cultivo. Así, las CpGs de la región II en el promotor de *Trex2* se encuentran todas demetiladas en los queratinocitos a día 9 de cultivo, siendo este el día en que se observa una alta expresión por parte de *Trex2* (Figura R23C y R23D).

En resumen, el grado de metilación de la región proximal del promotor del gen *Trex2* de ratón, a diferencia del de la región codificante, se correlaciona inversamente con el nivel de expresión de TREX2, cabe recordar además que ésta región se solapa con sitios de unión de factores de transcripción.

En el gen *TREX2* humano se encuentran tres regiones ricas en CpGs. Una en el exón 2 codificante (región I) y otra (región II) en el promotor proximal que son consenso. La región III, situada a más de 3500 pb del TSS posee un elevado porcentaje de CGs (62%), pero la relación Obs/Exp CpG no llega a 0.4. (Figura R22B). Los resultados obtenidos muestran que, tal y como se observó en ratón, la región I correspondiente a la región codificante del gen se encuentra completamente metilada en los diferentes tejidos y queratinocitos de diferentes días de diferenciación, independientemente del nivel de

expresión de TREX2. Como se ilustra en la figura R24A, los niveles de CpGs metiladas de la región I fueron del 100% en todas las muestras.

Por otra parte, el análisis del estatus de metilación de las CpGs de las regiones II (Figura R24B) y III (Figura R25) revela diferencias dependiendo del tipo de tejido y el estado de diferenciación de los queratinocitos. Concretamente, en la región II se observó una pérdida de metilación en CpGs concretas pero no de forma generalizada en queratinocitos diferenciados (Figura R24B). La principal diferencia que además se correlaciona con la expresión de TREX2 se observa en CpGs concretas, de izquierda a derecha; la segunda, la novena y la quinceava (señaladas con flechas) se encuentran mayoritariamente demetiladas en queratinocitos a día 8 de postconfluencia, en contraposición a los queratinocitos preconfluentes y a día 1 de postconfluencia. Notoriamente, la pérdida de metilación de estas dos CpGs simultáneamente y de la quinceava CpG (flecha negra) en particular en los queratinocitos diferenciados se correlaciona con la inducción de la expresión de TREX2 (Figura R5B). Estos datos son consistentes con los resultados del análisis de los perfiles de metilación realizados en el promotor de *Trex2* de ratón (Figura R23).

La Figura R25A muestra que el estado de metilación de la región III también varía en función del tejido y estado de diferenciación de los queratinocitos. La región III se muestra hipermetilada en sangre, comparada con el perfil de metilación de queratinocitos en diferentes estados de diferenciación, parcialmente metilado tanto en queratinocitos preconfluentes, como en postconfluencia (Figura R25B y R25C). Señalar que en los queratinocitos preconfluentes se analizó el efecto del tratamiento con el inhibidor de la metilación *5-aza-2'-Desoxicitidina* (5-aza-DC) en el estado de metilación de la región III. Tal y como se esperaba, las células tratadas mostraron un decrecimiento en el porcentaje de CpGs metiladas. Como se observa en la figura R25B, las diferencias residen principalmente en las CpGs situadas desde la mitad 3' de la región III. Para visualizar y evaluar mejor este patrón diferencial, se ha dividido la región III en dos segmentos: el segmento III.1 y el segmento III.2. Es en el segmento III.2 donde se localizan las CpGs que sufren una demetilación durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos (Figura R25D).

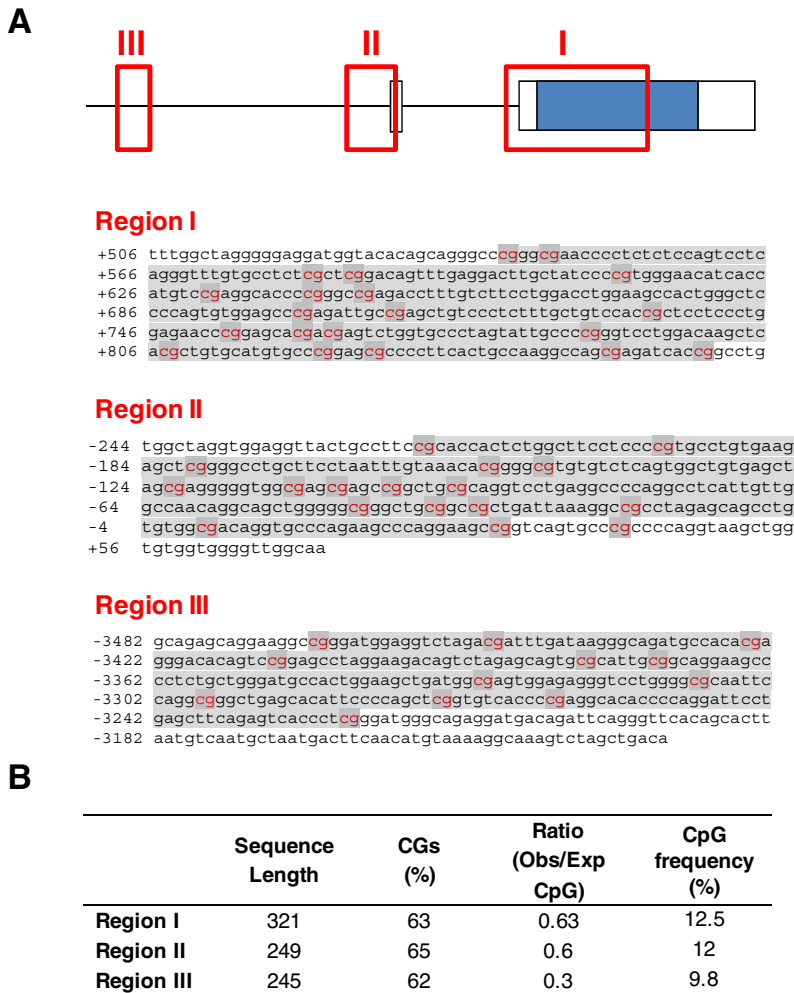


Figura R22. Regiones ricas en CGs del gen *TREX2* humano. (A) Las CpGs se encuentran resaltadas (rojo) en la secuencia génica: de la región codificante (región I), del promotor proximal (región II) y de una región 5' distal (región III). La numeración de la secuencia está hecha a partir del TSS (+1). En gris se indica la longitud de la secuencia en la que se han analizado los parámetros indicados en B. **(B)** Longitud secuencia génica, % CGs, relación CpGs observadas/esperadas y frecuencia CpGs. Las regiones I y II cumplen los parámetros de islas CpGs consensus (contenido de CGs $\geq 50\%$, longitud > 200 pb, ratio ≥ 0.6 de CpGs Obs/Exp).

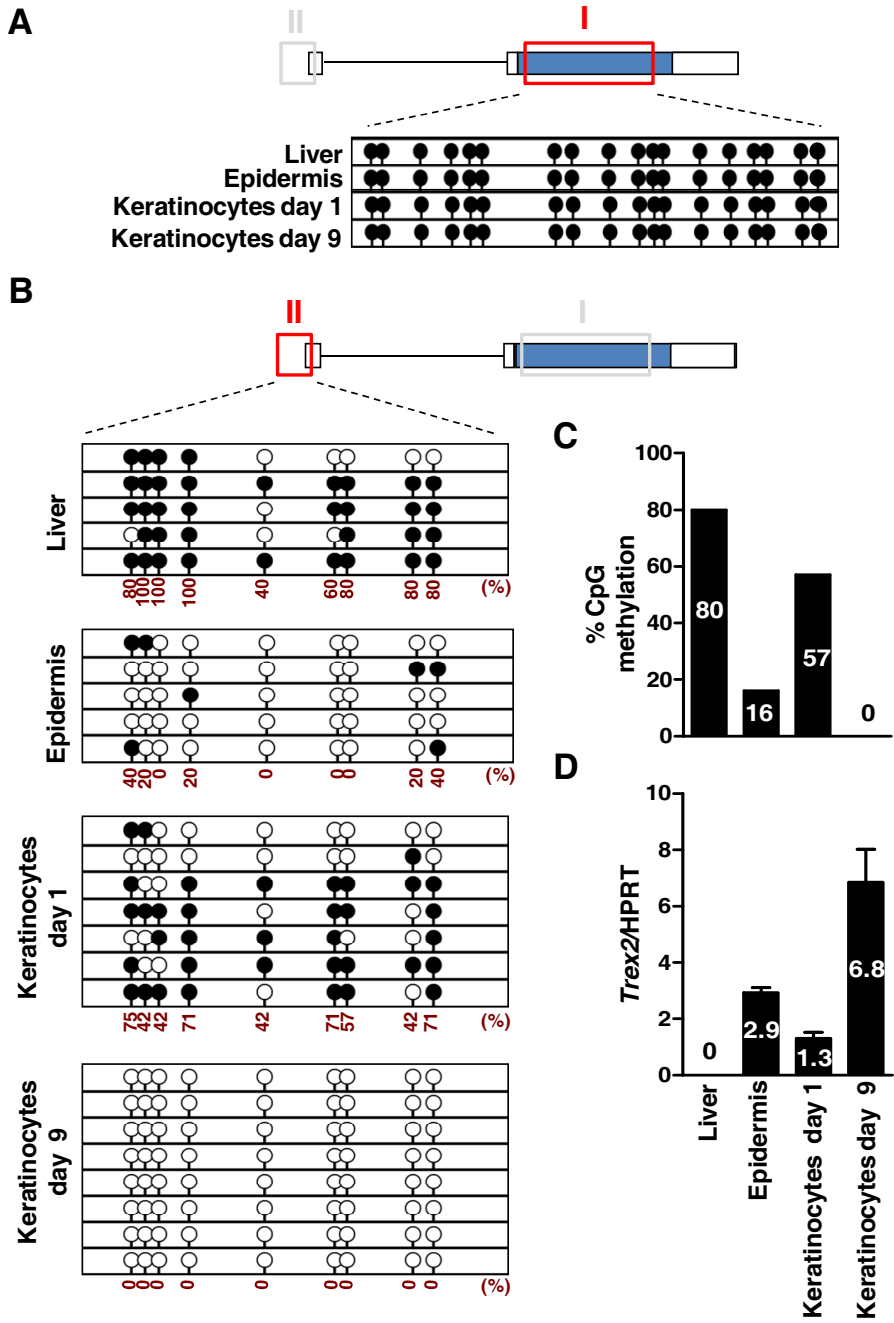
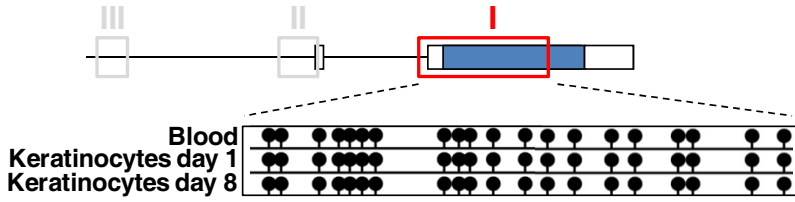


Figura R23. Análisis de metilación de las dos regiones del gen *Trex2* de ratón. (A) Perfil de metilación de la región I en las muestras indicadas. (B) Perfil de metilación de la región II en las muestras indicadas. Círculos negros: metilado; círculos blancos: no metilado. Cada columna corresponde a una CpG analizada y cada fila del perfil corresponde a un clon diferente. El porcentaje de metilación para cada grupo de clones se encuentra indicado en rojo. (C) Porcentaje de metilación global para cada muestra en particular. (D) Expresión del mRNA de *Trex2* en las muestras analizadas. *Liver*: Hígado; *Epidermis*: Epidermis; *Keratinocytes*: Queratinocitos.

A



B

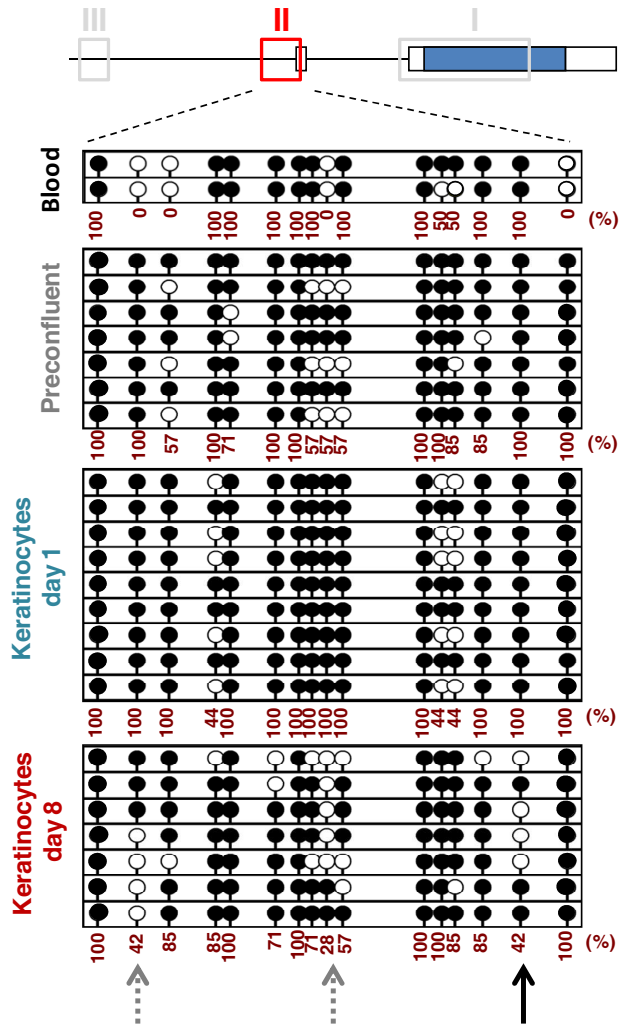


Figura R24. Análisis de metilación de las regiones I y II del gen *TREX2* humano. (A) Perfil de metilación de la región I en las muestras indicadas. **(B)** Perfil de metilación de la región II en las muestras indicadas. Círculos negros: metilado; círculos blancos: no metilado. Cada columna corresponde a una CpG analizada y cada fila del perfil corresponde a un clon diferente. El porcentaje de metilación para cada grupo de clones se encuentra indicado en rojo. Blood, Sangre; *Preconfluent*: Preconfluentes; *Keratinocytes day 1-8*: Queratinocitos día 1-8.

Globalmente, el estudio de metilación de las regiones ricas en CpGs del gen *TREX2* murino y humano demuestra que el perfil de metilación de las regiones II y III situadas en las regiones promotoras, se correlaciona con la expresión tejido-específica de *TREX2* y el aumento de la expresión a lo largo de la diferenciación de los queratinocitos. Estos resultados demuestran que la expresión de *TREX2* está regulada a nivel epigenético por el estado de metilación del promotor.

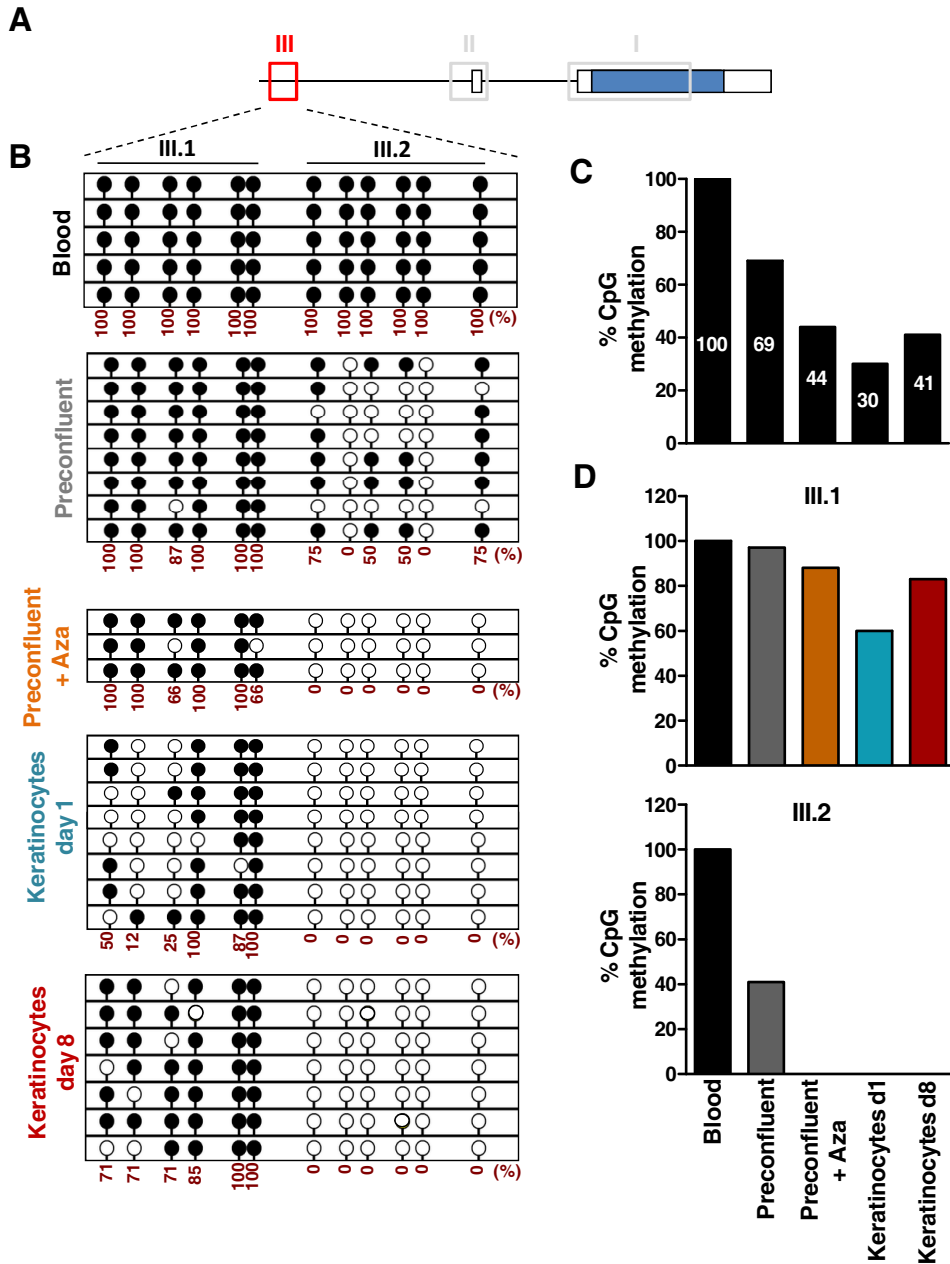


Figura R25. Análisis de metilación de la región III del gen *TREX2* humano. (A) Esquema del gen humano indicando la región III analizada. (B) Perfil de metilación de la región III en las muestras indicadas. Círculos negros: metilado; círculos blancos: no metilado. Cada columna corresponde a una CpG analizada y cada fila del perfil corresponde a un clon diferente. El porcentaje de metilación para cada grupo de clones se encuentra indicado en rojo. Segmentos agrupados en la secuencia de manera arbitraria (III.1, III.2) (C) Porcentaje de metilación global de las muestras indicadas. (D) Porcentaje de metilación de las muestras indicadas para cada uno de los segmentos. *Blood*: Sangre; *Preconfluent*: Preconfluentes; *Preconfluent + Aza*: Preconfluentes + Aza; *Keratinocytes day 1-8*: Queratinocitos día 1-8.

4.4 Variabilidad genética de *TREX2* en tumores escamosos

Para determinar si la variabilidad genética en el gen *TREX2* humano podría estar relacionada con la incidencia de la carcinogénesis del epitelio escamoso, se secuenció el gen en muestras tumorales y de sangre proveniente de pacientes afectados con tumores escamosos de cabeza y cuello (HNSCC) así como también de individuos no afectados o sanos (Tabla R3). La longitud del gen *TREX2* humano analizada fue de 3265 pb, dentro del cual se incluyeron tres exones del gen, un fragmento 5'-UTR de 88 pb y un fragmento 3'-UTR de 33 pb. El análisis genético de 190 muestras de pacientes con HNSCC identificó 17 variantes alélicas o sustituciones nucleotídicas simples (SNPs) (Figura R26). En la secuencia exónica se identificaron los SNPs sinónimos L172L y R217R para los cuales no hay cambio de aminoácido, además de cinco SNPs no-sinónimos: L15Q, R132W, R156L, A157T y G161S. El análisis genético mostró que los cinco SNPs no-sinónimos están presentes en bajas frecuencias que no superan el 1%. La variante R156L comporta un cambio de Arginina a Leucina, fue encontrada 2 veces en pacientes afectados y ninguna en los controles. Esta mutación había sido previamente descrita en tumores de cáncer de próstata hereditario (HPC, *Hereditary Prostate Cancer*) por el grupo de Perrino y colaboradores (2004). Por otro lado, tanto la mutación L15Q, que implica un cambio de Leucina a Glutamina como la A157T que cambia Alanina por Treonina, fueron detectadas una vez con frecuencias del 0.5% no siendo halladas en individuos controles. La mutación R132W, detectada en dos casos supone la sustitución del aminoácido Arginina por Triptófano y la G161S, detectada una vez, un cambio aminoacídico que pasa de Glicina a Serina. Ambas mutaciones se encontraron tanto en individuos afectados como en sanos con frecuencias del 0.5% y 1% respectivamente. Además se detectaron nueve SNPs raros y uno común en la secuencia intrónica no codificante y en posición 5' del gen *TREX2*. Todos estos polimorfismos fueron encontrados tanto en tejido tumoral como en sangre, indicando que se trata de mutaciones presentes en la línea germinal. Dado que el gen *TREX2* se encuentra localizado en el cromosoma X y que todas las variantes en la secuencia codificante fueron encontradas en pacientes masculinos, estas sustituciones aminoacídicas simples se expresaban en homocigosis. Si bien, la baja frecuencia de los SNPs identificados en el gen *TREX2* hace difícil determinar

asociaciones de SNPs concretos con la incidencia de HNSCC, al agrupar todos los SNPs raros del gen *TREX2*, la frecuencia del conjunto de SNPs encontrados en los individuos con tumores escamosos fue más alta comparada con individuos sanos (Tabla R4).

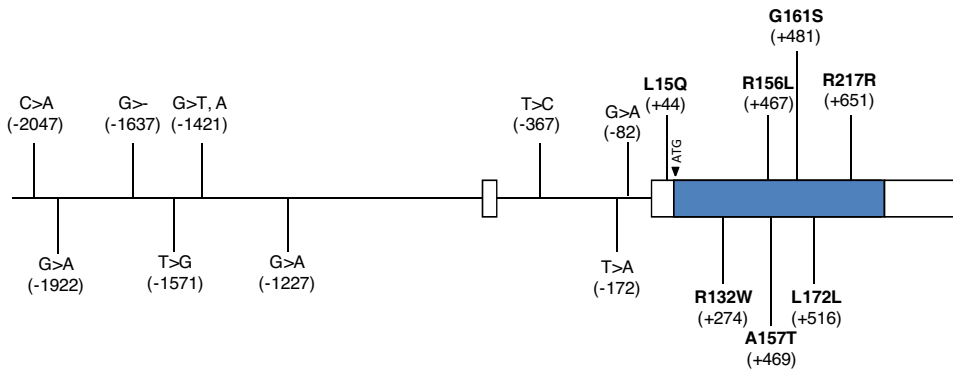


Figura R26. SNPs en el gen *TREX2* encontrados en muestras de pacientes con HNSCC. Se indica la posición de los SNPs identificados en el gen *TREX2* humano y el codón iniciador ATG. La posición de los SNPs se encuentra referenciada con respecto al ATG. En negrita SNPs en la región codificante.

Para conocer las posibles repercusiones funcionales de las mutaciones encontradas en la secuencia codificante, se analizó la actividad exonucleasa de cada una de las variantes, utilizando como sustrato tanto dsDNA como ssDNA (Figura R27). La electroforesis de la Figura R27A y R27B muestra las variantes de *TREX2* mutantes generadas y evaluadas. La variante R156L fue generada en una construcción plasmídica que dejaba seis residuos menos en el extremo N-terminal comparado con los constructos usados para las otras variantes, resultando así en el peso molecular más bajo observado en la electroforesis. Interesantemente, la actividad exonucleasa relativa de la variante R156L sobre dsDNA fue alrededor de seis veces más baja que la isoforma wt (Figura R27C y R27D). También las variantes A157T, G161S y L15Q mostraron una ligera disminución en la actividad exonucleasa sobre dsDNA, mientras que no se detectó alteración en la variante R132W. No se encontraron diferencias significativas en la actividad exonucleasa sobre ssDNA para ninguna de las variantes mencionadas. En este sentido, se ha visto que algunas mutaciones raras de *TREX1* (D200N, D18N) también afectan exclusivamente la actividad exonucleasa sobre dsDNA (Lehtinen et al., 2008). Los SNPs que no afectan la secuencia codificante podrían modificar la producción proteica a nivel de expresión génica o del procesamiento del

mRNA. Para completar estos análisis queda por evaluar si la localización o los niveles de expresión génica se ven alterados.

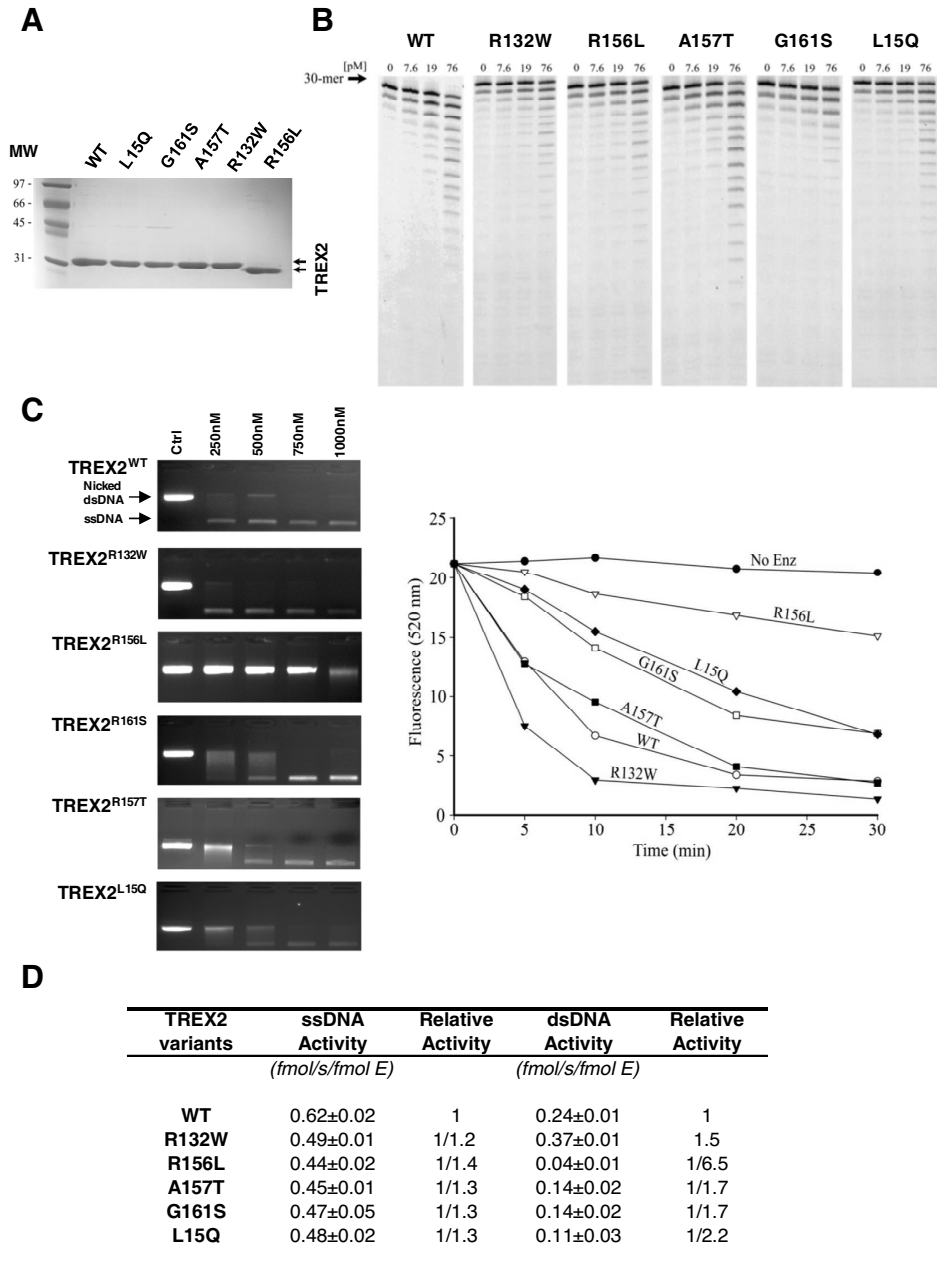


Figura R27. Actividad exonucleasa de las variantes de TREX2 wt y mutante. (A) Análisis SDS-PAGE de las variantes purificadas. Las posiciones del peso molecular (MW) están indicadas. **(B)** Actividad exonucleasa de ssDNA. Electroforesis en gel de úrea-poliacrilamida. **(C)** Actividad exonucleasa de dsDNA. Electroforesis en gel de agarosa. Las reacciones de titulación y la cinética de cada variante se encuentran indicadas. Las posiciones de migración del DNA mellado (*Nicked* dsDNA) y del DNA circular (ssDNA) están indicadas. **(D)** Actividad exonucleasa relativa de ssDNA y dsDNA.

Tabla R3. Variaciones genéticas y frecuencias del gen *TREX2* humano en pacientes con HNSCC y en individuos sanos. El *P* valor del test de Fisher exacto se encuentra indicado.

Position on X Chromosome	Accession number	Major allele	Minor allele	Position vs first ORF nucleotide	Amino acid	Cases (n=190)		Controls (n=189)	
						Minor allele	Frequency (%)	Minor allele	Frequency (%)
						samples n		samples n	
152712935	rs34107439	C	A	(-)2047		3	1.579	2	1.058
152712811	rs35426191	G	A	(-)1922		1	0.526	0	0.000
152712525	rs371785311	G	-	(-)1637		5	2.632	0	0.000
152712460	rs3020962	T	G	(-)1571		53	27.895	54	28.571
152712310	rs191272965	G	A	(-)1421		1	0.526	0	0.000
152712310	ss1026802595	G	T	(-)1421		1	0.526	1	0.529
152712115	ss1026802596	G	A	(-)1227		1	0.526	0	0.000
152711255	ss1026802597	T	C	(-)367		1	0.526	0	0.000
152711060	rs138397873	T	A	(-)172		2	1.053	0	0.000
152710970	rs62594087	G	A	(-)82		1	0.526	2	1.058
152710845	rs201756523	A	T	(+)44	L15Q	1	0.526	0	0.000
152710495	ss1026802598	G	A	(+)274	R132W	1	0.526	1	0.529
152710422	rs199587066	C	A	(+)467	R156L	2	1.053	0	0.000
152710420	ss1026802599	C	T	(+)469	A157T	1	0.526	0	0.000
152710408	rs200659060	C	T	(+)481	G161S	2	1.053	2	1.058
152710373	rs150316545	G	A	(+)516	L172L	0	0.000	1	0.529
152710236	ss1026802600	A	G	(+)651	R217R	6	3.158	2	1.058

Tabla R4. Frecuencia de las mutaciones de *TREX2* en HNSCC y controles. El *P* valor del test de Fisher exacto se encuentra indicado.

	Number in affected individuals (Frequency)	Number in control individuals (Frequency)	P value
Non-synonymous SNPs	7/190 (0.037)	3/ 189 (0.016)	0.337
Minor SNPs	29/190 (0.153)	11/189 (0.058)	0.004
Common SNPs	53/190 (0.279)	54/189 (0.286)	0.910
Minor & Common SNPs	82/190 (0.431)	65/189 (0.344)	0.114

5. DISCUSIÓN

En esta tesis se ha estudiado la regulación de la expresión específica del gen *TREX2* en queratinocitos y si la presencia de alteraciones génicas se puede relacionar con tumores derivados de queratinocitos, como los tumores escamosos de cabeza y cuello. Se ha constatado que pese a haber transcritos que codifican para isoformas de mayor peso molecular, sólo se detecta la expresión de la isoforma de 26 KDa. Nuestros resultados demuestran que una secuencia de no más que 260 pb *upstream* del TSS es capaz de dirigir la actividad promotora del gen *Trex2* en queratinocitos. La actividad de este promotor proximal está condicionada por los factores de transcripción Elf5 y AP1 y también por el estado de metilación de las citosinas de CpGs presentes en esta región. Se produce una demetilación del promotor en el proceso de diferenciación de los queratinocitos, correlacionándose con el aumento de expresión de TREX2. En conjunto, nuestros estudios indican que la expresión específica de TREX2 en queratinocitos es resultado de la interacción entre el estado de metilación en CpGs del promotor y los factores de transcripción de las familias ETS y AP1.

5.1 Expresión, localización y actividad de la proteína TREX2

Los estudios iniciales de expresión de la exonucleasa TREX2 realizados en nuestro laboratorio determinaron su expresión en aquellos tejidos con un epitelio escamoso estratificado tales como esófago, cérvix y piel (Parra et al., 2009). Además se constató que los queratinocitos constituían el tipo celular donde se expresaba TREX2. Con los estudios presentados en esta memoria hemos conseguido acotar aún más su expresión caracterizando mejor el tipo de expresión de TREX2. Los niveles de expresión proteica de TREX2 no son iguales en todos los queratinocitos sino que son más elevados en las capas suprabasales de la epidermis, principalmente en las últimas capas del estrato espinoso y en el estrato granuloso. El incremento de la expresión de TREX2 en las capas suprabasales se correlaciona con la expresión de genes marcadores del estado de diferenciación celular de los queratinocitos como K10 e Involucrina. La Involucrina es considerada un marcador del proceso de diferenciación temprana y su expresión ocurre en el estrato espinoso extendiéndose hasta el estrato granular (Crish et al., 2006). La K10 es también un

marcador de diferenciación temprana (Poumay & Pittelkow, 1995) y normalmente se expresa en los queratinocitos epidérmicos diferenciados (Santos et al., 2002) de las capas suprabasales de la epidermis. Señalar que el aumento en la expresión de TREX2 en las capas de la epidermis sería más tardío que el de la K10 o Involucrina. Por lo tanto, la proteína TREX2 se acumula en los queratinocitos más diferenciados, si bien el patrón de expresión no es exactamente idéntico al de la K10 ni al de la Involucrina. Consistentemente, en queratinocitos en cultivo murinos hay también una clara correlación entre la expresión de TREX2 y los marcadores de diferenciación Involucrina y Loricrina. La Loricrina es una proteína que se expresa muy tarde en la diferenciación epidérmica en las capas granulares de la epidermis humana y murina (Hohl et al., 1993; Jang & Steinert, 2002). Análogamente, esta correlación la hemos encontrado en queratinocitos humanos, los cuales inician la diferenciación cuando llegan a la confluencia (Poumay & Pittelkow, 1995). En este modelo, la expresión de TREX2 se detecta a nivel de mRNA y proteína a partir del día 4 de post-confluencia, cuando también se está induciendo la expresión de otros genes de diferenciación como la Involucrina y la Loricrina.

Además, detectamos una elevada expresión de TREX2 en las glándulas sebáceas asociadas al pelo del ratón así como en la capa interna del folículo piloso de la piel humana. El desarrollo embriológico de la glándula sebácea está altamente relacionado con la diferenciación del folículo piloso y la epidermis. La función más aparente de la glándula sebácea es la de excretar el sebo (Zouboulis et al., 1999) pero también se ha demostrado que puede sintetizar cantidades considerables de ácidos grasos libres sin influencia exógena. Los lípidos sebáceos son los responsables de la organización tridimensional lipídica de la superficie de la piel contribuyendo a la integridad de la barrera de la piel. También exhiben una actividad microbiana innata, transportan antioxidantes a la superficie de la piel, expresan propiedades pro y anti-inflamatorias (Zouboulis, 2004) y péptidos antimicrobianos, como las β -defensinas y LL-37 (Dong-Youn Lee, 2008). La presencia de TREX2 en esta glándula hace pensar que los sebocitos podrían tener un papel relevante en la secreción de TREX2. Queda por determinar su función

extracelular, aunque por su actividad exonucleasa podría contribuir a la degradación del DNA extracelular procedente de microorganismos o bien ser liberada en respuesta al daño celular y asociado a inflamación. En este contexto, se ha descrito que la endonucleasa DNasa1L2, que presenta una expresión similar a la de TREX2 (Fischer et al., 2007) inhibe la formación de biopelículas microbianas necesarias para la colonización de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, contribuyendo así a la inmunidad innata de la piel (Eckhart et al., 2007). Además, se ha visto que en ratones con deleciones de genes que codifican para proteínas estructurales de la piel como Loricrina se encuentran defectos y retrasos en la formación de la barrera epidérmica provocando una mayor permeabilidad de sustancias hacia el medio interno y mayor fragilidad en sus corneocitos (Koch et al., 2002).

La deficiencia de TREX2 da lugar a un pequeño pero significativo aumento en la expresión de la Involucrina en la piel de neonato en las fases temprana y media de anágeno del ciclo del pelo, sin observarse diferencias en la expresión de K10 y Loricrina. Por otra parte, en queratinocitos en cultivo la expresión de estos tres marcadores de diferenciación es ligeramente más elevada en ausencia de TREX2. Ahora bien, en el ratón *Trex2*^{-/-} no se observan defectos en la formación del estrato córneo ni en la arquitectura de la piel en condiciones no patológicas. Ello contrasta con el fenotipo observado en el ratón knockout de la endonucleasa DNasa1L2, que presenta un patrón de expresión extremadamente parecido al de TREX2, incluyendo expresión en la capa granular, glándula sebácea y en la capa interna del pelo (Fischer et al., 2007). La deficiencia de DNasa1L2 provoca un defecto en la eliminación del DNA de los corneocitos y al quedar DNA acumulado en el pelo las propiedades mecánicas de estos quedan alteradas resultando ser más quebradizos (Fischer et al., 2011b). Es posible que la pérdida de TREX2 altere solo levemente el proceso de diferenciación de los queratinocitos en condiciones basales, pero que tenga unas consecuencias más importantes en respuesta a situaciones de estrés. En este contexto, estudios de nuestro grupo utilizando un modelo de inducción de psoriasis en ratón han revelado que la pérdida de TREX2 se correlaciona con un aumento de la paraqueratosis (los corneocitos conservan el DNA nuclear) y de los marcadores de

diferenciación (Manils et al., en revisión). La psoriasis es una de las enfermedades más comunes de la piel que consiste en su inflamación crónica y recurrente la cual va acompañada de la diferenciación aberrante de los queratinocitos (Lowes, 2007).

Al comparar las isoformas proteicas humanas y murina de TREX2 se observan pequeñas diferencias a nivel de actividad, pero no en la localización subcelular, ni en el patrón de expresión tisular. En ratón se ha descrito una única isoforma proteica de 236 aa (26 kDa) de TREX2, codificada por un único transcrito (Parra et al., 2009). Por otra parte, en humanos se han detectado diversos transcritos que codificarían para tres isoformas de 236 aa (26 kDa), equivalente a la de ratón, de 279 aa (31 kDa) y de 278 aa (30 kDa) diferenciadas sólo a nivel de los aminoácidos N-terminales (Chen et al., 2007b). Nuestros estudios tanto en piel como en queratinocitos humanos demuestran que si bien se detecta el transcrito que codifica para la isoforma de 279 aa, la única isoforma proteica que se detecta es la de 26 kDa. De hecho, incluso al expresar de forma heteróloga el cDNA que codifica para la isoforma de 279 aa (L1) se generan tres isoformas proteicas, de 279, 264 y 236 aa, correspondientes al inicio de traducción a partir de las metioninas situadas a +1, +16 y +44, indicando que el transcrito que codifica para la isoforma de 279 aa también puede generar la isoforma de 236 aa. Ya que tanto en piel como en queratinocitos humanos sólo detectamos la isoforma de 26 kDa es muy probable que *in vivo* el inicio de transcripción utilizado preferentemente sea el que codifica para esta isoforma.

Al igual que la isoforma murina (Manils et al., 2015), las isoformas humanas de TREX2 se localizan predominantemente en el núcleo y en micronúcleos. Por lo tanto, los 43 aa adicionales presentes en el extremo N-terminal de la isoforma humana de 279 aa, en relación a la isoforma de 236 aa, no determinan una localización subcelular diferencial. Interesantemente, en los micronúcleos TREX2 colocaliza con la histona H2AX fosforilada (Manils et al., 2015), importante tanto para la reparación del DNA como para su degradación (Baritaud et al., 2010). La fosforilación de la histona H2AX se produce en las roturas dobles del DNA presentes en la cromatina dañada de núcleos apoptóticos y micronúcleos (Lippens et al., 2009; Terradas et al., 2010; Eckart et al., 2013). No obstante, el rol que cumple TREX2 en los micronúcleos continúa siendo desconocido. No se han

encontrado diferencias en las frecuencias de micronúcleos entre queratinocitos wt o *Trex2*^{-/-} (Manils et al., 2015), aunque no se descarta que puedan existir diferencias en el contenido y la conformación del DNA micronuclear entre los dos genotipos.

Si bien el patrón de localización subcelular no varía entre las isoformas humanas y la murina de TREX2, sí que se detectan ligeras diferencias a nivel de actividad enzimática. Nuestros datos confirman que la actividad enzimática de la isoforma de 236 aa es claramente dependiente del pH como se había descrito anteriormente (Mazur & Perrino, 2001b) y revelan que la dependencia de pH de la isoforma de 279 aa es similar a la de 236 aa. Por otra parte, al comparar la actividad de las tres isoformas a diferentes pHs, se observa que la de la isoforma murina es inferior a la de las isoformas humanas, que presentan diferencias mínimas entre ellas. También cabe señalar que a pH 5.0 la actividad exonucleasa de TREX2 disminuye pero sigue conservando una actividad importante. El pH de la capa más superficial de la piel o estrato córneo es aproximadamente de 5.0, frente al de 7.4 de la epidermis. Esto implica que un cambio de más de dos unidades de pH se produce en una distancia de sólo 10 µm (espesor normal del estrato córneo humano) en la epidermis (Öhman & Vahlquist, 1998). La superficie de la piel es ácida, variando en un rango de pH entre 4.5 y 6.0 dependiendo de la contextura del cuerpo, género o especie (Öhman & Vahlquist, 1994). Curiosamente, el pH ácido del estrato córneo es relativamente más ácido en humanos adultos (5.0) comparado con ratones adultos (5.5) (Jia & Nash, 2010). Esta sutil diferencia se correlaciona con una actividad relativamente mayor de las isoformas humanas respecto a la isoforma murina a los diferentes pHs analizados. La formación de la barrera del estrato córneo involucra varias enzimas con actividades dependientes del pH, entre ellas se incluyen la glucocerebrosidasa, esfingomielinasa ácida, lipasas ácidas, fosfatasas y fosfolipasas (Schmid-Wendtner & Korting, 2006). Previos estudios han propuesto que el pH óptimo para la actividad exonucleasa de la isoforma de 236 aa oscila entre 7.5 y 8.0 (Mazur & Perrino, 2001b). El hecho de que la actividad de las diferentes isoformas de TREX2 no se inhiba completamente en las condiciones de acidez del estrato córneo sugiere una actividad

polivalente, acorde con las exigencias del gradiente de pH de la piel y un papel activo de TREX2 en el estrato córneo.

5.2 Regulación del gen *TREX2*

La información sobre el gen *TREX2* humano en la base de datos *GenBank* registra múltiples transcritos, algunos de los cuales contienen exones del gen *HAUS7* situado a 5' del gen *TREX2*. Inicialmente se propuso un transcrito de 16 exones, localizándose la secuencia codificante exclusivamente en el último exón (Mazur & Perrino, 2001a). Por otro parte, sólo dos exones integran el gen *Trex2* murino, situado también adyacente al gen *Haus7*. Los datos obtenidos en el estudio de los inicios de transcripción en queratinocitos y piel revelan que los dos transcritos humanos que codifican para la isoforma S son equivalentes al de ratón. Asimismo, los inicios transcripcionales del gen *TREX2* humano para la isoforma S son equivalentes a los inicios del gen murino revelando el alto grado de conservación entre las dos especies. De los cuatro inicios identificados, uno de ellos coincide con el inferido (Mazur & Perrino, 2001a). Señalar también que en estos estudios no conseguimos detectar los TSS para el transcrito L1, que codifica para la isoforma de 279 aa, ni el transcrito L2, que codifica para la isoforma de 278 aa (Chen et al., 2007a), seguramente debido a su baja expresión relativa. De hecho, el transcrito L2 recientemente ha sido retirado de la base de datos. Por otra parte, en piel identificamos un nuevo transcrito al que denominamos L3, formado por exones de *HAUS7* y *TREX2*. Curiosamente, en el L3, el codón ATG de inicio coincide con el del transcrito L2. La posibilidad de iniciar la transcripción en distintos sitios a lo largo del promotor se puede relacionar con un fino nivel de regulación de la expresión de TREX2, dependiente del tipo celular y de los estadios de diferenciación.

El promotor de *Trex2* no posee cajas generales de inicio de transcripción TATA ni motivos de secuencia CCAAT pero en su lugar posee un elemento *Inr* ubicado a -57 pb del TSS, además de un motivo MTE a -103 pb. Se ha descrito que el motivo MTE en conjunto con el elemento *Inr* puede promover la transcripción por la RNA polimerasa II cuando está localizado en las posiciones +18 a +24 relativo a la secuencia consenso del *Inr* (Lim et al.,

2004). En la secuencia promotora del gen *Trex2* aparecen estos dos motivos pero el motivo MTE se encuentra localizado *upstream* del motivo *Inr*. Queda por determinar si este motivo es funcional y si actúa en coordinación con el motivo *Inr* o si, por el contrario, estos dos motivos regulan independientemente la actividad.

La principal información que se desprende del análisis *in silico* es la elevada presencia de TFBS pertenecientes a las familias AP1 y ETS, los cuales están relacionados con la expresión específica en queratinocitos y durante la diferenciación de queratinocitos (Eckert et al., 2004; Tumala & Sinha, 2006; Choi et al., 2008; Mizuno et al., 2006; Rorke et al., 2010). En esta tesis se demuestra que el promotor proximal de *Trex2* se encuentra aproximadamente a 260 pb del TSS del gen, coincidiendo con una región conservada en diversas especies. Este promotor tiene una actividad transcripcional bastante más elevada en queratinocitos que en fibroblastos, indicando que contiene elementos que regulan la expresión dependiente del tipo celular. Además, nuestros datos indican que los elementos AP1 y Elf5, situados en las posiciones -202/-200 y -196/-193, respectivamente, regulan positivamente la actividad del promotor. Concretamente, la mutación de la caja AP1 afecta específicamente la actividad del promotor en queratinocitos, mientras que la mutación de la caja Elf5 reduce la actividad promotora tanto en queratinocitos como en fibroblastos. Sitios AP1 funcionales han sido previamente identificados en genes específicos de la epidermis como K8 y K18 (DiSepio, et al., 1995), Involucrina (Eckert et al., 2004; Balasubramanian & Eckert, 2007) y Loricrina (Han et al., 2012; Rorke et al., 2014), entre otros. El promotor humano de la Involucrina posee sitios de unión a AP1 en su región proximal y distal, requeridos para la expresión tanto en queratinocitos en cultivo como *in vivo* (Banks et al., 1998)

Por otra parte, sorprendentemente la mutación de la caja CREB situada a -217/-214 afecta la actividad del promotor negativamente o positivamente en función de si se analiza en el contexto de una región promotora que abarca hasta -487 pb o bien -260 pb. Esta aparente paradoja podría estar relacionada con cambios en la conformación del promotor dependiente del tamaño del fragmento analizado y/o a la pérdida de interacciones entre elementos reguladores de regiones proximales y distales. Se ha

descrito que los elementos CREB modulan la transcripción génica positiva y negativamente, interaccionando con otros factores de transcripción, entre ellos los miembros de AP1. Concretamente, miembros de la familia CREB actúan como inhibidores del promotor de la Loricrina en queratinocitos. La proteína CREB puede competir con c-Jun por el sitio AP1 y reprimir la actividad promotora de la Loricrina (Jang & Steinert, 2002). Se ha documentado también que las proteínas CREB y AP1 son capaces de formar heterodímeros y unirse a sitios AP1 (Chatton et al., 1994). La inhibición de CREB se ha relacionado con la represión de la actividad transcripcional de un reportero de AP1 en queratinocitos diferenciados de ratón *in vitro* (Rutberg et al., 1999). Otros estudios muestran que la activación de la expresión génica durante la diferenciación de queratinocitos es regulada en el promotor por combinaciones específicas de CREB, c-Jun y C/EBP β (Rozenberg et al., 2013) y por metilación de CpGs en secuencias CRE (Rishi et al., 2010). Interesantemente, como comentamos más adelante, el promotor de *Trex2* se regula por metilación en CpGs durante la diferenciación de los queratinocitos.

Nuestros resultados indican que Elf5, cuya expresión se restringe a queratinocitos diferenciados y epitelio glandular (Tumala & Sinha, 2006; Choi et al., 2008), tiene un papel clave en la regulación de la expresión específica de TREX2 en queratinocitos. Aunque la mutación del TFBS de Elf5 disminuye la actividad promotora en fibroblastos y queratinocitos, los experimentos de sobreexpresión de Elf5 indican que la actividad promotora aumenta sólo en queratinocitos MCA3D y no en los fibroblastos NIH3T3. La disminución de la actividad en fibroblastos debido a la mutación de la caja de unión a Elf5 seguramente afecta a la interacción de algún otro factor de la familia ETS. De hecho, la expresión de Elf5 en fibroblastos es prácticamente nula y muy reducida en la línea celular de queratinocitos MCA3D, en comparación a los niveles de expresión detectados en queratinocitos primarios. La región promotora de Elf5 se encuentra en una conformación abierta selectivamente en células epiteliales diferenciadas. Ciertos estudios bioquímicos de los factores que se unen a este segmento han identificado un factor nuclear restringido a queratinocitos (KRF) importante para la mayor parte de la actividad del promotor de Elf5. KRF puede jugar un papel fundamental como mediador de la expresión no sólo de

Elf5, sino también de otros marcadores de diferenciación de queratinocitos incluyendo la Involucrina (Tummala & Sinha, 2006). La importancia de Elf5 en la regulación de la expresión de TREX2 en queratinocitos viene avalada por los estudios de CHIP que demuestran la interacción de Elf5 con el promotor de TREX2 y los datos obtenidos en los experimentos de silenciamiento de Elf5 en queratinocitos, que dan lugar a una disminución de la expresión de TREX2. En conjunto, todos estos datos apuntan a Elf5 como regulador de la expresión específica de *Trex2* en queratinocitos.

Los datos obtenidos sobre la regulación de la actividad del promotor de *Trex2* por factores de transcripción de la familia AP1 son difíciles de interpretar. En la línea de queratinocitos MCA3D, la inhibición de la actividad mediante la expresión del dominante negativo de AP1 y el aumento de actividad al sobreexpresar JunB sugieren una regulación positiva al menos por parte de JunB. c-Fos *per se* o en combinación con JunB no modifica la actividad.

Varios miembros de la familia AP1 se expresan en diferentes capas de la epidermis (Eckert et al., 2013b) y se les ha concedido un papel clave en la diferenciación de los queratinocitos (Eckert et al., 2004; Mizuno et al., 2006; Rorke et al., 2010). La activación de AP1 es requerida para la expresión de la K15 (Bose et al., 2012) y su inhibición específica mediante TAM67, una forma alterada de c-Jun que inhibe la función de AP1 (Matthews et al., 2007; Han et al., 2012; Rorke et al., 2014), extingue completamente la expresión de la K15. También la expresión de la Involucrina depende de la activación de AP1 (Balasubramanian & Eckert, 2007). La actividad promotora del gen de la Involucrina también es inhibida por TAM67, así como los niveles de mRNA y proteína en queratinocitos, indicando la importancia de AP1 en la expresión génica de la Involucrina. La inhibición de AP1 por TAM67 reduce también la expresión de la Loricrina, indicando que la expresión de la Loricrina es también dependiente de AP1 (Han et al., 2012; Rorke et al., 2014). Adicionalmente, estudios de inmunotinción en epidermis de ratón muestran que la expresión suprabasal de TAM67 afecta la expresión de la Loricrina, que normalmente está presente como una banda discreta en la capa más externa de la

epidermis, siendo detectada de forma difusa en múltiples capas suprabasales en epidermis TAM67 positivas (Rorke et al., 2010; Rorke et al., 2014).

Por otra parte, sorprendentemente, el *knockdown* de JunB y de Fra-2 en queratinocitos primarios aumenta la expresión de TREG2, indicando una regulación negativa por parte de estos dos miembros de la familia AP1. Análogamente al patrón observado en la expresión de TREG2, el *knockdown* de JunB, c-Jun, c-Fos o Fra-2 no da lugar a un aumento de la expresión de los genes de Involucrina, K10 y Loricrina en queratinocitos primarios en cultivo, sino que determina un aumento más o menos mayor de la expresión de estos marcadores de diferenciación. Cabe señalar la gran similitud en la regulación negativa de la expresión de TREG2 e Involucrina por JunB y Fra-2, mientras que la expresión de K10 y Loricrina se regula además por c-Fos. Los resultados aparentemente contradictorios obtenidos a partir de los estudios de actividad del promotor y los estudios en queratinocitos primarios deficientes para diferentes miembros de AP1 podrían estar relacionados con la regulación dual y diferencial por parte de AP1 de diversos genes de diferenciación en queratinocitos basales, reprimiendo su expresión, y en queratinocitos diferenciados, activandola (Wurm et al, 2015; Yang & Steinert, 2002). Concretamente, la actividad del promotor humano de la Loricrina puede ser activada por los heterodímeros c-Jun/c-Fos en los queratinocitos suprabasales, mientras que JunB puede suprimirla en los queratinocitos basales (Yang & Steinert, 2002; Rossi et al., 1998). Asimismo, Fra-2 se activa por fosforilación en los queratinocitos suprabasales, regulando positivamente la expresión de Loricrina, mientras su actividad transcripcional se reprime por metilación en los queratinocitos basales (Wurm et al., 2015). Además, la inactivación de AP1 en el compartimento basal no produce cambios en la proliferación, pero en la suprabasal produce hiperproliferación (Rorke et al., 2010; Eckert et al., 2013b), reflejando el papel diferencial y multifuncional de AP1 dependiendo del estado de diferenciación del queratinocito.

La inducción de la expresión de TREG2 por la radiación UV (Manils et al., 2015), al igual que la actividad de AP1 y la expresión de marcadores de diferenciación de la piel (Moravcová et al., 2013), sugieren también un papel clave de AP1 en la regulación de la

expresión de TREX2 en respuesta al estrés celular. Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran una elevada expresión de TREX2 en piel humana y de ratón con psoriasis en comparación a la piel normal (Manils et al., en revisión). En este sentido, el análisis de la expresión de TREX2 en el modelo de psoriasis inducido por la pérdida de c-Jun/JunB (Schonthaler et al., 2009; Wagner et al., 2010) nos permitiría corroborar la correlación del fenotipo psoriático con una sobreexpresión de TREX2.

Todos estos datos en conjunto indican que la expresión de TREX2 puede ser regulada directa o indirectamente por JunB y Fra-2. Concretamente, los estudios *in vitro* indican una regulación positiva por parte de AP1 de la actividad del promotor de *Trex2* en queratinocitos dependiente de AP1. Además, el hecho de que c-Jun esté unido al promotor de *Trex2* sólo en tejidos transcripcionalmente activos es consistente con una relevancia de AP1 en la regulación tejido-específica de TREX2. Por otra parte, los estudios *in vivo* demuestran que JunB y Fra-2 actúan como supresores de TREX2. Sin embargo, este efecto puede ser dependiente del estado de diferenciación de los queratinocitos, como hemos comentado anteriormente. Por otra parte, no podemos descartar un papel de AP1 *in vivo* independiente de la regulación directa sobre el promotor de *Trex2* que module la expresión de otros factores de transcripción que a su vez regulen positivamente o negativamente la actividad del promotor de *Trex2*. El mismo razonamiento sería aplicable a la regulación de la expresión de la Involucrina, K10 y Loricrina, si bien cada gen está regulado por una combinación específica de diferentes miembros de AP1. Diferentes miembros de la familia Jun pueden interactuar entre ellos mismos y son capaces de interaccionar estructural y funcionalmente con otros reguladores transcripcionales (Rossi et al., 1998). Por otro lado, los resultados aparentemente opuestos observados en los ensayos *in vivo* e *in vitro* podrían estar relacionados con las limitaciones del estudio de la actividad promotora *in vitro*. Las regiones estudiadas son relativamente pequeñas y probablemente no consiguen mantener la estructura cromatínica natural del promotor endógeno. Por ejemplo, se ha demostrado que una determinada posición de los nucleosomas en las regiones promotoras se correlaciona con la actividad transcripcional (Venkatesh & Workman, 2015). Además se sabe que las modificaciones postraduccionales

de las histonas así como las distintas histonas presentes en los nucleosomas son cruciales para el anclaje y acceso de factores implicados en la regulación transcripcional (Kouzarides, 2007; Weber & Henikoff, 2014). En nuestros ensayos *in vitro* es muy probable que los nucleosomas no se encuentren posicionados correctamente, y por lo tanto esa “capa adicional” de regulación se pierda o bien no se reproduzca de la misma manera que en el promotor endógeno, como ya se ha demostrado que sucede en otros ensayos parecidos al nuestro (Hebbar & Archer, 2008). Por todo ello, no es de extrañar que los resultados *in vitro* obtenidos no se correspondan al 100% con los resultados *in vivo*.

La regulación del gen *Trex2* por parte de AP1 en queratinocitos vendría determinada no sólo por la formación de distintos complejos de AP1 de manera directa o indirecta, sino también por interacciones que involucran otros reguladores transcripcionales. De hecho, no se puede descartar la presencia de otras secuencias reguladoras proximales y distales en el promotor de *Trex2* (Ong & Corces, 2012). En conjunto nuestros datos indican que la expresión espacial y temporal de *Trex2* en la piel estaría determinada por distintos complejos de AP1, que podrían regular la expresión diferencial en las distintas capas de la epidermis y por el factor de transcripción Elf5, junto con otros reguladores transcripcionales aún no identificados.

Además, en este trabajo hemos observado claramente que la expresión de TREX2 se regula también por mecanismos epigenéticos. Consistentemente, en ratón y humano, hemos observado que el grado de metilación del promotor de *Trex2* se correlaciona inversamente con los niveles de expresión. Concretamente, en ratón, todas las CpGs localizadas en el promotor proximal, donde se encuentran los sitios de unión para AP1, Elf5 y CREB están demetiladas en tejidos y células que expresan TREX2, mientras que están metiladas en aquellos que tienen una expresión negativa. Por otra parte, en el promotor humano se han localizado dos regiones en las que se distingue un patrón de metilación diferencial en CpGs puntuales entre células con expresión positiva y negativa de TREX2. La demetilación del promotor proximal humano ocurre en los queratinocitos más diferenciados sólo en CpGs concretas, una de las cuales precisamente coincide con el inicio de transcripción. Por otra parte, en la región promotora distal se demetilan casi el

50% de las CpGs analizadas también en los queratinocitos más diferenciados. Se sabe que la metilación de una sola citosina en dinucleótidos CpG puede modular la expresión génica (Messerschmidt et al., 2014). Durante la diferenciación de la piel, ocurren cambios en la metilación del DNA, usualmente en los extremos de las islas CpG (Perdigoto et al., 2014). El estado de metilación del DNA en tejidos de mamíferos es el resultado de la acción de tres enzimas metiltransferasas; DNMT3A, DNMT3B y DNMT1 (Smith & Meissner, 2013). Durante el desarrollo embrionario la metilación *de novo* se establece mediante la DNMT3A y la DNMT3B (Law & Jacobsen, 2011; Sharma et al., 2011). Consistentemente, cerca del 20% de los genes reprimidos son metilados *de novo* durante la diferenciación epidérmica (Sen et al., 2010). Alternativamente, algunos genes epidérmicos sufren demetilación activa durante el proceso de diferenciación, entre los cuales se encuentran S100P y EphA2, un receptor tirosina quinasa importante en la diferenciación terminal de la piel (Sen et al., 2010; Bock et al., 2012). Recientes estudios demuestran que en queratinocitos no diferenciados la mayoría de los genes activos tienen promotores no metilados y sólo algunos genes activos (19%) muestran promotores metilados. También se ha visto que con la diferenciación, el mRNA de una gran cantidad de genes específicos de la diferenciación se duplica y el 40% de estos genes muestran promotores con CpGs metiladas (Rishi et al., 2010). Además, el estado de metilación del promotor puede jugar un papel importante en el reclutamiento diferencial de factores de transcripción como CREB, c-Jun y C/EBP β , todos ellos importantes reguladores de genes involucrados en la diferenciación de los queratinocitos (Iguchi-Ariga & Schaffner 1989; Umek et al., 1991; Rishi et al., 2010; Rozenberg et al., 2013). No parece existir una regla general que defina el patrón de metilación de genes activos, lo cierto es que *Trex2* encaja en los genes inactivos en queratinocitos no diferenciados con promotores metilados que, posteriormente con la diferenciación se demetilan y activan.

5.3 Alteraciones de *TREX2* en tumores

En este estudio hemos observado que la expresión de TREX2 en muestras de tumores derivados de queratinocitos como los SCC cutáneos (cSCC, *cutaneous squamous*

cell carcinoma) y los HNSCC, sufre una desregulación. La pérdida de la expresión de TREX2 está asociada con la dediferenciación de los tumores (Manils et al., 2015), hecho que va acorde con la hipótesis de que TREX2 puede actuar como supresor tumoral en la tumorigénesis de tumores escamosos (Parra et al., 2009). Respecto al gen *TREX2* humano, nuestros datos confirman que las mutaciones somáticas en este gen no se encuentran entre las diversas alteraciones genéticas acumuladas en HNSCC (Stransky et al., 2011). Sin embargo, la mayor incidencia del conjunto de las variantes raras de TREX2 en pacientes con tumores escamosos sugiere que la variabilidad genética podría predisponer la aparición de tumores escamosos. Si bien la frecuencia de los SNPs en el gen *TREX2* es muy baja, al agrupar los SNPs raros del gen *TREX2*, la frecuencia del conjunto de SNPs encontrada es significativamente mayor en individuos con tumores escamosos que en individuos sanos. Hasta ahora sólo algunas mutaciones raras en los genes NER y anemia de Fanconi se han asociado con la susceptibilidad a la carcinogénesis de células escamosas (Wyss et al., 2013; Romick-Rosendale et al., 2013). Curiosamente, la variante R156L, presente a una relativamente alta frecuencia en cáncer de próstata esporádico (Perrino et al., 2004) resulta en una pérdida parcial de la función. En este contexto, una mutación inactivadora de *Trex2* en la línea germinal, con pérdida adicional de heterocigosis en el tumor ha sido reportada en un paciente con cáncer colorectal, implicando a *TREX2* como potencial supresor tumoral en la tumorigénesis colorectal (Smith et al., 2013). Una evaluación más profunda de grandes cohortes debería proporcionar información sobre una posible asociación de las variantes de *Trex2* con susceptibilidad al SCC proveniente de queratinocitos de la capa espinosa de la epidermis u otras patologías epiteliales. La robusta actividad exonucleasa de todas las variantes en los ensayos sobre dsDNA y ssDNA indica que las mutaciones de estas variantes no comprometen una pérdida de función completa. Las consecuencias funcionales de las variantes genéticas podrían estar mediadas por interacciones proteína-proteína o proteína-DNA alteradas *in vivo*. De acuerdo con esta idea los residuos R132, R156, A157, G161 están posicionados en la superficie de TREX2, de forma que pueden interactuar con otras moléculas o con el DNA (Perrino et al., 2005). El residuo L15 interactúa hidrofólicamente con L126 y L127 para

posicionar adecuadamente la hélice alfa en la que reside el R132. Los residuos R156, A157 y G161 están posicionados en el mismo bucle entre las hélices $\alpha 6$ - $\alpha 7$ conteniendo R163, R165 y R167 para los cuales había sido previamente demostrado su contribución en la unión directa del DNA con la enzima TREX2 (Perrino et al., 2005). Por lo tanto, las variantes de TREX2 identificadas están situadas en posiciones que pueden interrumpir las interacciones de múltiples mecanismos.

6. CONCLUSIONES

1. La expresión de la exonucleasa TREX2 en piel y queratinocitos, se correlaciona positivamente con el grado de diferenciación, acumulándose en los estratos suprabasales de la epidermis, la capa interna del folículo piloso y la glándula sebácea.
2. La organización genómica del gen *TREX2* y los inicios de transcripción del transcrito mayoritario son equivalentes en queratinocitos humanos y murinos. Tanto en unos como en otros se detecta una única isoforma proteica de 236 aminoácidos, aunque en queratinocitos humanos se generan transcritos minoritarios que codifican para isoformas de 279 (L1) y 273 (L3) aminoácidos. Las isoformas de 236 y 279 aminoácidos presentan una localización nuclear y en micronúcleos. Por otra parte, la actividad exonucleasa *in vitro* es similar entre las diferentes isoformas, siendo funcional al pH ácido presente en el estrato córneo, si bien las isoformas humanas presentan una actividad relativamente mayor a la murina.
3. El promotor proximal del gen *Trex2* se localiza aproximadamente a 260 pb del inicio de transcripción, contiene diversos elementos funcionales que determinan la expresión tejido específica en queratinocitos, regulándose la actividad del promotor positivamente por los factores de transcripción Elf5 y AP1. Por otra parte, en queratinocitos primarios los factores de transcripción Fra-2 y JunB controlan negativamente la expresión de TREX2, sugiriendo una regulación compleja por miembros de la familia AP1.
4. El promotor de TREX2 se regula por el estado de metilación de regiones ricas en CpG. Concretamente, la expresión tejido específica y a lo largo de la diferenciación del promotor murino se correlaciona con la demetilación de CpG localizadas en la región proximal. Análogamente, en el gen humano la demetilación de la CpG situada en el inicio de transcripción se correlaciona con la expresión de TREX2. Además, se ha identificado una región 5' distal que también presenta un patrón de

metilación CpG diferencial que se correlaciona con la expresión de TREX2; encontrándose menos metilada en células con expresión positiva y más metilada en células con expresión negativa y de TREX2.

5. Se han identificado diversos polimorfismos raros en el gen *TREX2*, incluyendo 5 no sinónimos. Sólo la variante R156L presenta una menor actividad exonucleasa frente a dsDNA. Sin embargo, la frecuencia del conjunto de estas variantes raras es significativamente mayor en individuos con tumores que en individuos sanos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, K.H. & R.W. Sobol. (2007). A unified view of base excision repair: lesion dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*, 6:695-711.
- Alonso, L., & Fuchs, E. (2006) The hair cycle. *J Cell Sci*, 119:391-3.
- Andersen, B., Weinberg, W. C., Rennekampff, O., McEvilly, R. J., Bermingham, J. R. Jr., Hooshmand, F., Vasilyev, V., et al. (1997). Functions of the POU domain genes *Skn-1a/i* and *Tst-1/Oct-6/SCIP* in epidermal differentiation. *Genes Dev*, 11(14): 1873-84.
- Andersen, P. L., Xu, F., & Xiao, W. (2008). Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res*. 18: 162-73.
- Andreoli, J. M., Jang, S. I, Chung, E., Coticchia, C. M., Steinert, P. M., & Markova, N. G. (1997). The expression of a novel, epithelium-specific ets transcription factor is restricted to the most differentiated layers in the epidermis. *Nucleic Acids Res*, 25:4287-4295.
- Angel, P., Szabowski, a, & Schorpp-Kistner, M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 20(19):2413-23.
- Ansari, K. M., Rundhaug, J. E., Fischer, S. M. (2008) Multiple signaling pathways are responsible for prostaglandin E2-induced murine keratinocyte proliferation. *Mol Cancer Res*, 6(6):1003-1016.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M. R., Meilinger, D. Meissner, A., Jenuwein, T., et al. (2012). *In Vivo* Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. *PLOS Genetics*, 8(6):e1002750.
- Aubert, M., Boyle, N. M., Stone, D., Stensland, L., Huang, M.-L., Magaret, A. S., Galetto, R., et al. (2014). In vitro Inactivation of Latent HSV by Targeted Mutagenesis Using an HSV-specific Homing Endonuclease. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3:1-12.
- Balasubramanian, S., & Eckert, R. L. (2007). Curcumin supresses AP1 transcription factor-deépendent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 282:6707-6715.
- Banks, E. B., Crish, J. F., Welter, J. F., & Eckert, R. L. (1998) Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements- a role for Sp1 and AP1 binding sites. *Biochem J*, 331 (Pt 1):61-68.
- Baritaud, M., Boujrad, H., Lorenzo, H.K., Krantic, S., & Susin, S.A. (2010). Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell Cycle*, 9: 3166-3173.
- Behrens, A., Sibilía, M., David, J. P., Mohle-Steinlein, U., Tronche, F., Schutz, G., & Wagner, E. F. (2002) Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J*, 21:1782-1790.
- Bennardo, N., Gunn, A., Cheng, A., Hasty, P., & Stark, J. M. (2009). Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential. *PLoS Genetics*, 5(10):e1000683.
- Bernheim, A. (2010). Cytogenomics of cancers: From chromosome to sequence. *Mol Oncol*, 4(4):309-22.
- Blanco, R., Muñoz, P., Flores, J. M., Klatt, P., & Blasco, A. (2007). Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes & Development*, 21:206-220.
- Bock, C., Beerman, I., Lien, W. H., Smith, Z. D., Gu, H., Boyle, P., Gnirke, A., Fuchs, E., Rossi, D. J., & Meissner, A. (2012). DNA methylation dynamics during *in vivo* differentiation of blood and skin stem cells. *Mol Cell*, 47(4):633-647.
- Bogdanović, O., & Veenstra, G. J. C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5): 549-565.
- Borrelli, S., Testoni, B., Callari, M., Alotto, D., Castagnoli, C., Romano, R-A., Sinha, S., et al. (2007). Reciprocal regulation of p63 by C/EBP delta in human keratinocytes. *BMC, Mol Biol*, 8:85.
- Bose, A., Teh, M-T., Hutchison, I. L., Wan, H., Leigh, I. M., & Waseem, Ahmad. (2012). Two Mechanisms Regulate Keratin K15 Expression In Keratinocytes: Role of PKC/AP-1 and FOXM1 Mediated Signalling. *PLoS ONE* 7(6):e38599.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology*, 106:761-771.
- Burgers, P. M., Koonin, E.V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., et al. (2001). Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclatura. *Journal of Biological Chemistry*, 276:43487-90.

- Butler, J. E. F., & Kadonaga, J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*, 16(20): 2583–92.
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(4):328–40.
- Canettieri, G., Coni, S., Della Guardia, M., Nocerino, V., Antonucci, L., Di Magno, L., Screaton, R., et al. (2009). The coactivator CRTC1 promotes cell proliferation and transformation via AP-1. *Proc Natl Acad Sci*, 106(5):1445–1450.
- Carroll, S. B. (2000). Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell*, 101(6):577–80.
- Certo, M. T., Gwiazda, K. S., Kuhar, R., Sather, B., Curinga, G., Mandt, T., Brault, M. et al. (2012). Coupling endonucleases with DNA end-processing enzymes to drive gene disruption. *Nature Methods*, 9(10):973–5.
- Chakrabarti, R., Hwang, J., Blanco, M., Wei, Y., Lukačičin, M., Romano, R. A., Smalley, K., et al. (2012). E1F5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nat Cell Biol*, 14(11):1212–22.
- Chatterjee, R., & Vinson, C. (2012). CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1819(7):763–70.
- Chatterjee, R., Zhao, J., He, X., Shlyakhtenko, A., Mann, I., Waterfall, J. J., et al. (2012). Overlapping ETS and CRE Motifs ((G/C)CGGAAGTGACGTCA) preferentially bound by GABPα and CREB proteins. *G3*, 2(10):1243–56.
- Lin, K. K., Chudova, D., Hatfield, G. W., Smyth, P., & Andersen, B. (2004). Identification of hair cycle-associated genes from time-course gene expression profile data by using replicate variance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15955–15960.
- Chatton, B., Bocco, J.L., Goetz, J., Gaire, M., Lutz, Y., & Kedinger, C. (1994). Jun and Fos heterodimerize with ATFα, a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene*, 9:375–385.
- Chen, M.-J., Dumitrache, L. C., Wangsa, D., Ma, S.-M., Padilla-Nash, H., Ried, T., & Hasty, P. (2007b). Cisplatin depletes TREX2 and causes Robertsonian translocations as seen in TREX2 knockout cells. *Cancer Research*, 67(19):9077–83.
- Chen, M.J., Ma, S.M., Dumitrache, L. C., & Hasty, P. (2007a). Biochemical and cellular characteristics of the 3'→5' exonuclease TREX2. *Nucleic Acids Res*, 35:2682–2694.
- Choi, Y. S., Chakrabarti, R., Escamilla-Hernandez, R., & Sinha, S. (2009). E1F5 conditional knockout mice reveal its role as a master regulator in mammary alveolar development: failure of Stat5 activation and functional differentiation in the absence of E1F5. *Developmental Biology*, 329(2):227–41.
- Choi, Y.S., Cheng, J., Segre, J., & Sinha, S. (2008). Generation and analysis of E1F5-LacZ mouse: unique and dynamic expression of E1F5 (ESE-2) in the inner root sheath of cycling hair follicles. *Histochem. Cell Biol*, 129:85–94.
- Chowdhary, R. (2006). A bayesian system for modeling promoter structure: a case of study of histone promoters. Ph.D. Thesis, National University of Singapore, 86 pp.
- Christmann, M., Fritz, G., & Kaina, B. (2007). Induction of DNA repair genes in mammalian cells in response to genotoxic stress. *En: Lankenau, D.H. (ed.). Genome Integrity, Facets and perspectives. - Springer, Berlín, 383-398pp.*
- Crish, J. F., Gopalakrishnan, R., Bone, F., Gilliam, A. C., & Eckert, R. L. (2006). The distal and proximal regulatory regions of the involucrin gene promoter have distinct functions and are required for in vivo involucrin expression. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(2):305–14.
- Dai, X., & Segre, J. A. (2004). Transcriptional control of epidermal specification and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 14:485–491.
- de Silva, U., Perrino, F.W., & Hollis, T. (2009). DNA binding induces active site conformational change in the human TREX2 3'-exonuclease. *Nucleic Acid Res*, 37(7):2411–7.
- Deaton, M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25:1010–1022.
- Dexheimer, T. S. (2013). Capítulo 2: DNA repair pathways and mechanisms. *En: Mathews, L. A., Cabarcas, S. M., & Hurt, E. (Eds.). DNA repair of cancer stem cells. Springer, Holanda, 19-32 pp.*

- Di Russo, N. V., Estrin, D. A., Martí, M. A., & Roitberg, A. E. (2012). pH-Dependent Conformational Changes in Proteins and Their Effect on Experimental pK_s: The Case of Nitrophorin 4. *PLoS Comput Biol*, (11):e1002761.
- DiSepio, D., Jones, A., Longley, M.A., Bundman, D., Rothnagel, J.A., & Roop, D. R. (1995). The proximal promoter of the mouse loricrin gene contains a functional AP-1 element and directs keratinocyte-specific but not differentiation-specific expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(18):10792-10799.
- Donnison, M., Beaton, A., Davey, H. W., Broadhurst, R., L'Huillier, P., & Pfeffer, P. L. (2005). Loss of the extraembryonic ectoderm in Elf5 mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development* 132(10):2299–308.
- Dumitrache, L.C., Hu, L., & Hastay, P. (2009). TREX2 Exonuclease Defective Cells Exhibit Double-Strand Breaks and Chromosomal Fragments but Not Robertsonian Translocations. *Mutat Res*, 662(1-2):84–87.
- Eckert, R. L., & Welter, J. F. (1996). Transcription factor regulation of epidermal keratinocyte gene expression. *Molecular Biology Reports*, 23(1):59-70.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Banks, E. B., & Welter, J. F. (1997). The epidermis: Genes on—genes off. *J Invest Dermatol*, 109(4):501–509.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F., et al. (2004). Regulation of involucrin gene expression. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(1):13–22.
- Eckert, R. L., Adhikary, G., Balasubramanian, S., Rorke, E. A., Vemuri, M. C., Boucher, S. E., Bickenbach, J. R., & Kerr, C. (2013a). Biochemistry of epidermal stem cells. *Biochim Biophys Acta*, 1830(2):2427-2434.
- Eckert, R. L., Adhikary, G., Young, C. A., Jans, R., Crish, J. F., Xu, W., & (2013b). AP1 transcription factors in epidermal differentiation and skin cancer. *Journal of skin cancer*. ID 537028, 1-9.
- Eckhart, L., Fischer, H., Barken, K.B., Tolker-Nielsen, T., & Tschachler, E. (2007). DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br J Dermatol*, 156: 1342-1345.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., & Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12): 3471-3480.
- ECR Browser. Evolutionary Conservation of Genomes, [en línea]. Dirección URL: <http://ecrbrowser.dcode.org/> [Consulta: 18 Marzo 2012].
- Eferl, R., Zenz, R., Theussl, H., & Wagner, E. F. (n.d.). Simultaneous Generation of fra -2 Conditional and fra -2 Knock-Out Mice, *Genesis*, 451(2007):447–451.
- Ensembl. The Ensembl Project, [en línea]. Dirección URL: <http://www.ensembl.org/index.html> [Consulta: 20 Febrero 2012].
- Faus, I., Hsu, H. J. & Fuchs, E. (1994). Oct-6: a regulator of keratinocyte gene expression in stratified squamous epithelia. *Mol. Cell. Biol*, 14(5):3263–3275.
- Feldman, R. J., Sementchenko, V. I., & Watson, D. K. (2003). The epithelial-specific Ets factors occupy a unique position in defining epithelial proliferation, differentiation and carcinogenesis. *Anticancer Res*, 23:2125–2131.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surrallés, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., et al. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1):125-32.
- Fijalkowska, I. J., & Schaaper, R.M. (1996). Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli* dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. *Proc Natl Acad Sci*, 93(7):2856-61.
- Fischer, H., Eckhart, L., Mildner, M., Jaeger, K., Buchberger, M., Ghannadan, M., & Tschachler, E. (2007). DNase1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation. *J Invest Dermatol*, 117: 24-30.
- Fischer, H., Szabo, S., Scherz, J., Jaeger, K., Rossiter, H., Buchberger, M., Ghannadan, M. et al. (2011b). Essential role of the keratinocyte-specific endonuclease DNase1L2 in the removal of nuclear DNA from hair and nails. *J Invest Dermatol*, 131: 1208-1215.
- Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A. et al. (1998). Impaired Long-Term Memory and NR2A-Type NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Mice - Lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci*, 23(27):9116–9122.
- Friend, H.T., & Watson, C. J. (2013). Elf5-breast cancer's little helper. *Breast Cancer Res*, 15(2):307.

- Friedberg, E. C., & L. B. Meira. (2004). Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage. *DNA Repair*, 3: 1617-1638.
- Friedberg, E. C. (2008). A brief history of the DNA repair field. *Cell Research*. 18:3-7.
- Fuchs, E., & Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, 3(3):199-209.
- Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T., & Uchi, H. (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res*, 306:769-779.
- Genomatix [en línea]. Dirección URL: <http://www.genomatix.de> [Consulta: 15 Enero 2012].
- Goldsby, R.E., Lawrence, N.A., Hays, L.E., Olmsted, E.A., Chen, X., Singh, M., & Preston, B.D. (2001). Defective DNA polymerase-delta proofreading causes cancer susceptibility in mice. *Nat Med*, 7(6):638-639.
- Goldsby, R. E., Hays, L. E., Chen, X., Olmsted, E. A., Slayton, W. B., Spangrude, G. J., & Preston, B. D. (2002). High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading. *Proc Natl Acad Sci*, 99(24):155560-65.
- Grieves, J. L., Fye, J. M., Harvey, S., Grayson, J. M., Hollis, T., & Perrino, F. W. (2015). Exonuclease TREX1 degrades double-stranded DNA to prevent spontaneous lupus-like inflammatory disease. *PNAS*, 112(16):5117-5122.
- Guinea-Viniegra, J., Zenz, R., Scheuch, H., Hnisz, D., Holmann, M., Bakiri, L., Schonthaler, H.B *et al.* (2009). TNFalpha shedding and epidermal inflammation are controlled by Jun proteins. *Genes & Development*, 23(22):2663-74.
- Guo-Min, L., Chen, D. J., Mitra, S., & Turchi, J. J. (2008). A special issue on DNA damage responses and genome maintenance. *Cell Research*, 18:1-2.
- Han, B., Rorke, E. A, Adhikary, G., Chew, Y. C., Xu, W., & Eckert, R. L. (2012). Suppression of AP1 transcription factor function in keratinocyte suppresses differentiation. *PLoS One*, 7(5):e36941.
- Hardison, R. C., & Taylor, J. (2012). Genomic approaches towards finding cis-regulatory modules in animals. *Nature Reviews. Genetics*, 13(7):469-83.
- Hasty, P., & Montagna, C. (2014). Chromosomal rearrangements in cancer. Detection and potential causal mechanisms. *Molecular and Cellular Oncology*, 1(1): e29904.
- He, J., Pan, Y., Hu, J., Albarracin, C., Wu, Y., & Dai, J. L. (2007). Profile of Ets gene expression in human breast carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 6(1):76-82.
- Hebbar, P.B., & Archer, T.K. (2008). Altered histone H1 stoichiometry and an absence of nucleosome positioning on transfected DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8):4595-4601.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., & Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8(3):193-204.
- Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 117(Pt25):5965-73.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411:366-374.
- Hohl, D., Ruf, Olano, B., de Viragh, P. A., Huber, M., Detrisac, C.J., Schnyder, U. W., & Roop, D.R. (1993). Expression patterns of lorocrin in various species and tissues. *Differentiation*, 54(1): 25-34.
- Hollenhorst, P. C., McIntosh, L. P., & Graves, B. J. (2011). Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual Review of Biochemistry*, 80:437-71.
- Höss, M., Robins, P., Naven, T. J., Pappin, D. J., Sgouros, J., & Lindahl, T. (1999). A human DNA editing - enzyme homologous to *Escherichia coli* DnaQ/MutD protein. *EMBO J*, 18:3868-3875.
- House, J. S., Zhu, S., Ranjan, R., Linder, K., & Smart, R. C. (2010) C/EBP alpha and C/EBP beta are required for Sebocyte differentiation and stratified squamous differentiation in adult mouse skin. *PLoS One*, 5:e9837.
- Htike, Z. Z., & Win, S. L. (2013). Recognition of Promoters in DNA Sequences Using Weightily Averaged One-dependence Estimators. *Procedia Computer Science*, 23:60-67.
- Hu, L., Kim, T. M., Son, M. Y., Kim, S.-A., Holland, C. L., Tateishi, S., *et al.* (2013). Two replication fork maintenance pathways fuse inverted repeats to rearrange chromosomes. *Nature*, 501(7468):569-72.
- Huen, M., & J. Chen. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Research*, 18:8-16.

- Iguchi-Arigo, S.M., & Schaffner W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev*, 3(5): 612-9.
- Jang, S-I., & Steinert, P. M. (2002). Loricrin expression in cultured human keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP1, and AP2 families. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44): 42268–79.
- Jaspar. The Jaspar Database, [en línea]. Dirección URL: <http://jaspar.genereg.net/> [Consulta: 12 Mayo - 2014].
- Jia, Q., & Nash, J. F. (2010). Pathology of Aging skin. En: Farage, M. A., Miller, K. W., & Maibach, H. I. (Ed.). Textbook of Aging Skin. *Springer, USA*, 277-290pp.
- Jochum, W., Passegue, E. & Wagner, E. F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 20(19):2401–2412.
- Kas, K., Finger, E., Grall, F., Gu, X., Akbarali, Y., Boltax, J., Weiss, A., Oettgen, P., Kapeller, R., & Libermann, T. A. (2000). ESE-3, a novel member of an epithelium-specific ets transcription factor subfamily, demonstrates different target gene specificity from ESE-1. *J Biol Chem*, 275(4):2986–2998.
- Kastan, M. B. & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015):316-23.
- Kavanagh, D., Spitzer, D., Kothari, P. H., Shaikh, A., Liszewski, M. K., Richards, A., & Atkinson, J. P. (2008). New roles for the major human 3'-5' exonuclease TREX1 in human disease. *Cell Cycle*, 7(12):1718–25.
- Kawachi, Y., Ishitsuka, Y., Maruyama, H., Fujisawa, Y., Furuta, J., Nakamura, Y., & Otsuka, F. (2012). GATA-3 regulates differentiation-specific loricrin gene expression in keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 21(11):859–64.
- Khare, V., & Eckert, K. A. (2002). The proofreading 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. *Mutat Res*, 510 (1-2):45-54.
- Khavari, P. A. (2006). Modelling cancer in human skin tissue. *Nature Reviews, Cancer*, 6(4):270–80.
- Koch, P.J, de Viragh, P.A., Scharer, E., Bundman, D., Longley, M.A., Bickenbach, J., Kawachi, Y., *et al.* (2002). Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol*, 151(2):389-400.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128 (4):693-705
- Weber, C.M. & Henikoff, S. (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev*, 28(7):672-82.
- Kulesz-Martin, M., Kilkenny, A. E., Holbrook, K. A., Digernes, V., & Yuspa, S. H. (1983). Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation. - *Carcinogenesis*, 4(11):1367-77.
- Kunkel, T. A. (1988). Exonucleolytic proofreading. *Cell*, 53(6):837-840.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* 279:16895-8.
- Lapinskas, E. J., Palmer, J., Ricardo, S., Hertzog, P. J., Hammacher, A., & Pritchard, M. A. (2004). A major site of expression of the ets transcription factor Elf5 is epithelia of exocrine glands. *Histochem. Cell Biol*, 122:521–526.
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2011). Establishing, maintaining and modifying Dna methylation patterns in plants and animals. *Nature Review Genetics*, 11:204-220.
- Lee, D.Y., Yamasaki, K., Rudsil, J., Zouboulis, C.C., Park, G.T., Yang, J.M., & Gallo, R.L. (2008). Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill propionibacterium acnes. *J Invest Dermatol*, 128(7):1863-6.
- Lee-Kirsch, M. A., Gong, M., Chowdhury, D., Senenko, L., Engel, K., Lee, Y. A., de Silva, U., Bailey, S. L., Witte, T., Vyse, T. J. *et al.* (2007). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, 39:1065–1067.
- Lehtinen, D. A., Harvey, S., Mulcahy, M. J., Hollis, T., & Perrino, F. W. (2008). The TREX1 double-stranded DNA degradation activity is defective in dominant mutations associated with autoimmune disease. *J Biol Chem*, 283(46):31649-56.
- Leibel, D., Laspe, P., & Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*, 37:225-238.

- Lenhard, B., Sandelin, A., & Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature Reviews. Genetics*, 13(4):233–45.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. New York, NY: Pearson Prentice Hall.
- Li, Z., Musich, P. R., & Zou, Y. (2011). Differential damage responses in p53 proficient and deficient cells: cisplatin-induced nuclear import of XPA is independent of ATR checkpoint in p53-deficient lung cancer cells. *Int J Biochem Mol Biol*, 2(2): 138-145.
- Li, Z., Gadue, P., Chen, K., Jiao, Y., Tuteja, G., Schug, J., Li, W., Kaestner, K. (2012). Foxa2 and H2A.Z mediate nucleosome depletion during embryonic stem cell differentiation. *Cell*, 151(7):1608–1616.
- Lim, C. Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U., Kadonaga, J.T. (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev*, 18(13):1606-17.
- Lin, K. K., Chudova, D., Hatfield, G. W., Smyth, P., & Andersen, B. (2004). Identification of hair cycle-associated genes from time-course gene expression profile data by using replicate variance. *PNAS*, 101(45):15955–15960.
- Lindahl, T., Barnes, D. E., Yang, Y. G., & Robins, P. (2009) Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease. *Biochem Soc Trans*, 37:535–538
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., and Declercq, W. (2009). Celldeath in the skin. *Apoptosis*, 14: 549-569.
- Lowes, M. A. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130):866-73.
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*, 133(9):1463-7.
- Lyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, B., & P. L. Modrich. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*, 106:302-323.
- Manils, J., Gómez, D., Salla-martret, M., Fischer, H., Fye, J. M., Marzo, E., *et al.* (2015). Multifaceted role of TREX2 in the skin defense against UV-induced skin carcinogenesis. *Oncotarget*, 6(26):22375-96.
- Manils, J., Casas, E., Viña-Vilaseca, A., Díez-Villanueva, A., Gómez, D., Marruecos, L., Benito, C., Vavouri, T., Perrino, F.W., de Anta, J.M., & Soler, C. Exonuclease TREX2 shapes psoriatic phenotype. (En revisión).
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N. R. *et al.* (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acid Res*, 41(D1):D384-52.
- Marple, T., Li, H., & Hastly, P. (2004). A genotoxin screen: rapid analysis of cellular dose-response to a wide range of agents that either damage DNA or alter genome maintenance pathways. *Mutant Res*, 554:253-266.
- Mason, P. A & Cox, L.S. (2012). The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing. *Age*, 34(6):1317-40.
- Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics Hu. Genet*, 7:29-59.
- Mathysaraja, H., & Ostrowski, M. C. (2012). Setting Snail2's pace during EMT. *Nature Cell Biology*, - 14(11):1122-1123.
- Matthews, C. P., Birkholz, A. M., Baker, A. R., Perella, C. M., Beck, G. R., Young, M. R., & Colburn, N. H. (2007). Dominant-negative activator protein 1 (TAM67) targets cyclooxygenase-2 and osteopontin under conditions in which it specifically inhibits tumorigenesis. *Cancer Research*, 67(6):2430–8.
- Maytin, E. V., Lin, J. C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P. J., & Habener, J. F. (1999). Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev. Biol.* 216(1):164–181.
- Mazur, D. J., & Perrino, F. W. (1999). Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases. *J Biol Chem*, 274:19655–19660.
- Mazur, D. J., & Perrino, F. W. (2001a). Excision of 3' termini by the Trex1 and TREX2 3'-5' exonucleases. Characterization of the recombinant proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(20):17022–9.
- Mazur, D. J., & Perrino, F. W. (2001b). Structure and expression of the TREX1 and TREX2 3'→5' exonuclease genes. *J Biol Chem*, 276:14718-14727.

- Mehic, D., Bakiri, L., Ghannadan, M., Wagner, E. F., & Tschachler, E. (2005). Fos and Jun proteins are specifically expressed during differentiation of human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 124(1):212–20.
- Messerschmidt, D. M., Knowles, B. B. & Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*, 28:812-828.
- Metzger, D. E., Xu, Y., & Shannon, J. M. (2007). E1f5 is an epithelium-specific, fibroblast growth factor-sensitive transcription factor in the embryonic lung. *Dev. Dy.*, 236:1175–1192.
- Mizuno, H., Cho, Y. Y., Ma, W. Y., Bode, A. M., & Dong, Z. (2006). Effects of MAP kinase inhibitors on epidermal growth factor-induced neoplastic transformation of human keratinocytes. *Mol Carcinog*, 45(1):1–9.
- Moravcová, M., Libra, A., Dvořáková, J., Víšková, A., Muthný, T., Vladimír, V., & Kubala, L. (2013). Modulation of keratin 1, 10 and involucrin expression as part of the complex response of the human keratinocyte cell line HaCaT to ultraviolet radiation. *Interdiscip Toxicol*, 6(4):203–208.
- Morrison, A., Johnson A. L., Johnston, L. H., & Suginoet, A. (1993). Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 12(4):1467-1473.
- Moshonov, S., Elfakess, R., Golan-Mashiach, M., Sinvani, H., & Dikstein, R. (2008). Links between core promoter and basic gene features influence gene expression. *BMC Genomics*, 9(92):1–10.
- Muller-Rover, S., Handjiski, B., Van der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I. A., Stenn, K. S., *et al.* (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol*, 117(1):3–15.
- Nakamura, Y., Kawachi, Y., Xu, X., Sakurai, H., Ishii, Y., Takahashi, T., & Otsuka, F. (2007). The combination of ubiquitous transcription factors AP-1 and Sp1 directs keratinocyte-specific and differentiation-specific gene expression in vitro. *Experimental Dermatology*, 16(2):143–50.
- Namjou, B., Kothari, P. H., Kelly, J. A., Glenn, S. B., Joshua, O., Adler, A., Alarcón-Riquelme, M. A. (2011). *Genes Immun*, 12(4):270–279
- Nandakumar, V., Vaid, M., Tollefsbol, T. O., & Katiyar, S. K. (2011). Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. *Carcinogenesis*, 32(4):597–604.
- Oettgen, P., Kas, K., Dube, A., Gu, X., Grall, F., Thamrongsak, U., Akbarali, Y., *et al.* (1999). Characterization of ESE-2, a Novel ESE-1-related Ets Transcription Factor That Is Restricted to Glandular Epithelium and Differentiated Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41):29439–29452.
- Öhman, H., and A. Vahlquist. (1994). In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Dermatol. Venereol*, 74:375–379.
- Öhman, H., & Valquist, A. (1998). The pH Gradient over the Stratum Corneum Differs in X-Linked Recessive and Autosomal Dominant Ichthyosis: A Clue to the Molecular Origin of the "Acid Skin Mantle"? *J Invest Dermatol*, 111(4):674-7.
- Okitsu, C. Y., Hsieh, J. C. F., & Hsieh, C-L. (2010). Transcriptional activity affects the H3K4me3 level and distribution in the coding region. *Mol. Cell. Biol*, 30(12): 2933-2946.
- Ong, C.-T., & Corces, V. G. (2012). Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO Reports*, 13(5), 423–30.
- Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci*, 34(9):453-63.
- Parra, D. (2007). Análisis de la expresión y de la función de la exonucleasa TREX2. Tesis Doctoral, - Universidad de Barcelona, 178pp.
- Parra, D., Manils, J., Castellana, B., Viña, A., Morán, S., Vásquez, Núria., Tarancón, G., Borràs, M., Sancho S., Benito, C., Ortega, S., & Soler, C. (2009). Increased susceptibility to skin carcinogenesis in TREX2 knockout mice. *Cancer Res*, 69 (16):6676-6684.
- Perdigoto, C. N., Valdes, V. J., Bardot, E. S., & Ezhkova, E. (2014). Epigenetic regulation of epidermal differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(2). pii: a015263.
- Perrino, F. W., Krol, A., Harvey, S., Zheng, S. L, Horita, D. A., Hollis, T., Meyersb, D. A., Isaacs, W. B., & Xu, J. (2004). Sequence variants in the 3´-5´ deoxyribonuclease TREX2: identification in a genetic screen and effects on catalysis by the recombinant proteins. *Advan. Enzyme Regul*, 44:37–49.

- Perrino, F. W., Harvey, S., Mcmillan, S., & T. Hollis. (2005). The human TREX2 3' → 5'-exonuclease structure suggests a mechanism for efficient nonprocessive DNA catalysis. *J Biol Chem*, 280(15):15212-15218.
- Perrino, F. W., de Silva, U., Harvey, S., Pryor, E. E Jr., Cole, D. W., & Hollis, T. (2008). Cooperative DNA binding and communication across the dimer interface in the TREX2 3'→5'exonuclease. *J Biol Chem*, 280(15):15212-15218.
- Phillips, T. (2008). The role of methylation in gene expression. *Nature education*, 1(1): 116.
- Pirrone, A., Hager, B., & Fleckman, P. (2005). Primary mouse keratinocyte culture. *Methods Mol Biol*, 289:3-14.
- Poumay, Y., & Pittelkow, M.R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol*, 104(2):271-276.
- Prakash, S., Johnson, R. E. & Prakash, L. (2005). Eukaryotic translation synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem*, 74:317-53.
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12):1063–1072.
- Qiao, H., & May, J. M. (2011). CpG methylation at the USF binding site mediates cell-specific transcription of human ascorbate transporter SVCT2 exon 1a. *Biochem J*, 440(1):73-84.
- Raj, D., Brash, D. E., & Grossman, D. (2006). Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol*, 126(2):243–257.
- Rao, C. V., & Yamada, H. Y. (2013). Genomic instability and colon carcinogenesis: from the perspective of genes, *Front Oncol*, 3:130.
- Rao, X., Evans J., Chae, H., Pilrose, J., Kim, S., Yan, P., Huang, R. L., et al. (2013). CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer. *Oncogene*, 32(38):4519-28.
- Ray, S. S., & Swanson, H. I. (2003) Alteration of keratinocyte differentiation and senescence by the tumor promoter dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 192(2):131–145.
- Rishi, V., Bhattacharya, P., Chatterjee, R., Rozenberg, J., Zhao, J., Glass, K., Fitzgerald, P., & Vinson, C. (2010). CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP alpha binding sites that activate some tissue-specific genes, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 107(47):20311–20316.
- Romick-Rosendale, L.E., Lui, V.W., Grandis, J.R., Wells, S.I. (2013). The Fanconi anemia pathway: repairing the link between DNA damage and squamous cell carcinoma. *Mutat Res*, 743–744:78–88.
- Rompolas, P., Mesa, K. R., & Greco, V. (2013). Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate. *Nature*, 502(7472):513-518.
- Rorke, E., Adhikary, G., Jans, R., Crish, J. F., & Eckert, R. L. (2010). AP1 Factor Inactivation in the Suprabasal Epidermis Causes Increased Epidermal Hyperproliferation and Hyperkeratosis but Reduced Carcinogen-Dependent Tumor Formation. *Oncogene*, 29(44):5873-5882.
- Rorke, E., Adhikary, G., Young, C. A., Roop, D. R., & Eckert, R. L. (2014). Suppressing AP1 Factor Signaling in the Suprabasal Epidermis Produces a Keratoderma Phenotype. *J Invest Dermatol*, 00:1-11.
- Rossi, A., Jang, S. I., Ceci, R., Steinert, P. M., & Markova, N. G. (1998). Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 110(1):34–40.
- Rostad, K., Mannelqvist, M., Halvorsen, O. J., Oyan, A. M., Bo, T. H., Stordrange, L., Olsen, S., et al. (2007). ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer. *Int J Oncol*, 30(1):19-32.
- Rozenberg, J., Rishi, V., Orosz, A., Moitra, J., Glick, A., & Vinson, C. (2009) Inhibition of CREB function in mouse epidermis reduces papilloma formation. *Mol Cancer Res*, 7:654–664.
- Rozenberg, J. M., Bhattacharya, P., Chatterjee, R., Glass, K., & Vinson, C. (2013). Combinatorial recruitment of CREB, C/EBPβ and c-Jun determines activation of promoters upon keratinocyte differentiation. *PLoS One*, 8(11):e78179.
- Rutberg, S. E., Adams, T. L., Olive, M., Alexander, N., Vinson, C., & Yuspa, S. H (1999) CRE DNA binding proteins bind to the AP-1 target sequence and suppress AP-1 transcriptional activity in mouse keratinocytes. *Oncogene*, 18(8):1569–1579

- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73:39-85.
- Santos, M., Paramio, J. M, Bravo, A., Ramirez, A., & Jorcano, J. L. (2002). The Expression of Keratin K10 in the Basal Layer of the Epidermis Inhibits Cell Proliferation and Prevents Skin Tumorigenesis*. *J Biol Chem*, 277(21): 19122–19130.
- Schmid-Wendtner, M. H., & Korting, H. C. (2006). The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. *Skin Pharmacol Physiol*, 19(6):296-302.
- Schonhaler, H. B., Huggenberger, R., K., Wculek, S., Detmar, M., & Wagner, E. F. (2009). *Proc Natl Acad Sci*, .106(50):21264–21269.
- Segre, J. A., Bauer, C. & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature Genet*, 22(4):356–360.
- Seibel, N. M., Eljouni, J., Nalaskowski, M. M., & Hampe, W. (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal Biochem*, 368(1): 95-9.
- Sementchenko, V. I., & Watson, D. K. (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*, 19(55):6533–48.
- Sen, G. L., Boxer, L. D., Webster, D. E., Bussat, R. T., Qu, K., Zarnegar, B. J., Johnston, D., Siprashvili, Z., & Khavari, P. A. (2012). ZNF750 is a p63 target gene that induces KLF4 to drive terminal epidermal differentiation. *Dev Cell*, 22(3):669-77.
- Sen, G. L., Reuter, J. A., Webster, D. E., Zhu, L., & Khavari, P. A. (2010). DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature*, 463:563–567.
- Sharma, S., De Carvalho, D. D., Jeong, S., Jones, P. A., & Liang, G. (2011). Nucleosomes Containing Methylated DNA Stabilize DNA Methyltransferases 3A/3B and Ensure Faithful Epigenetic Inheritance. *PLOS Genet*, 7(2):e1001286.
- Sharrocks, A. D. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11):827-37.
- Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4(5):E131-6.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., & Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*, 16(8):869-71.
- Shevelev, I. V., & Hübscher, U. (2002). The 3'-5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:364-376.
- Shi, G., Sohn, K. C., Choi, D. K., Kim, Y. J., Kim, S. J., Ou, B. S., Piao, Y. J., et al. (2010). Brn2 is a transcription factor regulating keratinocyte differentiation with a possible role in the pathogenesis of lichen planus. *PLoS One*, 5(10):e13216.
- Sinha, S., Degenstein, L., Copenhaver, C., & Fuchs, E. (2000). Defining the Regulatory Factors Required for Epidermal Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 20(7):2543-2555.
- Sinha, S. & Fuchs, E. (2001). Identification and dissection of an enhancer controlling epithelial gene expression in skin. *Proc. Natl Acad. Sci*, 98(5):2455–2460
- Smirnova, M., & Klein, H. L. (2003). Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutat. Res*, 532:117-35.
- Smith, C.G., Naven, M., Harris, R., Colley, J., West, H., Li, N., Liu, Y., Adams, R., Maughan, T.S., Nichols, L., Kaplan, R., Wagner, M.J., McLeod, H.L., & Cheadle, J.P. (2013). Exome resequencing identifies potential tumor-suppressor genes that predispose to colorectal cancer. *Hum Mutat*, 34:1026–1034.
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14:204–220.
- Socha, M. J., Said, N., Dai, Y., Kwong, J., Ramalingam, P., Trieu, V., Desai, N., Mok, S. C., & Motamed, K. (2009). Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia*, 11 (2):126-135.
- Spada, Haemmer, A., Kuch, D., Rothbauer, U., Schermelleh, L., Kremmer, E., Carell, T., et al. (2007). DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol*, 178(5): 565-571.
- Stransky, N., Egloff, A.M., Tward, A.D., Kostic, A.D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G.V., et al. (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science*, 333:1157–1160.

- Sundberg, J. P., Nanney, L. B., Fleckman, P., & King, L. E. (2012). Skin and Adnexa. *En: Treuting, P. M., & Dintzis, S. M. (Eds). Comparative Anatomy and Histology. A mouse and Human Atlas. Academic Press-Elsevier, San Diego-CA, 433-455 pp.*
- Sutter, C.H., Bodreddigari, S., Campion, C., Wible, R. S., Sutter, T. R. (2011) 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the expression of genes in the human epidermal differentiation complex and accelerates epidermal barrier formation. *Toxicol Sci*,124(1):128–137.
- Suzuki, M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 9:465–476.
- Switzer, C. H., Cheng, R. Y-S., Ridnour, L. A., Glynn, S. A., Ambs, S., & Wink, D. A. (2012). Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 14:R125.
- Taher, L., McGaughey, D. M., Maragh, S., Aneas, I., Bessling, S. L., Miller, W., Nobrega, M. A., McCallion, A. S, & Ovcharenko I. (2011). Genome-wide identification of conserved regulatory function in diverged sequences. *Genome Res*, 21(7):1139-49.
- Tang, H. L., Tang, H. M., Mak, K. H., Hu, S., Wang, S. S., Wong, K. M., Wong, C. S. T. *et al.* (2012). Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Molecular Biology of the Cell*, 23(12):2240–52.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutat Res*, 705(1):60-7.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E. & Bohlooly-Y, M. *et al.* (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429(6990):417-23.
- Tummala, R., & Sinha, S. (2006). Differentiation-specific transcriptional regulation of the *ESE-2* gene by a novel keratinocyte-restricted factor. *J. Cell. Biochem*, 97:766–781.
- Umek, R.M., Friedman, A. D., & McKnight, S.L. (1991). CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*, 251(4991):288-92.
- Venkatesh, S. & Workman, J.L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(3):178-89.
- Vicentini, F., He, T., Shao, Y., Fonseca, M., Verri, W. A. Jr., Fisher, G. J., & Xu, Y. (2011). Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-κB pathway. *Journal of Dermatological Science*, 61(3):162-168.
- Vinci, M. C. (2012) Sensing the Environment: Epigenetic Regulation of Gene Expression. *J Physic Chem Biophysic*, S3:001.
- Wagner, E. F., Schonhaler, H. B., Guinea-Viniegra, J., & Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nature Publishing Group*, 6(12): 704–714.
- Wang, X., Pasolli, H. A., Williams, T., & Fuchs, E. (2008). AP-2 factors act in concert with Notch to orchestrate terminal differentiation in skin epidermis. *J Cell Biol*, 183(1):37-48.
- Wang, Z., Schones, D., & Zhao, K. (2009). Characterization of human epigenomes. *Curr Opin Genet Dev*, 19(2):127–134.
- Wassermann, W. W., & Sandelin, A. (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, 5:276-287.
- Werner, T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mammalian Genome*, 10(2):168–75.
- Wischermann, K., Popp, S., Moshir, S., Scharfetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., de Grujil, F., Hartschuh, W., *et al.* (2008). UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene*, 27(31):4269-80.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291:1284-1289.
- Wu, Hao., & Zhang, Y. (2011). Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & Dev*, 25:2436-2452.
- Wurm, S., Zhang, J., Guinea-viniegra, J., Garc, F., Mun, J., Bakiri, L., Ezhkova, E., & Wagner, E. F. (2015). Terminal epidermal differentiation is regulated by the interaction of Fra-2 / AP-1 with Ezh2 and ERK1 / 2. *Genes and Development*, 29:144–156.

- Wyss, A.B., Herring, A.H., Avery, C.L., Weissler, M.C., Bensen, J.T., Barnholtz-Sloan, J.S., Funkhouser, W.K., Olshan, A.F. (2013). Single-nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes, cigarette smoking, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22:1428–1445.
- Yamauchi, M., Ogata, Y., Kim, R. H., Li, J. J., Freedman, L. P., & Sodek, J. (1996). AP-1 regulation of the rat bone sialoprotein gene transcription is mediated through a TPA response element within a glucocorticoid response unit in the gene promoter. *Matrix Biol*, 15(2):119–130.
- Yang, Y-G., Lindahl, T., & Barnes, E. D. (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*, 30(5): 873-86.
- Yilmaz, A., & Grotewold, E. (2010). Components and Mechanisms of Regulation of Gene Expression. En: Ladunga , I. (Ed.). Computational Biology of Transcription Factor Binding. *Humana Press*, Lincoln, 23-32pp.
- You, H-L., Eng, H-L., Hsu, S-F., Chen, C-M., Ye, T-C., Liao, W-T., Huang, M-Y., *et al.* (2007). A PKC-sp1 signaling pathway induces early differentiation of human keratinocytes through upregulation of *TSG101*. *Cellular Signalling*, 19(6):1201-1211.
- Yu, X., Lin, J., Zack, D. J., & Qian, J. (2006). Computational analysis of tissue-specific combinatorial gene regulation: predicting interaction between transcription factors in human tissues. *Nucleic Acids Research*, 34(17):4925–36.
- Zenz, R., Eferl, R., Kenner, L., Florin, L., Hummerich, L., Mehic, D., Scheuch, H., Angel, P., Tschachler, E., & Wagner, E. F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthrosis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature*, 437(7057):369-75.
- Zenz, R., & Wagner, E. F. (2006). Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7):1043–9.
- Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonthaler, H. B., Kenner, L., *et al.* (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Research & Therapy*, 10(1): 1-10.
- Zhou, J., Chehab, R., Tkalcevic, J., Naylor, M. J., Harris, J., Wilson, T. J., Tsao, S., *et al.* (2005). E1f5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *EMBO J*, 24(3):635–644.
- Zhuang, Z., Johnson, R. E., Haracska, L., Prakash, L., Prakash, S. & Benkovic, S. J. (2008). Regulation of polymerase exchange between Pol η and Pol δ by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 105:5361-6.
- Zouboulis, C.C., Seltmann, H., Neitzel, H., and Orfanos, C.E. (1999). Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol*, 113: 1011-1020.
- Zouboulis, C.C. (2004). The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Hormones*, 3(1): 9-26.

7. ANEXOS

A. Primers

Se indica la secuencia de los primers *forward* (*fw*) y *reverse* (*re*) 3'-5'.

I. Primers utilizados para la secuenciación del gen *TREX2*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
AF1 <i>fw</i>	ACACTCCCACCATCCTTTTG
AF2 <i>fw</i>	CTTAGGGTCCTGTGCGAGAC
AF3 <i>fw</i>	GGGACTCCTCTTGGTACCT
AR1 <i>re</i>	TCGGGAGATGCTATCTGCTT
AR2 <i>re</i>	GTCTGGCACCTGGCTCCT
AR3 <i>re</i>	CCGCCAAGATGACAGGAG
BF1 <i>fw</i>	CCAGCAGCCACTGTTAGGTG
BF2 <i>fw</i>	CCCAGGCCTCATTGTTGG
BF3 <i>fw</i>	GCCTGCCTTTTCTGTTCACT
BF4 <i>fw</i>	AGGGCCCATCTGCCTTGT
DR2 <i>re</i>	CACTGTCCATGGCACAG
BR2 <i>re</i>	CCATCAAAGCCAGCCTTC
BR3 <i>re</i>	AGAGGCAGAGGCAGCTCAG
BR4 <i>re</i>	CCCCGAGCTTTCACAGG

II. Primers utilizados para el análisis de metilación del promotor de *Trex2* murino.

Gen <i>TREX2</i> murino	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'	Secuencia <i>nested</i> <i>reverse</i> 5'-3
Región I	TGTTTAGTAGG	AAATCATAATC	TTTGTTAGGG
	TGATAGGAG	AAAACCATT	GGAGGATGG
Región II	AGTATGGGGGA	TTACCAACCCC	TGGTTAGGT
	GGTATTGG	ACCACACCA	GGAGGTTA

III. Primers utilizados para el análisis de metilación del promotor de *Trex2* humano.

Gen <i>TREX2</i> murino	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'	Secuencia <i>nested</i> <i>reverse</i> 5'-3
Región I	TGTTTAGTAGG	AAATCATAAT	TTTGTTAGGG
	TGATAGGAG	CAAACCATT	GGAGGATGG
Región II	AGTATGGGGGA	TTACCAACCCC	TGGTTAGGT
	GGTATTGG	ACCACACCA	GGAGGTTA
Región III	GTAGGGGATAG	ACACAACCCCT	AAGAGTGAGG
	GGGAGATGAA	CACCTACC	GTAGAGTAG

IV. *Primers* utilizados para las reacciones de secuenciación.

Para la secuenciación de los productos de PCR subclonados en el vector pSTBluel se utilizaron los cebadores comerciales SP6 y T7.

Nombre	Secuencia 5'-3'
SP6	TATGTGTCACCTAAAT
T7	TAATACGACTCACTATA

V. *Primers* utilizados para el clonaje del promotor murino de *Trex2*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
-1633 <i>fw</i>	GGTGCTAGCACCCACTGGAG
-487 <i>fw</i>	GTAGGTGCTTCTGCTACTCC
-373 <i>fw</i>	GTCCTGGCATAGGGCTAA
-260 <i>fw</i>	CTCTGACTTCCTCCTGCCTGT
-212 <i>fw</i>	GTGCTCATCACTACCCGGAAGC
-177 <i>fw</i>	GAGCCTACTTCTCAGTCT
-138 <i>fw</i>	TGGTGGCTGCAAGCTCAT
-109 <i>fw</i>	AAGCAAGCCGGCCGCACAG
-73 <i>fw</i>	CTCCTGGTTGCCCAACTG
+48 <i>re</i>	CTGGGGCGGGCTTCAGCTGGC
+663 <i>re</i>	GAGGCCTAGAGCTGCCAGAA

VI. *Primers* utilizados para la mutagénesis dirigida.

La letra m se refiere a -mutado- y va seguida del nombre de la caja mutada.

Constructo mutado	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'
<i>Trex2</i> mETS	ACGGTGCTCATCACTCACCTACGG CCTGTGTGCAGTCAGAGC	GCTCTGACTGCACACAGGCCGTA GGTGAGTGATGAGCACCCGT
<i>Trex2</i> mCREB	GACACATTCCTTCGGCTCGCTCAG GTGCTCATCACTACCCGG	CCGGTGAGTGATGAGCACCTGAG CGAGCCGAAGGAATGTGTC
<i>Trex2</i> mAP1	CGGTGCTCATCATGAACCGGAA GCCTGTGTGCAGTCAGAG	CTCTGACTGCACACAGGCTCCG GTTTCATGATGAGCACCG
<i>Trex2</i> mETS/AP1	CGTGACGGTGCTCATCATGAACCT ACGGCCTGTGTGCAGTCAGAGCC	GGCTCTGACTGCACACAGGCCGT AGGTTTCATGATGAGCACCCGTACG

VII. *Primers* utilizados para la amplificación de los extremos 5' y 3' (RACE) de *Trex2*.

Los adaptadores corresponden a los oligonucleótidos sintéticos ligados en los extremos 5' o 3' de los mRNA's. Los oligos externo e interno en *forward* reconocen la secuencia del adaptador sintético en 5' y los oligos externo e interno en *reverse* reconocen el adaptador sintético en 3'.

Uso	Nombre	Secuencia		
5' RACE	adaptador en 5'	5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3' (44 bases)		
3' RACE	adaptador en 3'	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₄ -3' (60 bases)		
5' RACE humano	<i>primer</i> externo adaptador en <i>fw</i>	5'-CGACTGGAGCA CGAGGACACTGA -3'	<i>primer</i> externo <i>Trex2</i> en <i>re</i>	5'-GTGAAGGGGC GCTCCGGGCACAT -3'
	<i>primer</i> interno adaptador en <i>fw</i>	5'-GGACTGACATGGA CTGAAGGAGTAGAAA-3'	<i>primer</i> interno <i>Trex2</i> en <i>re</i>	5'-TGTCAGGAC CCGGGGCAATACTA-3'
3' RACE humano	<i>primer</i> externo adaptador en <i>re</i>	5'-GCTGTCAACGATA CGCTACGTAACG-3'	<i>primer</i> externo <i>Trex2</i> en <i>fw</i>	5'-GCAGCCTCTTC CACCGCTAC -3'
	<i>primer</i> interno adaptador en <i>re</i>	5'-CGCTACGTAAC GGCATGACAGTG -3'	<i>primer</i> interno <i>Trex2</i> en <i>fw</i>	5'-TGCTCCTGATCT TCCTGCAC -3'
5' RACE ratón	<i>primer</i> externo adaptador en <i>fw</i>	5'-CGACTGGAGCA CGAGGACACTGA -3'	<i>primer</i> externo <i>Trex2</i> en <i>re</i>	5'-CGCTCCGGGC ACATGCACAGTGT -3'
	<i>primer</i> interno adaptador en <i>fw</i>	5'-GGACTGACATGGA CTGAAGGAGTAGAAA-3'	<i>primer</i> interno <i>Trex2</i> en <i>re</i>	5'-GGGCAGCACCA AGGAACCAGAATC -3'
3' RACE ratón	<i>primer</i> externo adaptador en <i>re</i>	5'-GCTGTCAACGATA CGCTACGTAACG-3'	<i>primer</i> externo <i>Trex2</i> en <i>fw</i>	5'-TCTCTCCACCG CTACTTCC -3'
	<i>primer</i> interno adaptador en <i>re</i>	5'-CGCTACGTAAC GGCATGACAGTG -3'	<i>primer</i> interno <i>Trex2</i> en <i>fw</i>	5'-TCTGATCTTCT GCATCGTGC -3'

VIII. *Primers* utilizados para el subclonaje del cDNA de las isoformas de TREX2 humanas.

Para la amplificación del cDNA de las isoformas de TREX2 humanas se introdujeron sitios de restricción para Sall (GTCGAC) a 5' y XhoI (CTCGAG) a 3'. Estos sitios se encuentran señalados en **negrita** al inicio de la secuencia de cada primer. Se indica el tamaño del fragmento amplificado.

Isoforma	Amplicón	Secuencia de expresión	
		Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'
L1	837 pb	GTCGACCACAGGATGGGGCGGGC	CTCGAGTGGTGCTCAGGCCTCCAG
S1	708 pb	GTCGACACCATGTCCGAGGCACC	CTCGAGTGGTGCTCAGGCCTCCAG
N-terminal	129 pb	GTCGACCACAGGATGGGGCGGGC	CTCGAGGGTGATGTTCCAC

IX. *Primers* usados en la transcripción reversa para los análisis de expresión de los transcritos L1 y S de humano.

Para apreciar la expresión de los dos transcritos humanos evaluados se usó un *primer* específico en *forward* tanto para TREX2 como para HPRT, en la reacción de transcripción reversa.

Gen	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'
hTREX2	GCAATACTAGGGCACCAGAC
hHPRT	GAAGTCTGACAAAGATTCACTG

X. *Primers* utilizados en la qPCR.

Ensayos de expresión			
Gen	Amplicón	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'
Humano			
c-Fos	165 pb	TCCGGGAGATCTCATTGAGC	CAGGCTGGCTTTCTACTTGC
c-Jun	152 pb	CGCCTTCCACGGAGAAGAA	GCCTGTGCGAACTGGTATG
JunB	151 pb	TGGCAGCCTGTCTCTACAC	TGATCCCTGACCCGAAAAGT
K10	101 pb	GGAGATAGAACTACAGTCCC	GCCTGAATCTGTGAGAGCTG
Ratón			
c-Fos	152 pb	TGAAGAGGAAGAGAAACGG	TGGCAATCTCAGTCTGCAAC
c-Jun	172 pb	CCTACGGCTACAGTAACCCT	TGGATGATCAGGCGCTCC
JunB	159 pb	CAAACCTCTGAAACCGAGCC	GAAGAGGCGAGCTTGAGAGA
K10	139 pb	GTACGAGAAGCATGGCAAC	GGCATTGTCAATCTGCAGC
Involucrina	139 pb	TCTCCCTCCTGTGAGTTTG	CTTGTTCCTGCTGGATATG
Fra-2	174 pb	CGGAGGGAGAGAAACAAGC	GTGAGCCACCAACATGAACT

Promotor murino de <i>Trex2</i> (ChIP)			
Promotor	Amplificón	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'
<i>Trex2</i> -A	140 pb	CTTGACTTCCTCCTGCCTGT	ATGAGCTTGCAGCCACCA
<i>Trex2</i> -B	115 pb	GTGCTCATCACTCACCGGAAGC	ATGAGCTTGCAGCCACCA
Loricrina	116 pb	ATCCTTCCCCTGCAATCACA	GGGAAGGAGGTGATGCTGAT

XI. Primers utilizados para el subclonaje del cDNA de Elf5 de ratón.

Gen	Amplificón	Secuencia <i>forward</i> 5'-3'	Secuencia <i>reverse</i> 5'-3'
Elf5	762 pb	ATGTTGGACTCCGTAACCCATAG	TCAGAGTTTCTTCTCTGCCAC

B. SONDAS

I. Sondas utilizadas en los ensayos de qPCR.

Gen	Amplicón	Sonda
Humano		
<i>TREX2</i> (L1)	93 pb	Hs01095149_m1
<i>TREX2</i> (S, splicing 513 pb)	54 pb	Hs01095167_g1
HPRT	71 pb	Hs01003267_m1
β actina	171 pb	Hs99999903_m1
Involucrina	74 pb	Hs00902520_m1
Elf5	80 pb	Hs01063022_m1
Ratón		
<i>Trex2</i>	72 pb	Mm04210320_m1
HPRT	65 pb	Mm00446968_m1
Elf5	105 pb	Mm00468732_m1
Loricrina	91 pb	Mm01219285_m1

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y con profundo amor y convicción agradezco a mis únicos y grandes Dioses, Mis papás, Álvaro y Olga. Las personas más maravillosas que conozco y quienes me han dado la mayor de las alegrías, la libertad. No exagero cuando digo que se pasan de buenos y generosos, comprensivos y amorosos. Todo el “aguante” y las ganas de vivir intensamente se lo debo a ellos, siempre disponibles, siempre cariñosos, siempre con palabras de apoyo. Han sido muchos años ya fuera de casa y aunque los tengo “al otro lado del charco”, jamás me he sentido desamparada. Les agradezco la confianza que han decidido tener en mí, esta tesis no hubiese sido posible jamás sin su ayuda. Gracias infinitas a mis extraordinarios papás!. También tengo que agradecer a Camila, mi hermanota menor. Sin su presencia en casa y al lado de mis papis jamás habría conseguido la serenidad para seguir el camino, Camila es la parte de mí que se quedó en Colombia y hace las cosas mejor que yo. Agradezco a Cami la enorme paciencia que ha tenido por no poder tener más recuerdos juntas, le doy gracias a la gran persona que hay en ella; responsable, con carácter, inteligente y humana. Gracias por ser parte de mi súper familia!.

Quiero agradecer enormemente a Concepció Soler y Antonio Felipe la gran oportunidad que me brindaron al venir aquí. Gracias por la confianza y el apoyo ofrecido en todo momento. Muchas gracias a Concepció por haberme mostrado el apasionante mundo de la ciencia con todas sus caras, buenas y no tan buenas, y por haber guiado con constancia y dedicación mi trabajo y el de mis compañeros. Con ella he aprendido grandes virtudes como la constancia y dedicación, la perseverancia y el esfuerzo. Sin su ayuda esta tesis no habría llegado a término. Muchas gracias también a Sònia Forcales quien ha co-dirigido esta tesis y ha contribuido enormemente en la corrección del manuscrito.

A todos los grandes investigadores que han pasado por el laboratorio 4118, la Elena sin H, la Neus, la Inma, la Laura, la Mamita Mercé, la Mónica polaca, el Aitor, el Joan. Muchas gracias por su compañía, por ser excelentes compañeros y personas. Ellos hicieron los largos protocolos más amenos y las cortas comidas un espacio para reír y compartir (gracias por dejarme probar sus delicias culinarias!!). Gracias también por aguantar la BBC radio (Bogotá Beer Company radio), aunque al final creo que también les llegó a gustar. Pero hay alguien a quien agradezco con entusiasmo su presencia en el lab, y ese es Joan o Joooooooooooo. Joan fue el colega que con paciencia y una gran dosis de humor me enseñó a desenvolverme en el laboratorio como pez en el agua, también fue mi “amiga” cuando no tuve más opción y mi hermano en la vida diaria. No es fácil pasar 8 horas/día, 5 días/semana con una persona pero con Joan las horas en el lab siempre fueron divertidas y llenas de gracia. En resumen, gracias por siempre estar ahí, por tu amistad y por la fideuéa de la mama!.

He de agradecer a todas las bellas gentes de la 4ta planta de Bellvitge, quienes han aportado enormemente a la realización de este trabajo. Sin su ayuda tanto de material como de conocimiento, esta tesis tampoco hubiese sido posible. Muchas gracias a las vecinas más guapas y generosas del pasillo: la Marga, Esther, Irene, Maye, Anusha y Mercedes. Ha sido grato compartir con tan buenas vecinas. Gracias a los colegas de otros laboratorios, siempre dispuestos a compartir y ayudar con mis preguntas y peticiones: Sonia, Tanit, Alejandro, el Héctor, Fran, Helena, El Xavi, la Carla, Petra, Betta, Xavi de Cerdanyola, Fabi, Natalia, Bea, Rubén, el Dani. Mención especial a los compañeros de

cuitas y comidas de la 5ta planta: El Santi, Nuria, Ma. Isabel, Ari, Silvia, Aida, Natalia, Mercé. Nuestro acercamiento por fuerza mayor de uso de campana nos convirtió en grandes amigos y la cervecita en los chinos ayudó a dilatar problemas científicos y de la vida diaria. Antes de seguir quería agradecer a las incondicionales Natalia y Mercé, increíbles personas quienes han sido las amigas fieles que no esperaba encontrar. Y a Santi agradezco su disponibilidad, sinceridad y buen humor, siempre sacándome una sonrisa. Muchas gracias a estos Chicos!. A los grandes colegas y amigos que han pasado por los laboratorios del pasillo y han marchado: Andy, Laura, Miguel, Eddie, Tania. Gracias a ellos por los buenos momentos de los primeros años de doctorado.

Agradecimientos al tribunal de tesis por haber aceptado participar en esta lectura.

Quiero expresar mi gratitud también al estabulario de Bellvitge, a Álvaro Gimeno por haberme permitido hacer parte del equipo, a Natasha, Bea, Pilar, Loli y Puri por sus atenciones, calidad humana, su cariño y trabajo en equipo.

Gracias a todos esos compañeros que he tenido a lo largo de estos años de doctorado: compañeros de piso, de escalada, de montaña, de barbacoas, calcotadas, sardinadas etc., quienes hicieron grata la vida fuera del lab, a los que pasaron por Altimira en Cerdanyola, por Marina y el Clot en Barcelona y sobre todo muchas gracias a quienes se convirtieron en mi familia adoptiva en España: Roque y James. A James agradezco el apoyo, la tolerancia y la compañía en el camino. Gracias a Roque también por su apoyo, consejos y por haber sido un gran compañero en los viajes. Gracias también a los pablos (Pablazza y Pedro Pablo), a la Helenilla y a Sivgin por la confianza, amistad y disposición en el último año de tesis.

A mi prima-hermana Ana María debo agradecer esas valiosas visitas llenas de catarsis, exorcismos, risas y llantos, por la ayuda que siempre me ha brindado, los grandes consejos, por ser mi confidente y estar pendiente de mí, todo ese amor que me ha dado ha sido crucial para terminar este ciclo.

No puedo dejar pasar la oportunidad para decir gracias a los nuevos amigos-familia que he conocido en el último año y quienes me han brindado una amistad excepcional, sabiduría y confianza para continuar sin desfallecer; los Espinosa y la gran familia acroyogui, sin su compañía este último año de tesis habría sido un caos. Unas gracias especiales a Raúl quien ha creído en mí, me ha dado fuerzas y su mano para continuar en el camino.

Por último, agradezco a todos esos amigos y esa increíble familia que he dejado en Colombia o anda por el mundo y que siempre ha estado ahí desde la distancia brindándome soporte, ánimos y afecto. Marta, Sofi, Valen, Yoyis, Maria, Rafa, Cata, Davinchi, Dianish, Vivi, Caro, ViviO, Lala. La idea de tenerlos, aunque lejos, me ha ayudado enormemente a mantenerme firme y en equilibrio.

A todos quienes han participado de manera directa o indirecta, de este capítulo de mi vida y que he olvidado nombrar. A todos ustedes, gracias por haber sido y por haber estado.

Para terminar doy gracias a la ciudad más bonita de Catalunya, la cual se ha convertido en mi segundo hogar y además me ha traído inmensas alegrías, Gracias a Barcelona.