



EXPRESION PREFERENCIAL NEURONAL DEL GEN
HUMANO HPRT: IDENTIFICACION Y ANALISIS
DE LOS ELEMENTOS REGULADORES

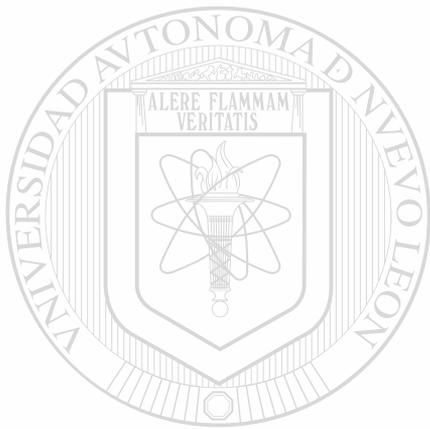
POR
DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS

TESIS PRESENTADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

MONTERREY, N. L.; MEXICO ABRIL DE 1994



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

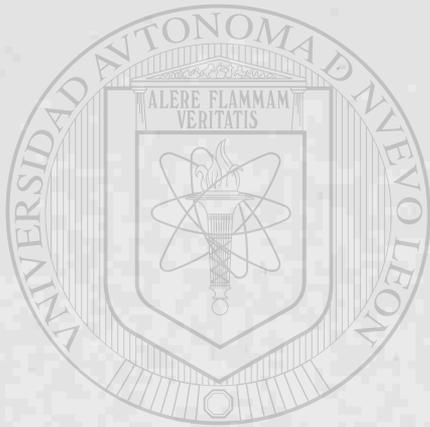
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

D.C. DIEGO ENRIQUE RINCONCLIMAS IV - 94

TD
QH440
.4
.R5
1994
c.1



1080125982



UANL

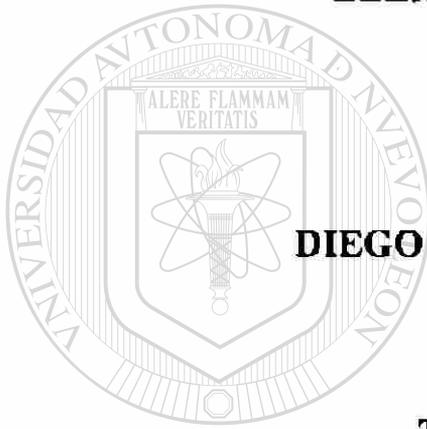
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





**EXPRESION PREFERENCIAL NEURONAL DEL GEN HUMANO
HPRT: IDENTIFICACION Y ANALISIS DE LOS
ELEMENTOS REGULADORES**



POR

DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS

TESIS PRESENTADA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

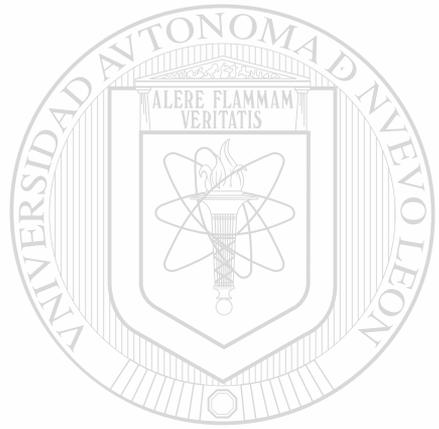
DOCTOR EN CIENCIAS

**CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA**

Monterrey, N. L., México

Abril de 1994

TD
QH440
.4
R5
1994



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**EXPRESION PREFERENCIAL NEURONAL DEL GEN HUMANO
HPRT: IDENTIFICACION Y ANALISIS DE LOS
ELEMENTOS REGULADORES**

POR

DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética



El Comité de Tesis:

**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
(Asesor)**

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

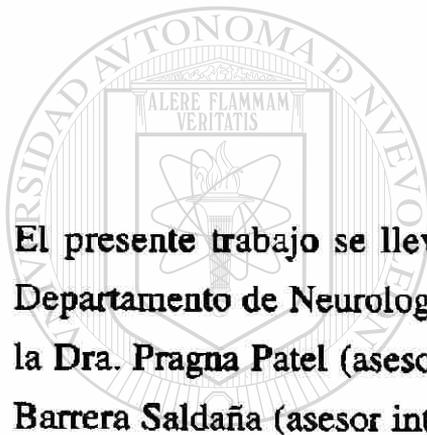
Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla

Dr. Mario César Salinas Carmona

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

Aprobó:

**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Secretario de Ciencias Básicas de la
Subdirección de Investigación y Postgrado de
la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.**



El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Genética Molecular y el Departamento de Neurología del Colegio de Medicina Baylor bajo la dirección de la Dra. Pragna Patel (asesor externo; Colegio de Medicina Baylor) y el Dr. Hugo Barrera Saldaña (asesor interno; Facultad de Medicina, UANL).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**EXPRESION PREFERENCIAL NEURONAL DEL GEN HUMANO HPRT:
IDENTIFICACION Y ANALISIS DE LOS ELEMENTOS REGULADORES.**

Derechos Reservados © 1994 por Diego Enrique Rincón Limas.

La propiedad intelectual de esta obra está protegida por la ley. Prohibida la reproducción total o parcial sin la autorización escrita de su autor.

Lic. Miriam Valdéz Valerio/ Ministerio Público Federal/ México.

Copyright © 1994 by Diego Enrique Rincón-Limas and Pragna I. Patel.

All rights reserved. No part of this dissertation may be reproduced in any

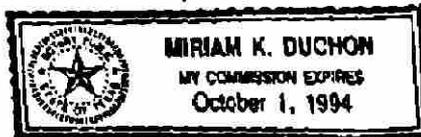
form or by any means, without written permission from the copyright owner.

Judith C. Cupper/ Attorney in law/ United States of America.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Miriam K. Duchon



INDICE

Indice	i
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de abreviaturas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
a) Regulación de la expresión de genes	2
b) Potenciadores, represores y factores de transcripción	3
c) Genética en reversa y transgénesis animal	3
d) Antecedentes particulares	4
e) Justificación	8
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	9
IV. MATERIALES Y METODOS	10
a) Origen de los reactivos	10
b) Material biológico	10
c) Métodos	11
Técnicas convencionales de ingeniería genética	11
Construcción de los vectores de expresión hHPRT-CAT	11
Procedimientos de cultivo celular	14
Transfecciones celulares con DNA plasmídico	15
Ensayos de cloranfenicol acetiltransferasa	15
Análisis de RNA por hibridación tipo Northern	15
Construcción de los vectores de expresión hHPRT-lacZ	16
Producción de ratones transgénicos	18

Identificación de ratones transgénicos	18
Detección de β -galactosidasa por el método de X-gal	20
Detección de β -galactosidasa por inmunocitoquímica	21
Análisis de RNA por hibridación <i>in situ</i>	22
Análisis de RNA por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-PCR)	23
Preparación de extractos nucleares	24
Ensayos de retardo electroforético	26
Ensayos de interferencia por metilación	27
Determinación del peso molecular de factores de transcripción por entrecruzamiento con luz UV y electroforesis bidimensional	29
V. RESULTADOS	31
Caracterización funcional <i>in vitro</i> de la region 5' del gen hHPRT	31
El promotor hHPRT es reprimido a nivel de la transcripción	31
La región entre -570 y -388 contiene un elemento represor	33
hHPRT-NE reprime la actividad de promotores heterólogos y funciona independientemente de orientación pero es dependiente de distancia	35
Un factor(es) represor interactúa específicamente con el elemento negativo del gen hHPRT	35
Generación de animales transgénicos	39
La región entre -233 y -122 funciona únicamente <i>in vitro</i>	39
El transgen RP1600N contiene secuencias nucleotídicas que dirigen la expresión hacia el sistema nervioso central	41
La expresión preferencial cerebral se manifiesta antes del nacimiento	44
La expresión del transgen RP1600N es similar a la expresión endógena del gen HPRT murino	44
Las secuencias entre -1681 y -885 son requeridas para la especificidad neuronal	47
hHPRT-NE: un elemento regulador con funciones activadoras y represoras	47
hHPRT-NE forma complejos con proteínas neuronales y ubicuas	50

El complejo I es específico de neuronas y su formación correlaciona con un incremento en la transcripción del gen HPRT	50
Caracterización bioquímica de los complejos I y II	52
Los complejos I y II se forman dentro de una región de 60 pb: el fragmento Ff	55
Las proteínas que interactúan con el fragmento Ff representan nuevos factores de transcripción	55
El complejo II es un modulador negativo de la expresión genética	58
GGAAGCC: el sitio de unión a las proteínas de los complejos I y II	58
Los complejos I y II están formados por la asociación de múltiples proteínas	60
Las proteínas de los complejos I y II contienen dominios similares de unión al DNA	63
VI. DISCUSION	65
VII. CONCLUSIONES	69
VIII. PERSPECTIVAS	71
<hr/>	
IX. PUBLICACIONES DERIVADAS	72
X. BIBLIOGRAFIA	73

DEDICATORIA

A mis padres y a mi tía Laura

quienes en su difícil lucha por una mejor vida hicieron todo lo posible por llevarme a este nivel de educación, de tal manera que pudiera tener acceso a las oportunidades que ellos nunca tuvieron.



y

U A N L

A María Laura

por ser la perspectiva y la razón de mis esfuerzos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Mi infinito agradecimiento a la Dra. Pragna Patel por haberme guiado durante cinco años de trabajo experimental. Su experiencia, su comprensión, su apoyo y sobre todo su incesante perseverancia fueron factores importantes en la culminación del presente trabajo. No existen palabras para expresar mi gratitud por todas las contribuciones que ha hecho en mi vida.

Al Dr. Hugo Barrera Saldaña, no solamente por sus enseñanzas y su apoyo para la obtención de mi grado doctoral, sino también porque hace ya algunos años creyó en mí y me dió la oportunidad de ingresar al mundo de la biología molecular.

A los demás integrantes de mi comité de tesis, Dra. Herminia Martínez Rodríguez, Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla, Dr. Mario C. Salinas Carmona y Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, por sus valiosas sugerencias y por su interés en la revisión del presente trabajo.

Al QFB René Fuentes Esquivel, Director de la Fac. de C. Químicas de la UAT, y al Ing. Humberto Filizola Haces, Rector de la misma Universidad, por su siempre incondicional apoyo.

Mi sincero agradecimiento al Centro Internacional de Biología Molecular y Celular, A.C., en particular al Dr. Guillermo Elizondo Riojas, por haberme honrado con una beca doctoral.

Al Dr. Dan Marshak, por haberme otorgado una beca de entrenamiento técnico en los laboratorios de Cold Spring Harbor en Nueva York.

A los Dres. Paul A. Overbeek, Chung Y. Hsu y Robert Geske, por su asesoría y cooperación en la producción de ratones transgénicos, estudios de hibridación *in situ* y análisis inmunocitoquímicos, respectivamente.

A los biólogos Felipe Amaya y Dave Krueger, así también como a la Dra. Laura Niño, por su asistencia en algunos experimentos.

El Dr. Luis Figuera merece un reconocimiento especial por sus críticas durante la preparación de este trabajo y su valiosa asistencia en la reproducción computarizada de algunas figuras.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez, pilar ejemplar en mi formación, por todas sus enseñanzas durante los primeros años de mi entrenamiento.

Mi profunda gratitud a la Dra. Catalina Elizondo, por su constante ayuda con los trámites de mi examen doctoral.

A mis tíos Adán y Oralia, por su gran afecto y su apoyo irrestricto.

A Gloria, Mily, José Luis y Juan, por el aliento que siempre me brindaron.

Mi perenne gratitud a mi tía Laura, por todo lo que ha hecho en beneficio de mi familia. Sus desvelos, sus fatigas, sus oraciones y sobre todo sus incontables sacrificios, estarán siempre conmigo por el resto de mi vida.

Por último y en forma muy especial a mis padres, Dr. Enrique Rincón y Sra. Leonor Limas de Rincón, a quienes debo todo lo que soy.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
cols	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Citidín trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMS	Dimetil sulfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAc	DNA complementario
dNTP	Desoxinucleósido trifosfatado
EDTA	Acido etilendiamín tetracético
g	Gramo
h	Hora
HPRT	Hipoxantín-guanín fosforibosil transferasa
hHPRT	HPRT humana
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
M	Molar
mHPRT	HPRT murina
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mCi	Milicurie
µCi	Microcurie
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
pb	Kilobases
pH	Logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
pl	Picolitro
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Lauril sulfato de sodio
UV	Ultravioleta
X	Veces la concentración
xg	Veces la gravedad
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3 indolil-β-D- galactopiranósido

LISTA DE FIGURAS

Frontispicio #	Pag.	Título
1	6	Estructura anatómica de los genes HPRT humano y murino.
2	13	Estructura anatómica de los vectores de expresión hHPRT-CAT.
3	17	Estructura anatómica de los vectores hHPRT- <i>lacZ</i> .
4	32	Análisis funcional de la región 5' del gen hHPRT.
5	34	Detección de transcritos para CAT y hGH en células cotransfectadas con los vectores hHPRT-CAT y pAVE1hGH.
6	34	Efecto del elemento negativo sobre la actividad del promotor hHPRT.
7	36	Efecto del elemento negativo sobre la actividad de promotores heterólogos.
8	37	Desrepresión del promotor del gen hHPRT por ensayos de competencia <i>in vitro</i> .
9	38	Interacción específica de un factor represor con el elemento negativo del gen hHPRT.
10	42	Distribución de la expresión del gen <i>lacZ</i> en cerebro de ratones transgénicos portadores de la construcción RP1600N.
11	43	Análisis de la expresión de los genes <i>lacZ</i> y HPRT en cerebro de ratones transgénicos RP1600N.
12	45	Análisis de la expresión de β -galactosidasa en ratones transgénicos durante el desarrollo embrionario.
13	46	Análisis transcripcional de los genes <i>lacZ</i> y mHPRT en ratones transgénicos portadores de la construcción RP1600N.

14	48	Detección de β -galactosidasa en el SNC de ratones transgénicos portadores de diferentes cartuchos hHPRT- <i>lacZ</i> .
15	49	Expresión aberrante del gen <i>lacZ</i> en ratones transgénicos portadores de la construcción RP1600 Δ NE.
16	51	Detección de proteínas nucleares que se unen a la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388).
17	53	La formación del complejo I correlaciona con un incremento en la transcripción del gen HPRT durante la diferenciación neuronal.
18	54	Análisis bioquímico de las proteínas que interactúan con la secuencia hHPRT-NE.
19	56	Localización de las regiones de unión a las proteínas dentro de la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388).
20	57	Ensayos de competencia con oligonucleótidos que contienen secuencias de reconocimiento para diversos factores de transcripción.
21	59	Análisis funcional del fragmento Ff en cultivo celular.
22	61	Identificación de los sitios de unión a las proteínas mediante ensayos de interferencia por metilación ("footprinting").
23	62	Electroforesis bidimensional de los factores nucleares que se unen al heptámero GGAAGCC.
24	64	Análisis proteolítico de los complejos I y II.

LISTA DE TABLAS

Frontispicio	#	Pag.	Título
	1	40	Generación y análisis de ratones transgénicos.

I. RESUMEN

La enzima hipoxantín-guanín fosforibosil transferasa (HPRT) cataliza la conversión de hipoxantina y guanina a sus respectivos 5'-mononucleótidos, jugando un papel muy importante en el salvamento metabólico de las purinas. Una deficiencia total de dicha enzima produce en humanos el síndrome de Lesch-Nyhan, un desorden neurológico fatal caracterizado por retraso mental, espasticidad, hiperuricemia y un compulsivo comportamiento automutilante. La enzima HPRT es expresada constitutivamente a niveles basales en todos los tejidos, excepto en partes del sistema nervioso central donde, por causas desconocidas, es expresada a niveles comparativamente más elevados.

Para elucidar los mecanismos moleculares que regulan la expresión preferencial neuronal del gen humano HPRT, investigamos el papel de la región que flanquea el extremo 5' de la unidad transcripcional en cultivo celular y animales transgénicos. Encontramos que la secuencia de -1681 a -122 contiene los elementos reguladores necesarios para dirigir altos niveles de expresión en los ganglios basales, corteza cerebral, hipocampo y algunas otras estructuras del cerebro anterior. Además, identificamos un elemento regulador de 182 pb (hHPRT-NE; -570 a -388), el cual no solamente es requerido para conferir altos niveles de expresión neuronal, sino también para reprimir la transcripción en células no neuronales. Otra región importante para la especificidad neuronal es la secuencia de -1681 a -885. Dicha secuencia parece actuar sinérgicamente con la región hHPRT-NE para conferir niveles elevados de expresión en el sistema nervioso central (SNC). Descubrimos también que la secuencia hHPRT-NE interactúa con factores de transcripción neuronales y ubicuos. Los factores neuronales son responsables de activar el gen HPRT en el SNC, mientras que los ubicuos son responsables de reprimir la transcripción en células no neuronales. Interesantemente, los dos tipos de factores interactúan con una misma secuencia nucleotídica (-483 a -477), la cual parece funcionar como un "interruptor" biológico para modular la expresión preferencial. En conjunto, estos datos proporcionan las primeras evidencias moleculares para explicar la elevada expresión del gen HPRT en el cerebro. Esta información será de gran valor en lo que se refiere al conocimiento de la disfunción neurológica que ocurre en el síndrome de Lesch-Nyhan y probablemente ofrecerá nuevos enfoques para la terapia génica de esta devastadora enfermedad.

II. INTRODUCCION

a) Regulación de la expresión de genes

El crecimiento y la diferenciación celular, así como la respuesta de la célula a estímulos químicos o ambientales son procesos cuidadosamente regulados que cuando se alteran pueden conducir a procesos patológicos.

Desde el descubrimiento de que todas las células diferenciadas en un organismo multicelular contienen la misma información genética, se han generado intensos esfuerzos de investigación para descifrar cómo es que una determinada célula se programa para adoptar un fenotipo específico, lo cual implica determinar, a nivel molecular, cómo es que se expresa selectivamente un subconjunto de genes del total de su genoma. Dichos esfuerzos han revelado que la activación preferencial y la represión selectiva de genes específicos son los principales determinantes del desarrollo y especialización funcional de tejidos y órganos específicos (41,44,62). Casi cada paso en la trayectoria del flujo de información un gen a una proteína está sujeto a una diversidad de mecanismos de regulación, tales como amplificación y rearrreglos de DNA, activación de la transcripción, procesamiento y degradación del RNA, eficiencia de la traducción, modificaciones postraduccionales y procesos de asociación proteica. Varios estudios han demostrado que el control de la expresión genética radica principalmente a nivel de la iniciación de la transcripción (44,50).

La regulación de la síntesis del RNA mensajero (RNAm) es un proceso bien caracterizado en organismos procariotes, sin embargo en organismos superiores dicho fenómeno apenas empieza a clarificarse. Aunque en este momento se desconocen los mecanismos y los procesos bioquímicos por los cuales las células integran instrucciones fisiológicas para producir cambios transcripcionales adecuados, es muy claro que la frecuencia de la síntesis de RNAm depende en principio de la interacción de factores proteicos con una serie de secuencias nucleotídicas específicas de cada gen (91).

b) Potenciadores, represores y factores de transcripción

La transcripción de genes eucariotes por la RNA polimerasa II es, en general, mediada por una diversidad de pequeños elementos de DNA (6-15 pb) localizados frente (5') al sitio de inicio de la transcripción de dichos genes (50). Estos elementos se han dividido en dos clases: elementos promotores, los cuales definen niveles basales de transcripción, y elementos reguladores, los cuales modulan la actividad de los elementos promotores (44). Los elementos reguladores se clasifican a su vez en elementos positivos o potenciadores, los cuales son requeridos para incrementar significativamente la transcripción, y elementos negativos o represores o silenciadores, los cuales son necesarios para apagar o reducir la actividad transcripcional. Todos estos elementos génicos representan secuencias de reconocimiento para proteínas nucleares, denominadas factores de transcripción (39), las cuales una vez que se unen al DNA pueden por sí solas o en combinación con otras proteínas incrementar o inhibir el proceso de transcripción. Dichos factores se han dividido arbitrariamente en tejido-específicos y ubicuos. Se ha demostrado que la presencia o ausencia de algunos factores en un tejido en particular correlaciona con algunas fases de la diferenciación y/o funcionamiento de tipos celulares específicos (51). Puesto que el contenido celular de los factores de transcripción es extremadamente bajo, su purificación por métodos bioquímicos convencionales ha sido prácticamente imposible, lo cual ha requerido la aplicación de técnicas de ingeniería genética (91). Esta tecnología no solamente ha permitido la clonación y purificación de diversos factores transcripcionales, sino que también ha llevado a la identificación de las regiones proteicas importantes para su función (39). A pesar de ello, el principal desafío en la actualidad es determinar cómo es que las interacciones de DNA-proteínas regulan la transcripción y cómo es que varias interacciones se integran como un todo para evocar un determinado patrón de expresión genética.

c) Genética en reversa y transgénesis

El desarrollo de métodos para clonar genes individuales ha llevado consecuentemente a la determinación de sus estructuras primarias. Sin embargo, el conocimiento de la secuencia nucleotídica de un gen no indica necesariamente cómo es que dicho gen funciona o cómo es que se regula su expresión durante el desarrollo y la diferenciación. Para ello se requiere aplicar una estrategia experimental conocida como "genética en reversa". Dicha estrategia consiste en

modificar secuencias nucleotídicas, en forma directa y en muy diversas modalidades, para posteriormente estudiar la relevancia fenotípica de dichas alteraciones, ya sea en cultivo celular o en organismos completos. Esto implica la construcción de genes que no existen en la naturaleza -genes quiméricos- en los cuales partes de un gen son fusionados con partes de otro. Generalmente, esas partes corresponden a las secuencias codificadoras de uno con las secuencias reguladoras de otro. De manera que el diseño y la utilización de estos genes híbridos representa un medio muy eficiente para identificar y caracterizar secuencias involucradas en la regulación de la transcripción. Lo anterior se lleva a cabo al ensayar la producción de RNAm o proteína a partir de los nuevos derivados genéticos, ya sea por estudios de transcripción *in vitro* o más comúnmente por transfección transitoria de células en cultivo. Por otra parte, la generación de animales transgénicos es una de las más sofisticadas y prometedoras aplicaciones de la genética en reversa, ya que permite descubrir aspectos moleculares que no pueden ser revelados en cultivo celular. Es por ello que la habilidad para alterar el genoma de un ratón mediante la introducción de DNA foráneo en su etapa de cigoto unicelular es indudablemente una de las técnicas más poderosas de la biología moderna (25). El análisis de un determinado fenotipo en ratones transgénicos ha generado valiosas aportaciones al conocimiento de la oncogénesis, del desarrollo de mamíferos, de la función del sistema inmune y de la naturaleza de varias enfermedades (55). Sin embargo, la producción de ratones transgénicos ha sido generalmente asociada con estudios de regulación genética (55), ya que el DNA transgénico es frecuentemente expresado de una manera espaciotemporal según las secuencias reguladoras presentes en el DNA introducido. Por lo tanto la producción de varios ratones transgénicos con una serie de genes quiméricos hace factible la identificación de las secuencias que favorecen la expresión de un gen en un tejido en particular. En el presente trabajo se describe la aplicación de la "retrogenética" para identificar los elementos reguladores implicados en la expresión preferencial neuronal del gen humano HPRT.

d) Antecedentes particulares

La enzima hipoxantín-guanín fosforribosil transferasa (HPRT; E.C.2.4.2.8.) interviene en uno de los primeros pasos en la vía de salvamento de las purinas hipoxantina y guanina, las cuales son requeridas como componentes de ácidos nucleicos, fuentes de energía, neurotransmisores, segundos mensajeros, y otros

cofactores necesarios para una diversidad de reacciones enzimáticas (81). Dicha enzima cataliza la condensación de 5' fosforibosil-1-pirofosfato (PP-ribosa-P) y las bases púricas hipoxantina y guanina para generar 5'-IMP y 5'-GMP, respectivamente (9).

En los seres humanos, la deficiencia de HPRT está asociada con dos entidades clínicas. Una deficiencia total de la enzima produce el síndrome de Lesch-Nyhan, un desorden neurológico incurable y mortal caracterizado clínicamente por hiperuricemia, espasticidad, corioatetosis, hiperreflexia, retraso mental y un compulsivo comportamiento automutilante (40,78). Una deficiencia parcial de HPRT está asociada con hiperuricemia, nefrolitiasis y una forma severa de artritis gotosa (31). Aproximadamente un 20% de los pacientes en este último grupo presentan anomalías neurológicas que incluyen espasticidad, ataxia cerebelar y retraso mental, pero no presentan el extraño comportamiento automutilante (81).

La enzima HPRT está presente en todas las células de mamífero como una proteína citoplásmica, soluble y no glicosilada; está constituida por 217 aminoácidos, tiene un peso molecular de 24.5 KDa y representa del 0.005 al 0.04% de la proteína total celular (81).

El gen humano HPRT ha sido asignado a la región Xq26-27, el del ratón a la banda XA6 y el de hamster a la región distal Xp (32,47,57,72). Después de lograr la obtención de los DNAC's de HPRT de esas especies, se demostró que el RNAm lo conforman aproximadamente 1600 nucleótidos (81). La comparación nucleotídica de esos DNAC's indicó que la similitud entre dichas secuencias es mayor del 95% en la región codificadora y 80% en los segmentos 5' y 3' no traducibles (81). En 1984 se demostró que los genes HPRT del ratón y del hombre están integrados por 9 exones dispersos sobre 34 y 44 Kb de DNA genómico, respectivamente (47). Las uniones entre exones e intrones son idénticas para ambas especies. La longitud de los nueve exones varía desde 18 a 593 pb en el ratón y de 18 a 637 pb en el humano (Fig. 1). La gran diferencia en tamaño entre esos genes es debida a la longitud de los intrones, los cuales varían desde 0.2 a 10.5 Kb en el genoma del ratón y de 0.17 a 13.8 Kb en el humano.

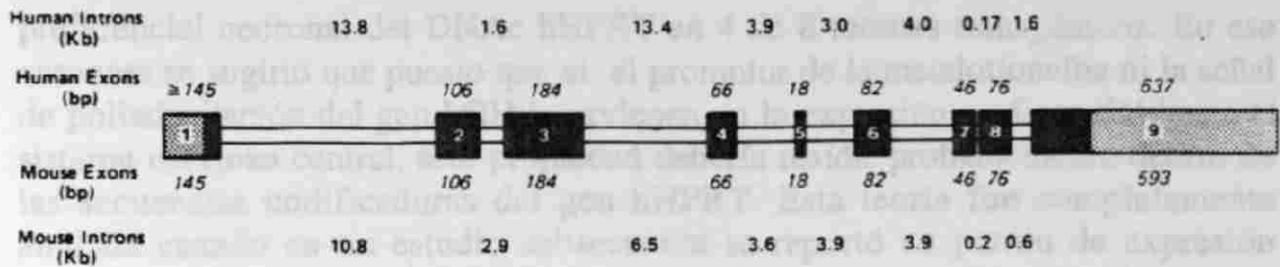


Figura 1. Estructura anatómica de los genes HPRT humano y murino. Las áreas punteadas representan las regiones 5' y 3' no traducibles mientras que las áreas negras representan las secuencias codificadoras.

El gen HPRT es constitutivamente expresado en una amplia variedad de tejidos incluyendo células en cultivo. Estudios bioquímicos sobre la distribución de HPRT en tejidos de humano, mono rhesus, rata y ratón han indicado que la mayor actividad enzimática se encuentra en el cerebro (22,35,43,48,53), dentro del cual la región de los ganglios basales exhibe los niveles más elevados (70,90). El mecanismo que promueve una mayor expresión de HPRT en el sistema nervioso central mientras mantiene un nivel constitutivo en los demás tejidos era completamente desconocido hasta antes de iniciar el presente trabajo.

Se ha demostrado que la síntesis *de novo* de las purinas en los ganglios basales ocurre a niveles muy bajos (90), lo cual sugiere que esta región cerebral depende bioquímicamente de la enzima HPRT para mantener el suministro de las purinas a través de la vía metabólica de salvamento. Puesto que los estudios postmortem de material cerebral obtenido de pacientes con síndrome de Lesch-Nyhan no han demostrado anomalías morfológicas en los ganglios basales, se ha postulado que las manifestaciones neurológicas de dicho síndrome pudieran ser debidas a alteraciones bioquímicas discretas más que a cambios morfológicos substanciales (90). Desafortunadamente, esta hipótesis no ha podido verificarse ya que las células que expresan altos niveles de HPRT dentro de los ganglios basales aún no han sido identificadas.

Como un primer paso hacia el entendimiento de la expresión neuronal del gen HPRT, Stout y cols. (82) generaron ratones trasgénicos que portaban el DNAC de hHPRT flanqueado por el promotor del gen de la metalotioneína I de ratón y la región 3' flanqueadora del gen de la hormona de crecimiento humana (hGH). Después de la apropiada inducción con cadmio se observó una expresión

preferencial neuronal del DNAC hHPRT en 4 de 8 ratones transgénicos. En ese entonces se sugirió que puesto que ni el promotor de la metalotioneína ni la señal de poliadenilación del gen hGH intervienen en la expresión preferencial hacia el sistema nervioso central, esta propiedad debería residir probablemente dentro de las secuencias codificadoras del gen hHPRT. Esta teoría fue completamente anulada cuando en un estudio subsecuente se reportó un patrón de expresión similar en ratones transgénicos al utilizar la misma construcción anterior excepto que el DNAC de hHPRT fue reemplazado por el gen hGH (83). Por lo anterior es claro que los estudios iniciales sobre la expresión del gen hHPRT en ratones transgénicos necesitan ser reevaluados. Además, una vez descartada la posibilidad de que las secuencias codificadoras del gen hHPRT gobiernan la expresión preferencial tisular, es necesario analizar su región 5' flanqueante para determinar si en ella existen los elementos reguladores que dictaminan dicho patrón de expresión.

Gran parte de la información disponible sobre secuencias génicas reguladoras ha sido obtenida durante el estudio de genes que producen RNAm's abundantes, la mayoría de los cuales son activos solamente en células especializadas. El gen HPRT pertenece a la clase de los denominados genes del mantenimiento celular ("housekeeping") (49), los cuales son constitutivamente expresados a niveles relativamente bajos en la mayoría de los tejidos. En esta clase se incluyen los genes para adenosín desaminasa (ADA) (88), dihidrofolato reductasa (DHFR) (93) y 3-hidroximetil glutaril CoA reductasa (HMGC_oA reductasa) (63). Las regiones 5' de estos genes son extremadamente ricas en guanina y citosina, carecen de las típicas secuencias TATA o CAAT y contienen varias copias de la secuencia 5'-GGGCGG-3' o su complemento invertido (7,29,46). Es importante destacar que los miembros de este grupo exhiben patrones de expresión que sugieren mecanismos únicos de regulación genética. Por ejemplo, el gen ADA es expresado a niveles muy bajos en la mayoría de los tejidos pero a niveles 10 veces mayores en los linfocitos T y B y aproximadamente a 100 veces más elevados en el timo (5). El gen DHFR exhibe regulación durante el ciclo celular (14). El gen HMGC_oA reductasa es reprimido por colesterol y las secuencias en el extremo 5' del gen han sido implicadas en esta inhibición, la cual se ha demostrado que ocurre a nivel de la transcripción (63). Estas y otras observaciones han sugerido que el patrón de expresión de los genes "housekeeping" es el resultado de una compleja interacción entre secuencias positivas (potenciadores) y/o negativas (represores) con factores de transcripción específicos de cada gen.

El promotor del gen humano HPRT ha sido analizado, desde el punto de vista estructural, por Patel y colaboradores (57). Aproximadamente el 80% de los 250 pb localizados junto al extremo 5' del codón de iniciación son residuos de guanina y citosina. Además, experimentos de protección con nucleasa S1 y extensión del primero detectaron múltiples sitios de iniciación de la transcripción entre las posiciones -169 y -104 con respecto al sitio de iniciación de la traducción. Posteriormente, los mismos investigadores realizaron experimentos de selección en cultivo celular y sugirieron la probable participación un elemento represor, al observar que la expresión del gen hHPRT se encontraba bajo regulación negativa (58). Determinar la existencia y significancia de ese elemento negativo, así como de otras secuencias reguladoras, y sus posibles interacciones con factores de transcripción, fueron las principales metas de este trabajo para así tratar de establecer las bases moleculares que regulan la expresión del gen humano HPRT.

e) Justificación

La disfunción neurológica que ocurre en el síndrome de Lesch-Nyhan es el más devastador y menos entendido aspecto de la enfermedad. Actualmente no existe tratamiento alguno para las complicaciones neurológicas de dicho síndrome. A pesar de las dramáticas consecuencias de la deficiencia de HPRT, no se han observado cambios estructurales anatómicos en el sistema nervioso central de las víctimas de este padecimiento. Por éstas y otras razones, el síndrome de Lesch-Nyhan es un candidato potencial para la terapia por reemplazamiento genético (2,16). Sin embargo, el desarrollo de dicha terapia ha sido severamente afectado debido a que no se conocen los tipos celulares específicamente involucrados en la patogénesis. Además, las secuencias nucleotídicas que regulan la expresión del gen hHPRT aún no han sido identificadas, lo cual ha sido la principal limitación en el diseño de vectores terapéuticos. Por lo anterior, es claro que la identificación y caracterización de los elementos que regulan la expresión preferencial neuronal del gen humano HPRT son una necesidad, no solamente para favorecer el entendimiento de la disfunción neurológica, sino también para evaluar la seguridad y estabilidad de la terapia génica antes de iniciar la experimentación con seres humanos.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Varios estudios han demostrado que la expresión tejido-específica de un gen está determinada por secuencias localizadas generalmente en su región promotora (41,44,50,62). Estos estudios, junto con el hallazgo de que las secuencias codificadoras del gen hHPRT no están involucradas en la expresión preferencial neuronal (82,83), nos condujeron a formular la siguiente hipótesis:

“La región 5’ flanqueante del gen humano HPRT contiene secuencias nucleotídicas que son responsables de dirigir una mayor expresión hacia el sistema nerviosos central”

Objetivo General:

Definir la estructura y función de los elementos involucrados en la expresión preferencial neuronal del gen humano HPRT.

Objetivos Particulares:

- 1.- Identificación y caracterización funcional de las secuencias nucleotídicas que positiva y/o negativamente regulan la expresión del gen hHPRT en cultivo celular.
- 2.- Identificación de las secuencias nucleotídicas que ocasionan una elevada expresión del gen hHPRT en el cerebro, mediante la generación de animales transgénicos
- 3.- Definición del patrón de expresión del gen HPRT en el sistema nervioso central.
- 4.- Identificación de los factores proteicos que se unen a las secuencias involucradas en la expresión preferencial neuronal.
- 5.- Análisis de la interacción de los factores proteicos con las secuencias reguladoras, a nivel de ácidos nucleicos, y correlación de esta interacción con la función.

IV. MATERIALES Y METODOS

a) Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción y modificación de ácidos nucleicos fueron obtenidas de varias casa comerciales: New England Biolabs, Bethesda Research Laboratories, Pharmacia y Boehringer Mannheim y se utilizaron de acuerdo a las instrucciones especificadas por el proveedor.

Los radioisótopos [α - ^{32}P]dCTP, [α - ^{35}S]dATP, [γ - ^{32}P]ATP y [^{14}C] acetil cloranfenicol fueron obtenidos de New England Nuclear.

Las enzimas Taq DNA polimerasa (Amplitaq) y transcriptasa reversa (AMV) fueron obtenidas de Cetus y Bethesda Research Laboratories, respectivamente.

Para la recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el estuche de reactivos "GeneClean II" de la compañía Bio101.

Para la determinación de secuencias nucleotídicas se utilizó el conjunto de reactivos "Sequenase Kit" de la compañía United States Biochemical.

En el aislamiento de RNAs totales se utilizó el conjunto de soluciones "RNAzol B" de la compañía Biotecx Laboratories.

Para la determinación cuantitativa de proteínas se empleó el estuche de soluciones "BioRad-Bradford Assay" de la compañía BioRad.

Los reactivos empleados en la elaboración de amortiguadores , soluciones diversas y medios de cultivo fueron obtenidos de varias casas comerciales: Sigma, Merck, J. T. Baker, Gibco, Aldrich y BioRad.

b) Material biológico

Para la generación de ratones transgénicos se utilizaron ratones de laboratorio cepa FVB/N (84), los cuales fueron proporcionados por el Dr. Paul A. Overbeek (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine).

Las células NT2/D1 y PC12 fueron proporcionadas respectivamente por los Dres. Peter Andrews (The Wistar Institute of Anatomy and Biology) y Jim Patrick (Division of Neuroscience, Baylor College of Medicine).

El vector de expresión pAVE1hGH (61) fue proporcionado por el Dr. Hugo Barrera Saldaña (ULIEG, Facultad de Medicina, U.A.N.L.).

Los plásmidos pEN.24CAT (27), pXN.8CAT (27) y pD35RCAT (42) fueron proporcionados por el Dr. Rodney Kellems (Department of Biochemistry, Baylor College of Medicine).

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Richard Gibbs (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine), a excepción de aquellos que contienen secuencias de reconocimiento para diversos factores de transcripción, los cuales fueron proporcionados por la compañía Promega.

El vector de clonación pTZ19R, los vectores de expresión pSV0CAT(19) y pSV2CAT (19), así como los marcadores de peso molecular, las bacterias Ca^{++} competentes (*Escherichia coli* cepa DH5 α) y las células RJK88, provienen de la genoteca, la bacterioteca y la colección de células eucariotas de la Dra. Pragna Patel (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine).

c) Métodos:

Técnicas convencionales de Ingeniería Genética

Métodos rutinarios de Ingeniería Genética tales como análisis de restricción, electroforesis y purificación de DNA en geles de agarosa y/o poliacrilamida, modificación y reparación enzimática de extremos nucleotídicos, subclonación de fragmentos génicos, transformación de bacterias con DNA plasmídico, minipreparación y maxipreparación de plásmidos, marcaje radiactivo de ácidos nucleicos, hibridación tipo Southern y secuenciamiento de nucleótidos, fueron realizados siguiendo los procedimientos descritos por Rincón Limas (64) o por Sambrook y cols. (74).

Construcción de los vectores de expresión hHPRT-CAT

La región 5' flanqueante del gen humano HPRT fue recuperada a partir de la clona genómica p λ 4X8-RB1.8 (57). Se obtuvieron varios fragmentos de longitud decreciente en la dirección 5' a 3' al utilizar sitios de restricción localizados a lo largo de dicha región y un sitio fijo de referencia *MstII*, el cual se localiza en la posición -122 en relación al sitio de iniciación de la traducción. Los sitios *EcoRI*, *SmaI* y *Sau3AI* fueron usados, junto con el sitio *MstII*, para generar los fragmentos de -1681 a -122, -885 a -122 y -570 a -122. Los extremos

cohesivos de dichos fragmentos fueron reparados con Klenow DNA polimerasa y se les añadieron adaptadores *Hind*III. Cada uno de esos fragmentos fue subclonado en el sitio *Hind*III del plásmido pSV0CAT (19) para generar los vectores pPP11CAT, pPP14CAT y pPP15CAT, respectivamente.

Los sitios *Bss*HII y *Xma*III fueron también utilizados para obtener los fragmentos de -219 a -19 y -388 a -13, respectivamente. Dichos fragmentos fueron subclonados, mediante generación y ligación de extremos romos, en el sitio *Hind*III del plásmido pSV0CAT para generar los vectores pPP16CAT y pPP17CAT, respectivamente.

La clona pλ4X8-RB1.8 (57) fue digerida con la enzima *Sma*I y posteriormente con la exonucleasa *Bal*31 y la enzima de restricción *Mst*II, para generar los fragmentos de -353 a -122 y -233 a -122. Después de añadir adaptadores *Hind*III, dichos fragmentos fueron subclonados en el sitio *Hind*III del plásmido pSV0CAT para generar los vectores pPP12CAT y pPP10CAT, respectivamente.

Cada uno de los fragmentos anteriormente mencionados fue subclonado en el plásmido pSV0CAT tanto en orientación normal como en orientación reversa, lo cual se indica respectivamente por las letras A o B en seguida del nombre de cada vector de expresión (Fig. 2).

El plásmido pPP11ΔNE, el cual tiene una delección interna de la región de -570 a -388, fue generado de la siguiente manera: el plásmido pPP11CATA fue digerido con *Sma*I (-885) y *Xma*III (-388) para producir y purificar dos fragmentos de 497 y 5,603 pb. El fragmento pequeño fue digerido parcialmente con *Sau*3AI para recuperar un fragmento de 315 pb, el cual contiene las secuencias HPRT desde -885 hasta -570. Después de generar extremos romos con Klenow DNA polimerasa, dicho fragmento fue religado con el fragmento de 5,603 pb (*Sma*I-*Xma*III) para producir finalmente el plásmido pPP11ΔNE.

El plásmido pTZNE fue construido al subclonar, mediante generación y ligación de extremos romos, la secuencia HPRT de -570 a -388 (*Sau*3AI-*Xma*III) en el sitio *Sma*I del vector pTZ19R. De igual manera, dicha secuencia fue subclonada en ambas orientaciones en el sitio *Nde*I de los siguientes plásmidos: pPP10CATA para generar pPP10NEA y pPP10NEB; pXN.8CAT (27) para crear pXN.8NEA y pXN.8NEB; pEN.24CAT (27) para generar pEN.24NEA y pEN.24NEB; y pD35RCAT (42) para producir pD35NEA y pD35NEB.

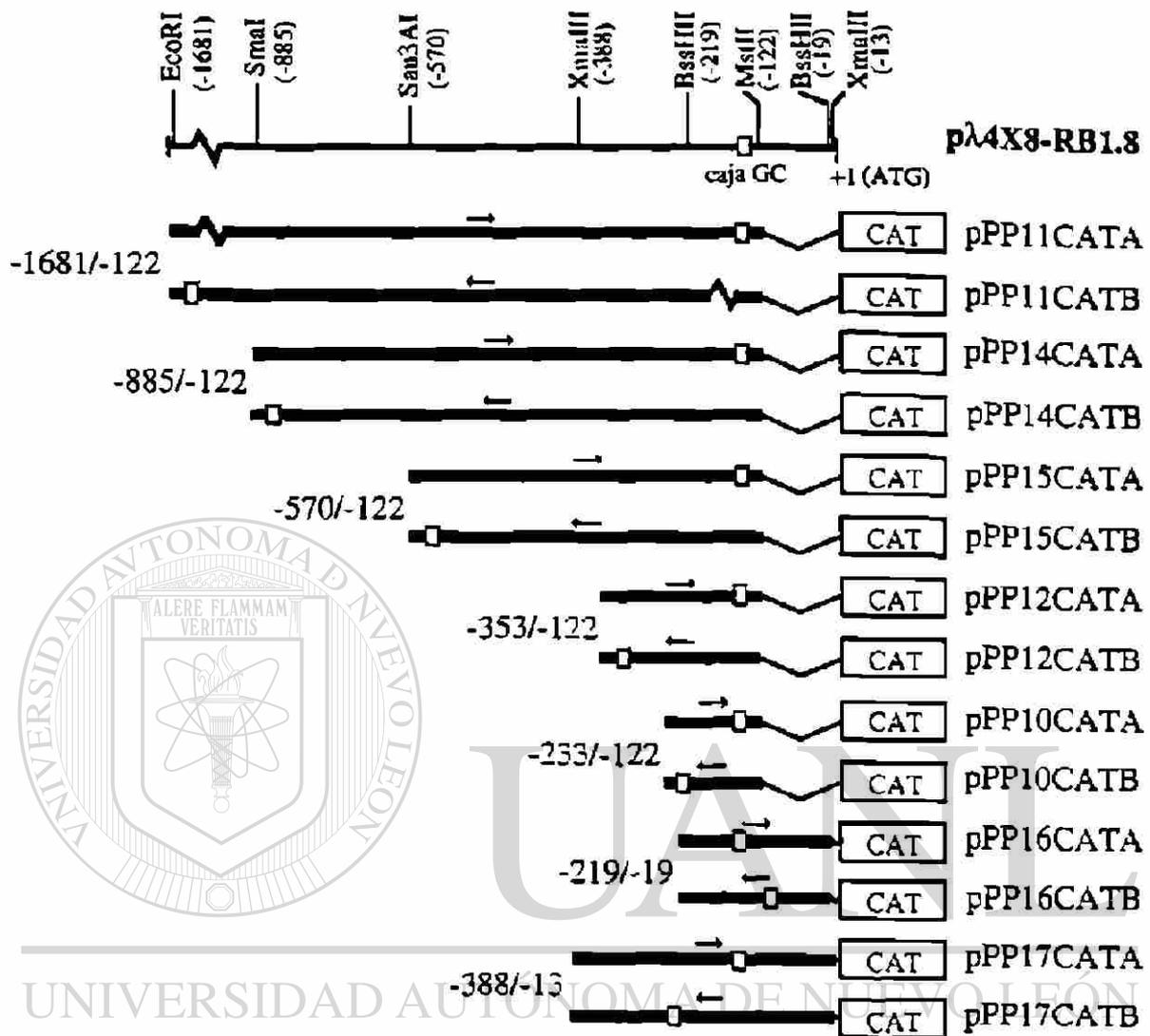


Figura 2. Estructura de los vectores de expresión hHPRT-CAT. Se esquematiza la organización estructural del promotor hHPRT y las deleciones generadas con enzimas de restricción y exonucleasa *Bal31*. Los números a la izquierda indican la posición de los fragmentos en relación al sitio de iniciación traduccional (+1) del gen hHPRT. La caja blanca representa las regiones ricas en G-C típicas de los genes de expresión constitutiva. Las flechas indican la orientación de los insertos dentro de cada vector. Las barras negras corresponden a secuencias relacionadas con el promotor hHPRT y las líneas delgadas indican áreas deletadas. A la derecha se describe la nomenclatura de cada uno de los vectores.

La secuencia HPRT de -510 a -451, referida en este trabajo como región Ff (60 pb), fue obtenida mediante reacción en cadena de la polimerasa y subclonada en ambas orientaciones en el sitio *NdeI* de los siguientes vectores: pPP10CATA para crear pPP10FfA y pPP10FfB; pEN.24CAT (27) para generar pEN.24FfA y pEN.24FfB; y pD35RCAT (42) para crear pD35FfA y pD35FfB. Tanto la integridad como la orientación de los insertos en estas clonas fueron verificadas mediante secuenciamiento nucleotídico por el método de Sanger (76), tal y como se describió por Rincón Limas (64). Todos los plásmidos descritos en esta sección fueron preparados y purificados a gran escala mediante doble ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio (74).

Procedimientos de cultivo celular

Como receptores celulares para los experimentos de transfección se utilizaron células RJK88 (17), una línea de fibroblastos de hamster que tiene una delección completa del gen HPRT. Dichas células fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 10% (vol/vol) de suero bovino fetal, 100 µg/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina, bajo una atmósfera de 5% CO₂-95% O₂. Dichas células fueron propagadas a una densidad de 5x10⁵ células por placa de 100 mm, aproximadamente 24 h antes de iniciar los experimentos de transfección. Las líneas celulares HeLa y PC12 fueron cultivadas de manera similar, solo que éstas fueron utilizadas para la obtención de extractos nucleares.

Células NT2/D1 (4,59) fueron cultivadas en medio OptiMEM (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal, estreptomina y penicilina a las mismas concentraciones indicadas en el párrafo anterior. Para inducir la diferenciación neuronal (60), 2 x 10⁶ células fueron propagadas en botellas de 75 cm² y tratadas con 1 x 10⁻⁵ M de ácido *trans*-retinoico (Sigma), el cual fue preparado como una solución matriz a una concentración de 10⁻² M en dimetil sulfóxido (DMSO). Cultivos control incubados con una concentración equivalente de DMSO fueron también mantenidos en paralelo. Después de dos semanas de tratamiento, dichas células fueron utilizadas para la preparación de extractos nucleares y para la obtención de RNAs totales.

Transfecciones celulares con DNA plasmídico

La introducción de los vectores de expresión a las células RJK88 se llevó a cabo mediante la técnica de precipitación con fosfato de calcio (20). Después de 5 h de incubación, la mezcla de DNA-fosfato de calcio fue eliminada y las células fueron sutilmente colapsadas mediante un tratamiento con 15% de glicerol durante 2 min (56), seguido de la adición de medio fresco. Las células fueron transfectadas con 10 μg de los plásmidos experimentales. En algunos casos, 1 μg del vector pAVE1hGH (61) fue también cotransfectado para normalizar las eficiencias de transfección. En los ensayos de competencia se transfectaron diferentes cantidades de DNA tal y como se indica en las leyendas de las figuras correspondientes. Cada experimento de transfección se repitió por lo menos tres veces utilizando duplicados para cada plásmido experimental.

Ensayos de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)

48 h después de la transfección, se cosecharon las células y se lisaron mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Se eliminaron los detritos celulares mediante centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad). Cada ensayo de CAT se llevó a cabo en un volumen de 190 μl conteniendo 200 μg de extracto proteico, 0.05 μCi de [^{14}C]cloranfenicol (60 mCi/mmol), y 0.05 mM de acetil coenzima A (19). La mezcla se incubó a 37°C durante 1 h y los productos de la reacción enzimática fueron separados por cromatografía en placas de sílica gel. El porcentaje de [^{14}C]cloranfenicol convertido a productos acetilados fue determinado al cuantificar las áreas radiactivas del cromatograma en un contador de centelleo líquido. Todos los ensayos fueron realizados dentro del rango lineal de actividades con respecto al tiempo de incubación y concentración de proteínas. El porcentaje de acetilación producido por cada vector de expresión fue determinado al promediar los resultados obtenidos en tres transfecciones independientes realizadas por duplicado.

Análisis de RNA por hibridación tipo Northern

Se llevó a cabo una hibridación tipo Northern (74) para conocer el nivel transcripcional de cada uno de los vectores hHPRT-CAT así como también para determinar la eficiencia de las transfecciones. Para ello se utilizó RNA total obtenido de células RJK88 cotransfectadas con los plásmidos experimentales y el plásmido pAVE1hGH (61). El RNA fue obtenido por el método de isotiocianato-fenol-cloroformo (11,64) utilizando el estuche de reactivos RNazol B (BioTecx Laboratories). 25 μg de RNA total fueron glioxilados y fraccionados en un gel al

1.2% de agarosa-fosfatos (74) y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Gene Screen Plus, New England Nuclear). Las sondas utilizadas fueron un fragmento *HindIII-BamHI* de 1,632 pb recuperado a partir del plásmido pSV0CAT (19) y un fragmento *AatII-XmaI* obtenido del DNAC de hGH (68). Dichas sondas fueron marcadas con [α - 32 P]dCTP utilizando el conjunto de reactivos "T7 QuickPrime" (Pharmacia) a una actividad específica de ~10⁹ cpm/ μ g. La hibridación y los lavados de la membrana se realizaron por procedimientos convencionales (74). Al finalizar la hibridación con la sonda CAT se colocó el filtro de nylon en una solución a ebullición que contenía 0.1% de SDS, 15 mM de cloruro de sodio y 1.5mM de citrato de sodio durante 10 min, después de lo cual se sometió a una segunda hibridación con la sonda proveniente del DNAC de hGH.

Construcción de los vectores de expresión hHPRT-lacZ:

Como receptor de los fragmentos hHPRT se usó el vector pC4AUG β Gal (86), el cual contiene el gen *lacZ* (β -galactosidasa) como gen reportero. La secuencia hHPRT de -233 a -122 fue obtenida a partir del plásmido pPP10CATA, mediante digestión con *HindIII*, y subclonada mediante ligación de extremos romos en el sitio *SmaI* del vector pC4AUG β Gal. Dicho fragmento, el cual contiene la región promotora esencial, fue subclonado tanto en orientación normal como en orientación reversa para generar las construcciones pRP112N y pRP112R, respectivamente. De igual manera, la construcción pRP1600N fue producida al subclonar un fragmento *HindIII* del plásmido pPP11CATA, el cual contiene la secuencia de -1681 a -122 e incluye a un elemento regulador negativo (-570 a -388). pRP800N y pRP1600 Δ NE fueron creados de manera similar al subclonar las secuencias hHPRT (*HindIII*) obtenidas de los plásmidos pPP14CATA y pPP11 Δ NE, respectivamente. pRP800N porta la secuencia hHPRT de -885 a -122. pRP1600 Δ NE difiere de pRP1600N únicamente por una delección interna de la región de -570 a -388. Todos estos vectores fueron propagados a gran escala (74) y caracterizados con enzimas de restricción diagnósticas. La secuencia nucleotídica de cada uno de los fragmentos hHPRT fue verificada por el método de Sanger (76). Los cartuchos de expresión hHPRT-lacZ, requeridos para la producción de ratones transgénicos, fueron recuperados de los plásmidos pRP112N, pRP112R, pRP1600N, pRP800N y pRP1600 Δ NE mediante digestión con *EcoRI* (Fig. 3). Dichos fragmentos génicos fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1% utilizando el conjunto de reactivos GeneClean II (Bio101), el cual se empleó de acuerdo a las instrucciones del proveedor con las siguientes modificaciones: el DNA fue eluido con amortiguador de inyección (10 mM de Tris pH 7.6 y 0.1 mM de EDTA), previamente filtrado a través de una membrana

de 0.2 μm , y las perlas de sílica y otras impurezas fueron eliminadas mediante dos ciclos de ultracentrifugación (TL100, Beckman) a 40,000 rpm durante 20 min. Finalmente la concentración del DNA fue determinada por fluorometría.

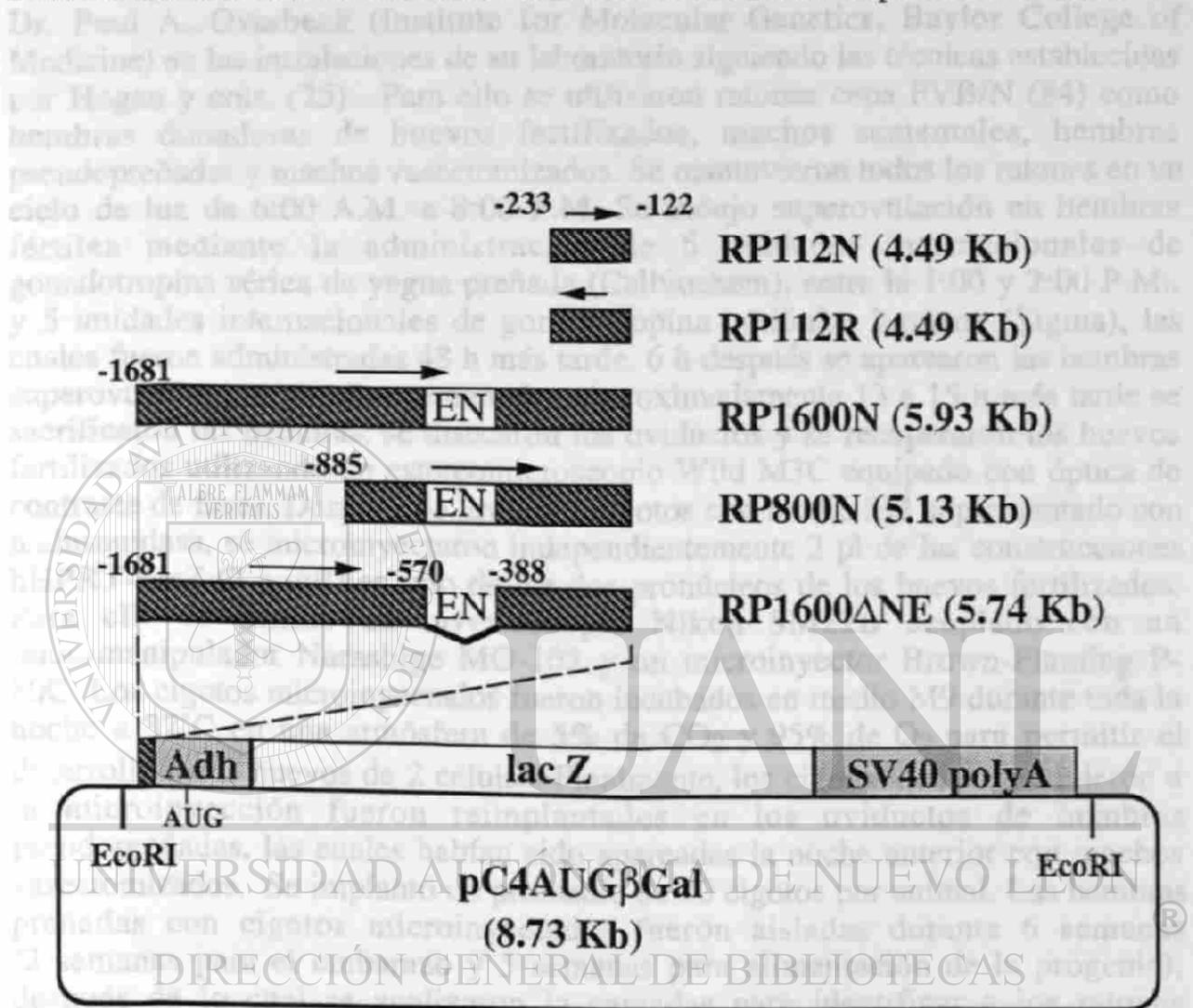


Figura 3. Estructura de los vectores hHPRT-lacZ. Varios fragmentos del promotor del gen hHPRT (segmentos con líneas diagonales) fueron subclonados en el plásmido pC4AUG β Gal (86) para generar las construcciones indicadas. Los números sobre dichos fragmentos indican su posición con respecto al sitio de iniciación traduccional (+1) del gen hHPRT y las flechas indican la orientación de los fragmentos dentro de cada construcción. Los cartuchos de expresión para los experimentos de transgénesis fueron recuperados de los correspondientes vectores mediante digestión con *EcoRI* y su tamaño se indica entre paréntesis. NE representa el propuesto elemento negativo del gen hHPRT.

Producción de ratones transgénicos

La producción de ratones transgénicos se llevó a cabo bajo la asesoría del Dr. Paul A. Overbeek (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine) en las instalaciones de su laboratorio siguiendo las técnicas establecidas por Hogan y cols. (25). Para ello se utilizaron ratones cepa FVB/N (84) como hembras donadoras de huevos fertilizados, machos sementales, hembras pseudopreñadas y machos vasectomizados. Se mantuvieron todos los ratones en un ciclo de luz de 6:00 A.M. a 8:00 P.M. Se indujo superovulación en hembras fértiles mediante la administración de 5 unidades internacionales de gonadotropina sérica de yegua preñada (Calbiochem), entre la 1:00 y 2:00 P.M., y 5 unidades internacionales de gonadotropina coriónica humana (Sigma), las cuales fueron administradas 48 h más tarde. 6 h después se aparearon las hembras superovuladas con machos sementales. Aproximadamente 13 a 15 h más tarde se sacrificaron las hembras, se disecaron los oviductos y se recuperaron los huevos fertilizados utilizando un estereomicroscopio Wild M3C equipado con óptica de contraste de fases. Después de lavar los cigotos con medio M2 suplementado con hialuronidasa, se microinyectaron independientemente 2 pl de las construcciones hHPRT-*lacZ* (2 ng/ μ l) en uno de los dos pronúcleos de los huevos fertilizados. Para ello se utilizó un invertoscopio Nikon SM22B acoplado con un micromanipulador Narashige MO-102 y un microinyector Brown-Flaming P-80C. Los cigotos microinyectados fueron incubados en medio M9 durante toda la noche a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂ para permitir el desarrollo hacia huevos de 2 células. Finalmente, los cigotos que sobrevivieron a la microinyección fueron reimplantados en los oviductos de hembras pseudopreñadas, las cuales habían sido apareadas la noche anterior con machos vasectomizados. Se implantó un promedio de 20 cigotos por animal. Las hembras preñadas con cigotos microinyectados fueron aisladas durante 6 semanas (3 semanas para el embarazo y 3 semanas para alimentación de la progenie), después de lo cual se analizaron la camadas para identificar a los ratones portadores de los diferentes transgenes hHPRT-*lacZ*.

Identificación de ratones transgénicos

Los integrantes de cada una de las camadas (3-4 semanas de edad) fueron anestesiados con 300 μ l de avertina al 2.5% (Sigma) mediante inyección intraperitoneal. Se cortaron ~2 cm de la cola de cada uno de los ratones y se detuvo el sangrado por cauterización. Se codificó cada ratón al incrustar un anillo metálico numerado en la oreja derecha antes de terminar la anestesia. A partir de este momento las hembras y los machos fueron mantenidos separadamente y se

registró cuidadosamente el nombre de la construcción génica que fue utilizada en cada camada, así como también el número correspondiente a cada ratón. Se colocó el tejido en 750 μ l de solución MTB (30 mM de Tris pH 7.7, 50 mM de EDTA, 50 mM de NaCl, 0.5% de SDS) y se agregaron 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml, Boehringer Mannheim). Se mezcló el tubo por inversión y se incubó a 55°C durante 12 h. Se agregaron 20 μ l de RNAsa (13 μ g/ml, Worthington) y se incubó a 37°C por 1 h. Se hicieron dos extracciones orgánicas con fenol y cloroformo y se precipitó el DNA en la fase acuosa mediante la adición de 300 mM de acetato de sodio pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol. Se recuperó el material viscoso (DNA) con una pipeta Pasteur, cuya punta había sido sellada mediante calor, y se transfirió a un tubo eppendorf conteniendo 500 μ l de etanol al 70%. Después de 2 min se retiró la pipeta, con el DNA adherido, y se dejó secar al aire durante 3 min. El DNA fue recuperado del vidrio al sumergir la pipeta en 200 μ l de amortiguador TE (10 mM de Tris pH 7.4, 1 mM de EDTA). Finalmente se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría.

El DNA de cada uno de los ratones fue analizado mediante una hibridación tipo Southern (74). 5 μ g de DNA fueron digeridos con *Eco*RI y fraccionados en un gel de agarosa al 1%. Se transfirieron a una membrana de nylon (Gene Screen Plus) por capilaridad utilizando 400 mM de NaOH y 600 mM de NaCl como solución de transferencia. Después de neutralización y secado de las membranas, los DNAs fueron hibridados con una sonda radiactiva correspondiente al gen bacteriano *lacZ*, la cual fue obtenida del plásmido pC4AUG β Gal (86) mediante doble digestión con *Cla*I y *Xba*I. Dicha sonda fue marcada con [α -³²P]dCTP a una actividad específica de 1×10^9 cpm/ μ g utilizando el estuche "T7 QuickPrime" (Pharmacia). La hibridación y los lavados de la membrana se hicieron por procedimientos convencionales (74). El número de copias de cada transgen integrado en el genoma de los ratones, se determinó al comparar la intensidad de las bandas de los fragmentos de restricción del transgén en el DNA genómico contra la intensidad de las bandas producidas al utilizar diferentes concentraciones del gen *lacZ*, las cuales fueron usadas como referencia. Para ello se analizaron los autorradiogramas utilizando un densitómetro LKB Ultroskan XL.

Los ratones identificados como transgénicos en el análisis tipo Southern, designados como animales F0, fueron apareados con ratones silvestres FVB/N para generar familias independientes. Las generaciones resultantes fueron identificadas como F1, F2, etc., y los animales transgénicos de cada generación fueron detectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP)(23). Brevemente, 300 ng de DNA obtenido de colas de ratón fueron mezclados con 1X de amortiguador de RCP (Cetus), 250 μ M de cada dNTP, 100 pM de cada uno de cuatro diferentes oligonucleótidos y 0.5 U de Amplitaq (Cetus) en un volumen de

50 μ l. Se realizaron 30 ciclos de amplificación (94°C, 1 min; 58°C, 1 min, 72°C, 1 min) en un termociclador Perkin-Elmer. La presencia del transgén *lacZ* fue detectada al amplificar un fragmento de 822 pb con el siguiente par de oligonucleótidos:

5'-GCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT (sentido)
5'-GACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGAC (antisentido)

Como control interno se amplificó una banda de 590 pb del gen de la rapsina murina, la cual fue obtenida con los siguientes oligonucleótidos:

5'-AGGACTGGGTGGCTTCCAACCTCCCAGACAC (sentido)
5'-AGCTTCTCATTGCTGCGCGCCAGGTTTCAGG (antisentido)

Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Los DNAs de animales transgénicos produjeron dos bandas de 822 y 590 pb, mientras que los DNAs de animales silvestres produjeron únicamente la banda de 590 pb.

Detección de β -galactosidasa por el método de X-gal

Se utilizó el método de Sanes y cols. (75) para la detección *in situ* de la enzima β -galactosidasa en diversos tejidos de animales transgénicos. Dicho ensayo enzimático consiste en el rompimiento del sustrato 4-cloro-5-bromo-3 indolil- β -D-galactósido (X-gal), en la presencia de los catalizadores ferro y ferricianuro de potasio, para producir un compuesto insoluble de color azul índigo. Ratonos transgénicos fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se recuperaron los siguientes órganos y tejidos: cerebro, corazón, pulmón, tórax, hígado, bazo, estómago, páncreas, intestinos, riñón, músculo, piel y testículos. El cerebro fue cuidadosamente seccionado utilizando un molde de disección para cerebro murino (Ted Pella, Inc.). Se lavaron los tejidos con amortiguador PBS (Sigma) frío y se fijaron con una mezcla de 2% de formaldehído y 0.2% de glutaraldehído en PBS durante 1 h a 4°C. Se lavaron con tres cambios de PBS y se incubaron en solución X-Gal (1mg/ml de X-Gal, 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM de $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM de $MgCl_2$, 0.01% de deoxicolato de sodio y 0.02% de nonident-P40 en PBS) en la obscuridad durante toda la noche a 25°C. Al día siguiente se detectó la presencia de un precipitado de color azul índigo en aquellos tejidos que contenían actividad de β -galactosidasa. Como control negativo se utilizaron tejidos de animales silvestres procedentes de la misma camada.

Para estudiar la expresión del gen *lacZ* (β -galactosidasa) durante el desarrollo embrionario se aparearon, a las 8:00 P.M., machos transgénicos heterocigotos con varias hembras silvestres cepa FVB/N. Se registró como tiempo de 0.5 días el momento en que se detectó un tapón de semen coagulado en la vaginas, las cuales se inspeccionaban entre las 10:00 y 11:00 A.M. del día siguiente al apareamiento. Se programó el sacrificio de las hembras embarazadas para obtener embriones a tiempos secuenciales durante la gestación. Se analizaron todos los embriones de la misma hembra, ya que solo unos cuantos de ellos serían transgénicos mientras que los demás servirían como un control negativo de la misma edad. Los embriones recuperados fueron fijados por 30 min, tal y como se describió en el párrafo anterior, y se incubaron en solución X-Gal durante toda la noche. A la mañana siguiente se inspeccionó la presencia del color azul típico de la reacción enzimática.

Detección de β -galactosidasa por inmunocitoquímica

El análisis inmunocitoquímico de β -galactosidasa en el SNC se llevó a cabo bajo la asesoría del Dr. Rob Geske en las instalaciones de su laboratorio (Center for Comparative Medicine, Baylor College of Medicine). Para ello se obtuvieron cerebros de ratones transgénicos y silvestres, los cuales fueron lavados con PBS (Sigma) y colocados en solución fijadora (2% de formaldehído y 0.2% de glutaraldehído en PBS) durante 1 h a 4°C. Se cortaron secciones coronales de ~2 mm de grosor con la ayuda de un vibrotomo, se fijaron nuevamente por 45 min adicionales y se colocaron en 15% de sacarosa (en PBS) durante toda la noche. Se colocaron los tejidos en moldes de congelación, se cubrieron con medio OTC (Tissue Tek, Miles) y se congelaron en nitrógeno líquido. Se obtuvieron secciones de 5-15 μ m, utilizando un crióstato (Leitz 1720 Digital) a -22°C, y se montaron sobre laminillas cubiertas con gelatina (Miles Scientific). Se lavaron dos veces en solución TB (100 mM de Tris pH 7.4) durante 10 min y tres veces en solución TBS (150 mM de NaCl, 100 mM de Tris pH 7.4) por 5 min. Se incubaron las secciones en la mezcla de anticuerpo primario [2% de albúmina sérica bovina, 0.3% de Tritón X-100, 150 mM de NaCl, 100 mM de Tris pH 7.4 y anticuerpos policlonales de conejo anti- β -galactosidasa (5'→3', Inc.) diluidos 1:200] durante toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones cinco veces con solución TBS durante 5 minutos cada vez y se incubaron en la mezcla de anticuerpo secundario [2% de albúmina sérica bovina, 0.3% de Tritón X-100, 150 mM de NaCl, 100 mM de Tris pH 7.4 y anticuerpos biotinilados de cabra anti-IgG de conejo (Vector Elite) diluidos 1:500] durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones 4 veces en solución TBS durante 10 min cada vez. La inmunodetección se llevó a cabo al producir un complejo de avidina-biotina (26) utilizando el estuche de reactivos "Vectastain ABC" de la compañía Vector

Laboratories, el cual fue aplicado de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En algunos casos se visualizó la inmunoreactividad del anticuerpo primario mediante la técnica de inmunoamplificación con granos de plata, para lo cual se utilizó un estuche de reactivos de la compañía Biocell Research Laboratories. Después de teñir las secciones con hematoxilina, se les colocaron cubreobjetos y se sellaron con solución Permount (Miles Scientific). Las secciones fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio Zeiss Axiophot utilizando óptica tipo Nomarski. Como controles negativos se procesaron, en paralelo, secciones de animales no transgénicos o secciones transgénicas en las que se omitió el uso del anticuerpo primario.

Análisis de RNA por hibridación *in situ*

Para determinar la distribución tisular de los transcritos del gen HPRT en el SNC de ratones transgénicos, se utilizó la técnica de hibridación descrita por Simmons y cols. (79). Estos estudios fueron realizados bajo la asesoría de los Drs. Juan-Juan Xue y Chung Y. Hsu en las instalaciones de su laboratorio (Division of Restorative Neurology and Human Neurobiology, Baylor College of Medicine). Para ello se anestesiaron ratones transgénicos (6 semanas de edad) y se perfundieron intracardialmente con paraformaldehído al 4% en PBS (Sigma). Se recuperaron los cerebros y se incubaron a 4°C en 30% de sacarosa/4% de paraformaldehído en PBS durante toda la noche. Se congeló el tejido en nitrógeno líquido utilizando moldes de congelación y se cortaron secciones coronales de ~20 µm de espesor, las cuales fueron montadas sobre laminillas cubiertas con poli-L-lisina (Miles Scientific). Se trataron las secciones con 0.2 N de HCl por 20 min a temperatura ambiente y con 125 µg/ml de Pronasa (Calbiochem), preparada en 50 mM de Tris pH 7.5 y 5 mM de EDTA, por 10 min a 37°C. Se incubaron en una mezcla de 100 mM de trietanolamina pH 8 y 0.25% de ácido acético a temperatura ambiente durante 10 min. Se lavaron exhaustivamente con PBS, se deshidrataron por pasaje a través de varios gradientes de etanol (de 30 a 100%) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se cubrieron las secciones con 40 µl de solución de hibridación conteniendo 0.15 ng/µl de sonda radiactiva [fragmento *HincII* del DNAC de HPRT murina (47) marcado con α -³²P-dCTP a una actividad específica de 2x10⁹ cpm/µg], 50% de formamida, 10% de dextrán sulfato, 300 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 5 mM de EDTA, 10 mM de NaPO₄ pH 6.8, 1X de reactivo de Denhardt (Sigma), 10 mM de DTT, y 1 mg/ml de tRNA. Se cubrieron las laminillas con cubreobjetos siliconizados, se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron durante 16 h a 50°C. Se removieron los cubreobjetos y se lavaron las laminillas dos veces en una mezcla de 2 X de SSC (1X SSC: 300 mM de NaCl, 30 mM de citrato de sodio pH 7.4) y 1 mM de EDTA

a 55°C durante 30 min cada vez. Se trataron con una solución de 20 µg/ml de RNAsa A y 1 U/ml de RNAsa T1 en 2 X SSC a 37°C durante 30 min. Se hicieron 3 lavados a temperatura ambiente con 2 X SSC durante 5 min cada vez y 2 lavados a 55°C en 2 X SSC/1 mM de EDTA durante 30 min cada vez. Se deshidrataron las secciones al sumergirlas en varios gradientes de etanol, se dejaron secar al aire y se expusieron a películas de Rayos X Kodak AR5 durante 24-72 h. Como control negativo se usaron secciones de cerebro de ratones HPRT⁻ (36), los cuales fueron proporcionados generosamente por el Dr. Allan Bradley (Institute for Molecular Genetics, Baylor College of Medicine).

Análisis de RNA por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP)

Ratones transgénicos fueron sacrificados por dislocación cervical y se recuperaron diversos tejidos, los cuales fueron almacenados a -70°C hasta su uso. Los RNAs totales fueron recuperados de dichos tejidos por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (11) y se trataron con DNAsa I (libre de RNAsa) por 10 min a 37°C, seguido de dos extracciones con fenol y cloroformo (74). Los RNAs se cuantificaron por espectrofotometría y se verificó su integridad en geles de agarosa-urea-ácido (64). La transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se llevaron a cabo en el mismo tubo de ensayo y en el mismo amortiguador, tal y como se describió por Robinson y Simon (69). Brevemente, 50 µl de agua ultrapura (libre de RNAsas, grado HPLC) conteniendo 400 ng de RNA total, 1X de amortiguador para RCP (Cetus), 250 µM de cada dNTP y 100 pM de cada oligonucleótido, fueron calentados a 65°C por 5 min y colocados en hielo por 3 min. Se añadieron 2.5 U de transcriptasa reversa (AMV, Bethesda Research Laboratories) y 2 U de Amplitaq (Cetus) seguido de la adición de 2 gotas de aceite mineral (Cetus). Las reacciones se incubaron a 37°C por 20 min y después se sometieron a 24 ciclos de amplificación (94°C, 1.5 min; 58°C, 2 min; 72°C 3 min) en un termociclador Perkin-Elmer. El número de ciclos fue optimizado para permitir un rango lineal de detección de transcritos. 12.5 µl de los productos de RCP fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 4% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Los transcritos para *lacZ* y mHPRT fueron coamplificados junto con los transcritos para β-tubulina, los cuales sirvieron como un control interno de la amplificación. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

lacZ (23) : 5'-GCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT-3' y
3'-CAGCGATGGTAATGGTCAACCAGACCACAG-5'.

β -tubulina: 5'-TGGCCAGATCTTCAGACCAG-3' y
3'-GAGTGACACGGACTTGAATG-5'.

mHPRT: 5'-TTGTTGGATTGAAATCCAGACAAGTTTG-3' y
3'-TTATTATTATGACTCTAACATAGACATTCT-5'.

Los oligonucleótidos para β -tubulina (18) y mHPRT (47) fueron seleccionados a partir de diferentes exones. De esta manera se amplificaría un fragmento de mayor tamaño, proveniente de la amplificación de secuencias intrónicas y exónicas, en caso de que hubiese contaminación de DNA genómico en la preparación de RNA.

RNA total obtenido (11) de células humanas NT2/D1 (59), cultivadas en la presencia o ausencia de ácido retinoico, fue también utilizado para evaluar la expresión del gen hHPRT en células neuronales mediante la técnica de TR-RCP. Para ello se usaron las mismas condiciones descritas en esta sección, excepto que los transcritos para hHPRT fueron coamplificados con los transcritos para gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), los cuales sirvieron como control interno. Los oligonucleótidos G3PDH fueron obtenidos de la compañía Clontech (Palo Alto, CA). Los oligonucleótidos para hHPRT fueron los siguientes: 5'-TCCTCCTGAGCAGTCAGC-3' y 3'-CTCAGGATAACTGTAGCGG-5'. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos que consistían en reacciones sin RNA y/o sin transcriptasa reversa.

Preparación de extractos nucleares

Se obtuvieron proteínas nucleares de cerebro, hígado y riñón de ratón cepa FVB/N (84) utilizando el protocolo de Tamura y cols. (85). Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en un cuarto frío (4°C) y las soluciones, tubos y centrifugas fueron preenfriadas a 0°C. Se agregaron inhibidores de proteasas (1% de aprotinina, 2.5 mM de benzamidina, 20 μ g/ml de inhibidor de tripsina y 1 μ g/ml de antipaina, quimostatina y pepstatina) en todas las soluciones excepto en la solución de diálisis. Brevemente, 10-15 g de tejido macerado fueron sumergidos en 30 ml de solución de homogenización (10 mM de HEPES pH 7.6, 15 mM de KCl, 0.15 mM de espermina, 0.5 mM de espermidina, 1 mM de EDTA, 2.2 M de sacarosa, 5% de glicerol, 0.5 mM de DTT). Los tejidos fueron disgregados mediante tres ciclos de homogenización de 2 min a 900 rpm utilizando un homogenizador eléctrico de teflón y vidrio. El homogenizado fue vertido cuidadosamente sobre 10 ml de una solución "colchón" (10 mM de HEPES pH 7.6, 15 mM de KCl, 0.15 mM de espermina, 0.5 mM de espermidina, 2 M de sacarosa, 10% de glicerol, 0.5 mM de DTT) y se centrifugó a 23,000 rpm

durante 45 min (rotor SW27, Beckman). Después de centrifugar se eliminó el material flotante, las fracciones solubles y el “colchón” de sacarosa por aspiración. La pastilla de núcleos se disolvió en 3 ml de solución de lisis (10 mM de HEPES pH 7.6, 100 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA, 10% de glicerol, 3 mM de MgCl₂, 0.5 mM de DTT) y se verificó la integridad de los núcleos mediante microscopía. Se determinó la concentración del DNA en la suspensión nuclear a 260 nm y se ajustó a una concentración final de 0.65 mg de DNA/ml utilizando la solución de lisis. Se rompieron los núcleos mediante tratamiento con 0.55 M de KCl durante 30 min a 0°C y se eliminó la cromatina al centrifugar a 40,000 rpm por 45 min (rotor SW50.1, Beckman). Se recuperó el 90% del sobrenadante, se agregaron 0.3 g/ml de sulfato de amonio y se precipitaron las proteínas por centrifugación a 40,000 rpm durante 20 min. Se disolvió la pastilla en 2 ml de solución de diálisis (25 mM de HEPES pH 7.6, 0.1 mM de EDTA, 40 mM de KCl, 10% de glicerol, 1 mM de DTT) y se dializó durante 4 h utilizando 800 ml de la misma solución. Se eliminó el material insoluble mediante microcentrifugación y se cuantificaron las proteínas utilizando el estuche “Bradford Assay” de la compañía BioRad. Finalmente se ajustó la concentración de los extractos a 10 mg/ml y se almacenaron en pequeñas alíquotas a -135°C hasta su uso.

Los extractos nucleares de células en cultivo fueron preparados de acuerdo al método de Andrews y Faller (3). Las manipulaciones se llevaron a cabo en condiciones de baja temperatura y todas las soluciones fueron preenfriadas a 0°C. Aproximadamente 5×10^7 células fueron lavadas con amortiguador PBS (Sigma), transferidas a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y empaquetadas después de 20 s de centrifugación. Se agregaron 400 µl de amortiguador A (10 mM de HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0.5 mM de DTT, 0.2 mM de PMSF), se resuspendió la pastilla de células al mezclar el tubo por inversión y se colocó en hielo por 10 min. Se mezcló la solución en un agitador eléctrico (Vortex) durante 20 s a baja velocidad, se centrifugó a 5,000 rpm por 10 s y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 70 µl de amortiguador C (20 mM de HEPES-KOH pH 7.9, 25% de glicerol, 420 mM de NaCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de EDTA, 0.5 mM de DTT, 0.2 mM de PMSF) y se incubó en hielo por 20 min para permitir la ruptura nuclear y celular debido a la alta concentración de sales. Se eliminaron los detritos celulares por centrifugación a 10,000 rpm durante 2 min y se colectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de las proteínas nucleares y se almacenaron a -135°C hasta su uso. La producción típica es de aproximadamente 50-75 µg de proteína por cada 10^6 células.

Ensayos de retardo electroforético

Se utilizó el método de Sing y cols. (80) para detectar, a partir de un extracto crudo, a aquellas proteínas que se unen selectivamente a las secuencias reguladoras del gen hHPRT. Dicho ensayo electroforético se basa en que cuando una proteína se une específicamente a un fragmento radiactivo de DNA, retarda la migración del mismo y produce una banda adicional de mayor tamaño en el carril donde fue aplicada la mezcla de DNA y proteínas, la cual es visualizada por autorradiografía.

Las reacciones de unión entre DNA y proteínas se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l conteniendo 25,000 cpm de sonda radiactiva (aproximadamente 0.5-1 ng), 3 μ g de poli (dI-dC) (Pharmacia), 10 mM de HEPES pH 7.5, 10% de glicerol, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, y 10 μ g del extracto nuclear correspondiente. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se fraccionaron las reacciones por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4%, los cuales fueron secados al vacío y analizados por autorradiografía. Para los ensayos de competencia se agregaron cantidades excesivas de DNA competidor no radiactivo 5 min antes de añadir la sonda a la reacción de unión. Para determinar los perfiles de inactivación térmica de las proteínas involucradas en la unión al DNA, se incubaron extractos nucleares de hígado y cerebro murino a diferentes temperaturas durante 5 min y posteriormente se utilizaron en reacciones de unión. Para analizar el efecto de agentes quelantes y detergentes iónicos sobre la estabilidad de los complejos de DNA-proteínas, se hicieron varias reacciones de unión en presencia de cantidades crecientes de EDTA y SDS, respectivamente, y se analizaron los productos por electroforesis. Para los experimentos de digestión con proteasas se hicieron varias reacciones de unión y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se agregaron diferentes concentraciones de tripsina (Sigma), se incubaron las reacciones a 37°C durante 5 min y se analizaron los productos de la digestión por electroforesis y autorradiografía.

Las sondas utilizadas en los ensayos de retardo electroforético corresponden a diversos fragmentos que cubren la totalidad del elemento negativo del gen hHPRT (hHPRT-NE, -570 a -388). Dichos fragmentos fueron obtenidos mediante la reacción en cadena de polimerasa (RCP) (73) a partir del plásmido pTZNE, el cual es portador exclusivo de dicha secuencia (67). Brevemente, 20 ng de plásmido fueron mezclados con 1 \times de amortiguador de RCP, 250 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleótido y 0.5 U de Amplitaq (Cetus) en un volumen de 100 μ l. La amplificación se llevó a cabo por 30 ciclos (94°C, 1 min; 58°C, 1

min; 72°C, 1 min) en un termociclador Perkin-Elmer. Los productos de RCP fueron recuperados a partir de geles de agarosa al 2%, utilizando el estuche de reactivos Geneclean II (BIO101), y se marcaron los extremos 5' con [γ -³²P]ATP.

Los siguientes fragmentos fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos que se indican entre paréntesis: hHPRT-NE (6788 y 8319), Fa (6788 y 8316), Fb (6789 y 8317), Fc (6417 y 8318), Fd (6418 y 8319), Fe (6788 y 8315), Ff (6417 y 8317), y Fg (6419 y 8319). Las coordenadas de dichos fragmentos se indican en la figura correspondiente. La secuencia de los oligonucleótidos se describe a continuación, en dirección 5' a 3':

6788: TGATCTGGGTGACTCTAGGACTCTAGGTCT
6789: CAACTGTTACAACCAGTTAAGGGTTTGGGG
6417: AAGCACTGGGCCAAGAGTCAGGAAAATGGA
6418: AGCCACAGGTAGTGCAAGGTCTTGGGAATG
6419: GGACGTCTGGTCCAAGGATTCACGCGATGA
8315: CCCCAAACCCTTAACTGGTTGTAACAGTTG
8316: TCCATTTTCTGACTCTTGGCCCAGTGCTT
8317: CATTCCCAAGACCTTGCACTACCTGTGGCT
8318: TCATCGCGTGAATCCTTGGACCAGACGTCC
8319: TAAACCGGGCCCCGGCTCTTCCCGGGTTCCAG

Ensayos de interferencia por metilación

Para determinar los sitios de contacto de las proteínas dentro de la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388), se utilizó el método de interferencia por metilación (10). Dicho método identifica las guaninas (G) en el DNA que, cuando son metiladas, interfieren con la unión de la proteína(s). Para ello se requiere utilizar un fragmento de DNA marcado específicamente en uno de los dos nucleótidos terminales (5' o 3') de la cadena codificadora o no codificadora, las cuales son analizadas independientemente para determinar los contactos en cada una de ellas. La sonda es parcialmente metilada con dimetil sulfato a un promedio de una guanina por molécula de DNA. Dicha sonda es entonces utilizada en una reacción de unión y los complejos de DNA-proteínas son separados de la sonda libre (no unida) mediante un ensayo de retardo electroforético. Aquellas moléculas de DNA que estén metiladas en sitios importantes para la unión de las proteínas no serán retardadas en la electroforesis y migrarán como sonda libre. Por lo tanto, el complejo de DNA-proteínas carece de moléculas metiladas en las guaninas que son requeridas para la interacción. Después de identificar las bandas de DNA acomplejado y DNA libre por autorradiografía, se eluye el DNA de cada una de ellas y se somete a un tratamiento químico con piperidina, con el cual se

cortará el DNA exclusivamente a nivel de las bases metiladas. Finalmente, los productos generados durante el rompimiento químico, a partir de la sonda libre y acomplejada, son separados simultáneamente en un gel de secuenciamiento y analizados por autorradiografía. La ausencia de algunas bandas en el carril del DNA acomplejado en relación con el carril de DNA libre, identifica las guaninas que están en contacto directo con los factores proteicos. La posición exacta de dichas bases se determina al analizar, en el mismo gel, una reacción de secuenciamiento del DNA utilizado en la reacción de unión, la cual servirá como punto de referencia.

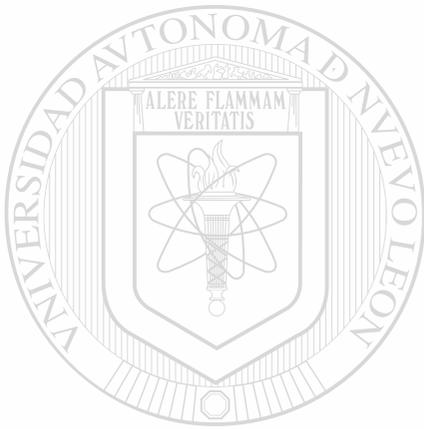
La sonda utilizada en estos estudios corresponde a la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388), la cual fue obtenida a partir del plásmido pTZNE mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 6788 y 8319 (descritos en la sección anterior). La cadena codificadora fue analizada al marcar radiactivamente el oligonucleótido 6788 (sentido) en el extremo 5' antes de iniciar la amplificación, mientras que la cadena no codificadora fue analizada al marcar solamente el oligonucleótido 8319 (antisentido). Los productos radiactivos de la amplificación (~500,000 cpm) fueron mezclados separadamente con 200 μ l de 50 mM de cacodilato de sodio pH 8/1 mM de EDTA. Se agregó 1 μ l de dimetil sulfato (Aldrich) y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Se agregaron 10 μ g de RNAt (Sigma), 25 μ l de acetato de sodio 3 M pH 7 y 600 μ l de etanol. Se incubó a -70°C durante 10 min y se centrifugó a 12,000 xg durante 15 min. Se tomó cuidadosamente el sobrenadante y se desechó en una botella de vidrio conteniendo 5 M de NaOH. Se lavaron las pastillas de DNA con etanol al 70% y se resuspendieron en 10 μ l de agua ultrapura (grado HPLC). Se tomó una alícuota (2 μ l) de cada una de las muestras, se rotularon como "codificadora" y "no codificadora", y se utilizaron para hacer reacciones de secuenciamiento nucleotídico por el método de Maxam y Gilbert (74). Los DNAs remanentes fueron utilizados separadamente para hacer reacciones de unión tal y como se describió en la sección anterior, excepto que todos los componentes fueron incrementados 5 veces. En dichas reacciones se usaron extractos de cerebro e hígado murino así como también extractos de células humanas NT2/D1 cultivadas en presencia o ausencia de ácido retinoico. Después de separar los productos de las reacciones por electroforesis, se cubrió el gel (poliacrilamida al 4%) con plástico adherible (SaranWrap) y se expuso a una película de Rayos X (Kodak AR5) a 4°C durante 3 h. Se colocó la autorradiografía por debajo del gel y se cortaron las regiones de poliacrilamida que corresponden a las bandas de DNA acomplejado y DNA libre. Se maceraron dichos fragmentos de gel con una navaja estéril y se agregaron separadamente a tubos Eppendorf de 2 ml conteniendo 500 μ l de TE (10 mM de Tris pH 7.6, 1 mM de EDTA). Se eluyó el DNA por agitación en un rotador eléctrico a 200 rpm

durante toda la noche a 37°C. Se centrifugaron los tubos a 12,000 xg durante 5 min, para eliminar los restos de poliacrilamida y se recuperaron los sobrenadantes. Se hicieron dos extracciones orgánicas con fenol-cloroformo y se precipitaron los DNAs con etanol y acetato de sodio (74) utilizando tubos Eppendorf de 1.5 ml con tapón de rosca. Se disolvieron las pastillas en 100 µl de piperidina 1 M (preparada en fresco) y se incubó a 95°C durante 30 min, seguido de un enfriamiento súbito en hielo durante 3 min. Se hicieron 3 orificios en los tapones de los tubos con la ayuda de una aguja calibre 18 y se evaporó a sequedad en un desecador centrífugo (SpeedVac 110, Savant) durante 2 h. Se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua (grado HPLC) y se secó durante 1 h. Se resuspendió en 40 µl de agua y se repitió el proceso de secado. Se disolvieron la pastillas en 10 µl de colorante FD (95% de formamida desionizada, 0.02% de xilén cianol, 0.025% de azul de bromofenol), se calentaron a 95°C durante 3 min y se aplicaron ~3,000 cpm de cada muestra en un gel de secuenciamiento al 8%. Como patrones de referencia migratoria se aplicaron también reacciones de secuenciamiento tanto de la cadena codificadora como de la no codificadora. Se secó el gel en un secador de geles (SGD4050, Savant) y se analizaron los productos radiactivos por autorradiografía.

Determinación del peso molecular de factores de transcripción por entrecruzamiento con luz ultravioleta y electroforesis bidimensional

Los estudios de entrecruzamiento con luz UV se hicieron tal y como se describió por Gray y cols. (21). Como sonda radiactiva se usó un oligonucleótido de 30 residuos (5'-AGTCAGGAAAATGGAAGCCACAGGTAGTGC-3'), el cual contiene en el centro la secuencia involucrada en la interacción proteica (subrayada), según los experimentos de interferencia por metilación. Dicho oligonucleótido se apareó con su homólogo complementario y se marcaron los extremos 5' con [γ -³²P]ATP. Aproximadamente 100,000 cpm de la sonda radiactiva fueron utilizadas en reacciones típicas de unión, en las cuales se usó extracto nuclear de cerebro o hígado murino. Los productos de las reacciones fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%. Se cortó completamente cada carril que contiene los productos de la reacciones de unión, se cubrieron las tiras de gel con plástico adherible (SaranWrap) y se irradiaron con luz UV (312 nm) a 4°C durante 20 min con el objeto de unir covalentemente las proteínas al DNA. Se colocó cada una de las tiras de gel en tubos Falcon de 15 ml conteniendo 5 ml de amortiguador SB (65 mM de Tris pH 6.8, 3% de SDS, 10% de glicerol, 100 mM de DTT, 0.004% de azul de bromofenol) y se agitaron suavemente a 22°C durante 30 min. Se recuperaron las tiras de poliacrilamida y se extendieron horizontalmente sobre carriles amplios (1.5 x 14 cm) hechos en geles desnaturizantes de SDS y poliacrilamida al 5-10% (74). Después de

resolver los productos del entrecruzamiento por electroforesis en segunda dimensión, se secó el gel en un secador de geles (SGD4050, Savant) al vacío y se analizaron los complejos de DNA y proteínas mediante autorradiografía. Se utilizaron proteínas marcadas con ^{14}C como marcadores de peso molecular (Bethesda Research Laboratories).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V. RESULTADOS

Caracterización funcional *in vitro* de la región 5' del gen hHPRT

Para identificar las secuencias involucradas en la modulación de la transcripción del gen hHPRT en cultivo celular, subclonamos en ambas orientaciones varios fragmentos de la región 5' de dicho gen en un vector de expresión que porta el gen CAT como reportero. Cada uno de los plásmidos esquematizados en la Fig. 2 fue transfectado por el método de precipitación con fosfato de calcio (20), en células RJK88 (17) y la producción de CAT fue analizada 48 h después de la transfección. Para cada vector de expresión, la actividad de CAT fue expresada en relación a la actividad obtenida con el vector pSV2CAT, el cual fue transfectado en paralelo para usarlo como referencia.

Los resultados de los experimentos de transfección se ilustran en la Fig. 4. Cuando el plásmido pPP11CATA, el cual contiene las secuencias de -1681 a -122, fue utilizado en la transfección celular, se obtuvo un nivel muy bajo en la expresión de CAT. La delección de las secuencias de -1681 a -885 y -1681 a -570, no ocasionó ningún cambio notable en la actividad enzimática en comparación con la actividad obtenida con el plásmido pPP11CATA. Sin embargo, la delección de la secuencia de -1681 a -353 causó un incremento de 13 veces en la actividad de CAT. La subsecuente delección hasta la posición -233 no alteró significativamente dicho incremento. Además, se obtuvieron niveles similares de actividad enzimática cuando se analizaron las secuencias de -219 a -19 y -388 a -13, lo cual permitió delimitar a la región promotora esencial entre las posiciones -219 y -122 (97 pb). Puesto que la expresión de CAT fue muy similar cuando las secuencias fueron analizadas tanto en orientación normal como en orientación reversa, los datos aquí presentados indican que el promotor hHPRT exhibe actividad bidireccional. Estos resultados también sugieren la presencia de un elemento regulador negativo entre las posiciones -570 y -388.

El promotor hHPRT es reprimido a nivel de la transcripción

Para confirmar que los resultados obtenidos en los experimentos de transfección fueron debidos a un efecto sobre la transcripción del gen reportero y no a un efecto sobre la traducción, examinamos los niveles de RNAm producidos por cada plásmido quimérico. Se transfectaron células RJK88 con cada uno de los vectores hHPRT-CAT y se obtuvieron los RNAs a las 48 h después de la transfección, los cuales fueron sometidos a una hibridación tipo Northern. Para asegurarnos de que los niveles detectados de RNAm no fueron debidos a

diferencias en las eficiencias de transfección. Se comparó cada uno de dichos plásmidos con el vector pSV2CAT. La Fig. 7 ilustra los resultados de la hibridación al utilizar sondas específicas para los RNAs de los genes CAT y hHP. Esta resultada indica que las eficiencias de transfección fueron muy similares entre todos los plásmidos, así y como se demostró al utilizar la sonda para hHP, y que los niveles de RNAs de CAT producidos por cada vector de expresión correlacionan con los niveles de expresión enzimática (Fig. 4), lo cual sugiere que la expresión del producto hHPRT depende a su vez de la iniciación de la transcripción.

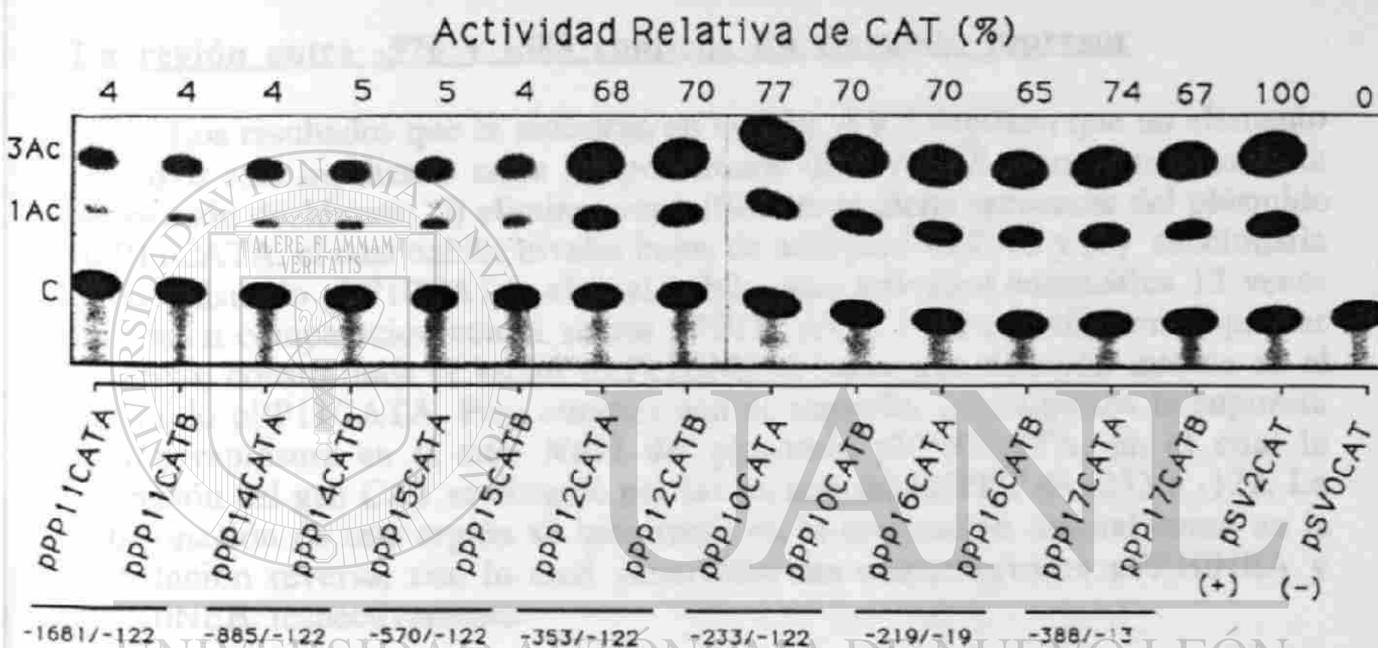


Figura 4. Análisis funcional de la región 5' del gen hHPRT. Células RJK88 fueron transfectadas con 10 µg de cada uno de los vectores hHPRT-CAT y a las 48 h se analizó la expresión de CAT. La posición de las secuencias 5' del gen hHPRT presentes en cada vector se indica debajo del nombre de las construcciones correspondientes. La actividad de CAT obtenida con cada vector es expresada como porcentaje de la actividad obtenida con el plásmido pSV2CAT (100%). Los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes. El plásmido pSV0CAT, el cual carece de secuencias promotoras, fue utilizado como control negativo. Se indica la posición del cloranfenicol (C) y sus productos acetilados (1 Ac y 3 Ac).

diferencias en las eficiencias de transfección, se cotransfectó cada uno de dichos plásmidos con el vector pAVE1hGH. La Fig. 5 ilustra los resultados de la hibridación al utilizar sondas específicas para los RNAm de los genes CAT y hGH. Estos resultados indican que las eficiencias de transfección fueron muy similares entre todos los plásmidos, tal y como se demostró al utilizar la sonda para hGH, y que los niveles de RNAm de CAT producidos por cada vector de expresión correlacionan con los niveles de actividad enzimática (Fig. 4), lo cual sugiere que la represión del promotor hHPRT ocurre a nivel de la iniciación de la transcripción.

La región entre -570 y -388 contiene un elemento represor

Los resultados que se muestran en las Fig. 4 y 5 sugieren que un elemento negativo está localizado entre las posiciones -570 y -388. Para confirmar esta suposición decidimos: (i) eliminar específicamente dicha secuencia del plásmido pPP11CATA, el cual exhibe niveles bajos de actividad de CAT y (ii) subclonarla en el plásmido pPP10CATA, el cual exhibe una actividad enzimática 13 veces mayor en comparación con el vector pPP11CATA. Para cumplir con el primer objetivo, construimos el vector pPP11 Δ NE al hacer una delección interna en el plásmido pPP11CATA. Para cumplir con el segundo, introdujimos la supuesta región represora en el sitio *NdeI* del plásmido pPP10CATA, en el cual la expresión del gen CAT es dirigida por las secuencias hHPRT de -233 a -122. La subclonación de esta región se hizo tanto en la orientación normal como en la orientación reversa, con lo cual generamos las construcciones pPP10NEA y pPP10NEB, respectivamente.

Cuando la región entre -570 y -388 fue deletada del plásmido pPP11CATA, la expresión del gen CAT se incrementó 11 veces, lo cual confirmó la existencia de un elemento negativo dentro de esa región (Fig. 6). Aún más, la inserción de dicha secuencia junto al extremo 5' de la región promotora esencial (-233 a -122) en el plásmido pPP10CATA, provocó una reducción de 9 veces en la actividad enzimática, independientemente de la orientación del inserto. Estos resultados demostraron inequívocamente que la región entre -570 y -388 contiene un elemento negativo, el cual hemos denominado hHPRT-NE.

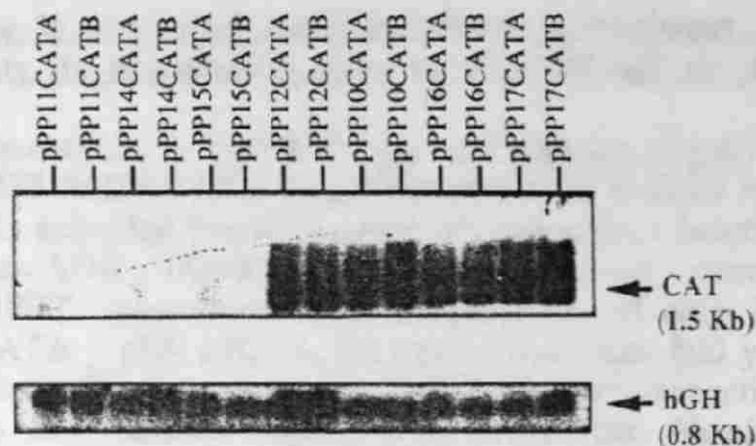


Figura 5. Detección de transcritos para CAT y hGH en células cotransfectadas con los vectores hHPRT-CAT y pAVE1hGH. Células RJK88 fueron cotransfectadas con 10 μ g de cada uno de los vectores hHPRT-CAT y 1 μ g del plásmido pAVE1hGH, el cual sirvió como indicador para evaluar las eficiencias de transfección. 25 μ g de RNA total, obtenido de dichas células, fueron fraccionados en un gel desnaturalizante y transferidos a una membrana de nylon. Las sondas utilizadas corresponden a un fragmento *Hind*III-*Bam*HI de 1.632 pb obtenido del gen CAT y un fragmento *Aat*II-*Xma*I de 640 pb proveniente del DNAC de hGH. La hibridación y los lavados se hicieron por técnicas convencionales. Únicamente se muestran las partes relevantes de las autorradiografías.

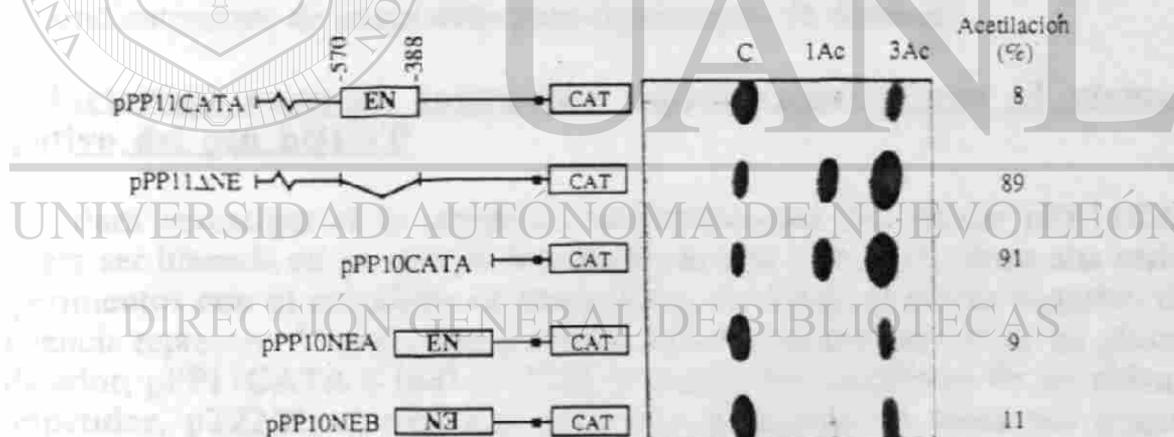


Figura 6. Efecto del elemento negativo (EN) sobre la actividad del promotor hHPRT. La secuencia comprendida entre las posiciones -570 y -388 fue deletada del plásmido pPP11CATA y subclonada en ambas orientaciones, junto al extremo 5' de la secuencia hHPRT presente en el plásmido pPP10CATA. Los vectores resultantes fueron transfectados en células RJK88 y se analizó la actividad de CAT por métodos tradicionales. Las unidades transcripcionales de los vectores se ilustran a la izquierda y los resultados del ensayo de CAT a la derecha. El porcentaje de acetilación representa el grado de conversión del cloranfenicol (C) a sus derivados 1-acetil (1Ac) y 3-acetil (3Ac) cloranfenicol. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

hPRT-NE reprime la actividad de promotores heterólogos y funciona independientemente de orientación pero es dependiente de distancia

Habiendo demostrado la presencia de un elemento negativo entre las posiciones -570 y -388 (hHPRT-NE), decidimos investigar si dicha secuencia era capaz de reprimir la actividad transcripcional de promotores heterólogos tales como los de los genes ADA y DHFR, los cuales son funcional y estructuralmente similares al gen HPRT. Insertamos dicha secuencia en el sitio *NdeI* de los plásmidos pXN.8CATA y pEN.24CAT, los cuales contienen 800 y 240 pb del promotor del gen de la adenosín desaminasa (ADA) murina, respectivamente. El elemento negativo fue también introducido en el sitio *NdeI* del vector pD35RCAT, el cual contiene 297 pb del promotor del gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) murina. La región represora fue insertada en ambas orientaciones y la actividad de CAT fue analizada mediante transfección en células RJK88 (Fig. 7). La inserción de la secuencia negativa en el plásmido pXN.8CAT no afectó los niveles de expresión del gen reportero. Sin embargo, cuando dicha secuencia fue insertada en el plásmido pEN.24CAT, hubo una reducción de 8 veces en la actividad de CAT. La introducción del elemento negativo en el vector pD35RCAT provocó también una reducción de 10 veces en la actividad del gen reportero. Estos resultados indican que la secuencia hHPRT-NE es capaz de reprimir promotores heterólogos y sugieren que funciona independientemente de orientación pero dependiente de distancia.

Un factor(es) represor interactúa específicamente con el elemento negativo del gen hHPRT

Para investigar si la represión transcripcional del vector pPP11CATA pudiera ser liberada en un ensayo de competencia *in vivo*, realizamos una serie de experimentos con el propósito de neutralizar, en *trans*, el efecto negativo de la secuencia represora. Transfectamos células RJK88 con una mezcla de un plásmido indicador, pPP11CATA (-1681 a -122), y cantidades crecientes de un plásmido competidor, pTZNE, el cual fue generado al insertar el elemento negativo (hHPRT-NE; -570 a -388) en el plásmido pTZ19R. Varias cantidades del vector pTZ19R, el cual carece de secuencias reguladoras, fueron añadidas para balancear la cantidad total de DNA utilizado en cada transfección. Este experimento revelaría la participación de un factor(es) represor siempre y cuando los niveles de expresión del gen CAT aumentasen al utilizar cantidades crecientes del DNA competidor. Nuestros resultados demuestran que al aumentar la concentración del plásmido competidor de 0 a 10 µg, se produjo un incremento de seis veces en la actividad transcripcional de la construcción pPP11CATA (-1681 a -122) (Fig. 8).

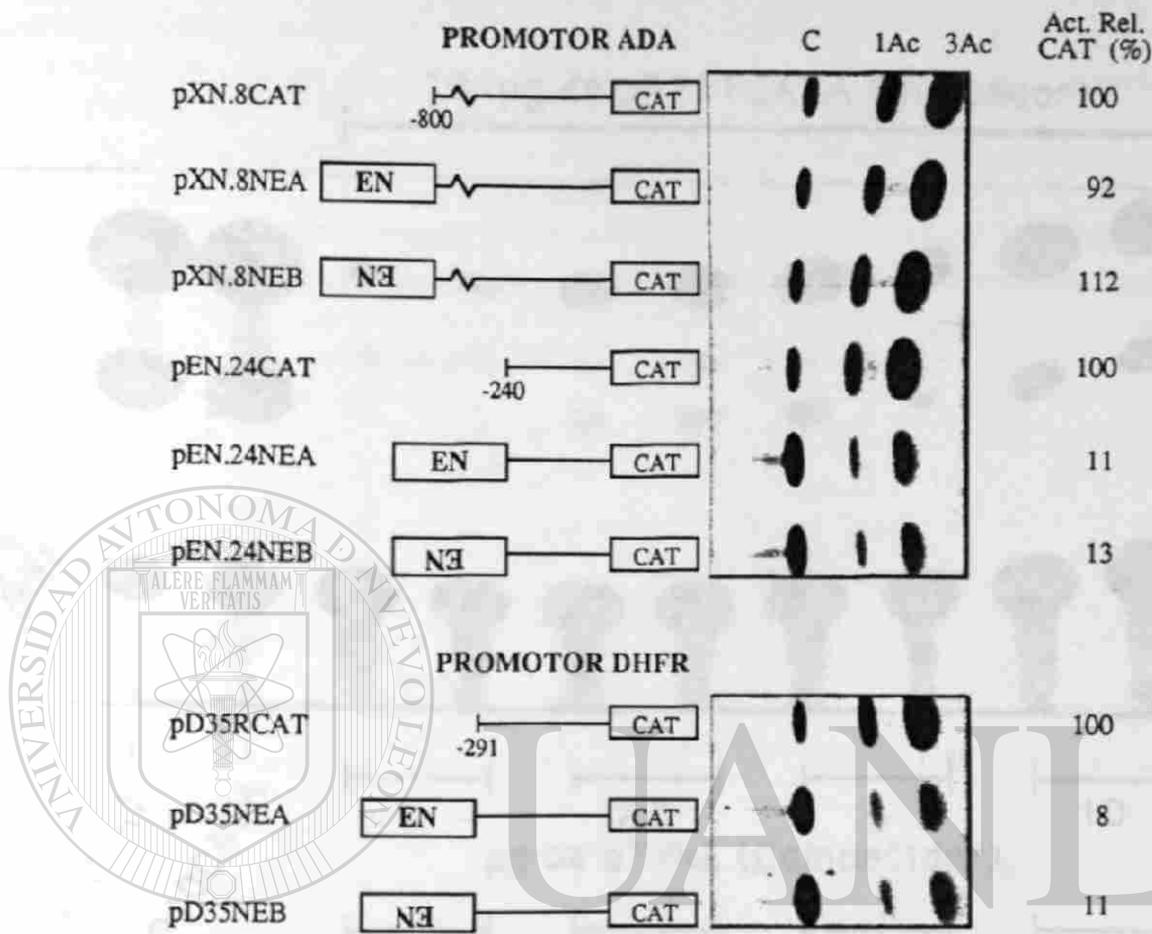
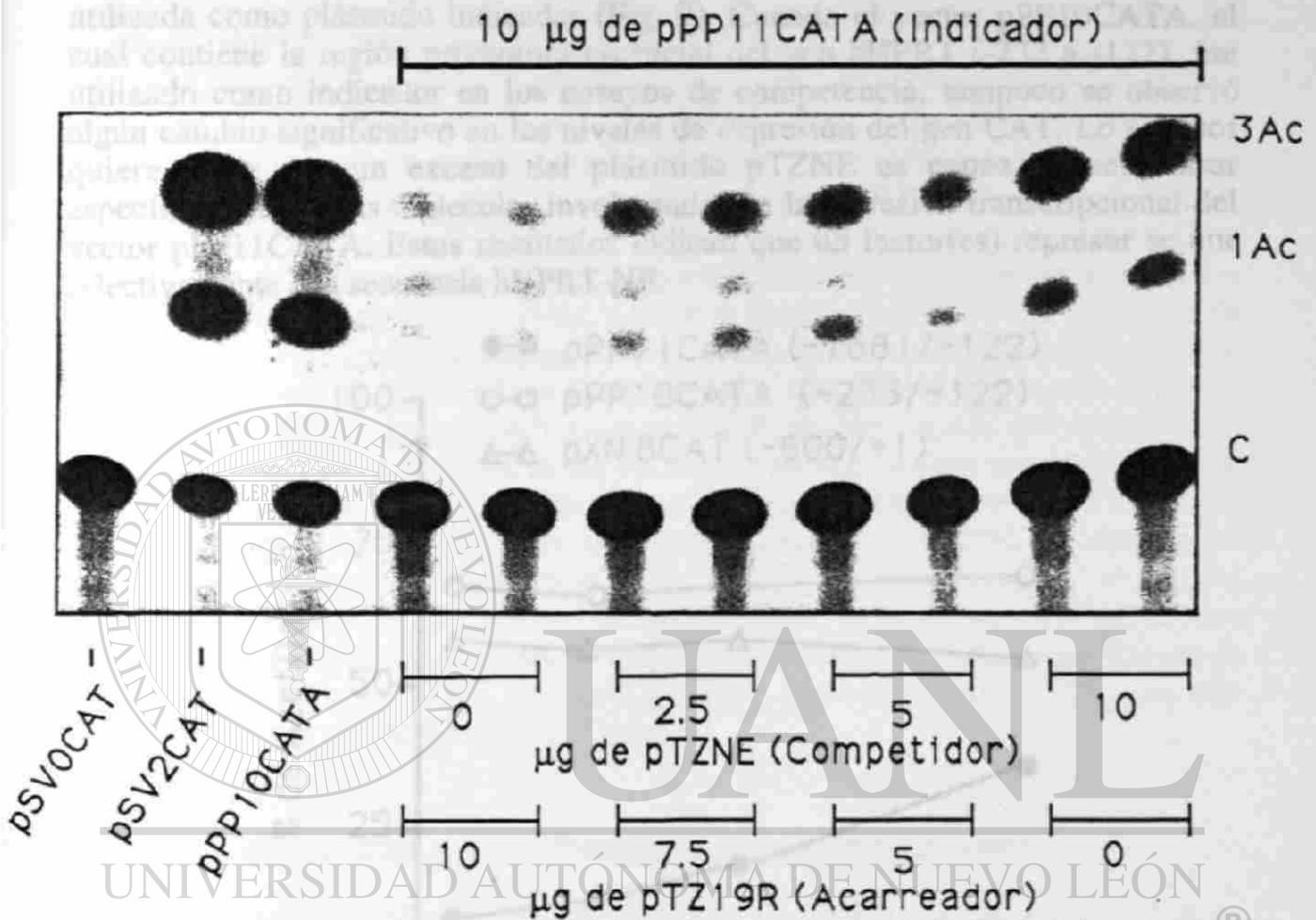


Figura 7. Efecto del elemento negativo (EN) sobre la actividad de promotores heterólogos. El elemento negativo del gen hHPRT (-570 a -388) fue insertado en ambas orientaciones en el sitio *NdeI* de los plásmidos pXN.8CAT y pEN.24CAT, los cuales contienen respectivamente 800 y 240 pb del promotor del gen ADA. Dicho elemento fue insertado también en el plásmido pD35RCAT, el cual contiene 297 pb del promotor del gen DHFR. Los plásmidos fueron transfectados en células RJK88 y se analizó la expresión del gen CAT. La actividad de CAT en las nuevas construcciones es expresada como un porcentaje de la actividad obtenida con las correspondientes clonas originales (Act. Rel., actividad relativa). Nótese que el elemento negativo funciona independientemente de su orientación, sin embargo, su actividad represora parece ser dependiente de distancia. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes. Las posiciones del cloranfenicol (C) y sus derivados acetilados (1-Ac y 3-Ac) se indican en la parte superior.

Posteriormente se demostró que este incremento en la actividad de CAT es específico para dicho plásmido, ya que no se observó ninguna elevación en la actividad del reportero cuando la construcción pSV0CAT (promotor ADA) fue utilizada como plásmido indicador. En el autorradiograma se muestra un ejemplo de tres experimentos independientes realizados por duplicado, en los cuales se utilizó como indicador un plásmido que contiene la región promotora del gen hHPRT (pPPP10CATA) al cual se le agregó un exceso del plásmido pTZNE en cantidades de 2.5, 5 y 10 µg. Este exceso de pTZNE produce un incremento en la actividad de CAT del plásmido pPPP10CATA. pSV2CAT y pPPP10CATA sirvieron como controles positivos y pSV0CAT como control negativo. El autorradiograma es un ejemplo representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican las posiciones del cloranfenicol (C) y sus derivados acetilados (1-Ac y 3-Ac).



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 8. Desrepresión del promotor del gen hHPRT por ensayos de competencia *in vitro*. Células RJK88 fueron transfectadas con una mezcla de un plásmido indicador pPPP10CATA (-1681 a -122) y cantidades crecientes de un plásmido competidor, pTZNE. La cantidad de DNA se mantuvo constante en todas las transfecciones al ajustar el total de DNA con un plásmido acarreador (pTZ19R). Se obtuvieron extractos celulares 48 h después de la transfección y se analizó la actividad de CAT. El plásmido competidor (pTZNE) fue construido al insertar la secuencia negativa del gen hHPRT (-570 a -388) en el plásmido pTZ19R. Nótese que un exceso de pTZNE produce un incremento en la actividad de CAT del plásmido pPPP10CATA. pSV2CAT y pPPP10CATA sirvieron como controles positivos y pSV0CAT como control negativo. El autorradiograma es un ejemplo representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican las posiciones del cloranfenicol (C) y sus derivados acetilados (1-Ac y 3-Ac).

Posteriormente demostramos que este incremento en la actividad de CAT es específico para dicho plásmido, ya que no se observó ninguna elevación en la actividad del reportero cuando la construcción pXN.8CAT (promotor ADA) fue utilizada como plásmido indicador (Fig. 9). Cuando el vector pPP10CATA, el cual contiene la región promotora esencial del gen hHPRT (-233 a -122), fue utilizado como indicador en los ensayos de competencia, tampoco se observó algún cambio significativo en los niveles de expresión del gen CAT. Lo anterior quiere decir que un exceso del plásmido pTZNE es capaz de secuestrar específicamente a las moléculas involucradas en la represión transcripcional del vector pPP11CATA. Estos resultados indican que un factor(es) represor se une selectivamente a la secuencia hHPRT-NE.

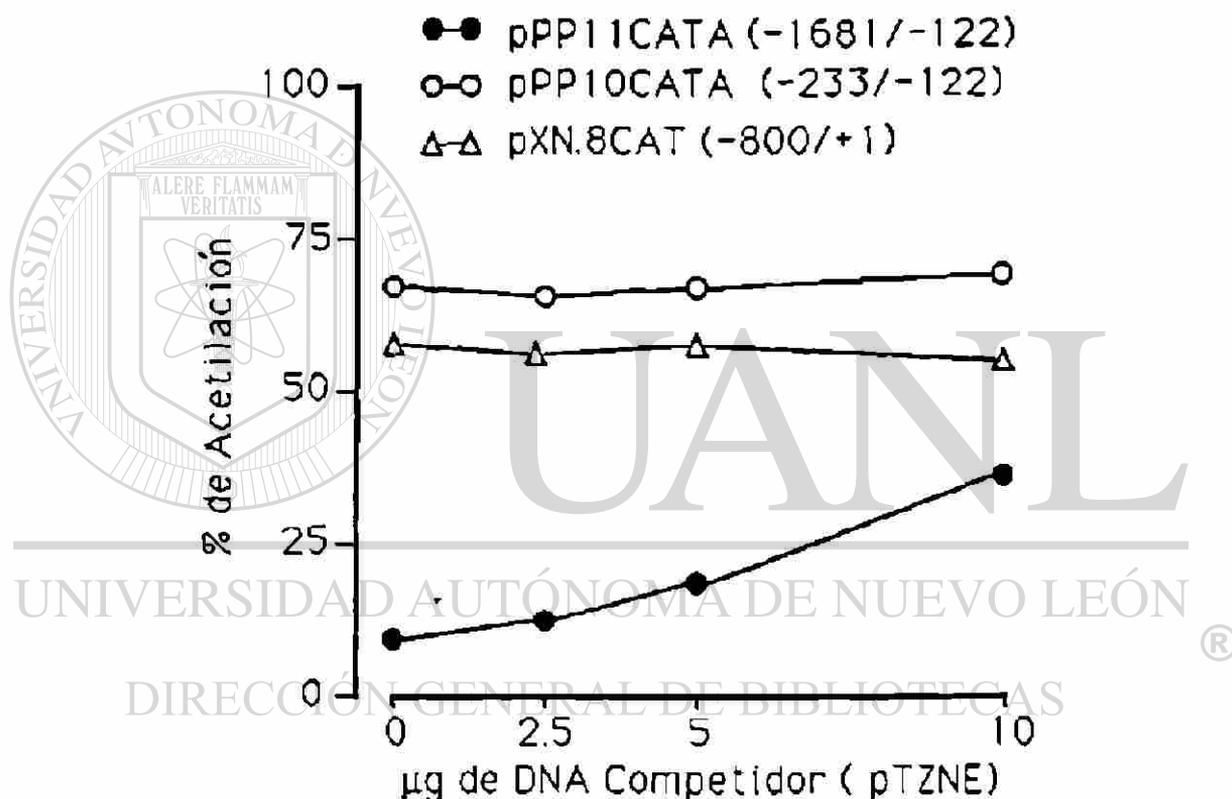


Figura 9. Interacción específica de un factor represor con el elemento negativo del gen hHPRT. 10 µg de los plásmidos indicadores pPP11CATA (-1681 a -122), pPP10CATA (-233 a -122) y pXN.8CAT (promotor del gen murino ADA), fueron independientemente cotransfectados con cantidades crecientes de un plásmido competidor, pTZNE, el cual contiene la secuencia represora del gen hHPRT (-570 a -388). La cantidad total de DNA transfectado en cada caso fue ajustada al agregar cantidades apropiadas de un plásmido acarreador (pTZ19R). El porcentaje de acetilación, producido por los plásmidos indicadores, representa el grado de conversión del cloranfenicol a sus derivados acetilados. La gráfica demuestra que a mayor cantidad de pTZNE se incrementa la expresión de CAT específicamente en pPP11CATA, probablemente debido al secuestro de un factor represor que interactúa con el elemento negativo. Cada punto en la gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes.

Generación de animales transgénicos

Para estudiar la expresión preferencial cerebral del gen humano HPRT, generamos ratones transgénicos portadores de diferentes fragmentos del promotor hHPRT fusionados al gen *lacZ* de *Escherichia coli*. Dicho gen fue seleccionado como reportero debido a que su expresión produce un color azul en presencia de un substrato cromogénico conocido como X-gal. Dada la ventaja de detectar el color azul *in situ* tanto en animales adultos como en etapas embrionarias, decidimos construir los vectores hHPRT-*lacZ* para analizar el efecto de diversos fragmentos hHPRT sobre la expresión de β -galactosidasa (Fig. 3). A partir de dichos vectores recuperamos cinco cartuchos de expresión, los cuales diferían en extensión y arreglo de la secuencia hHPRT. Para cada uno de los cartuchos se microinyectaron ~150 huevos fertilizados, los cuales fueron obtenidos a partir de 10 hembras superovuladas que habían sido apareadas con machos sementales. Aproximadamente el 60% de los cigotos sobrevivió a la microinyección y se reimplantaron en hembras pseudopreñadas a un promedio de 20 cigotos por animal. Aproximadamente el 25% de los cigotos reimplantados dió lugar a ratones recién nacidos, de los cuales únicamente el 20% resultaron ser transgénicos. Después de microinyectar todos los cartuchos de expresión obtuvimos un total de 16 ratones transgénicos, con cada uno de los cuales generamos familias independientes. Así pues, obtuvimos cuatro familias de la microinyección con RP112N, una con RP112R, cuatro con RP1600N, tres con RP800N y cuatro con RP1600 Δ NE (Tabla 1).

La región entre -233 y -122 funciona únicamente *in vitro*

Generamos varias familias de ratones transgénicos para determinar el papel de la región promotora esencial (-233 a -122) en la expresión preferencial cerebral del gen hHPRT, así como también para verificar el fenómeno de la bidireccionalidad promotora observada en cultivo celular. La secuencia hHPRT entre -233 y -122 fue fusionada en el extremo 5' del gen *lacZ* en el plásmido pC4AUG β Gal, tanto en orientación normal como en orientación reversa, con lo cual se generaron respectivamente las construcciones RP112N y RP112R. Cuatro familias transgénicas fueron creadas independientemente con RP112N y una con RP112R (Tabla 1). Sorprendentemente, no se detectó expresión del gen *lacZ* (β -galactosidasa) en ninguna de las líneas transgénicas, tal y como se demostró al analizar varios órganos y tejidos mediante una tinción cromogénica con X-gal (datos no mostrados). Aunque previamente demostramos que la región promotora esencial produce altos niveles de expresión del gen CAT, independientemente de su orientación (Fig. 4), estos resultados demuestran la incapacidad de esta región

para dirigir la expresión del reportero en ratones transgénicos y sugieren que se requiere de secuencias adicionales para obtener una adecuada expresión *in vivo*.

TABLA 1. GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

TRANSGEN	LINEA	NO. DE COPLAS*	Expresión de β-galactosidasa (X-Gal)	
			CEREBRO	OTROS ORGANOS
RP112N	DRL-554	16	-	-
	DRL-555	6	-	-
	DRL-558	21	-	-
	DRL-559	3	-	-
RP112R	DRL-565	2	-	-
RP1600N	OVE159	4	Ca	-
	DRL-41	19	Ca	-
	DRL-52	ND	Ca	-
	DRL-55	28	Ca	-
RP800N	DRL-117	31	Hb,Hi	-
	DRL-132	18	Cb	-
	DRL-134	10	Hb,Hi	-
RP1600ΔNE	DRL-107	34	Ca,Cm	+
	DRL-164	3	-	+
	DRL-168	ND	-	+
	DRL-169	4	-	+

* El número de copias del transgen fue determinado por hibridación tipo Southern y densitometría.

Ca, cerebro anterior; Hb, habénula; Hi, hipocampo; Cb, cerebelo; Cm, cerebro medio.

El transgen RP1600N contiene secuencias nucleotídicas que dirigen la expresión hacia el sistema nervioso central

Para determinar la influencia de las secuencias distales de la región promotora (-233 a -122) sobre la expresión preferencial neuronal, generamos ratones transgénicos portadores del cartucho de expresión RP1600N, el cual contiene el gen *lacZ* bajo el control de la secuencia hHPRT de -1681 a -122 (Fig. 3). A pesar de que dicha secuencia dirige niveles muy bajos de expresión del gen CAT en cultivo celular (Fig. 4), probablemente debido a la presencia de un elemento negativo, nuestros estudios *in vivo* revelaron que esta secuencia contiene los elementos génicos necesarios para producir altos niveles de expresión de β -galactosidasa en varias regiones del sistema nervioso central. Diversos órganos de animales silvestres y transgénicos fueron analizados para examinar la distribución de β -galactosidasa mediante el ensayo cromogénico de X-gal. No se observaron indicios (tinción azul) de la expresión del transgen en hígado, corazón, pulmón, torax, bazo, estómago, páncreas, intestinos, riñón, músculo, piel y testículos (datos no mostrados). Sin embargo, los productos de la reacción cromogénica estuvieron presentes únicamente en el cerebro de ratones transgénicos. Se observó un patrón de expresión muy similar en cerebros provenientes de cada una de las familias transgénicas (Tabla 1, Fig. 10), lo cual sugiere que dicho patrón de expresión es independiente del sitio de integración de transgén en el DNA cromosómico (55). Una vez demostrada la similitud de la expresión entre las cuatro familias, se seleccionó la línea OVE159 para un análisis exhaustivo. La expresión fue prominente en la corteza cerebral, colículos inferiores y bulbo olfatorio. (Fig. 10, Fig. 11A,B). Secciones coronales revelaron tinción laminar en la neocorteza, con niveles elevados de expresión en la capa más interna de la corteza media y en las capas de células piramidales del hipocampo (Fig. 11C). Interesantemente, se observó una expresión intensa del gen *lacZ* en los ganglios basales (núcleo caudado y putamen, Fig. 11A,B,D), los cuales han sido postulados como las regiones posiblemente involucradas en las disfunciones motoras del síndrome de Lesch-Nyhan (90). No se observó tinción en el cerebelo ni en las estructuras de materia blanca, tales como el cuerpo calloso. Posteriormente comparamos el patrón de expresión cromogénico del gen *lacZ* con el patrón de expresión del gen HPRT murino, el cual fue obtenido mediante la técnica de hibridación *in situ*, al utilizar como sonda un fragmento del DNAC de la HPRT murina. Hibridaciones en secciones coronales, obtenidas de cerebro de ratones transgénicos (OVE159), revelaron altos niveles de RNAm de HPRT particularmente en los ganglios basales y en la corteza cerebral (Fig. 11E), lo cual correlaciona con la topografía de la expresión del gen *lacZ*. Resultados similares fueron obtenidos al utilizar secciones de ratones silvestres, mientras que no se detectó señal alguna al utilizar secciones cerebrales provenientes de ratones

mutantes $HPRT^-$ (Fig. 11F). Estudios inmunocitoquímicos con anticuerpos anti- β -galactosidasa demostraron que el gen *lacZ* fue expresado dentro de las neuronas (Fig. 11G), mientras que no se detectó ninguna inmunoreactividad al utilizar secciones cerebrales de ratones silvestres (Fig. 11H). Todos estos resultados indican que la secuencia de -1681 a -122 contiene elementos génicos esenciales para controlar la expresión preferencial neuronal del gen humano *HPRT*.

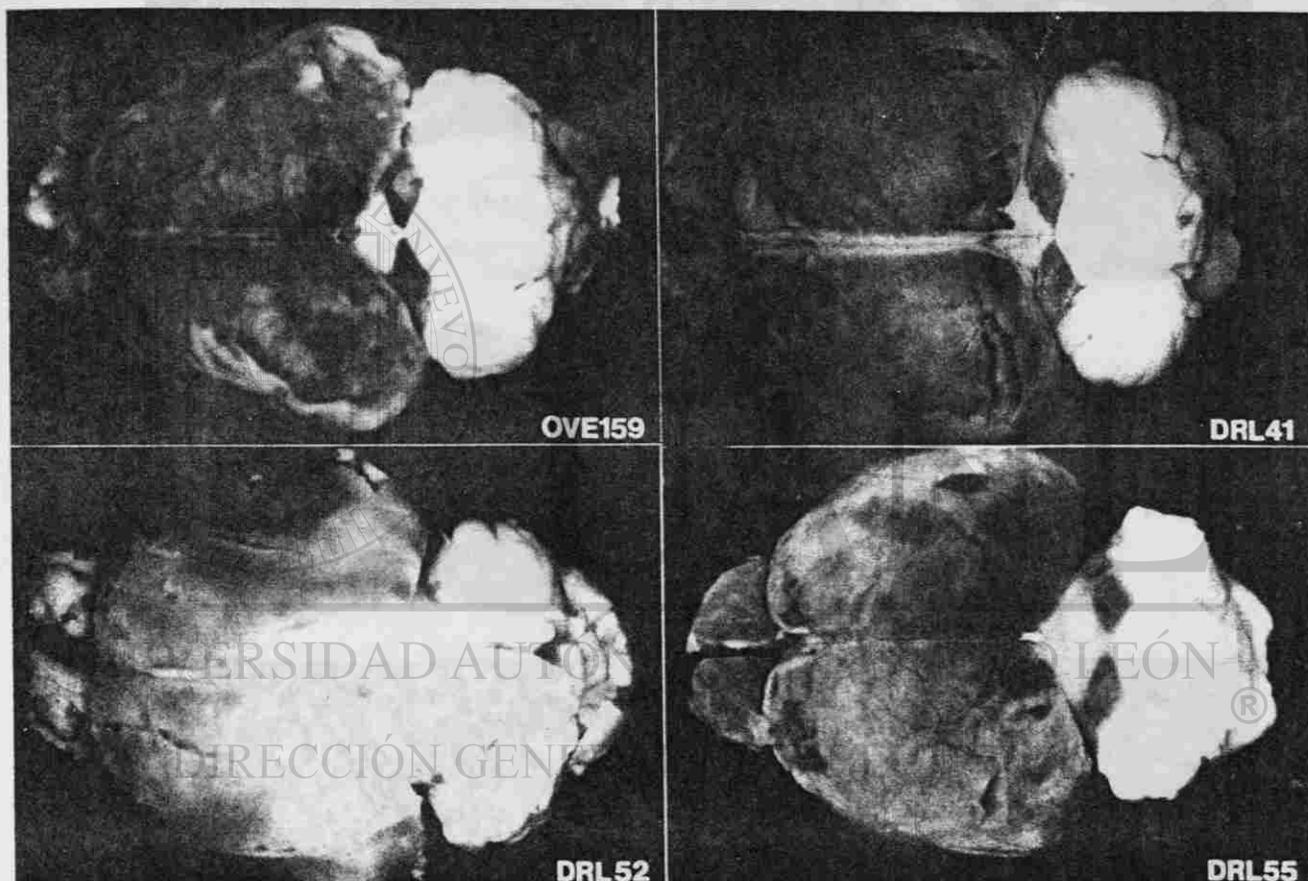


Figura 10. Análisis de la expresión del gen *lacZ* en cerebros de ratones transgénicos RP1600N. Cerebros de animales provenientes de cada una de las familias indicadas fueron sometidos a una tinción con X-gal para detectar la presencia de β -galactosidasa. Nótese que el patrón de expresión del gen reportero es cualitativamente similar en las cuatro líneas transgénicas.

El hipocampo; OB, bulbo olfatorio; y el resto del cerebro. Inmunocitoquímicas de β -galactosidasa en ratones transgénicos OVE159 (G) y en ratones silvestres. Inmunocitoquímica con anticuerpo anti- β -galactosidasa y los frutos.

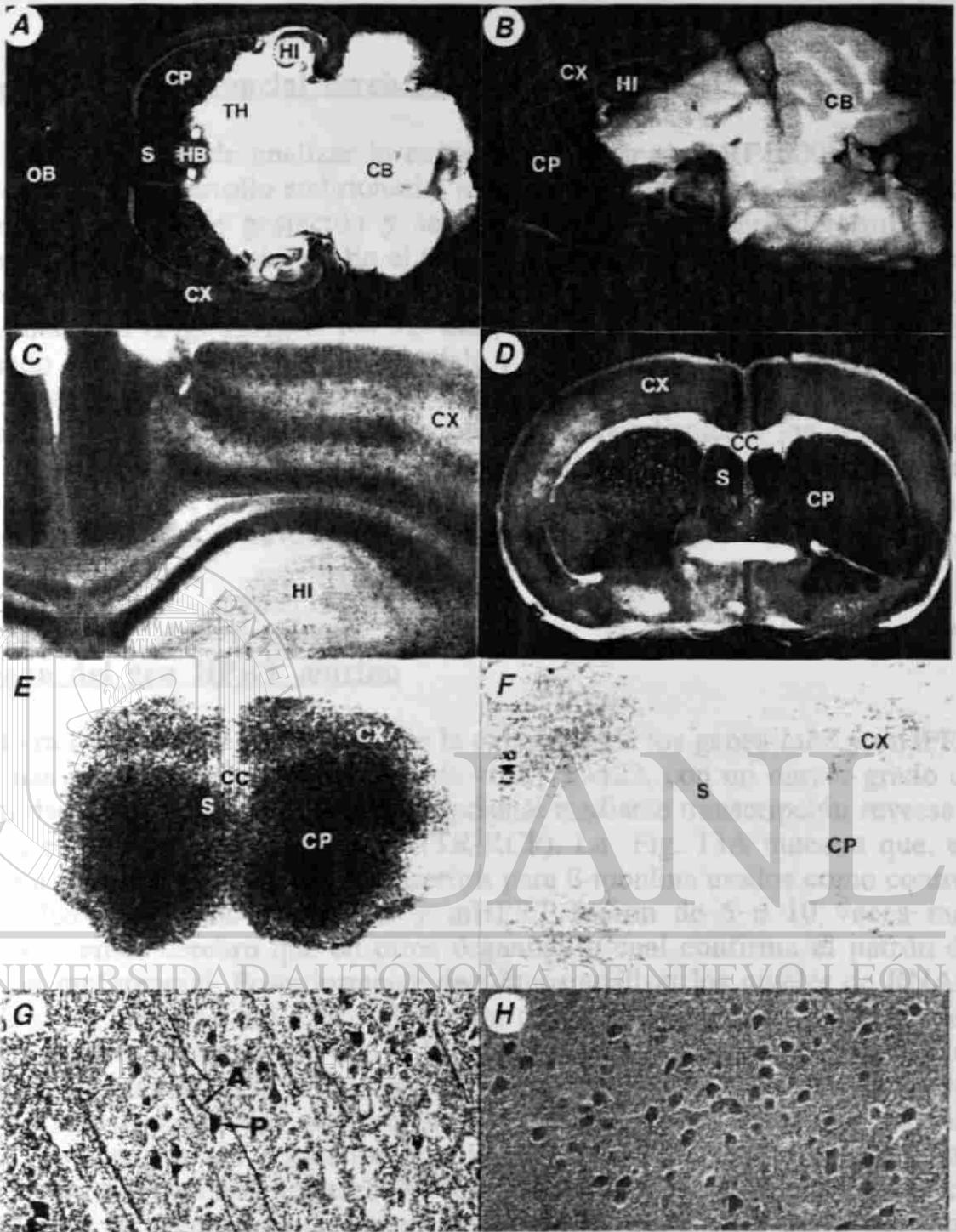


Figura 11. Análisis de la expresión de los genes *lacZ* y *HPRT* en cerebro de ratones transgénicos RP1600N. Paneles A a D representan secciones cerebrales de ratones adultos heterocigotos línea OVE159 después de haber sido teñidos con X-gal. (A) Sección horizontal. (B) Sección parasagital. (C) Sección coronal a nivel del hipocampo. (D) Sección coronal a nivel de los ganglios basales. (E y F) Detección del RNAm de hHPRT por hibridación *in situ* en secciones coronales de un ratón transgénico línea OVE159 (E, 1 día de exposición) y un ratón mutante *HPRT*⁻ (F, 3 días de exposición), el cual fue usado como control negativo. CB, cerebelo; CC, cuerpo calloso; CP, núcleo caudado y putamen; CX, corteza cerebral; HB, habénula; HI, hipocampo; OB, bulbo olfatorio; S, septum; TH, tálamo. G y H representan detección inmunocitoquímica de β -galactosidasa en secciones cerebrales de un ratón transgénico línea OVE159 (G) y un ratón silvestre cepa FVB/N (H, control negativo) mediante la técnica de inmunoamplificación con oro y plata. Las células negras indican inmunoreactividad para β -galactosidasa y las flechas indican axones (A) y pericariotes (P).

La expresión preferencial cerebral se manifiesta antes del nacimiento

Con el objeto de analizar la expresión del transgen RP1600N (-1681 a -122) durante el desarrollo embrionario, se obtuvieron embriones heterocigotos a diferentes tiempos de gestación y se tiñeron con X-gal para determinar la distribución de β -galactosidasa. En el más temprano estadio examinado, 8.5 días, los productos de la reacción cromogénica fueron claramente confinados a las crestas neurales (Fig. 12A). A los 9.5 días, el transgen fue predominantemente expresado en las estructuras del telencéfalo y el diencéfalo (Fig. 12B). Desde los 12.5 días hasta la etapa neonatal, la expresión del gen reportero fue prominentemente observada en las regiones correspondientes a los hemisferios cerebrales y la parte frontal del cerebro (Fig. 12D,E). Estos resultados sugieren que la enzima HPRT debe jugar un papel muy importante en el SNC desde los primeros estadios del desarrollo embrionario (-1861 a -122).

La expresión del transgen RP1600N es similar a la expresión endógena del gen HPRT murino

Para comparar la distribución de la expresión de los genes *lacZ* y mHPRT en ratones portadores de la secuencia de -1681 a -122, con un mayor grado de sensibilidad, hicimos un análisis transcripcional mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP). La Fig. 13A muestra que, en relación a la ubicua población de transcritos para β -tubulina usados como control interno, los transcritos para *lacZ* y mHPRT fueron de 5 a 10 veces más abundantes en el cerebro que en otros órganos, lo cual confirma el patrón de expresión preferencial. Posteriormente decidimos analizar los niveles de RNAm en diversas estructuras del SNC. El RNAm de *lacZ* fue más abundante en los ganglios basales, corteza cerebral e hipocampo, seguido del bulbo olfatorio, colículos e hipotálamo (Fig. 13B). Niveles significativamente más bajos de dicho transcrito fueron detectados en el cerebelo, puente, médula oblongada y médula espinal. Este patrón de transcripción fue muy similar al del gen endógeno mHPRT con la excepción del cerebelo, donde los niveles de RNAm del gen *lacZ* no fueron tan elevados. Esta discrepancia sugiere que secuencias adicionales, no incluidas en el transgen RP1600N, pudieran estar involucradas en la regulación del gen HPRT dentro de los compartimientos cerebelares.

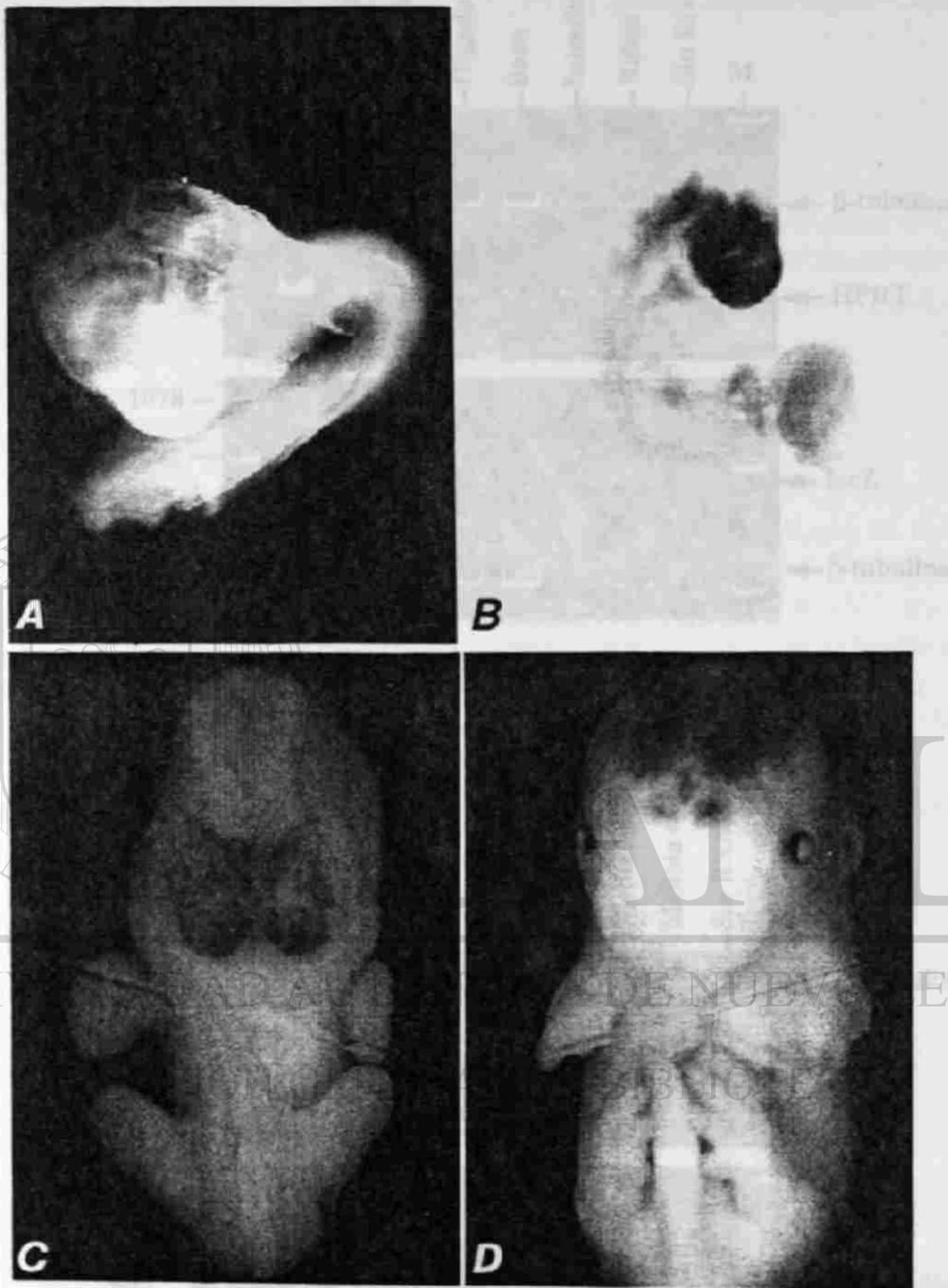


Figura 12. Análisis de la expresión de β -galactosidasa en ratones transgénicos durante el desarrollo embrionario. Las figuras corresponden a embriones transgénicos heterocigotos portadores de la construcción RP1600N (línea OVE159) obtenidos a los 8.5 (A), 9.5 (B), 12.5 (C) y 15 (D) días de gestación.

Las secuencias entre... especificidad neuronal... para la... que la... -121... para dirigir la... elementos entre local... diseñamos el cartucho... las familias transgénicas... analizaron animales tras... colocación azul... con X-gal, sin embargo... de la hipótesis de la... transgénica de la línea... financiamiento... mil millones de dólares... p... la captación... de la secuencia... el parpadeo...

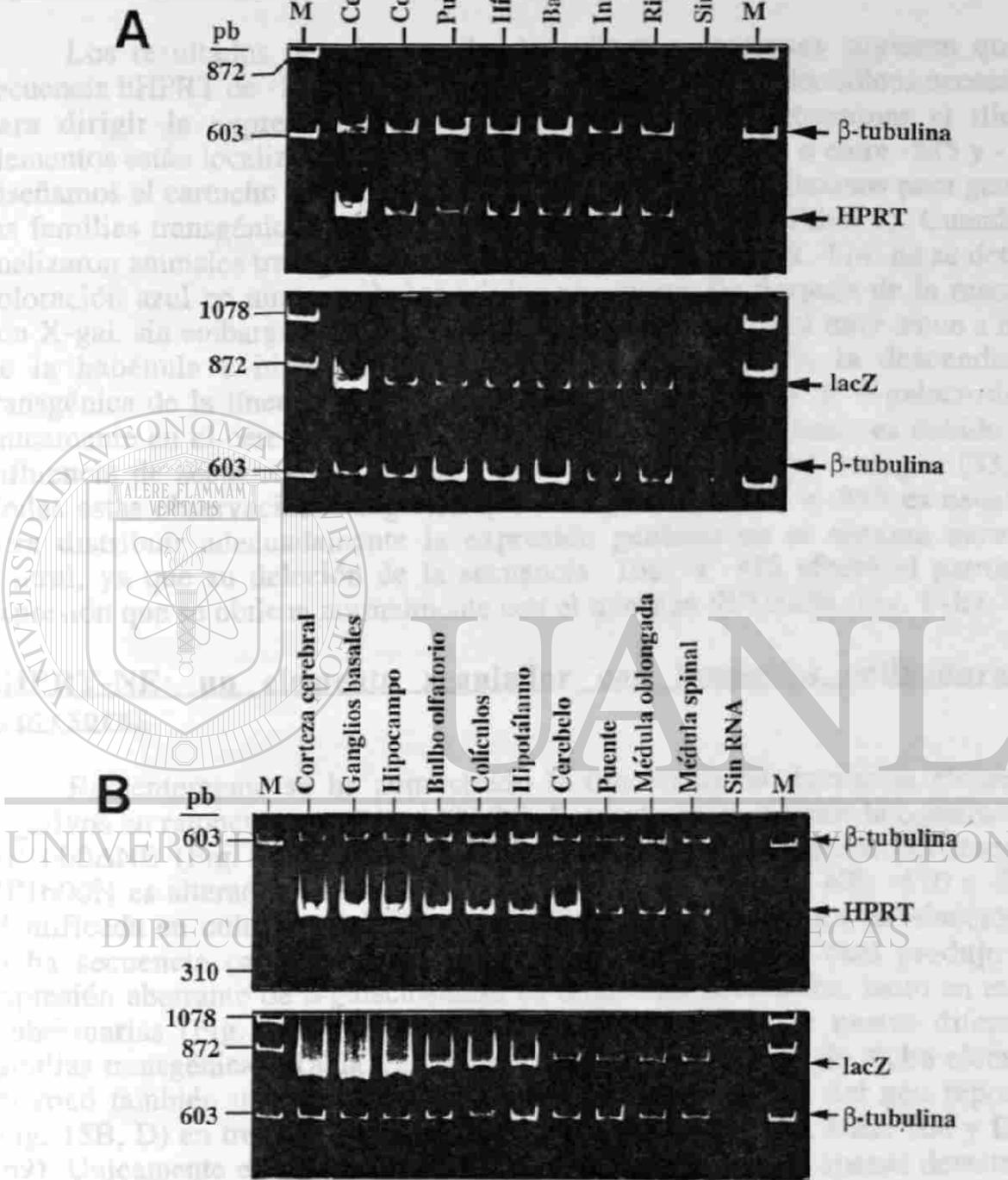


Figura 13. Análisis transcripcional de los genes *lacZ* y *mHPRT* en ratones transgénicos portadores de la construcción RP1600N. Se obtuvo RNA total de diversos órganos (A) y áreas seleccionadas del SNC (B) y se analizaron los niveles transcripcionales mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa. Los tamaños esperados de los productos *lacZ*, *HPRT* y β -tubulina (control interno) son 822, 418 y 650 pb, respectivamente.

Las secuencias entre -1681 y -885 son requeridas para la especificidad neuronal

Los resultados descritos en las tres últimas secciones sugieren que la secuencia hHPRT de -1681 a -122 contiene los elementos nucleotídicos necesarios para dirigir la expresión preferencial cerebral. Para determinar si dichos elementos están localizados entre las posiciones -1681 y -885 o entre -885 y -122, diseñamos el cartucho de expresión RP800N (Fig. 3) y lo utilizamos para generar las familias transgénicas DRL-117, DRL-132 y DRL-174 (Tabla 1). Cuando se analizaron animales transgénicos de las líneas DRL-117 y DRL-174, no se detectó coloración azul en ninguno de los tejidos no neuronales después de la reacción con X-gal, sin embargo, en el cerebro se observó un color azul muy tenue a nivel de la habénula e hipocampo (Fig. 14C). Por otra parte, la descendencia transgénica de la línea DRL-132 exhibió niveles detectables de β -galactosidasa únicamente en el cerebelo (células de Purkinje), lo cual creemos es debido a la influencia de secuencias adjuntas al sitio de integración del transgen (33,83). Todas estas observaciones sugieren que la región de -1681 a -885 es necesaria para distribuir adecuadamente la expresión genética en el sistema nervioso central, ya que su delección de la secuencia -1681 a -122 afectó el patrón de expresión que se obtiene normalmente con el transgen RP1600N (Fig. 14B).

hHPRT-NE: un elemento regulador con funciones activadoras y represoras

Recientemente se ha demostrado la funcionalidad de varios elementos negativos en ratones transgénicos (87,92). Por lo tanto generamos la construcción RP1600 Δ NE (Fig. 3) para investigar si el patrón de expresión del transgén RP1600N es alterado cuando la secuencia represora (hHPRT-NE; -570 a -388), identificada en cultivo celular, es específicamente deletada. La eliminación de dicha secuencia causó una desrepresión del gen *lacZ*, lo cual produjo una expresión aberrante de β -galactosidasa en tejidos no neuronales, tanto en etapas embrionarias (Fig. 15B, D), como en animales adultos de cuatro diferentes familias transgénicas (Tabla 1). Interesantemente, la delección de dicho elemento provocó también una pérdida total de la expresión cerebral del gen reportero (Fig. 15B, D) en tres de cuatro líneas transgénicas (DRL-164, DRL-168 y DRL-169). Únicamente en la línea DRL-107 se observaron niveles apenas detectables de β -galactosidasa en algunas estructuras del cerebro medio y cerebro anterior, lo cual creemos es debido a la influencia de las secuencias que flanquean el sitio de integración del transgen (33), en esta familia en particular. Así que tomando en consideración los datos descritos en la sección anterior, proponemos que por lo menos dos regiones nucleotídicas están involucradas en la expresión preferencial

tisular del gen hHPRT. Una región distal, localizada entre las posiciones -1681 y -885, es aparentemente necesaria para especificar la distribución de la expresión genética en diversas estructuras cerebrales. La otra región corresponde a la secuencia hHPRT-NE, la cual es necesaria no solamente para dirigir altos niveles de expresión hacia el cerebro, sino que también es necesaria para reprimir la actividad del gen HPRT en órganos que requieren niveles basales de expresión.

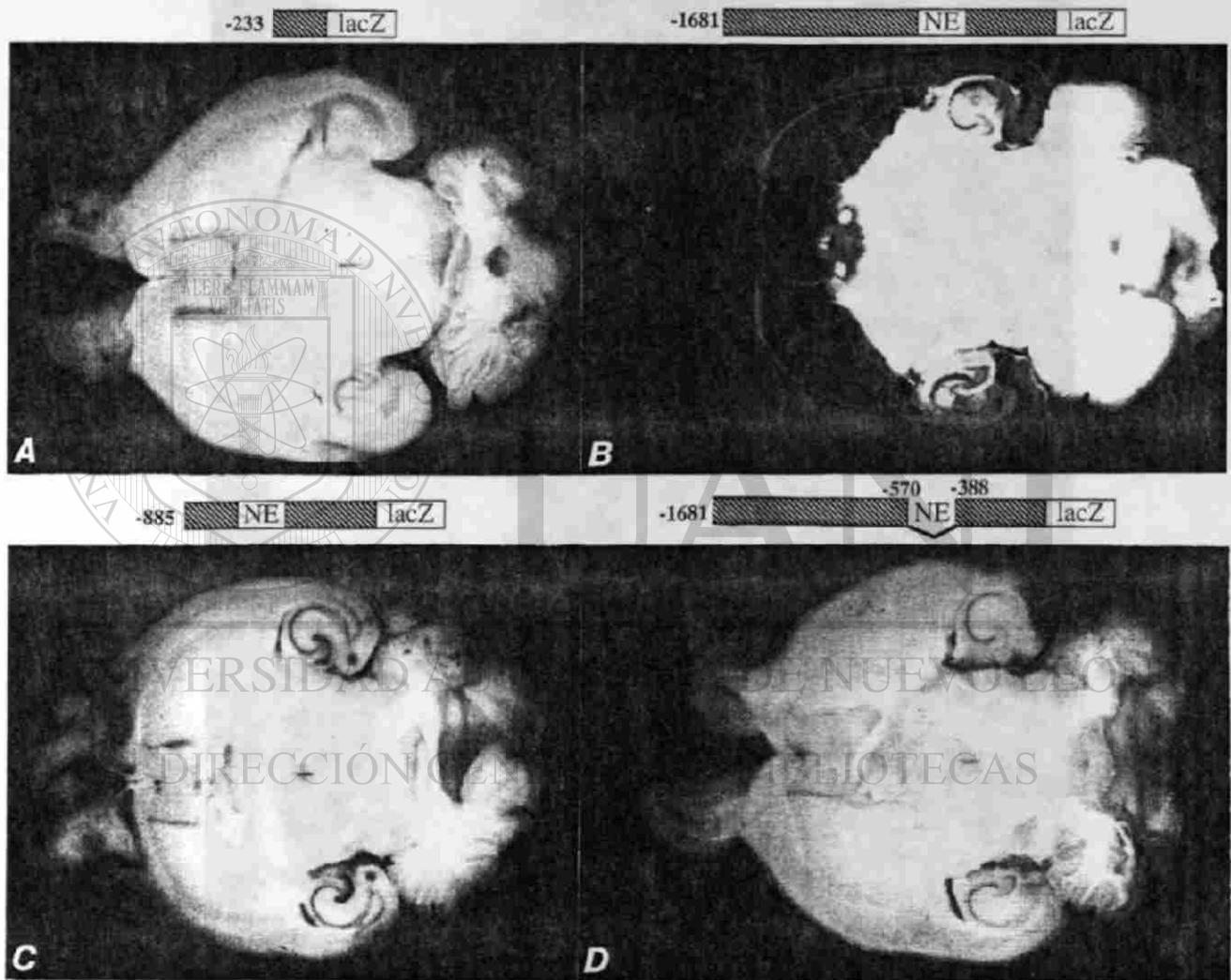


Figura 14. Expresión aberrante del gen lacZ en ratones transgénicos portadores de la construcción RP1600N. A y C corresponden a ratones portadores de la construcción RP112N y RP800N, respectivamente.

Figura 14. Detección de β -galactosidasa en el SNC de ratones transgénicos portadores de diferentes cartuchos hHPRT-lacZ. Las figuras representan secciones horizontales de ratones adultos portadores de las construcciones RP112N (A), RP1600N (B), RP800N (C) y RP1600 Δ NE (D), después de haber sido sometidos a una tinción con X-gal. En la parte superior de las figuras se esquematizan los cartuchos de expresión correspondientes.

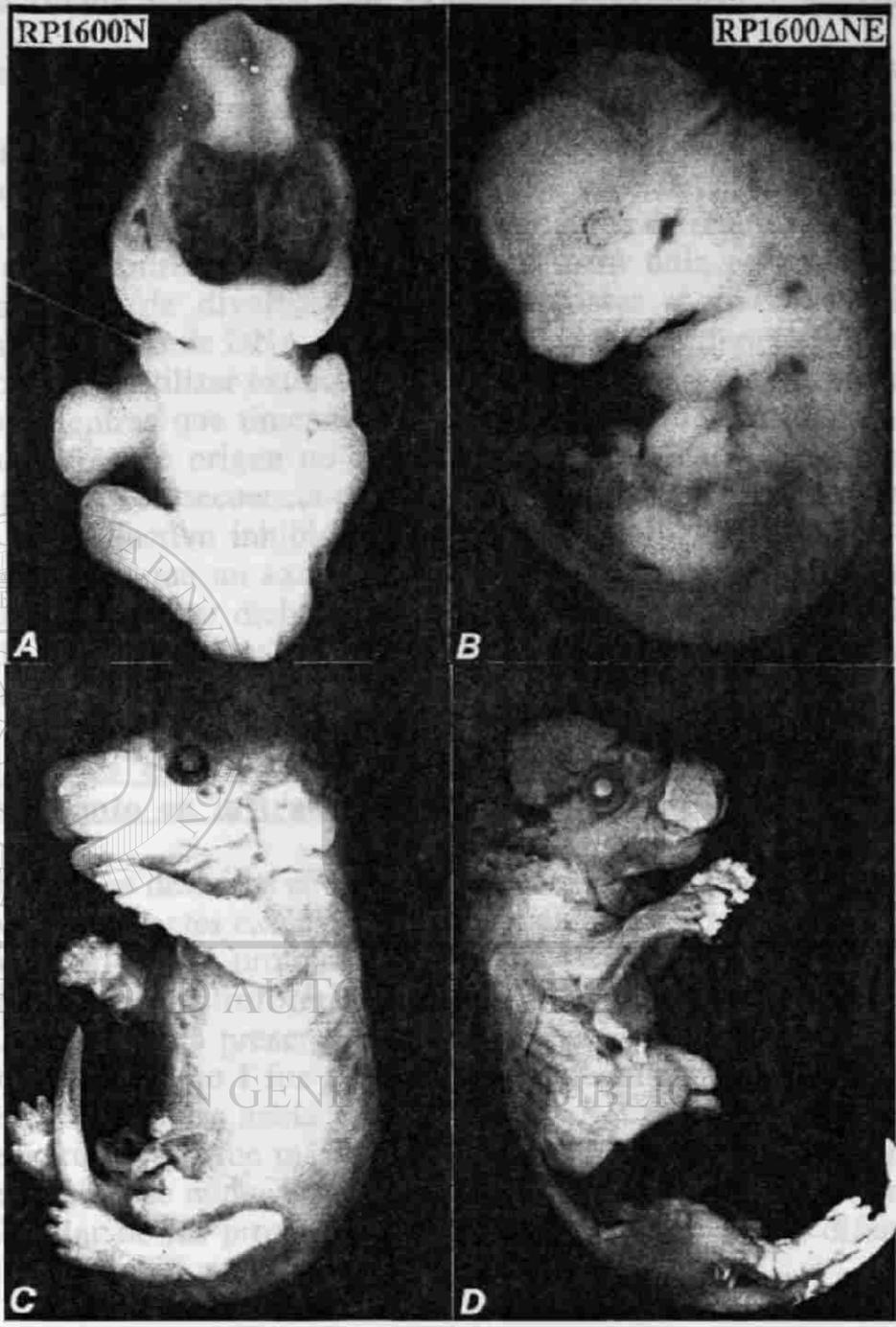
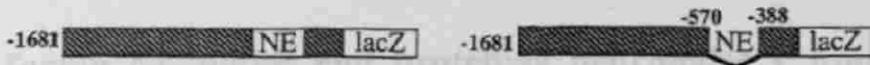


Figura 15.- Expresión aberrante del gen *lacZ* en ratones transgénicos portadores de la construcción **RP1600 Δ NE**. A y C corresponden a embriones transgénicos RP1600N recuperados a los 12.5 y 17 días de gestación, respectivamente. B y D corresponden a embriones RP1600 Δ NE obtenidos al mismo tiempo de gestación. En la parte superior se esquematizan los cartuchos de expresión correspondientes. Nótese que la delección del elemento negativo (NE) causó una pérdida de la expresión del gen *lacZ* en el cerebro y produjo expresión de β -galactosidasa en tejidos no neuronales.

hHPRT-NE forma complejos con proteínas neuronales y ubicuas

Puesto que los estudios en animales transgénicos revelaron que la secuencia hHPRT-NE es importante no solamente para amplificar la expresión en el SNC sino también para reprimir la transcripción en tejidos no neuronales, decidimos investigar la existencia de proteínas nucleares que pudieran estar involucradas en esta función transcripcional. Así que mediante ensayos de retardo electroforético, examinamos la habilidad de dicha secuencia para unir proteínas nucleares obtenidas a partir de diversas fuentes neuronales y no neuronales. Dos prominentes complejos de DNA-proteínas, designados I (inferior) y II (superior), fueron detectados al utilizar extractos de cerebro de ratón y células neuronales de rata (PC12), mientras que únicamente el complejo II fue detectado al utilizar extractos nucleares de origen no neuronal (Fig. 16). Estos complejos fueron debidos a interacciones secuencia-específicas, puesto que únicamente el exceso de hHPRT-NE no radiactivo inhibió la formación de los complejos con la sonda radiactiva, mientras que un exceso de secuencias heterólogas no relacionadas fracasó para competir por dichas interacciones. Estos resultados demuestran la existencia de factores nucleares, neuronales y ubicuos, capaces de interactuar específicamente con la secuencia hHPRT-NE.

El complejo I es específico de neuronas y su formación correlaciona con un incremento en la transcripción del gen hHPRT

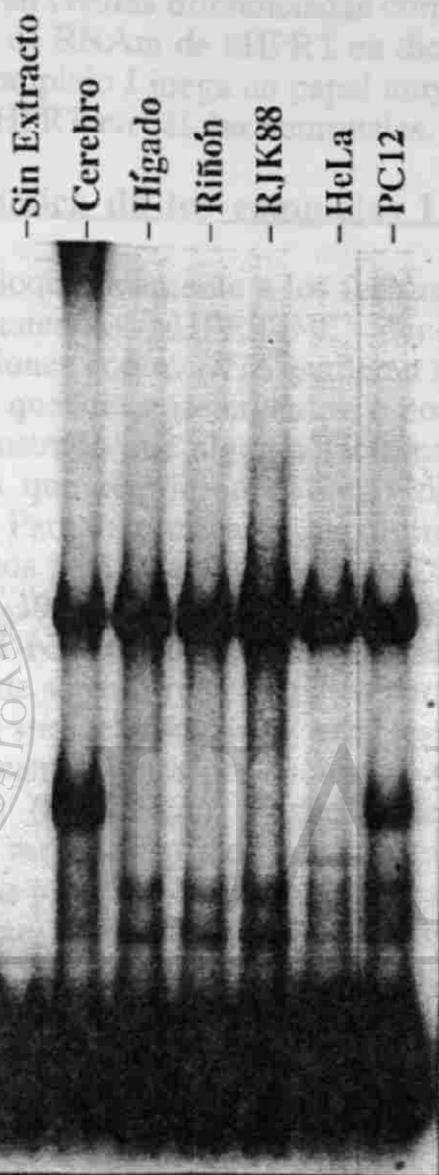
Los hallazgos descritos en la sección anterior sugieren que los factores del complejo I están presentes exclusivamente en células neuronales. Para confirmar el origen neuronal de las proteínas que interactúan en el complejo I, hicimos ensayos de retardo electroforético utilizando extractos de células humanas NT2/D1 cultivadas en la presencia o ausencia de ácido retinoico. La Fig. 17A muestra que el complejo I fue producido solamente cuando la diferenciación neuronal de dichas células había sido inducida por el ácido retinoico, aunque su migración electroforética fue más rápida que la del correspondiente complejo en extractos de cerebro de ratón. Esta discrepancia puede ser debida a diferencias en el peso molecular de las proteínas entre diferentes especies o a diferencias en algún proceso de modificación postraduccional.

Para investigar si la formación del complejo I pudiera estar asociada con la activación de la transcripción neuronal, comparamos los niveles de RNAm de hHPRT entre células NT2/D1 diferenciadas y no diferenciadas. El análisis transcripcional se llevó a cabo mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP). Para ello amplificamos el RNAm de hHPRT junto con el RNAm de G3PDH, el cual fue utilizado como un control interno del

proceso de amplificación. Incrementalmente, encontramos que la formación del complejo I en células dadas correlaciona con el incremento de 4 veces en los niveles de hHPRT en dichas células (Fig. 17B). Este hallazgo sugiere que el complejo I juega un papel muy importante en la regulación de la expresión del gen hHPRT.

Caracterización bioquímica

Para caracterizar bioquímicamente a los complejos I y II que interactúan con la sonda hHPRT-NE, se investigó si sus correspondientes asociaciones de proteínas se ven selectivamente afectadas por la adición de agentes que afectan la actividad de transcripción o de traducción. Se ha demostrado que los dominios aminoácidos que se encuentran en la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388) se agregaron a ambos complejos I y II, en los cuales los ácidos nucleicos de código o de control, acompañados de altas concentraciones de proteínas, se agregaron a la sonda hHPRT-NE. Como se esperaba, la formación de los complejos I y II se ve afectada por la adición de agentes que afectan la actividad de transcripción o de traducción.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS

Figura 16. Detección de proteínas nucleares que se unen a la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388). Ensayo de retardo electroforético que muestra la formación de complejos de DNA y proteínas al mezclar extractos nucleares, provenientes de los indicados órganos murinos y cultivos celulares, con la sonda hHPRT-NE. Las flechas indican las posiciones de los complejos I y II. La formación de dichos complejos fue visualizada mediante electroforesis y subsecuente autorradiografía.

proceso de amplificación. Interesantemente, encontramos que la formación exclusiva del complejo I en células diferenciadas correlaciona con un incremento de 4 veces en los niveles de RNAm de hHPRT en dichas células (Fig. 17B). Este hallazgo sugiere que el complejo I juega un papel muy importante en la activación de la expresión del gen hHPRT en células neuronales.

Caracterización bioquímica de los complejos I y II

Para caracterizar bioquímicamente a los factores neuronales y ubicuos que interactúan con la secuencia hHPRT-NE, decidimos investigar si sus correspondientes asociaciones con el DNA pudieran ser selectivamente afectadas por la adición de agentes quelantes, detergentes, o por preincubación a diferentes temperaturas. Se ha demostrado que algunos factores de transcripción contienen dominios aminoacídicos que requieren cationes divalentes para unirse a su secuencia consenso (29). Para determinar si las proteínas de los complejos I y II requerieren iones metálicos para interactuar con el DNA, se agregaron cantidades crecientes de EDTA (0.1-10 mM) a varias reacciones de unión, en las cuales la sonda radiactiva (hHPRT-NE) se mezcló con extractos nucleares de cerebro e hígado murino. Después de separar los productos por electroforesis, encontramos que los complejos I y II son relativamente estables a bajas concentraciones de EDTA, mientras que concentraciones por encima de 4 mM afectan la formación de ambas interacciones (Fig. 18A). Posteriormente encontramos que los complejos I y II pueden ser distinguidos por su sensibilidad al SDS. Como se muestra en la Fig. 18B, las proteínas del complejo II son gradualmente disociadas al aumentar la concentración de SDS pero son relativamente estables hasta concentraciones de 0.005%, mientras que los factores del complejo I son completamente disociados a concentraciones mayores de 0.002% de SDS. También pudimos distinguir ambas interacciones al estudiar la sensibilidad de las proteínas, cerebrales y hepáticas, a diferentes temperaturas antes de utilizarlas en reacciones de unión. La Fig. 18C muestra que los factores del complejo II son relativamente termoestables, puesto que la preincubación de los extractos hasta temperaturas de 62°C no afectó la formación de dicho complejo, mientras que los factores del complejo I son térmicamente inactivados a temperaturas mayores de 46°C. Todos estos resultados indican que aunque las proteínas de los complejos I y II son similarmente sensibles a la presencia de agentes quelantes, son diferencialmente afectadas por la presencia de SDS y exhiben diferentes perfiles de inactivación térmica. Estos hallazgos sugieren que los complejos I y II deben ser considerados como entidades bioquímicamente distintas.

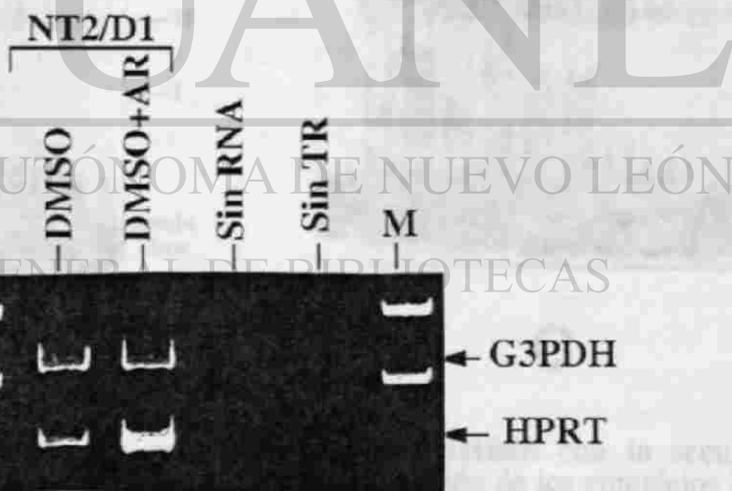
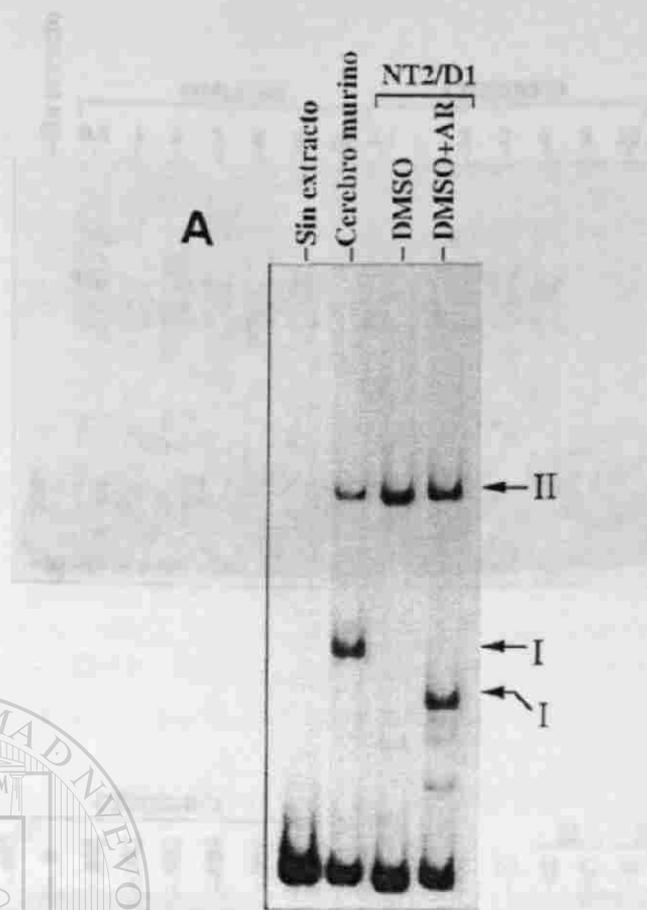
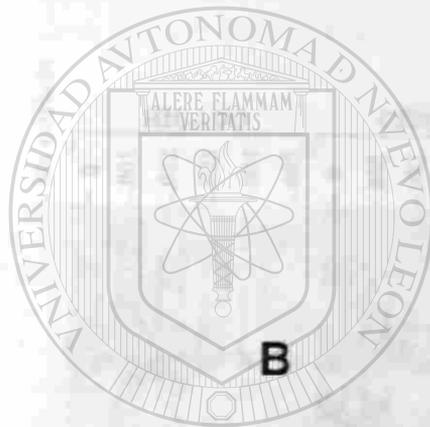
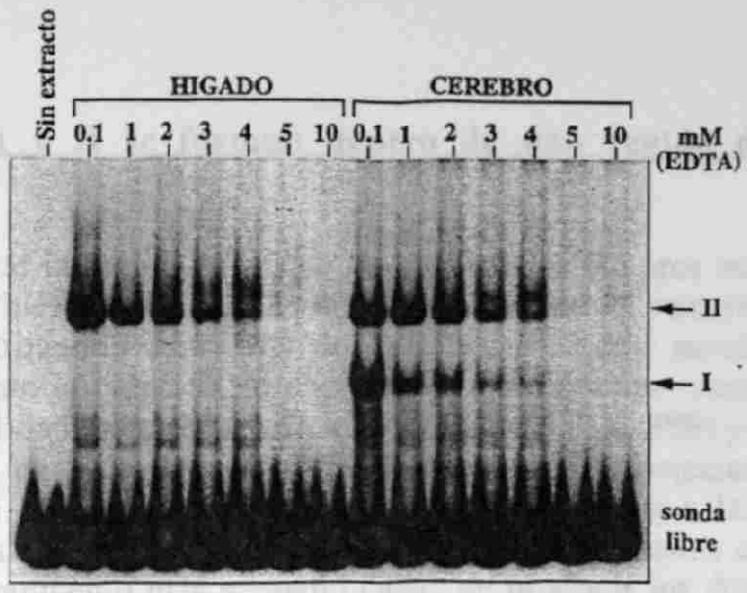


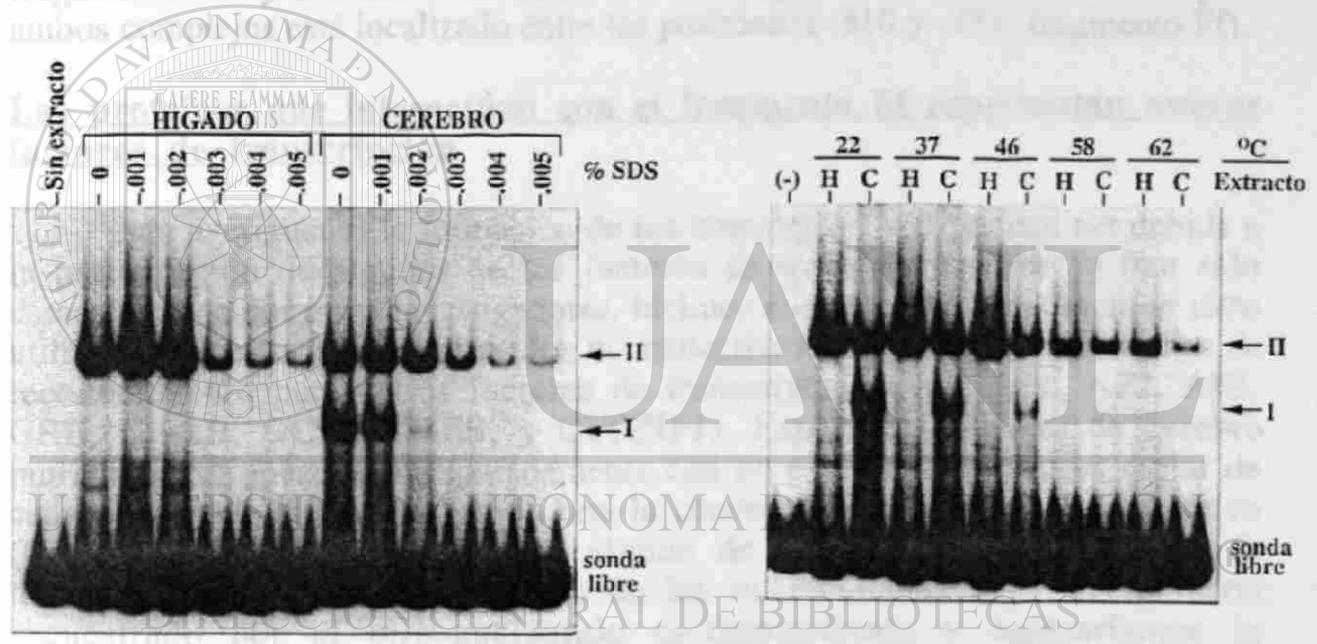
Figura 17. La formación del complejo I correlaciona con un incremento en la transcripción del gen HPRT durante la diferenciación neuronal. (A) Ensayo de retardo electroforético que muestra los eventos de unión al mezclar la sonda hHPRT-NE con extractos de células NT2/D1 cultivadas en la presencia o ausencia de ácido retinoico. Nótese que el complejo I no se forma con extracto de células no diferenciadas. El extracto de cerebro murino fue utilizado para comparar la migración de los complejos resultantes. Las flechas indican las posiciones de los complejos I y II. (B) RNA total obtenido de células NT2/D1 diferenciadas y no diferenciadas fue utilizado para analizar los niveles de hHPRT mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa. Los tamaños esperados de los productos G3PDH (control interno) y hHPRT son 983 y 794, respectivamente. Las posiciones de los marcadores de peso molecular (M), en pares de bases, se indican a la izquierda de la fotografía. DMSO, dimetil sulfóxido; AR, ácido retinoico.

Los complejos
de la secuencia
electroforético un
generamos mediante
que cubren la total
con radiactividad
Como se muestra
observaron en dos
Sin embargo, el
un fragmento de 60 pb
fragmentos Fb y Fc. Este
localizada con la

Para delimitar
de la secuencia
electroforético un
generamos mediante
que cubren la total
con radiactividad
Como se muestra
observaron en dos
Sin embargo, el
un fragmento de 60 pb
fragmentos Fb y Fc. Este
localizada con la



A



B

C

Figura 18. Análisis bioquímico de las proteínas que interactúan con la secuencia hHPRT-NE. (A y B) Efecto del EDTA y el SDS sobre la formación de los complejos I y II. Extractos nucleares de hígado y cerebro murino fueron incubados con la sonda hHPRT-NE en la presencia de cantidades crecientes de EDTA (A) o SDS (B) en la reacción de unión. (C) Efecto de la temperatura sobre la formación de los complejos I y II. Extractos nucleares de hígado (H) y cerebro (C) murino fueron preincubados por 5 min a las temperaturas indicadas antes de ser añadidos a reacciones de unión que contienen la sonda hHPRT-NE. Los complejos de DNA y proteínas fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% y posterior autorradiografía.

Los complejos I y II se forman dentro de una región de 60 pb: el fragmento Ff

Para delimitar la región en la que interactúan los factores nucleares dentro de la secuencia hHPRT-NE (182 pb), hicimos varios ensayos de retardo electroforético utilizando extractos de cerebro e hígado murino. Para ello generamos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, varios fragmentos que cubren la totalidad de la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388) y los marcamos con radiactividad para usarlos separadamente en varias reacciones de unión. Como se muestra en la Fig. 19, las propiedades de unión a las proteínas se observaron en dos de cuatro fragmentos de 90 pb, identificados como Fb y Fc. Sin embargo, el fragmento más pequeño capaz de producir los dos complejos es un fragmento de 60 pb identificado como Ff, el cual está contenido dentro de los fragmentos Fb y Fc. Estos resultados indican que el sitio de formación para ambos complejos está localizado entre las posiciones -510 y -451 (fragmento Ff).

Las proteínas que interactúan con el fragmento Ff representan nuevos factores de transcripción

Para averiguar si la formación de los complejos I y II pudiera ser debida a la participación de algunos de los factores de transcripción que ya han sido caracterizados por otros investigadores, hicimos ensayos de competencia *in vitro* utilizando diversos oligonucleótidos no radiactivos que contenían secuencias de reconocimiento para varios factores de transcripción (Sp1, AP1, AP2, AP3, GRE, NF- κ B, OCT1, CREB, y CTF/NF1). Extractos nucleares de cerebro murino fueron mezclados separadamente con un exceso de 100 veces molar de cada oligonucleótido, en relación con la concentración de la sonda radiactiva (fragmento Ff). En caso de que alguno de los mencionados factores de transcripción estuviera involucrado en las interacciones, dicho factor sería secuestrado por el oligonucleótido correspondiente y esperaríamos la desaparición de las bandas radiactivas correspondientes a los complejos I y II. Como se muestra en la Fig. 20, ninguno de los oligonucleótidos competidores inhibió la formación de dichas interacciones, sin embargo la adición de 100 veces molar del fragmento Ff no radiactivo, inhibió la asociación de los complejos radiactivos I y II. Además, al hacer estudios computacionales (Transfactors, Intelligenetics) no encontramos ninguna similitud entre la secuencia Ff y secuencias que son sitios de unión para proteínas en otros genes (13). Estos resultados sugieren que los factores que interactúan con la región Ff representan nuevos reguladores transcripcionales.

DNA COMPETITION

(100 X) autor radiografía

Fa	Fb	Fc	Fd	Fe	Ff	Fg
-570/-481	-540/-451	-510/-421	-480/-388	-570/-510	-510/-451	-451/-388
(-) B L						

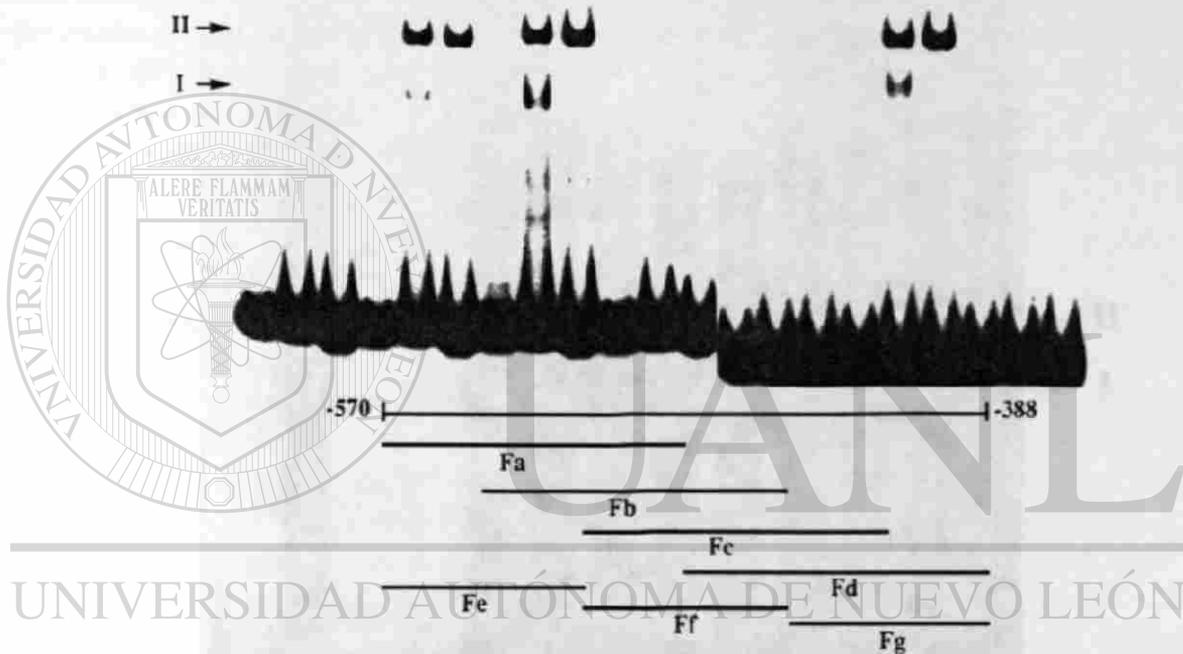
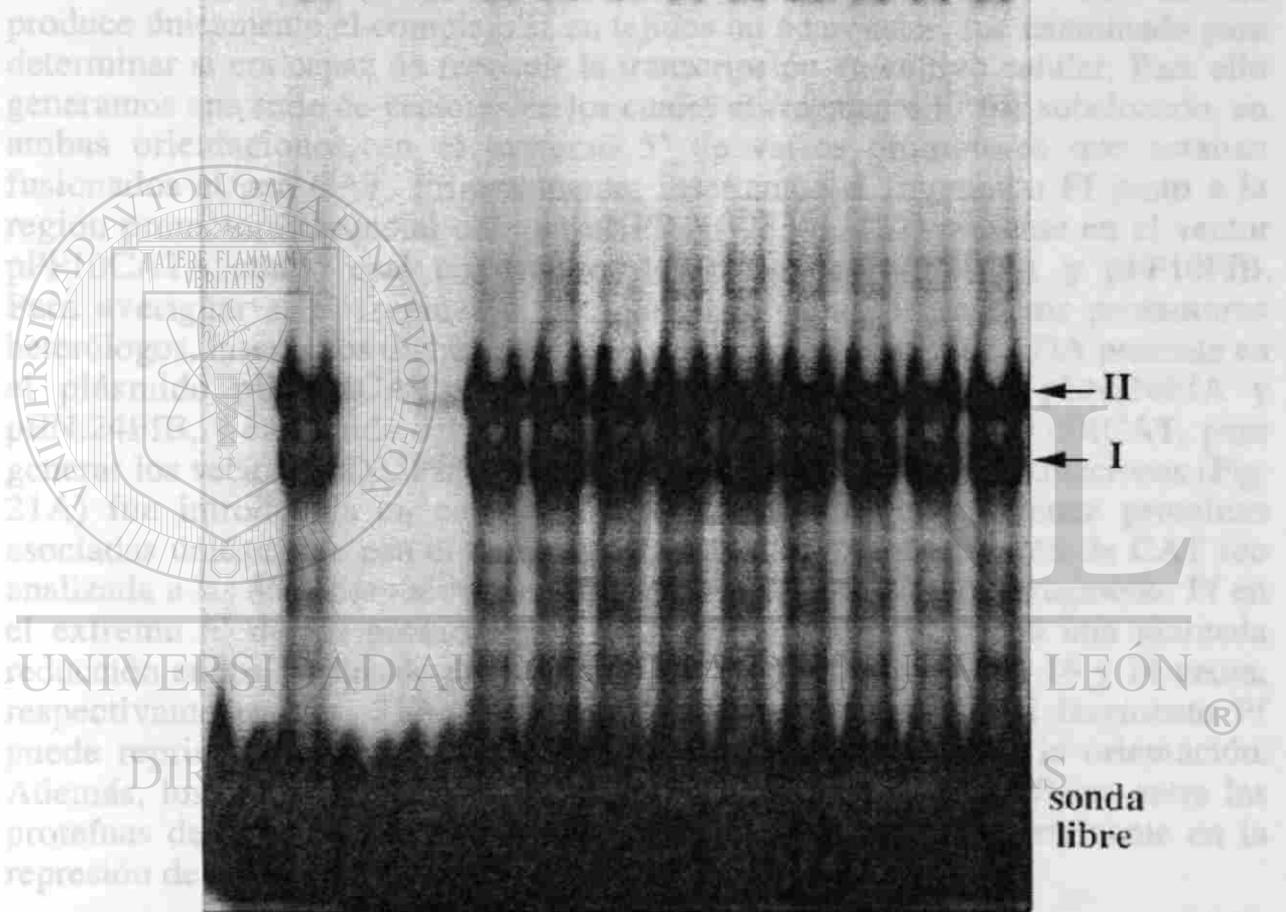


Figura 19. Localización de las regiones de unión a las proteínas dentro de la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388). Diferentes fragmentos que cubren la extensión de la secuencia hHPRT-NE fueron producidos mediante RCP y se marcaron radiactivamente. Cada uno de los fragmentos se analizó en reacciones de unión con extractos de cerebro (B) e hígado (L) murino y los productos resultantes se resolvieron por electroforesis. Los números en la parte superior indican la posición de cada uno de los fragmentos en relación al sitio de iniciación de la traducción. (-) indica ausencia de extracto nuclear. Las flechas indican la formación de los complejos obtenidos al utilizar los fragmentos que tienen la actividad de unión a las proteínas.

El complejo II es un modulador negativo de la expresión génica

Nuestros estudios en animales transgénicos indicaron que la secuencia hHPRT-NE (570-788) es responsable de la expresión en tejidos no neurales del complejo I de hHPRT (Fig. 20). El producto responsable de la expresión de hHPRT en el cerebro murino es el complejo II. Para determinar si era capaz de reconocer la secuencia de hHPRT, generamos una serie de sondas con los cuales se reemplazó en ambas orientaciones el extremo 5' de la secuencia de hHPRT.



GGAGCC) el sitio de unión a los principios de los transcritos I y II

Figura 20. Ensayos de competencia con oligonucleótidos que contienen secuencias de reconocimiento para diversos factores de transcripción. Un exceso de 100 veces molar de cada uno de los oligonucleótidos así indicados, también como de la secuencia Ff no radiactiva, fueron mezclados con extractos de cerebro murino antes de la adición de la sonda Ff radiactiva. Los productos de las reacciones de unión fueron analizados por electroforesis y autorradiografía. Nótese que la formación de los complejos I y II fue afectada únicamente por la acción de la proteinasa K o por un exceso de la secuencia Ff no radiactiva.

El complejo II es un modulador negativo de la expresión genética

Nuestros estudios en animales transgénicos indicaron que la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388) es requerida no solamente para conferir altos niveles de expresión en el cerebro sino también para reprimir la expresión genética en tejidos no neuronales. Habiendo establecido anteriormente que la formación del complejo I está asociada con un incremento en la transcripción neuronal del gen hHPRT (Fig. 17A, B), postulamos que la formación del complejo II pudiera ser responsable de disminuir la transcripción en células que exhiben niveles basales de HPRT. Para probar esta hipótesis, el fragmento Ff (-510 a -451), el cual produce únicamente el complejo II en tejidos no neuronales, fue examinado para determinar si era capaz de reprimir la transcripción en cultivo celular. Para ello generamos una serie de vectores en los cuales el fragmento Ff fue subclonado, en ambas orientaciones, en el extremo 5' de varios promotores que estaban fusionados al gen CAT. Primeramente, insertamos el fragmento Ff junto a la región promotora esencial del gen hHPRT (-233 a -122) presente en el vector pPP10CATA, con lo cual construimos los plásmidos pPP10FfA y pPP10FfB. Para averiguar si el fragmento Ff podría ser capaz de reprimir promotores heterólogos, insertamos dicha secuencia enseguida del promotor ADA presente en el plásmido pEN.24CAT, para generar las construcciones pEN.24FfA y pEN.24FfB, y enseguida del promotor DHFR en el plásmido pD35RCAT, para generar los vectores pD35FfA y pD35FfB. Cada una de estas construcciones (Fig. 21A) fue introducida en células RJK88, cuyos núcleos contienen proteínas asociadas únicamente con el complejo II (Fig. 16), y la producción de CAT fue analizada a las 48 h después de la transfección. La inserción del fragmento Ff en el extremo 5' de los promotores HPRT, ADA o DHFR, causó una marcada reducción en los niveles de expresión de CAT por factores de 18, 16 y 14 veces, respectivamente (Fig. 21A, B). Estos resultados indican que el fragmento Ff puede reprimir promotores heterólogos independientemente de la orientación. Además, los datos aquí presentados sugieren que la asociación física entre las proteínas del complejo II y la secuencia Ff es el principal determinante en la represión de la transcripción del gen hHPRT.

GGAAGCC: el sitio de unión a las proteínas de los complejos I y II

Para determinar los sitios de formación de los complejos I y II decidimos hacer un tamizaje nucleotídico a través de la secuencia hHPRT-NE, mediante ensayos de interferencia por metilación ("footprinting"). Dicha secuencia fue marcada separadamente en cada una de sus dos cadenas, parcialmente metilada y mezclada con extractos de proteínas nucleares de origen neuronal (cerebro murino y células NT2/D1 diferenciadas) y no neuronal (hígado murino y células

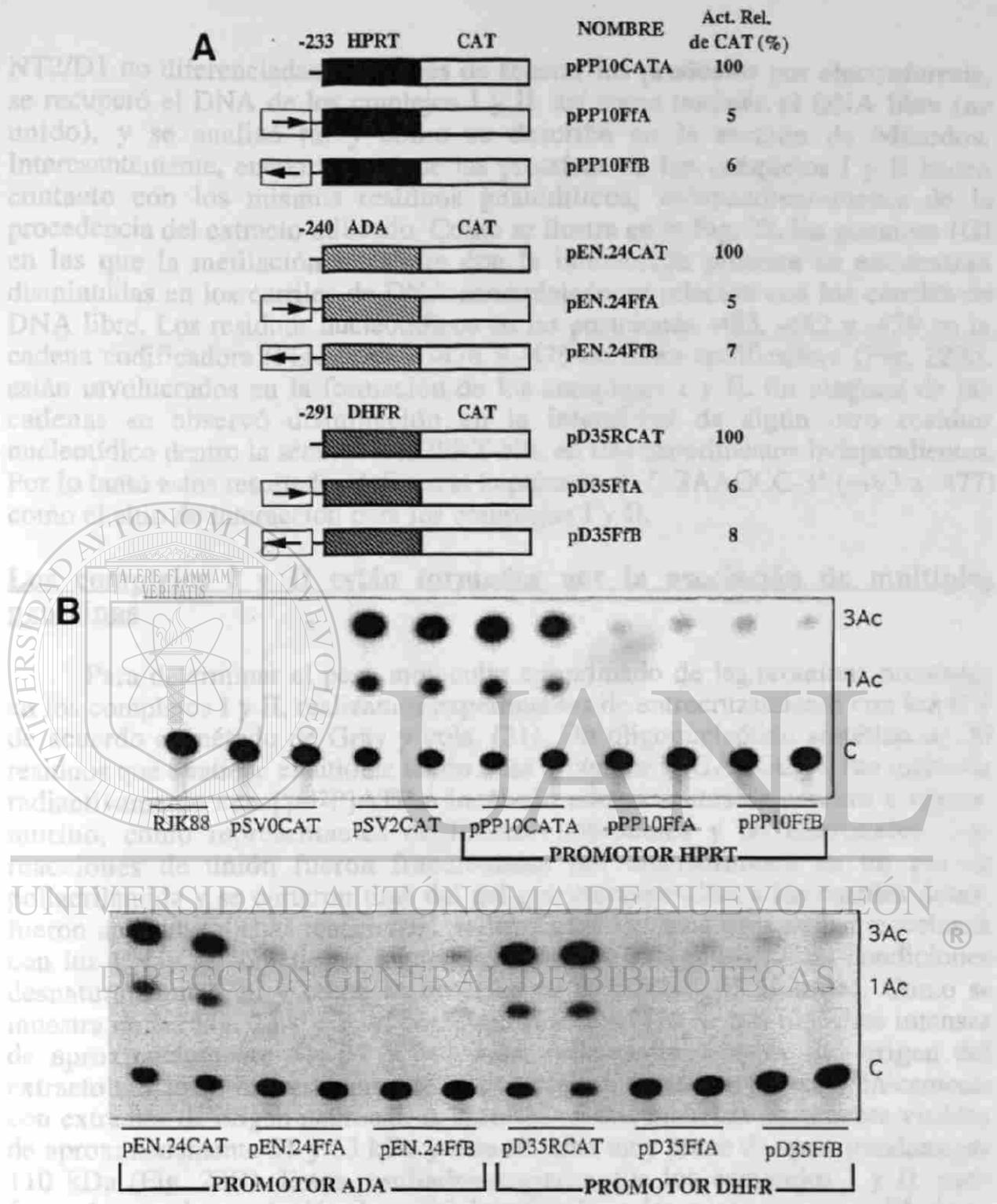


Figura 21. Análisis funcional del fragmento Ff en cultivo celular. (A) Efecto de la secuencia Ff sobre la actividad transcripcional de varios promotores de expresión constitutiva. El fragmento Ff (caja con flechas) fue clonado en ambas orientaciones en los plásmidos pPP10CATA, pEN.24CAT y pD35RCAT, y las construcciones resultantes fueron analizadas mediante transfección de células RJK88. La actividad de CAT de los nuevos vectores es expresada como un porcentaje de la actividad que se obtiene con la clona original correspondiente (Act. Rel., actividad relativa). Las flechas indican la orientación del fragmento Ff dentro de cada construcción. (B). Ejemplo representativo de los resultados obtenidos en tres experimentos de transfección realizados por duplicado. El carril RJK88 representa ensayos de CAT con células no transfectadas. pSV0CAT y pSV2CAT sirvieron como control negativo y positivo, respectivamente. Se indican las posiciones del cloranfenicol (C) y sus derivados acetilados (1Ac y 3Ac).

NT2/D1 no diferenciadas). Después de separar los productos por electroforesis, se recuperó el DNA de los complejos I y II, así como también el DNA libre (no unido), y se analizó tal y como se describe en la sección de Métodos. Interesantemente, encontramos que las proteínas de los complejos I y II hacen contacto con los mismos residuos guanidílicos, independientemente de la procedencia del extracto utilizado. Como se ilustra en la Fig. 22, las guaninas (G) en las que la metilación interfiere con la interacción proteica se encuentran disminuidas en los carriles de DNA acomplejado en relación con los carriles de DNA libre. Los residuos nucleotídicos en las posiciones -483, -482 y -479 en la cadena codificadora (Fig. 22A) y -478 y -479 en la no codificadora (Fig. 22B), están involucrados en la formación de los complejos I y II. En ninguna de las cadenas se observó disminución en la intensidad de algún otro residuo nucleotídico dentro la secuencia hHPRT-NE, en tres experimentos independientes. Por lo tanto estos resultados definen al heptámero 5'-GGAAGCC-3' (-483 a -477) como el sitio de interacción para los complejos I y II.

Los complejos I y II están formados por la asociación de múltiples proteínas

Para determinar el peso molecular aproximado de las proteínas presentes en los complejos I y II, realizamos experimentos de entrecruzamiento con luz UV de acuerdo al método de Gray y cols. (21). Un oligonucleótido sintético de 30 residuos que contiene el sitio de unión a las proteínas (GGAAGCC), fue marcado radiactivamente con [γ -³²P]ATP e incubado con extractos de cerebro e hígado murino, como representantes de fuentes neuronales y no neuronales. Las reacciones de unión fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida y se cortaron tiras del gel que correspondían a los carriles donde fueron aplicadas dichas reacciones. Se irradiaron los productos de las reacciones con luz UV y se sometieron a una electroforesis bidimensional en condiciones desnaturizantes tal y como se describe en la sección de Métodos. Como se muestra en las Fig. 23A y B, el complejo II se resolvió en tres manchas intensas de aproximadamente 51, 97 y 200 kDa, independientemente del origen del extracto utilizado. Interesantemente, el complejo I, el cual es formado únicamente con extractos de origen neuronal, se resolvió en dos manchas claramente visibles de aproximadamente 51 y 63 kDa y otra mancha muy tenue de aproximadamente 110 kDa (Fig. 23B). Estos resultados sugieren que los complejos I y II están formados por la asociación de múltiples proteínas, las cuales parecen diferir en naturaleza, abundancia y distribución tisular.

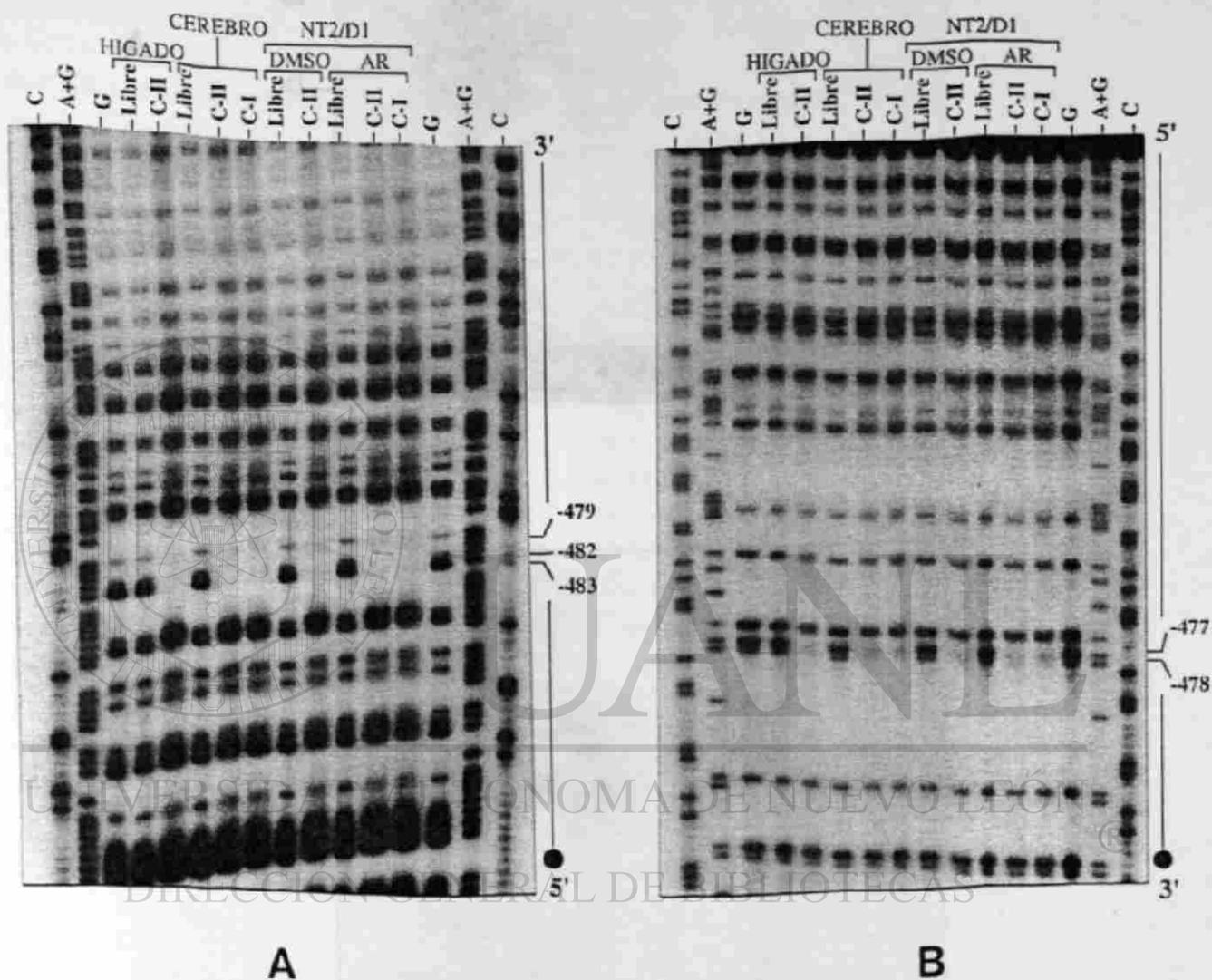


Figura 22. Identificación de los sitios de unión a las proteínas mediante ensayos de interferencia por metilación (“footprinting”). Autorradiogramas que muestran los sitios de rompimiento químico de las guaninas metiladas en la cadena codificadora (A) y no codificadora (B) de la secuencia hHPRT-NE. Los productos de DNA acomplejado (C-I, complejo I; C-II, complejo II) y DNA libre que resultan al utilizar los extractos indicados, fueron analizados junto con reacciones de secuenciamiento por el método de Maxam y Gilbert. Los números negativos indican la posición de las guaninas que, al estar metiladas, interfieren con la unión a las proteínas. DMSO, dimetil sulfóxido; AR, ácido retinoico.

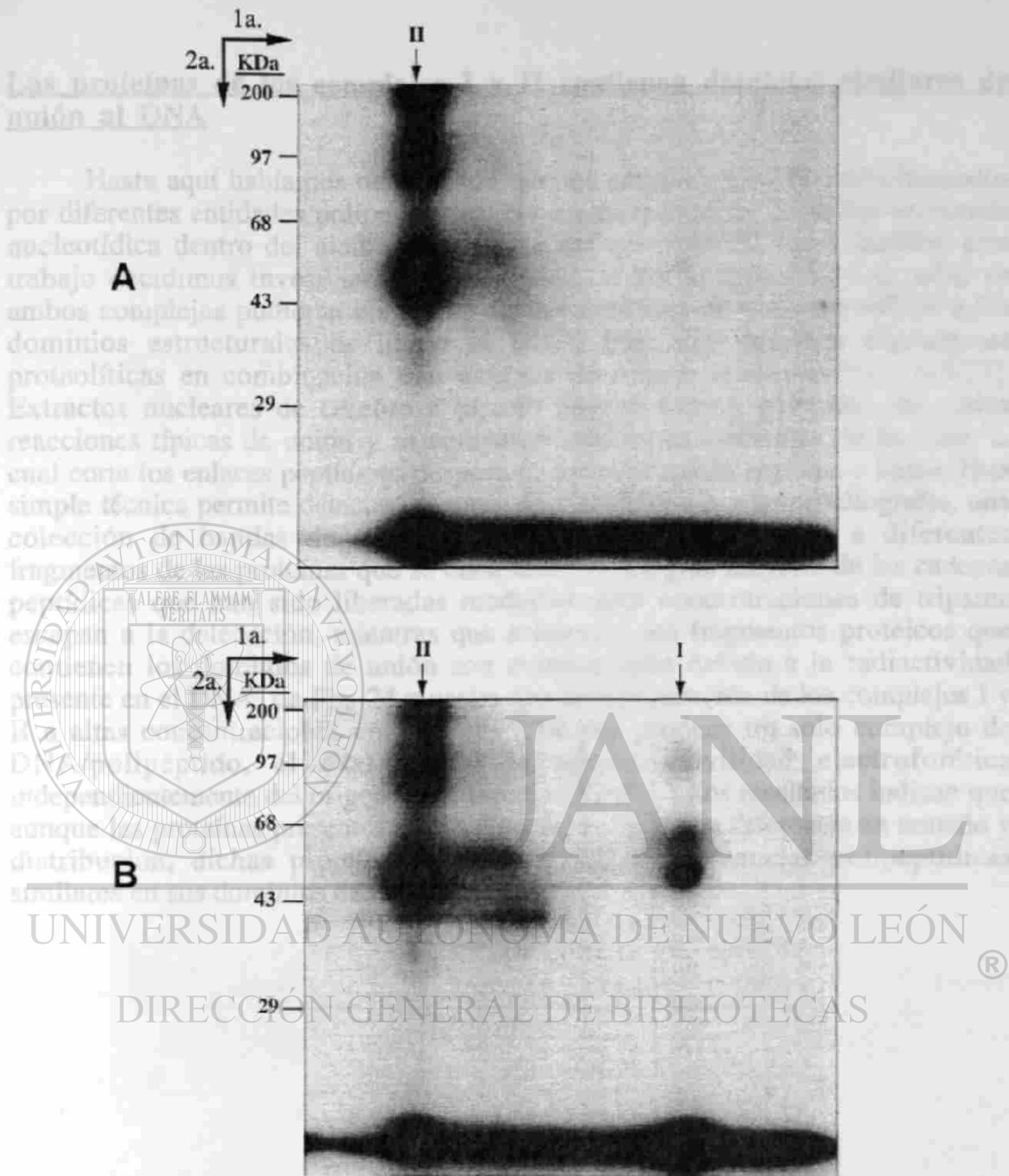


Figura 23. Electroforesis bidimensional de los factores nucleares que se unen al heptámero GGAAGCC. Un oligonucleótido que contiene el sitio de unión a las proteínas fue mezclado con extractos de hígado (A) y cerebro (B) murino y los productos resultantes fueron fraccionados por electroforesis. Se cortaron tiras de poliacrilamida correspondientes a los carriles electroforéticos y se irradiaron con luz UV. Las proteínas que integran los complejos I y II fueron visualizadas por electroforesis bidimensional en gels de poliacrilamida-SDS y posterior autorradiografía.

Las proteínas de los complejos I y II contienen dominios similares de unión al DNA

Hasta aquí habíamos demostrado que los complejos I y II están formados por diferentes entidades polipeptídicas, las cuales reconocen la misma secuencia nucleotídica dentro del elemento negativo del gen hHPRT. Para finalizar este trabajo decidimos investigar, a *grosso modo*, si las proteínas involucradas en ambos complejos pudieran compartir alguna similitud en lo que se refiere a los dominios estructurales de unión al DNA. Para ello hicimos digestiones proteolíticas en combinación con ensayos de retardo electroforético (45,77). Extractos nucleares de cerebro e hígado murino fueron utilizados en varias reacciones típicas de unión y se agregaron cantidades crecientes de tripsina, la cual corta los enlaces peptídicos después de los residuos de arginina o lisina. Esta simple técnica permite detectar, después de electroforesis y autorradiografía, una colección de bandas de migración rápida que corresponden a diferentes fragmentos de las proteínas que se unen al DNA. La gran mayoría de las cadenas peptídicas que han sido liberadas mediante altas concentraciones de tripsina escapan a la detección, mientras que solamente los fragmentos proteicos que contienen los dominios de unión son monitoreados debido a la radiactividad presente en el DNA. La Fig. 24 muestra que la tripsinización de los complejos I y II a altas concentraciones enzimáticas (200 ng) produce un solo complejo de DNA/polipéptido, el cual exhibe la misma movilidad electroforética independientemente del origen del extracto utilizado. Estos resultados indican que aunque las proteínas presentes en los complejos I y II son diferentes en tamaño y distribución, dichas proteínas parecen compartir secuencias polipeptídicas similares en sus dominios de unión al DNA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. DISCUSIÓN

Resumen de la discusión de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

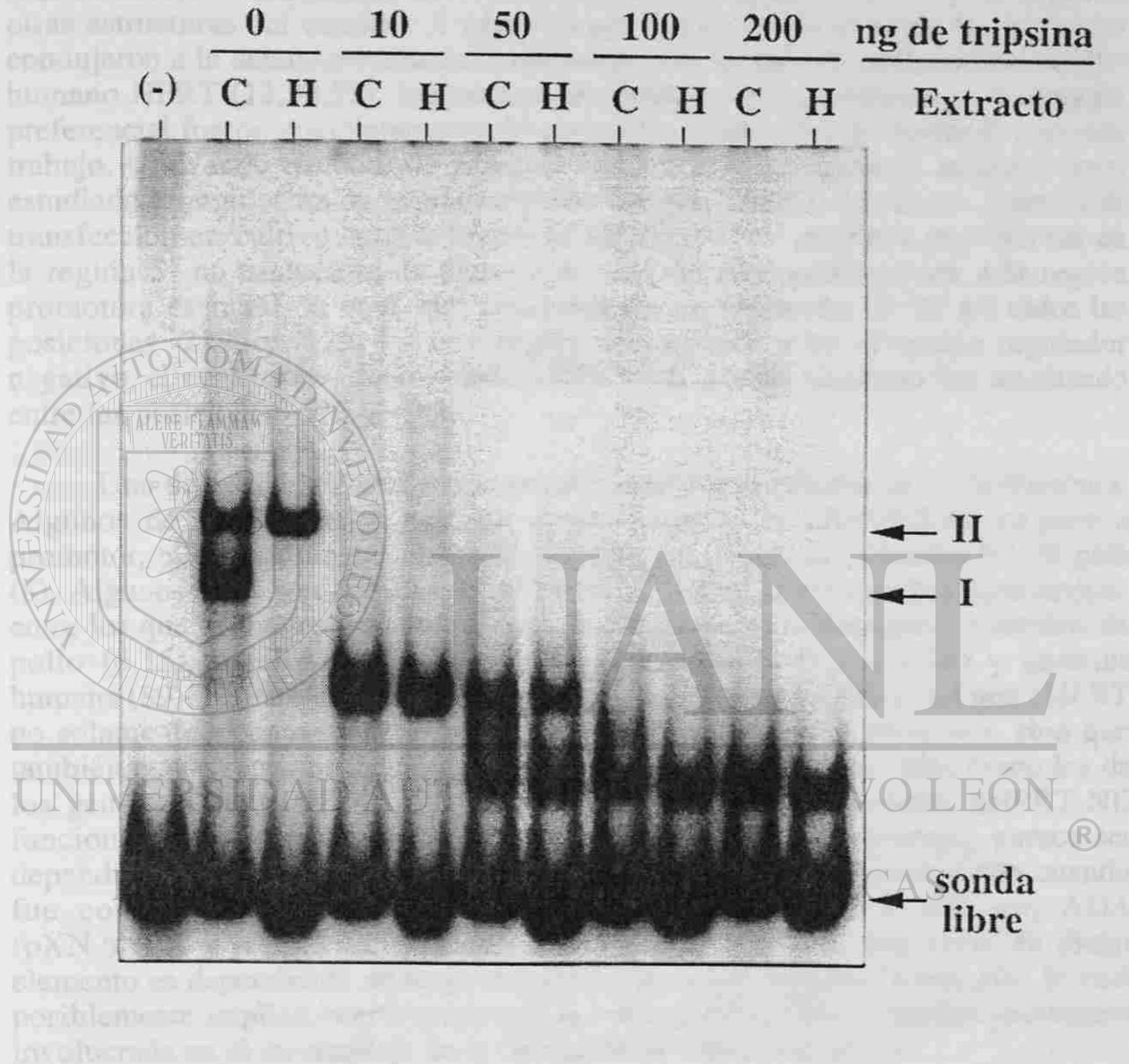


Figura 24. Análisis proteolítico de los complejos I y II. El fragmento Ff radiactivo fue mezclado con extractos de cerebro (C) e hígado (H) murino en varias reacciones de unión. Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron las cantidades indicadas de tripsina y se incubó a 37°C durante 5 min. Los productos resultantes fueron analizados por electroforesis y autorradiografía.

VI. DISCUSION

Rosenbloom y cols. reportaron en 1967 (70) que la distribución de la enzima HPRT varía considerablemente en diversos tejidos y demostraron que existen niveles extremadamente elevados en los ganglios basales y en algunas otras estructuras del cerebro. A pesar de que los recientes avances tecnológicos condujeron a la determinación de la estructura y la secuencia nucleotídica del gen humano HPRT (12,32,57), los eventos moleculares que gobiernan su expresión preferencial fueron completamente desconocidos hasta antes de iniciar el presente trabajo. Utilizando técnicas de genética en reversa y transgénesis animal hemos estudiado la regulación de la transcripción del gen hHPRT. Mediante ensayos de transfección en cultivo celular logramos identificar dos regiones reguladoras en la región 5' no traducible de dicho gen. Una de ellas corresponde a la región promotora esencial, la cual está contenida en un segmento de 97 pb entre las posiciones -219 y -122. La otra región corresponde a un elemento regulador negativo, el cual hemos denominado hHPRT-NE. Dicho elemento fue localizado entre las posiciones -570 y -388.

Una diversidad de elementos negativos han sido reportados en la literatura. Algunos de ellos parecen reprimir exclusivamente la actividad de su propio promotor, tal es el caso del elemento represor del gen de la cristalina δ -1 de pollo (8). Algunos otros son capaces de inhibir la actividad de promotores heterólogos, entre los que se incluyen los represores de los genes de la lisozima y vimetina de pollo (6,15), insulina y hormona de crecimiento de rata (37,38) y gastrina humana (89). En este estudio demostramos que elemento negativo del gen hHPRT no solamente es capaz de reprimir la actividad de su propio promotor, sino que también puede reprimir la actividad de promotores heterólogos, tales como los de los genes ADA y DHFR. También demostramos que el elemento hHPRT-NE funciona de una manera independiente de orientación, sin embargo, parece ser dependiente de distancia, ya que no fue capaz de inhibir la transcripción cuando fue colocado a 600 pb de la región promotora esencial del gen ADA (pXN.8NEA y pXN.8NEB). Esto sugiere que la represión por parte de dicho elemento es dependiente de su proximidad a la región promotora esencial, lo cual posiblemente implica interferencia con la unión o la función de alguna proteína(s) involucrada en el ensamblaje de la "maquinaria" transcripcional.

Para determinar si las secuencias reguladoras identificadas *in vitro* pudieran estar involucradas en la expresión preferencial cerebral, así también como para investigar la existencia de otros elementos que hubiesen escapado la detección en cultivo celular, generamos ratones transgénicos portadores de varias secuencias hHPRT fusionadas al gen reportero *lacZ* (β -galactosidasa) (66).

Nuestros análisis revelaron que la región promotora esencial del gen hHPRT no es suficiente para dirigir la expresión genética en animales transgénicos. Aunque esta secuencia produjo altos niveles de expresión reportera en cultivo celular, nuestros hallazgos sugirieron que se requiere de secuencias adicionales para dirigir la expresión *in vivo*. Un resultado similar fue observado al analizar la región promotora esencial del gen aP2 en ratones transgénicos (71). Posteriormente fusionamos la secuencia de -1681 a -122, la cual contiene la región promotora esencial y secuencias adicionales del extremo 5', junto al gen bacteriano *lacZ* y utilizamos la construcción resultante (RP1600N) para generar ratones transgénicos. Interesantemente, observamos una expresión intensa del gen reportero en el SNC, la cual fue muy similar en todos los animales transgénicos provenientes de cuatro familias independientes. Los productos del gen *lacZ* fueron prominentemente expresados en los ganglios basales (núcleo caudado y putamen), los cuales en humanos son las regiones que exhiben la mayor actividad de HPRT (70,90). Los análisis de RNA por TR-RCP e hibridación *in situ* demostraron que el patrón de expresión del transgen se asemeja mucho al patrón de expresión del gen endógeno (mHPRT), lo cual sugiere que el transgen RP1600N (-1681 a -122) contiene los elementos reguladores necesarios para controlar la expresión preferencial neuronal. Aunque hemos descrito a grandes rasgos la topografía de la expresión del gen *lacZ* en el SNC, un exhaustivo análisis inmunocitoquímico será requerido para definir los subtipos neuronales involucrados en la expresión del transgen, lo cual permitirá conocer las células posiblemente implicadas en la patología del síndrome de Lesch-Nyhan.

Al menos dos secuencias nucleotídicas parecen ser requeridas para la expresión del gen hHPRT en el SNC. La región de -1681 a -885 parece ser esencial puesto que su delección resultó en la pérdida de la expresión del gen reportero en diversas estructuras del cerebro, con la excepción de la habénula y el hipocampo. Esto parece indicar que dicha región es importante para controlar la distribución de la expresión genética dentro del cerebro anterior. Un minucioso análisis *in vivo*, en el cual se utilicen construcciones con diversa delecciones entre las posiciones -1681 y -885, será requerido para delimitar los dominios funcionales dentro de dicha región. La otra secuencia importante para la regulación de la transcripción *in vivo* es la región hHPRT-NE, ya que su delección específica en la construcción RP1600N abolió por completo la expresión en el cerebro, mientras que ocasionó una aberrante expresión de β -galactosidasa en tejidos no neuronales. Ante esta situación es válido especular que existe un sinergismo entre las secuencias distales (-1681 a -885) y la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388) para conferir la especificidad neuronal. Esta idea se basa en el hecho de que las construcciones RP800N y RP1600 Δ NE, las cuales carecen de una u otra de las mencionadas secuencias, fracasaron para dirigir la expresión

hacia el SNC. Esto quiere decir que dichas secuencias son necesarias pero no suficientes para dirigir la expresión preferencial y que se requiere el efecto aditivo de ambas secuencias para conferir altos niveles de expresión genética en el SNC, tal y como sucede en el caso de la construcción RP1600N.

Stout y cols. reportaron en 1985 que las secuencias codificadoras del gen hHPRT contienen los elementos responsables de dirigir la expresión preferencial hacia el SNC (82). Esta aseveración fue emitida después de analizar ratones transgénicos que portaban el DNAc de hHPRT bajo el control del promotor del gen de la metalotioneína de rata y la señal de poliadenilación del gen hGH. Sin embargo, dichos hallazgos fueron desafiados cuando se encontró el mismo patrón de expresión neuronal al substituir, en la misma construcción, el DNAc de hHPRT por el DNAc de hGH (83). Los resultados de este trabajo han puesto punto final a esta controversia, ya que nuestros datos proporcionan sólidas evidencias de que la región 5' flanqueante del gen hHPRT (-1681 a -122) contiene las secuencias responsables de dirigir la expresión preferencial hacia el SNC. Los prominentes niveles de expresión del gen *lacZ* detectados en estructuras cerebrales asociadas principalmente con funciones cognitivas, emocionales y motoras, sugieren que la enzima HPRT debe ejercer una relevante función en dichas estructuras, la cual aún permanece desconocida. Es claro que estos hallazgos tendrán importantes implicaciones en lo que se refiere al desarrollo de vectores para la terapia génica del síndrome de Lesch-Nyhan.

Recientemente aparecieron los primeros reportes sobre proteínas nucleares que se unen a elementos represores involucrados en la expresión neurón-específica (34,52). Utilizando ensayos de retardo electroforético hemos identificado factores nucleares que interactúan con el elemento hHPRT-NE (65), el cual es necesario no solamente para dirigir altos niveles de expresión neuronal, sino también para reprimir la transcripción en tejidos no neuronales. Nuestros análisis revelaron la formación de dos complejos de DNA-proteínas (I y II) al utilizar extractos de cerebro murino y células PC12, mientras que solamente uno de ellos (II) fue detectado al utilizar extractos de origen no neuronal. Creemos que la formación de los complejos I y II observados con extractos de cerebro, representan factores positivos de subpoblaciones neuronales que requieren altos niveles de HPRT (complejo I) y factores negativos de otras poblaciones neuronales y no neuronales, tales como células gliales, las cuales requieren niveles basales de HPRT (complejo II). Esta idea es apoyada, al menos en parte, por el hecho de que los extractos nucleares de un órgano completo contienen factores proteicos provenientes de muchos tipos celulares. Obviamente la clonación y purificación de dichos factores será el paso terminal para elucidar el origen de las proteínas involucradas en ambos complejos.

Puesto que encontramos la formación del complejo I en extractos de células NT2/D1, después de inducir la diferenciación neuronal, creemos que la asociación de dicho complejo está relacionada con la activación del gen HPRT en células neuronales, tal y como lo demostramos al detectar niveles elevados de RNAm de hHPRT en células NT2/D1 que habían sido diferenciadas a neuronas. Por otra parte, después de definir un fragmento de 60 pb (Ff; -510 a -451) como la región involucrada en la asociación de DNA y proteínas, decidimos analizar su efecto sobre la actividad de varios promotores de genes constitutivos. Nuestros estudios de transfección revelaron que dicho fragmento es capaz de reprimir la transcripción independientemente de su orientación. Puesto que los núcleos de células RJK88, las cuales fueron utilizadas como receptores en los ensayos de transfección, contienen factores que participan solamente en la formación del complejo II, proponemos que las proteínas detectadas en dicho complejo están involucradas en la represión transcripcional.

Los resultados de los ensayos bioquímicos y los experimentos de entrecruzamiento con luz UV sugieren que los complejos I y II son entidades independientes formadas por la asociación de múltiples proteínas, algunas de las cuales parecen ser tejido-específicas mientras que otras parecen ser ubicuas. Sin embargo, quizás el hallazgo más interesante de nuestro trabajo es el hecho de que las proteínas de los complejos I y II interactúan con los mismos residuos nucleotídicos (5'-GGAAGCC-3'; -483 a -477) en ambas cadenas de la secuencia hHPRT-NE, tal y como se demostró mediante experimentos de "footprinting". Para determinar si dicha secuencia pudiera ser un elemento de control común en otros genes realizamos una búsqueda de homologías nucleotídicas mediante estudios computacionales (Intelligenetics, GenBank), sin embargo, no encontramos similitud alguna entre el heptámero hHPRT y las secuencias que han sido reportadas como sitios de unión para factores de transcripción en otros genes, lo cual indica que las proteínas asociadas con los complejos I y II representan nuevos reguladores transcripcionales.

Cómo es que las proteínas de los complejos I y II se ensamblan en la misma región nucleotídica para modular la expresión genética? Es posible especular la existencia de una proteína "común" en ambos complejos (~51 kDa), tal y como lo sugieren los experimentos de entrecruzamiento con luz UV y electroforesis bidimensional. Sin embargo, es claro que el complejo ubicuo (II) contiene proteínas más grandes en la vecindad del factor "común", las cuales pudieran servir para reprimir la transcripción en células que requieren niveles basales de HPRT. Hemos postulado al menos dos modelos para explicar este proceso de represión. Primeramente, un factor(es) activador que interactúa simultáneamente con el DNA y la proteína "común" en el complejo I, podría ser reemplazado por

proteínas más grandes (complejo II) en aquellas células donde se requieren niveles constitutivos de HPRT (1,54). Alternativamente, es posible que las proteínas que activan la transcripción en poblaciones neuronales (complejo I) son las mismas que la inhiben en células no neuronales (complejo II), solo que en estas últimas han sido modificadas postraduccionalmente para cambiar su función de activadoras a represoras (24,28). Cualquiera que sea el caso, es de asumirse que el complejo II debe servir para bloquear la función activadora de la región distal (-1681 a -122), la cual parece actuar sinérgicamente con la secuencia hHPRT-NE. Es probable que la activación neuronal del gen hHPRT sea mediada por la región distal en cooperación con las proteínas del complejo I; por lo tanto, la transición del complejo I al complejo II debe ocurrir en aquellas células que requieren niveles basales de HPRT. Dicha transición pudiera ser el principal determinante del patrón de transcripción al funcionar como un "interruptor" biológico que modula la expresión preferencial cerebral. Futuros estudios sobre la regulación de las proteínas aquí descritas y sus mecanismos de acción ayudarán a elucidar el intrigante papel de la enzima HPRT en el sistema nervioso central.

VII. CONCLUSIONES

El conocimiento generado durante el presente trabajo se puede resumir en las siguientes conclusiones:

1. La expresión del gen humano HPRT es controlada por elementos nucleotídicos localizados dentro de su extremo 5' no traducible.
2. La región promotora esencial se localiza entre la secuencia de -219 a -122 y exhibe actividad bidireccional *in vitro*.
3. Un elemento regulador negativo (hHPRT-NE) se localiza entre las posiciones -570 y -388 en relación al sitio de iniciación de la transcripción.
4. hHPRT-NE es capaz de inhibir la actividad de promotores heterólogos y funciona independientemente de orientación, pero parece ser dependiente de distancia.
5. La región promotora esencial es activa *in vitro* pero requiere elementos adicionales para funcionar *in vivo*.

- 6.** La secuencia de -1681 a -122 contiene la información esencial para dirigir la expresión preferencial cerebral.
- 7.** La región de -1681 a -885 coordina la distribución de la expresión en el sistema nervioso central.
- 8.** La secuencia hHPRT-NE ejerce una doble función: dirigir altos niveles de expresión hacia el cerebro y mantener niveles basales de expresión en tejidos no neuronales.
- 9.** La región distal (-1681 a -885) parece actuar sinérgicamente con la secuencia hHPRT-NE para activar la expresión neuronal.
- 10.** hHPRT-NE interactúa con factores de transcripción neuronales (I) y ubicuos (II).
- 11.** Los factores del complejo I se expresan únicamente en neuronas y están involucrados en la activación transcripcional, mientras que los factores del complejo II son constitutivos y participan en la represión de la transcripción.
- 12.** El heptámero 5'-GGAAGCC-3' (-483 a -477) es un sitio de interacción común para las proteínas de los complejos I y II.
- 13.** Proteínas de ~51, 97 y 200 kDa integran el complejo II, mientras que el complejo I está formado por proteínas de ~51, 63 y 110 kDa.
- 14.** Las proteínas de los complejos I y II parecen ser similares en sus dominios de unión al DNA.
- 15.** Las diferencias estructurales y funcionales de las proteínas presentes en los complejos I y II, en coordinación con la función activadora de la región distal, representan los principales componentes del mecanismo que regula la expresión preferencial neuronal del gen humano HPRT.

VIII. PERSPECTIVAS

Hemos demostrado que la expresión preferencial cerebral del gen humano HPRT es el resultado de la interacción de secuencias activadoras y represoras con múltiples factores de transcripción y que la activación y represión del gen están determinadas por el ensamblaje de diferentes proteínas sobre una misma secuencia nucleotídica (5'-GGAAGCC-3'). Este hallazgo nos ha llevado a iniciar un exhaustivo análisis de mutagénesis dirigida para determinar, a un nivel molecular más fino, cuales son los nucleótidos involucrados en el contacto con cada una de las proteínas. Por otra parte, la caracterización funcional y estructural de esas proteínas, así como la clonación de sus DNAs, constituyen el siguiente paso para determinar si son codificadas por diferentes genes que están estrechamente relacionados, o si las diferencias estructurales y funcionales de dichas proteínas son el resultado de un procesamiento alternativo o una modificación postraduccional de los productos de un mismo gen.

Si bien es cierto que el presente trabajo establece las bases moleculares de la regulación de la expresión del gen humano HPRT, también es cierto que el proceso fisiopatológico por el cual la deficiencia de HPRT produce la disfunción neurológica aún permanece desconocido. A este respecto, la disponibilidad de las líneas transgénicas RP1600N representa una oportunidad única para identificar los subtipos neuronales que pudiesen estar implicados en la patogénesis. Además, futuros estudios sobre los factores reguladores aquí descritos y su posible asociación con neurotransmisores y/o segundos mensajeros, a nivel supramolecular, ayudarán a definir el relevante papel de la enzima HPRT en el sistema nervioso central.

Cabe mencionar también que después de haber demostrado la capacidad del promotor hHPRT (-1681 a -122) para producir altos niveles de expresión en el SNC, varios grupos de investigadores están utilizando dicha secuencia para dirigir la expresión de diversos genes heterólogos en modelos animales con el objeto de realizar estudios del desarrollo y/o funcionamiento neuronal.

Por último, y sin duda la aportación más importante, estos resultados tienen implicaciones de incalculable valor en lo que se refiere al tratamiento de la deficiencia de HPRT mediante la terapia por reemplazamiento genético. Gracias a nuestro esfuerzo, los líderes de la terapia génica en el SNC (Joseph Glorioso, Neal DeLuca, Kevin Lee y William Goins) están utilizando las secuencias aquí identificadas para construir los vectores terapéuticos apropiados e iniciar las primeras pruebas en animales de experimentación. Es probable que el resultado de esta colaboración conduzca, en los próximos años, al establecimiento de

protocolos de terapia génica para uno de los más devastadores e intrigantes desórdenes neurológicos, el síndrome de Lesch-Nyhan.

IX. PUBLICACIONES DERIVADAS

El conocimiento generado durante el desarrollo del presente trabajo ha sido divulgado en las siguientes comunicaciones científicas:

- 1.- **Rincón-Limas, D.E., D.A. Krueger y P.I. Patel (1991).** Functional characterization of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene promoter: evidence for a negative regulatory element. *Molecular and Cellular Biology* 11:4157.
- 2.- **Rincón-Limas, D.E., F. Amaya-Manzanares, R.S. Geske, P.A. Overbeek y P.I. Patel (1992).** Neuronal expression of the human HPRT gene: sequence elements and trans-acting factors. *American Journal of Human Genetics* 51:134.
- 3.- **Rincón-Limas, D.E., R.S. Geske, F. Amaya-Manzanares, C.Y. Hsu, P.A. Overbeek y P.I. Patel (1993).** Brain-preferential expression of the human HPRT gene: an interplay of positive and negative regulatory elements. *Journal of Cellular Biochemistry* 17A:404.
- 4.- **Rincón-Limas, D.E., F. Amaya-Manzanares, D.A. Krueger y P.I. Patel (1993).** DNA-protein interactions at the human HPRT gene negative regulatory element: implications for its tissue differential expression. *American Journal of Human Genetics* 53: 724.
- 5.- **Rincón-Limas, D.E., R.S. Geske, J.-J. Xue, C.Y. Hsu, P.A. Overbeek y P.I. Patel (1994).** 5'-flanking sequences of the human HPRT gene direct neuronal expression in the brain of transgenic mice. *Journal of Neuroscience Research* (en prensa).
- 6.- **Rincón-Limas, D.E., F. Amaya-Manzanares, M.L. Niño-Rosales y P.I. Patel (1994).** Interplay of ubiquitous and neuronal DNA-binding proteins with a negative regulatory element contribute to the brain preferential expression of the human HPRT gene, *enviado a publicación*.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Akerblom, I.E., E.P. Slater, M. Beato, J.D. Baxter y P.L. Mellon.** 1988. Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science* **241**: 350-353.
- 2.- **Anderson, W.F.** 1984. Prospects for human gene therapy. *Science* **226**: 401-409.
- 3.- **Andrews, N.C. y D.V. Faller.** 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**: 2499.
- 4.- **Andrews, P.W.** 1984. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*. *Dev. Biol.* **103**: 285-293.
- 5.- **Aronow, B., D. Lattier, R. Silbiger, M. Dusing, S. Potter, D. Witte y D. Wiginton.** 1989. Evidence for a complex regulatory array in the first intron of the human adenosine deaminase gene. *Genes Dev.* **3**: 1384-1400.
- 6.- **Baniahmad, A., M. Muller, C. Steiner y R. Renkawitz.** 1987. Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *EMBO J.* **6**: 2297-2303.
- 7.- **Barrera-Saldaña, H.A., K. Takahashi, M. Vigneron, A. Wildelman, I. Davison y P. Chambon.** 1985. All six G-C motifs of the SV40 early upstream element contribute to promoter activity *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J.* **4**: 3839-3849.
- 8.- **Borras, T., C. A. Peterson y J. Piatigorsky.** 1988. Evidence for positive and negative regulation in the promoter of the chicken $\delta 1$ -crystallin gene. *Develop. Biol.* **127**: 209-219.
- 9.- **Chinault, A.C. y C.T. Caskey.** 1984. The hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene: a model for the study of mutation in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Biol.* **31**: 295-313.
- 10.- **Chodosh, L.S.** 1990. Methylation interference assay for analysis of DNA-protein interactions. p. 12.3.1. *In* F.M. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, New York.
- 11.- **Chomczynski, P. y N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- 12.- **Edwards, A., H. Voss, P. Rice, A. Civitello, J. Stegemann, C. Schwager, J. Zimmermann, H. Erfle, C.T. Caskey y W. Ansorge.** 1990. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics* **6**: 593-608.

- 13.- **Faisst, S. y S. Meyer.** 1992. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **20:** 3-26.
- 14.- **Farnham, P. J. y R. T. Schimke.** 1986. Murine dihydrofolate reductase transcripts through the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **6:**365-371.
- 15.- **Farrell, F. X., C. M. Sax y Z. E. Zehner.** 1990. A negative element involved in vimentin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **10:**2349-2358.
- 16.- **Friedmann, T.** (1989). Progress toward human gene therapy. *Science* **244:** 1275-1281.
- 17.- **Fusco, J. C., R. G. Fenwick, Jr., D. H. Ledbetter y C. T. Caskey.** 1983. Deletion and amplification of the HGPRT locus in Chinese hamster cells. *Mol. Cell. Biol.* **3:**1086-1096.
- 18.- **Gittes, G.K. y W.J. Rutter,** 1992. Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89:** 1128-1132.
- 19.- **Gorman, C. M., L. F. Moffat y B. H. Howard.** 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2:**1044-1051.
- 20.- **Graham, F. L. y A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:**456-467.
- 21.- **Gray, T.A., D.L. Gumucio y F.S. Collins.** 1990. A two-dimensional electrophoresis system for DNA-binding proteins. *Technique J. Methods Cell Mol. Biol.* **2:** 147-154.
-
- 22.- **Gutensohn, W. y G. Guroff.** 1972. Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase from rat brain (purification, kinetic properties, development and distribution). *J. Neurochem.* **19:** 2139-2150.
- 23.- **Hanley, T. y J.P. Merlie.** 1991. Transgene detection in unpurified mouse tail DNA by polymerase chain reaction. *BioTechniques* **10:** 56.
- 24.- **Hunter, T. y M. Karin.** 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70:** 375-387.
- 25.- **Hogan, B., F. Costantini y E. Lacy.** 1986. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 26.- **Hsu, S.M., L. Raine y H. Fanger.** 1981. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptides hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am.J.Clin.Pathol.* **75:** 734-738.

- 27.- **Ingolia, D. E., M. R. Al-Ubaidi, C. Y. Yeung, H. A. Bigo, D. A. Wright y R. E. Kellems.** 1986. Molecular cloning of the murine adenosine deaminase gene from a genetically enriched source: identification and characterization of the promoter region. *Mol. Cell. Biol.* 6:4458-4466.
- 28.- **Jackson, S.P. y R. Tjian.** 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implication for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55: 125-133.
- 29.- **Kadonaga, J.T., K.R. Carner, F.R. Masiarz y R. Tjian.** 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51: 1079-1090.
- 30.- **Kadonaga, J.T., K.A. Jones y R. Tjian.** 1986. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *Trends Biochem. Sci.* 11:20-23.
- 31.- **Kelley, W.N., F.M. Rosenbloom, J.F. Henderson y J.E. Seegmiller.** 1967. A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57: 1735-1739.
- 32.- **Kim, S. H., J. C. Moores, D. David, J. G. Respass, D. J. Jolly y T. Friedmann.** 1986. The organization of the human HPRT gene. *Nucleic Acids Res.* 14:3103-3118.
- 33.- **Kothary, R., S. Clapoff, A. Brown, R. Campbell, A. Peterson y J. Rossant.** 1988. A transgene containing lacZ inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature (London)* 335: 435-436.
- 34.- **Kraner, S.D., J.A. Chong, H-J. Tsay y G. Mandel.** 1992. Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation. *Neuron* 9: 37-44.
- 35.- **Krenitsky, T.A.** (1969). Tissue distribution of purine ribosyl- and phosphoribosyl-transferases in the Rhesus monkey. *Biochim. Biophys. Acta* 179: 506-509.
- 36.- **Kuehn, M.R., A. Bradley, E.J. Robertson y M.J. Evans.** 1987. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature (London)* 326: 295-298.
- 37.- **Laimins, L., M. Holmgren-Konig y G. Khoury.** 1986. Transcriptional silencer element in rat repetitive sequences associated with the rat insulin I gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3151-3155.
- 38.- **Larsen, P. R., J. W. Harney y D. D. Moore.** 1986. Repression mediates cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8283-8287.
- 39.- **Latchman, D.S.** 1990. Eukaryotic transcription factors. *Biochem. J.* 270: 281-289.

- 40.- **Lesch, M. y W. L. Nyhan.** A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* 36: 561-570.
- 41.- **Levin, M y J.L. Manley.** 1989. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 59: 405-408.
- 42.- **Linton, J. P., J. Yen, E. Selby, Z. Chen, J. M. Chinsky, K. Liu, R. E. Kellems y G. F. Crouse.** 1989. Dual bidirectional promoters at the mouse *dhfr* locus: Cloning and characterization of two mRNA classes of the divergently transcribed Rep-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 9:3058-3072.
- 43.- **Lo, Y.F.V. y R.M. Palmour.** 1979. Developmental expression of murine HPRT. I. Activities, heat stabilities and electrophoretic mobilities in adult tissues. *Biochem. Genet.* 17: 737-746.
- 44.- **Maniatis, T., S. Goodbourn y J.A. Fischer.** 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236:1237-1244.
- 45.- **Marzouki, N., S. Camier, A. Ruet, A. Moenne y A. Sentenac.** 1986. Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor τ . *Nature (London)* 323: 176-178.
- 46.- **McKnight, S.L., R.C. Kingsbury, A. Spence y M. Smith.** 1984. The distal transcription signals of the herpesvirus *tk* gene share a common hexanucleotide control sequence. *Cell* 37: 253-262.
- 47.- **Melton, D.W., D.S. Konecki, J. Brennan y C.T. Caskey.** 1984. Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2147-2151.
- 48.- **Melton, D. W., D. S. Konecki, D. H. Ledbetter, J. F. Hejtmancik y C.T. Caskey.** 1981. *In vitro* translation of hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase mRNA: characterization of a mouse neuroblastoma cell line that has elevated levels of hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6977-6980.
- 49.- **Melton, D. W., C. McEwan, A. B. McKie y A. M. Reid.** 1986. Expression of the mouse HPRT gene: Deletional analysis of the promoter region of an X-chromosome linked housekeeping gene. *Cell* 44:319-328.
- 50.- **Mermelstein, F.H., O. Flores y D. Reinberg.** 1989. Initiation of transcription by RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1009: 1-10
- 51.- **Mitchell, P.J. y R. Tjian.** 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.

- 52.- Mori, N., C. Schoenherr, D.J. Vandenberg y D.J. Anderson. 1992. A common silencer element in the SCG10 and type II Na⁺ channel genes binds a factor present in nonneuronal cell but not in neuronal cells. *Neuron* 9: 45-54.
- 53.- Murray, A.W. (1966). Purine-phosphoribosyltransferase activities in rat and mouse tissues and in Ehrlich ascites-tumour cells. *Biochem. J.* 100: 664-670.
- 54.- Ohkuma, Y., M. Horikoshi, R.G. Roeder y C. Desplan. 1990. Engrailed, a homeodomain protein, can repress *in vitro* transcription by competition with the TATA box-binding protein transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2289-2293.
- 55.- Palmiter, R.D. y R.L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Annu. Rev. Genet.* 20: 465-499.
- 56.- Parker, B. A. y G. R. Stark. 1979. Regulation of simian virus 40 transcription: Sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. *J. Virol.* 31:360-369.
- 57.- Patel, P. I., P. E. Framson, C. T. Caskey y A. C. Chinault. 1986. Fine structure of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Mol. Cell. Biol.* 6:393-403.
- 58.- Patel, P.I., T.Y. Tsao, C.T. Caskey y A.C. Chinault. 1987. 5'-regulatory elements of the human HPRT gene, p. 45-55. *In* Granner, D., M.G. Rosenfeld, and S. Chang (ed.), *Transcriptional Control Mechanisms*. Alan R. Liss, New York.
- 59.- Pleasure, S.J. y V.M.-Y. Lee. 1993. NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 35: 585-602.
- 60.- Pleasure, S.J., C. Page y V. M.-Y. Lee. 1992. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* 12: 1802-1815.
- 561.- Ramírez-Solís, R., D. Reséndez-Perez, L. E. Alvidrez-Quihui, D. E. Rincón-Limas, R. Varela-Martínez, H. G. Martínez-Rodríguez y H. A. Barrera-Saldaña. 1990. New vectors for the efficient expression of mammalian genes in cultured cells. *Gene* 87:291-294.
- 62.- Renkawitz, R. 1990. Transcriptional repression in eukaryotes. *Trens Genet.* 6: 192-197.
- 63.- Reynolds, G.A., S.K. Basu, T.F. Osborne, M.S. Brown, J.L. Goldstain y K.L. Luskey. 1984. HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated region. *Cell* 38: 275-285.

- 64.- **Rincón-Limas, D.E.** 1990. Clonación molecular de los DNAs que codifican para las hormonas de crecimiento de origen hipofisiario humano en *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad A. de Nuevo León, Monterrey, México.
- 65.- **Rincón-Limas, D.E., F. Amaya-Manzanares, M.L. Niño-Rosales y Pragna I. Patel.** 1994. Interplay of ubiquitous and neuronal DNA-binding proteins with a negative regulatory element contribute to the brain preferential expression of the human HPRT gene. *Enviado a publicación.*
- 66.- **Rincón-Limas, D.E., R.S. Geske, J.-J. Xue, C. Y. Hsu, P.A. Overbeek y P.I. Patel.** 1994. 5'-flanking sequences of the human HPRT gene direct neuronal expression in the brain of transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* (en prensa).
- 67.- **Rincón-Limas, D.E., D.A. Krueger y P.I. Patel.** 1991. Functional characterization of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene promoter: evidence for a negative regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4157-4164.
- 68.- **Rincón-Limas, D.E., D. Reséndez-Pérez, R. Ortiz-López, L.E. Alvidrez-Quihul, F. Castro-Muñoz Ledo, W. Kurt-Harcuch, H.G. Martínez-Rodríguez y H.A. Barrera-Saldaña.** 1993. HGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1172**: 49-54.
- 69.- **Robinson, M.O. y M.I. Simon.** 1991. Determining transcript number using the polymerase chain reaction: P_{gk}-2, mP₂, and PGK-2 transgene mRNA levels during spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1557-1562.
- 70.- **Rosenbloom, F.M., W.N. Kelley, J. Miller, J.F. Henderson y J.E. Seegmiller.** 1967. Inherited disorder of purine metabolism: correlation between central nervous system dysfunction and biochemical defects. *JAMA* **202**: 103-105.
- 71.- **Ross, S.R., R.A. Graves, A. Greenstein, K.A. Platt, H-L. Shyu, B. Mellovitz y B.M. Spiegelman.** 1990. A fat specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P₂ in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 9590-9594.
- 72.- **Rossiter, B.J.F., J.C. Fuscoe, D.M. Muzny, M. Fox y C.T. Caskey.** 1991. The chinese hamster HPRT gene: restriction map, sequence analysis, and multiplex PCR deletion screen. *Genomics* **9**: 247-256.
- 73.- **Saiki, R.D., D.H. Gelfand, S. Stoffel, J.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis y H.A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- 74.- **Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

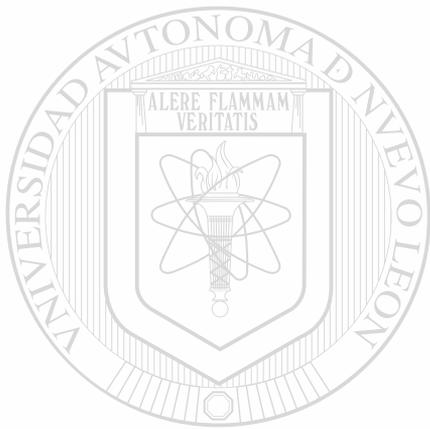
- 75.- **Sanes, J.R., J.L.R. Rubenstein y J-F. Nicolas.** 1986. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* 5: 3133-3142.
- 76.- **Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- 77.- **Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Müller y W. Schaffner.** 1988. Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCAB). *EMBO J.* 7: 4221-4229.
- 78.- **Seegmiller, J.E., F.M. Rosenbloom y W.N. Kelley.** 1967. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155: 1682-1684.
- 79.- **Simmons, D.M., J.L. Arriza y L.W. Swanson.** 1989. A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radiolabeled single-stranded RNA probes. *J. Histotechnol.* 12: 160-181.
- 80.- **Singh, H., R. Sen, D. Baltimore y P.A. Sharp.** 1986. A nuclear factor that binds to a conserved motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319: 154-158.
- 81.- **Stout, J.T. y C.T. Caskey.** 1989. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficiency: the Lesch-Nyhan syndrome and gouty arthritis, p. 1007-1028. *In* C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle (ed.), *The metabolic basis of inherited disease*, 6th ed. Mc Graw-Hill Book Co., New York.
-
- 82.- **Stout, J.T., H.Y. Chen, J. Brennand, C.T. Caskey y R.L. Brinster.** 1985. Expression of human HPRT in the central nervous system of transgenic mice. *Nature (London)* 317: 250-252.
- 83.- **Swanson, L.W., D.M. Simmons, J. Arriza, R. Hammer, R. Brinster, M.G. Rosenfeld y R.M. Evans.** 1985. Novel developmental specificity in the nervous system of transgenic animals expressing growth hormone fusion genes. *Nature* 317: 363-366.
- 84.- **Taketo, M., A.C. Schroeder, L.E. Mobraaten, K.B. Gunning, G. Hanten, R.R. Fox, T.H. Roderick, C.L. Stewart, F. Lilly, C.T. Hansen y P.A. Overbeek.** 1991. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2065-2069.
- 85.- **Tamura, T-A., Y. Ohya, M. Miura, A. Aoyama, T. Inoue y K. Mikoshiba.** 1989. Preparation of large amounts of transcription-competent nuclear extracts from mouse brain. *Technique* 1: 33-36.

- 86.- **Thummel, C.S., A.M. Boulet y H.D. Lipshitz.** 1988. Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* 74: 445-456.
- 87.- **Vacher, J. y S.M. Tilghman.** 1990. Dominant negative regulation of the mouse α -fetoprotein gene in adult liver. *Science* 250: 1732-1735.
- 88.- **Valerio, D., M.G. Duyvesteyn, B.M. Dekker, L. van der Voorn y A.J. van der Eb.** 1985. Adenosin deaminase: characterization and expression of a gene with a remarkable promoter. *EMBO J* 4: 437-443.
- 89.- **Wang, T. C. y S. J. Brand.** 1990. Islet cell-specific regulatory domain in the gastrin promoter contains adjacent positive and negative DNA elements. *J. Biol. Chem.* 265:8908-8914.
- 90.- **Watts, R.W.E., E. Spellacy, D.A. Gibbs, J. Allsop, R.O. McKeran y G.E. Slavin.** 1982. Clinical, post-mortem, biochemical and therapeutic observations on the Lesch-Nyhan syndrome with particular reference to the neurological manifestations. *Quar. J. Med.* 201: 43-78.
- 91.- **Wingender, E.** 1990. Transcription regulatory proteins and their recognition sequences. *Crit. Rev. Euk. Gene Exp.* 1: 11-48.
- 92.- **Wuenschell, C.W., N. Mori y D.J. Anderson.** 1990. Analysis of SCG10 gene expression in transgenic mice reveals that neural specificity is achieved through selective derepression. *Neuron* 4: 595-602.
- 93.- **Yang, J.K., J.N. Masters y J. Attardi.** 1984. Human dihydrofolate reductase gene organization. *J. Mol. Biol.* 176: 169-187.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



