



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

D.C. DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS IV - 94

TD  
QH440  
.4  
.R5  
1994  
c.1



1080125982



**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., México**

**Abril de 1994**

TD

QH440

.4

R5

1994



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

**POR**

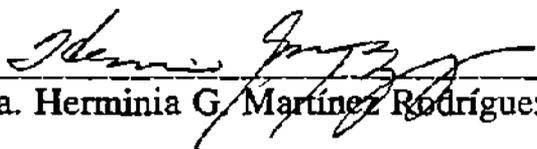
**DIEGO ENRIQUE RINCON LIMAS**

**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**

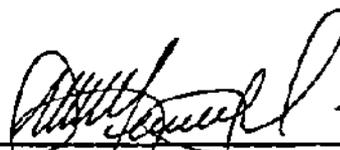
**El Comité de Tesis:**



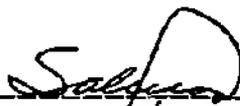
**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
(Asesor)**



**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez**



**Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla**

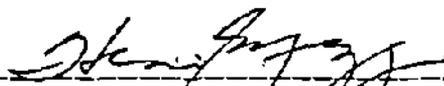


**Dr. Mario César Salinas Carmona**



**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).**

**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.



*Miriam K. Duchon*



## INDICE

Indice .....	i
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de abreviaturas .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	ix
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION .....</b>	<b>2</b>
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
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>10</b>
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- <i>lacZ</i> .....	16
Producción de ratones transgénicos .....	18

Identificación de ratones transgénicos .....	18
Detección de $\beta$ -galactosidasa por el método de X-gal .....	20
Detección de $\beta$ -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
<b>V. RESULTADOS</b> .....	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
<b>VI. DISCUSION</b> .....	65
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	69
<b>VIII. PERSPECTIVAS</b> .....	71
<b>IX. PUBLICACIONES DERIVADAS</b> .....	72
<b>X. BIBLIOGRAFIA</b> .....	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*

*A María Laura*

*por ser la perspectiva y la razón de mis esfuerzos.*

## 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.

## 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 <sup>+</sup>
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- galactopiranosido

## 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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\Delta$ 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.