

## **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**

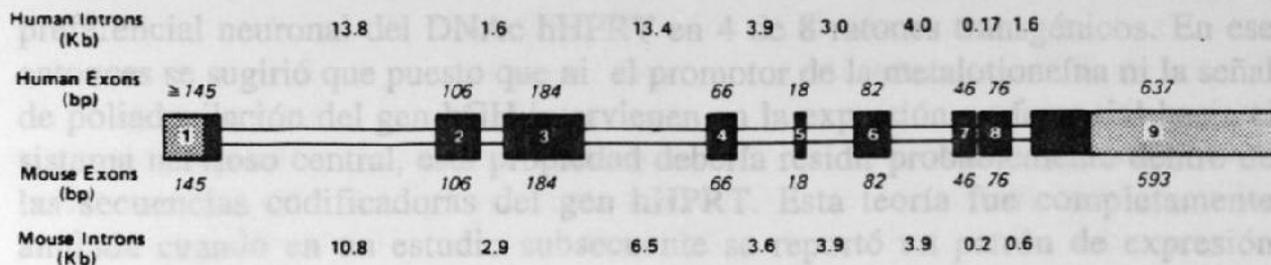
La enzima hipoxantín-guanín fosforribosil transferasa (HPRT; E.C.2.4.2.8.) interviene en uno de los primeros pasos en la vía de salvamento de las purinas hipoxantina y guanina, las cuales son requeridas como componentes de ácidos nucleicos, fuentes de energía, neurotransmisores, segundos mensajeros, 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<sub>o</sub>A 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<sub>o</sub>A 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 [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP, [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP, [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP y [ $^{14}\text{C}$ ] 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 $\alpha$ ) 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 $\lambda$ 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.

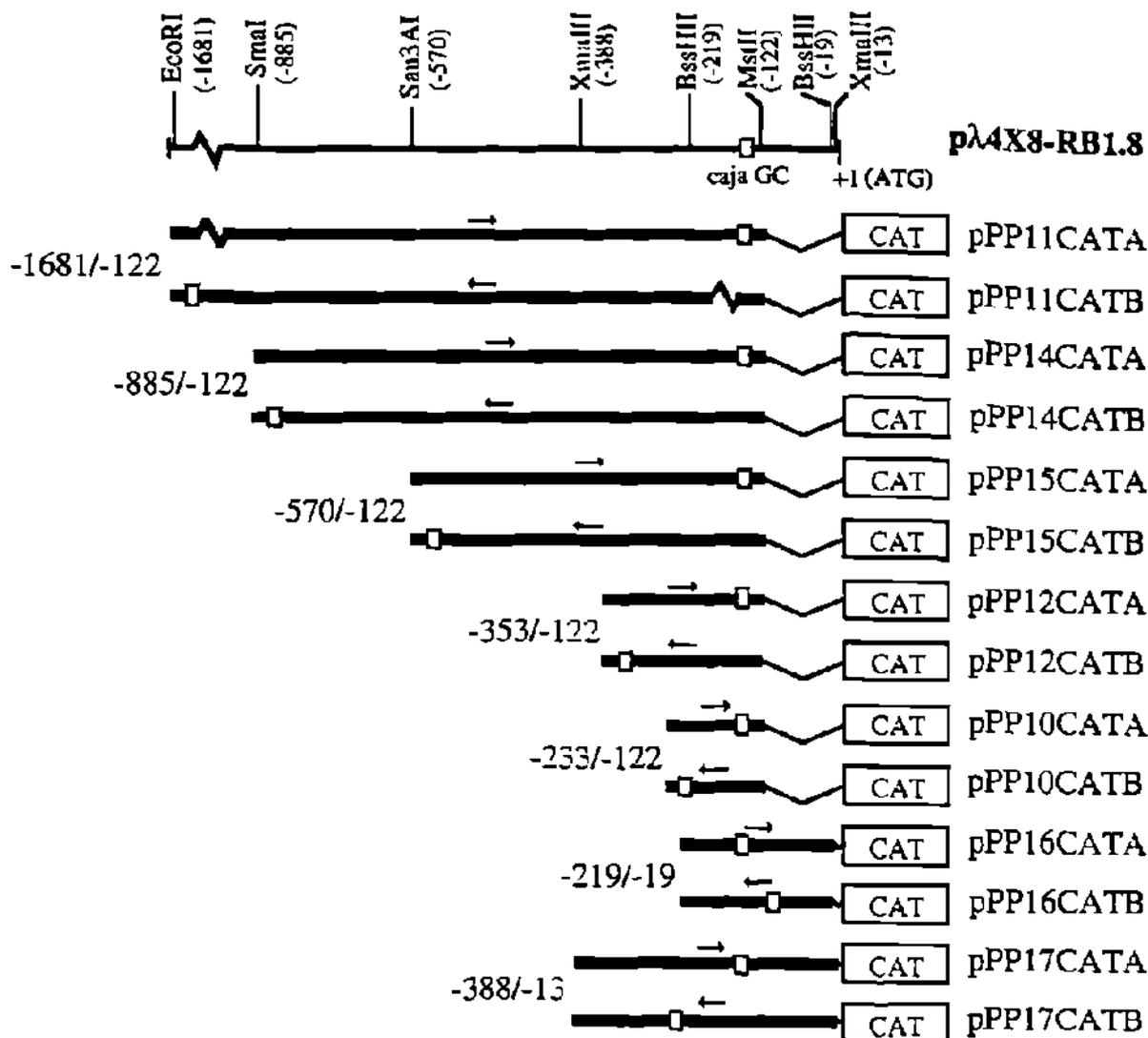
Los sitios *Bss*III y *Xma*III fueron también utilizados para obtener los fragmentos de -219 a -19 y -388 a -13, respectivamente. Dichos fragmentos fueron subclonados, mediante generación y ligación de extremos romos, en el sitio *Hind*III del plásmido pSV0CAT para generar los vectores pPP16CAT y pPP17CAT, 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% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>. Dichas células fueron propagadas a una densidad de 5x10<sup>5</sup> 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 10<sup>6</sup> células fueron propagadas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> y tratadas con 1 x 10<sup>-5</sup> M de ácido *trans*-retinoico (Sigma), el cual fue preparado como una solución matriz a una concentración de 10<sup>-2</sup> 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 [<sup>14</sup>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 [<sup>14</sup>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**

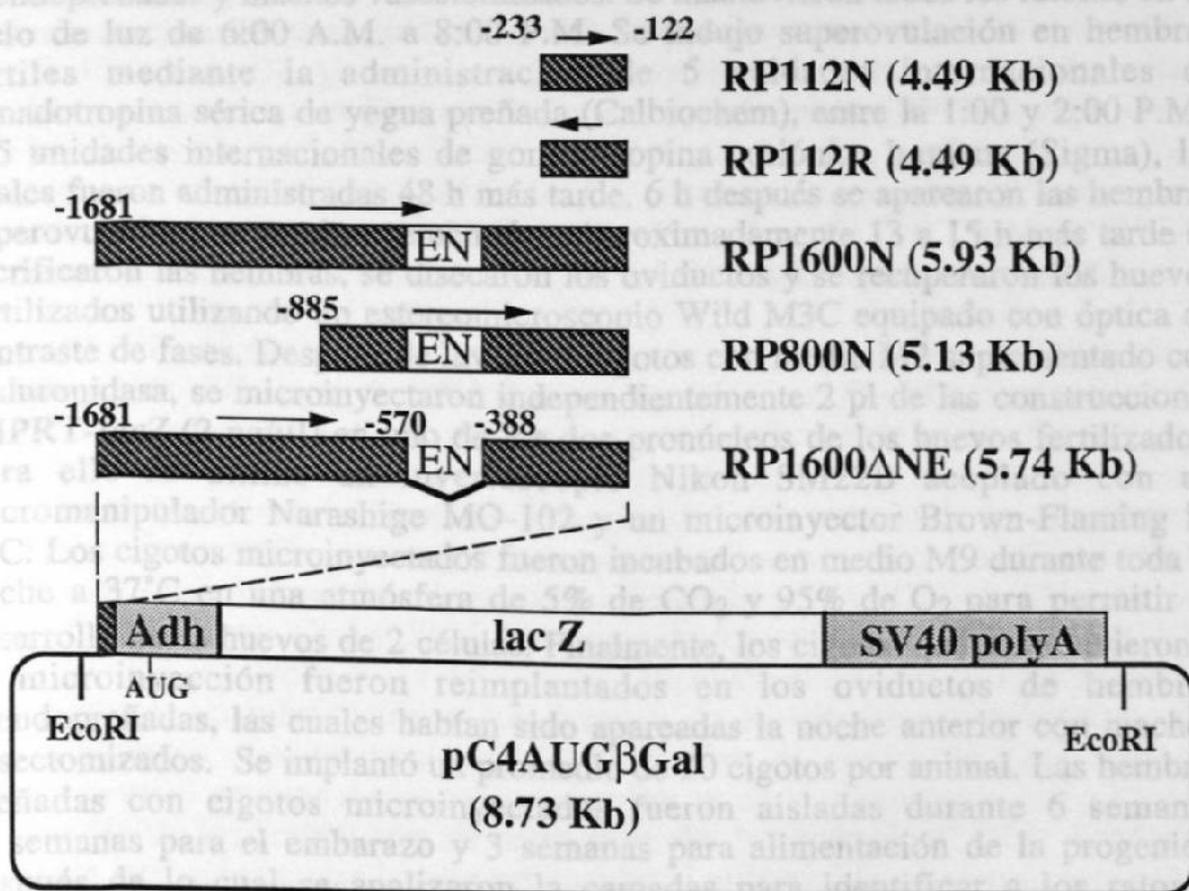
Se llevó a cabo una hibridación tipo Northern (74) para conocer el nivel transcripcional de cada uno de los vectores hHPRT-CAT así como también para determinar la eficiencia de las transfecciones. Para ello se utilizó RNA total obtenido de células RJK88 cotransfectadas con los plásmidos experimentales 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 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP utilizando el conjunto de reactivos " T7 QuickPrime" (Pharmacia) a una actividad específica de  $\sim 10^9$  cpm/ $\mu$ 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 $\beta$ Gal (86), el cual contiene el gen *lacZ* ( $\beta$ -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 $\beta$ 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 $\Delta$ NE fueron creados de manera similar al subclonar las secuencias hHPRT (*HindIII*) obtenidas de los plásmidos pPP14CATA y pPP11 $\Delta$ NE, respectivamente. pRP800N porta la secuencia hHPRT de -885 a -122. pRP1600 $\Delta$ 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 $\Delta$ 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  $\mu\text{m}$ , 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.



### Identificación de ratones transgénicos

**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 $\beta$ 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/ $\mu$ 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 CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 µl 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 µl 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 µl de RNAsa (13 µg/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 µl 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 µl 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 µg de DNA fueron digeridos con *EcoRI* 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 pC4AUGβGal (86) mediante doble digestión con *ClaI* y *XbaI*. Dicha sonda fue marcada con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP a una actividad específica de 1x10<sup>9</sup> cpm/µg 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 Ultrosan 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 µm de cada dNTP, 100 pM de cada uno de cuatro diferentes oligonucleótidos y 0.5 U de Amplitaq (Cetus) en un volumen de

50  $\mu$ 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 $\beta$ -galactosidasa por el método de X-gal

Se utilizó el método de Sanes y cols. (75) para la detección *in situ* de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en diversos tejidos de animales transgénicos. Dicho ensayo enzimático consiste en el rompimiento del sustrato 4-cloro-5-bromo-3 indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal), en la presencia de los catalizadores ferro y ferricianuro de potasio, para producir un compuesto insoluble de color azul índigo. Ratones 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 oscuridad 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  $\beta$ -galactosidasa. Como control negativo se utilizaron tejidos de animales silvestres procedentes de la misma camada.

Para estudiar la expresión del gen *lacZ* ( $\beta$ -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 $\beta$ -galactosidasa por inmunocitoquímica

El análisis inmunocitoquímico de  $\beta$ -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  $\mu$ 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- $\beta$ -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  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP a una actividad específica de 2x10<sup>9</sup> 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 NaPO<sub>4</sub> 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<sup>-</sup> (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'.

**$\beta$ -tubulina:** 5'-TGGCCAGATCTTCAGACCAG-3' y  
3'-GAGTGACACGGACTTGAATG-5'.

**mHPRT:** 5'-TTGTTGGATTTGAAATTCCAGACAAGTTTG-3' y  
3'-TTATTATTATGACTCTAACATAGACATTCT-5'.

Los oligonucleótidos para  $\beta$ -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  $\mu$ g/ml de inhibidor de tripsina y 1  $\mu$ 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 MgCl<sub>2</sub>, 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  $5 \times 10^7$  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 MgCl<sub>2</sub>, 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 MgCl<sub>2</sub>, 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  $\mu$ l conteniendo 25,000 cpm de sonda radiactiva (aproximadamente 0.5-1 ng), 3  $\mu$ g de poli (dI-dC) (Pharmacia), 10 mM de HEPES pH 7.5, 10% de glicerol, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, y 10  $\mu$ 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  $\mu$ M de cada dNTP, 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 0.5 U de Amplitaq (Cetus) en un volumen de 100  $\mu$ 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 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]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: TCCATTTTCCTGACTCTTGGCCCAGTGCTT  
8317: CATTCCAAGACCTTGCACTACCTGTGGCT  
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  $\mu$ l de 50 mM de cacodilato de sodio pH 8/1 mM de EDTA. Se agregó 1  $\mu$ l de dimetil sulfato (Aldrich) y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Se agregaron 10  $\mu$ g de RNAt (Sigma), 25  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 7 y 600  $\mu$ 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  $\mu$ l de agua ultrapura (grado HPLC). Se tomó una alícuota (2  $\mu$ 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  $\mu$ 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 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]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  $^{14}\text{C}$  como marcadores de peso molecular (Bethesda Research Laboratories).

## V. RESULTADOS

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

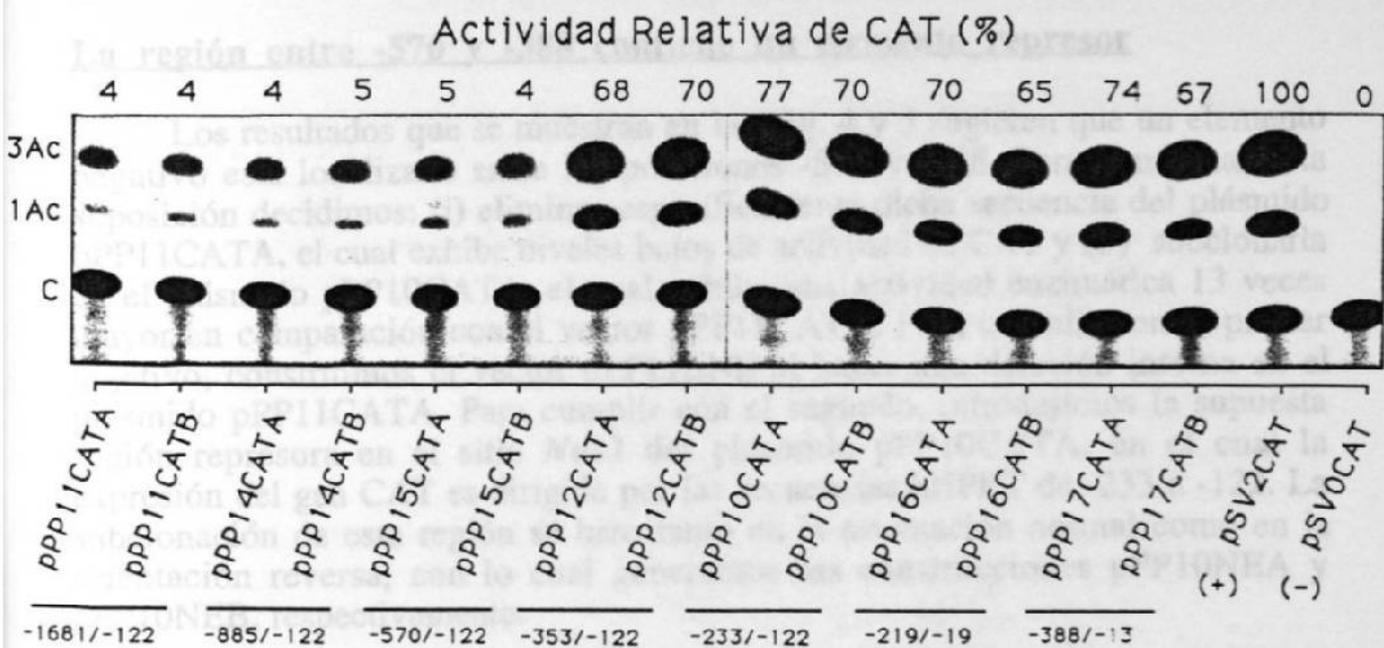
Para identificar las secuencias involucradas en la modulación de la transcripción del gen hHPRT en cultivo celular, subclonamos en ambas orientaciones varios fragmentos de la región 5' de dicho gen en un vector de expresión que porta el gen CAT como reportero. Cada uno de los plásmidos esquematizados 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 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 RNAs 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 RNA 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.



**Figura 4. Análisis funcional de la región 5' del gen hHPRT.** Células RJK88 fueron transfectadas con 10  $\mu$ g 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.

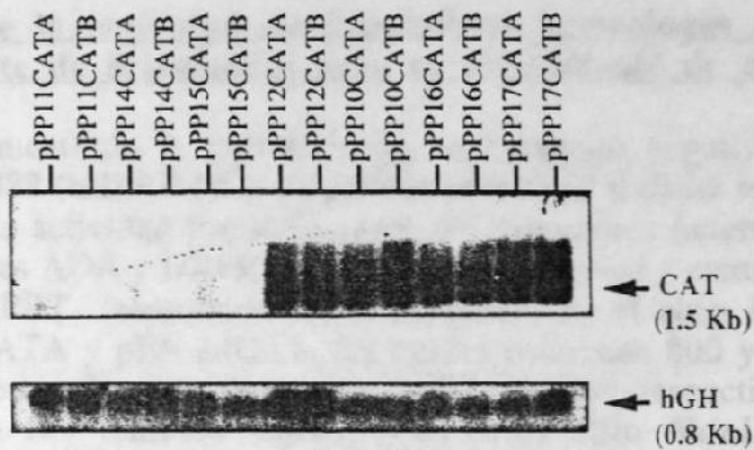
### **La región entre -570 y -388 contiene un elemento represor**

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 $\Delta$ NE al hacer una deleción 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.

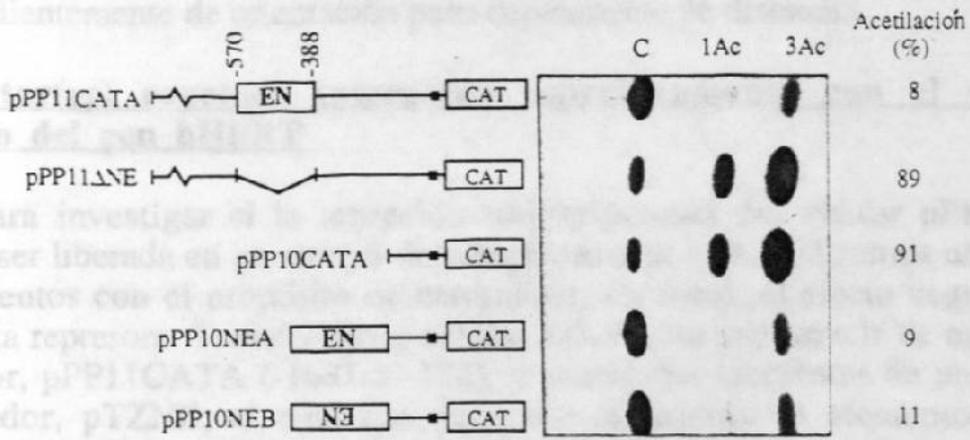
Cuando la región entre -570 y -388 fue deletada del plásmido pPP11CATA, la expresión del gen CAT se incrementó 11 veces, lo cual confirmó la existencia de un elemento negativo dentro de esa región (Fig. 6). Aún más, la inserción de dicha secuencia junto al extremo 5' de la región promotora esencial (-233 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.

**hPRT-NE** rep...  
independientemente

Habiendo de...  
posiciones -570 y...  
capaz de reprimir...  
como los de los gen...  
similares al gen...  
plásmidos pXN.CATA y...  
promotor del gen...  
elemento negativo...  
pD35RCAT, el caso...



**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 µg de cada uno de los vectores hHPRT-CAT y 1 µg del plásmido pAVE1hGH, el cual sirvió como indicador para evaluar las eficiencias de transfección. 25 µg 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 *HindIII-BamHI* de 1.632 pb obtenido del gen CAT y un fragmento *AatII-XmaI* 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.



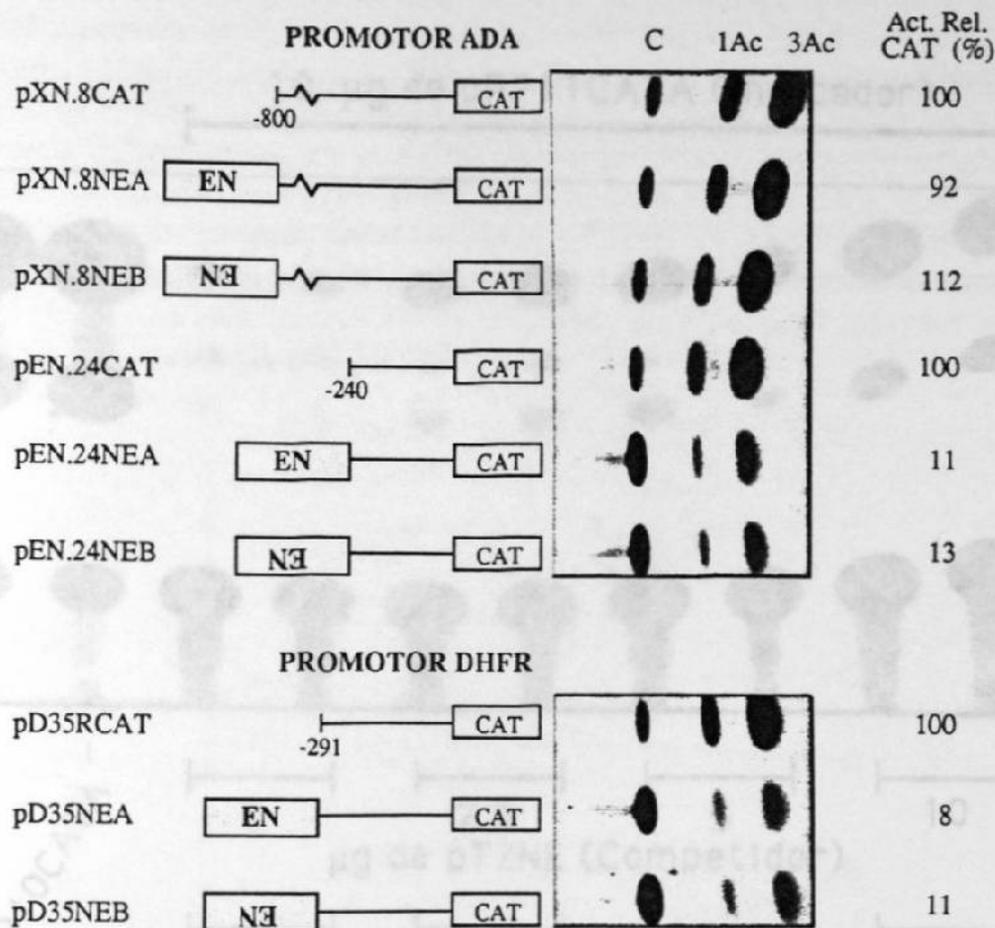
**Figura 6. Efecto del elemento negativo (EN) sobre la actividad del promotor hHPRT.** La secuencia comprendida entre las posiciones -570 y -388 fue deletada del plásmido pPP11CATA y subclonada en ambas orientaciones, junto al extremo 5' de la secuencia hHPRT presente en el plásmido pPP10CATA. Los vectores 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**

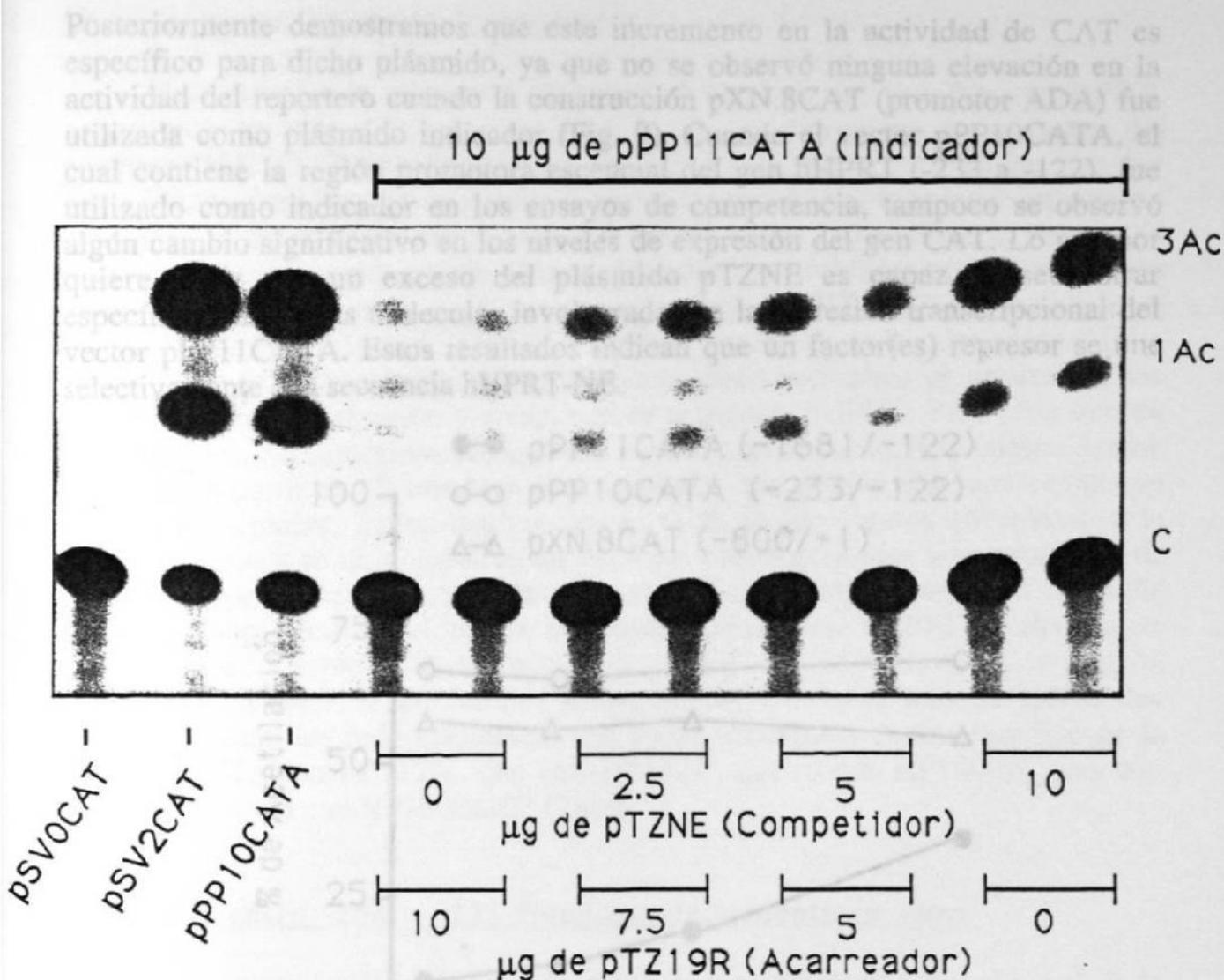
Habiendo demostrado la presencia de un elemento negativo entre las posiciones -570 y -388 (hHPRT-NE), decidimos investigar si dicha secuencia era capaz de reprimir la actividad transcripcional de promotores heterólogos tales como los de los genes ADA y DHFR, los cuales son funcional y estructuralmente 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).



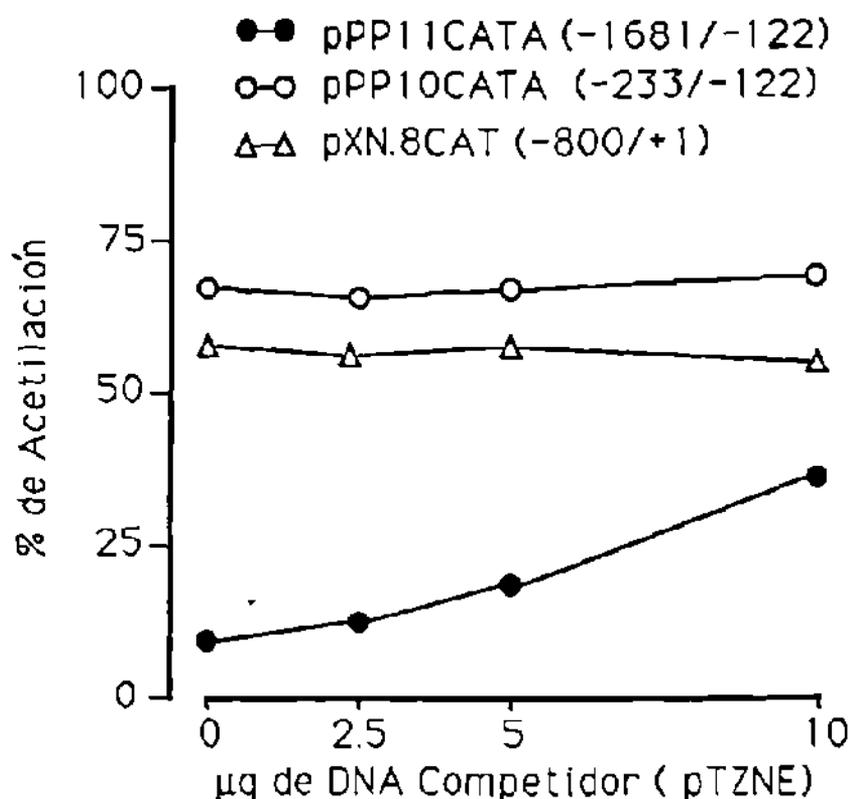
**Figura 7. Efecto del elemento negativo (EN) sobre la actividad de promotores heterólogos.** El elemento negativo del gen hHPRT (-570 a -388) fue insertado en ambas orientaciones en el sitio *Nde*I de los plásmidos pXN.8CAT y pEN.24CAT, los cuales contienen respectivamente 800 y 240 pb del promotor 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.



**Figura 8. Desrepresión del promotor del gen hHPRT por ensayos de competencia *in vitro*.** Células RJK88 fueron transfectedas con una mezcla de un plásmido indicador pPP11CATA (-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 pPP11CATA. pSV2CAT y pPP10CATA 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).

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). Cada punto en la gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes.

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  $\beta$ -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 $\Delta$ 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 $\beta$ 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* ( $\beta$ -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 $\beta$ -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	-
RP1600 $\Delta$ NE	DRL-107	34	Ca,Cm	+
	DRL-164	3	-	+
	DRL-168	ND	-	+
	DRL-169	4	-	+

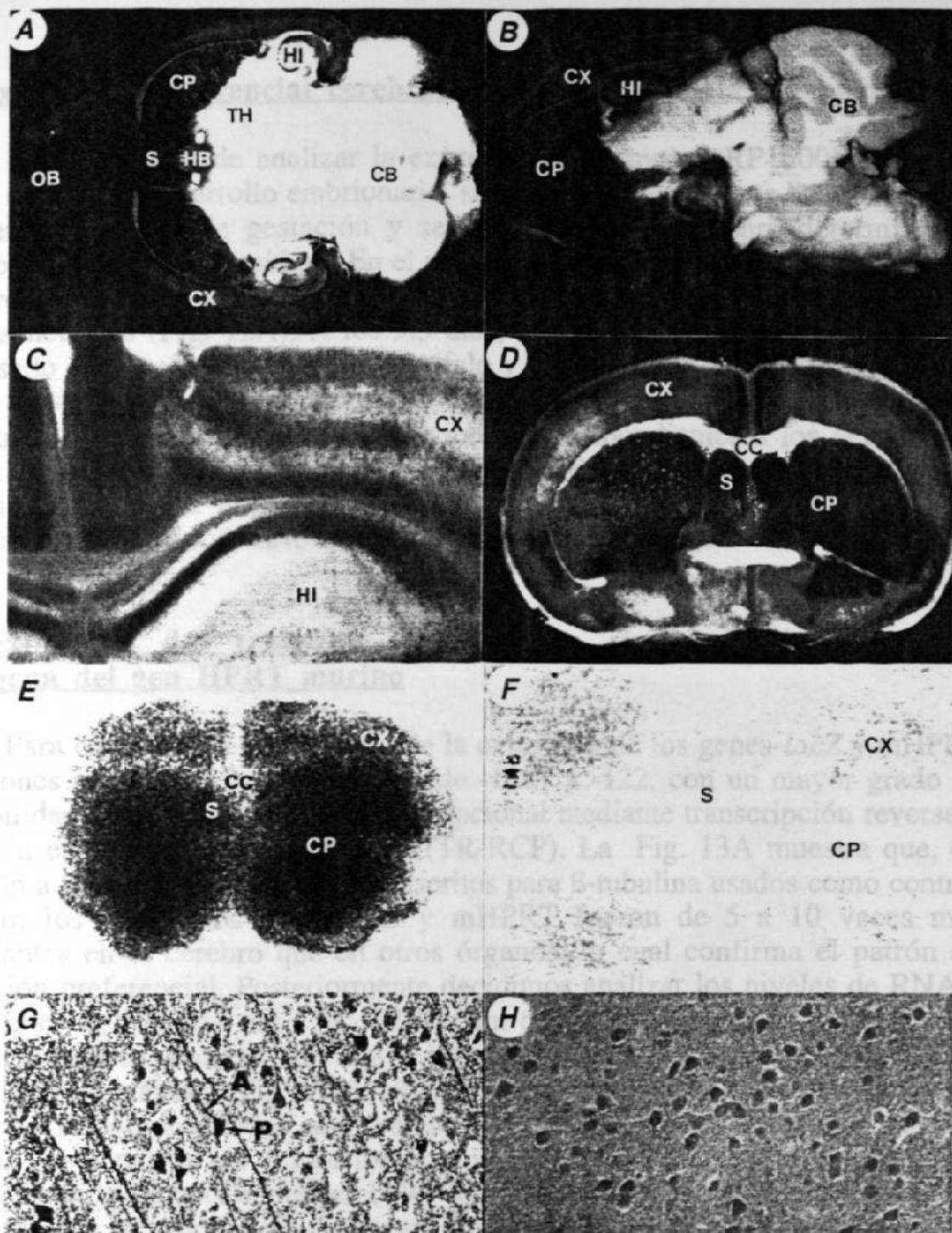
\* El número de copias del transgen fue determinado por hibridación tipo Southern y densitometría.

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  $\beta$ -galactosidasa en varias regiones del sistema nervioso central. Diversos órganos de animales silvestres y transgénicos fueron analizados para examinar la distribución de  $\beta$ -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





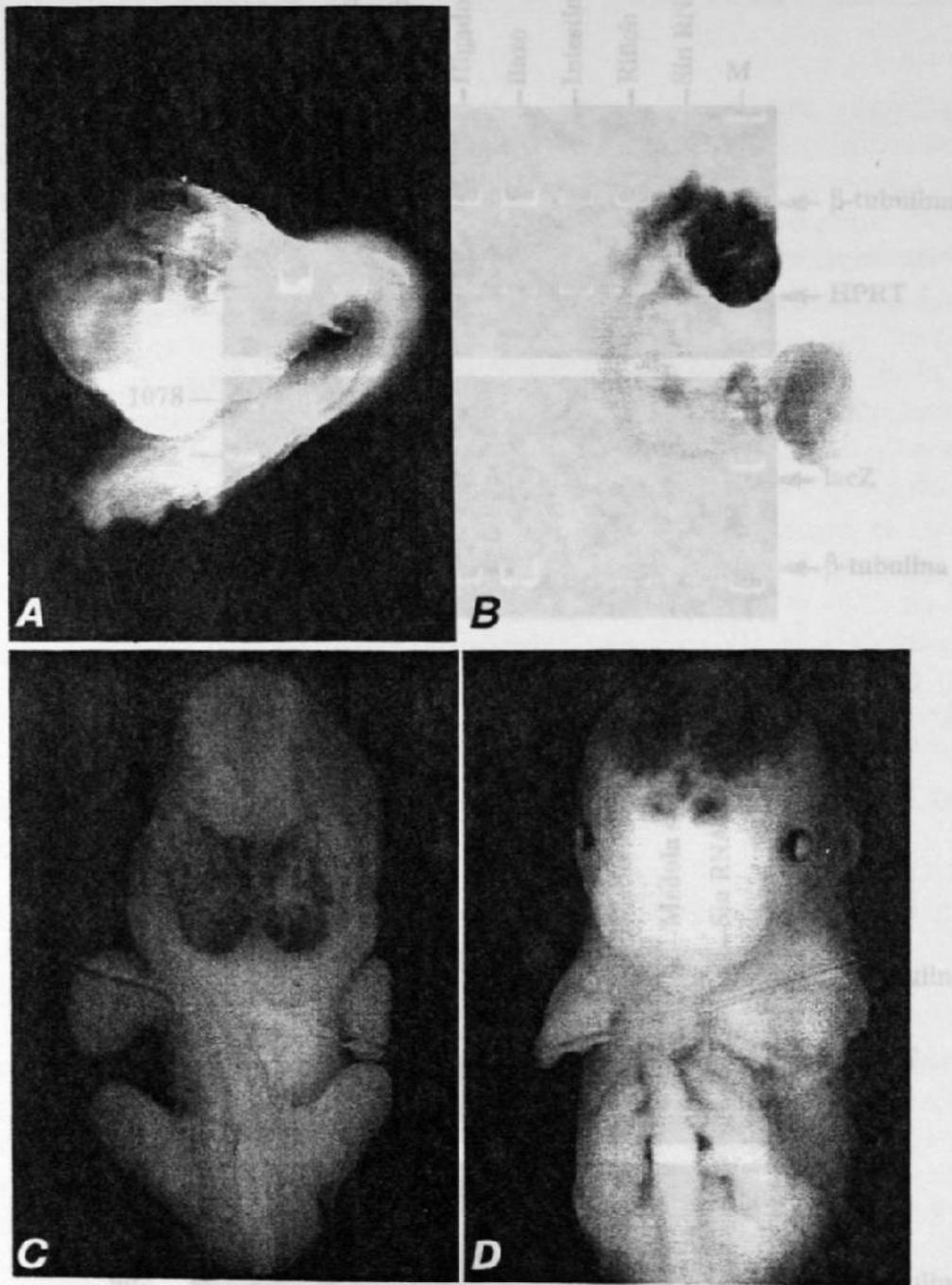
**Figura 11.** Análisis de la expresión de los genes *lacZ* y *HPRT* en cerebro de ratones transgénicos RP1600N. Paneles A a D representan secciones cerebrales de ratones adultos heterocigotos línea OVE159 después de haber sido teñidos con X-gal. (A) Sección horizontal. (B) Sección parasagital. (C) Sección 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*<sup>-</sup> (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  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidasa y las flechas indican axones (A) y pericarios (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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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. NC (B) y se analizaron los niveles transcripcionales mediante transcripción reverse y reactivo en cadena de la polimerasa. Los tamaños esperados de los productos *lacZ*, *HPRT* y  $\beta$ -tubulina (control interno) son 822, 418 y 650 pb, respectivamente.