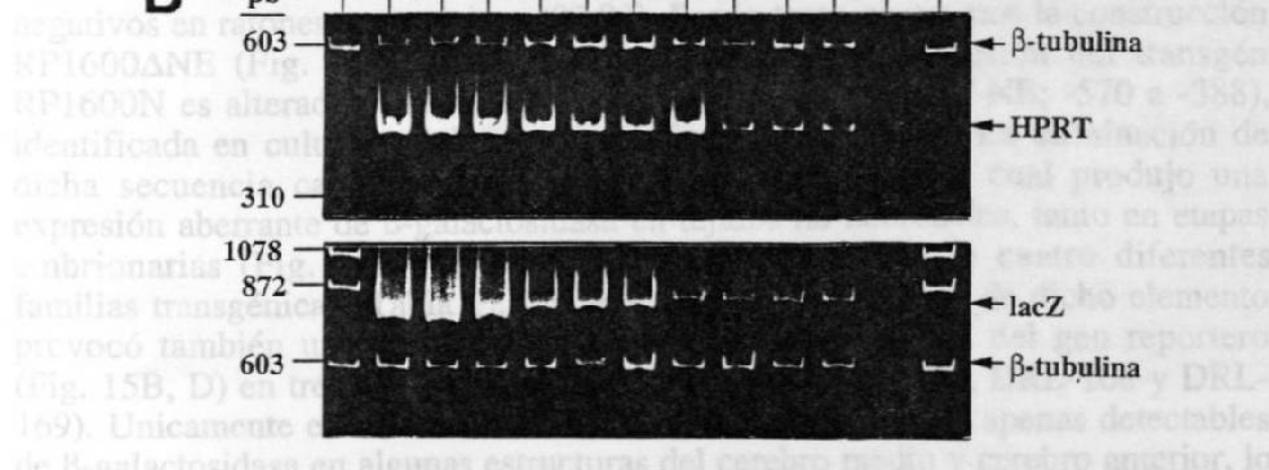


Las secuencias entre -174 y -122, que se requieren para la especificidad neuronal.



Todas estas observaciones sugieren que la construcción RP1600N es adecuada para distribuir adecuadamente la expresión genética en el sistema nervioso central, ya que su delección de la secuencia -174 a -122 afectó el patrón de expresión que se obtiene normalmente con el vector control (Fig. 14B).

**mHPRT-NE: un elemento regulador neuronal y glial y sus variantes y expresoras**



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

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

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

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

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

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

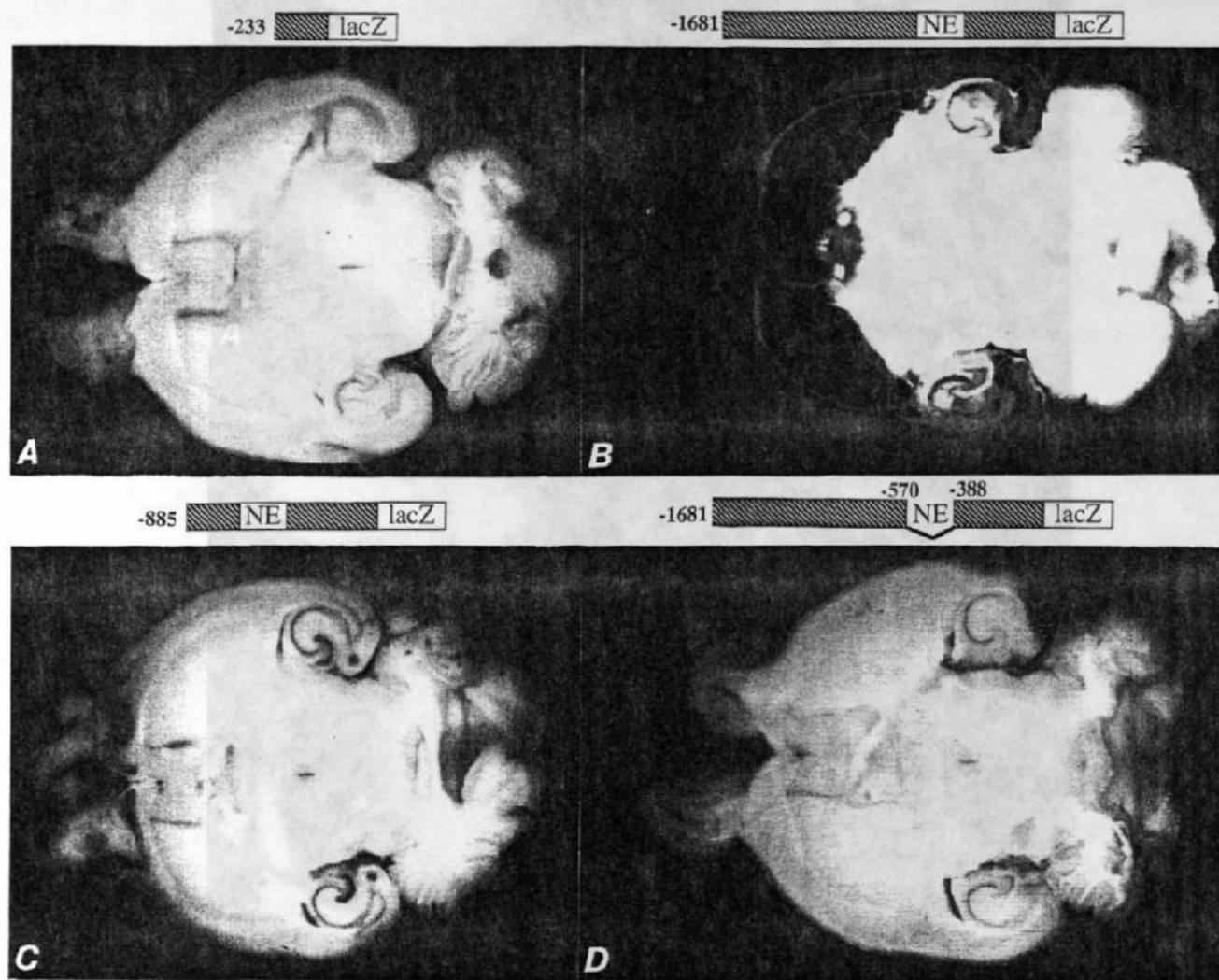
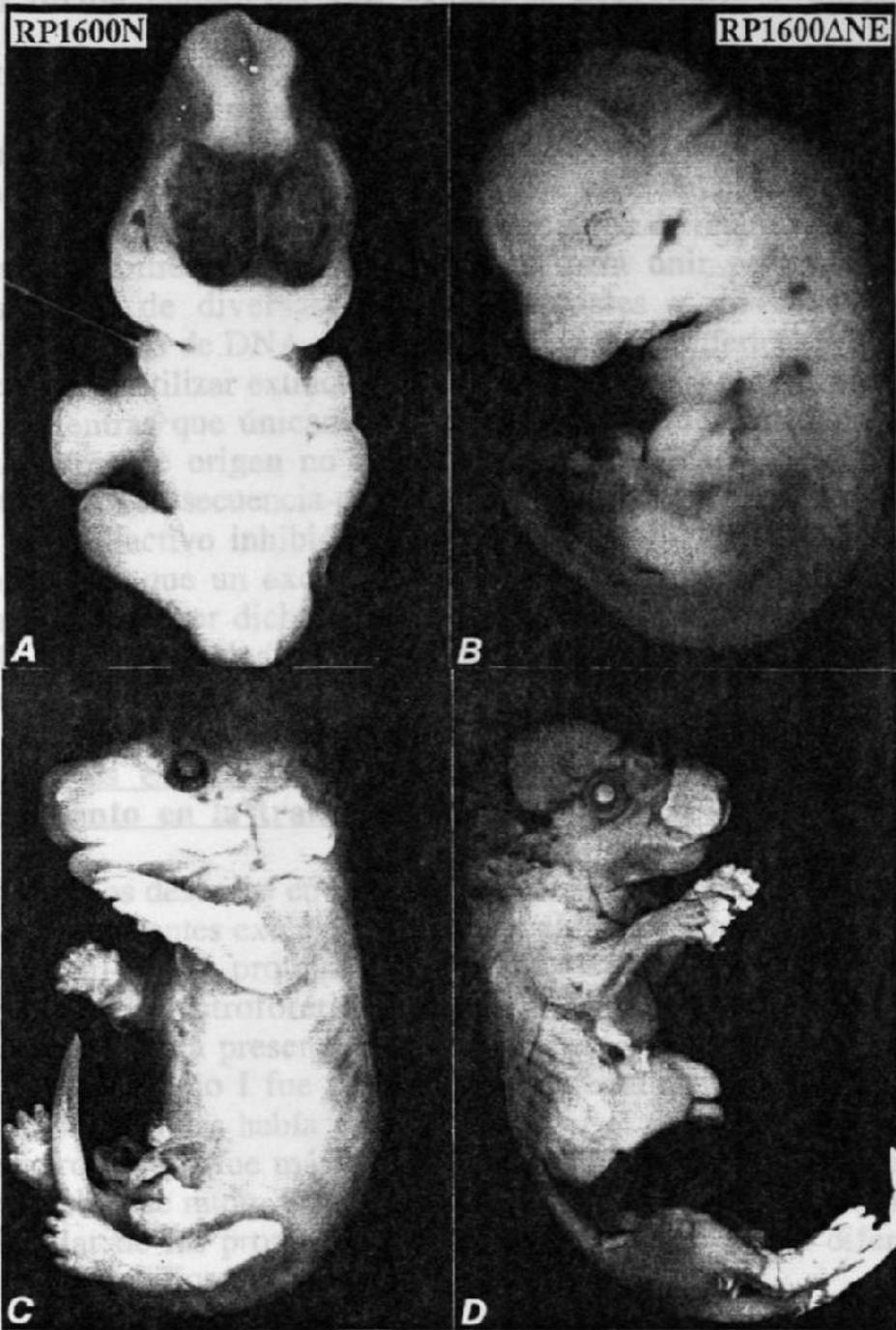
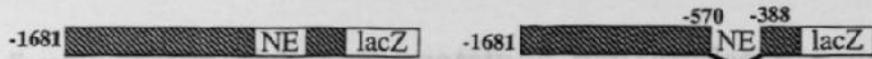


Figura 14.- Expresión aberrante del gen *lacZ* en el SNC de ratones transgénicos portadores de la construcción RP1600ΔNE. A y C corresponden a ratones portadores de la construcción RP112N y RP800N, respectivamente.

**Figura 14.** Detección de β-galactosidasa en el SNC de ratones transgénicos portadores de diferentes cartuchos hHPRT-*lacZ*. Las figuras representan secciones horizontales de ratones adultos portadores de las construcciones RP112N (A), RP1600N (B), RP800N (C) y RP1600ΔNE (D), después de haber sido sometidos a una tinción con X-gal. En la parte superior de las figuras se esquematizan los cartuchos de expresión correspondientes.



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

## **hHPRT-NE forma complejos con proteínas neuronales y ubicuas**

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

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

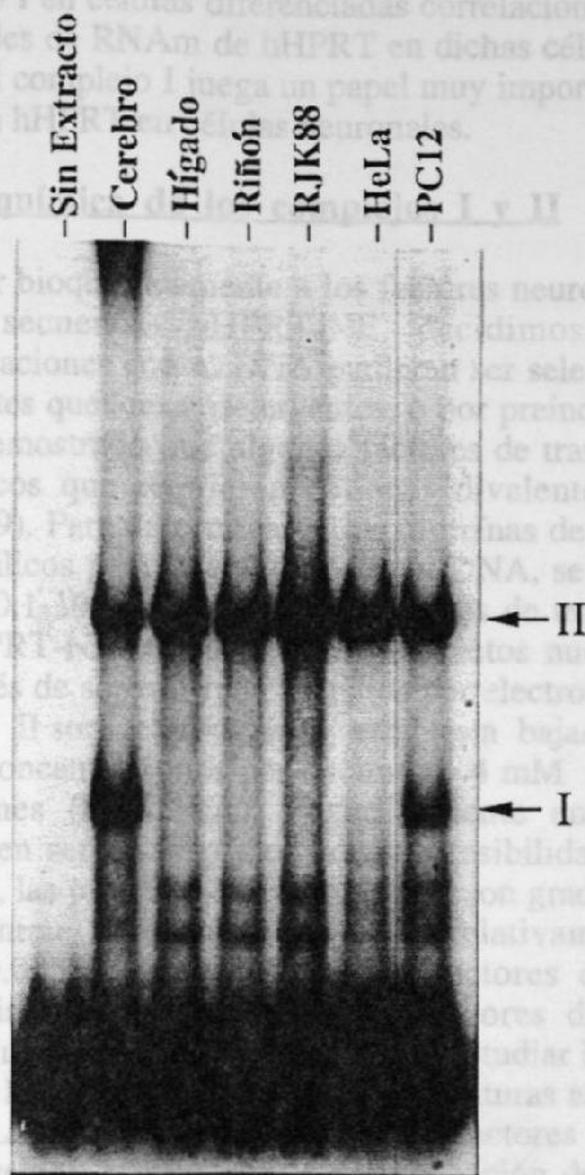
Los hallazgos descritos en la sección anterior sugieren que los factores del complejo I están presentes exclusivamente en células neuronales. Para confirmar el origen neuronal de las proteínas que interactúan en el complejo I, hicimos ensayos de retardo electroforético utilizando extractos de células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

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

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

### Caracterización bioquímica de los complejos I y II

Para caracterizar bioquímicamente a los factores neuronales y ubicuos que interactúan con la secuencia hHPRT-NE, decidimos investigar si sus correspondientes asociaciones de proteínas pueden ser selectivamente afectadas por la adición de agentes que afectan la actividad de transcripción. Se ha demostrado que los factores de transcripción contienen dominios aminoacídicos que interactúan con la secuencia consenso (29). Para investigar si los factores de transcripción requieren iones metálicos para interactuar con la secuencia hHPRT-NE, se agregaron cantidades crecientes de EDTA (0.1-30 mM) a las mezclas de la sonda radiactiva (hHPRT-NE) y extractos nucleares de hígado murino. Después de la electroforesis, encontramos que los complejos I y II se forman en presencia de EDTA, mientras que con concentraciones de ambas interacciones de los complejos I y II pueden ser afectadas, como se muestra en la Fig. 18B. Los resultados indican que al aumentar la concentración de EDTA, los complejos I y II se disocian completamente a concentraciones de 0.1 mM. También pudimos distinguir la especificidad de las proteínas, cerebrales y hepáticas, en las reacciones de unión. La formación de los complejos I y II es relativamente termoestable. El calentamiento de los extractos hasta temperaturas de 62°C no afectó la formación de dicho complejo, mientras que los factores del complejo I son térmicamente inactivados a temperaturas mayores de 46°C. Todos estos resultados indican que aunque las proteínas de los complejos I

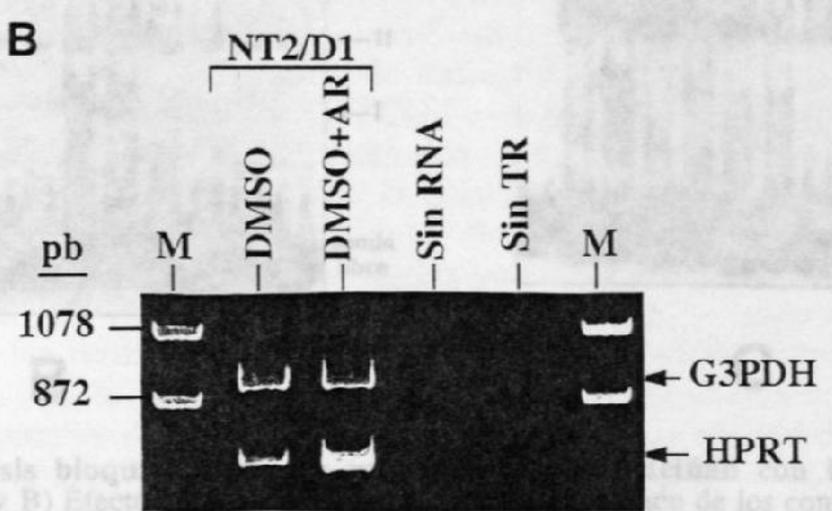
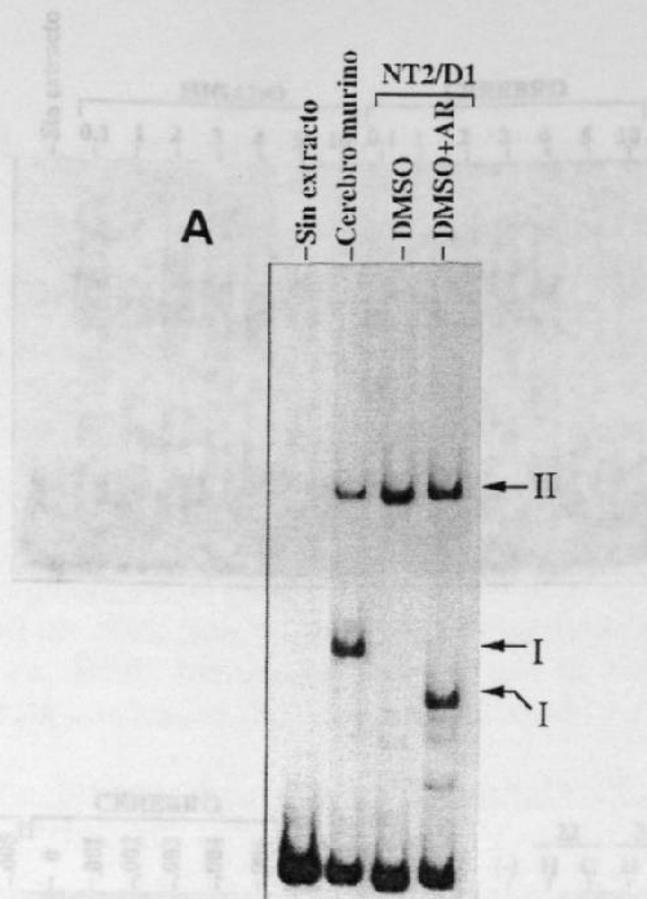


**Figura 16. Detección de proteínas nucleares que se unen a la secuencia hHPRT-NE (-570 a -388).** Ensayo de retardo electroforético que muestra la formación de complejos de DNA y proteínas al mezclar extractos nucleares, provenientes de los indicados órganos murinos y cultivos celulares, con la sonda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

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

### Caracterización bioquímica de los complejos I y II

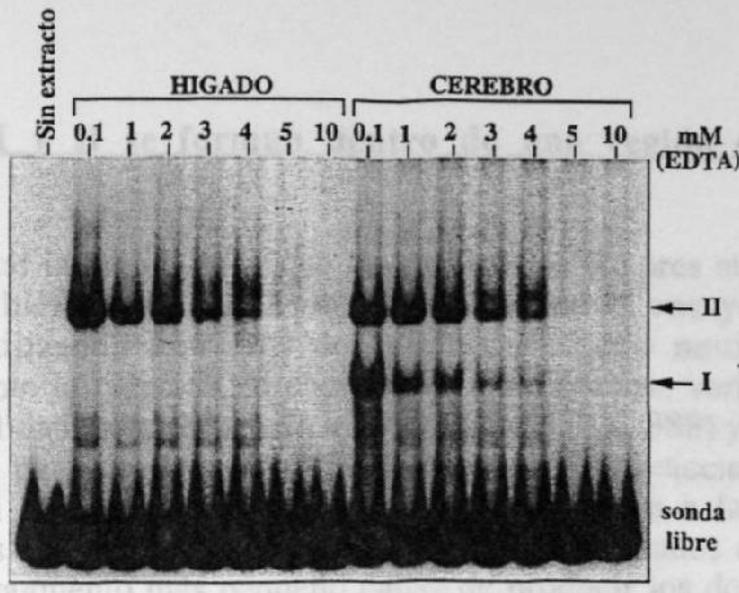
Para caracterizar bioquímicamente a los factores neuronales y ubicuos que interactúan con la secuencia hHPRT-NE, decidimos investigar si sus correspondientes asociaciones con el DNA pudieran ser selectivamente afectadas por la adición de agentes quelantes, detergentes, o por preincubación a diferentes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



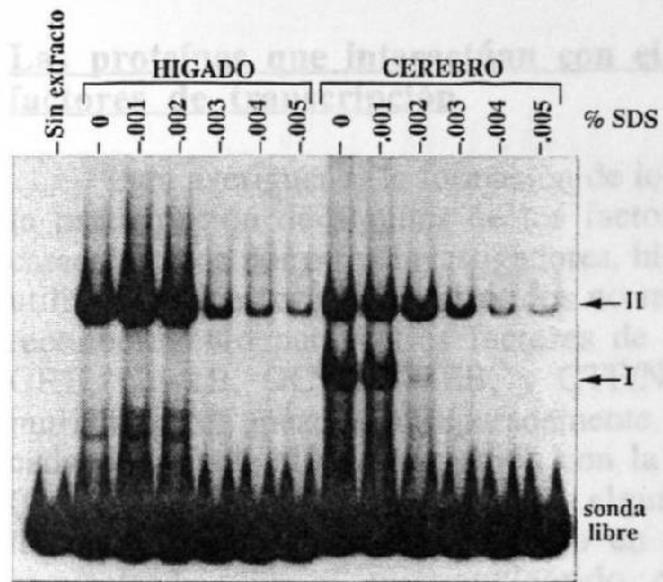
**Figura 17.** La formación del complejo I correlaciona con un incremento en la transcripción del gen HPRT durante la diferenciación neuronal. (A) Ensayo de retardo electroforético que muestra los eventos de unión al mezclar la sonda hHPRT-NE con extractos de células NT2/D1 cultivadas en la presencia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

Los complejos I y II  
 fragmento Ef

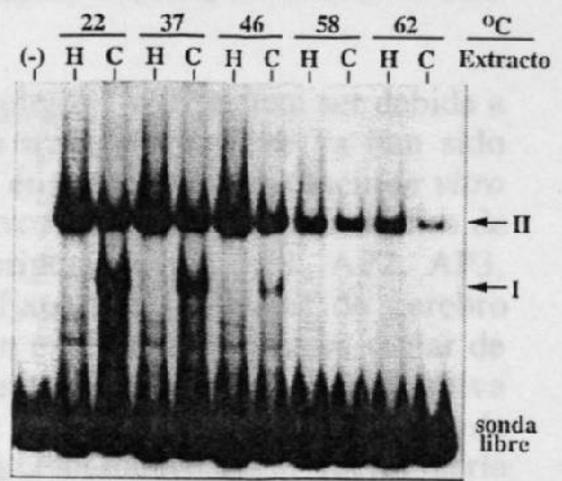
Para delimitar la secuencia electroforética que generamos mediante que cubren la totalidad con radiactividad. Como se muestra observaron en dos Sin embargo, el fragmento de 60 pb identificado en los fragmentos Fb y Fc. Estos resultados indican que el sitio de formación para ambos complejos está localizado entre las posiciones -510 y -531 (fragmento Ff).



**A**



**B**



**C**

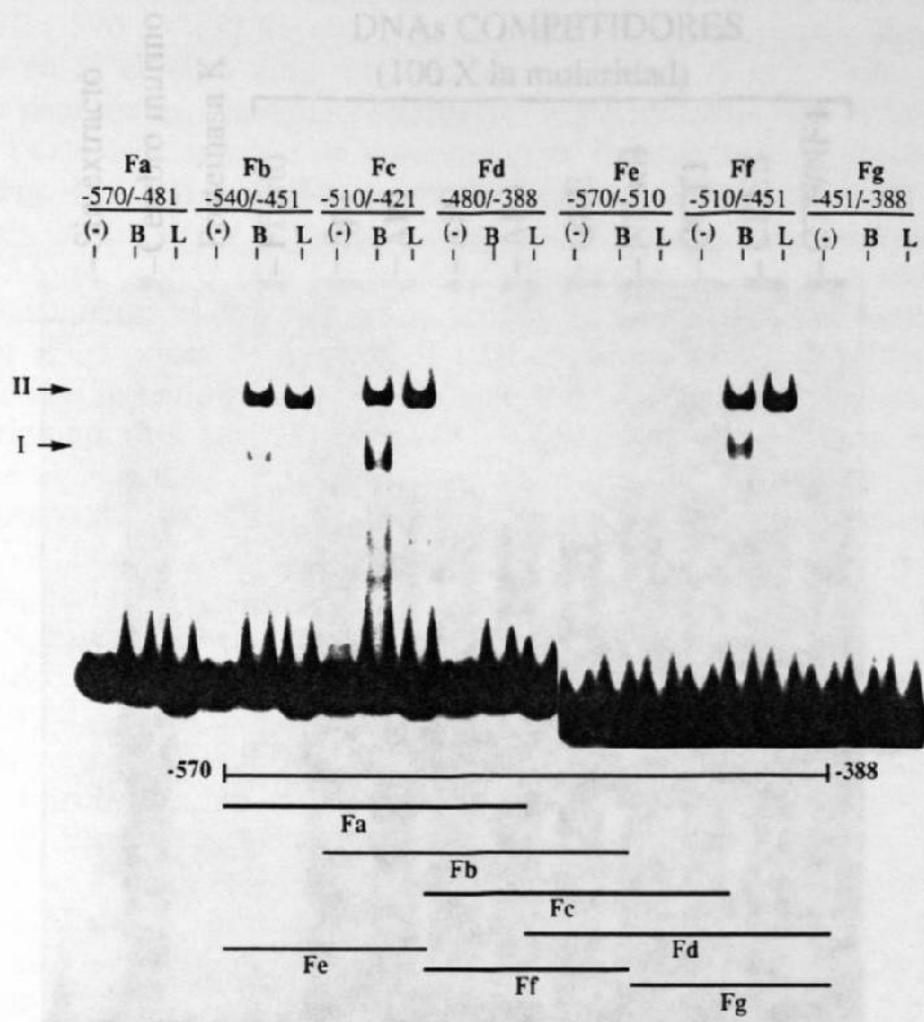
**Figura 18. Análisis bioquímico de las proteínas que interactúan con la secuencia hHPRT-NE. (A y B) Efecto del EDTA y el SDS sobre la formación de los complejos I y II. Extractos nucleares de hígado y cerebro murino fueron incubados con la sonda hHPRT-NE en la presencia de cantidades crecientes de EDTA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

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

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

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

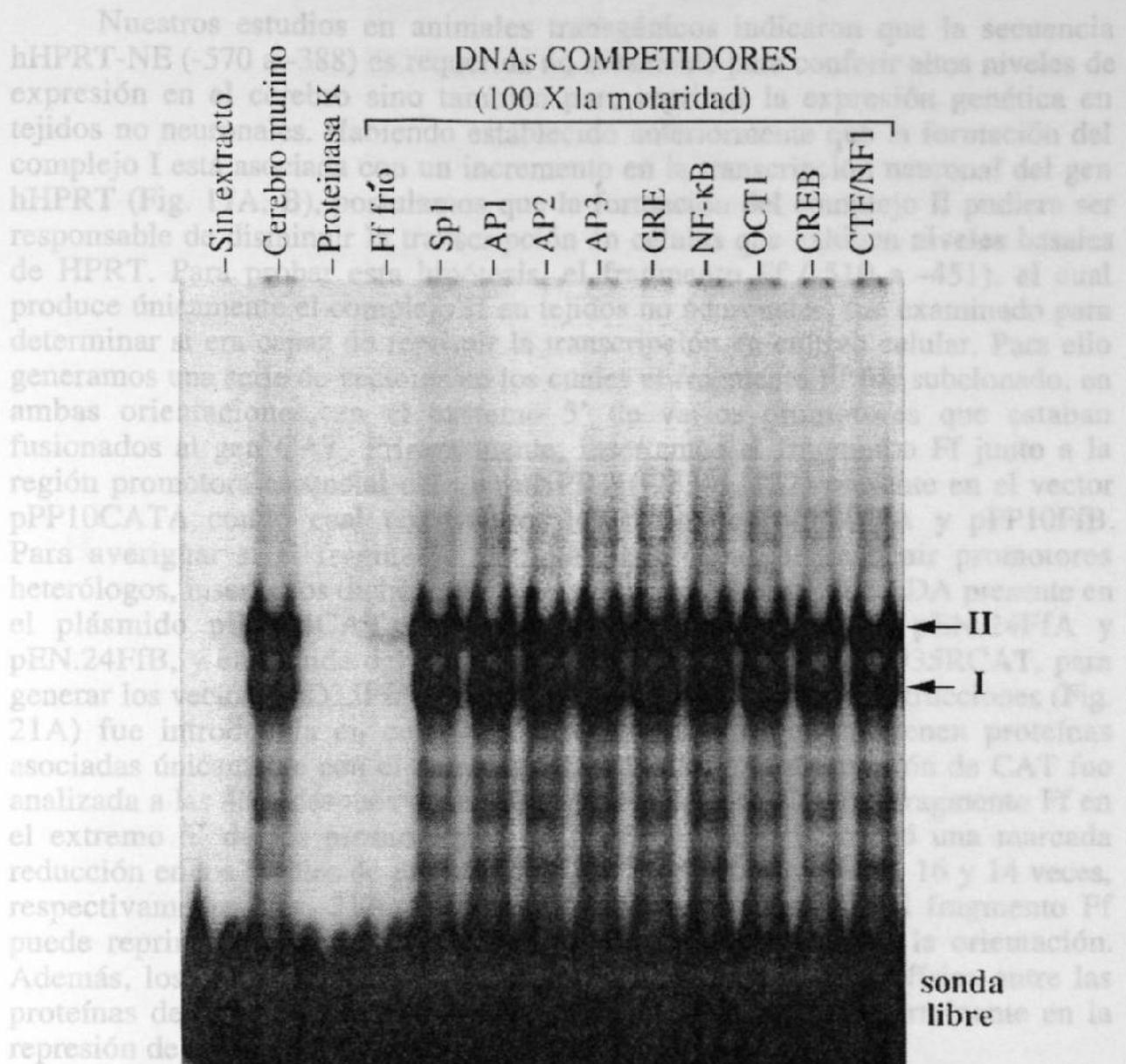
Para averiguar si la formación de los complejos I y II pudiera ser debida a la participación de algunos de los factores de transcripción que ya han sido caracterizados por otros investigadores, hicimos ensayos de competencia *in vitro* utilizando diversos oligonucleótidos no radiactivos que contenían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



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

El radiactivo. Los productos de las reacciones de unión fueron resueltos por electroforesis y autoradiografía. Nótese que la formación de los complejos I y II fue el resultado únicamente de la acción de la proteinasa K, o por un exceso de la secuencia 5' de radiación.

## El complejo II es un modulador negativo de la expresión génica



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

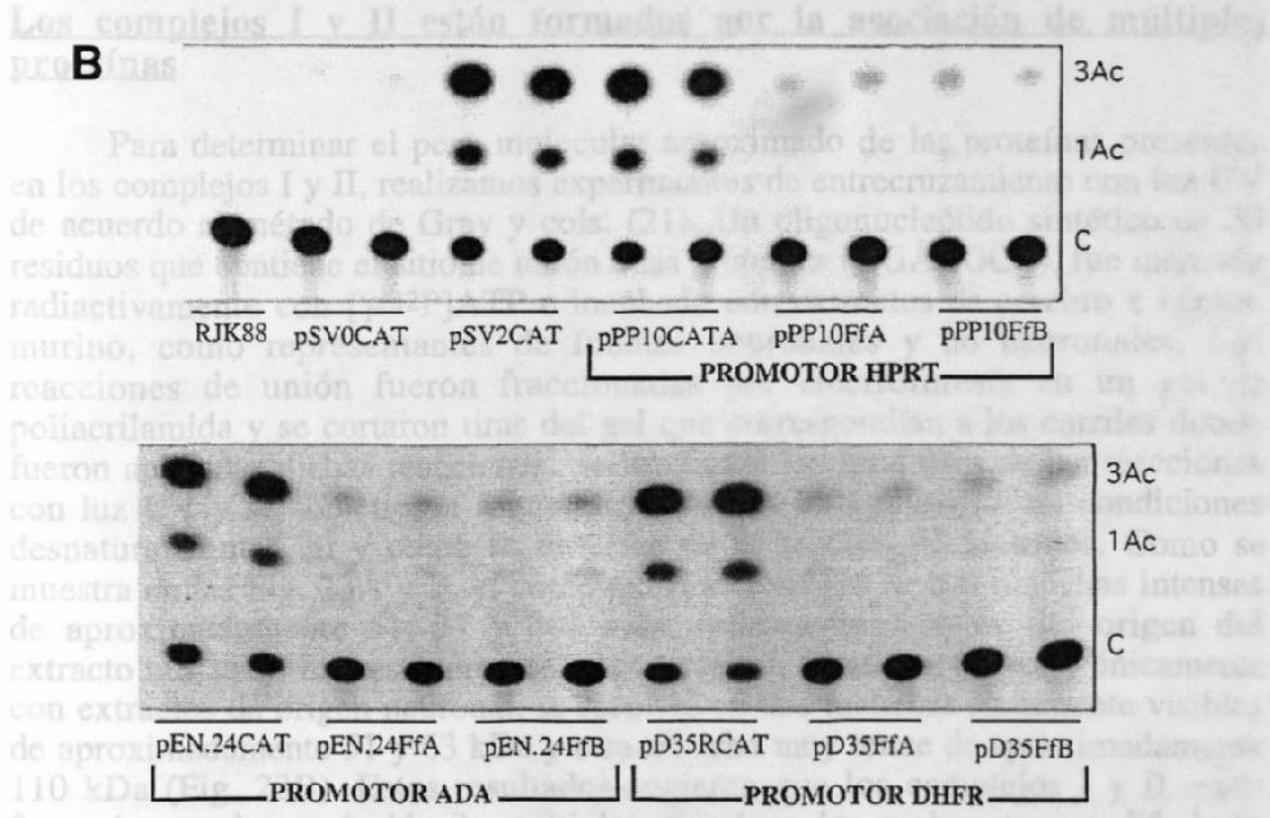
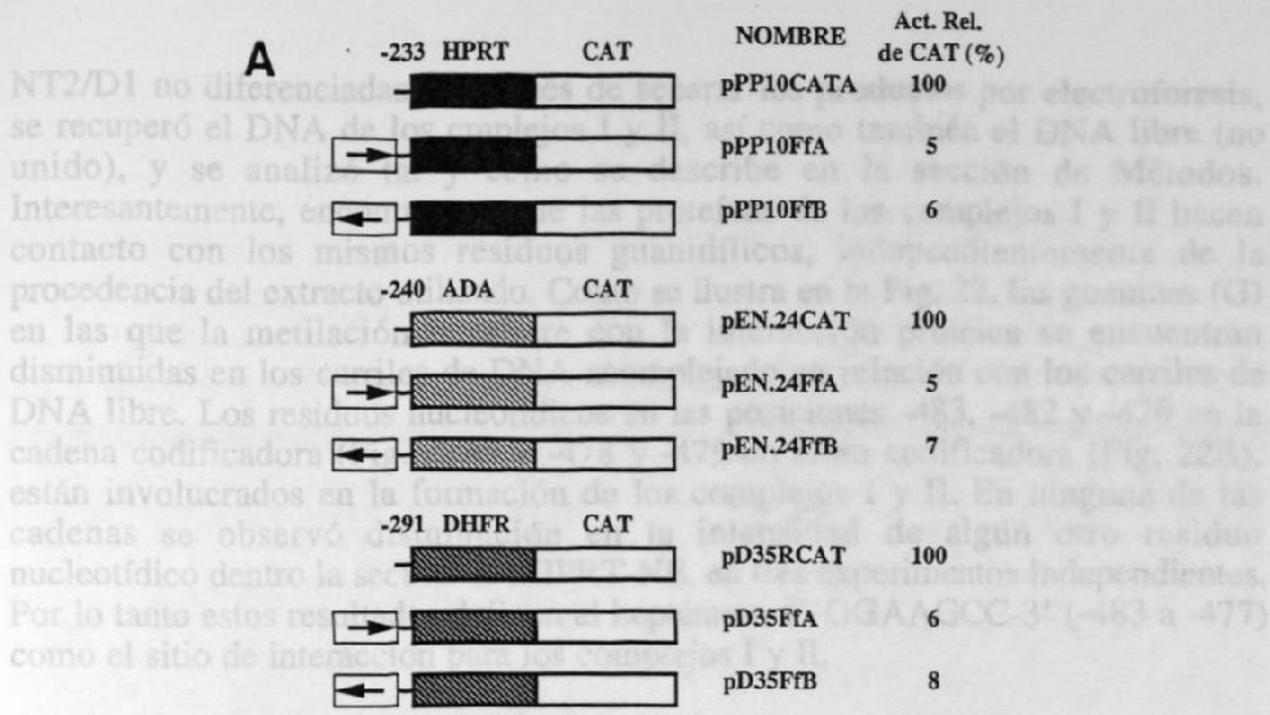
**Figura 20. Ensayos de competencia con oligonucleótidos que contienen secuencias de reconocimiento para diversos factores de transcripción.** Un exceso de 100 veces molar de cada uno de los oligonucleótidos así indicados, también como de la secuencia Ff no radiactiva, fueron mezclados con extractos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

## **El complejo II es un modulador negativo de la expresión genética**

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

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

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

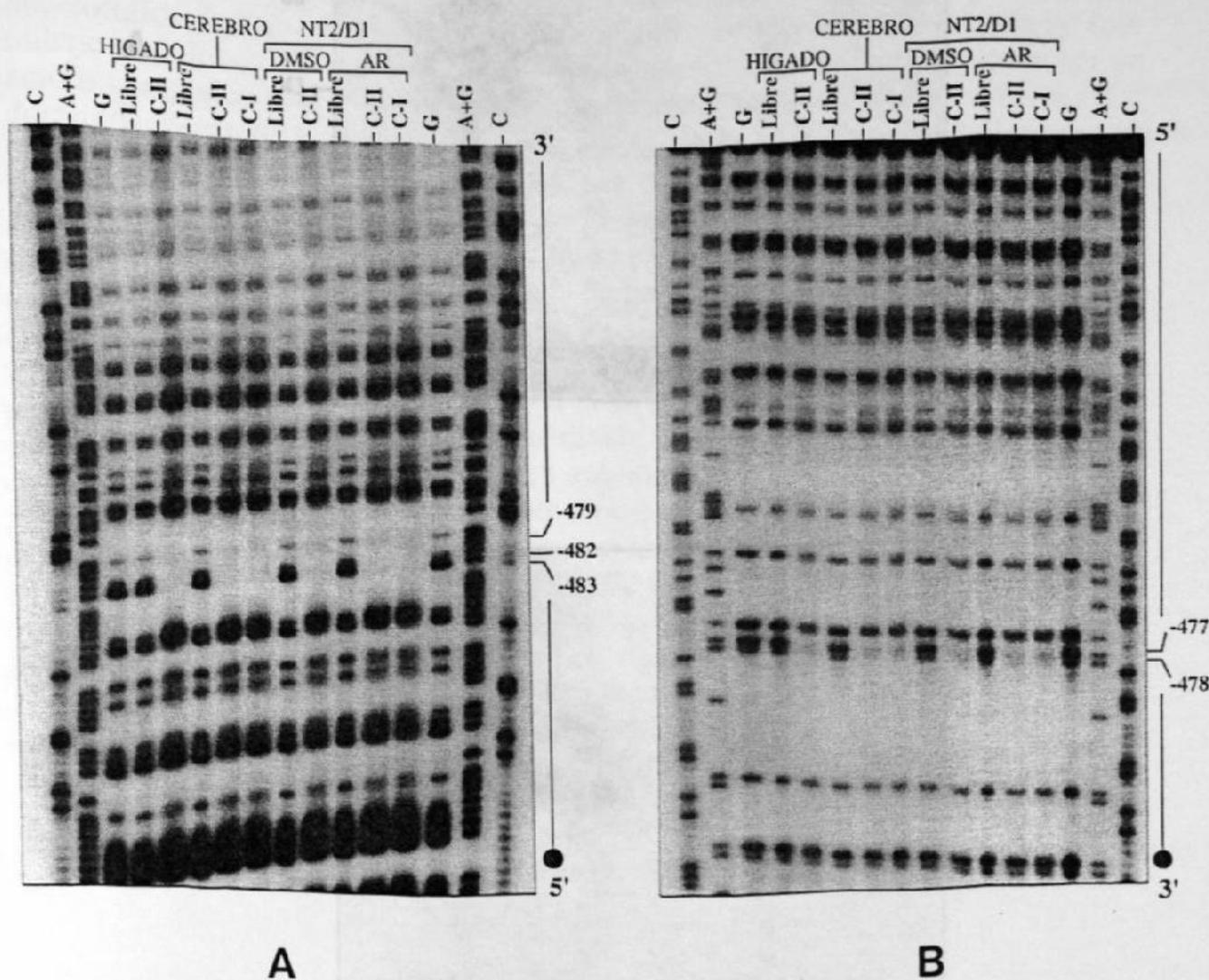


**Figura 21. Análisis funcional del fragmento Ff en cultivo celular.** (A) Efecto de la secuencia Ff sobre la actividad transcripcional de varios promotores de expresión constitutiva. El fragmento Ff (caja con flechas) fue clonado en ambas orientaciones en los plásmidos pPP10CATA, pEN.24CAT y pD35RCAT,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

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

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

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

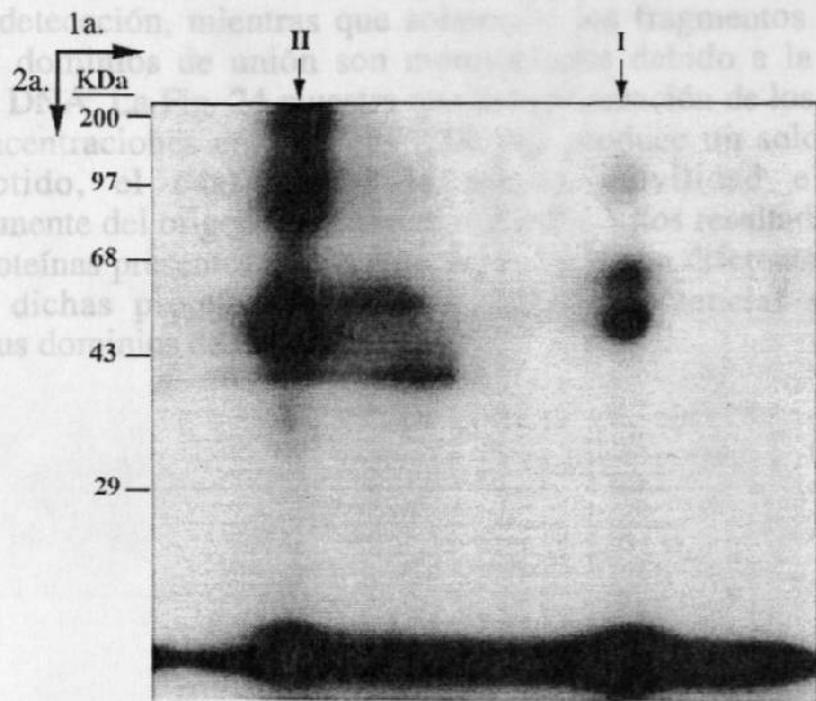
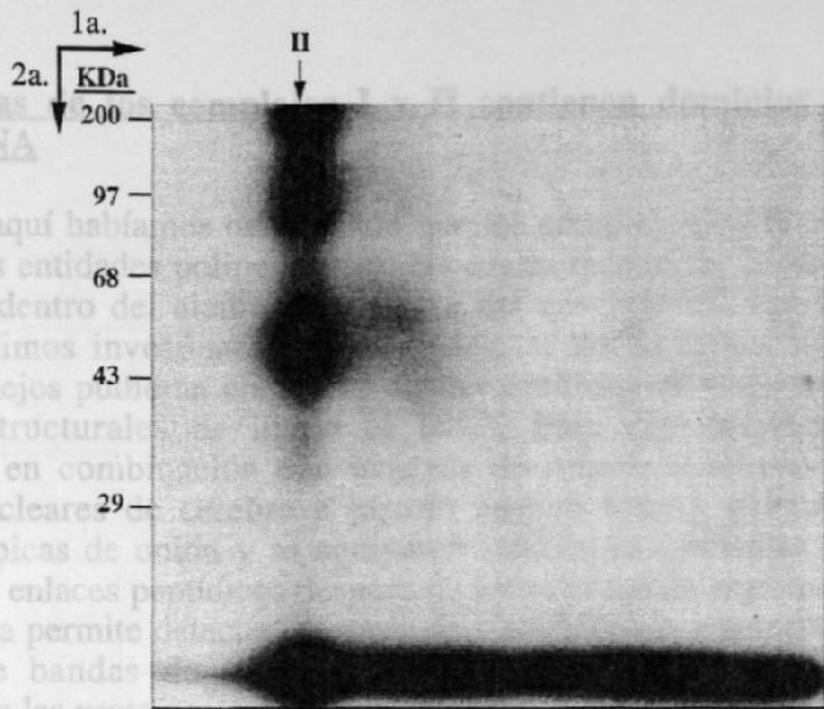


**Figura 22. Identificación de los sitios de unión a las proteínas mediante ensayos de interferencia por metilación (“footprinting”).** Autorradiogramas que muestran los sitios de rompimiento químico de las guaninas metiladas en la cadena codificadora (A) y no codificadora (B) de la secuencia hHPRT-NE.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

Las proteínas  
unión al DNA

Hasta aquí habíamos  
por diferentes entidades  
nucleotídica dentro de  
trabajo **A**  
ambos complejos para  
dominios estructurales  
proteolíticas en combi  
Extractos nucleares  
reacciones típicas de  
cual corta los enlaces  
simple técnica permite  
colección de bandas  
fragmentos de las proteínas

escapan a la detección,  
presente en el DNA  
DNA/polipéptido.  
independientemente del  
aunque las proteínas  
distribución, dichas  
similares en sus dom



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

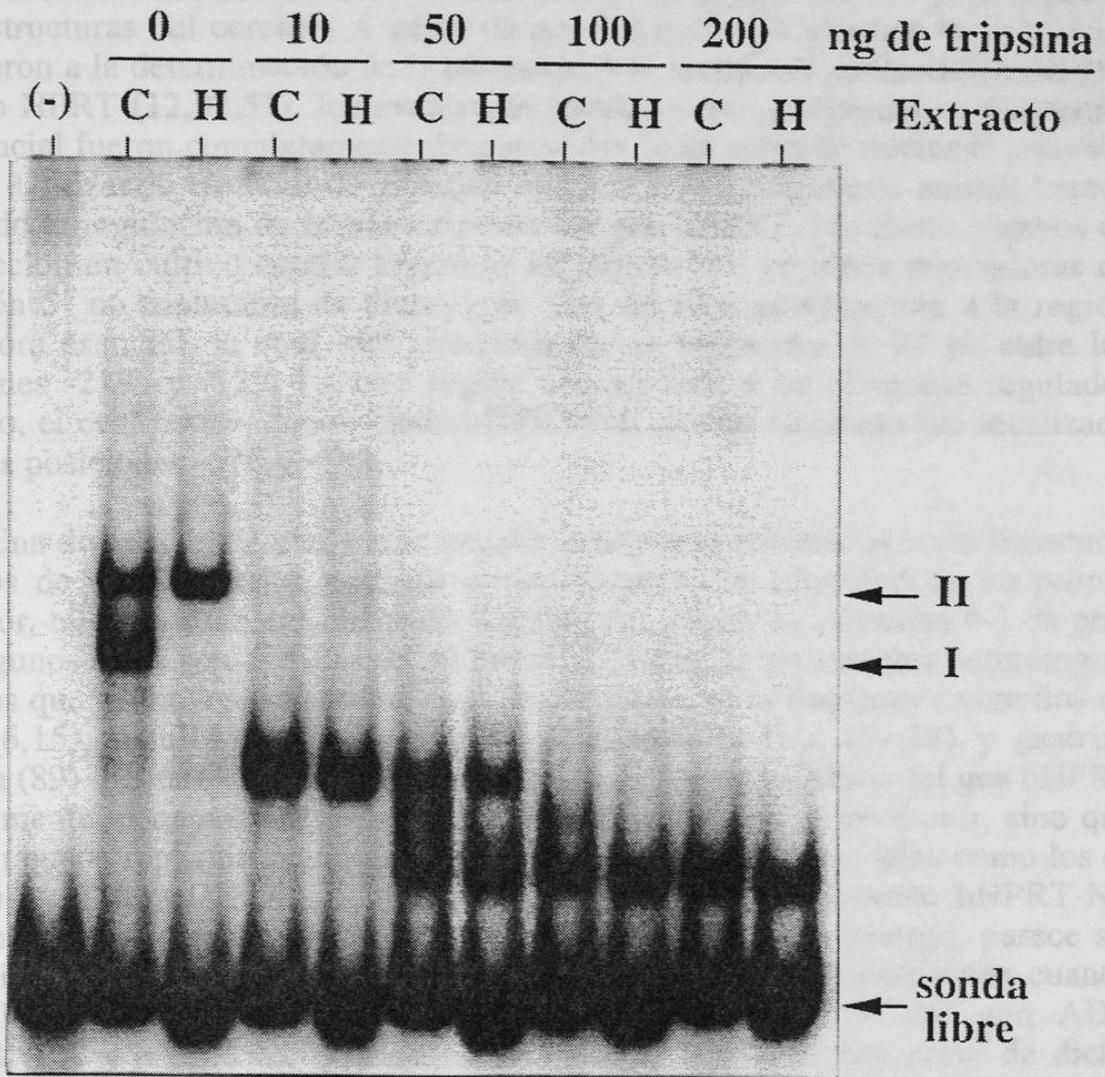
## Las proteínas de los complejos I y II contienen dominios similares de unión al DNA

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

## VI. DISCUSION

Rosenbloom y cols. reportaron que el nivel de la enzima HPRT varía considerablemente en diferentes tejidos y existen niveles extremadamente altos en el cerebro y en otras estructuras. En el presente estudio, los resultados condujeron a la conclusión de que el fragmento Ff humano tiene una preferencia por el cerebro humano. Este trabajo, estudiado en detalle, demostró que el fragmento Ff transfecido en células de ratón se localiza en la región promotora y en la región de inicio de la transcripción. En las posiciones -2 y -1, el fragmento Ff actúa como un elemento regulador negativo, el cual interfiere con la actividad de los factores entre las posiciones -2 y -1.

Un estudio reciente de la actividad de los factores de transcripción en el cerebro humano y en el cerebro de pollo (15) demostró que el fragmento Ff humano (89) actúa como un elemento regulador negativo, el cual interfiere con la actividad de los factores de transcripción. Este estudio también demostró que el fragmento Ff humano actúa como un elemento regulador negativo, el cual interfiere con la actividad de los factores de transcripción. Este estudio también demostró que el fragmento Ff humano actúa como un elemento regulador negativo, el cual interfiere con la actividad de los factores de transcripción.



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

## VI. DISCUSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## VII. CONCLUSIONES

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

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

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

## VIII. PERSPECTIVAS

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

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

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

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

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

## IX. PUBLICACIONES DERIVADAS

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

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

## X. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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



DONATIVO

