

Tesis de Posgrado

Regulación de la expresión genéticas : estudio de la región 5' reguladora del gen de la transferrina humana y de los factores de transcripción que la reconocen

Ochoa, Alberto Ricardo

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ochoa, Alberto Ricardo. (1988). Regulación de la expresión genéticas : estudio de la región 5' reguladora del gen de la transferrina humana y de los factores de transcripción que la reconocen. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2160_Ochoa.pdf

Cita tipo Chicago:

Ochoa, Alberto Ricardo. "Regulación de la expresión genéticas : estudio de la región 5' reguladora del gen de la transferrina humana y de los factores de transcripción que la reconocen". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2160_Ochoa.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES

Regulación de la expresión genética

Estudio de la región 5' reguladora del gen de la
transferrina humana y de los factores de transcripción
que la reconocen.

Tesis presentada para optar al título de Doctor
en Ciencias Químicas

Autor:

Alberto Ochoa

Directores:

Mario Zakin

Hector Carminatti

Lugar de trabajo:

Unidad de Bioquímica Celular

Instituto Pasteur

1988

- 2 160 -
g. 2

Agradecimientos

Muchas son las personas que, de una u otra forma, han colaborado en la realización de este trabajo, quiero agradecer especialmente a aquellos que en Paris o en Buenos Aires permitieron llevarlo a cabo

Al Dr. Mario Zakin, por sus enseñanzas, su apoyo y su amistad. La realización de este trabajo es ante todo un mérito de su dirección y su ejemplo.

Al Instituto Pasteur, especialmente en la persona del Dr Georges N. Cohen por haberme permitido trabajar en la Unidad de Bioquímica Celular y por ser no solo el jefe del servicio, sino un compañero más del laboratorio en el trabajo y en las discusiones de todos los días.

A mis compañeros de laboratorio: Nathalie Duchange, Yvonne Guillou, Marie Claire Py, y Miguel Lucero. A Daniel Mendelzon, por su amistad. A Evelyne Schaeffer y François Boissier por la excelente tarea de construcciones y transfecciones y, especialmente, a Franck Brunel por su amistad y por compartir el entusiasmo de esta investigación. Gracias a todos ellos la diversión del trabajo de cada día se transforma en una eficiente y fructífera tarea de grupo.

Al Dr. Charles Babinet, por su disposición y ayuda en el trabajo de obtención de animales transgénicos.

Quiero agradecer también a todos aquellos que desde Buenos Aires han sido partícipes de esta tesis o compañeros de otra época, particularmente:

Al Dr. Hector Carminatti, mi director en años anteriores, por su ejemplo de honestidad y sacrificio, y por haber aceptado la responsabilidad de presentar de este trabajo ante la Universidad de Buenos Aires.

A los directores de la Fundación Campomar, por haberme permitido trabajar en el Instituto donde pasé uno de los períodos más importantes de mi trabajo y formación en la investigación.

A mis compañeros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por los gratos momentos compartidos durante los años pasados junto a ellos. A mis amigos Mariana Stein, Marta Blumenfeld, Daniel Boscoboinik y Cecilia Hertig. A Alejandro Mentaberry, con quien hice mis primeros experimentos, a Luis Quesada y Ricardo Wolosiuk por sus consejos y estímulo. A Mary Boxer y Beile Wolf, por su afecto y disposición. A todos los integrantes del I.I.B. por la camaradería de cada día.

Finalmente, a mi familia y a mis amigos por su estímulo y la alegría de compartir tantas cosas, por ser como son.

Índice

INTRODUCCION.....	1
I) Regulación de la expresión genética.....	1
1) Resumen	1
2) Metodologías.....	3
3). Mecanismo de iniciación transcripcional.....	6
a). Iniciación basal de la transcripción.....	6
b). Iniciación de la transcripción.....	7
c). Región promotora y factores promotores	7
d). "Enhancers".....	9
e). Otros elementos reguladores.....	10
f). Especificidad tisular	11
g). Estructura de la cromatina.....	12
II) La Transferrina.....	13
1) Resumen	13
2) Estructura de la proteína.....	13
3) Actividad biológica de la Tf.....	15
4) Estructura del gen de la hTf.....	15
5) Regulación de la expresión del gen de la hTf.....	16
<u>MATERIALES Y METODOS.....</u>	20
I) Métodos de obtención y purificación de ácidos nucleicos.....	20
A) Obtención de DNA plasmídico	20
1) Obtención y purificación por gradientes de cloruro de cesio	20
2) Método de la lisis alcalina (pequeña escala).....	21
B) Obtención de DNA genómico.....	22
1) Obtención de DNA Leucocitario.....	22
2) Obtención de DNA de órganos o colas de ratón	23
C) Obtención de RNA.....	24
1) A partir de cultivos celulares.....	24
2) A partir de órganos.....	25
D) Métodos de purificación de ácidos nucleicos	26
1) Extracciones y precipitaciones con solventes orgánicos	26
E) Preparación de oligonucleótidos.....	27
1) Purificación de oligonucleótidos de simple cadena	27
2) Hibridización con el oligonucleótido complementario	28
II) Reacciones enzimáticas y marcado radioactivo de sondas.....	29
A) Marcado radioactivo de fragmentos de DNA	29
1) Marcado en extremos 3'.....	29
2) Marcado en extremo 5'.....	29
3) Marcado por desplazamiento de corte-Nick translation.....	30
4) Marcado por polimerización al azar (Random Priming).....	30
B) Reacciones enzimáticas	30
1) Enzimas modificadoras del DNA	31
2) Cloranfenicol Acetil Transferasa	31
III) Métodos Electroforéticos.....	32
A) Electroforesis de DNA.....	32
1) Geles nativos de agarosa	32
2) Aislamiento de fragmentos de DNA por electroelución a papel..	32
3) Geles de agarosa de bajo punto de fusión	33

4) Geles nativos de poliacrilamida.....	33
5) Geles de separación de cadena	33
6) Geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	34
7) Aislamiento de fragmentos de DNA de geles de poliacrilamida.....	35
B) Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	35
C) Electroforesis de proteínas	36
IV) Clonado de fragmentos de DNA	37
A) Clonado	37
1) Preparación del vector.....	37
2) Ligación de fragmentos	37
3) Preparación de bacterias competentes.....	37
4) Transformación de bacterias.....	38
B) Identificación de recombinantes.....	38
1) Identificación por hibridación de DNA sobre filtros Whatman	39
2) Análisis de clones recombinantes.....	40
1) Purificación de plásmidos en pequeña escala	40
2) Análisis del patron de restricción.....	40
V) Identificación de secuencias por hibridación y secuenciación de DNA	41
A) Método de hibridación puntual de DNA (Dot Blot).....	41
1) Preparación de la membrana.....	41
2) Prehibridación	41
3) Hibridación.....	42
4) Lavados y autoradiografía.....	42
B) Método de Southern	42
1) Tratamiento del gel de agarosa	43
2) Transferencia del DNA a la membrana.....	43
3) Prehibridación	43
4) Hibridación.....	44
5) Lavados y autoradiografía.....	44
C) Identificación de secuencias de RNA (Northern blot).....	44
1) Preparación del RNA.....	44
2) Transferencia del RNA a la membrana	45
3) Prehibridación	45
4) Hibridación.....	45
5) Lavados y autoradiografía.....	45
D) Secuenciación de DNA por métodos de modificación química.....	46
1) Método de Maxam y Gilbert.....	46
2) Secuencia A+G.....	47
VI) Métodos "in vivo" de estudio de elementos reguladores.....	49
A) Transfecciones transientes.....	49
1) Cultivo de células	49
2) Transfecciones.....	49
B) Animales transgénicos.....	50
1) Preparación del transgen.....	50
2) Microinyección.....	50
VII) Análisis "in vitro"	52
A) Preparación de extractos nucleares.....	52
1) Aislamiento de núcleos.....	52
a) Aislamiento de núcleos a partir de hígado de rata	52
b) Aislamiento de núcleos de células en cultivo	53
2) Extracción de proteínas nucleares.....	54
B) Improntas de proteínas sobre DNA (Foot-prints).....	55
1) Digestión de DNA en presencia de proteínas.....	56

2) Digestión del DNA libre	56
3) Secuencia A+G.....	57
4) Electroforesis.....	57
C) Geles de retardamiento de DNA.....	57
1) Reacción de unión (binding).....	58
2) Electroforesis en gel nativo	58
D) Interferencia de unión por metilación.....	58
1) Preparación de la sonda	59
a) Marcado	59
b) Annealing.....	59
c) Metilación.....	59
2) Selección del DNA por geles de retardamiento.....	59
3) Corte con piperidina.y electroforesis.....	60
VIII) Otras técnicas empleadas.....	61
A) Métodos cromatográficos.....	61
1) Filtración por geles.....	61
2) Cromatografía de afinidad	61
a) Preparación de la resina.....	61
b) Desarrollo de la cromatografía.....	63
B) Métodos de dosaje	63
1) Dosajes de proteínas	63
2) Dosaje de DNA y RNA	63
3) Dosaje de radioactividad.....	63
<u>Soluciones, buffers y medios empleados</u>	65
<u>RESULTADOS I</u> Experiencias con animales transgénicos.....	69
Introducción	69
Resultados.....	70
1) Experiencias con el minigén mgTf	70
2) Experiencias con el minigén mgTf-CAT	74
<u>RESULTADOS II</u>	83
Capítulo I Identificación de elementos cis y trans de la región 5' del gen de la hTf.....	83
Introducción	83
Resultados.....	83
1) Estudio de la región promotora.....	83
2) Identificación de factores nucleares hepáticos que interaccionan con la región 5' proximal de la hTf.....	86
3) Experimentos realizados con extractos nucleares de células HeLa.....	92
4) Caracterización de los factores que reconocen las secuencias determinadas	94
Oligonucleótidos utilizados	96
5) Caracterización térmica.....	101
Capítulo II Estudio de los factores hepáticos TfLF1 y TfLF2.....	107
Introducción	107
Resultados.....	107
1)Análisis de la región proximal.	107
2) Caracterización de TfLF1.....	108
a) Estudio de la región análoga en el gen de la antitrombina III humana (AT III).....	112
b) Estudio de la región homóloga al sitio de fijación de TfLF1 presente en el promotor de 1-AT.....	119
c) Estudio de los sitios de contacto del factor TfLF1	122

Motivos de contacto de T_fLF1 y de LF-A1 determinados por interferencia de unión por metilación	127
3)Caracterización de T_fLF2	127
Estudio de la región análoga al sitio de reconocimiento de T_fLF2 en al-AT, sitio de acción de LF-A1.....	127
Capítulo III Estudio de factores que interactúan con las regiones $PRII_{Tf}$, CR_{Tf} y $DRII_{Tf}$	130
Introducción	130
Resultados.....	130
1) Caracterización del o los factores que interactúan con la región $PRII_{Tf}$.	130
2) Estudio del factor que reconoce la región CR_{Tf}	135
3) Caracterización del factor que reconoce la región $DRII_{Tf}$	137
<u>DISCUSION</u>	141
Descripción general del mecanismo de transcripción.....	141
Discusión de las observaciones descritas en este trabajo.....	143
Resultados I.....	143
Animales transgénicos.....	143
Resultados II.....	146
1) Determinación de elementos cis presentes en la región 5' del gen de la hTf.....	146
2) Estudios "in vitro" de la interacción entre factores nucleares y la región 5' del gen de la hTf.....	147
Identificación en la región 5' (-650/+30) de sitios de reconocimiento de factores nucleares.....	147
3) Promotor proximal.....	148
4) Estudio de la región $PRITf$ y del factor T_fLF1	149
4a) Estudio de la región análoga a $PRITf$ y $DRITf$ en ATIII.....	150
4b) El factor hepático LF-A1 es distinto de T_fLF1 y de T_fLF2	151
5) Estudio de las regiones "CCAAT" presentes en el gen de la hTf.....	153
5a) Estudio de la región $PRII_{Tf}$	154
5b) Estudio de la región CR_{Tf}	154
6) Estudio de los módulos distales de la región 5' del gen de la hTf.....	155
6a) Estudio de la región $DRITf$	155
6b) Estudio de la región $DRII_{Tf}$	156
<u>REFERENCIAS</u>	157

Abreviaturas

α1AT	α 1 anti-tripsina.
Aα1AT	Dominio A del promotor de la α 1-AT.
ATIII	Antitrombina III humana.
C/EBP	Factor de transcripción " <i>CCAAT/enhancer binding protein</i> ".
CRTf	Región central del gen de la hTf.
CTF	Factor de transcripción " <i>CCAAT Transcription factor o nuclear factor 1</i> ".
CTF/NF1	Factor de transcripción " <i>CCAAT Transcription factor o nuclear factor 1</i> ".
DRITf	Región distal 1 del gen de la hTf.
DRIITf	Región distal 1 del gen de la hTf.
HAT3	Región H del gen de la antitrombina III humana.
hTf	Transferrina humana.
LF-A1	Factor de transcripción A1 " <i>liver factor A1</i> " (reconoce el dominio A α 1AT).
NF1	Factor de transcripción " <i>CCAAT Transcription factor o nuclear factor 1</i> ".
NF1ad	Región de reconocimiento del factor CTF/NF1 en Adenovirus.
Pol II	RNA polimerasa II o B.
PRITf	Región proximal 1 del gen de la hTf.
PRIIITf	Región proximal 2 del gen de la hTf.
RBP	Proteína que une retinol " <i>Retinol binding protein</i> ".
Sp1	Factor de transcripción " <i>Specific protein 1</i> ".
Tf	Transferrina.
TfLF1	Factor hepático 1 (reconoce el módulo PRITf).
TfLF2	Factor hepático 2 (reconoce el módulos DRIITf).
UPE	Módulo de reconocimiento un factor dentro de la región promotora " <i>Upstre. m promoter element</i> ".

INTRODUCCION

I) Regulación de la expresión genética

1) Resumen

La información genética se expresa en una forma controlada de tal manera que los organismos se desarrollan, reproducen y pasan esta información a las futuras generaciones. En eucariotes superiores varios son los pasos en los cuales esta expresión se halla controlada. Estos incluyen primero, la apertura a la maquinaria transcripcional de la cromatina condensada e inactiva (Yaniv y Cereghini 1986) y la utilización de distintas posibles regiones promotoras (Noguchi y col. 1987). Posteriormente, la determinación de la velocidad de iniciación de la transcripción en los genes que se encuentran en la cromatina abierta (Dyran y col. 1985) y finalmente varios procesos postranscripcionales (Leff y col 1986). La velocidad de iniciación de la cadena de RNA es un punto importante de la regulación de la expresión, en él se centran los estudios realizados en este trabajo.

Los tres tipos de RNA polimerasas eucarióticas I, II y III o A, B y C son los elementos fundamentales de tres maquinarias diferentes ; ellas se encargan de transcribir los genes que codifican para los RNA ribosomales, para las proteínas, y para los 5S y tRNA respectivamente (Sentenac 1985). En los eucariotes superiores, lo mismo que en bacterias, existen secuencias de DNA regulatorias, aunque el panorama es más complejo. La RNA polimerasa II (Pol II), incapaz de transcribir por sí sola (Fire y col. 1984), necesita de una serie de factores que se llaman factores generales de transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID y TFIIE) (Sawadogo y col 1985a y b). Estos son los encargados de reconocer la o las secuencias (TATA y CA) que determinan el sitio de iniciación de la transcripción, así como de reconocer e integrar a la Pol II dentro del complejo nucleoproteico para que pueda ser activo transcripcionalmente. Sin embargo parece ser que la velocidad de formación de este complejo de preiniciación es baja y su estabilidad mínima, dando en estas condiciones una actividad de polimerización casi despreciable, tan solo

detectada en ensayos *in vitro* (Wasylik 1988). Aparentemente es a este nivel que otros factores estabilizan y activan el complejo (Horikoshi y col. 1984).

Secuencias características de cada gen, a las que se las denomina **elementos cis** por su posición respecto de la información genética, son el sitio de reconocimiento y unión de los **factores específicos de transcripción**. Serían aparentemente estos **elementos trans**, unidos a sus secuencias blanco, los que activan el complejo de preiniciación. De esta manera estos factores de regulación darían, a una maquinaria común a la síntesis de todos los mensajeros, una actividad distinta para cada uno (McKnight y col 1986).

Aparentemente estos factores específicos pueden ser varios para cada gen, sin embargo ha sido observado que solo unos pocos son necesarios para inducir la actividad y que el resto son moduladores. El sitio de unión de los factores necesarios se encuentra en regiones cercanas al punto en que se inicia la polimerización, en la mayoría de los casos 100 a 200 nucleótidos en posición 5' respecto del sitio cap. Es a la región que incluye estas secuencias y a las de reconocimiento de los factores generales que se llama **región promotora**. Generalmente además de la caja TATA se encuentran en esta región uno o más sitios de reconocimiento de **factores promotores**, a los que se llaman **UPEs** (Upstream promotor elements) (Maniatis y col 1987).

Otros elementos de regulación se han encontrado en regiones cercanas de hasta mil bp cadena arriba del sitio de iniciación así como en regiones lejanas de hasta 10 kbp; en este último caso se impone la teoría de un "looping" del DNA (Schleift 1987) que permita las interacciones correspondientes de estos moduladores con la Pol II. Un tipo de elementos que merece especial atención son los llamados **enhancers** (Ptashne 1986), los cuales generalmente ubicados en regiones distales del promotor activan en forma significativa el nivel transcripcional. Si bien no son necesarios para lograr una expresión *in vitro* o en células transfectadas (Voss y col. 1986), parecen ser imprescindibles *in vivo*, quizás para permitir la apertura de la cromatina durante la diferenciación celular. Las evidencias acumuladas indican que en general los factores transcripcionales presentan dos tipos de estructuras proteicas de reconocimiento de DNA, tipo *zinc fingers* o *helix turn helix*

A continuación se describen un poco más detalladamente ciertas observaciones publicadas en el estudio de la regulación transcripcional. Algunos de estos conceptos van a ser retomados, en forma menos o más detallada, para permitir una mejor comprensión en capítulos posteriores (reviews Dynan y col. 1985; McKnight y col. 1986; Maniatis y col. 1987; Wasylyk 1988)

2) Metodologías

Un gran avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales los genes se expresan se debe al desarrollo de ciertas tecnologías. Los conocimientos alcanzados en el tema son inseparables de estas técnicas y es por este motivo que se incluye una breve descripción de ellas en esta introducción.

La posibilidad de aislar y modificar secuencias de ADN, así como el desarrollo de métodos para estudiar en sistemas vivos e *in vitro* la expresión fenotípica de los genes mutados permitió alcanzar la comprensión que actualmente se tiene de la regulación genética. Las técnicas de ingeniería genética permiten modificar las regiones reguladoras (deleciones, *linker scanings*, combinación de diferentes módulos reguladores, etc). De esta manera son accesibles una serie de vectores que difieren unos de otros en una o más características determinadas, permitiendo así un estudio ordenado y bastante preciso de regiones de DNA importantes. Esta metodología para ser fructífera debe estar combinada con la posibilidad de estudiar cual es el efecto de las alteraciones obtenidas, sea *in vivo* o *in vitro*.

Una posibilidad de analizar estos genes mutados pasa por el estudio del efecto de dichas alteraciones sobre la tasa de expresión del gen. Ciertos métodos se han manifestado, en este sentido, de gran utilidad para estudiar la regulación de la expresión en sistemas *in vivo*. El más ampliamente aplicado es el de introducir el gen que se está investigando dentro de células en cultivo (método de **transfecciones transientes**). Esto implica una modificación de la membrana así como una presentación del gen en determinadas condiciones (fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación en un campo eléctrico). Generalmente la mejor expresión de los genes se obtiene cuando éstos están incluidos en

un plásmido superenrollado. Solo un pequeño número de células son transfectadas y en ellas solo una parte del DNA llega al núcleo para ser transcrito (Loyter y col. 1982); a pesar de esto la sensibilidad de detección de ciertos métodos (northern o medición enzimática de un gen marcador como cloranfenicol acetil transferasa) permite determinaciones suficientemente precisas. La expresión alcanza su nivel máximo alrededor de las 48 hs y generalmente desaparece dos días después. El estado del DNA no se conoce claramente, si bien existen evidencias que éste podría estar organizado como la cromatina, aunque en una forma extracromosomal. Otros métodos se han implementado para introducir genes en células en cultivo (microinyecciones, infecciones virales, fusión de liposomas). En todos la limitación más importante es la provista por el sistema, células ya diferenciadas en un sistema distinto de un organismo completo. De esta limitación la ventaja de la interpretación de un sistema más simple. También se han implementado **transfecciones estables**, en las que por presión, por ejemplo con un antibiótico, se selecciona la mínima población de células que, por un mecanismo no muy bien conocido, integran el DNA exógeno a su material genético dando origen a nuevas cepas, existen casos en que se trata de recombinación homóloga (Lin y col. 1985; Thomas y col. 1986).

Otra metodología poderosa implica la incorporación del DNA exógeno dentro de la línea germinal de un animal, obteniéndose de esta manera **animales transgénicos** (Gordon y col. 1980; Constantini y col. 1981). Una técnica empleada para ello es la microinyección del **transgen** dentro de un pronúcleo de una cigota, que luego se deja desarrollar hasta término, la integración es al azar aunque existen casos de recombinación homóloga descriptos (Palmiter 1986). Otra técnica es la incorporación de células que llevan el transgen dentro de embriones en estadios tempranos, esto da animales mosaicos, de la progenie de los cuales luego se clona la cepa totalmente transgénica. Los animales obtenidos generalmente expresan correctamente el DNA exógeno, si bien existen importantes anomalías descriptas.

Un tercer método, ya no *in vivo*, está siendo ultimamente empleado para estudiar elementos del DNA así como factores en trans, la **transcripción *in vitro*** (Bazett-Jones y col. 1985; Bodner y col. 1987). En éste, sistemas parcialmente purificados son ensayados para determinar su capacidad de transcribir a partir de una determinada

secuencia promotora (Gorsky. y col. 1986). Este método permite estudiar de una manera mucho más precisa los mecanismos de interacciones moleculares entre los distintos elementos que conforman los complejos núcleo-protéicos activos en la transcripción.

Otros caminos de acceso a la información molecular son aquellos que estudian las interacciones entre elementos cis y trans, generalmente en forma independiente de su efecto funcional. El método de determinación de **improntas** en DNA o "**foot-printing**" permite identificar la presencia de factores en extractos (Galas y col. 1978) o en cultivo de células (Church y col. 1984; Becker y col. 1987;), que se unen al DNA, así como las regiones que incluyen los motivos o **módulos** que son su sitio de reconocimiento. Las proteínas mencionadas protegen al DNA en la región donde ellas están unidas, de la acción de factores modificadores [DNasa I, dimetil-sulfato, ciertas sales de hierro (Van Dyke y col 1983)], permitiendo así identificarlas. Otro método ampliamente utilizado es el de **geles de retardamiento de DNA** (*gel shifting*) que permite estudiar, de una manera más versátil que la técnica de improntas, las interacciones entre proteínas que se unen al DNA y sus secuencias blanco (Garner y col. 1981; Fried y col. 1981). La base del método es la separación e identificación de los complejos DNA-proteína en electroforesis nativas. Una herramienta de trabajo que se ha demostrado de utilidad para identificar las bases de contacto entre los factores transcripcionales y los elementos regulatorios del DNA es la técnica de **interferencia de unión por metilación, o metil interferencia**. En ésta, las poblaciones de DNA metiladas en los sitios de contacto no son reconocidas por el factor correspondiente; una posterior separación de especies por geles de retardamiento de DNA y métodos de secuenciación permiten identificar las bases que conforman el módulo de reconocimiento del factor en forma mucho más precisa que las determinaciones de improntas. Con excepción de la transcripción *in vitro*, los otros métodos han sido empleados en este trabajo, descripciones más detalladas de sus protocolos de implementación y de sus fundamentos se encontrarán en materiales y métodos, y en el desarrollo del texto donde se hace mención de estas técnicas.

3). Mecanismo de iniciación transcripcional

a). Iniciación basal de la transcripción

Experimentos de mutación permitieron identificar secuencias reguladoras de la expresión alrededor de la región de iniciación transcripcional (+1), presentes en un gran número de genes. Esta región va de alrededor de -50 a +35 y dentro de ella dos motivos se encuentran altamente conservados en un gran número de genes: una caja TATA (5'-TATAAA-3') a -30 y un sitio (5'-CA-3') a +1 (Bucher y col. 1986).

Una batería de técnicas han permitido establecer que un factor aparentemente ubicuo llamado BTF1 o TFIID, se fija sobre la caja TATA. El reconocimiento parece involucrar también a otro factor, STF o TFIIA, que se une al DNA en forma no específica y que aparentemente estabiliza la formación del complejo TFIID-DNA (Reimberg y col. 1987; Sawadogo y col. 1985b) Este podría ser el primer paso dentro del mecanismo de formación del complejo transcripcional; un factor no específico (TFIIA) prepara el DNA y favorece la unión de otro en una región específica (TFIID) (Hai y col. 1988). En un paso subsiguiente la polII, TFIIE y TFIIB (en nomenclatura americana, los nombres europeos son polB, BTF2 y BTF3) se unen al complejo ya formado dando el **complejo de iniciación rápido** (rapid start complex) o **complejo de preiniciación** (Reimberg y col. 1987; Fire y col. 1984). Los factores E y B aparentemente no se ligan al DNA sino que interactúan directamente por uniones proteína-proteína. El complejo formado es capaz de transcribir el DNA en ensayos *in vitro*, sin embargo en ausencia de otros factores la actividad observada es muy baja. Los datos hasta ahora acumulados sugieren que esto es debido a que la velocidad de formación es muy lenta y que su estabilidad es mínima (Horikoshi y col. 1984).

La formación de este complejo parece no ser absolutamente dependiente de la presencia de las secuencias TATA (sitio de unión de TFIID) y CA (primer sitio de contacto de la polII). Varios genes careciendo de estos elementos se expresan normalmente (Bucher y col. 1986), aunque otras evidencias muestran que mutaciones que acercan al consenso TATAAA y CA dan promotores más activos. En ciertos casos el sitio de iniciación de transcripción parece ser determinado por la caja

TATA a juzgar por la distancia a que se inicia el mensajero cuando se intercalan secuencias entre TATA y CA; en otras experiencias la delección de la caja TATA no altera la iniciación en el sitio normal, indicando que ambos elementos cis podrían actuar por separado o en forma conjunta (Tamura y col. 1988).

En el caso de la ovotransferrina de pollo, las secuencias entre -45 y +62 no solo son suficientes para dar un nivel de expresión considerable, sino que además lo hacen en forma tejido específica al menos en experiencias de transcripción *in vitro*. Esto indica que en esta región se encuentran los sitios para los factores generales de iniciación y también elementos activadores específicos para factores tejido específicos (Dierich y col. 1987).

b). Iniciación de la transcripción.

Ensayos de transcripción *in vitro* han demostrado que el mecanismo de transcripción basal puede ser significativamente activado, dato coherente con el hecho que este mecanismo de por sí, no puede justificar las actividades observadas *in vivo*. Es en este punto donde aparentemente se ejerce la regulación de la velocidad de iniciación de cadena por factores específicos para cada gen. Estos actúan aparentemente en una primera instancia por interacciones DNA-proteína, ligandose a sus módulos de reconocimiento en el DNA, y luego por interacciones proteína-proteína entre los distintos factores específicos y los factores generales y es de esta forma que estabilizan y aumentan la velocidad de formación del complejo de iniciación transcripcional (ya no más llamado complejo de preiniciación) (Dynam y col. 1985).

Se ha demostrado que secuencias de DNA en regiones distintas a la zona de iniciación poseen elementos que actúan como activadores importantes. Un gran número de estas secuencias se encuentran en regiones cercanas al sitio cap, otras se han ubicado hasta a varias kilobases de distancia. Estas también son los módulos de anclaje de factores específicos (Maniatis y col. 1987).

c). Región promotora y factores promotores

Se ha observado que secuencias cercanas al sitio de iniciación contienen elementos suficientes para permitir la expresión en experimentos de transfecciones transientes y en animales transgénicos. La región mínima que contiene esta información es denominada **región promotora** y su talla total raramente pasa de 200 bp. En ella se encuentran generalmente además del sitio TATA, una o más secuencias capaces de fijar factores transcripcionales que son llamada **elementos promotores** o UPE (upstream promotor elements) (Maniatis y col 1987).

Experiencias de transcripción *in vitro* han demostrado en varios casos que los factores que reconocen dichos UPE son capaces de estimular la transcripción, en este caso se habla de **factores promotores**. Su mecanismo de acción parece ser por interacciones proteína-proteína ya que, como para los factores generales, desplazamientos de sus módulos de anclaje de 5 bp (medio giro de helice) que colocan a la proteína del otro lado del ADN, disminuyen o eliminan su efecto, lo mismo ocurre a medida que se alejan hacia el extremo 5'.

Se ha observado que la utilización de un factor promotor específico no es prerrogativa exclusiva de un determinado promotor. Un mismo factor puede ser necesario para la transcripción de distintos genes; existen ya identificados varios de ellos que actúan en distintos promotores (Sp1, OBP, NF1, CBP etc). En general se ha visto que las secuencias que reconocen varían muy poco en los diferentes casos y que son interciables. Esta última evidencia es la que permite decir que el mecanismo es modular, teoría que se confirma ya que se puede secuestrar un factor de una maquinaria transcripcional, compitiendolo con un exceso de su "módulo" de reconocimiento e incluso se pueden construir promotores (Cao y col. 1988).

Ciertos de estos factores parecen ser ubicuos, otros están presentes en solo algunos tejidos, lo que implicaría que el correspondiente promotor es tejido específico. Conclusión de esto es que **la regulación tejido específica** se encuentra determinada (al menos en parte, ver discusión), por la presencia en un tejido dado de los factores transcripcionales necesarios para la expresión de un gen.

El término "factor promotor" está actualmente cuestionado por el hecho de haber encontrado que varios de éstos también actúan en regiones lejanas y no necesarias para la transcripción.

En resumen, el mecanismo de activación de la transcripción estaría ligado a la formación de un complejo entre los factores específicos y el DNA, probablemente preexistente a la incorporación de los factores generales de transcripción y que permitiría el anclado de estos últimos en forma estable y rápida; una vez esto obtenido, la polIII sintetiza el mensajero sin necesidad de los factores específicos, es decir que su acción sería transiente (Horikoshi y col 1988).

d). "Enhancers"

Ciertas regiones de ADN se han mostrado capaces de estimular la actividad transcripcional aun a grandes distancias del promotor hacia 5' (10 kbp en el caso de la albúmina Pinkert y col. 1987) o hacia 3', en forma independiente de su orientación y sentido y aun topologicamente separados del gen (Plon y col. 1986), actuando tanto sobre su propio promotor como sobre promotores heterólogos. El término "enhancers" fue especialmente acuñado para designar estas secuencias. Inicialmente descubiertos en virus, hoy se ha confirmado su presencia en un gran número de genes y hasta varias veces por gen (Godbout y col. 1986 y 1988), pareciendo ser necesarios para la expresión *in vivo*. En ciertos casos su acción *in vitro* podría ser un artefacto (Seargeant y col. 1984)

La estructura general de un enhancer está conformada por la presencia, en una región relativamente pequeña de DNA, de varios módulos de unión de factores transcripcionales. Sería precisamente la cantidad de elementos una de las características importantes para manifestar el *efecto enhancer*, a juzgar por el hecho que éstos se pueden construir por multimerización de ciertos motivos que solos no presentan las características generales (Bienz y col 1986, Herr y col. 1985 y 1986, Weber y col. 1984).

El mecanismo de acción parece en principio el mismo que en el caso de los promotores, es decir interacciones del tipo proteína-DNA y proteína-proteína. Asimismo los elementos cis y sus factores trans

parecen no ser privativo de los enhancer, habiendo ya sido encontrados en otras regiones del gen y aun en distintos genes (Sp1, C/EBP, OBP, NF κ B, etc fueron también encontrados en regiones promotoras o activadoras) (Wasylyk 1988)

En el estudio del mecanismo de la transcripción el modelo de excelencia es el promotor temprano del virus SV40. El enhancer de este virus está formado por dos secuencias repetidas de 72 bp las cuales llevan ocho módulos de reconocimiento (Octa y P y repetidos dos veces Sph, TC, GT) (Zenke y col. 1986) para al menos cinco proteínas activadoras. Todos los elementos contribuyen parcialmente al efecto total y en forma sinérgica (a juzgar por efectos de mutaciones, Herr y col. 1986). Si bien por separado la actividad de cada uno de ellos es casi nula o despreciable, ella puede ser recuperada por multimerización de sus elementos confirmando el mecanismo sinérgico de su acción (Zenke y col. 1986; Herr y col. 1985). Estas características están hoy verificadas para otros enhancers virales y celulares. Podría decirse que es necesaria una cierta masa crítica de información transcripcional para generar el efecto enhancer.

A distancias cortas del promotor, como es el caso de SV40, se requiere un alineamiento de los factores sobre un mismo lado del DNA (desplazamientos de 5 bp bajan la actividad en tanto que de 10 casi no la alteran) indicando que existen interacciones proteína-proteína entre los factores del enhancer y del promotor. Cuando éstos se encuentran separados por varios cientos de bases aparentemente interactúan de igual manera pero excluyendo las secuencias intermedias (*looping out*)(Schleift y col. 1987), ésto se evidencia para distancias menores de 150 bp donde la tensión del DNA comienza a ser considerable y el efecto enhancer comienza a depender de la posición.

Otra teoría corresponde al deslizamiento de la información (de una manera no descripta) a través del DNA interviniente entre las dos regiones. De hecho aductos de psoraleno en la región intermedia disminuyen la acción del enhancer sobre el promotor (Courey y col. 1986)

e). Otros elementos reguladores

En otras regiones del gen se han ubicado **elementos positivos y negativos** que estimulan o reprimen la expresión, generalmente aislados, no en *clusters* como en los promotores o enhancers. Sobre ellos actúan una serie de factores trans, a veces también presentes en promotores o enhancers. En general en la primera kilobase hacia 5' del sitio de iniciación se ubican algunas de estas regiones llamadas "**responsive elements**" o **regulating elements**". Entre ellas se encuentran a veces elementos de respuesta a **hormonas** o a **metales**.

Un hallazgo significativo mostró que los factores que actúan sobre los elementos de regulación de hormonas esteroideas, son los propios receptores hormonales activados, con el esteroide. En el caso del receptor de estrógenos de pollo, ya se han decorticado tres regiones dentro del polipéptido correspondientes a los dominios de: fijación de la hormona, de unión al DNA y de activación de la transcripción (P. Chambon seminario interno). Aparentemente la activación del primer dominio (fijación de la hormona), produce la activación del segundo (fijación al DNA) y ambos la activación del tercero (estimulación de la transcripción por interacciones proteína-proteína).

Un tipo interesante de elementos de regulación negativo, son los llamados "**silencers**" *dehancers* o *extinction elements* (Brandt y col. 1986). Representan de alguna forma el caso opuesto al de los enhancers, es decir son capaces de actuar a distancia e independientemente de su orientación y posición. Aparentemente también actuarían de una manera cooperativa a travez de la acción de varios factores concentrados en una región (Keleher y col. 1988)

f). Especificidad tisular

Uno de los elementos importantes que determinan la expresión de un determinado gen en un tejido y no en otro es la presencia de los factores necesarios para su transcripción. Un número importante de factores transcripcionales han sido reportados como característicos de ciertos tejidos, en tanto que otros parecen ser ubicuos (Wingender 1988). Ensayos de foot print permiten identificar regiones protegidas por factores tejido específicos, en tanto que mutaciones y ensayos de transcripción *in vitro* han confirmado que son estos elementos cis y

trans los responsables de la especificidad de expresión. Ensayos *in vivo* han evidenciado la importancia de elementos cis y trans de enhancers, silencers y de otros elementos reguladores en la determinación de la tejido-especificidad.

g) Estructura de la cromatina

Otros mecanismos determinan la especificidad de transcripción y actúan antes que el mecanismo de control por la presencia de factores transcripcionales. Uno de ellos es el que determina la estructura de la cromatina y está aparentemente relacionado con el proceso de diferenciación (Weintraub 1985) y con sitios de hipersensibilidad a la DNAsa I en las zonas de DNA que son activamente transcritas en distintos tejidos.

Asimismo se ha estudiado la estructura del genoma de SV40 en infecciones tardías. Se ha comprobado que si bien presenta una estructura de cromatina, existe una zona sensible a la acción de DNAsa I donde no se presentan arreglos de nucleosomas precisamente en la región donde están ubicados los promotores temprano y tardío del virus (Choder y col. 1984). Un dato significativo es que tanto la región del enhancer (72 bp rep.) como el promotor (21 bp rep.) son capaces de generar zonas libres de nucleosomas, no así la región en que la transcripción comienza (Gerard y col. 1984).

Otros estudios deben hacerse aun para confirmar la influencia de el anclaje a la matriz celular que en algunos casos mapea cerca de regiones transcripcionalmente importantes. También debe considerarse la tensión y fundamentalmente el grado de metilación del DNA. Este último ha sido claramente correlacionado con el nivel de transcripción indicando que genes mayormente metilados son silentes y que su activación está relacionada con la demetilación (Cedar 1988).

II) La Transferrina

1) Resumen

La transferrina o siderofilina (Tf) es la proteína sérica encargada del transporte de hierro en los vertebrados. Por su intermedio los iones férricos son transportados del intestino, del sistema retículo endotelial y del parénquima hepático a numerosas poblaciones celulares en el cuerpo, particularmente a las células eritroides y a todos los tejidos proliferativos (Barnes y col. 1980; Ekblom y col. 1983 y Huebner y col. 1984). Además la Tf es un factor de crecimiento y de diferenciación esencial, y juega un rol significativo en la bacteriostasis. La proteína es expresada primariamente en el hígado y el plexo coróideo, y también en menores concentraciones en el músculo fetal, en los oligodendrocitos de cerebro (Khan y col. 1987, Aldred y col. 1987), en las células de Sertoli (Taek y col. 1986) y en los linfocitos T₄⁺ activados (Lum y col. 1986). Su concentración en el plasma humano aumenta en la anemia férrica y durante el embarazo y disminuye en la hematocromatosis (Harris y col. 1974). Las hormonas esteroides y la deficiencia nutricional de hierro estimulan su síntesis. Estas características hacen del gen de la transferrina un modelo adecuado para estudiar la regulación génica en el hombre (reviews Khan y col. 1987; Bezkorovainy y col. 1987) . A continuación se describen un poco más detalladamente dichas características.

2) Estructura de la proteína

La transferrina sérica humana es un miembro de una familia de glicoproteínas monoméricas, relacionadas en la evolución, que incluye también a la ovotransferrina o conalbúmina de las aves, a la lactotransferrina de mamíferos y a la melanotransferrina o antígeno p97 humana (Williams y col. 1985). La secuencia completa de aminoácidos de la serotransferrina humana (MacGillivray y col. 1983 y Yang y col. 1984), de la lactotransferrina humana (Metz-Boutigue y col. 1984), de la ovotransferrina de pollo (Jeltsch y col. 1982) y de la melanotransferrina

(Rose y col. 1986), han sido determinadas. Todas presentan un muy alto grado de homología entre sí.

La proteína humana (hTf) comprende 679 aminoácidos, con un peso molecular de 79.570 y está compuesta por dos dominios cristalográficos (Gorinsky y col. 1979; Anderson y col. 1987; Bailey y col. 1988) y funcionales (Aisen y col. 1980), los que también presentan un asombroso grado de homología entre si, 47 % de residuos idénticos. Estos dominios son compactos (Gorinsky y col. 1979) y corresponden a los aminoácidos 1 a 336 y 337 a 679, fijando un ion férrico y un bicarbonato cada uno (Aisen y col. 1980) La fijación del hierro presenta una afinidad diferente en cada dominio (Huebers y col. 1984). Del mismo modo la lactotransferrina y la ovotransferrina presentan dos dominios homólogos, de tamaño y características similares. La figura I muestra la imagen tridimensional de la Tf de conejo, se pueden distinguir claramente las dos partes de la molécula.



Figura 1: a) Estructura tridimensional de la Tf de conejo (Gorinsky y col. 1979).

3) Actividad biológica de la Tf

El descubrimiento de las transferrinas está asociado con la observación que la clara de huevo es inhibitoria para el crecimiento bacteriano (Schade y col. 1944) y que dicha inhibición es reversible por adición de hierro. Las transferrinas están presentes en distintos fluidos biológicos, plasma, fluido seminal, líquido cefalorraquídeo. En el plasma la cantidad de Tf (2,6 mg/ml) está referida por los parámetros de "hierro total" (TI) y la "capacidad total de unión de hierro" (TIBC). En condiciones normales solo un tercio de la proteína está cargada con hierro ($TI = TIBC/3$) (Bezkorovainy 1987).

La transferrina es requerida virtualmente por todas las células en crecimiento, y es por lo tanto incluida en los medios empleados en el cultivo libre de suero. Ella actúa por unión con su receptor específico en la membrana, el que está directamente relacionado con la proliferación celular (Shindelman y col. 1981; Sutherland y col. 1981 y Trowbridge y col. 1981). La estructura de la apotransferrina (la proteína es así llamada cuando no porta al catión) es alterada cuando esta capta hierro, lo que hace con alta afinidad (10^{30}). La nueva estructura que presenta la ferrotransferrina (la proteína portando al catión) es reconocida por el receptor específico (TfR), presente en la membrana de todas las células, con alta afinidad ($K_m = 6 \times 10^9$ a pH neutro). Un proceso de endocitosis "ligando-receptor" via "clatrin-coated-pits" lleva el complejo hacia compartimentos intracelulares de menor pH (5) por fusión de organelas. El hierro es entonces liberado en estos compartimentos ácidos (para ser utilizado inmediatamente o almacenado en los reservorios que constituyen la ferritina), en tanto que el receptor y la apotransferrina vuelven a la membrana, donde esta última es liberada nuevamente a la circulación (McKleland y col. 1987).

4) Estructura del gen de la hTf

Recientemente han sido clonadas las secuencias genómicas correspondientes a la hTf y se ha determinado su estructura y organización (Park y col. 1985; Schaeffer y col. 1987). El gen tiene una

talla de 33,5 kbp y está organizado en 17 intrones separados por 16 intrones. Los exones codantes para el dominio N-terminal son homólogos a los correspondientes al dominio C-terminal. Los pares de exones homólogos (3,10), (4,12), (5,13), (6,14), (7,15) y (8,16) presentan un 90 % de identidad de talla y entre 43 y 58 % de identidad de secuencia nucleotídica (Schaeffer y col. 1987) Esto confirma la hipótesis que las transferrinas se originan a partir de un gen ancestral por duplicación intragénica. En la figura 2 que se muestra a continuación se propone un modelo de duplicación.

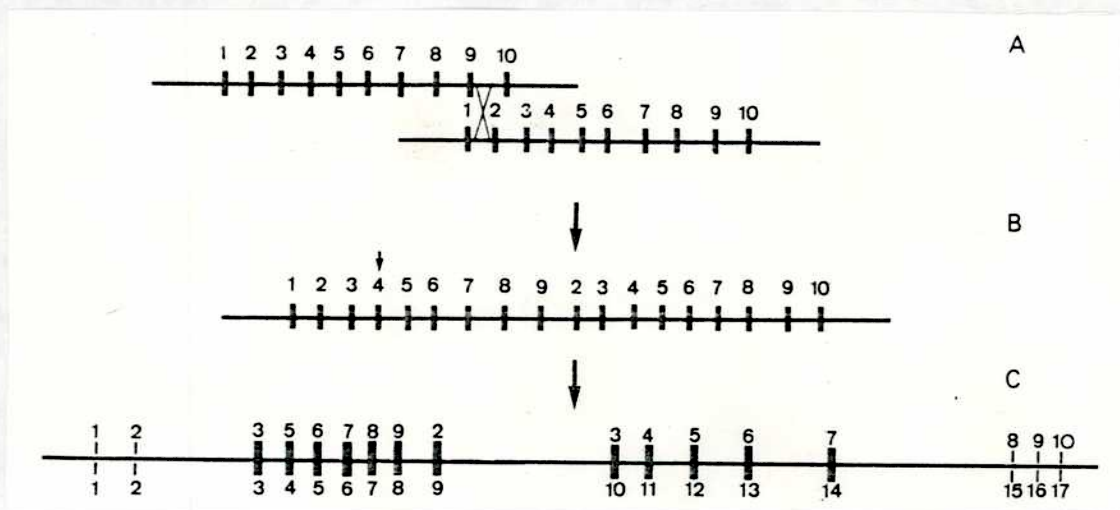


Figura 2: Modelo de duplicación génica del gen de la hTf (Schaeffer y col. 1987); las barras horizontales representan los exones y no están a escala respecto de sus tamaños, así como tampoco los intrones correspondientes a los genes ancestrales en A y B, ya que se desconocen.

5) Regulación de la expresión del gen de la hTf

La transferrina es sintetizada principalmente en el hígado y en menor cantidad en otros órganos. Dos estudios recientes han reportado sorprendentemente, altos niveles de mRNA de transferrina, comparables a los de hígado, en glándula mamaria de ratón durante la preñez (Chen y col 1987) y en el plexo coróideo (Aldred y col 1987).

Su mRNA ha sido detectado también en los oligodendrocitos del cerebro (Bloch y col. 1985; Khan y col. 1987), en células de Sertoli en cultivo (Taek y col. 1986), en células de músculo fetal de rata entre el día 17 de gestación y el nacimiento (Levin y col. 1984), en los linfocitos T₄⁺ humanos estimulados por un antígeno o un mitógeno (Lum y col. 1986) y en placenta, vaso, riñón, músculo y tejido nervioso de ratones normales (Aldred y col 1987).

A nivel del hígado la Tf se expresa desde la diferenciación de los hepatocitos y su cantidad aumenta paralelamente con el desarrollo, para permanecer constante, a un nivel elevado, en el hígado adulto (Khan y col. 1987) Diferentes estudios en la rata y en el pollo han mostrado que el nivel de transcripción del gen a nivel hepático se encuentra aumentado al doble bajo el efecto de estrógenos y glucocorticoides (Hammer y col. 1986; McKnight y col. 1980a y b). En condiciones de deficiencia de hierro su nivel se encuentra aumentado de 1,5 a 2,5 veces en hepatocitos de pollo y de rata (McKnight y col. 1980b; Idzerda 1986). Otras experiencias en rata no mostraron variaciones significativas del nivel de transcripción del gen por efecto de hormonas esteroides o por anemia férrica en tanto que evidenciaron una inhibición transitoria de la transcripción bajo el efecto de glucagon o cAMP (Tuil y col. 1985). En glándula mamaria de ratón su síntesis es significativamente aumentada durante la preñez o cuando estas células son cultivadas sobre una matriz extracelular (Chen y col 1987) En el hombre los datos estudiados son limitados, en la anemia férrica y durante el embarazo aumenta el nivel sérico de Tf, en tanto que desciende del nivel normal en respuesta a una sobrecarga de hierro (Khan y col. 1987). Estas evidencias sobre diferentes reguladores y sobre una expresión distinta en varios tejidos hacen del gen de la hTf un excelente modelo para estudiar la regulación de la expresión genética y su tejido especificidad.

En el laboratorio del Dr Zakin también se ha determinado el sitio de iniciación de la transcripción del gen de la hTf y el largo total del mensajero correspondiente (2.315 bp). Además se han clonado aproximadamente seis kilobases de la secuencia 5' no codante del gen y se han secuenciado las primeras 650 bp (Lucero y col. 1986). En la figura 3 se muestra un estudio comparativo de la secuencia de 650 bp de la hTf con secuencias de sitios regulatorios descritos en la literatura. La identificación de estos putativos elementos regulatorios constituye un

interesante punto de partida para el estudio de la regulación del gen de la transferrina humana .

Figura 3

-650CTCTGTCCCT AGTCTAAGGT GTCCACAGG AAGCTTGAGG GCGGGAAGTT ^{....Enh..}
 Sp1
 -600TTCCAGCCCA GGAGCCTTGAG CTCAGCGGGG CAGGAAGAGG GAGCAGCTCC
 GRE Enh
 -550TCCGTGGGGG ACCTTTGAGA GCCCAGGAGC AGGATTTCGA GGGACAGGTG
 -500GTGGGGAGCA AAAGGTGCTG AGTCTGTCTT TGACCTTGAG CCCAGCTTGT
 cAMP
 -450TTCTTCCTGCA TCCTCCCCCA AAAGGGCTTT GCCTGTCATT CTGCAGTTCT
 MBS
 -400AGTGTGGGGT CTGGGCGCAG TTCTTTTCCC TCTCCAGCCT CGGAGTCTTC
 Enh
 -350CTCTGTGGAC TGCGCAGATA GGACTGGTGG CACGGACCAG CTCTGCAGCC
 Enh MBS
 -300TGGAGTCAGG AGCAGAGCCC CGGCTCCAGC CGCGTAGCCG CTCTGGCACC
 MBS
 -250GAGCGAGCCG GATGACAATG GCTGCATTGT GCTTCATGTC CCTTCCCATC
 MBS
 -200AACATTTCTG TGCTGGACTC CTTCCACTCG CGGGTCGTCT CCAGAGCTCA
 PRE
 -150GAAAATGAGG TGATCAGTGG GACGAGTAAG GAAGGGGGGT TGGGAGAGGG
 -100GCGATTGGGC AACCCCGCTG CACAAACAG GGAGGTCAAA GATTGCGCCC
 MBS
 -050AGCCGCCCA GGCGGGGAAT GGAATAAAAGG GACGCGGGGC GCCGGAGGCT
 Sp1 TATA-like
 +01GCACAGAAGC GAGTCCGACT GTGCTCGCTGC TCAGCGCGCA CCCGGAAGATC +50

Figura 3: Se pueden ubicar sitios regulatorios por uniones a metales, identificados en la figura como "MBS" (Stuart y col. 1985), dos sitios de unión del factor transcripcional Sp1 "Sp1" (Dynam y col. 1985), un sitio de unión del receptor de progesterona "PRE" (Mulvihill y col. 1982), un sitio de unión del receptor de glucocorticoides "GRE" (Buetti y col. 1983), un dominio de regulación por cAMP "cAMP" (Gunzburg y col. 1985; Comb y col. 1986), varios "cis acting DNA enhancers" "Enh" (Yaniv 1984), así como una caja "TATA-like" "TATA".

MATERIALES Y METODOS

Los métodos descritos en esta sección resumen los empleados en este trabajo. Para una mejor comprensión los fundamentos de ciertas técnicas aquí incluidas son repetidos en el capítulo de resultados donde estos son empleados; asimismo los buffers utilizados se describen en el texto tan solo la primera vez que son citados; al final de este capítulo se encuentra una lista ordenada alfabéticamente de todas las soluciones, buffers y medios.

Los productos y materiales empleados en este trabajo fueron todos de calidad "grado analítico" o "ultrapuro".

I) Métodos de obtención y purificación de ácidos nucleicos

A) Obtención de DNA plasmídico

1) Obtención y purificación por gradientes isopéncicos de cloruro de cesio (preparativo)

Se empleó el método de Ullman (1986). Se inoculan 6 ml de medio líquido Luria (ML), conteniendo el antibiótico apropiado, con una colonia de la bacteria que lleva el plásmido a purificar y se incuba a 37°C con agitación vigorosa durante la noche.

<u>Medio Líquido Luria (ML)</u>	
Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l

Se inoculan 500 ml de medio con los 6 ml del precultivo y se incuba a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanza una DO de $\approx 0,6$ a 600 nm, luego de lo cual, se agrega cloranfenicol hasta una concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$, continuandose la incubación hasta el día siguiente. Se precipitan las bacterias centrifugando 10 minutos a 4.000 g y se descarta el sobrenadante. Las bacterias son resuspendidas en 5 ml de STE y se agregan 5 ml de solución LTE. Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente y por 10 minutos a 70°C. Se centrifuga

a 40.000 rpm por 30 minutos a 4°C en SW41 recuperandose el sobrenadante, al cual se le agrega un volumen de solución PEG dejando precipitar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 4.000g por 10 minutos a 4°C y se descarta cuidadosamente el sobrenadante. Se resuspende el precipitado en 3,5 ml de TE, se agregan 4,1 g de ClCs y 400 µl de bromuro de etidio a 10 mg/ml y se centrifuga 16 hs a 40.000g a 10°C en un rotor VTi65. El DNA plasmídico es visualizado bajo luz ultravioleta y se recupera la banda inferior con jeringa. Se transvasa la solución a un tubo de centrifuga , se agregan 200 µl de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se completa a 5 ml con una solución de ClCs a 0,95 g/ml de TE. Se centrifuga a 62.000 rpm por 4,5 hs a 10°C en un rotor VTi 65.

Se recupera la banda fluorescente bajo luz ultravioleta con una jeringa y se extrae tres veces el bromuro de etidio con n-butanol. La solución de DNA se dializa intensivamente contra TE.

Buffer STE

NaCl	100 mM
Tris-HCl pH8	10 mM
EDTA	1 mM

Solución LTE

Lisozima	2 mg/ml
EDTA pH 8	100 mM
Triton X 100	1 %

Solución PEG

Polietilen glicol 6.000	100 g
NaCl	292 g
Tris-HCl 1 M pH 8	5 ml
EDTA 0,5M pH 8	1 ml

2) Método de la lisis alcalina (pequeña escala)

Se empleo el método de Birnboim (1979). Se inoculan 3 ml de medio líquido Luria (ML), conteniendo el antibiótico apropiado, con una colonia de la bacteria que contiene el plásmido a analizar y se incuba a 37°C con agitación vigorosa durante la noche

Se centrifuga 1 ml del cultivo por 5 minutos y se descarta el sobrenadante cuidadosamente. Se resuspende el precipitado en 100 µl de solución de lisozima y se incuba por 5 minutos a temperatura

ambiente. Se agregan 200 μ l de una solución de SDS 1% en NaOH 0,2M, se agita suavemente por inversión y se incuba por 5 minutos en hielo. Se agregan luego 150 μ l de acetato de sodio 3M pH 8, se agita vigorosamente y se incuba por 5 minutos más en hielo. Se centrifuga por 5 minutos y se retira el precipitado con un escarbadientes de madera. Se centrifuga por 5 minutos más y se transfiere el sobrenadante a otro tubo. Se agrega 1 ml de etanol y se incuba 15 minutos a -80°C . Se centrifuga por 5 minutos más y se descarta el sobrenadante. Se agregan entonces 100 μ l de acetato de sodio 50 mM : Tris-HCl 50 mM, pH8 y se disuelve el precipitado agitando vigorosamente. Se agregan 200 μ l de etanol y se incuba por 15 min a -80°C ; se centrifuga por 15 minutos y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el precipitado en 50 ml de una solución de RNasa A (20 $\mu\text{g/ml}$ en TE pH 8) y se incuba a 37°C por 30 minutos. Se agregan 5 μ l de acetato de sodio 3M pH 7,5 y 135 μ l de etanol, y se incuba por 15 minutos a -80°C . Se centrifuga por 5 minutos se descarta el sobrenadante y se seca al vacío. Se retoma el precipitado en 20 μ l de TE.

Solución de Lisozima

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8	25 mM
lisozima	4 mg/ml

B) Obtención de DNA genómico

Es importante destacar que, en las dos técnicas que se describen a continuación, es necesario trabajar con extremo cuidado. Debido al tamaño del DNA genómico éste es muy frágil, por lo que todas las agitaciones se realizaron suavemente y las soluciones se colectaron con pipeta pasteur de boca ancha para no romper el DNA.

1) Obtención de DNA Leucocitario

Se colectan 20 ml de sangre (10 ml por tubo heparinizado), se agregan 2 ml de EDTA 0,1M pH 8 por tubo, se agita y se transfieren los 24 ml a un tubo siliconado. Se lavan los tubos de partida con solución salina, se agrega al resto y se centrifuga a 3.000g por 10 minutos a 4°C . Se descarta el sobrenadante y se resuspende suavemente el precipitado en igual volumen de solución salina. Se centrifuga nuevamente en las

mismas condiciones, se elimina el sobrenadante y se agregan 10 ml de buffer de lisis recién preparado. Se tapa el tubo con parafilm, se agita por inversión y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente (viraje del rojo claro al rojo oscuro). Luego de una centrifugación a 3.000g por 10 min. a 4°C, se descarta el sobrenadante, el precipitado se resuspende en 10 ml de solución salina y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en dos ml de solución salina y se transvasa a un erlenmeyer de 50 ml. Se agregan 20 ml de buffer de digestión K y 200 µl de solución de proteinasa K (10 mg/ml) y se incuba a 37°C sin agitación hasta el día siguiente, luego de lo cual se agregan 22 ml de fenol y se agita suavemente por 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 11 ml de cloroformo y se agita suavemente por 10 minutos más. Se centrifuga a 4°C por 10 min. a 3.000g, se recupera el sobrenadante repitiéndose la extracción dos veces más para luego hacer una extracción clorofórmica. Se recupera el sobrenadante en un vaso de precipitado y se agregan 2,5 volúmenes de etanol. Se agita suavemente y se deja 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se recupera el DNA enrollándolo en una varilla de vidrio siliconada y se lava dos veces en etanol. La varilla es colocada en un tubo Falcon de 4 ml, se seca al vacío, y se agregan 2 ml de TE. dejando disolverse el DNA a temperatura ambiente en un agitador rotatorio hasta el día siguiente. Se determina la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm. Una buena preparación da una relación DO₂₆₀/DO₂₈₀ entre 1,9 y 2,0.

Buffer de Lisis

NH ₄ Cl	131 mM
NH ₄ HCO ₃	0,9 mM

Solución Salina

NaCl	130 mM
Buffer fosfato de sodio pH 7	10 mM
EDTA	5 mM

Buffer de digestión K

Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,5 %

2) Obtención de DNA de órganos o colas de ratón

Se congelan 100-200 mg de tejido o un trozo de cola de ratón de aproximadamente 0,5 g en nitrógeno líquido. Se lo coloca luego entre dos hojas de papel glicinado y se lo disgrega con un golpe de martillo. El tejido se transvasa a un tubo Falcon de 4 ml y se agregan 3 ml de buffer de digestión K y 60 μ l de solución de proteinasa K 10 mg/ml. incubandose en agitador rotatorio a 37°C hasta el día siguiente. El digerido se transvasa a un tubo Corex de 15 ml, haciendose tres extracciones fenólicas, una con fenol-cloroformo y otra con cloroformo. Se recupera la fase acuosa en un tubo de 30 ml y se agregan 2,5 volúmenes de etanol. Se agita suavemente y se deja 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se recupera el DNA enrollandolo en una varilla de vidrio siliconada y se lava dos veces en etanol. Se coloca la varilla en un tubo Falcon de 4 ml y se seca al vacío; luego de agregar 2 ml de TE, se deja disolver el DNA a temperatura ambiente en un agitador rotatorio hasta el día siguiente. Se determina la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm. Una buena preparación da una relación DO₂₆₀/DO₂₈₀ entre 1,9 y 2,0.

Buffer de digestión K

Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,5 %

C) Obtención de RNA

1) A partir de cultivos celulares

Se utilizó el método de Chirgwin y col. (1979), en el cual el tejido se homogeneiza en presencia de un agente caotrópico (tiocianato de guanidina) como desnaturalizante para impedir la acción de RNAsas y posteriormente se purifica el RNA por sedimentación a través de un colchón de cloruro de cesio. Todo el material utilizado fue esterilizado (por autoclavado o con dietilpirocarbonato) y las drogas empleadas fueron libres de RNAsa.

Las placas de cultivo (10 cm de diámetro) son lavadas con 2 ml de PBS; luego de eliminar esta solución se agregan 2 ml de buffer GTC por placa, se agita suavemente por 2 minutos y se transfiere a un tubo Falcon de 50 ml. Se lava nuevamente la placa con 2 ml del mismo buffer y se colecta junto con la solución anterior.

PBS

NaCl	8	g/l
KCl	8	g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15	g/l
KH ₂ PO ₄	0,2	g/l

Buffer GTC

Tioicinato de guanidina	4	M
Lauril sarcosina sódica	0,5	%
Citrato de sodio	5	mM
β-mercapto etanol	100	mM

Se lleva a pH 7 con NaOH y se filtra por 0,22 μm

El DNA genómico se rompe pasando la suspensión 5 a 6 veces por una jeringa con aguja (la preparación se hace menos viscosa) y se deposita sobre una solución de cloruro de cesio. El RNA es precipitado a través del colchón de cloruro de cesio por centrifugación a 36.000g durante 12 a 16 horas a 20°C.

Colchón de ClCs

CsCl	5,7	M
Acetato de sodio pH 5,4	25	mM
EDTA pH 5,4	50	mM

El sobrenadante es aspirado con pipeta pasteur y el tubo de centrífuga es cortado por debajo del nivel en que bandeja el DNA. El precipitado se resuspende en 200 μl de acetato de sodio 0,4 M pH 4,8 se agrega 1 ml de etanol y se deja a -20°C. Al día siguiente se centrifuga por 15 minutos a 4°C, el RNA se lava dos veces con etanol 80%.y se seca al vacío. El material se resuspende en 100 μl de agua y sobre una alícuota se determina la concentración por su absorbancia a 260 nm. El rendimiento normal es de alrededor de 100 mg de RNA por placa de petri.

2) A partir de órganos

El método utilizado es esencialmente el mismo, teniendo en cuenta que se dejan ayunar los animales para disminuir el contenido de glucógeno de la preparación ya que éste podría coprecipitar con el RNA debido a su alta densidad. La homogeneización se realizó con 10 ml de buffer por gramo de tejido en un homogeneizador Dounce con piston A.

D) Métodos de purificación de ácidos nucleicos

1) Extracciones y precipitaciones con solventes orgánicos

Los métodos que se describen en este punto deben su importancia no a la originalidad o a la complejidad de la técnica, sino a la frecuencia de utilización. Prácticamente todas las manipulaciones con DNA o RNA incluyen en varias etapas extracciones con solventes orgánicos o precipitaciones etanólicas, por esta razón se decidió incluirlas dentro de los métodos utilizados

El objetivo de las extracciones, generalmente es desproteinizar las soluciones de ácidos nucleicos, y en el caso de la purificación por agarosa de bajo punto de fusión es eliminar a esta última de la preparación

a) Extracción fenólica

Se utiliza para ello fenol de alta pureza, preferentemente recién destilado, al que se equilibra 3-4 veces con Tris-ClH 1M pH 8, hasta que el pH sube de 7,6 y luego 2 veces con una solución 100 mM Tris-ClH pH 8; 2 mM EDTA; 10 mM β -mercapto-etanol. Se lo conserva a 4°C con un volumen de esta solución, previo agregado de β -hidroxiquinoleína a una concentración final de 0,1%.

La extracción se realiza con un volumen de fenol por volumen de solución, se agita, se centrifuga por cinco minutos y se recupera la fase superior sin tomar la interfase.

b) Extracción con fenol:cloroformo

En este caso el solvente de extracción es la mezcla de 25 volúmenes de fenol, preparado como se explicó más arriba, 24 volúmenes de cloroformo y un volumen de alcohol isoamílico. La extracción se realiza en las mismas condiciones

c) Extracción con cloroformo

En este caso el solvente de extracción es cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La extracción se realiza como en los casos precedentes

En algunos casos, sobre todo cuando el DNA purificado fue sometido a posteriori a un tratamiento enzimático, se realizó una extracción final con eter etílico para eliminar otros solventes y luego se incubó la fase acuosa a 42°C por 10 minutos para evaporar el eter remanente

d) Precipitación Etanólica

Como regla general las soluciones de DNA se llevaron a una concentración de acetato de amonio de 2,5 M, y se agregaron entonces 2,5 volúmenes de etanol. Se dejó precipitando 15 minutos a -80°C y se centrifugó por 15 minutos a 4°C.

En los casos de soluciones diluídas (concentraciones de DNA menores de 20 ng/ μ l) o para fragmentos pequeños, la precipitación se realizó a -20°C y enfriando lentamente la solución, de manera de impedir la formación de un gran número de núcleos de precipitación para que estos sean más grandes. De ser posible se deja precipitando hasta el día siguiente y las condiciones de centrifugación se intensifican, llegando a 100.000g por 60 minutos en los casos de oligonucleótidos de simple cadena en solución diluída.

E) Preparación de oligonucleótidos

1) Purificación de oligonucleótidos de simple cadena

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados y purificados por HPLC en la Unidad de Química Orgánica del Instituto Pasteur. El producto (n-mer) viene algo impurificado con oligonucleótidos más chicos [(n-1)mer, (n-2)mer,etc], por lo que es necesario purificarlo nuevamente.

Se resuspenden 50 U₂₆₀ de cada oligonucleótido en 20 μ l de colorante formamida, se lo calienta 5 minutos a 90°C y se lo somete a una electroforesis en un gel desnaturante de 17% de poliacrilamida de 0,5 mm de espesor. Se migra a 40 mA hasta que el Xilene cyanol se desplaza 30 cm. El oligonucleótido se visualiza bajo luz UV sobre una placa de silicio y se corta la banda correspondiente al n-mer. Se eluye a 37°C en buffer de elución hasta el día siguiente. Se filtra por Millex de

0,45 μ m, se lava el tubo, la jeringa y el filtro con buffer de elución, se completa con NaCl hasta 0,4M y se precipita con tres volúmenes de etanol. Se centrifuga a 100.000g por 4-5 hs a 4°C. El precipitado es retomado en 200 ml de TE diluído 1/10, y se pasa por Sephadex G-25 en TE diluído. Se dosa por absorbancia a 260 nm y se colectan las fracciones que contienen el DNA.

Colorante formamida

Azul de bromofenol	0,1 %
Xilene cyanol	0,1 %
TBE 10x	10 %
Formamida	80 %

La solución obtenida se utiliza para marcar los oligonucleótidos en un extremo 5', para experiencias de metil-interferencia o para hibridizar con el oligonucleótido complementario. El resto se liofiliza y se conserva a -20°C.

2) Hibridización con el oligonucleótido complementario (annealing)

Se mezclan en un tubo Eppendorf cantidades equimolares de los oligonucleótidos ss complementarios y se agrega 1/9 del volumen de buffer An-10x. Se calienta la solución por 3 minutos en baño de agua a 85°C, se centrifuga por un instante, se retorna al baño y se deja hasta que la temperatura de éste desciende a temperatura ambiente. Se guarda a 4°C.

Buffer An-10x

Tris-HCl pH 7,6	67 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	6,7 mM
Espermidina	1,3 mM
EDTA	1,3 mM

II) Reacciones enzimáticas y marcado radioactivo de sondas

A) Marcado radioactivo de fragmentos de DNA

1) Marcado en extremos 3'

El método se utiliza para marcar fragmentos de DNA obtenidos a partir de cortes con endonucleasas de restricción que generen extremos 5' salientes.

El protocolo comunmente utilizado fue incubar 1 μ g del o los fragmentos de DNA con 10 μ Ci del deoxinucleótido elegido, marcado en posición alfa con 32 P. Se agregan los otros tres deoxinucleótidos no radioactivos a una concentración de 100 μ M, y 1-5 Unidades de DNA polimerasa I fragmento mayor (fragmento Klenow), en un volumen final de 20 μ l a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se agrega el nucleótido que se utilizó para marcar, pero no radioactivo, en una concentración final de 100 μ M y se continúa la incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene con el agregado de EDTA 50 mM final, o con 0,3 volúmenes de BBP-E y el fragmento se purifica generalmente por electroforesis en gel nativo de poliacrilamida.

Buffer BBP-E

Azul de bromofenol	0,2 %
EDTA	15 mM
Glicerol	50 %

2) Marcado en extremo 5'

El método fue utilizado para marcar, con la enzima T4 polinucleótido quinasa, fragmentos de DNA cuyo extremo 5' está libre (no fosforilado), sea de simple o doble cadena. En nuestro caso se lo utilizó para marcar oligonucleótidos.

El protocolo general de marcado fue incubar en un volumen de 50 μ l 10 pmoles de DNA (200 ng de un oligonucleótido ds de 30 bp), con 50 μ Ci de (γ^{32} P) ATP y 5 unidades de enzima (NEB) en el buffer recomendado por el fabricante, por 2 horas, a 37°C. La reacción se detiene por el agregado de un volumen de fenol-cloroformo, se extrae y precipita con etanol, luego del agregado como carrier de 1 μ g de poly(dI-dC)-poly(dI-dC).

3) Marcado por desplazamiento de corte (Nick translation)

El método se utilizó para marcar de 100 a 500 ng de plásmido o de fragmentos de DNA. Se usó el Nick translation Kit N-5000 (Amersham) y en algunos casos se suplementó la mezcla enzimática con 5 unidades de DNA polimerasa I (NEB). Generalmente fueron utilizados 50 a 100 μCi de uno de los cuatro deoxinucleótidos. Los fragmentos radioactivos obtenidos se purifican por columna de Sephadex G-50 y posterior precipitación etanólica.

4) Marcado por polimerización al azar o "Random Priming"

El método se basa en la alta probabilidad de hibridización a baja temperatura que presentan los oligonucleótidos de 6 bp y en la utilización de estos como "primer" para el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli*.

Se separa el DNA a marcar por electroforesis en gel nativo de agarosa de bajo punto de fusión. Luego de visualizado el fragmento bajo luz UV se corta el trozo correspondiente de agarosa, se lo pasa a un tubo Eppendorf tarado y se pesa nuevamente. Se agregan 2 ml de TE por gramo de agarosa y se incuba por 15 minutos a 100°C y por 15 minutos en el hielo. Se mezcla el equivalente de 100 a 200 ng de DNA con 50 μCi de un deoxinucleótido radioactivo y los otros tres fríos en una concentración final de 100 μM , con 10 μl de buffer OLB 5 X y con 5 unidades de DNA polimerasa I, fragmento mayor (Klenow) en un volumen final de 50 μl . Se lo incuba por 16 hs a temperatura ambiente. La reacción se detiene por el agregado de EDTA y se purifica por columna de Sephadex G-50.

Buffer OLB 5 X

Pipes pH 6,6	500 mM
MgCl ₂	25 mM
DTT	50 mM
Hexanucleótidos	1,25 mg/ml
BSA	1 mg/ml

B) Reacciones enzimáticas

1) Enzimas modificadoras del DNA

Las enzimas utilizadas fueron endonucleasas de restricción, DNA polimerasa I de *E.coli*, DNA polimerasa I (fragmento mayor o Klenow) de *E.coli*, DNA ligasa de fago T4, polinucleótido quinasa de fago T4, DNAsa I y DNAsa micrococcal. Generalmente las condiciones de utilización (buffer, concentraciones de sustratos, temperatura y tiempo de incubación) fueron las recomendadas por cada fabricante.

2) Cloranfenicol Acetil Transferasa

La medición de la actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CATsa) se realiza por la acetilación de ^{14}C cloranfenicol en presencia de acetil-CoA como donador y la posterior separación de los derivados acetilados en cromatografía en capa delgada, según el método descrito por Gorman y col. en 1982. Los extractos utilizados son calentados por 7 minutos a 60°C antes del ensayo para precipitar las deacetilasas endógenas, tratamiento que no afecta la enzima CATsa, que resta activa en el sobrenadante luego de centrifugar.

El ensayo tipo se realiza incubando $10\ \mu\text{g}$ del extracto a analizar en una solución $40\ \text{mM}$ de (^{14}C)-cloranfenicol y $0,4\ \text{mM}$ de acetil-CoA en $170\ \mu\text{l}$ de Tris-HCl $250\ \text{mM}$ pH 7,8 a 37°C por 30 minutos. La sensibilidad del ensayo se aumentó utilizando cantidades mayores de extractos proteicos y realizando incubaciones más largas, teniendo en cuenta en este último caso de agregar cada una o dos horas un suplemento de acetil coenzima A, debido a la hidrólisis de ésta. La reacción se detiene por el agregado de $1\ \text{ml}$ de acetato de etilo y se agita vigorosamente. La fase orgánica se cambia de tubo y se repite la extracción con otro ml del éster. Las fases orgánicas se secan al vacío en evaporador rotatorio (Speed-Vac), las muestras son suspendidas en $10\ \mu\text{l}$ de acetato de etilo y se depositan en una placa delgada de sílica (Polygram SIL-g $0,25\ \text{mm}$, Macherey Nagel) Los distintos derivados acetilados del cloranfenicol se separan por cromatografía ascendente, utilizando como solvente de desarrollo una mezcla de cloroformo y metanol en una relación 95 a 5. Cuando el frente de migración del solvente alcanza $4/5$ de la placa, ésta se saca de la cámara, se seca y se autoradiografía.

III) Métodos Electroforéticos

A) Electroforesis de DNA

1) Geles nativos de agarosa

Se aplicó la técnica descrita por Maniatis 1982. Se utilizaron corrientemente geles de 6 x 10 x 0,5 cm o geles dobles de 15 x 20 x 0,5 cm según la cantidad de muestras a analizar. El porcentaje de agarosa utilizado fue de 0,8 a 2 % según la talla de los fragmentos a separar. Comunmente se usaron geles al 1 %. Los geles se prepararon disolviendo a ebullición la agarosa (sigma tipo II), en buffer TBE, suplementandose luego con bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml. Las muestras se depositaron en volúmenes de 10 a 100 µl, previo agregado de 0,3 volúmenes de BBP-E. Las electroforesis se desarrollaron a 10 V/cm para separaciones rápidas (≈2 hs) o a 1V/cm para separaciones nocturnas (≈16 hs). La posición de las bandas se visualizó en un transiluminador Kodac de 306 nm de longitud de onda y se fotografió. Como marcadores de peso molecular se utilizaron digestos de pBR322 por *Hinf* I o de fago lambda por *Hind* III o por *Hind* III y *Eco* R I.

Buffer TBE

Tris	89 mM
Acido Bórico	89 mM
EDTA	2 mM

2) Aislamiento de fragmentos de DNA por electroelución a papel.

Luego de la separación electroforética de los fragmentos de DNA, se elimina el exceso de buffer que recubre el gel de tal manera que solo los bordes estén en contacto con la solución. Se visualiza la posición de las bandas con una lámpara UV y se realiza un corte con bisturí a ≈ 1-2 mm adelante de la banda a recuperar. En él, se introduce un rectángulo de celofán de diálisis y otro de papel Wathman 3MM embebido en TBE (entre el celofán y la banda a eluir). Se continua la electroforesis, controlando con una lámpara UV que toda la banda seleccionada se haya transferido al papel y no haya atravesado el celofán. Se retiran el papel y el celofán y se los coloca en un tubo Eppendorf de 0,5 ml (cuya base se ha perforado con un alfiler), éste se coloca dentro de un tubo de 1,5 ml y se centrifuga 10 segundos. Luego se lava cinco veces el papel con 50 µl

de NaCl 0,5 M y se centrifuga 10 segundos cada vez. Se controla bajo luz UV que todo el DNA haya sido eluído. La solución obtenida se centrifuga 5 minutos, se cambia de tubo y se precipita con 2,5 volúmenes de etanol a -20°C , se seca al vacío y se retoma en el volumen deseado de TE.

3) Aislamiento de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión

Se aplicó la técnica descrita por Maniatis 1982. Las electroforesis se desarrollaron como se explicó, excepto que en lugar de utilizar agarosa común, se utilizó agarosa de bajo punto de fusión. Los fragmentos a purificar se recuperan cortando las bandas con bisturí, las que se colectan en un tubo Corex de 15 ml. Se agrega 0,5 a 1 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 8 y se incuba a 65°C por 15 min. Una vez disuelta la agarosa se realizan tres extracciones fenólicas, se agrega 0,1 volumen de NaCl 5 M y 3 volúmenes de etanol, y se deja precipitando a -20°C hasta el día siguiente. Posteriormente se centrifuga a 5.000 g por 30 minutos a 4°C , se descarta el sobrenadante y se seca al vacío. El precipitado se resuspende en 200 μl de TE, se agregan 100 μl de acetato de amonio 7,5 M y 750 μl de etanol y se lo deja precipitando toda la noche a -20°C , o 30 min. a -80°C . Luego se centrifuga 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol 70%. Se seca al vacío y se resuspende en el volumen deseado de TE.

4) Geles nativos de poliacrilamida

Se aplicó la técnica descrita por Maniatis 1982. Se utilizaron geles de 4 a 15% de poliacrilamida en TBE (acrilamida:bisacrilamida en relación 30:1), según la talla de los fragmentos a separar. Generalmente se prepararon geles de 0,35 mm de espesor en placas de vidrio siliconadas de 20 x 40 cm y como buffer de corrida se usó TBE.

Las muestras fueron resuspendidas en buffer BBP-E 50% y las electroforesis fueron desarrolladas a 1500V con un amperaje limitante de 35 mA, hasta que el colorante comienza a salir del gel. Los fragmentos fueron ubicados por autoradiografía en el caso de DNA marcado radioactivamente, o por tinción con bromuro de etidio.

5) Geles de separación de cadena

El método se basa en que la estructura secundaria de las dos hebras de DNA desnaturalizadas no siendo la misma puede determinar

que la relación carga/radio sea distinta para cada hebra y por lo tanto éstas sean separadas en electroforesis, lo que no siempre ocurre.

Se aplicó la técnica descrita por Maniatis 1982, con modificaciones, utilizándose generalmente para separar fragmentos marcados radioactivamente. El grado de entrecruzamiento de los geles es menor, para ello se utiliza una relación de acrilamida/bisacrilamida de 50/1.

Se prepara un gel de 5 a 8% de poliacrilamida (50/1), según la talla de los fragmentos a separar, en TBE 0,4 x y se lo somete a una preelectroforesis de una hora a 300 V y 30 mA. Se resuspende la muestra en 25 µl de colorante-DMSO recién preparado, se la incuba por 5 minutos a 90°C y se la congela rápidamente a -80°C. Se descongela la muestra y se siembra inmediatamente en el gel. Se migra por una hora a 250 V y 15 mA y luego a 150 V y 15 mA hasta el día siguiente, se detiene cuando el xilene cyanol se desplaza unos 25 cm. Se autoradiografía, se cortan las bandas, se eluye el DNA y se lo purifica como se describe más abajo.

Colorante-DMSO

Dimetilsulfóxido	25 µl
Azul de bromofenol 0,2%	25 µl
Xilene cyanol 1%	5 µl
EDTA 100 mM pH8	1 µl
H ₂ O	19 µl

6) Geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Se utilizaron generalmente geles de 0,35 mm de espesor de 20 x 40 cm o de 40 x 40 cm preparados entre placas de vidrio siliconadas, según el método descrito por Maniatis 1982. Los geles más comunmente empleados fueron según la talla de los fragmentos a separar de 8, 15, y 25 % de poliacrilamida (Acrilamida/bisacrilamida 30:1), en buffer TBE y urea 7 M. Las muestras fueron resuspendidas en colorante formamida con agitación vigorosa, centrifugadas, calentadas por 3 minutos a 90°C y depositadas inmediatamente sobre el gel. Las condiciones de migración fueron de 30, 35 y 40 V/cm para cada una de los porcentajes de poliacrilamida utilizados respectivamente.

Colorante formamida

Azul de bromofenol	0,1 %
Xilene cyanol	0,1 %
TBE 10x	10 %

Formamida

80 %

7) Aislamiento de fragmentos de DNA de geles de poliacrilamida

Las bandas de DNA seleccionadas son cortadas del gel con bisturí e incubadas en tubos eppendorf con 400 μ l de buffer de elución a 37°C hasta el día siguiente. La solución es entonces filtrada por Millex (0,45 μ m), sometida a una partición con fenol:cloroformo y el DNA es concentrado por precipitación etanólica

Buffer de elución

Acetato de amonio	500 mM
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0,1 %

B) Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Se utilizó la técnica descrita por McMaster (1977) que bloquea el RNA con glioxal impidiendo de esta manera su degradación. Se prepara un gel de agarosa 1,5 % como se describió más arriba utilizando en lugar de TBE, buffer fosfato de sodio 15 mM pH 6,5 esterilizado. El gel no lleva bromuro de etidio. Se incuban el RNA en 20 μ l de la solución bloqueante por 15 minutos a 50°C y se la coloca luego en un baño de hielo, y se le agregan 2 μ l de una solución de azul de bromofenol 1% / xilene cianol 1%, previamente esterilizada.

Las muestras se depositan en el gel y se hace migrar a 10V/cm en fosfato de sodio 15 mM pH 6,5 con recirculación del buffer. Se debe evitar que el pH de éste suba de 8 para mantener la estabilidad de los acetales. La tinción se realiza incubando el gel en una solución de bromuro de etidio 1,25 μ g/ml en NaOH 40 mM por 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación. El exceso de colorante es eliminado posteriormente con dos lavados de 15 minutos en acetato de sodio 200 mM pH 4. El gel se fotografía bajo luz ultravioleta.

Solución Bloqueante

Buffer fosfato pH 6,5	15 mM
Glioxal(deionizado)	500 mM

DMSO

50 %

C) Electroforesis de proteínas

1) Geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS

Se utilizó el método de Laemmli (1970) con modificaciones. Se usó un equipo Protean II (BioRad), y la técnica utilizada fue la que se describe en el manual de instrucciones del equipo. Generalmente los geles fueron de 7,5 % de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor. Para algunos controles de proteínas se utilizaron minigeles desarrollados y teñidos en un equipo "Fast-Gel" (Pharmacia).

2) Geles nativos de poliacrilamida.

Se utilizaron solamente para experiencias de retardamiento de DNA. En el ítem correspondiente se describe su preparación y utilización.

IV) Clonado de fragmentos de DNA

A) Clonado

1) Preparación del vector.

Los vectores utilizados generalmente fueron pUC 18 o pUC 19, que otorgan resistencia a la ampicilina e incluyen un sitio múltiple de corte (polylinker) dentro de la región codante de la β -galactosidasa. Ésto permite, en el medio adecuado, diferenciar las colonias de bacterias transformadas por el plásmido salvaje, de aquellas que llevan uno recombinante.

El plásmido se abre con la o las enzimas de restricción elegidas. Los extremos cohesivos, si son 5' salientes, se pueden transformar en extremos romos por tratamiento con DNA polimerasa I, fragmento mayor (Klenow) (New England Biolabs). Si los extremos del vector linearizado son coherentes (complementarios o ambos romos), es decir que puedan ligarse entre sí sin incluir al inserto, se los desfosforila con fosfatasa alcalina (Boeringer) en las condiciones descriptas por el fabricante.

2) Ligación de fragmentos

El vector y el inserto a clonar son mezclados en una relación molar igual al cuadrado del cociente de sus tamaños, la cantidad total de DNA se mantiene alrededor de 100 ng. La reacción de ligación se realiza en 10 μ l del buffer recomendado por el fabricante, con 400 unidades de T4 DNA ligasa (New England Biolabs), a 16°C por 14 a 20 hs.

3) Preparación de bacterias competentes

La cepa de bacteria utilizada fue E.coli 71/18, cuyas características son [Δ (Lac,Pro) F' Lac I Z Δ M15 Pro⁺]. Ella permite identificar los clones de pUC no recombinantes en presencia de IPTG y X-gal como clones azules ya que son los únicos que expresan la β -galactosidasa. Las bacterias competentes se prepararon por el método de Mandel (1970).

Se inoculan 30 ml de medio ML con 200 μ l de un precultivo fresco, y se incuban a 37°C con agitación hasta que la DO₆₀₀ alcanza 0,6 unidades. Se pasa a un tubo Falcon de 50 ml, se incuba en hielo por 10 minutos y luego se centrifuga a 5.000g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante es descartado y el precipitado se resuspende en 15 ml de

Cl₂Ca 50 mM esteril a 4°C y se deja por 15 minutos en el hielo. Se centrifuga a 5.000g por 10 minutos a 4°C, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 2 ml de Cl₂Ca. Se guarda a 4°C y se utiliza al día siguiente para la transformación.

4) Transformación de bacterias

En un tubo Falcon de 4 ml se incuban 5 µl de la mezcla de ligación con 100 µl de bacterias competentes y 40 µl de Tris-HCl 0,1 M pH 7,1 por 5 minutos en hielo y luego por 5 minutos a 37°C; se agregan 200 µl de medio ML y se incuba a 37°C por 45 a 60 minutos. Se agregan 3 ml de gelosa blanda (previamente fundida a 100°C y equilibrada luego a 45°C)* se agita por inversión y se vierte inmediatamente sobre placas de petri con medio sólido Luria (MS) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Se deja solidificar la gelosa por 10 minutos a temperatura ambiente y se incuba hasta el día siguiente a 37°C.

Medio Sólido Luria (MS)

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l
agar	1,5 %

Gelosa blanda

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
agar	0,7 %

* Si el vector de clonado fue un pUC sin insertos se agregan junto con la gelosa blanda 40 µl de IPTG 100 mM y 40 µl de X-gal 0,2 %.

Como regla general se hacen placas de control de:

bacterias: bacterias en medio sin antibiótico
sensibilidad: idem con ampicilina
corte: idem pero transformadas con el vector cortado
ligación: idem pero ligado y
desfosforilación: idem transformadas con el vector desfosforilado y ligado.

B) Identificación de recombinantes

En el caso que el vector de partida sea un pUC, los clones recombinantes se identifican como aquellos que en presencia de IPTG y X-gal dan clones no azules.

1) Identificación por hibridación de DNA sobre filtros Whatman

a) Preparación de los filtros:

Las colonias son repicadas en doble y de manera ordenada, sobre placas de petri con medio MS con ampicilina e incubadas a 37°C por 16 hs. Se coloca un filtro Whatman 541 sobre cada caja, marcando su posición, y se incuba por una hora a 37°C. Se retiran los filtros y se desnaturalizan por 10 minutos en NaOH 0,5 M y luego se secan a 37°C. Luego se lavan dos veces por 5 minutos con NaOH 0,5 M, dos veces por 5 minutos con Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, dos veces por 5 minutos con 2 x SSC y una vez con etanol 95% por un minuto y luego se secan a temperatura ambiente.

Solución Stock 20 x SSC

Cloruro de sodio	3 M
Citrato de sodio	0,3 M

b) Prehibridización

Los filtros se colocan en una bolsita de plástico con la solución de prehibridización I (1 ml por cm² de superficie del total de filtros) y se incuban a 42°C con agitación por dos horas.

Solución de prehibridización I

DNA de esperma de salmón, sonificado y desnaturalizado a 10 mg/ml	0,5 ml
Formamida deionizada	50 ml
20 x SSC	25 ml
H ₂ O	24,5 ml

c) Hibridización

La solución de prehibridización es retirada, se agrega a ésta la sonda radioactiva y se filtra todo por Millex 0,45 µm. Se coloca la solución nuevamente dentro de la bolsa que contiene los filtros y se incuban por 16 hs a 42°C con agitación. Generalmente se utiliza de 10 a 100 ng de de sonda por filtro. Se puede utilizar el mismo inserto marcado por polimerización al azar (oligoprimering) o por desplazamiento

de corte (nick translation). Es conveniente utilizar actividades específicas mayores de 10^8 dpm/ μ g de DNA.

d) Lavados y autoradiografía

Los filtros son luego lavados con solución 2 x SSC por 5 min a 20°C luego por 30 minutos a 20°C y finalmente a 37°C por una hora aproximadamente, controlando con contador geiger. Se seca a temperatura ambiente y se autoradiografía 1- 16 hs.

2) Análisis de clones recombinantes

1) Purificación de plásmidos en pequeña escala

Se empleo el método descrito en Focus (1981). Se inoculan 3 ml de medio líquido Luria (ML), conteniendo el antibiótico apropiado, con una colonia de la bacteria que contiene el plásmido a analizar y se incuba a 37°C con agitación vigorosa durante la noche. Se centrifuga 1 ml del cultivo por 5 minutos, se descarta el sobrenadante cuidadosamente, luego se agregan 70 μ l de buffer STET y se resuspende el precipitado agitando vigorosamente. Se agregan 5 μ l de lisozima (10 mg/ml), se agita y se incuba el tubo por 40 segundos a 100°C. Se centrifuga 15 minutos a 4°C y se recupera el sobrenadante. Se agrega un volumen de isopropanol y se incuba 15 minutos a -80°C. Se centrifuga 5 minutos a 4°C, se descarta el sobrenadante y se seca al vacío. Se retoma el DNA en 20 μ l de TE.

Buffer STET

Sacarosa	8	%
Triton x 100	5	%
EDTA	50	mM
Tris-HCl pH 8	50	mM

2) Análisis del patron de restricción

El DNA obtenido es digerido con la o las enzimas de restricción elegidas y los fragmentos se separan por electroforesis en geles de agarosa. Se identifica así el clon cuyo patrón de corte corresponde al mapa de restricción esperado.

V) Identificación de secuencias por hibridización y secuenciación de DNA

A) Método de hibridización puntual de DNA (Dot Blot)

El método se basa en que la presencia de una secuencia dada dentro de un DNA puede ser determinada por hibridización con una sonda radioactiva que lleve dicha secuencia. La técnica se utilizó para identificar animales transgénicos. El DNA genómico de colas de ratón y de linfocitos fue preparado como se explicó más arriba.

1) Preparación de la membrana.

Se desnaturalizan las muestras de DNA en 5 μ l de NaOH 0,2 M por 10 minutos a temperatura ambiente. Se las pasa al hielo y se las diluye con 5 μ l de 10 x SSC. La membrana (GeneScreen) se sumerge por 20 minutos a temperatura ambiente en solución 2 x SSC y se la seca luego sobre papel Whatman 3MM. Se depositan las muestras en gotas pequeñas, en forma ordenada, secando entre cada depósito para evitar la difusión. Se deja secar por 30 minutos y se lava la membrana cuidadosamente en solución 2 x SSC. Se seca sobre Whatman 3MM. Se fija el DNA en horno a 80°C por 3 horas. La membrana se puede guardar luego a temperatura ambiente.

2) Prehibridización

Se prehibridiza la membrana a 42°C por un mínimo de 6 horas y con agitación constante, en un saco de plástico sellado, con 1 ml de solución de prehibridización II por cada 10 cm² de superficie de membrana.

Solución de prehibridización II

DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado	100 μ g/ml	
Polivinil pirrolidona (40.000)	0,2	%
Seroalbúmina bovina	0,2	%
Ficoll (400.000)	0,2	%
SDS	1	%
Pirofosfato de sodio	0,1	%
NaCl	1	M
Sulfato de Dextrano (500.000)	10	%
Formamida (deionizada)	50	%

3) Hibridización

Se marca el fragmento que se va a utilizar como sonda por desplazamiento de corte (nick translation) o mejor por polimerización al azar (random priming), de manera de obtener actividades específicas superiores a 10^8 dpm/ μ g. Se precipita con etanol al equivalente de 10 a 20 ng de sonda por ml de solución de prehibridización II. Se resuspende el precipitado en 100 μ l de formamida 50%/ NaCl 1M, se lo desnaturaliza por 5 minutos a 90°C y se le agrega un ml de solución de prehibridización II a 42°C. Se abre el saco que contiene la membrana y se coloca la mezcla con la sonda. Se sella nuevamente el saco y se incuba a 42°C por 16 a 48 horas con agitación continua.

4) Lavados y autoradiografía

Se elimina la solución de hibridización y se lava la membrana en un cristalizador dos veces por 5 minutos con 100 ml de la solución de lavado a temperatura ambiente y con agitación constante.

Se lava luego dos veces por 30 minutos a 60°C con 100 ml de solución de lavado llevada a 1% de SDS con SDS 20 %, con agitación constante. Se lava por último dos veces con 100 ml de solución de lavado diluída 1/10 a temperatura ambiente por 30 minutos, con agitación constante. Se seca la membrana sobre papel Whatman 3MM a temperatura ambiente y se autoradiografía.

Solución de lavado

Tris-HCl pH8	60 mM
NaCl	300 mM
EDTA	2 mM

B) Método de Southern

La base del método es la misma que en el caso anterior. La modificación introducida es que las muestras de DNA son cortadas con enzimas de restricción y separadas en geles de agarosa antes de ser transferidas a la membrana, lo que permite no solo identificar la presencia de las secuencias sino además los fragmentos de restricción dentro de los que se encuentran.(Southern 1975)

1) Tratamiento del gel de agarosa

Se cortan 10 μ g de DNA genómico con las enzimas de restricción elegidas y se separan los fragmentos por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (con bromuro de etidio), como se explicó anteriormente. Se fotografía el gel junto a una regla centimetrada como parámetro, bajo luz UV. Se depuriniza el DNA incubando el gel por 20 minutos a temperatura ambiente, en un baño con 200 ml de HCl 0,25 M, con agitación constante. Se desnaturaliza el DNA incubando el gel a temperatura ambiente por 30 minutos con 200 ml de una solución de NaOH 0,2 M / NaCl 0,6 M, con agitación constante. Se equilibra el gel con tres incubaciones de 20 minutos cada una en 200 ml de buffer fosfato de sodio 25 mM pH 6,5 a temperatura ambiente y con agitación continua.

2) Transferencia del DNA a la membrana

Se colocan dos hojas de filtros Whatman 3MM en una cuba de electroforesis horizontal de tal manera que solo los extremos se encuentren dentro de los compartimentos de buffer. Se llenan estos con buffer fosfato 25 mM pH 6,5 y se deja que el buffer suba por capilaridad mojando todo el papel. Se sumerge en el mismo buffer fosfato una hoja de la membrana de transferencia (GeneScreen) del mismo tamaño del gel por 15 minutos a temperatura ambiente. Se coloca el gel sobre las hojas de papel Whatman cuidando de no dejar burbujas de aire y sobre éste se coloca la membrana de GeneScreen con el mismo cuidado. Posteriormente se colocan 5 hojas de papel Whatman 3MM apenas embebidas en el buffer y sobre éstas una pila de por lo menos 15 cm de servilletas de papel absorbente de la misma talla que el gel. Por último, se coloca un peso de aproximadamente 500 g y se deja transferir el DNA por capilaridad del gel a la membrana durante 16 a 24 horas. Se recupera cuidadosamente la membrana y se la lava por un minuto en buffer fosfato. Se la seca sobre filtros Whatman 3MM a temperatura ambiente. Se fija el DNA sobre la membrana a 80°C por 3 horas.

3) Prehibridización

Se prehibridiza la membrana con 1 ml de solución de prehibridización II por cada 10 cm² de superficie de membrana en un

saco de plástico sellado, a 42°C por un mínimo de 6 horas y con agitación constante.

4) Hibridización

Se marca el fragmento que se va a utilizar como sonda por desplazamiento de corte o mejor por polimerización al azar, de manera de obtener actividades específicas superiores a 10^8 dpm/ μ g. Se precipita con etanol al equivalente de 10-20 ng de sonda por ml de solución de prehibridización. Se resuspende el precipitado en 100 μ l de formamida 50 %/NaCl 1 M, se desnaturaliza por 5 minutos a 90°C y se le agrega un ml de solución de prehibridización II a 42°C. Se abre el saco que contiene la membrana y se coloca la mezcla con la sonda. Se sella nuevamente y se incuba a 42°C por 16 a 48 horas con agitación continua.

5) Lavados y autoradiografía

Se elimina la solución de hibridización y se lava la membrana en un cristizador dos veces durante 5 minutos con 100 ml de la solución de lavado, a temperatura ambiente y con agitación constante. Se lava luego dos veces durante 30 minutos a 60°C con 100 ml de solución de lavado llevada a 1% de SDS con SDS 20%, con agitación constante. Se lava por último dos veces con 100 ml de solución de lavado diluída 1/10 a temperatura ambiente por 30 minutos, con agitación constante. Se seca la membrana sobre papel Whatman 3MM a temperatura ambiente y se autoradiografía.

C) Identificación de secuencias de RNA (Northern blot)

1) Preparación del RNA

Se separan los RNA por electroforesis en gel de agarosa como se describió más arriba, teniendo en cuenta además la utilización de materiales esterilizados. En este caso, no es necesario ningún otro tratamiento posterior a la electroforesis como la depurinización o la desnaturalización debido a que el RNA, por sus características propias, se transfiere muy bien.

2) Transferencia del RNA a la membrana

Se colocan dos hojas de filtros Whatman 3MM en una cuba de electroforesis horizontal tal que solo los extremos se encuentren dentro de los compartimentos de buffer. Se llenan éstos con buffer fosfato 25 mM pH 6,5 y se deja que el buffer suba por capilaridad mojando todo el papel. Se sumerge en el mismo buffer fosfato una hoja de la membrana de transferencia (GeneScreen) del mismo tamaño del gel durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se coloca el gel sobre las hojas de papel Whatman cuidando de no dejar burbujas de aire y sobre éste se coloca la membrana de GeneScreen con el mismo cuidado. Luego se colocan 5 hojas de papel Whatman 3MM embebidas en el buffer y sobre éstas una pila de por lo menos 15 cm de servilletas de papel absorbente de la misma talla que el gel. Por último, se coloca un peso de aproximadamente 500 g. Se deja transferir el DNA por capilaridad del gel a la membrana durante 16 a 24 horas. Se recupera la membrana cuidadosamente y se la lava por un minuto en buffer fosfato. Se la seca sobre filtros Whatman 3MM a temperatura ambiente. Se fija el RNA sobre la membrana a 80°C durante 3 horas.

3) Prehibridización

Se prehibridiza la membrana, a 42°C, con 1 ml de solución de prehibridización II por cada 10 cm² de superficie de membrana, en un saco de plástico sellado, por un mínimo de 6 horas y con agitación constante.

Hibridización

Se marca el fragmento de DNA que se va a utilizar como sonda por desplazamiento de corte o por polimerización al azar, de manera de obtener actividades específicas superiores a 10⁸ dpm/µg. Se precipita con etanol el equivalente de 10 a 20 ng de sonda por ml de solución de prehibridización. Se resuspende el precipitado en 100 µl de formamida 50%, NaCl 1M, se lo desnaturaliza por 5 minutos a 90°C y se le agrega un ml de la solución de prehibridización II. Se abre el saco que contiene la membrana y se coloca la mezcla con la sonda. Se sella nuevamente y se incuba a 42°C por 16 a 48 horas con agitación continua.

Lavados y autoradiografía

Se pasa la membrana a un cristizador y se la lava dos veces, durante 5 minutos con 100 ml de la solución 2 x SSC a temperatura ambiente y con agitación constante. Se lava luego dos veces durante 30 minutos a 65°C con 100 ml de solución 2 x SSC llevada a 1% de SDS, con agitación constante. Se lava por último dos veces con 100 ml de solución 0,1 x SSC a temperatura ambiente por 30 minutos, con agitación constante. Se seca la membrana sobre papel Whatman 3MM a temperatura ambiente y se autoradiografía.

D) Secuenciación de DNA por métodos de modificación química

1) Método de Maxam y Gilbert

a) Preparación del DNA

Generalmente se trabajó con fragmentos marcados en 3', purificados en geles nativos y luego en geles de separación de cadenas. Se resuspenden 200 cps de DNA junto con 30 µg de tRNA, en 22 µl de agua.

b) Reacciones de modificación

T+C:

Se incuban 6 µl de la solución de DNA con 10 µl de agua y 30 µl de hidrazina por 30 minutos a 20°C. Se agregan 300 µl de solución Hidrazina-Stop y 600 µl de etanol

<u>Hidrazina-stop</u>	
Acetato de sodio	300 mM
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	0,1 mM

C:

Se incuban 6 µl de la solución de DNA con 20 µl de NaCl 5 M y 20 µl de hidrazina por 13 minutos a 20°C. Se agregan 300 µl de solución Hidrazina-Stop y 600 µl de etanol

A+C

Se incuban 5 µl de la solución de DNA con 21 µl de NaOH 1,5 M/EDTA 1 mM a 90°C por 10 minutos y se pasa al hielo. Se agregan 100 µl acetato de sodio 1 M y 600 µl de etanol

G:

Se incuban 4 μ l de la solución de DNA con 20 μ l de buffer DMS y 1 μ l de DMS por 10 minutos a 20°C. Se agregan 50 μ l de solución DMS-Stop y 600 μ l de etanol.

Buffer DMS

Cacodilato de sodio pH 8	50 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM

Buffer DMS-stop

Tris-Acetato pH 7,5	1 M
Acetato de sodio pH 7,5	1,5 M
Acetato de magnesio	50 mM
β -mercapto etanol	1 M
EDTA	1 mM

Todas las muestras son entonces precipitadas por 15 minutos a -80°C y centrifugadas 5 minutos. El sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende en 250 μ l de acetato de sodio 0,3 M y se reprecipita con 750 μ l de etanol a -80°C por 15 minutos se centrifuga, lava y seca al vacío.

c) Corte con piperidina y electroforesis

Las muestras son retomadas en una solución de piperidina 1 M e incubadas por 30 minutos a 90°C. Se liofilizan. Se resuspenden luego en 20 μ l de agua y se liofilizan nuevamente. Se repite esta operación. Las muestras son resuspendidas en 2 a 5 μ l de colorante-formamida y se someten a electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida, como se explicó más arriba.

2) Secuencia A+G

Se resuspenden 300 cps de cada muestra de DNA a secuenciar (marcadas radioactivamente en un solo extremo), junto con 1 μ g de DNA sonificado de salmón en 10 μ l de agua. Se agregan 25 μ l de ácido fórmico 88 %, se incuba por 15 minutos a 20 °C y se detiene la reacción con 250 μ l de buffer A+G Stop.

Buffer A+G STOP

Acetato de sodio	300 mM
Acetato de magnesio	5 mM
EDTA	0,1 mM

Se agregan 750 μ l de etanol y se precipita a -80°C por 15 minutos. Se centrifuga 15 minutos, se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 250 μ l de acetato de sodio 0,3 M. Se realiza nuevamente una precipitación etanólica. Se lava con etanol 80 % y se seca al vacío. Las muestras son retomadas en una solución de piperidina 1 M, incubadas por 30 minutos a 90°C y liofilizadas. Se resuspenden luego en 20 μ l de agua y se liofilizan nuevamente. Se repite esta operación. Las muestras son resuspendidas en 2 a 5 μ l de colorante-formamida y se someten a electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida, como se explicó más arriba.

VI) Métodos "in vivo" de estudio de elementos reguladores

A) Transfecciones transientes

1) Cultivo de células

Las líneas celulares que se utilizaron son Hep3B, HepG2 y HeLa. Las tres son de origen humano. Hep3B ha sido obtenida a partir de un hepatocarcinoma, en tanto que HepG2 a partir de un hepatoblastoma, y HeLa a partir de un carcinoma de células epiteliales. Esta última línea no produce transferrina en tanto que los dos hepatomas son productores.

Las células Hep se cultivan en medio F 12 (Boehringer) conteniendo 10 % de suero fetal bovino, 1 % de Hepes pH 7,3 y 1 % de glutamina. Las células HeLa son cultivadas en medio D-MEM (Boehringer), conteniendo los mismos aditivos.

2) Transfecciones

Los cultivos celulares fueron transfectados por el método del fosfato de calcio (Graham y col 1973). El plásmido a transfectar fue obtenido luego de dos pasajes por gradientes de cloruro de cesio y se controló su estado por geles de agarosa, ya que la eficiencia del método depende de la superhelicidad de la molécula.

El DNA se diluye a una concentración final de 20 μg por ml de solución de CaCl_2 y un volumen de ésta se agrega, gota a gota y agitando suavemente, sobre un volumen de buffer HBS. Se deja crecer el precipitado durante 25 a 30 minutos a temperatura ambiente.

<u>Buffer HBS</u>	
Hepes.NaOH pH 7,10	42 mM
NaCl	280 mM
Na_2HPO_4	1,4 mM

Un cultivo de $1,5 \times 10^6$ células en una placa de petri de 10 cm de diámetro se transfecta con un ml de la suspensión de DNA- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en estufa 5% de CO_2 , humidificada y a 37°C . Luego de 8 horas de transfección se aspira el sobrenadante y se cultiva con 20 ml de medio por 48 horas más.

Las células son lavadas dos veces con PBS y se las despega de la matriz con 1 ml de buffer TEN, agitando suavemente por 5 minutos. Se

colecta el material en un tubo eppendorf y se centrifuga durante un minuto. Las células son resuspendidas en 150 µl de Tris-HCl 250 mM pH 8 y son lisadas en 5-6 ciclos de congelación y descongelación a -80°C y 37°C respectivamente. A fin de inactivar y eliminar las probables desacetilasas internas las muestras son calentadas por 7 minutos a 60°C, luego son centrifugadas por 5 minutos y los sobrenadantes son transvasados de tubo. La preparación se puede guardar a -20°C.

Buffer TEN

Tris-HCl pH 7,5	40 mM
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM

B) Animales transgénicos

1) Preparación del transgen

El fragmento de DNA a microinyectar se purifica primero por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y luego por columna de adsorción (ELUTIP-d, utilizada en las condiciones descriptas por el fabricante). El DNA se somete posteriormente a una diálisis extensiva contra Tris-HCl 10 mM pH 7,5/EDTA 0,25 mM y se diluye luego a una concentración de 500 copias por picolitro en el mismo buffer (Brinster y col. 1985, Babinet y col 1975).

2) Microinyección.

Se utilizaron hembras del genotipo C57/SJL, obtenidas por cruzamiento entre machos SJL/J y hembras C57BL/6. Para obtener un número suficiente de embriones una superovulación es inducida en animales prepúberes (3-4 semanas), por inyección intraperitoneal de 5 unidades de Pregnant Mare Serum (PMS) seguida 42 a 48 horas después de 5 unidades de gonadotrofina coriónica humana (hCG). En tales condiciones 10 a 40 embriones son obtenidos por animal.

Las hembras fueron acopladas con machos C57/SJL. La ovulación tiene lugar alrededor de 12 horas después de la inyección de hCG. Las hembras fecundadas, que se identifican por la presencia del tapon vaginal, son sacrificadas y se disecan sus oviductos. Los huevos recuperados por ruptura de la ampula se incuban en una solución de hialuronidasa, diluída a 0,5 mg/ml en PB1, a fin de eliminar las células

foliculares. Los huevos se transfieren a una gota de Whiten (medio de cultivo de estados precoces), y se incuban con una gota de aceite para evitar la evaporación en estufa humidificada a 37°C con 5% de CO₂.

Doce horas después de la fecundación los pronúcleos femenino y masculino son visibles y se puede proceder a la inyección. Ésta se realiza bajo microscopio (100X), sobre la platina del cual son dispuestos los embriones en una gota de PB1 (medio de cultivo de estados precoces). Dos micropipetas son colocadas en los micromanipuladores; la primera es una pipeta de contención, su punta es redondeada para no dañar los huevos y tiene un diámetro interno de alrededor de 20 μm (el diámetro del embrión es de 85 μm), ella permite mantener el embrión en posición por aspiración en la zona pelúcida. La segunda pipeta es la que se utiliza para inyectar generalmente el pronúcleo masculino por ser el más grande. El huevo debe ser dispuesto de tal manera que el pronúcleo quede colocado del lado de la pipeta de inyección, de modo de facilitar la maniobra. Si la inyección es exitosa se ve aumentar el tamaño del pronúcleo. Los huevos son luego pasados a medio Whiten e incubados hasta el día siguiente. Aquellos que alcanzan al estadio de dos células son reimplantados en el oviducto de hembras pseudo-preñadas (hembras en estro que fueron acopladas con machos vasectomizados) (Brinster y col. 1985, Babinet y col 1975).

VII) Análisis "in vitro"A) Preparación de extractos nucleares1) Aislamiento de núcleosa) Aislamiento de núcleos a partir de hígado de rata

Se utiliza el método de Gorski y col. (1986). Generalmente se utilizaron ratas adultas de 12 semanas de 200 g y se trabajó con tres hígados por cada preparación. Se disecciona un hígado, se lo perfunde con PBS y se corta en pedazos pequeños, descartando el tejido no hepático. Se lava nuevamente con PBS.

<u>PBS</u>	
NaCl	8 g/l
KCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

Se lava con buffer de homogeneización SHB y se homogeneiza en 30 ml de este buffer en un potter con pistón de teflón (10 pasajes a velocidad 8, regulador Bioblock). Se filtra por gaza y se procede a homogeneizar otro hígado. Cuando se termina de filtrar el tercer homogeneizado, se lava el potter con SHB, luego se lava la gaza y se colecta todo junto, tal que el volumen final alcance 170 ml.; se agita por inversión. Se prepara un colchón de 10 ml de SHB por tubo de SW-27 (6 tubos en total) y se completa cuidadosamente con el homogeneizado. Se centrifuga en un rotor SW-27 a 25.000 rpm por 30 minutos a 4°C.

Buffer de homogeneización SHB

Hepes.KOH pH 7,9	10 mM
KCl	15 mM
EDTA	2 mM
Sacarosa	2 M
a último momento se agrega	
Espermina	0,15 mM
Espermidina	0,5 mM
DTT	0,5 mM
PMSF	0,5 mM
Pepstatina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml

Bepstatina 5 $\mu\text{g/ml}$

Se aspira el sobrenadante usando una bomba de agua y una pipeta pasteur. Se cambia la pipeta, se aspira cuidadosamente el colchón y se limpia el borde del tubo con servilletas de papel. Se agregan 3 ml de SHB/H₂O 9:1 por tubo y se resuspenden cuidadosamente los núcleos con pipetman de un ml (se usa un *tip* azul con la punta cortada). Se colecta la suspensión en un potter y se homogeneiza con tres pasajes en las mismas condiciones que antes. Se lavan los tubos y el homogeneizador con SHB 90%, se colecta junto con la suspensión de núcleos y se completa a 60 ml con SHB 90%. Se preparan dos colchones de SHB en tubos de SW-27 y se completan con la suspensión de núcleos. Se centrifuga en SW-27 a 25.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante por aspiración con bomba de agua y pipeta pasteur, se secan los bordes de los tubos con servilletas de papel y se guarda a -80°C para la preparación de extractos nucleares.

b) Aislamiento de núcleos de células en cultivo

Se elimina el medio de las cajas de petri y se lavan las células con PBS. Se agregan 5 ml de PBS y se levantan las células con "policeman" de goma. Se pasa la solución a otra caja y se repite la operación en serie con 10 cajas de petri. Se colecta en un tubo Falcon de 50 ml, se repite el lavado de las cajas con 5 ml de PBS y se colecta junto con la suspensión anterior. Se precipitan las células a 1.000g por 10 minutos y se elimina el sobrenadante con pipeta pasteur y bomba de agua. Se retoman las células en 7 ml de buffer HNB y se resuspenden con pipetman de 1 ml (*tip* azul, punta cortada).

Buffer HNB

Sacarosa	0,5	M
Tris-HCl pH 7,5	15	mM
KCl	60	mM
EDTA	0,25	mM
EGTA	0,125	mM
<u>a último momento se agrega</u>		
Espermina	0,15	mM
Espermidina	0,5	mM
DTT	1	mM
PMSF	0,5	mM
Pepstatina	5	$\mu\text{g/ml}$
Leupeptina	5	$\mu\text{g/ml}$

Bepstatina 5 µg/ml

Se agregan 5 ml de HNB llevado a 1% de Nonidet P 40 (a partir de una solución al 20%). Se agita por inversión 3 a 4 veces, se agregan inmediatamente 12 ml de HNB y se agita nuevamente por inversión 3-4 veces. Se centrifuga 10 minutos a 5.000g. Se aspira el sobrenadante cuidadosamente y se secan los bordes del tubo con servilletas de papel. Se toma una muestra para contar y controlar el estado de los núcleos bajo microscopio. Se utilizan inmediatamente para preparar los extractos nucleares.

2) Extracción de proteínas nucleares

Se aplicó el método de Dignam y col. (1983). Todas las operaciones se realizan a 4°C, en cámara fría. Se resuspende el precipitado de núcleos en 300 µl de TD-0,14 por 10⁹ núcleos, con pipetman de un ml (*tip* azul, punta cortada) y se pasa a un tubo de ultracentrífuga.

TD-0,14

Hepes.NaOH pH 7,9	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,25 mM
NaCl	0,14 M
a último momento se agrega	
Espermina	0,15 mM
Espermidina	0,5 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,5 mM
Pepstatina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml
Bepstatina	5 µg/ml

Se agrega igual volumen de TD-0,7, se resuspende con pipetman de un ml (*tip* azul, punta cortada); a medida que los núcleos se van rompiendo, se libera la cromatina y la solución se torna muy viscosa, aunque heterogeneamente. Se agita por 30 minutos en agitador rotatorio.

TD-0,7

Hepes.NaOH pH 7,9	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,25 mM
NaCl	0,7 M

con los mismos suplementos que TD-0,14 agregados a último momento.

Se centrifuga durante 30 minutos a 100;000g. Se recupera el sobrenadante y se agrega, lentamente y con agitación constante, sulfato de amonio hasta 0,3 g por ml de solución original. Se mezcla en agitador rotatorio por 30 minutos y se guarda hasta el día siguiente. Se resuspende en un volumen mínimo de buffer de diálisis al que se le han agregado los inhibidores de proteasas (en igual concentración que en TD-0,14) y se dializa tres veces por dos horas cada una, contra 500 ml de buffer de diálisis.

Buffer de diálisis

Hepes.KOH pH 7,9	20 mM
KCl	60 mM
EDTA	0,25 mM
EGTA	0,125 mM
Glicerol	20 %

Se colecta en tubos eppendorf y se centrifuga 10 minutos en microcentrífuga. Se fracciona y se congela en nitrógeno líquido. Sobre una alícuota se determina la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

B) Implantas de proteínas sobre DNA (Foot-printing).

El método se basa en el hecho que luego de tratar el DNA con una endonucleasa inespecífica (o un agente químico), éste se corta en distintos fragmentos que pueden ser separados en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. En el caso que la digestión se haga en presencia de una proteína que se ligue a una secuencia específica de nucleótidos, ésta va a estar protegida y no se van a producir cortes en esa región. Si el DNA digerido está marcado en un extremo, cuando se separen las bandas, las correspondientes a la región protegida van a estar ausentes o serán más débiles, produciendo en el patrón de bandas obtenido una "ventana" que delimita la secuencia en cuestión. La técnica utilizada fue la de las implantas a la DNAsa I descrita por Jones y col. (1985).

1) Digestión de DNA en presencia de proteínas

Se incuban en los distintos tubos 30 a 60 cps de DNA ds (marcado radioactivamente solo en un extremo 3'), con 500 ng de poly(dI-dC)-poly(dI-dC), y 15 a 50 μ g de proteínas de un extracto nuclear bruto en 50 μ l de buffer de diálisis 0,5 x a 0°C por 15 minutos.

Se agregan a cada tubo 50 μ l de una solución 10 mM MgCl₂ / 5 mM CaCl₂ y se incuba por 2 minutos a 20°C. Se agregan 3 μ l de una solución de DNAsa I, se agita suavemente y se incuba por 60 segundos a 20°C. [Las soluciones de DNAsa comunmente utilizadas fueron diluciones 1/50, 1/75, 1/150 y 1/300 preparadas a último momento a partir de una solución stock de DNAsa I (2 mg/ml). La dilución que da la digestión correcta varía con la preparación proteica, el lote de enzima y cada manipulación, por lo que conviene utilizar por lo menos dos condiciones de DNAsa en cada ensayo.] A los 60 segundos de agregada la enzima se detiene la reacción por el agregado de 100 μ l de buffer DNAsa-Stop-K, se agita vigorosamente y se incuba por 30 minutos a 42°C.

Buffer DNAsa-Stop-K

EDTA	20 mM
SDS	1 %
NaCl	200 mM
tRNA	150 μ g/ μ l
Proteinasa K	200 μ g/ μ l
(agregada a último momento)	

Se extrae luego con 100 μ l de fenol-cloroformo, se somete a 2 precipitaciones etanólicas, se lava con etanol 70% y se seca al vacío. Las muestras son resuspendidas en 2 a 4 μ l de colorante formamida.

2) Digestión del DNA libre

Se termostatan 30 a 60 cps de DNA en buffer HB a 20°C por 2 minutos, se agregan entonces 2 μ l de la solución de DNAsa I y se incuba por 60 segundos a 20°C [las soluciones de enzima generalmente utilizadas para digerir el DNA libre fueron 1/400, 1/500 y 1/600 a partir del mismo stock].

Buffer HB

Sacarosa	500 mM
Hepes-KOH pH 7,9	20 mM
KCl	60 mM
NaCl	15 mM

MgCl ₂	5 mM
CaCl ₂	2,5 mM

Se detiene la reacción con 100 µl de buffer DNAsa-Stop-K (al que a último momento NO se le agregó la proteinasa K, ya que en este caso no es necesaria). Las muestras son procesadas como se describió más arriba.

3) Secuencia A+G

Se realiza una reacción de secuenciación del fragmento para ubicarse en la secuencia. Se utilizó A+G debido a que es la reacción más sencilla y presenta un patrón fácil de seguir.

4) Electroforesis

Se deposita igual número de cpm de las muestras de secuencia (A+G), de las distintas digestiones de DNA libre y de las distintas digestiones en presencia de proteínas, sobre un gel desnaturizante de poliacrilamida al 8%. Se migra en las condiciones descritas, el gel es luego estampado sobre papel Whatman 3MM y autoradiografiado hasta el día siguiente.

C) Geles de retardamiento de DNA

El método se basa en la diferencia de migración entre los complejos DNA-proteína específicos y el DNA libre en electroforesis nativas de baja fuerza iónica (Garner y Revzin 1981). La técnica utilizada es una variación de la descrita por Carthrew y col. en 1985.

Se prepara una mezcla de DNA que incluye la sonda y competidores no específicos como poly(dI-dC)-poly(dI-dC) y DNA genómico sonicado. A esta mezcla se agregan en el caso de los experimentos de competición los oligonucleótidos correspondientes como competidores específicos.

Como sondas radioactivas se utilizaron oligonucleótidos de doble cadena marcados en 5'. La cantidad de poly(dI-dC)-poly(dI-dC) es empírica y depende del grado de purificación de la preparación proteica; en general para extractos nucleares brutos preparados como se describió más arriba, las cantidades óptimas fueron de 1 a 1,5 µg de poly(dI-dC)-poly(dI-dC) para 6 a 12 µg de proteínas.

1) Reacción de unión (binding)

Se prepara la siguiente mezcla de DNAs en hielo:

Sonda radioactiva	0,5 a 1 ng
Poly(dI-dC)-poly(dI-dC)	0 a 1,5 µg
DNA de salmón sonicado	25 ng
DNA de <i>E.coli</i> sonicado	30 ng
MgCl ₂	8 mM
Espermidina	8 mM
H ₂ O	csp 6 µl

Se agregan 6 µl de la solución proteica a analizar y se incuba por 15 minutos en hielo. En un tubo (blanco) que se utiliza para determinar la posición del DNA libre se agregan 6 µl de BBP-E en lugar del extracto proteico.

2) Electroforesis en gel nativo

Se prepara un gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 30:1) en buffer TBE 0,25 x y se lo somete a una preelectroforesis de 15 minutos a 10 V/cm. A los 15 minutos de comenzada la reacción de binding se depositan las muestras sobre el gel y se lo hace migrar a 10 V/cm con refrigeración por circulación de agua. La electroforesis se detiene cuando el colorante se desplazó aproximadamente 15 cm, el gel es entonces estampado y autoradiografiado de 1 a 16 hs.

D) Interferencia de unión por metilación

Este método se basa en la observación que si ciertas purinas dentro del sitio de reconocimiento en DNA de una proteína se encuentran metiladas producen una alteración estérica que impide la unión del factor. De esta manera si el DNA a utilizar es tratado en condiciones tales que una sola purina sea metilada por cada oligonucleótido, existirá una población de sondas que no se encuentran alteradas en los sitios de contacto del DNA. Si se realiza, en ciertas condiciones un gel preparativo de retardamiento, el factor no va a ligar las moléculas de la sonda que esten metiladas en bases que interfieran con la unión. Ésto significa que en el DNA retenido por el complejo no van a estar presentes las especies metiladas en los puntos de contacto. Si

la sonda retardada y la sonda que migra libre son eluidas del gel nativo y posteriormente se las hidroliza (en presencia de piperidina o NaOH), el DNA no va a ser cortado más que en los sitios en que las bases están modificadas. Por lo tanto dentro del patrón de corte de la sonda retenida van a estar ausentes las bandas correspondientes a los sitios de contacto entre la proteína y el DNA.

1) Preparación de la sonda

a) Marcado

Se marcan radioactivamente en 5' 100 ng de oligonucleótidos como se explica más arriba, se extrae con fenol cloroformo, se precipita con etanol, se lava y se seca.

b) Annealing

Se resuspende en 4 μ l de H₂O, se agregan 5 μ l de una solución a 20 ng/ μ l del oligonucleótido complementario no radioactivo y 1 μ l de buffer An-10 x y se hibridiza incubando por 3 minutos a 85°C y luego se deja descender la temperatura del baño hasta que alcanza la temperatura ambiente.

c) Metilación

Se agregan 187 μ l de buffer DMS, 1 μ l de poly(dI-dC)-poly(dI-dC) a 1 μ g/ μ l y 2 μ l de dimetil-sulfato (DMS) 50% en etanol. Se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente, se pasa al hielo y se agregan 50 μ l de solución DMS-stop.

Se precipita con etanol, se resuspende en TE y se somete a una nueva precipitación etanólica, se lava con etanol 80% y se seca. Se resuspende en 20 μ l de TE.

2) Selección del DNA por geles de retardamiento

Se verifica en un gel de retardamiento cualitativo si el patrón obtenido con el oligonucleótido metilado no está alterado (lo que generalmente implica hipermetilación).

Se hace un gel de retardamiento preparativo con 10 ng de sonda y 50 a 100 μ g del extracto nuclear en un volumen final de 20 μ l. Las cantidades de competidores no específicos son empíricamente determinadas. Las condiciones óptimas se encontraron alrededor de 10 μ g de poly(dI-dC)-poly(dI-dC), 1 μ g de DNA de *E.coli* y 1 μ g de DNA de

salmón. Las condiciones de electroforesis son las descriptas anteriormente.

El gel, sin estampar, se autoradiografía por dos horas y se cortan los trozos de gel que llevan el DNA libre y el retenido. Se eluyen hasta el día siguiente en buffer de elución. Las soluciones se filtran por Millex 0,22 μm , se extraen con fenol-cloroformo junto con 1 μg de poly(dI-dC)-poly(dI-dC), y se someten a dos precipitaciones etanólicas. Se secan al vacío.

3) Corte con piperidina, y electroforesis

Se retoma el DNA en 100 μl de piperidina 1 M y se incuba por 30 minutos a 90°C. Se liofiliza, se resuspende en 20 μl de agua. Se liofiliza y se resuspende nuevamente en 20 μl de agua y se dosa la radioactividad por el método de Cérencov. Se liofiliza y se resuspende en colorante formamida.

Se calienta por 3 minutos a 87°C y se depositan igual número de cpm en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 25%. La electroforesis se desarrolla a menos de 1800 V y 15 mA, en TBE hasta que el azul de bromofenol se desplaza aproximadamente 30 cm. Se autoradiografía sin estampar el gel de 16 a 48 hs.

VIII) Otras técnicas empleadasA) Métodos cromatográficos1) Filtración por geles

Las filtraciones por tamices moleculares se realizaron en columna de 90 cm por 1,1 cm de diámetro; el gel empleado fue AcA 34 equilibrado en el buffer "Z". Alrededor de 500 μ l de muestra fueron depositados en el tope de la columna; la cromatografía se desarrolló a una presión de 50 cm de solución, a una velocidad de aproximadamente 5 ml/hora y se colectaron fracciones de 0,5 ml.

Buffer "Z"

Hepes-KOH pH 7,8	25 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	12,5 mM
DTT	1 mM
Nonidet P-40	0,1%
Glicerol	20%

2) Cromatografía de afinidada) Preparación de la resina1) Preparación del DNA

Aproximadamente 10 U₂₆₀ de cada oligonucleótido ss complementario fueron purificados e hibridizados entre sí, como se describió anteriormente. Los oligonucleótidos originales tienen el extremo 5'-OH libre lo que implica que para ligarlos entre sí, es necesario fosforilar este extremo. Para seguir más fácilmente los pasos posteriores la fosforilación se hace en presencia de (γ^{32} P)-ATP.

Se toman 14 U₂₆₀ del oligonucleótido ds y se completa a 75 μ l con buffer An-10 x diluido al décimo. Se agregan 14 μ l de ATP 20 mM pH 7,5, 1 μ l de (γ^{32} P)-ATP (3.000 Ci/mmol a 10 μ Ci/ μ l) y 10 μ l de T4-polinucleótido quinasa. Se incuba a 37°C por dos horas. Se agregan 100 μ l de acetato de amonio 5 M pH 5,5, 25 μ l de MgCl₂ 100 mM y 25 μ l de TE. Se calienta a 65°C por 5 minutos. Se agregan 250 μ l de etanol, se precipita por 15 minutos a -80°C y se centrifuga 20 minutos a 4°C en

microcentrífuga. Se descarta el sobrenadante, se lava con etanol 80% y se seca al vacío. Se resuspende en solución de acetato de amonio y $MgCl_2$ y se precipita, lava y seca en las mismas condiciones.

Se resuspende en 75 μl de buffer de ligación y se agregan 20 μl de ATP 20 mM pH 7,5 y 5 μl de T4-DNA-ligasa. Se incuba a 16°C por 16 hs. Se extrae con un volumen de fenol-cloroforno, se precipita con etanol; se lava con etanol 70% y se seca al vacío. El DNA se resuspende en 200 μl de TE

Buffer de ligación

Tris-HCl pH 7,5	88 mM
$MgCl_2$	13 mM
DTT	20 mM
Espermidina	1,3 mM

2) Activación de la resina

Se trabaja en campana de seguridad. Se lavan 10 ml de sepharosa CL-2B (Pharmacia) con 250 ml de H_2O en filtro de vidrio fritado, se resuspende el gel en H_2O en un vaso de precipitados tal que el volumen final sea de 20 ml. Se agrega gota a gota una solución de 1,1 g de CNBr en 2 ml de NN dimetilformamida con lenta agitación magnética. Se agregan gota a gota durante 10 minutos 1,8 ml de NaOH 5 M con lenta agitación magnética e inmediatamente después 100 ml de H_2O a 0°C, para detener la reacción. Se filtra por vidrio fritado y se lava con 300 ml de agua a 0°C y luego con 100 ml de buffer fosfato de potasio 10 mM pH 8.

3) Acoplamiento del DNA

Se transfiere la resina activada a un tubo de polypropileno de 15 ml y se agrega buffer fosfato de potasio (KPi) 10 mM pH 8 para dar una suspensión espesa, aproximadamente 0,4 ml. Se agregan los 100 μl de DNA y se incuba a temperatura ambiente en un agitador rotatorio hasta el día siguiente. Se pasa a un filtro de vidrio fritado y se lava con 200 ml de H_2O y 100 ml de buffer etanolamina-HCl 1M pH 8. Se pasa a un tubo de 15 ml, se lava el filtro con buffer etanolamina y se incuba en agitador rotatorio por 4 a 6 hs a temperatura ambiente. Se pasa a un filtro de vidrio fritado y se lava sucesivamente con 100 ml de las siguientes soluciones: buffer KPi 10 mM pH8, buffer KPi 1M pH8, KCl 1M, H_2O y buffer de conservación.

La resina se resuspende en el buffer de conservación, se separa una alícuota para dosar la radioactividad y se guarda a 4°C. La eficacia del acoplamiento se calcula como la relación de radioactividad inicial a radioactividad retenida. Generalmente fue de 50 a 60%.

<u>Buffer de conservación</u>	
Tris-HCl pH 7,6	100 mM
NaCl	300 mM
EDTA	1 mM
NaN ₃	0,02 %

b) Desarrollo de la cromatografía

La resina se equilibra en el buffer de corrida "Z" y se prepara una columna con aproximadamente un ml del gel. La muestra se deja entrar lentamente, se lava la columna con 5 volúmenes del mismo buffer y luego se eluye con un gradiente lineal (10-15 vol.) o escalonado (3-5 vol/nivel) de la misma solución con KCl. La concentraciones de sales empleadas fueron desde la correspondiente al buffer de partida hasta 1M KCl.

B) Métodos de dosaje

1) Dosajes de proteínas

Para dosar las concentraciones de proteínas se utilizaron los métodos de Lowry, de Bradford o el sistema BCA de Pierce Chemicals.

2) Dosaje de DNA y RNA

Los ácidos nucleicos fueron dosados por su absorbancia a 260 nm tomándose como referencia de pureza una relación de densidad óptica 260 nm/280 nm igual a 2. Se consideraron para 1 Unidad de absorbancia a 260 nm las siguientes equivalencias: DNA ds= 50 µg; DNA ss (oligonucleótidos)= 35 µg y RNA= 43 µg.

Cantidades del orden de 5 a 50 ng se dosaron por colorimetría visual en solución de 1 µg/ml de bromuro de etidio en un transiluminador de 304 nm.

3) Dosaje de radioactividad

Los dosajes se realizaron por centellación en medio líquido con ACS II de Amersham. Los dosajes aproximativos se realizaron con contador de ionización Mip 10 de Nardeux.

Soluciones, buffers y medios empleados

Buffer A+G STOP

Acetato de sodio	300 mM
Acetato de magnesio	5 mM
EDTA	0,1 mM

Buffer Am-10x

Tris.HCl pH 7,6	67 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	6,7 mM
Espermidina	1,3 mM
EDTA	1,3 mM

Buffer BBP-E

Azul de bromofenol	0,2 %
EDTA	15 mM
Glicerol	50 %

Buffer de conservación

Tris.HCl pH 7,6	100 mM
NaCl	300 mM
EDTA	1 mM
NaN ₃	0,02 %

Buffer de diálisis

Hepes.KOH pH 7,9	20 mM
KCl	60 mM
EDTA	0,25 mM
EGTA	0,125 mM
Glicerol	20 %

Buffer de digestión K

Tris.HCl pH 8	50 mM
NaCl	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,5 %

Buffer de elución

Acetato de amonio	500 mM
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0,1 %

Buffer de homogeneización

SHB

Hepes.KOH pH 7,9	10 mM
KCl	15 mM
EDTA	2 mM
Sacarosa	2 M
a último momento se agrega	
Espermina	0,15 mM
Espermidina	0,5 mM
DTT	0,5 mM
PMSF	0,5 mM
Pepstatina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml
Bepstatina	5 µg/ml

Buffer de ligación

Tris.HCl pH 7,5	88 mM
MgCl ₂	13 mM
DTT	20 mM
Espermidina	1,3 mM

Buffer de Lisis

NH ₄ Cl	131 mM
NH ₄ HCO ₃	0,9 mM

Buffer DMS-stop

Tris Acetato pH 7,5	1 M
Acetato de sodio pH 7,5	1,5 M
Acetato de magnesio	50 mM
β-mercapto etanol	1 M
EDTA	1 mM

Buffer DMS

Cacodilato de sodio pH8	50 mM
Cloruro de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM

Buffer DNAsa-Stop-K

EDTA	20 mM
SDS	1 %
NaCl	200 mM
tRNA	150 µg/µl
Proteinasa K	200 µg/µl

(agregada a último momento)

Buffer GTC

Tioicianato de guanidina	4 M
Lauril sarcosina sódica	0,5 %
Citrato de sodio	5 mM
β-mercapto etanol	100 mM

Se lleva a pH 7 con NaOH y se filtra por 0,22 mm

Buffer HIB

Sacarosa	500 mM
Hepes-KOH pH 7,9	20 mM
KCl	60 mM
NaCl	15 mM
MgCl ₂	5 mM
CaCl ₂	2,5 mM

Buffer HBS

Hepes.NaOH pH 7,10	42 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,4 mM

Buffer HNB

Sacarosa	0,5 M
Tris HCl pH 7,5	15 mM
KCl	60 mM
EDTA	0,25 mM
EGTA	0,125 mM

a último momento se agrega

Espermina	0,15 mM
Espermidina	0,5 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,5 mM

Pepstatina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml
Bepstatina	5 µg/ml

Buffer OLB 5 X

Pipes pH 6,6	500 mM
MgCl ₂	25 mM
DTT	50 mM
Hexanucleótidos	1,25 mg/ml
BSA	1 mg/ml

Buffer STET

Sacarosa	8 %
Triton x 100	5 %
EDTA	50 mM
Tris.ClH pH 8	50 mM

Buffer STE

NaCl	100 mM
Tris.ClH pH8	10 mM
EDTA	1 mM

Buffer TBE

Tris	89 mM
Acido Bórico	89 mM
EDTA	2 mM

Buffer TEN

Tris.HCl pH 7,5	40 mM
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM

Colchón de CICs

CsCl	5,7 M
Acetato de sodio pH 5,4	25 mM
EDTA pH 5,4	50 mM

Colorante formamida

Azul de bromofenol	0,1 %
Xilene cyanol	0,1 %
TBE 10x	10 %
Formamida	80 %

Colorante-DMSO

Dimetilsulfóxido	25 µl
Azul de bromofenol 0,2%	25 µl
Xilene cyanol 1%	5 µl
EDTA 100 mM pH8	1 µl
H ₂ O	19 µl

Hidrazina-stop

Acetato de sodio	300 mM
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	0,1 mM

Medio Líquido Luria (ML)

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l

Medio Sólido Luria (MS)

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l
agar	1,5 %

PBS

NaCl	8 g/l
KCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

Solución Bloqueante

Buffer fosfato pH 6,5	15 mM
Glioxal(deionizado)	500 mM
DMSO	50 %

Solución de lavado

Tris.HCl pH8	60 mM
NaCl	300 mM
EDTA	2 mM

Solución de Lisozima

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris.ClH pH 8	25 mM
lisozima	4 mg/ml

Solución LTE.

Lisozima	2 mg/ml
EDTA pH 8	100 mM
Triton X 100	1 %

Solución de prehibridización I

DNA sonificado y desnaturizado de salmón a 10 mg/ml	0,5 ml
Formamida deionizada	50 ml
20 x SSC	25 ml
H ₂ O	24,5 ml

Solución de prehibridización II

DNA de salmón sonificado y desnaturizado	100 µg/ml
Polivinilpirrolidona(40.000)	0,2%
Seroalbúmina bovina	0,2 %
Ficoll (400.000)	0,2 %
SDS	1 %
Pirofosfato de sodio	0,1 %
NaCl	1 M
Dextran Sulfato (500.000)	10 %
Formamida (deionizada)	50 %

Solución PEG

Polietilen glicol 6.000	100 g
CINa	292 g
Tris.ClH 1 M pH 8	5 ml
EDTA 0,5M pH 8	1 ml

Solución Salina

NaCl	130 mM
Fosfato de sodio pH 7	10 mM
EDTA	5 mM

Solución Stock 20 x SSC

Cloruro de sodio	3 M
Citrato de sodio	0,3 M

TD-0,14

Hepes.NaOHpH7,9	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,25 mM
NaCl	0,14 M

a último momento se agrega

Espermina	0,15 mM
Espermidina	0,5 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,5 mM
Pepstatina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml
Bepstatina	5 µg/ml

TD-0,7

Hepes.NaOHpH7,9	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,25 mM
NaCl	0,7 M

a último momento se agregan los
mismos suplementos que a TD-
0,14

Buffer "Z"

Hepes-KOH pH 7,8	25 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	12,5 mM
DTT	1 mM
Nonidet P-40	0,1%
Glicerol	20%

RESULTADOS I

Experiencias con animales transgénicos

Introducción

La posibilidad de introducir funcionalmente genes dentro de sistemas *in vivo* ha provisto una herramienta importante para la disección de procesos biológicos complejos.

Uno de los métodos utilizados implica la introducción de material genético dentro de células en cultivo, ya sea por microinyección o por transfección (Graham y col. 1973). Este último procedimiento se basa en la transformación de las células eucarióticas por la introducción del DNA exógeno a partir del medio en que ellas son cultivadas. En la mayoría de los casos descritos, el gen exógeno o transgen es expresado apropiadamente, es decir en el tipo celular y con el nivel correspondiente (Wasylyk 1988). Las evidencias acumuladas indican que la información necesaria para ello está codificada en el propio gen, es decir en sus propios elementos regulatorios (elementos denominados "cis"); por lo tanto es posible obtener información a cerca de la posición y naturaleza de los elementos de un DNA necesarios para la regulación de su transcripción a partir del estudio del nivel de expresión de diferentes construcciones en distintos tipos celulares.

Otro método que se ha manifestado también como una importante ayuda para el estudio de la expresión genética es la construcción de animales transgénicos (Gordon y col. 1980 y 1985; Palmiter y col. 1986). Esta técnica se basa en la introducción del gen exógeno o transgen dentro de la línea germinal que va a dar origen a un nuevo animal y de él a una nueva cepa. El procedimiento más utilizado para ello consiste en la microinyección directa del DNA dentro de un pronúcleo de un huevo de ratón (Brinster y col. 1982). Esto significa que se introduce el gen en el

estadio inicial de una célula posibilitando de esta manera que el transgen pueda integrarse al material cromosómico de forma tal que todas las células del animal lleven la información exógena. Así el transgen va a encontrarse en contacto con todos los sistemas tisulares del animal respondiendo a cada maquinaria transcripcional según la información que él lleve codificada, es decir sus propios elementos reguladores "cis" inscriptos dentro de su secuencia nucleotídica. De esta forma la influencia de putativos elementos regulatorios de la transcripción puede ser asignada en todos los tipos celulares, y los cambios en la expresión del transgen pueden ser seguidos durante el desarrollo del animal. Se han obtenido con varios genes animales transgénicos y a partir de ellos se han asignado ciertas funciones a determinadas secuencias de DNA (Palmiter y col. 1986).

En este trabajo se han implementado estas técnicas a partir de genes recombinantes bajo la influencia de la región 5' de la hTf para estudiar la regulación de la expresión en distintos tejidos y durante la evolución; desgraciadamente todavía sin los resultados de expresión en el caso de los animales transgénicos obtenidos.

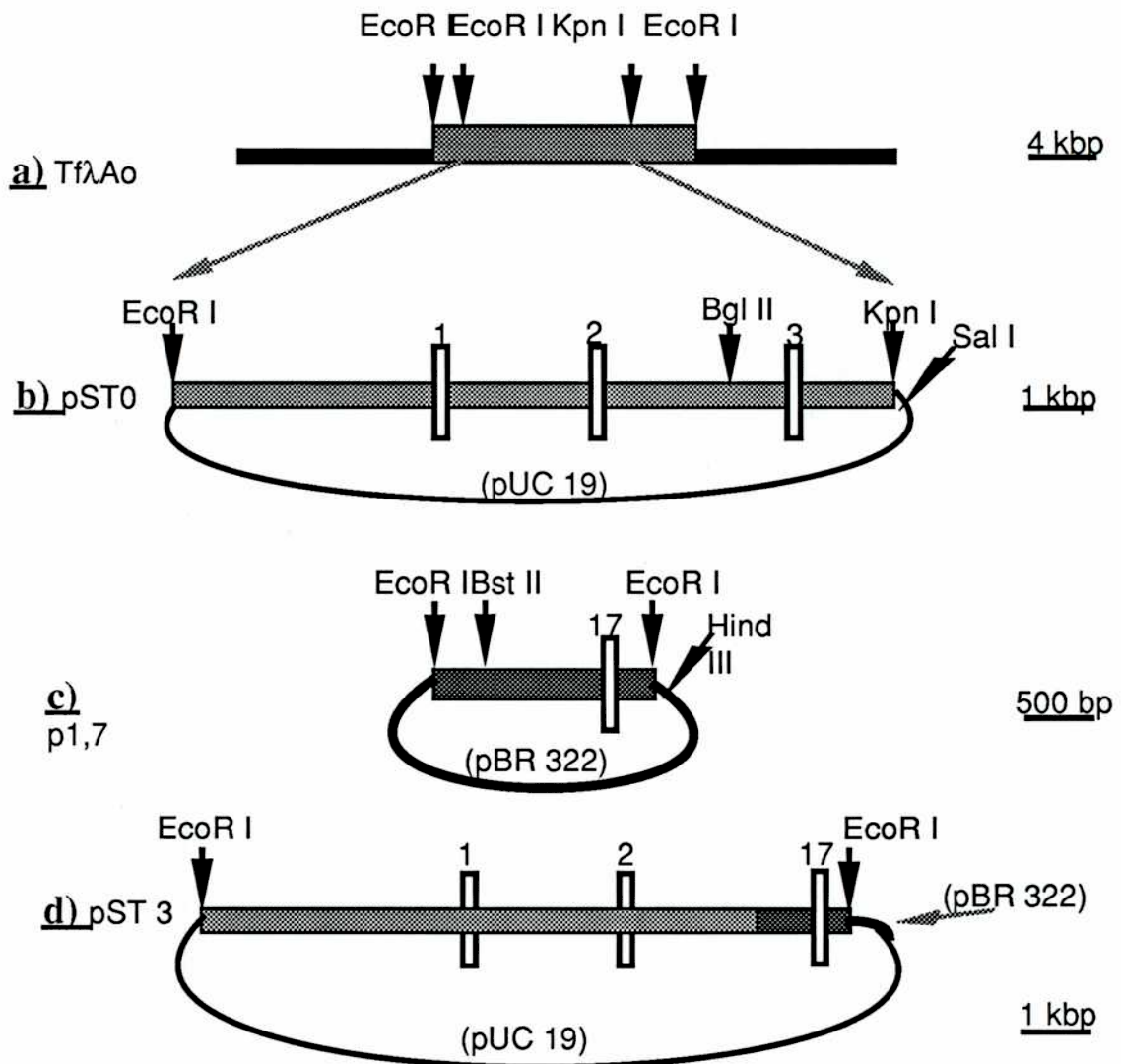
Resultados

1) Experiencias con el minigén mgTf

Debido al tamaño del mensajero de la transferrina humana, similar al del de ratón y al hecho de no contar con un clon único conteniendo el gen humano, se decidió construir un minigén para realizar las primeras experiencias con animales transgénicos. Dicho minigén fue construido a partir de regiones 5' y 3' del gen.

En una primera etapa un fragmento de 11,3 kbp de DNA proveniente del fago Tf- λ Ao (fig 4a) (Shaeffer y col. 1986), fue insertado en un vector pUC 19. El inserto contiene 4 kbp de la región 5' no codante, el primer, segundo y tercer exón, así como los intrones A, B y parte del C. El DNA purificado del fago Tf- λ A0 fue cortado con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Kpn* I, y el fragmento de 11,3 kbp

FIGURA 4



Plásmidos utilizados para la construcción del minigén *mgTf*

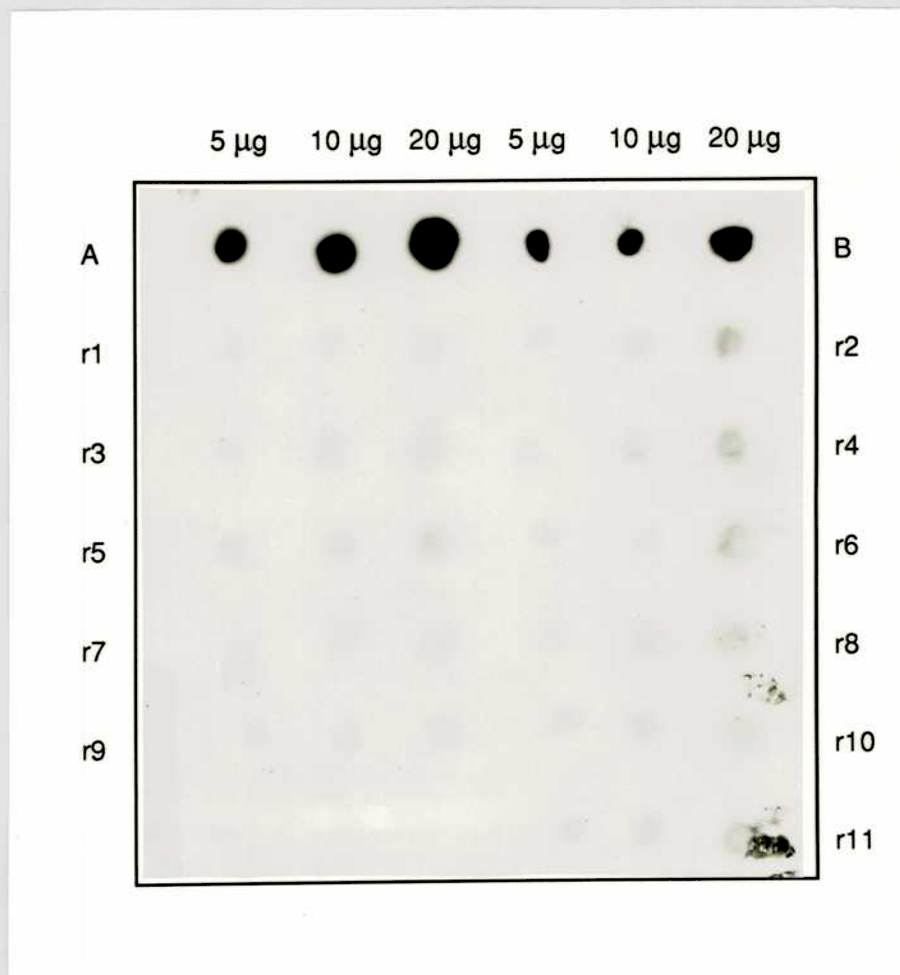
a) Fago Tf-1Ao, b) plásmido pST0, c) plásmido p1,7 y d) plásmido pST3. Los rectángulos horizontales indican secuencias genómicas de la hTf, los rectángulos verticales señalan la posición de los exones [no indicados en la figura 1a)], las barras horizontales negras representan los brazos del fago lambda y las líneas curvas las secuencias plasmídicas cuyo origen figura entre parentesis. Estas últimas no están en relación con la escala que se encuentra a la derecha de cada gráfico. Las flechas señalan los sitios de restricción cuya enzima se indica.

obtenido a partir de una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Dicho DNA fue clonado entre los sitios de restricción *EcoR* I y *Kpn* I del vector pUC 19. El plásmido resultante se denominó pST0 (Fig 4b). En una segunda etapa se inserto el DNA conteniendo la región 3' del gen en el plásmido pST0. La región utilizada proviene del plásmido p1,7 (Fig 4c) e incluye parte del intrón P, el exón 17 y 500 bp de la región 3' no codante. El clonado se realizó insertando un fragmento *BstE* II-*Hind* III de 1,4 kbp del p1,7 (fig 4c) entre los sitios *Bgl* II y *Sal* I (fig 4b) del plásmido pST0. Todos los extremos resultantes de los cortes enzimáticos se hicieron romos con DNA polimerasa I (fragmento Klenow) antes de la ligación.

El nuevo plásmido, denominado pST3 (fig 4d), contiene el minigén mgTf, que incluye en definitiva 4 kbp de la región 5' no codante, el primer, el segundo y el último exón (17), el intrón A, parte del B y del P, y 500 bp de la región 3' no codante. El tamaño de mgTf es de 11,3 kbp.

Para su utilización el plásmido pST3 fue purificado por el método de cloruro de cesio. El DNA conteniendo el minigén de la hTf, fue obtenido libre de DNA plasmídico por corte enzimático con *EcoR* I. El fragmento a microinyectar fue preparado a partir de una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y dializado extensivamente contra la solución TE antes de su utilización.

Alrededor de 400 cigotas de ratón fueron microinyectadas en el pronucleo masculino con 2 pl de una solución de DNA de 5 ng/ μ l y reimplantadas en una hembras pseudopreñadas (Babinet y col. 1985). Los embriones se dejaron desarrollar hasta término. A las crías de 15 a 30 días de edad, se les cortó un trozo de cola a partir del cual se preparó el DNA utilizado para determinar si el minigén se hallaba inserto en el genoma de los animales. El material proveniente de 35 animales obtenidos a partir de cigotas inyectadas con distintas preparaciones de mgTf fue analizado por el método del "dot blot". Tal como lo muestra parcialmente la figura 5 (con 11 preparaciones), el resultado fue negativo en todas las muestras analizadas, indicando que no hubo inserción del mgTf en el genoma de los animales obtenidos experimentalmente.

FIGURA 5Análisis por hibridación puntual de DNA de ratón

Por cada muestra se hicieron tres depósitos de 5, 10 y 20 μg de DNA de animales provenientes de huevos microinyectados con el minigén mgTf, preparado como se explica en materiales y métodos. La hibridación puntual ("dot blot") se realizó utilizando como sonda el plásmido pST3 marcado por desplazamiento de corte a una actividad específica de $1,4 \times 10^8$ dpm/ μg de DNA. Muestras A y B: DNA leucocitario humano; muestras r1 a r11 : DNA correspondiente a los ratones 1 a 11.

2) Experiencias con el minigén mgTf-CAT

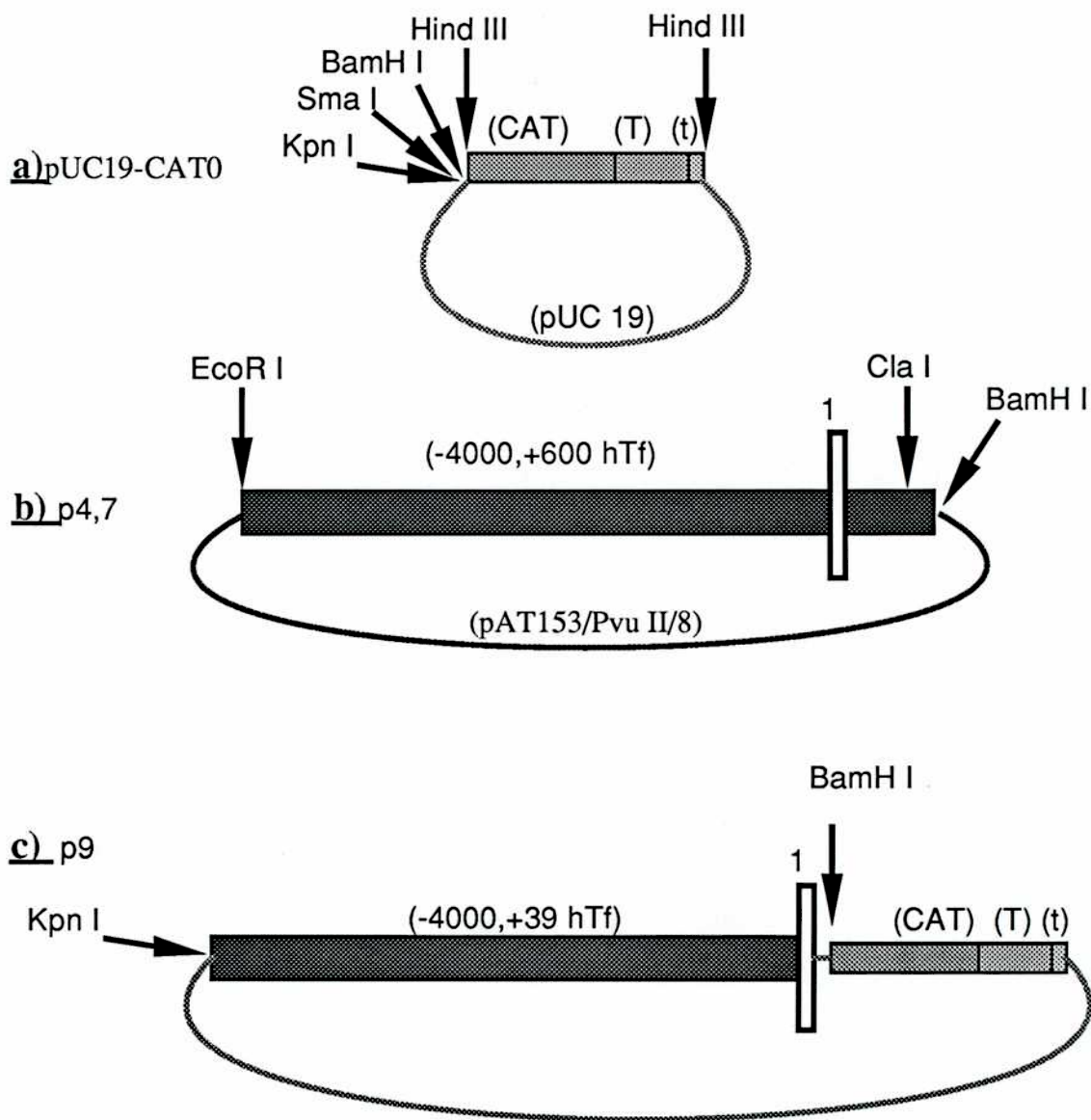
El minigén mgTf-CAT se construyó insertando un fragmento de la región 5' del gen de la transferrina delante del gen estructural de la enzima bacteriana cloranfenicol acetil transferasa presente en un vector pUC19 CAT0 (fig 6a).

El inserto fue obtenido por digestión con exonucleasa *Bal* 31 en el sitio *Cla* I del plásmido p4,7 (fig 6b) cortandose posteriormente con la enzima *EcoR* I. Los extremos resultantes de los cortes se hicieron romos con DNA polimerasa I (fragmento Klenow) y el inserto fue ligado en el sitio *Sma* I del plásmido pUC19-CAT0. Se identificó el extremo 3' del inserto de transferrina en los clones recombinantes por el método de secuenciación de Maxam y Gilbert (1980). El clon p9 fue elegido para trabajar por tener el extremo 3' del inserto en la posición +39, es decir entre el sitio de iniciación de la transcripción y el sitio de iniciación de la traducción del gen de la hTf.

Para verificar si dentro de la construcción se encuentran los elementos suficientes para la expresión del gen CAT se realizaron experimentos de transfecciones transientes del plásmido p9 sobre células en cultivo.

Cultivos de dos líneas de origen hepático (HepG2 y Hep3B) productoras de transferrina, y de una línea que no la produce, de origen epitelial (HeLa), fueron transfectados con el plásmido p9, por el método de coprecipitación con fosfato de calcio. La actividad de cloranfenicol acetil transferasa fue ensayada en extractos obtenidos a partir de dichos cultivos utilizando como substratos (^{14}C)-cloranfenicol y acetil-coenzima A. Los productos de reacción fueron extraídos, junto con el cloranfenicol, en acetato de etilo y separados posteriormente por cromatografía en capa delgada, la que luego fue autorradiografiada. En las condiciones cromatográficas utilizadas, las placas reveladas muestran a partir de la posición de sembrado el (^{14}C) cloranfenicol como el soluto de menor migración; luego, si los extractos son activos, el producto acetilado en la posición 1 [1AcCm], luego el acetilado en la posición 3 [3AcCm] que es generalmente el principal

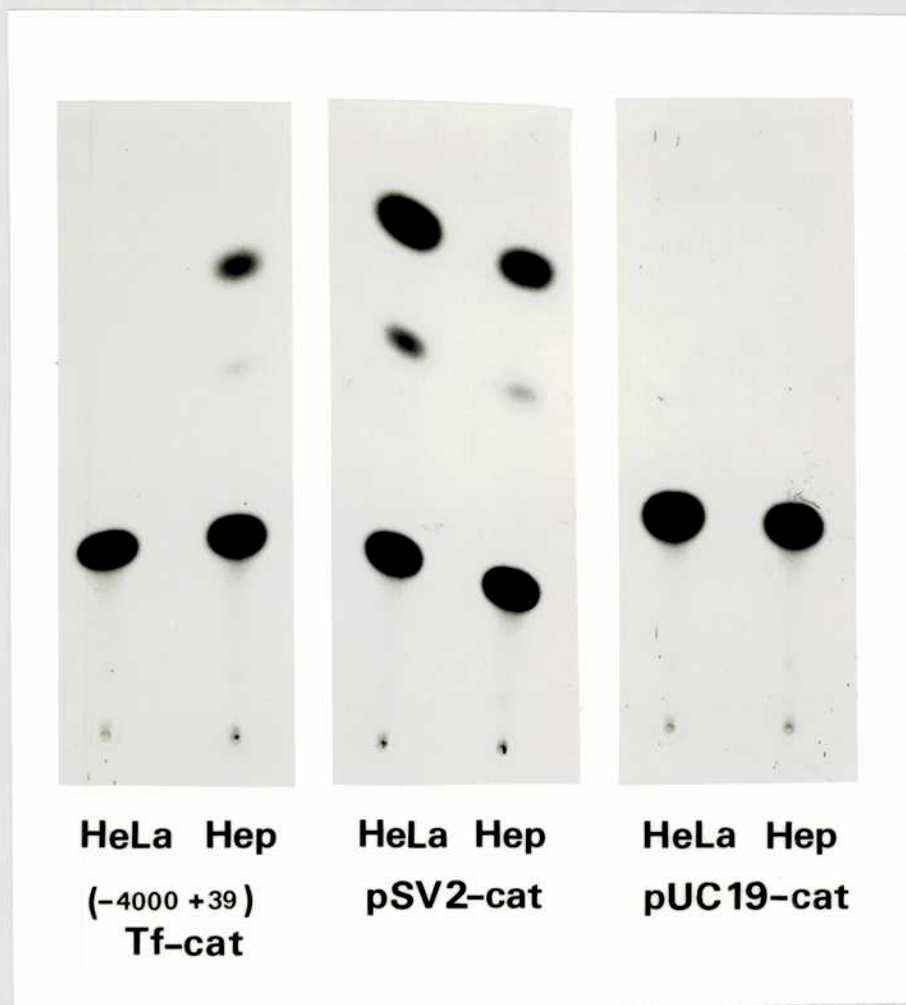
FIGURA 6



Plásmidos utilizados para la construcción del minigén mgTf-CAT

a):Plásmido pUC19CAT0; b) plásmido p4,7; c)plásmido p9.

Abreviaturas: (CAT): Secuencia estructural del gen CAT; (T) secuencia del intrón t de SV40; (t) sitio de poliadenilación del antígeno t de SV40, otras abreviaturas, ver figura 1.

FIGURA 7Análisis de la expresión del plásmido p9 por transfecciones transientes

Cultivos de células HeLa y HepG2 (marcado Hep en la figura) fueron transfectados con el vector que se indica y 10 μ g de extractos provenientes de estos cultivos fueron ensayados para determinar la actividad de CATsa como se describe en materiales y métodos. Como control de transfección positivo se utilizó el plásmido pSV2-CAT y como control de actividad de fondo pUC19-CAT0.

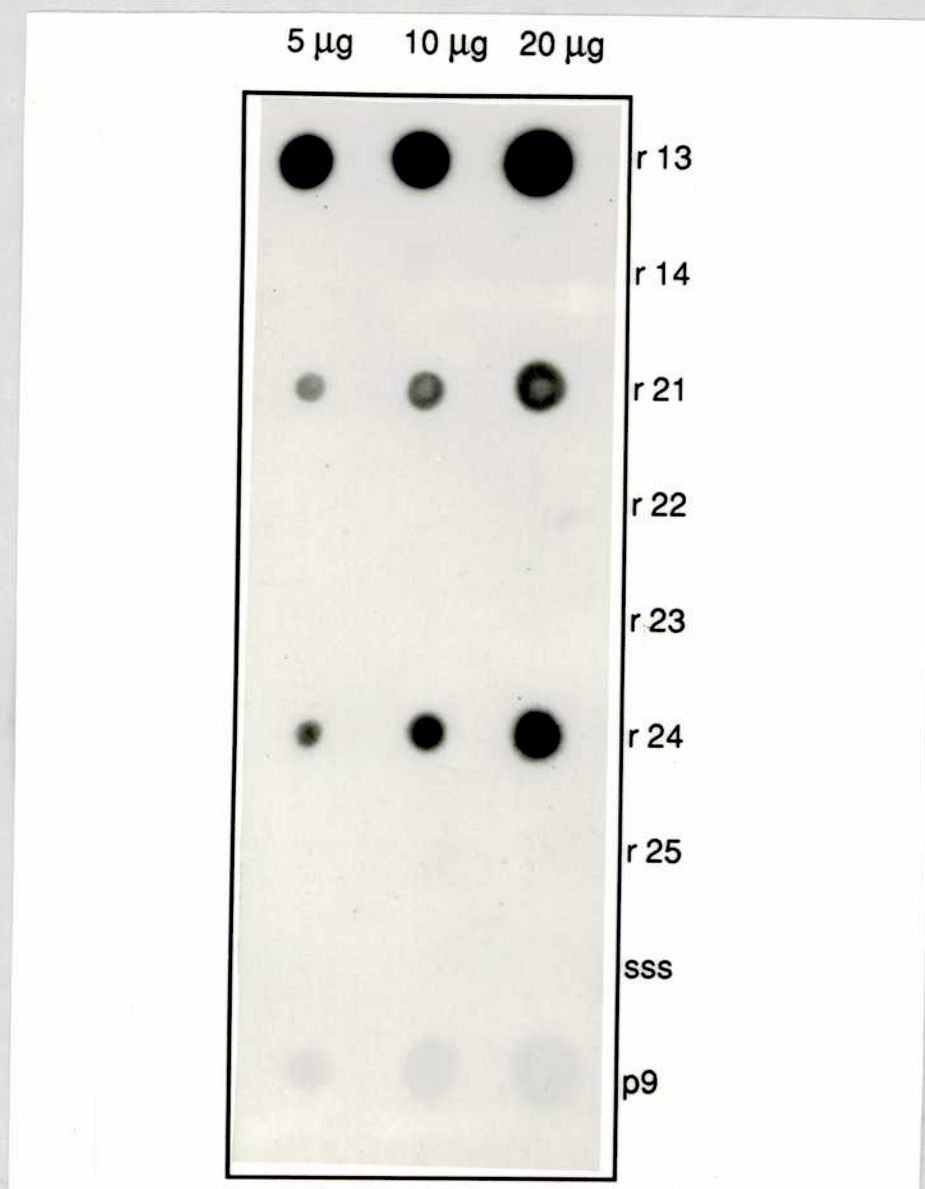
producto de reacción, y finalmente, para el caso de extractos muy activos, el producto diacetilado [1-3(Ac)₂Cm] como el de mayor Rf.

Las muestras provenientes de cultivos de células hepáticas presentaron la actividad enzimática en tanto que ella no se evidenció en las provenientes de células HeLa, demostrando que el fragmento de 4 kbp de la transferrina (-4000/+39) es capaz de proveer los elementos promotores necesarios para la expresión tejido específica del gen bacteriano CAT. Como se puede ver en la figura 7 la actividad promotora del fragmento de transferrina (-4000/+39) es de alrededor de un cuarto de la que presenta el promotor de SV40 en los cultivos de hepatoma, que también se expresa en HeLa; como nivel cero de actividad transcripcional se tomó la actividad detectada a partir de transfecciones del vector pUC19-CAT0 que no posee ningún promotor.

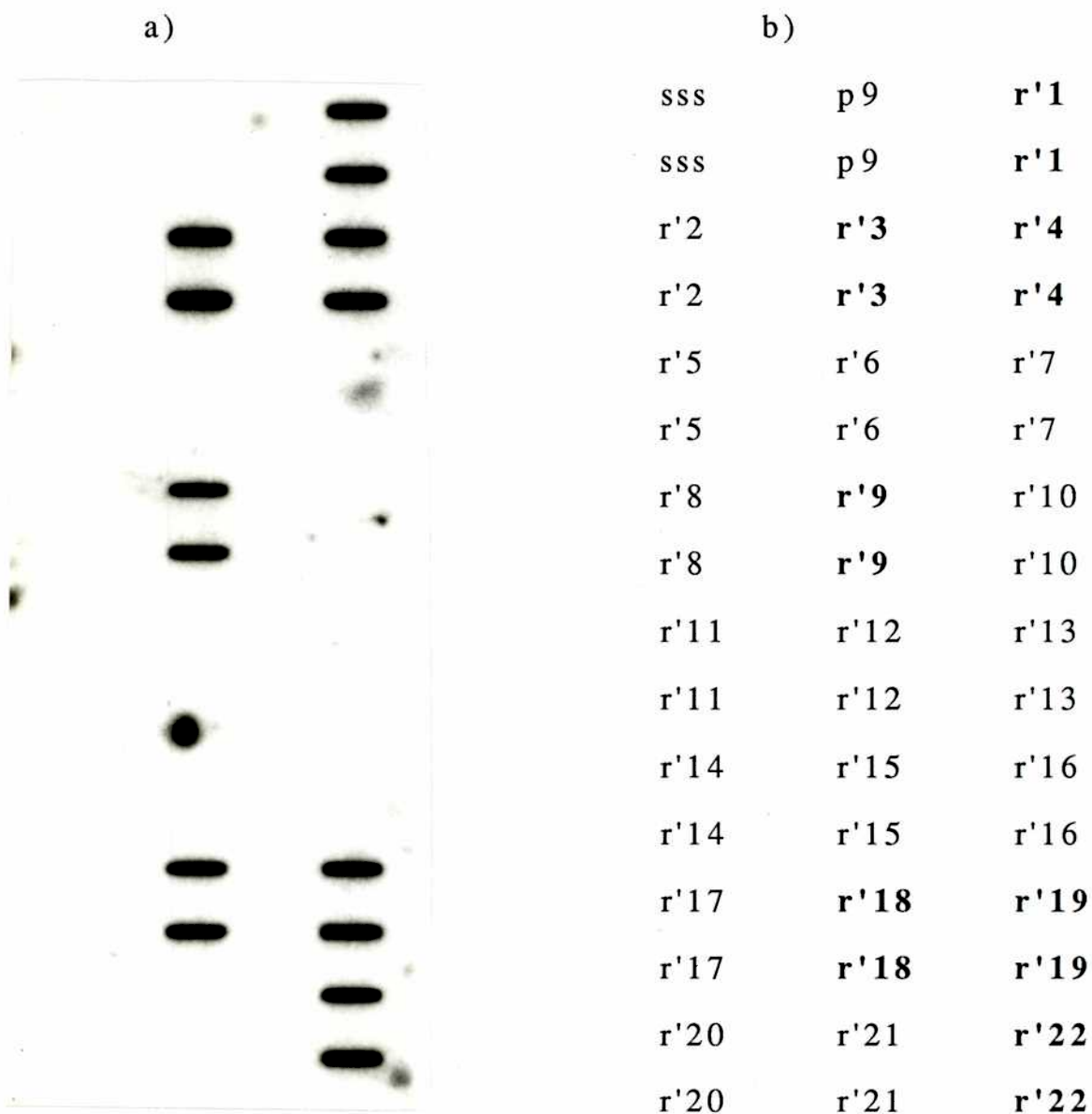
El plásmido p9 fue linearizado por un corte con *Kpn* I (fig 6a) y el minigén mgTf-CAT fue purificado y microinyectado en aproximadamente 500 huevos de ratón los que fueron implantados como se describe en materiales y métodos; los embriones se dejaron desarrollar hasta término. A las crías de 15 a 30 días de edad se les cortó un trozo de cola del que se purificó el DNA utilizado para analizar si el minigén se insertó en el genoma. Cinco animales (ratones 13, 21, 24, 47 y 82) evidenciaron la presencia del transgen integrado sobre un total de 31 ratones nacidos de huevos inyectados. La figura 8 corresponde a un ensayo en el que, por el método del "dot blot", se identifican tres muestras pertenecientes a animales transgénicos (ratones 13, 21 y 24) .

El número de copias del minigén mgTf-CAT integradas por genoma se determinó a partir del cociente de la radioactividad retenida por las distintas muestras positivas para el ensayo de "dot-blot" respecto de testigos del plásmido p9 diluidos a una copia por genoma (considerando el genoma de mamíferos de 3×10^9 bp). Los animales transgénicos llevaron incorporadas entre 4 a 8 copias (ratón 21) y 150 a 250 (ratón 13).

Los ratones 13, 47 y 82 fueron cruzados con animales salvajes (los otros dos se perdieron antes de establecer la cepa) y los ratones transgénicos de la primera generación (F1) fueron identificados por el método de "dot blot". En todos los casos el número de copias se

FIGURA 8Ensayo de hibridización puntual DNA de ratones

Tres depósitos de 5, 10 y 20 µg de DNA fueron hechos por cada muestra de DNA obtenido a partir de animales provenientes de huevos microinyectados con el minigén mgTf-CAT. La hibridización se realizó como se describe en materiales y métodos, con una sonda de pUC19-CAT0 (fig. 3a) marcada con una actividad específica de $4,1 \times 10^8$ dpm/µg de DNA. Las muestras r13 a r25 indican depósitos de DNA de los ratones r13 a r25; SSS : DNA sonicado de esperma de salmón y p9: DNA del plásmido p9 (fig 3c) en dilución equivalente a una copia por genoma de ratón, utilizando como "carrier" DNA sonicado de esperma de salmón.

FIGURA 9

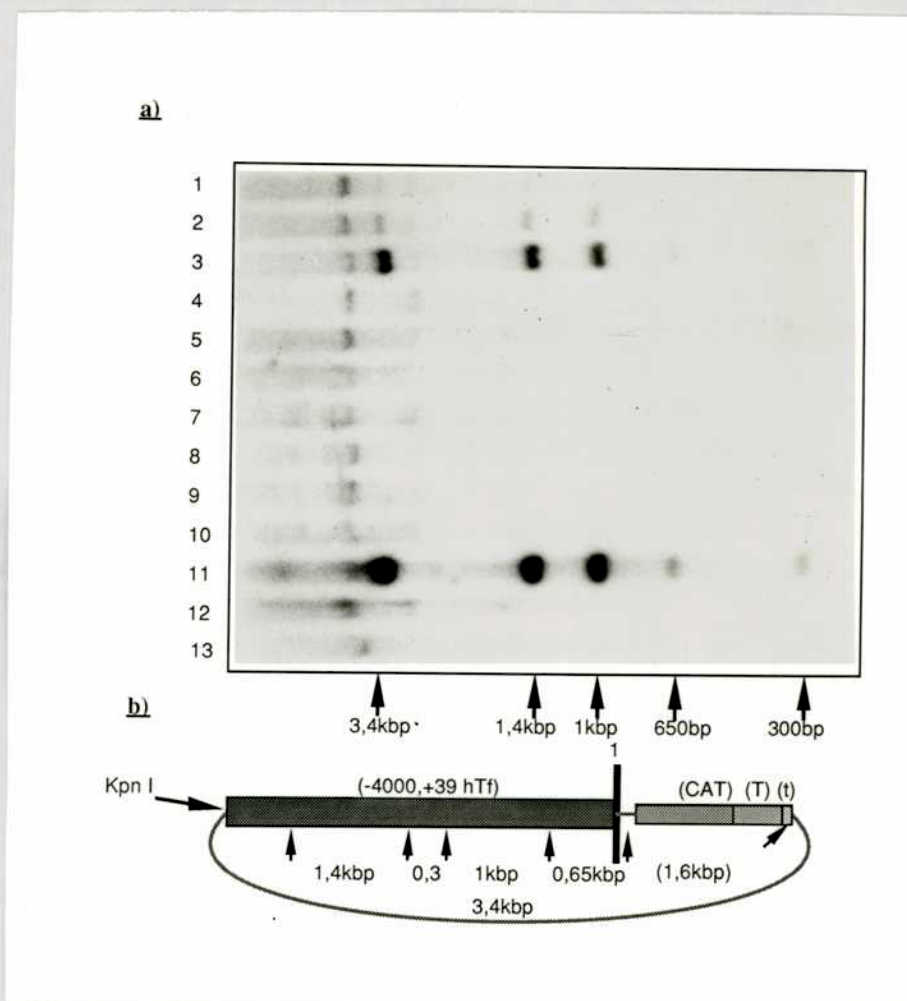
Análisis por hibridación puntual de la progenie del
ratón 13 (F₁13)

a) Dos depósitos de 10 μg de DNA de cada ratón fueron analizados por el método de hibridación puntual utilizando como sonda el plásmido p9 marcado a $2,8 \times 10^8$ dpm/ μg de DNA. En la tabla b) se muestra la disposición de los depósitos de la parte a) de la figura. En negrita se indican las muestras que fueron identificadas como positivas. Las abreviaturas son las indicadas en la figura 4.

mantuvo constante dentro de cada cepa como se puede ver para la progenie del ratón 13 (F1₁₃) en la figura 9. El mapeo de restricción realizado por el método de Southern muestra que las bandas obtenidas a partir de DNA de animales transgénicos son todas de la misma talla que las correspondientes al plásmido p9 usado como control (fig 10). Esto sugiere que la integración de las múltiples copias se realizó "en tandem" y probablemente en un único sitio ya que en ningún caso se visualizaron fragmentos diferentes correspondientes a los extremos de la inserción.

Animales de las distintas cepas fueron disecados y se prepararon extractos proteicos de hígado con el objetivo de estudiar la expresión del minigén mgTf-CAT, a través de la actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa. En ningún caso se pudo detectar la actividad enzimática (fig 11). Tampoco fue posible identificar, por el método Northern, la presencia del mensajero correspondiente (dato no mostrado). Estas evidencias sugieren que el transgen no se expresa en los animales obtenidos.

Actualmente se sigue intentando la obtención de animales que expresen correctamente un transgén hTf a partir de distintas construcciones que carecen de secuencias plasmídicas. La obtención de éstos permitirá encarar los estudios de regulación de la expresión de la hTf en distintos tejidos para diferentes etapas del desarrollo.

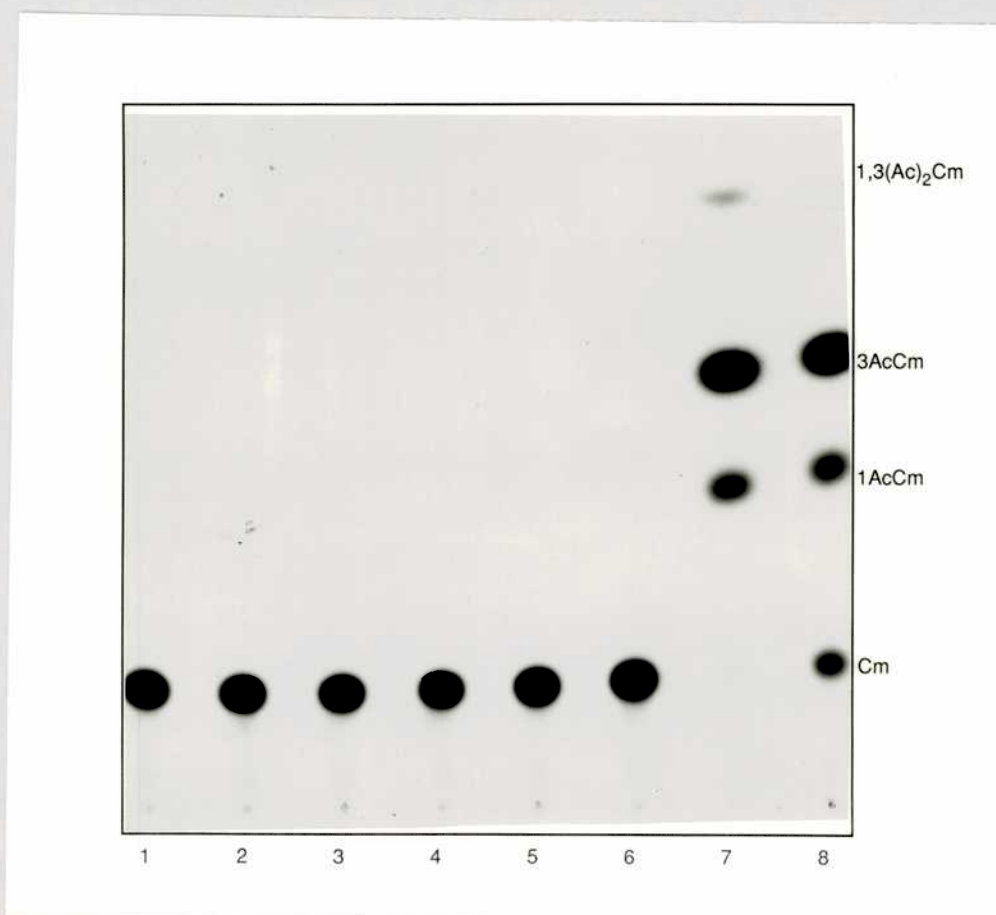
FIGURA 10

a) Análisis del patrón de restricción del DNA de los animales transgénicos

El DNA de los ratones, cortado con la enzima *Hind* III, fue procesado por el método de Southern. Muestras 1) y 2): DNA del plásmido p9, equivalente a 1 y 5 copias por genoma respectivamente; 3) a 5): DNA de los ratones r82, r83 y r84; 6) a 10): DNA de r40 a r44; 11) a 13): DNA de los ratones r'1, r'2 y r'6 de la progenie de r13 (F1r13). La sonda utilizada fue el fragmento *Eco*R I/*Bam*H I (-4000/+600 fig 3b) del plásmido p4,7 marcado por polimerización al azar a 2×10^9 dpm/ μ g de DNA

b) Mapa de restricción *Hind* III del plásmido p9

Las flechas indican los sitios de corte *Hind* III; *Kpn* I indica el sitio de linearización del minigén mgTf-CAT inyectado, otras abreviatures ver fig 4.

FIGURA 11Análisis de actividad de la enzima CATsa

Los extractos protéicos fueron obtenidos a partir de hígados de animales transgénicos y los ensayos de actividad de CATsa se realizaron como se describe en materiales y métodos. Muestras 1) a 6): 100 µg de extractos provenientes de los animales F1₁₃ r'1, r'3, r'4 y r'20 y de los animales F1₈₂ r'1 y r'3; muestra 7): Células HepG2 transfectadas con el plásmido p9 y muestra 8): 100 µg de extracto proveniente del animal r'20 F1₁₃ y 10 µg de extractos transfectados con el plásmido p9. Abreviaturas: Ac: Acetil; Cm: Cloramfenicol.

RESULTADOS II

Capítulo I

Identificación de elementos cis y trans de la región 5' del gen de la hTf

INTRODUCCION

La complementación de los métodos *in vivo* con las técnicas *in vitro* ha permitido estudiar más profundamente las regiones que se determinan como funcionalmente activas en experimentos de transfecciones transitorias. Como se mencionó anteriormente las técnicas de "foot print" y de geles de retardamiento de DNA permiten identificar factores protéicos presentes en distintos tejidos que reconocen ciertas zonas de las regiones funcionales, así como estudiar algunas de sus características.

En esta parte del trabajo se aplicaron precisamente estas metodologías para definir una región funcionalmente activa del gen humano de la transferrina, para identificar regiones de reconocimiento de proteínas nucleares, así como para realizar una breve caracterización de estos factores. En este capítulo se describe la identificación de una región de 650 bp que dirige la expresión tejido específica del gen de la hTf, y de una serie de factores nucleares que interactúan con ciertos elementos de esta secuencia, así como una caracterización inicial de dichos factores.

RESULTADOS

1) Estudio de la región promotora

Los resultados obtenidos con los diferentes genes estudiados hasta el momento indican que los elementos necesarios y suficientes para su expresión se encuentran ubicados en una región de alrededor de

200 bp o aun menor, adyacente al sitio de iniciación de transcripción (cap). Dicha región es la que se denomina "región promotora" y los elementos cis que en ella se encuentran son comunmente llamados "elementos promotores". Otra observación generalizada es que en la región de 500 bp hacia el extremo 5' del sitio "cap" se encuentran otros elementos reguladores de la transcripción. Por su posición se supone que éstos interactúan directamente en la formación del complejo de iniciación transcripcional, que incluye a la RNA polimerasa II como elemento fundamental en el caso de los genes de clase II o B.

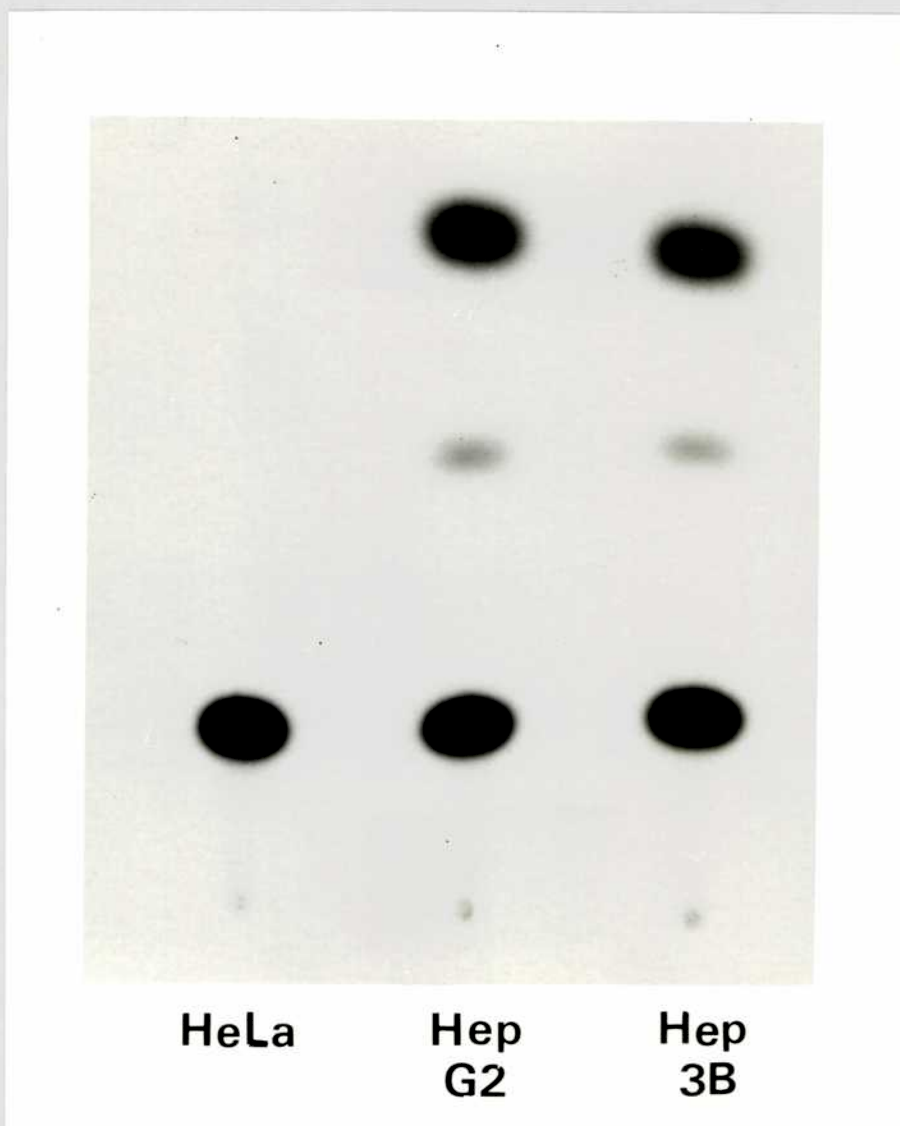
Como se vió en el capítulo anterior la región de 4000 bp hacia el extremo 5' del sitio de iniciación de transcripción del gen de la hTf contiene la información necesaria para dirigir la expresión tejido específica del gen CAT en experimentos de transfecciones transientes. La dificultad de estudiar esta región debido al tamaño de la secuencia a analizar así como las evidencias comentadas anteriormente sugirieron la posibilidad de precisar más la región necesaria para la expresión, por lo que se decidió la construcción de un vector más pequeño. A partir del p9 se construyó otro plásmido conteniendo delante del gen CAT una región de 651 bp de la hTf.

Para construir dicho vector se aprovechó la presencia de un sitio de restricción *Hind* III a -620 bp de la secuencia 5' de la hTf presente en el vector p9 (figuras 6 y 10). En consecuencia se digirió este vector con la enzima, los extremos obtenidos se hicieron romos con DNA polimerasa I y posteriormente se recortó el ADN con *Bam*H I. El fragmento obtenido se insertó entre los sitios *Bam*H I y *Sma* I del plásmido pUC19-CAT0 (fig 6a), y el recombinante, identificado por su mapa de restricción, fue purificado.

El plásmido obtenido, p(-620/+39)CAT, fue transfectado en células HeLa, HepG2 y Hep3B. La actividad de cloranfenicol. acetil transferasa fue ensayada en extractos obtenidos a partir de dichos cultivos utilizando como substratos (¹⁴C)-cloranfenicol. y acetil-coenzima A.

Los extractos provenientes de cultivos de hepatoma transfectados fueron capaces de acetilar el cloranfenicol., indicando que el gen bacteriano se expresa en este caso, como se muestra en la figura 12. Esto significa que en la región proximal de 650 bp estan contenidos los elementos promotores necesarios para permitir la expresión del gen

Figura 12



Ensayos de actividad CATsa de extractos provenientes de cultivos transfectados con el plasmido (-620/+39)Tf-CAT

Cultivos de células HeLa HepG2 y Hep3B fueron transfectados con el vector (-620/+39)Tf-CAT y 30 μ g de extractos provenientes de estos cultivos se ensayaron para determinar la actividad de CATsa como se describe en materiales y métodos.

CAT, empleando los factores transcripcionales presentes en las células hepáticas.

La cuantificación del nivel de actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa determinado para las transfecciones del plásmido p(-620/+39)Tf-CAT fue aproximadamente del 50 % del observado para la construcción p9 [(-4000/+39)Tf-CAT] en condiciones similares en varios ensayos, lo que pone en evidencia que dentro de la secuencia que va de -4000 a -620 se encuentra un elemento o varios elementos que en su conjunto actúan como un activador de la transcripción.

Otra observación resultante de las transfecciones fue que cuando éstas se hicieron sobre células HeLa los extractos obtenidos a partir de ellas no mostraron una actividad significativa de la enzima marcadora, con respecto a los ensayos realizados con el plásmido pUC19-CAT0, en tanto que las transfectadas con un control positivo pSV2-CAT expresaron altos niveles de actividad enzimática. Esto implica que los elementos presentes en el plásmido p(-620/+39)CAT son suficientes para dirigir una expresión tejido específica, al menos en lo que respecta a la discriminación entre las células HeLa y los hepatomas utilizados.

2) Identificación de factores nucleares hepáticos que interaccionan con la región 5' proximal de la hTf.

Habiendo precisado una región de 650 bp que incluye el promotor de la hTf y que es capaz de dirigir la expresión tejido específica en experimentos de transfecciones transientes, se decidió estudiar los factores que modulan esta expresión. La evidencia experimental acumulada indica que el mecanismo de iniciación de la transcripción implica la interacción de factores nucleares con secuencias específicas del ADN, las que se identifican como su sitio de reconocimiento. Cuando éstas son mutadas de manera de alterar dicha unión se altera también la transcripción del gen en cuestión, lo que indica su importancia dentro del mecanismo general.

El método de elección para este análisis fue determinar inicialmente los sitios de reconocimiento de dichos factores dentro de la

secuencia de la transferrina (-620/+39) que evidenció contener los elementos cis de ADN suficientes para dirigir una expresión tejida específica en células transfectadas. Para ello se implementó el método de improntas a la DNasa I, esta técnica se basa en la observación que una proteína unida a una secuencia de ADN impide, en ciertas condiciones, que esta sea cortada por la acción de la DNasa I pancreática (una endonucleasa de baja especificidad de secuencia de corte). Si el fragmento de ADN utilizado se encuentra marcado en un extremo, cuando se separan los fragmentos obtenidos en un gel de acrilamida desnaturizante se puede notar una región en la que no aparecen bandas. Esta región se identifica como la huella o impronta dejada por la proteína en la zona en que, unida al ADN, impidió que éste fuese cortado.

Debido a que la enzima utilizada presenta una baja especificidad de corte, se determina su patrón normal de clivaje en ausencia de proteínas nucleares. Para posicionarse dentro de la secuencia de ADN se realiza paralelamente la secuencia por modificación química del mismo fragmento marcado, generalmente por modificación de las purinas (secuencia A+G). Como fuente de proteínas se utilizaron extractos nucleares de hígado de rata o humano, o provenientes de células en cultivo. Los fragmentos de ADN estudiados fueron obtenidos por los cortes de restricción que se indican en la figura 13 y clonados en el vector pUC19 para facilitar su manipulación y marcado radioactivo.

La figura 14 muestra el experimento en que las sondas utilizadas fueron los fragmentos correspondientes a las regiones de 180 bp *Dde* I/*Dde* I (-150/+30) y la de 300 bp *Pst* I/*Nar* I (-310/-10). Se pueden identificar tres regiones protegidas o improntas. La más cercana al sitio "cap" se denominó PRI_{Tf} (región proximal I) cubriendo aproximadamente desde el nucleótido -76 hasta el -53 en la hebra superior (la que lleva la misma secuencia que el mensajero) y del -72 al -51 en la inferior (la que sirve de templado para el mRNA).

PRI_{Tf} o Región Proximal I

-076 **AACACGGGAGGTCAAAGATTGCGCCCA** -051
 -076 **TTGTGCCCTCCAGTTTCTAACGCGGGT** -051

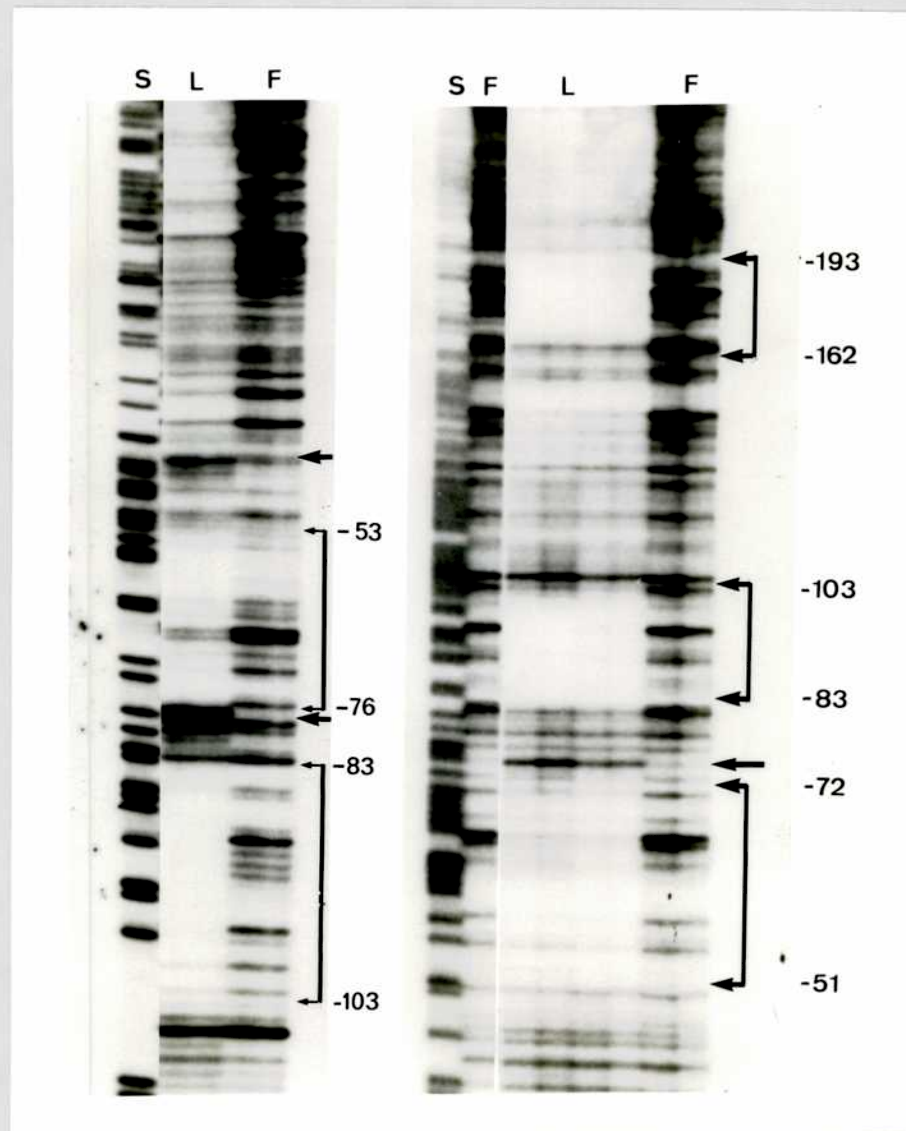
Figura 13Fragmentos de restricción de la región 5' del gen de la transferrina humana utilizados para los ensayos de determinación de improntas.

Los sondas utilizadas fueron obtenidas a partir de los fragmentos siguientes: 170 bp *Hinf* I-*Hinf* I (-650 a -480); 210 bp *Hind* III-*Pst* I (-615/-405); 331 bp *Dde* I-*Dde* I (-480/-150); 300 bp *Nar* I-*Pst* I (-310/-10) y 180 bp *Dde* I-*Dde* I (-150/+30). Dichos fragmentos fueron posteriormente clonados en el vector pUC19 para facilitar su marcado. Las sondas radioactivas correspondientes fueron obtenidas a partir de los recombinantes de pUC19 con los distintos fragmentos.

```

-660TCCCCTATGA
      Hinf I
-650CTCTGTCCCT AGTCTAAGGT GTCCACAGG AAGCTTGAGG GCGGGAAGTT
      Hinf I                               Hind III
-600TTCCAGCCCA GGAGCCTGAG CTCAGCGGGG CAGGAAGAGG GAGCAGCTCC
-550TCCGTGGGGG ACCTTTGAGA GCCCAGGAGC AGGATTTCGA GGGACAGGTG
-500GTGGGGAGCA AAAGGTGCTG AGTCTGTCTT TGACCTTGAG CCCAGCTTGT
      Dde I/Hinf I
-450TTCTCCTGCA TCCTCCCCCA AAAGGGCTTT GCCTGTCATT CTGCAGTTCT
      Pst I
-400AGTGTGGGGT CTGGGCGCAG TTCTTTTCCC TCTCCAGCCT CGGAGTCTTC
-350CTCTGTGGAC TGCAGCAGATA GACTGGTGG CACGGACCAG CTCTGCAGCC
      Pst I
-300TGGAGTCAGG AGCAGAGCCC CGGCTCCAGC CGCGTAGCCG CTCTGGCACC
-250GAGCGAGCCG GATGACAATG GCTGCATTGT GTTTCATGTC CCTTCCCATC
-200AACATTTCTG TGCTGGACTC CTTCCACTCG CGGGTCGTCT CCAGAGCTCA
      Dde I
-150GAAAATGAGG TGATCAGTGG GACGAGTAAG GAAGGGGGGT TGGGAGAGGG
      Dde I
-100GCGATTGGGC AACCCGGCTG CACAAACAG GGAGGTCAA GATTGCGCCC
-050AGCCCGCCCA GCGGGGAAT GGAATAAAG GACGCGGGGC GCCGGAGGCT
      Nar I
+01GCACAGAAGC GAGTCCGACT GTGCTCGCTGC TCAGCGCGCA CCCGGAAGATG
      DdeI
+51AGCCTGGCGCT GCGAGCGCTG CTCCTCTCGCG CCTCCTGGGT GAGTGCGGGCA

```


Figura 14

Identificación de las improntas PRI_{Tf} , $PRII_{Tf}$ y $DIRII_{Tf}$

Ensayos de deteminación de improntas realizados sobre los fragmentos de 180 bp *D deI-DdeI* (-150*/+30) y de 300 bp *Nar I-Pst I* (-310/-10*). La posición de la marca radioactiva se indica con un asterisco. S indica secuencia A+G, L Extractos de hígado humano y F corresponde al DNA libre.

La segunda región se denominó PRII_{Tf} (región proximal II) y cubre aproximadamente los nucleótidos que van del -103 hasta el -83. Dentro de esta se encuentra una secuencia (5' CCAAT 3') en la hebra inferior; este pentanucleótido es característico del sitio de reconocimiento de una familia de proteínas (Dorn y col. 1987; Hoof y col. 1987; Raymondjean y col. 1988) que actúan como factores de transcripción y cuya fijación se encuentra frecuentemente en la región promotora a alrededor de 80 bp hacia el extremo 5' del sitio cap, precisamente donde se ubica la región PRII_{Tf} .

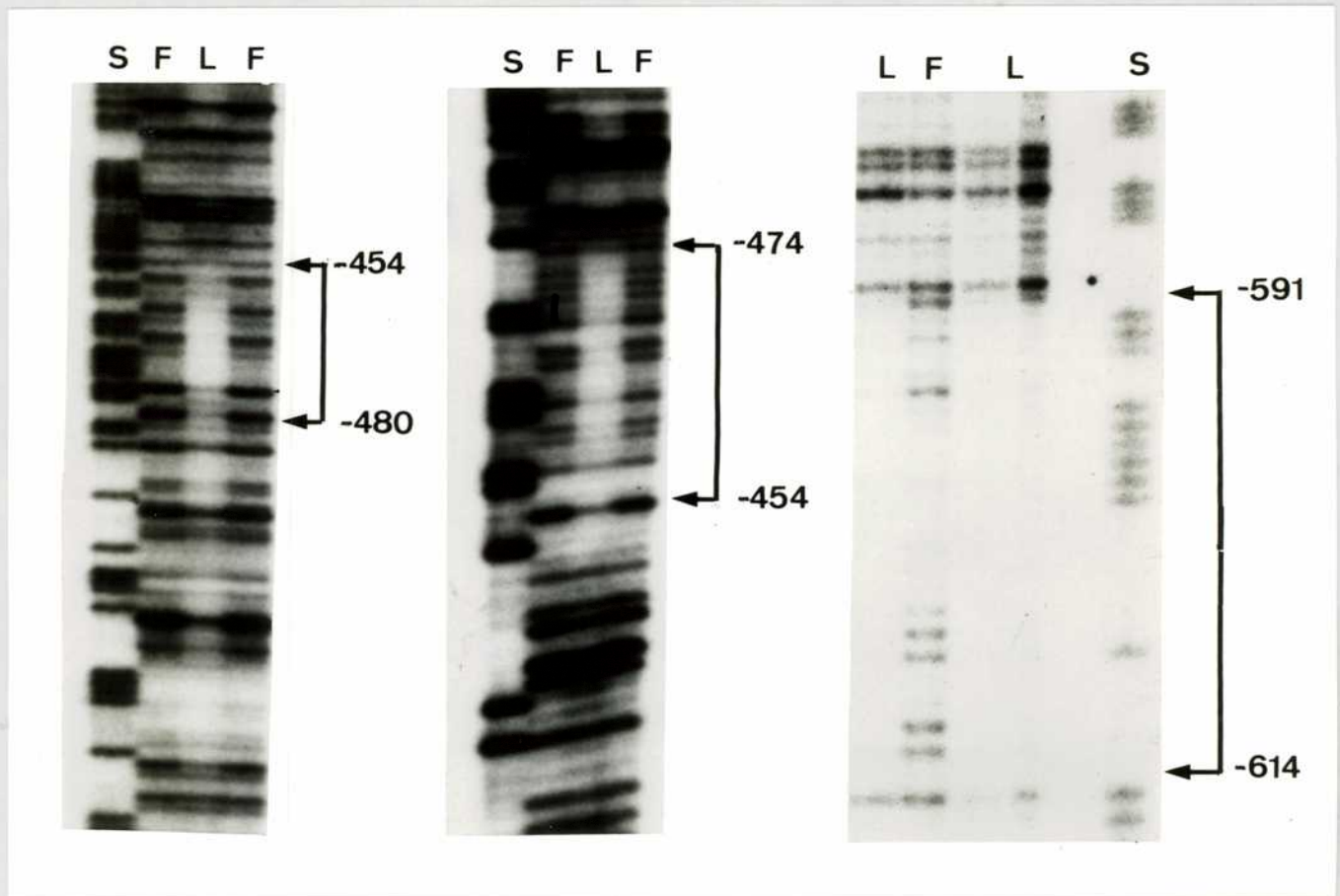
PRII_{Tf} o Región Proximal II
 -103 **GGGGCGATTGGGCAACCCGG** -83
 -103 **CCCCGCTAACCCGTTGGGCC** -83

Amen de las regiones PRI y PRII una tercera impronta fue identificada entre los nucleótidos -193 y -162, esta fue llamada CR_{Tf} por región central. Comparando las improntas obtenidas con los sitios de fijación de factores de transcripción conocidos se identificó una alta homología dentro de la región central con el sitio de reconocimiento de CTF/NF1 (Jones y col. 1985), un factor de la familia de proteínas que reconocen sitios CCAAT. La secuencia de reconocimiento consenso descrita en la literatura para NF1 es (5' TGG^A/_C N₅ GCCAAT 3') (Jones y col. 1987), en tanto que la identificada en CR_{Tf} compartiendo 8 de los 10 nucleótidos significativos es (5' TGGA N₅ TCCAAT 3')

CR_{Tf} o Región Central
 -193 **CTGTGCTGGACTCCTTCCACTCGCGGGTCTGTC** -162
 -193 **GACACGACCTGAGGAAGGTGAGCGCCAGCAG** -162

Entre las posiciones -28 y -23 se encuentra una secuencia (5' AATAAA 3') que por su ubicación teóricamente debería ser un sitio de reconocimiento para el factor TATA llamado TFIID o BTFA (Bucher y col. 1986; Reimberg y col. 1987) encargados de posicionar el complejo de iniciación de la transcripción. Significativamente esta región no se encontró protegida por extractos hepáticos .

Otra zona protegida fue identificada utilizando sondas correspondientes al fragmento de restricción *Dde* I/*Dde* I de -481 a -150

Figura 15

Identificación de la improntas $DRIT_f$ y $DRIIIT_f$

Ensayos de deteminación de improntas realizados sobre el fragmento de 210 bp *Hind* III-*Pst* I (-615/-405) marcado en ambos extremos y sobre el fragmento de 170 bp *Hinf* I-*Hinf* I (-650 a -480) marcado en la hebra inferior como se explica en materiales y métodos. S indica secuencia A+G, L Extractos de higado humano y F corresponde al DNA libre.

o al fragmento *Hind* III/*Pst* I que va de -615 a -405. La zona fue llamada DRI_{Tf} (región distal I) y cubre aproximadamente los nucleótidos -480 a -454 como se ve en la figura 15. Un primer análisis comparativo entre las distintas improntas permitió identificar dentro de esta región una secuencia de 10 nucleótidos idéntica a otra que se encuentra en PRI_{Tf} en la otra hebra. La secuencia (5' TCTTTGACCT 3'), se encuentra en la hebra superior dentro de DRI_{Tf} y en la inferior dentro de PRI_{Tf} .

DRI_{Tf} o Región Distal I

-480 **AGTCTGTCTTTGACCTTGAGCCCAGCT**-454
 -480 **TCAGACAGAACTGGAACCTCGGGTCGA**-454

PRI_{Tf} o Región Proximal I

-076 **AACACGGGAGGTCAAAGATTGCGCCCA**-051
 -076 **TTGTGCCCTCCAGTTTCTAACGCGGGT**-051

Finalmente una quinta región fue identificada entre los nucleótidos -614 y -591 utilizando un fragmento *Hinf* I/*Hinf* I que va de -650 a -480 (figura 15); esta zona fue llamada $DRII_{Tf}$ (región distal II). Dentro de esta región se identificó un módulo GC (5' GGGCGG 3'), descrito como sitio de reconocimiento del factor Sp1 (Gidoni y col. 1985).

$DRII_{Tf}$ o Región Distal II

-614 **GAGGGCGGGAAGTTTTCCAGCCCA**-591
 -614 **CTCCCGCCCTCAAAGGTCTCGGGT**-591

Las cinco secuencias identificadas fueron protegidas tanto por extractos nucleares de hígado humano o de ratón como por los provenientes de hepatomas. En la figura 16 se muestra la secuencia total analizada y las improntas que se determinaron.

3) Experimentos realizados con extractos nucleares de células HeLa.

El mismo protocolo experimental fue utilizado para determinar la presencia de proteínas que se unen a secuencias específicas del gen de la hTf en extractos nucleares de células HeLa como control no hepático.

Figura 16Secuencia total analizada

TCCCCTATGA -651
AGGGGATACT

CTCTGTCCCT AGTCTAAGGT GTCCACAGG AAGCTT**GAGG GCGGGAAGTT** -601
GAGACAGGGA TCAGATTCCA CAGGGTGTCC TTCGAA**CTCC CGCCCTTCAA**

TTCCAGCCCA GGAGCCTGAG CTCAGCGGGG CAGGAAGAGG GAGCAGCTCC -551
AAGGTCCGGT CCTCGGACTC GAGTCGCCCC GTCCTTCTCC CTCGTGAGG

TCCGTGGGGG ACCTTTGAGA GCCCAGGAGC AGGATTTGGA GGGACAGGTG -501
AGGCACCCCC TGGAAACTCT CGGGTCTCTG TCCTAAAGCT CCCTGTCCAC

GTGGGGAGCA AAAGGTGCTG **AGTCTGTCTT TGACCTTGAG CCCAGCTTGT** -451
CACCCCTCGT TTTCCACGAC TCAGA**CAGAA ACTGGAACTC GGGTCGAACA**

TTCTCCTGCA TCCTCCCCCA AAAGGGCTTT GCCTGTCATT CTGCAGTTCT -401
AAGAGGACGT AGGAGGGGGT TTTCCCGAAA CGGACAGTAA GACGTCAAGA

AGTGTGGGGT CTGGGCGCAG TTCTTTTCCC TCTCCAGCCT CGGAGTCTTC -351
TCACACCCCA GACCCGCGTC AAGAAAAGGG AGAGGTCCGA GCCTCAGAAG

CTCTGTGGAC TGCGCAGATA GGACTGGTGG CACGGACCAG CTCTGCAGCC -301
GAGACACCTG ACGCGTCTAT CCTGACCACC GTGCCTGGTC GAGACGTCGG

TGGAGTCAGG AGCAGAGCCC CGGCTCCAGC CGCGTAGCCG CTCTGGCACC -251
ACCTCAGTCC TCGTCTCGGG GCCGAGGTCG GCGCATCGGC GAGACCGTGG

GAGCGAGCCG GATGACAATG GCTGCATTGT GCTTCATGTC CCTTCCCATC -201
CTCGCTCGGC CTACTGTTAC CGACGTAACA CGAAGTACAG GGAAGGGTAG

AACATTT**CTG TGCTGGACTC CTCCACTCG CGGGTCGTC** CCAGAGCTCA -151
TTGTAAA**GAC ACGACCTGAG GAAGGTGAGC GCCAGCAGA** GGTCTCGAGT

GAAAATGAGG TGATCAGTGG GACGAGTAAG GAAGGGGGGT TGGGAGAG**GGG** -101
CTTTTACTCC ACTAGTCACC CTGCTCATT CTTCCCCCA ACCCTCT**CCC**

GCGATTGGGC AACCCGGCTG CACA**AACAGG GGAGGTCAAA GATTGCGC**CC -51
CGCTAACCCG TTGGGCCGAC GTGTTT**TGC CCTCCAGTT CTAACGGGG**

AGCCCGCCA GCGGGGAAT GGAATAAAG GACGCGGGG GCCCGAGGCT-1
TCGGGCGGGT CCGCCCTTA CCTTATTTCC CTGCGCCCCG CGGCCTCCGA

+GCACAGAAGCGAGTCCGACT+GTGCTCGCTGCTCAGCGCG+CACCCGGAAGAT+50
+CGTGTCTTCGCTCAGGCTGA+CACGAGCGACGAGTCGCGC+GTGGGCCTTCTA

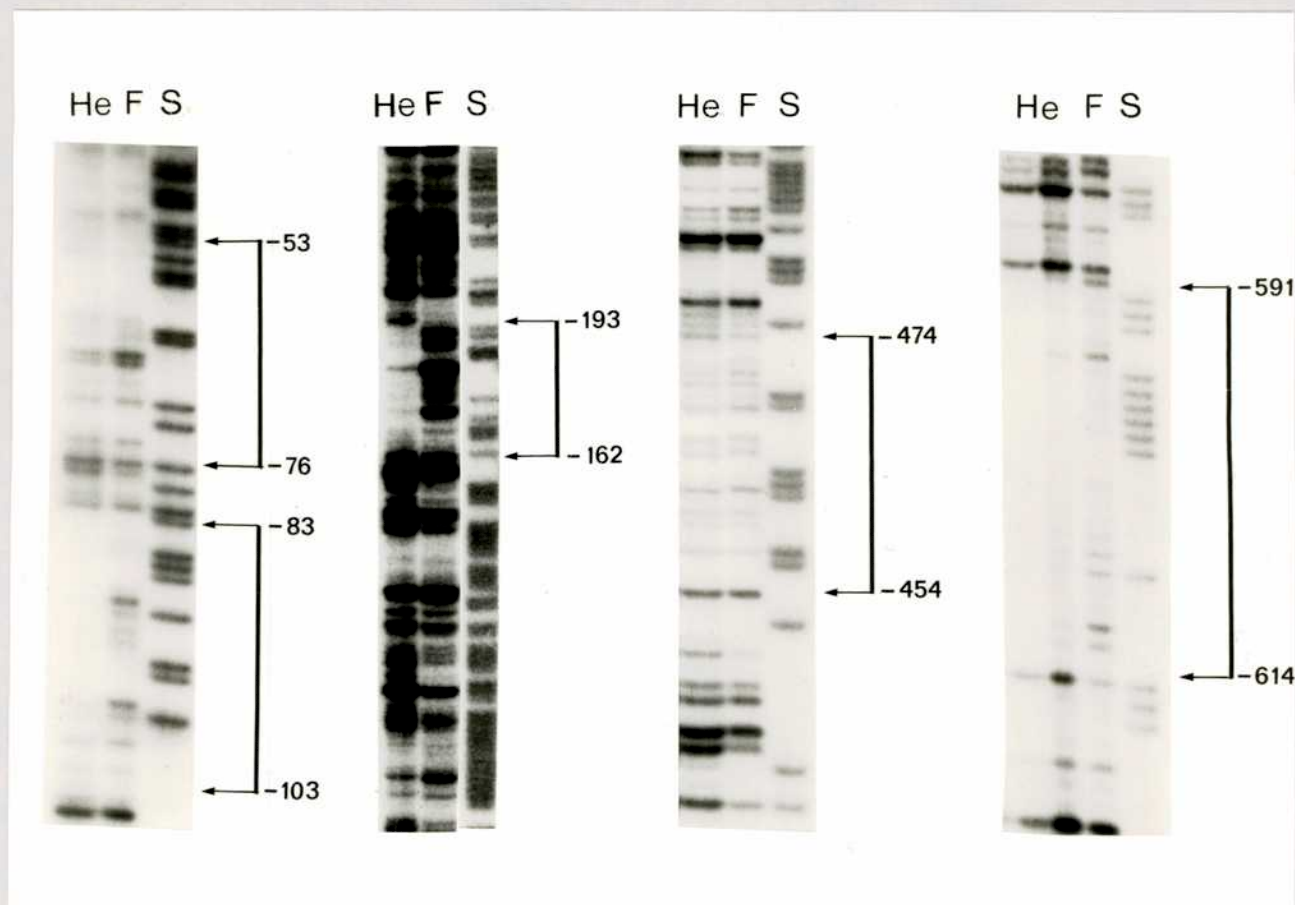
La figura 17 muestra los resultados obtenidos. Las regiones $PR_{II}T_f$, CR_{T_f} y $DR_{II}T_f$ fueron protegidas por los extractos de células HeLa, en tanto que las regiones $PR_{I}T_f$ y $DR_{I}T_f$ no presentaron diferencias significativas con el control realizado digiriendo con DNAsa I en ausencia de proteínas. Esto sugiere que las diferencias observadas en las transfecciones del plásmido p(-620/+39)CAT podrían deberse a factores hepáticos que se fijan sobre los sitios $PR_{I}T_f$ y $DR_{I}T_f$, factores ausentes o inactivos en los extractos nucleares de células HeLa.

La región correspondiente a la secuencia similar a la caja "TATA", entre los nucleótidos -28 y -23, tampoco fue protegida por los extractos nucleares de células HeLa.

4) Caracterización de los factores que reconocen las secuencias determinadas.

La única característica conocida de los factores que determinaban las improntas era la secuencia que protegían en el ensayo de "foot print" y por lo tanto dicha secuencia era el único elemento para identificarlas y estudiarlas. Esta razón llevó a implementar el método de geles de retardamiento de ADN que permite identificar proteínas que se unen al ADN tan solo por esta característica.

El método se basa en la observación que en condiciones electroforéticas de baja fuerza iónica el complejo formado entre una o varias proteínas que reconocen una secuencia dada y el ADN que contiene dicha secuencia es estable. Además este complejo presenta una migración característica y distinta de la del ADN libre. Esto implica que, empleando sondas marcadas radioactivamente, es posible identificarlo. La técnica que se aplicó utiliza oligonucleótidos pequeños, que presentan la ventaja de formar complejos más estables y de migrar libres mucho más rápido que unidos a proteínas; en estas condiciones se observa un retardamiento del ADN radioactivo en presencia de los extractos identificandose así la posición del complejo formado entre la o las proteínas y el oligonucleótido radioactivo.

Figura 17

Identificación de improntas con extractos HeLa.

Ensayos de deteminación de improntas realizados sobre los fragmentos marcados (la posición de la marca radioactiva se indica con un asterisco) de 180 bp *Dde* I-*Dde* I (-150*/+30), de 300 bp *Nar* I-*Pst* I (-310/-10*), de 210 bp *Hind* III-*Pst* I (-615/-405*) y de 170 bp *Hinf* I-*Hinf* I (-650*/-480) como se explica en materiales y métodos. **S** indica secuencia A+G, **H** extractos de células HeLa y **F** corresponde al DNA libre.

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados según las secuencias identificadas por "foot print" para las regiones PRI, PRII, DRI y DRII. La región central CR_{Tf} no fue estudiada en este capítulo (ver más adelante), prefiriéndose focalizar los esfuerzos en las otras regiones. Cada hebra sintetizada fue separadamente purificada e hibridizada con el oligonucleótido complementario para obtener las sondas que se muestran a continuación (los extremos de los fragmentos de ADN se hicieron complementarios de manera de poderlos utilizar ligados para otro tipo de manipulaciones).

Oligonucleótidos utilizados

PRI_{Tf}

ACAAACACGGGAGGTCAAAGATTGCGCCCAG
TGTGCCCTCCAGTTTCTAACGCGGGTCTGTT

PRII_{Tf}

GAGGGGCGATTGGGCAACCCGGC
CCGCTAACCCGTTGGGCCGCTCC

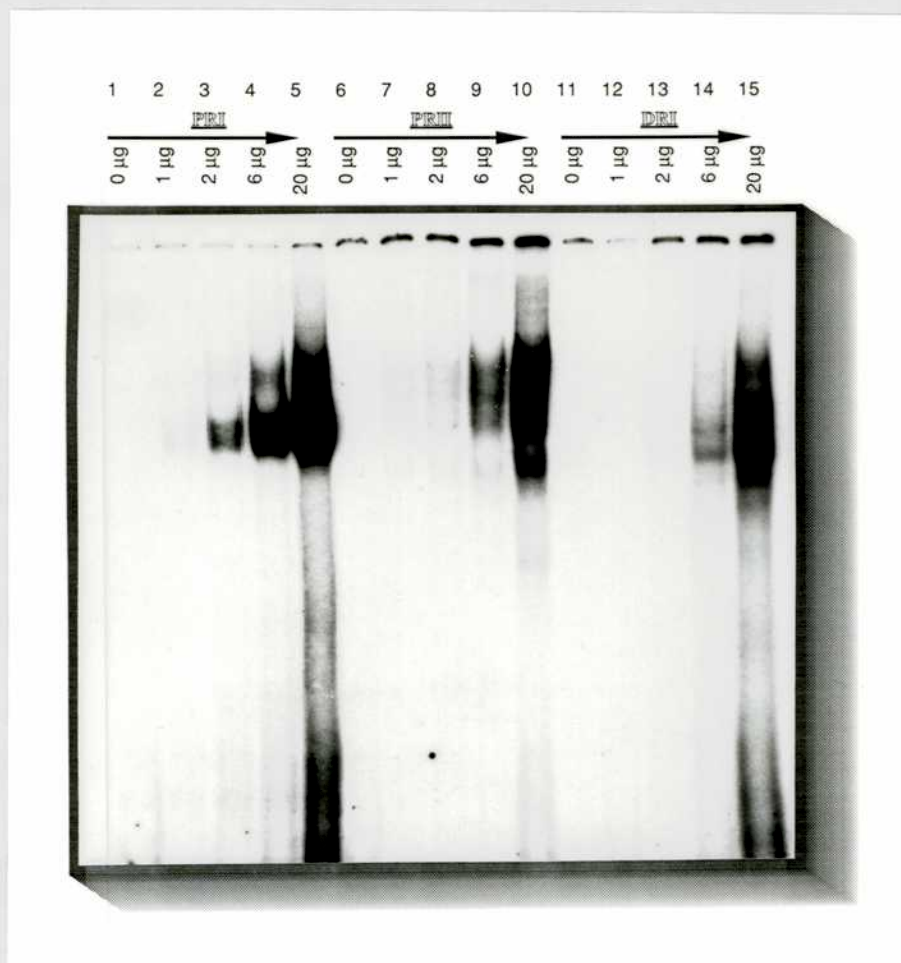
DRI_{Tf}

AGTCTGTCTTTGACCTTGAGCCC
ACAGAAACTGGAACCTCGGGTCAG

DRII_{Tf}

GCTTGAGGGCGGGAAGTTTTCCAGCCCAGG
CTCCCGCCCTTCAAAGGTCGGGTCCCGAA

Estas fueron posteriormente marcadas con ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP utilizando la T4 polinucleótido quinasa y repurificadas. Cada oligonucleótido es incubado con el extracto a analizar en un tampon de reconocimiento que incluye competidores no específicos. Luego de la incubación cada muestra se deposita sobre un gel no desnaturizante de poliacrilamida en tampon 0,25 x TBE y se las separa electroforéticamente. Los factores se visualizan en la autoradiografía del gel como bandas de menor migración que el ADN libre. Los competidores no específicos de doble cadena como poli(dI-dC)-poli(dI-dC), ADN de *E.coli* y de salmón, en una gran proporción respecto del oligonucleótido utilizado como sonda, son imprescindibles en el ensayo para competir con proteínas que unen ADN en forma inespecífica y que se encuentran en un gran exceso respecto del factor a estudiar, como por ejemplo las histonas.

Figura 18

Complejos obtenidos en geles de retardamiento para
PRI_{Tf}, PRII_{Tf} y DRI_{Tf}

Gel de retardamiento de DNA realizado con los oligonucleótidos marcados PRI_{Tf} (depósitos 1 a 5), PRII_{Tf} (6 a 10) y DRI_{Tf} (11 a 15) y con extractos de hígado de rata como se explica en materiales y métodos. Un ensayo se realizó con DNA libre (depósitos 1, 6 y 11) y otros con cantidades variables de proteínas: 1 µg (2, 7 y 12), 2 µg (3, 8 y 13), 6 µg (4, 9 y 14) y 20 µg (5, 10 y 15).

Cuando los cuatro oligonucleótidos preparados fueron ensayados por este método, todos fueron reconocidos por extractos provenientes de hígado o de hepatomas en cultivo. En la figura 18 se muestra un ensayo realizado con las sondas radioactivas PRI, PRII_{Tf} y DRI_{Tf} empleando distintas cantidades de proteínas. Se puede observar que los patrones de bandas de radioactividad retenidas para las diferentes sondas son distintos entre sí. Las bandas retenidas por el oligonucleótido DRI_{Tf} son de menor intensidad que las correspondientes a las otras sondas. (Para comparar con DRII_{Tf} ver figura 23.)

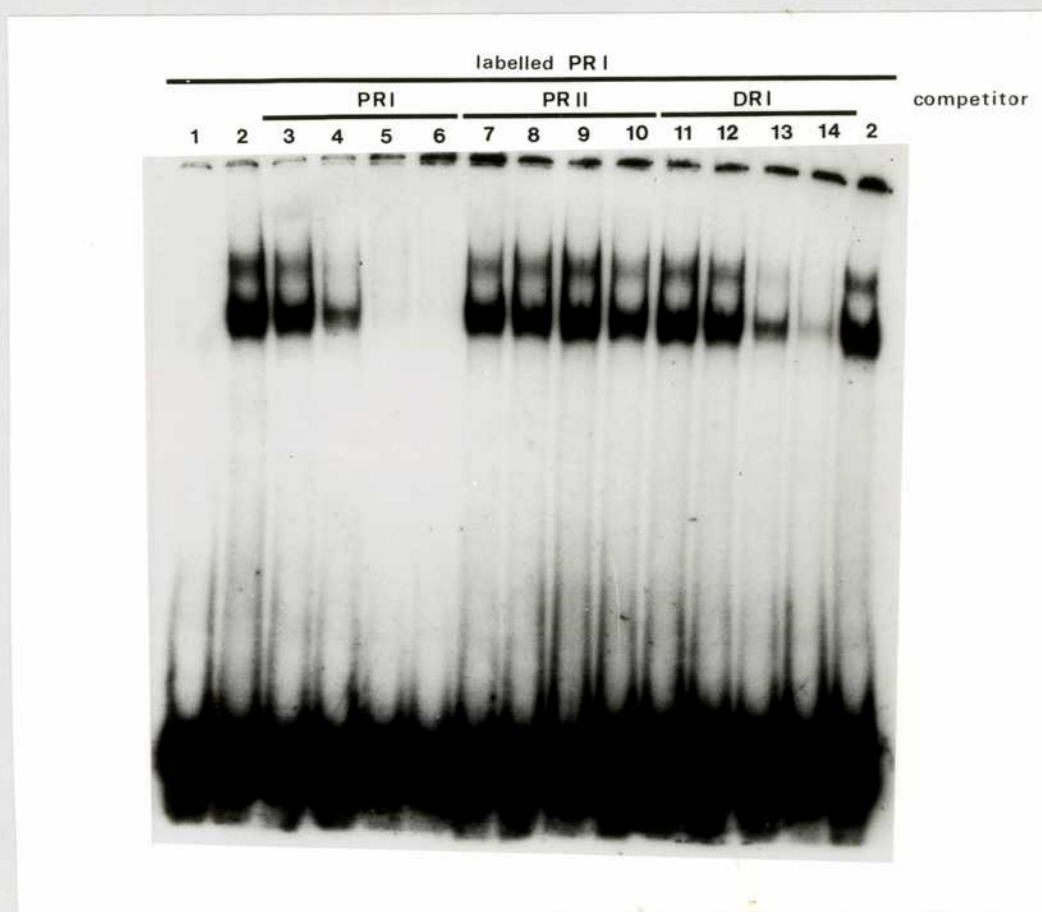
Realizando las reacciones de reconocimiento a distintas temperaturas antes de depositar las muestras en los geles se observó que para los cuatro oligonucleótidos ensayados la unión fue óptima a 0-4°C. Cuando la incubación se realiza a 20°C la radioactividad retenida de los oligonucleótidos PRI y DRI_{Tf} es menor que a 4°C y desaparece totalmente a 37°C. En los casos de PRII_{Tf} y DRII_{Tf} el complejo llega a formarse, aunque con menor eficiencia, aun a 65°C.

La formación de los complejos correspondientes a PRI_{Tf} y DRI_{Tf} no fue afectada por la presencia de magnesio o EDTA en la reacción de reconocimiento, mientras que para PRII_{Tf} y DRII_{Tf} la presencia del catión aumenta la cantidad de radioactividad retenida en tanto que las incubaciones en presencia de un exceso de EDTA la disminuyen significativamente.(dato no mostrado)

Para estudiar la especificidad de reconocimiento de estos factores por las regiones correspondientes se desarrollaron ensayos de competición cruzada con los distintos oligonucleótidos. La formación de los complejos ADN-proteína, no implicando una unión covalente, es reversible y por lo tanto la sonda radioactiva podría ser desplazada del complejo utilizando otros oligonucleótidos como competidores fríos, según la afinidad de éstos por el factor que reconoce al ADN marcado.

El comportamiento del o los factores que se ligan a PRI_{Tf} se muestra en la figura 19¹. Se puede ver que estos reconocen PRI_{Tf} en forma específica ya que los otros oligonucleótidos fríos no son capaces de desplazar significativamente la sonda radioactiva del complejo, en tanto

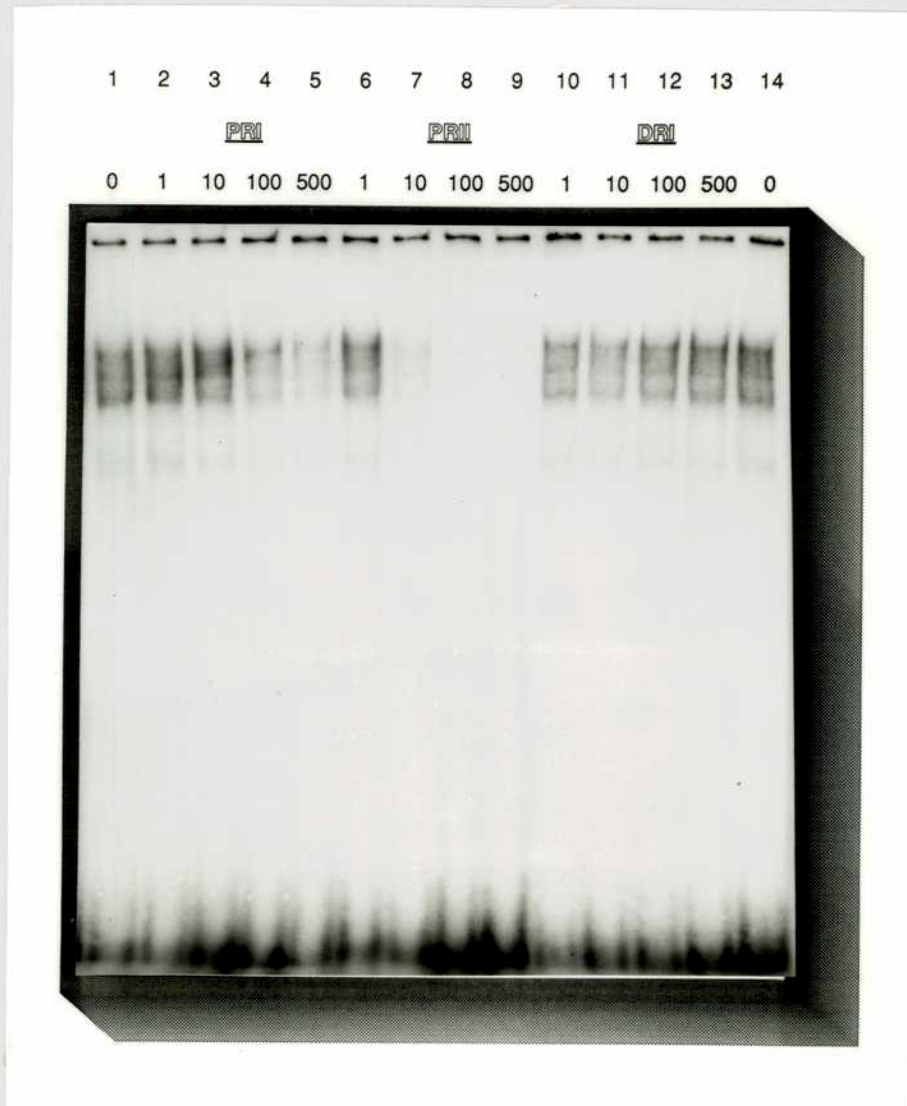
¹ Las competiciones contra DRII_{Tf} se muestran en la figura 23

Figura 19

Ensayos de competiciones por el o los factores que reconocen PRI_{Tf}.

Ensayo de competiciones con 1 ng del oligonucleótido marcado PRI_{Tf} y cantidades variables de oligonucleótidos fríos. realizado como se describe en materiales y métodos. Depósito 1) DNA libre, 2) en presencia de 6 µg de extracto y sin competidores, 3 a 6) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PRI_{Tf}, 7 a 10) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PII_{Tf} y 11 a 14) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de DRI_{Tf}.

Figura 20



Ensayos de competiciones cruzadas por el factor que reconoce PRII_{Tf}

Ensayo de competiciones con 1 ng del oligonucleótido marcado PRII_{Tf} y cantidades variables de oligonucleótidos fríos realizado en presencia de 6 μg de extracto, como se describe en materiales y métodos. Depósito 1 y 14) sin competidores, 2 a 5) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PRI_{Tf} , 6 a 9) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PRII_{Tf} y 10 a 13) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de DRI_{Tf} .

que un exceso de 10 veces del oligonucleótido homólogo disminuye en forma importante la radioactividad retenida y un exceso de 100 veces la hace indetectable. Otra observación fue que el oligonucleótido DRI_{Tf} compite mejor que los otros ADN heterólogos, hecho que sugiere que la analogía de secuencias encontrada entre estas dos regiones es funcional, al menos en lo que respecta a los factores que reconocen PRI_{Tf} por este método.

La figura 20 muestra los ensayos de competición realizados utilizando el oligonucleótido PRII_{Tf} como sonda marcada radioactivamente. Los complejos formados en este caso, también son específicos no siendo desplazados más que por el oligonucleótido homólogo.

Cuando se realizó el ensayo correspondiente a las competiciones del factor que reconoce al oligonucleótido DRI_{Tf} se observó que la afinidad de éste por el ADN correspondiente parece ser menor que en los otros casos, si bien el ADN homólogo es el mejor competidor, como se ve en la figura 21. Los oligonucleótidos correspondientes a PRI_{Tf} y PRII_{Tf} compiten significativamente aunque en menor escala, en tanto que DRII_{Tf} prácticamente no compite (ver figura 23).

El reconocimiento del oligonucleótido DRII_{Tf} por el factor correspondiente parece ser de alta afinidad como se muestra en la figura 22. Tan solo llega a ser competido por un exceso de 500 veces del oligonucleótido PRI_{Tf} , relación que ya no es significativa.

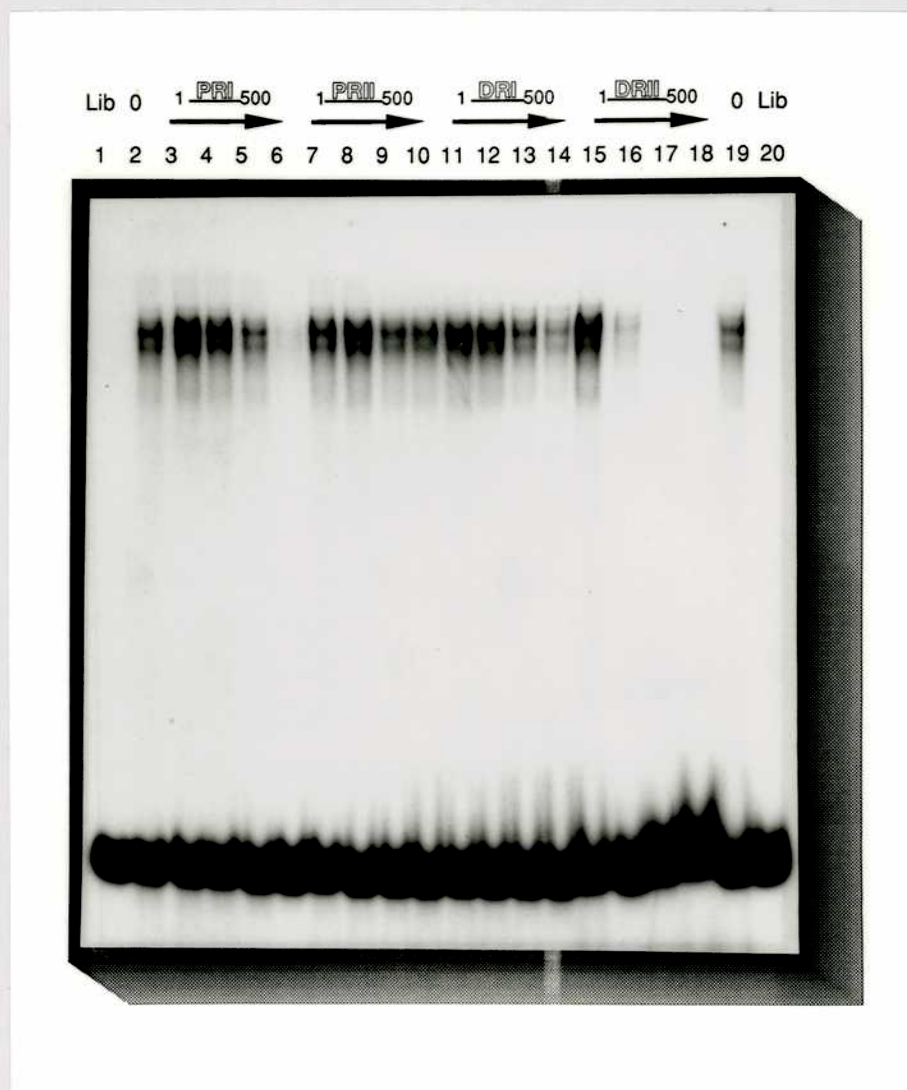
5) Caracterización térmica

La inactivación por calentamiento de los extractos brutos y el posterior análisis por "foot print" evidenciaron que el factor que reconoce PRI_{Tf} es inactivado a 65°C en 5 minutos en tanto que los otros factores resisten este tratamiento. Los factores que reconocen CR_{Tf} , DRI_{Tf} y DRII_{Tf} se inactivan a 80°C en 5 minutos mientras que el o los factores que reconocen PRII_{Tf} son resistentes a esta temperatura (figura 24, para CR_{Tf} dato no mostrado). Estos resultados son coherentes con las condiciones óptimas de reconocimiento de los factores por los

Figura 21

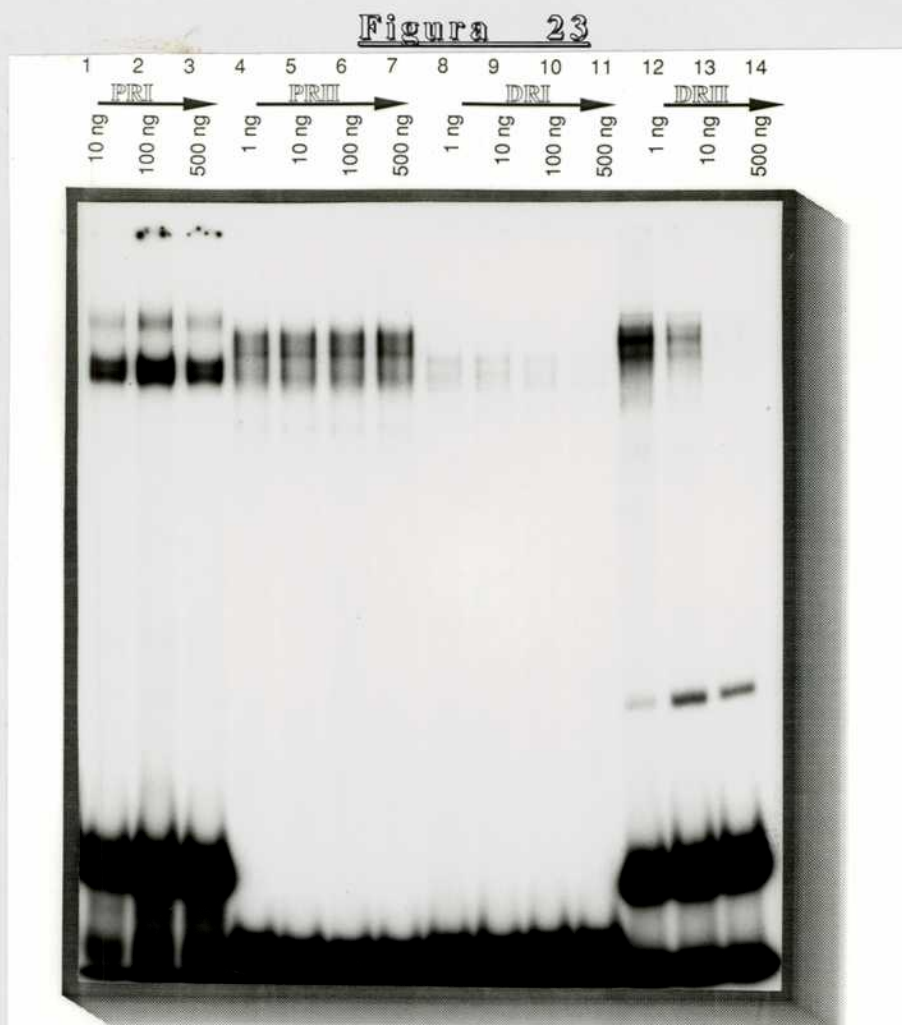
Ensayos de competiciones cruzadas por el factor que reconoce DRI_{Tf}

Ensayo de competiciones con 1 ng del oligonucleótido marcado DRI_{Tf} y cantidades variables de oligonucleótidos fríos realizado como se describe en materiales y métodos. Depósito 1) DNA libre, 2) en presencia de 6 µg de extracto y sin competidores, 3 a 6) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PRI_{Tf}, 7 a 9) competiciones con 1, 100 y 500 ng de PRII_{Tf} y 10 a 13) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de DRI_{Tf}.

Figura 22

Ensayos de competiciones cruzadas por el o los factores que reconocen DRII_{Tf}

Ensayo de competiciones con 1 ng del oligonucleótido marcado DRII_{Tf} y cantidades variables de oligonucleótidos fríos realizado en presencia de 6 µg de extracto, como se describe en materiales y métodos. Depósitos 1 y 20) DNA libre, 2 y 19) sin competidores, 3 a 6) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PRI_{Tf}, 7 a 10) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de PRII_{Tf}, 11 a 14) competiciones con 1, 10, 100 y 500 ng de DRI_{Tf} y 15 a 18) competiciones homólogas con 1, 10, 100 y 500 ng de PRII_{Tf}

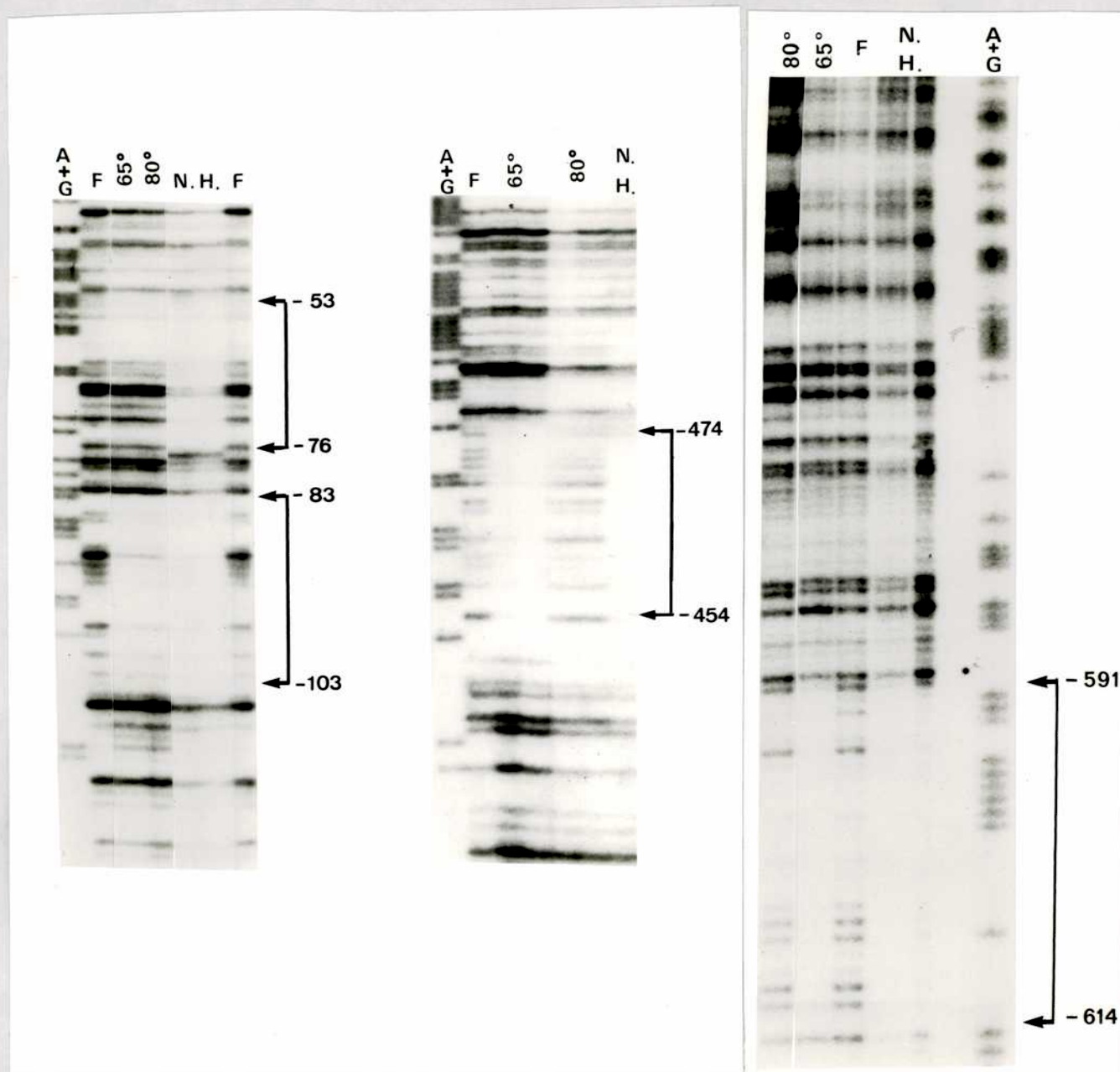


Ensayos de competiciones cruzadas de los distintos factores contra DRII_{Tf} frío.

Ensayo de competiciones con 1 ng de los oligonucleótidos marcados PRI_{Tf}, PRII_{Tf}, DRI_{Tf} y DRII_{Tf}, y en presencia cantidades variables del oligonucleótido frío DRII_{Tf} realizado con de 6 μg de extracto, como se describe en materiales y métodos. Depósitos 1 a 3) (³²P)-PRI_{Tf}, 4 a 7) (³²P)-PRII_{Tf}, 8 a 11) (³²P)-DRI_{Tf}, y depósitos 12 a 15) (³²P)-DRII_{Tf}. Como competidor frío se empleó el oligonucleótido DRII_{Tf} en cantidades de 1 ng (depósitos 4, 8, y 12), 10 ng (1, 5, 9 y 13), 100 ng (2, 6, 10 y 14) y 500 ng (3, 7 y 11).

oligonucleótidos para el ensayo de geles de retardamiento que se observaron en el punto anterior.

Figura 24



Estabilidad térmica de los distintos factores
determinada por el método de identificación de
improntas

Ensayos de *foot print* realizados con extractos sometidos a inactivación térmica por 5 minutos a las temperaturas indicadas en la figura. Las sondas utilizadas, marcadas en la posición indicada por un asterisco, fueron: *Hinf I-Hinf I* (-650* a -480); *Hind III-Pst I* (-615/-405*) y *Dde I-Dde I* (-150*/+30). A+G indica la secuencia A+G, F) indica DNA libre, 65°) indica extractos calentados por 5 min. a 65°C (y centrifugado por un minuto para descartar el precipitado), 85°) idem a 85°C y N.H.) indica extractos no calentados.

Capítulo II

Estudio de los factores hepáticos τ_f LF1 y τ_f LF2

Introducción

Las evidencias acumuladas hasta el momento permiten identificar en los distintos genes estudiados una región mínima que es capaz de dirigir la expresión, a la que se llama región promotora, y que aparentemente es una región de 100 a 200 bp. En este capítulo del trabajo se precisó la región promotora a partir del fragmento de 650 bp (-620/+39) y también se estudiaron las características de uno de los motivos presentes en esta región, PRI_{τ_f} y del motivo DRI_{τ_f} ya que comparten ciertas características. Los factores o el factor que reconoce PRI_{τ_f} se llamó Factor de Hígado 1 o τ_f LF1 y el que reconoce DRI_{τ_f} por analogía Factor de Hígado 2 o τ_f LF2.

Como se mencionó en el capítulo anterior estos motivos incluyen en su secuencia un decanucleótido idéntico, esta presencia es significativa debido a la baja probabilidad de repetición de una serie de 10 bp ($4^{10} = 1,1 \times 10^6$). Como se observó ni τ_f LF1 ni τ_f LF2 fueron detectados en extractos HeLa por ensayos de determinación de improntas; ambos factores parecen ser distintos a juzgar por los experimentos de caracterización térmica y los diferentes patrones en geles de retardamiento. Los dos podrían estar relacionados estrechamente a juzgar por los ensayos de competiciones cruzadas.

Resultados

1) Análisis de la región proximal.

Un estudio detallado de la región proximal al sitio de iniciación de la transcripción fue realizado por el método de transfecciones transientes. Para ello se construyeron distintos recombinantes por deleciones con la enzima *Bal 31* y posterior inserción en el vector

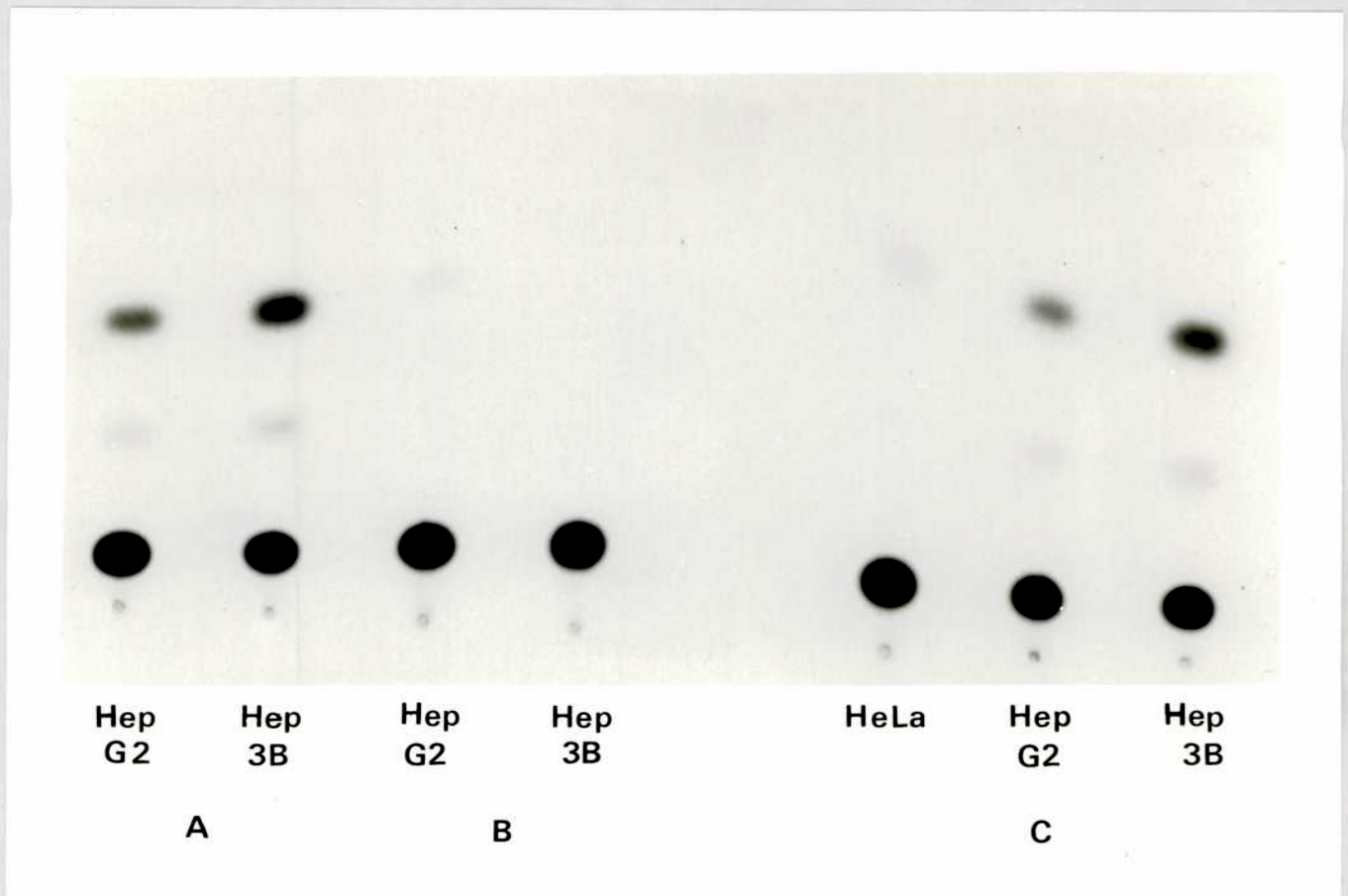
pUC19-CAT como se explicó en el capítulo I (ver figura 6). Los extremos 3' de los plásmidos obtenidos fueron identificados por secuenciación, y fueron respectivamente -6, -45 y -119. Estos vectores fueron purificados y transfectados como se explicó, y posteriormente se ensayó la actividad de la enzima CATsa en los extractos provenientes de los cultivos correspondientes. Como se puede ver en la figura 25 el vector (-4000/-45)Tf-CAT es capaz de dirigir la expresión del gen CAT (con la misma eficacia que p(-4000/-6)Tf-CAT dato no mostrado), en tanto que el vector (-4000/-119)Tf-CAT es inactivo.

Estos resultados tomados en conjunto indican que elementos promotores del gen humano de la transferrina se encuentran entre los nucleótidos -119 y -45, y que la presencia de la secuencia semejante a la caja "TATA" no es necesaria para la expresión. Se verificó también por experiencias de transfecciones transientes sobre células HeLa que ninguno de los tres vectores se expresa en estas células; otros ensayos realizadas en el laboratorio con recombinantes obtenidos a partir de deleciones 5' (Schaeffer y col. en preparación), indicaron que un fragmento de (-125/+39) de la hTf es suficiente para dirigir la expresión en hepatomas y no en HeLa (figura 25c), acotando entonces el promotor tejido específico de la hTf a la región situada entre los nucleótidos -125 y -45.

La región que quedó definida como el promotor de transferrina corresponde a la secuencia que contiene los sitios de reconocimiento de proteínas $PRITf$ y $PRIIIf$, indicando que la integridad de dichas regiones es funcionalmente importante para la expresión del gen de la hTf.

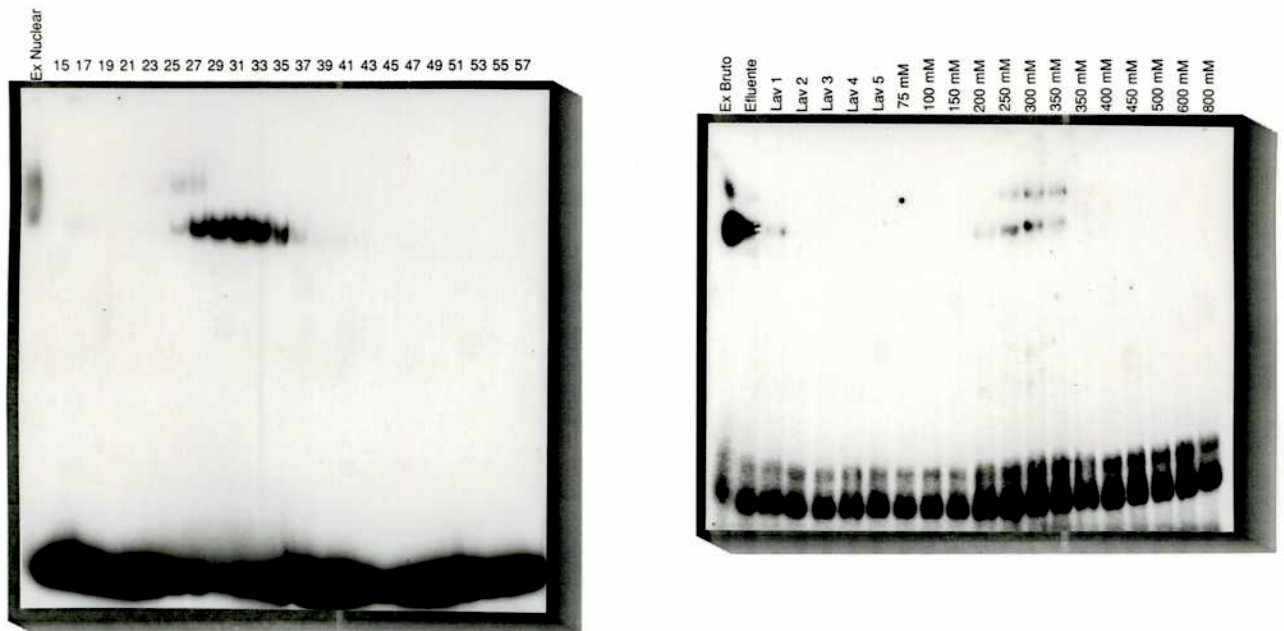
2) Caracterización de $TfLF1$

Como un ensayo de caracterización de LF1 se realizó una filtración por tamices moleculares. Se cromatografió un extracto nuclear de hígado de rata a travez de una columna de resina AcA 34, a 4°C en las condiciones descriptas en materiales y métodos, y se determinó, por geles de retardamiento de ADN, la presencia del factor en las fracciones eluidas. Como se ve en la figura 26a los distintos complejos que se observaron en los ensayos de retardamiento de ADN corresponden a factores que presentan radios de Stokes diferenciables. El complejo de

Figura 25

Determinación de la región promotora
Transfecciones con los plásmidos (-4000/-45)Tf-CAT,
(-4000/+119)Tf-CAT y (-125/+39)Tf-CAT

- A) Ensayos de actividad CATsa de 30 μ g de extractos provenientes de cultivos HepG2 y Hep3B transfectados con los plásmidos (-4000/-45)Tf-CAT.
- B) Ensayos similares sobre cultivos HepG2 y Hep3B transfectados con el vector (-4000/+119)Tf-CAT.
- C) Ensayos de actividad de CATsa de extractos de cultivos HeLa, HepG2 y Hep3B transfectados con el plásmido (-125/+39)Tf-CAT (Schaeffer y col manuscrito en preparación).

Figura 26

Filtración por geles y cromatografía de afinidad a través de PRI_{Tf} -sepharosa

A) Ensayo por geles de retardamiento de la filtración por AcA 34 de 1 ml de extracto nuclear bruto de hígado de rata, realizado como se describe en materiales y métodos. V_0 : fracción 17; β -galactosidasa (400 kD): fracción 19; Piruvato kinasa (220 kD): 28; Creatina fosfokinasa (80 kD): 44; Vi: 47.

B) Ensayo por geles de retardamiento de la cromatografía de afinidad por PRI_{Tf} -sepharosa, de las fracciones 25 a 27 de la columna de filtración, realizada como se describe en materiales y métodos.

menor migración electroforética, siempre como una banda radioactiva más débil, presenta un mayor peso molecular aparente (aproximadamente de 200.000), en tanto que las otras dos bandas, de migración electroforética cercana y que se marcan más fuertemente con PRITf, no se pudieron separar entre sí presentando un peso molecular menor. Las fracciones activas fueron cromatografiadas a través de una columna de afinidad de PRITf-Sepharosa por el método descrito por Kadonaga y col. (1985). Los factores se eluyen con una concentración de KCl de alrededor de 250 mM, indicando que la afinidad de ellos es aproximadamente la misma (figura 26b). Las fracciones activas fueron estudiadas por electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida-SDS analíticos (Fastsystem de Pharmacia), estos ensayos indicaron aun la presencia de varias bandas de proteínas.

Analizando la literatura, se observó que de los dos elementos promotores, la región PRIITf corresponde probablemente a una proteína de una familia descrita (CCAAT) y que aparentemente no es específica de hígado, por el contrario no se encontraron secuencias análogas a PRIITf descritas como sitio de reconocimiento de factores de transcripción, por lo que fue considerado importante estudiar este factor específico de hígado (en el momento de comenzar este proyecto todavía no había descrito ningún factor de transcripción hepático).

Como se dijo en el punto anterior no se encontraron secuencias análogas a los sitios protegidos por TfLF1 o TfLF2 descritas como factores de transcripción, sin embargo tomando como base de comparación el decanucleótido de PRIITf y DRIITf (5' TCTTTGACCT 3'), una búsqueda por computadora permitió identificar secuencias semejantes en regiones 5' de distintos genes. En la tabla siguiente se muestran algunas de dichas regiones que por su posición respecto del sitio de iniciación de transcripción y por pertenecer a genes de expresión hepática podrían ser sitios probables de fijación de alguno de los dos factores en estudio.

Secuencias análogas al decanucleótido presente en PRIITf y DRIITf obtenidas por búsqueda por computadora a partir del banco de secuencias de los Alamos "Gene Bank".

TCTTTGACCT DRIITf y PRIITf (la secuencia en esta última se encuentra en la hebra inferior)

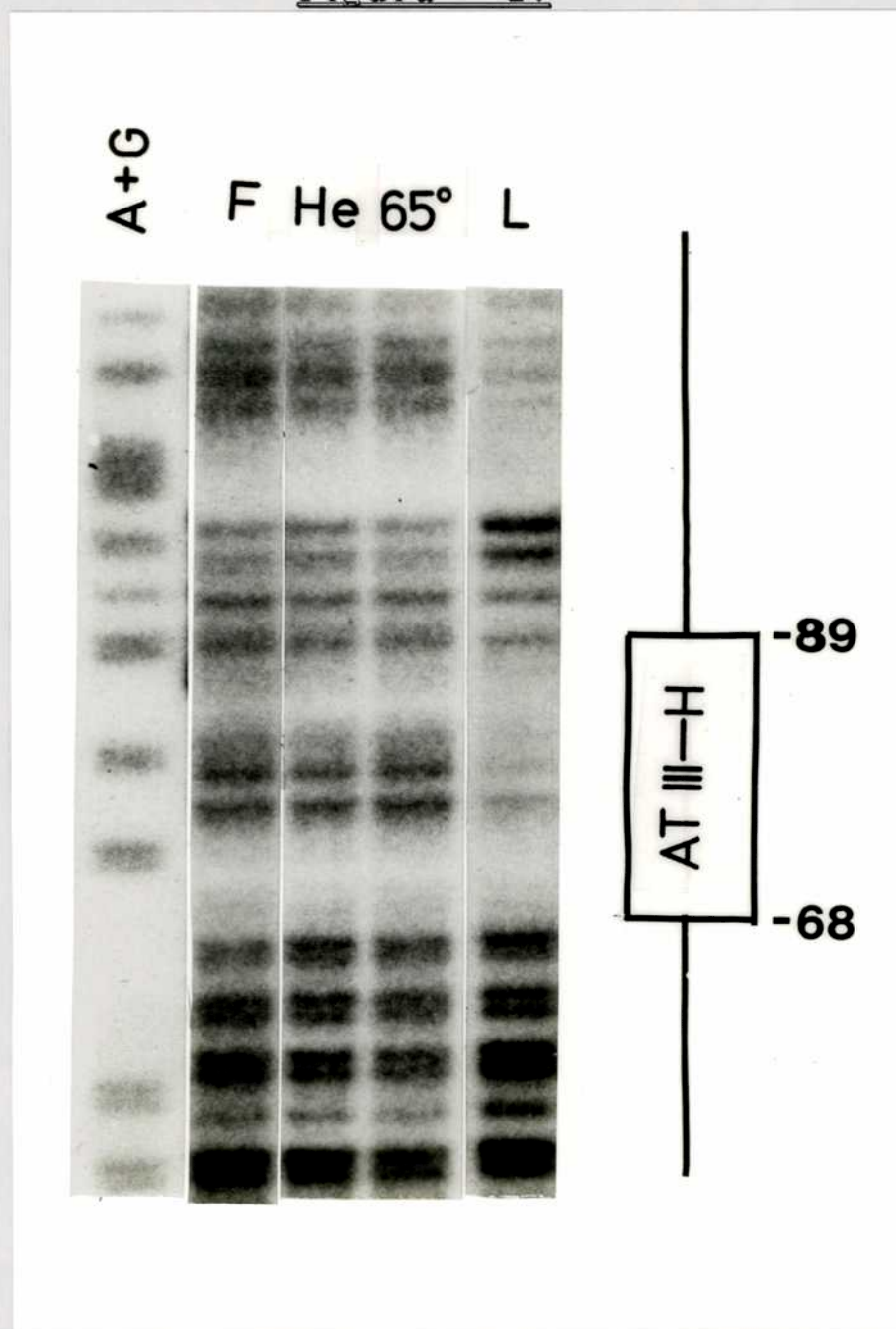
TCTTTGACTT	-3000 α Feto proteína humana (región descripta como un "enhancer")
TCTTTGACCT	-80 Antitrombina III humana
TCTTTGATCT	-250 Factor de coagulación XII humano
TCTTTGTCCT	-160 α Feto Proteína de ratón
TCGTTGACCT	-320 MHC "sex limited protein" de ratón
TCTTTGTCCT	-190 α Feto Proteína de rata
TATTTGACCT	-150 Sero-Albúmina de Xenopus Laevis
TCTTTGCCCT	-60 Aldolasa B humana.

a) Estudio de la región análoga en el gen de la antitrombina III humana (AT III)

La secuencia nucleotídica de 10 bp presente en los sitios PR_{Tf} y DR_{Tf} de la transferrina es casi idéntica a una secuencia de DNA (5' CCTTTGACCT 3') presente en la región 5' proximal del gen de la antitrombina III humana (AT III), otra proteína sérica sintetizada en el hígado. La región mencionada se encuentra a aproximadamente -80 bp del sitio de iniciación de la transcripción descripto para AT III (Prochownick 1985). Cuando un fragmento de 328 bp de este gen, que va del nucleótido -304 al +24 respecto del sitio cap, fue ligado delante de la secuencia CAT en un vector pUC19-CAT0 y transfectado en células hepáticas y en células HeLa (Duchange y Schaeffer no publicado y Prochownick 1985) se verificó que la región de 328 bp fue suficiente para dirigir la expresión en los hepatomas pero no en HeLa. Estos elementos nos llevaron a plantearnos el interrogante de si la región homóloga a PR_{Tf} y DR_{Tf} era el sitio de reconocimiento de una proteína y en el caso de serlo si ella era la misma o similar a los factores $TfLF1$ o $TfLF2$ que reconocen secuencias en el gen de la transferrina.

Con el objetivo de determinar la existencia o no de un factor que podría reconocer la región análoga encontrada se realizaron experimentos de determinación de improntas con DNasa I utilizando como fuente de proteínas extractos nucleares provenientes de células

Figura 27



Identificación de la región H_{AT3} por el método *foot print*

Ensayo de determinación de improntas realizado sobre el fragmento *Sau* 3AI /*Dra* I de 174 bp del gen de la AT III, que va del nucleótido -150 al +24 marcado en esta última posición A+G) secuencia A+G; F) DNA libre; He) Ensayo realizado con extractos de células HeLa; 65°) Ensayo realizado con extractos hepáticos inactivados a 65°C; L) Ensayo realizado con extractos hepáticos no calentados.

HeLa o hepáticos. Para ello, el fragmento Sau 3AI/Dra I de 174 bp del gen de la AT III que va del nucleótido -150 al +24 fue marcado en sus extremos 3' y los fragmentos resultantes utilizados como sonda. Cuando se realizó el ensayo de determinación de improntas con los extractos hepáticos se vió que una región protegida entre los nucleótidos -89 al -68 en la hebra superior del DNA (figura 27) y de -88 a -70 en la hebra inferior. Esta impronta cubre precisamente la secuencia análoga a PRI_{Tf} y DRI_{Tf} indicando la presencia de un factor en los núcleos de los hepatocitos que reconoce la zona en cuestión. Además esta protección no se observa empleando extractos nucleares de células HeLa como también es el caso en las regiones análogas en el gen de la transferrina. La región fue llamada H_{AT3} (H por hepática)

Región H_{AT3}

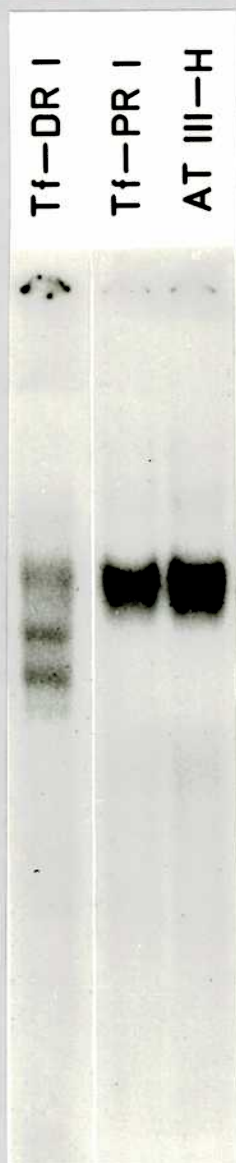
-92GGTCATCAGCCTTTGACCTCAGTTC-68
-96TAGTCGGAAACTGGAGTCAAGGGCC-64

Experimentos de inactivación térmica seguidos por ensayos de "foot print" (figura 27) indicaron que el factor que protege la región H_{AT3} era inactivado a 65°C en 5 minutos como es el caso de $TfLF1$, en tanto que $TfLF2$ resiste a 65°C.

Para caracterizar el factor que protege la región H_{AT3} y verificar si se trata de un factor similar a $TfLF1$ o a $TfLF2$ (los factores que reconocen las regiones homólogas PRI_{Tf} y DRI_{Tf} respectivamente), o un factor totalmente distinto se implementaron ensayos de geles de retardamiento de DNA. Para ello se sintetizaron los oligonucleótidos de simple cadena correspondientes a la región H_{AT3} , se los purificó e hibridizó entre sí y se los marcó por $\gamma(^{32}P)$ -ATP como se describió anteriormente. Los geles de retardamiento se realizaron utilizando además los oligonucleótidos PRI_{Tf} y DRI_{Tf} , como sondas para marcar los complejos correspondientes. Se observó que los complejos marcados por (^{32}P) - H_{AT3} eran similares a los correspondientes a $TfLF1$, marcados con (^{32}P) - PRI_{Tf} , y por ende distintos de $TfLF2$, como se puede ver en la figura 28.

La relación entre los distintos factores y las correspondientes afinidades por los oligonucleótidos utilizados se estudió más profundamente por ensayos de competición cruzada. El experimento en

Figura 28



Gel de retardamiento del oligonucleótido H_AT₃

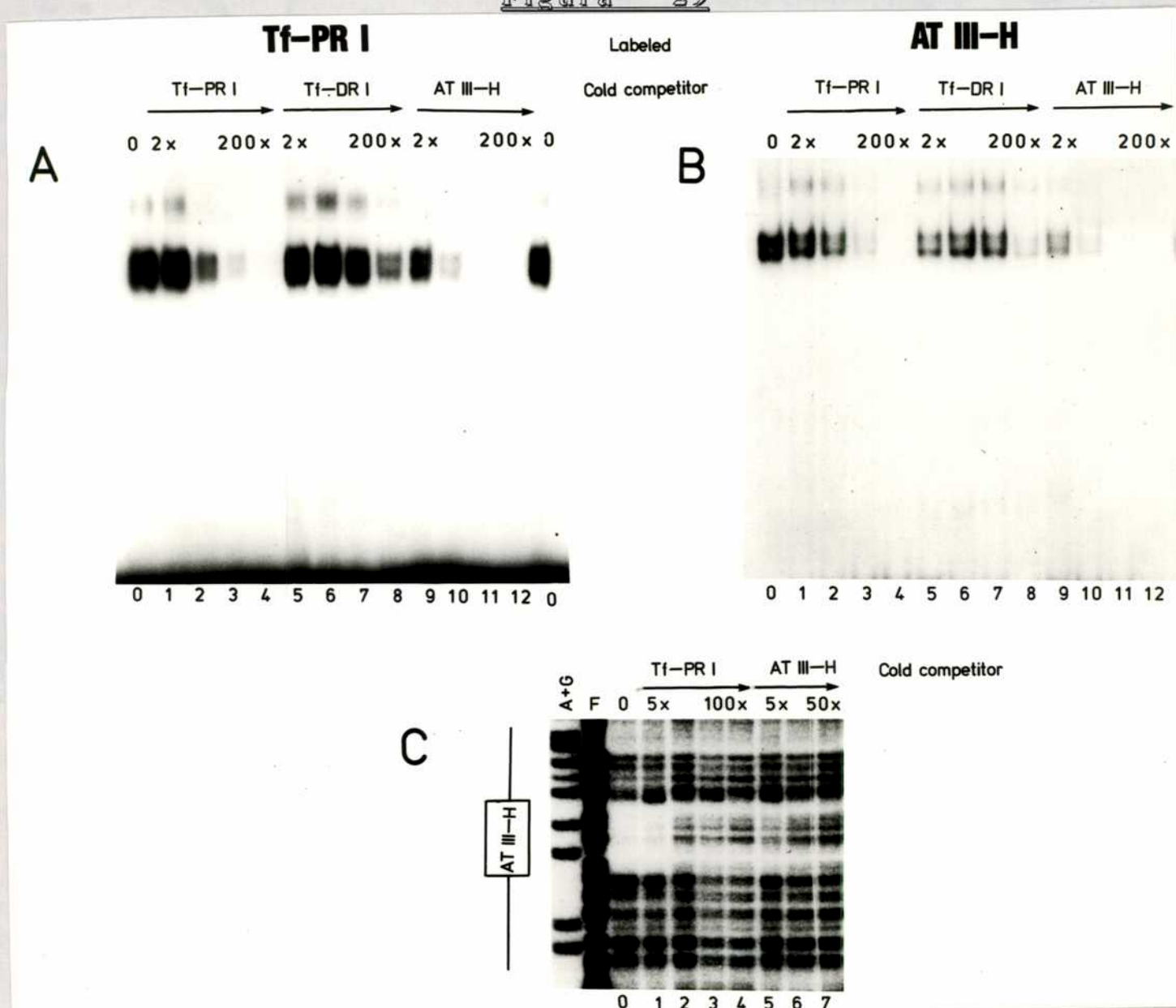
Ensayo de gel de retardamiento de DNA con los oligonucleótidos DR_IT_f, PR_IT_f y H_{AT3}, realizado como se describe en materiales y métodos.

que las competiciones se realizaron sobre T_fLF1 , identificado por la marca de (^{32}P) - PRI_{Tf} , indicó que un exceso de 10 veces del oligonucleótido H_{AT3} es requerido para desplazar la sonda radioactiva del complejo DNA-proteína, en tanto que un exceso de 40 veces del oligonucleótido homólogo frío, PRI_{Tf} , es requerido para obtener el mismo efecto, como se observa en la figura 29a. El ensayo de competición análogo se realizó sobre el factor que reconoce H_{AT3} , marcado por la presencia de este oligonucleótido en el complejo DNA-proteína. En la figura 29b se puede ver que un exceso de 40 veces del oligonucleótido PRI_{Tf} es requerido para desplazar significativamente a la sonda del complejo, mientras que un exceso de 10 veces del oligonucleótido homólogo H_{AT3} produce un desplazamiento comparable; además la región DRI_{Tf} no compite significativamente. Ensayos de competición cruzada realizados por el método de determinación de improntas confirmaron estos resultados como se muestra en la figura 29c. Estos experimentos indican que el factor T_fLF1 presenta una mayor afinidad por H_{AT3} que por PRI_{Tf} , y que el factor que reconoce el oligonucleótido de la antitrombina muestra el mismo comportamiento, en tanto que ninguno de los dos presenta una afinidad significativa por el oligonucleótido DRI_{Tf} .

Estos elementos, tomados conjuntamente con la similitud de bandas de retardamiento de DNA observadas en ambos casos, la tejido especificidad y los datos de termoestabilidad, sugieren fuertemente que T_fLF1 , el factor que reconoce y liga PRI_{Tf} , es el mismo factor nuclear hepático que interactúa con la región H_{AT3} del gen de la Antitrombina III.

La mayor afinidad de T_fLF1 por H_{AT3} fue confirmada realizando experiencias con geles de retardamiento de DNA en los que las reacciones de reconocimiento se efectuaron a concentraciones crecientes de KCl. Como se ve en la figura 30 los complejos con H_{AT3} son formados aun a 500 mM KCl en tanto que los complejos con PRI_{Tf} no se forman practicamente a esta concentración. Ésto sugiere que para una posterior purificación por columnas de DNA-Sepharosa el oligonucleótido H_{AT3} puede ser más eficiente que PRI_{Tf} .

Figura 29



Ensayos de copeticiones cruzadas de los factores que reconocen los oligonucleótidos PRI_{Tf} y H_{AT3}

A) Competiciones cruzadas por gel de retardo del oligonucleótido (^{32}P)- PRI_{Tf} . 0: ensayo con 6 μ g de extractos nucleares hepáticos en ausencia de competidores; 1 a 4: competiciones contra un exceso de 2, 10, 40 y 200 veces del oligonucleótido PRI_{Tf} frío respectivamente; 5 a 8: competiciones contra un exceso del DRI_{Tf} frío de 2, 10, 40 y 200 veces respectivamente; 9 a 12: competiciones contra un exceso del H_{AT3} frío de 2, 10, 40 y 200 veces respectivamente. B) Competiciones cruzadas por gel de retardo del oligonucleótido (^{32}P)- H_{AT3} ; el orden de los depósitos es el mismo que en la figura a. C) Ensayo de competiciones cruzadas por *foot print* sobre el fragmento *Sau* 3AI /*Dra* I de 174 bp del gen de la AT III, que va del nucleótido -150 al +24 marcado en esta última posición A+G) secuencia A+G; F) DNA libre; 0) en ausencia de competidores; 1 a 4) competiciones contra un exceso de 5, 25, 50 y 100 veces del oligonucleótido PRI_{Tf} respectivamente; 5 a 7) competiciones contra un exceso de 5, 25 y 50 veces del oligonucleótido H_{AT3} respectivamente

Figura 30

Ensayo de formación de complejos para PRI_{Tf} y H_{AT3} a distintas concentraciones de sales.

Ensayos de geles de retardamiento de DNA para los oligonucleótidos PRI_{Tf} y H_{AT3}. Las reacciones de reconocimiento se realizaron a las concentraciones de sales que se indican en la figura.

b) Estudio de la región homóloga al sitio de fijación de T_fLF1 presente en el promotor de α 1-AT

En un trabajo reciente (Hardon y col. 1988) en el que se estudia el gen de la alfa-antitripsina humana (α 1-AT), se describe un factor trans, específico de hígado, que interactúa con el dominio A ($A_{\alpha 1AT}$) que va del nucleótido -123 al -103 dentro de la región promotora (De Simone y col. 1987). Este factor, llamado LF-A1, también se une a la región promotora de la apolipoproteína A I humana (Apo AI) entre los nucleótidos -225 y -195. Los experimentos de interferencia de reconocimiento por metilación desarrollados por los autores les permitieron identificar, en los dos genes reconocidos por el factor, una secuencia análoga de seis nucleótidos, repetida dos veces, dentro de cada región, seguidamente en la α 1-AT y espaciadas en la Apo AI, como se muestra en la tabla II. Dicha secuencia consenso es (5' T G ^{G/A} C ^{G/T} 3'), ya que la metilación de las purinas homólogas interfiere con la unión al factor. Dicho hexanucleótido se encuentra presente en la secuencia común a PRI_{Tf}, DRI_{Tf} y H_{AT3}, (5' T/CCTTTGACCT 3'). Esta analogía sugiere la posibilidad que HAT3, PRI_{Tf} o DRI_{Tf} podrían ser sitios de reconocimiento del factor descrito por Hardon, de manera que uno de los factores encontrados en el estudio del gen de la transferrina, T_fLF1 o T_fLF2, sea en realidad LF-A1.

Sitios de reconocimiento de LF-A1 (Hardon y col. 1988) en las secuencias 5' de los genes de alfa 1 antitripsina (α 1-AT) y apolipoproteína A I (Apo AI), según Hardon y col. 1988. En negrita se marcan las regiones protegidas por el factor contra la DNAsa, en relieve el patrón de interferencia por metilación y subrayados los hexanucleótidos indicados por los autores como sitios de reconocimiento de la proteína.

α 1-AT

-135CAGATCCC**AGCCAGT**ACT **TA**CCCCTGTTTGCCTCCTCC-96

-135GTCTAGGG**TCGGTCACCT**GA **ATC**GGGACAAACGAGGAGG-96

Apo A I

-225CCCGCCCC**ACT**AACCCTT**ACC**CCTGCCCTGCACGCCC-186

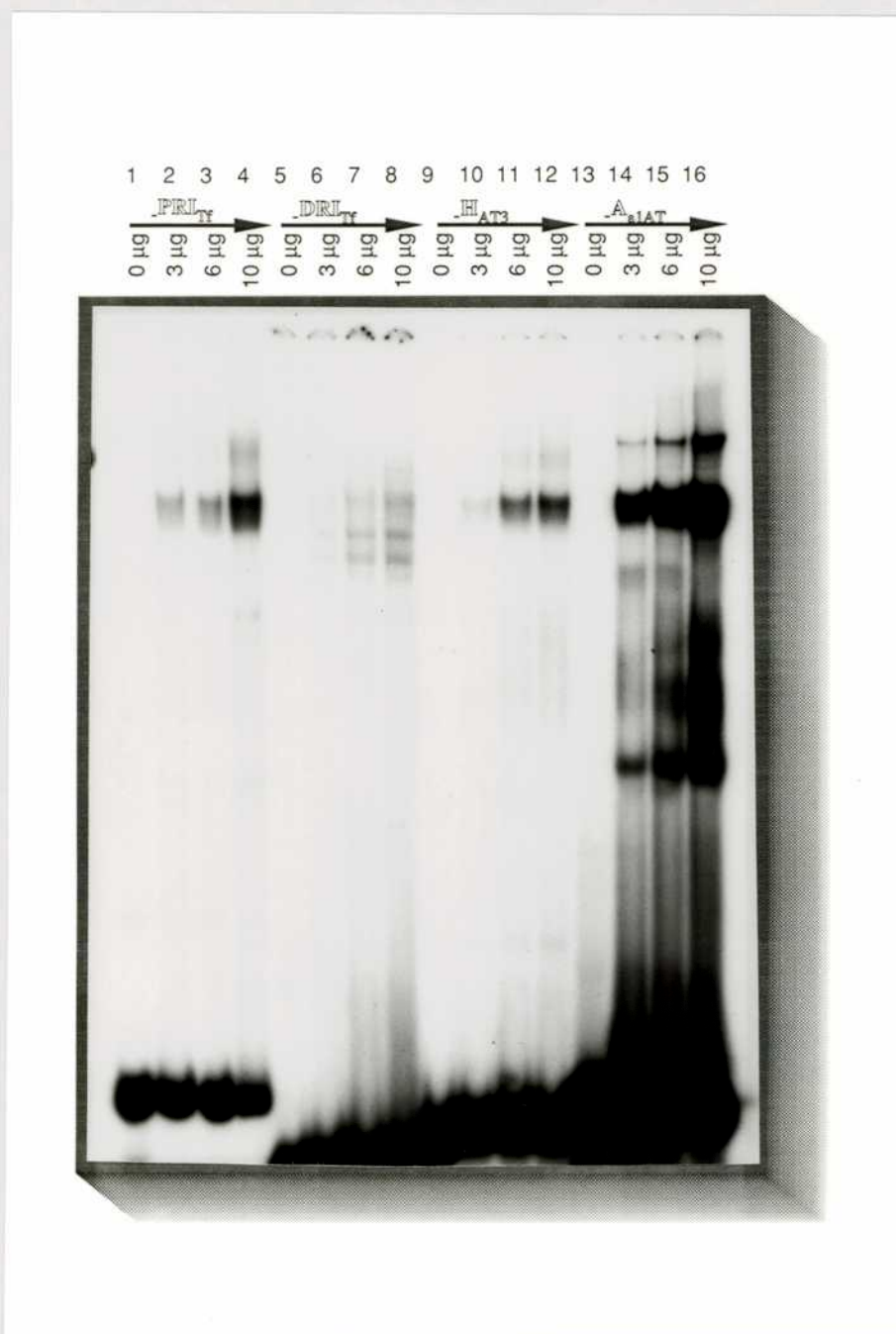
-225GGGC**GGGGTGACTT**GGAACT**GG**GACGGGACGTGCGGG-186

Para estudiar este factor se hicieron sintetizar los oligonucleótidos correspondientes al dominio $A_{\alpha 1AT}$ y se los preparó para ensayos de geles de retardamiento de DNA.

Los experimentos de geles de retardamiento de DNA permitieron observar que los complejos formados por el factor LF-A1 y (^{32}P) - $A_{\alpha 1AT}$ presentan el mismo patrón de migración que los formados por T_f LF1 y la sondas PRI_{Tf} o H_{AT3} marcadas, siendo ambos distintos del observado para T_f LF2, como se puede ver en la figura 31 (la mayor intensidad de las bandas de LF-A1 se debe a una mayor actividad específica de la sonda (^{32}P) - $A_{\alpha 1AT}$).

Para verificar si esta analogía de migración se debe a que se trata del mismo factor y se corresponde con una analogía en las afinidades entre los factores y los oligonucleótidos en cuestión se hicieron experimentos de competición cruzada. Los ensayos realizados compitiendo el factor LF-A1, marcado con la sonda (^{32}P) $A_{\alpha 1AT}$, revelaron que ésta puede ser competida por un exceso de 40 veces de PRI_{Tf} (figura 32a) o H_{AT3} (dato no mostrado), lo que indica que LF-A1 es capaz de reconocer las regiones mencionadas de transferrina y de antitrombina III. Los ensayos de competición de T_f LF1, marcado con el oligonucleótido (^{32}P) - PRI_{Tf} (figura 32b) o con (^{32}P) H_{AT3} (dato no mostrado) indicaron sorprendentemente que el oligonucleótido $A_{\alpha 1AT}$ aun en un exceso de 100 o 200 veces es incapaz de desplazar la sonda radioactiva del complejo. El mismo comportamiento se observó realizando las competiciones por *foot print*, confirmando que el oligonucleótido $A_{\alpha 1AT}$ no compite por el complejo de T_f LF1- H_{AT3} (figura 32c) siendo que DRI_{Tf} , que un otro factor, compite mejor como se vió en la figura 29a y b.

Estos resultados sugieren que las regiones PRI_{Tf} y H_{AT3} contienen motivos de unión que son reconocidos por el factor nuclear LF-A1; por el contrario el elemento promotor $A_{\alpha 1AT}$ no parece contener los elementos necesarios para ser reconocido por la proteína hepática T_f LF1, a pesar de que para ambos factores el patrón de migración obtenido por geles de retardamiento de DNA es similar.

Figura 31

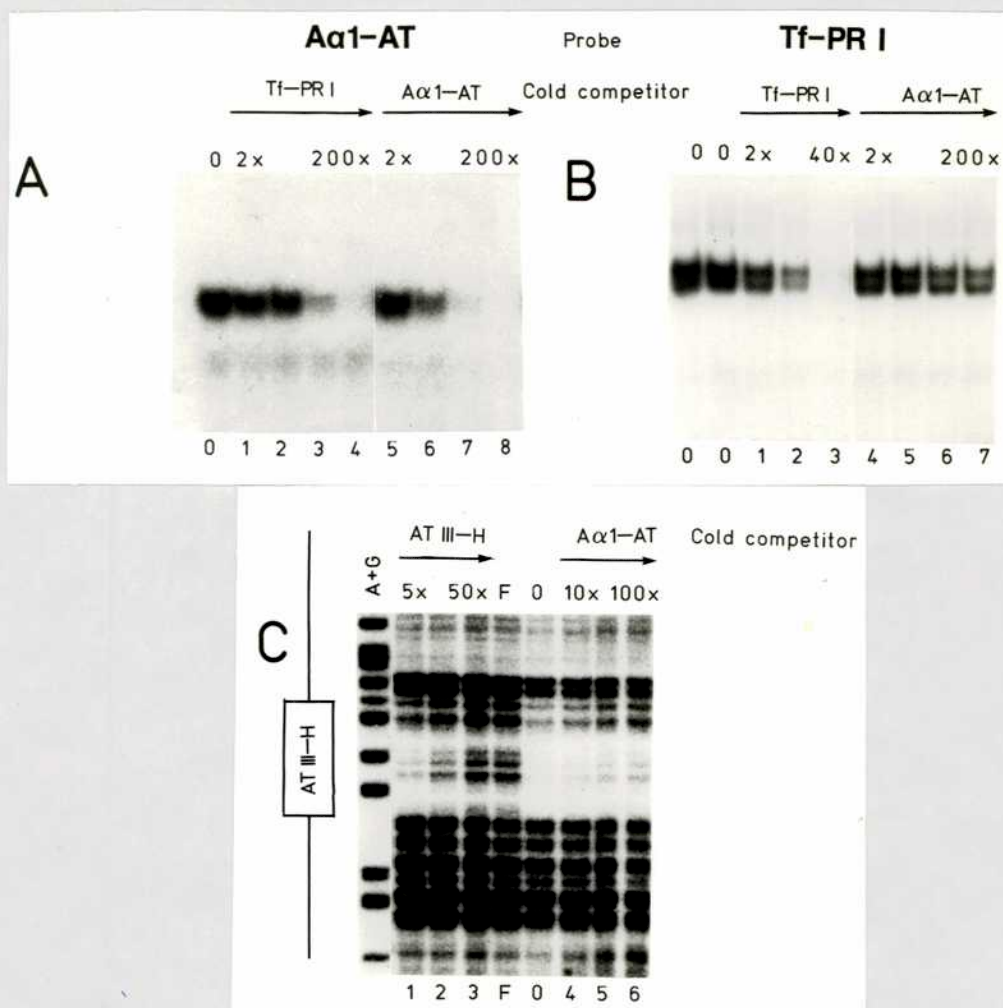
Identificación del patrón de bandas de LF-A1 por geles de retardamiento.

Geles de retardamiento de DNA realizados con los oligonucleótidos marcados PRI_{Tf} (depósitos 1 a 4), DRI_{Tf} (depósitos 5 a 8), H_{AT3} (9 a 12) y $A_{\alpha 1AT}$ (13 a 16), en ausencia de proteínas (1, 5, 9 y 13) y con cantidades variables de extractos nucleares de hígado de rata de 3 μg (2, 6, 10 y 14), 6 μg (3, 7, 11 y 15) y 10 μg (4, 8, 12 y 16).

c) Estudio de los sitios de contacto del factor T_fL F 1

Un análisis más preciso de las regiones de reconocimiento de estos factores permitiría comprender los resultados descritos en el párrafo anterior, en consecuencia se implementó el método de interferencia de unión por metilación. Este método se basa en la observación que si ciertas purinas dentro del sitio de reconocimiento del factor a estudiar se encuentran metiladas producen una alteración estérica que impide la unión del factor a dicho DNA. De esta manera si el DNA a utilizar es hipometilado en condiciones tales que estadísticamente una sola purina es alterada por cada sitio de reconocimiento y se realiza, en ciertas condiciones, un gel preparativo de retardamiento de DNA, el factor no va a ligar las moléculas de la sonda que esten metiladas en bases que interfieran con la unión. Ésto significa que en el DNA retenido por el complejo no van a estar presentes las moléculas metiladas en los puntos de contacto. Si la sonda retardada y la sonda que migra libre son eluidas del gel nativo y posteriormente se las hidroliza (en presencia de piperidina o NaOH), el DNA no va a ser cortado más que en los sitios en que las bases estan modificadas. Por lo tanto dentro del patrón de corte de la sonda retenida van a estar ausentes las bandas correspondientes a los sitios de contacto entre la proteína y el DNA.(ver materiales y métodos).

Con este propósito fueron marcados los oligonucleótidos de simple cadena correspondientes a PRI_{Tf}, H_{AT3} y A_{α1AT} en el extremo 5', e hibridizados con el oligonucleótido no radioactivo correspondiente, de manera de obtener las seis sondas marcadas en un solo extremo 5' para poder desarrollar posteriormente las secuencias. Estas fueron metiladas como se describe y se controló por geles de retardamiento cualitativo que la metilación sea tal que no altere el patrón de migración observado con sondas no metiladas. Posteriormente se hicieron los geles de retardamiento preparativos para separar el DNA no interferente, que migra en el complejo ligado al factor, así como el DNA que migra libremente utilizado como control. Las sondas fueron eluidas, purificadas e hidrolizadas, y posteriormente las muestras fueron separadas en geles de secuenciación de 20 o 25% de poliacrilamida como se describe en materiales y métodos.

Figura 32Ensayos de competición para los factores LF-A1 y Tf-LF1

A) Ensayo de competiciones cruzadas por gel de retardo empleando como sonda al oligonucleótido (^{32}P)- $\text{A}\alpha_1\text{AT}$. Depósito 0: ensayo con 6 μg de extractos nucleares hepáticos en ausencia de competidores; 1 a 4: competiciones contra un exceso de 2, 10, 40 y 200 veces del oligonucleótido PR I_{Tf} frío respectivamente; 5 a 8: competiciones contra un exceso de $\text{A}\alpha_1\text{AT}$ frío de 2, 10, 40 y 200 veces respectivamente.

B) Ensayo de competiciones cruzadas por gel de retardo empleando como sonda al oligonucleótido (^{32}P)- PR I_{Tf} ; el orden de los depósitos es el mismo que en la figura a.

C) Ensayo de competiciones cruzadas por *foot print* sobre el fragmento *Sau* 3AI /*Dra* I de 174 bp del gen de la AT III, que va del nucleótido -150 al +24 marcado en esta última posición A+G) secuencia A+G; F) DNA libre; 0) en ausencia de competidores; 1 a 3) competiciones contra un exceso de 5, 25 y 50 veces del oligonucleótido $\text{H}_{\text{AT}3}$ respectivamente; 4 a 6) competiciones contra un exceso de 10, 50 y 100 veces del oligonucleótido $\text{A}\alpha_1\text{AT}$ respectivamente

El ensayo realizado utilizando como sonda los oligonucleótidos conteniendo la secuencia de $A_{\alpha 1AT}$ se muestra en la figura 33. Las bandas ausentes o notoriamente más débiles corresponden a los sitios de contacto y aquellas que están disminuídas indican posiciones metiladas que interfirieron con la unión del factor en menor grado. Se puede ver que las bases metiladas indicadas en relieve dentro de la secuencia (5' TGGACT TAGCCC 3') de la hebra superior de $A_{\alpha 1AT}$ interfieren con la unión mientras que el patrón de interferencia en la cadena complementaria es (5' GGGCTA AGTCCA 3') indicando que esta secuencia es el sitio de contacto de LF-A1, dentro de la cual se encuentran los dos hexanucleótidos en tandem descritos anteriormente. Este resultado está de acuerdo con las experiencias de interferencia de metilación realizadas por Hardon y col. 1988, sobre una región de 250 bp indicando que la utilización de oligonucleótidos pequeños dio resultados comparables para la identificación de sitios de contacto.

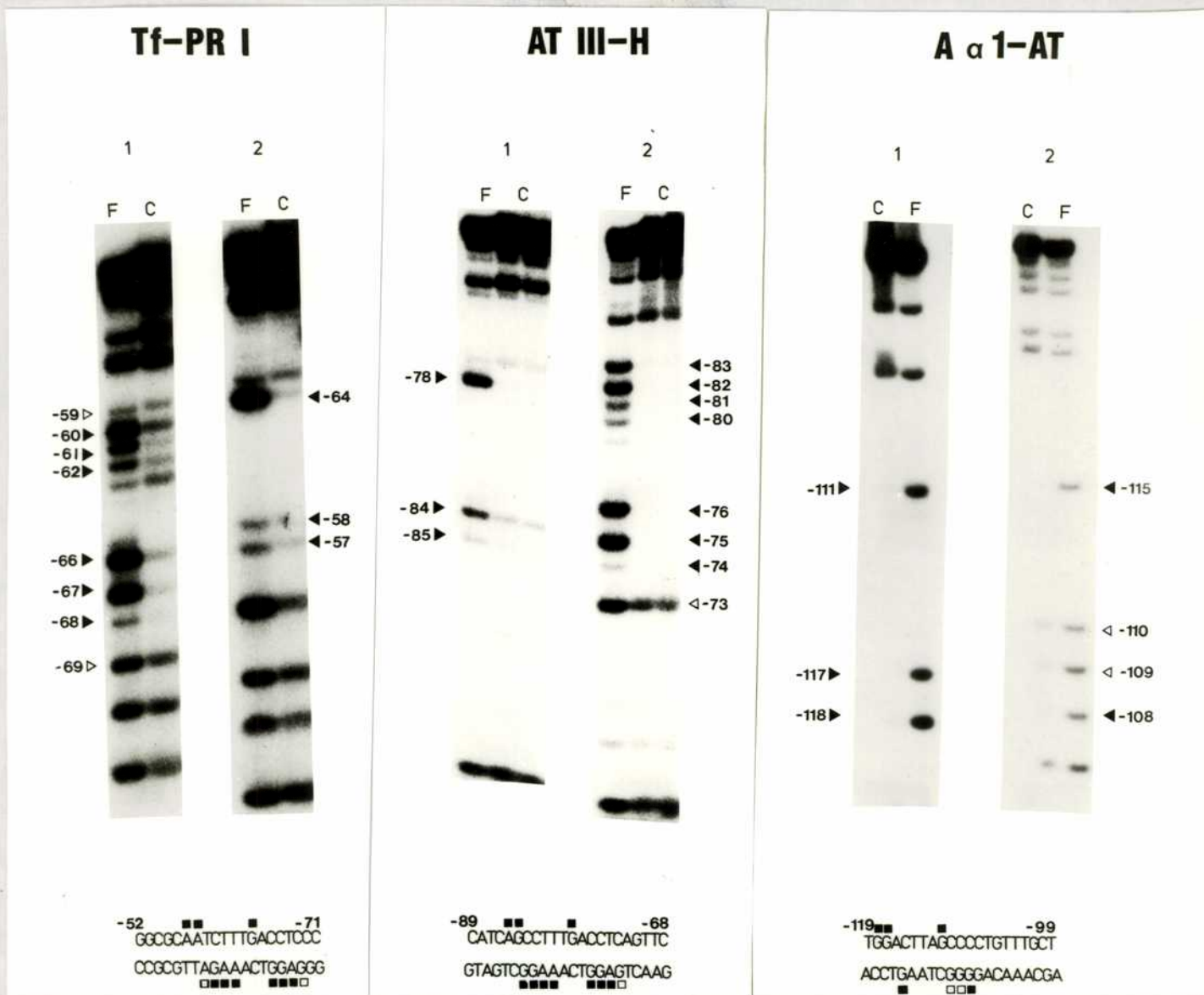
El estudio correspondiente realizado utilizando como sonda a los oligonucleótidos PRI_{Tf} marcados permitió identificar en cada hebra de DNA los puntos en que la metilación interfiere como se puede ver en la figura 33. Estos se inscriben dentro de la secuencia (5' GAGGTCAAAGA 3') en la hebra superior y en la secuencia (5' AATCTTTGACCTC 3') en la región complementaria, (en relieve se indican las bases que interfieren con la unión del factor).

El ensayo correspondiente realizado con las dos sondas H_{AT3} , mostrado en la misma figura, indica que los sitios de contacto (indicados en relieve) se ubican dentro de la región (5' AGCCTTTGACCTC 3'), en la hebra superior, y dentro de la región complementaria (5' GAGGTCAAAGGCT 3') de la hebra inferior.

El patrón observado en el caso correspondiente a $A_{\alpha 1AT}$ corresponde a la protección de los hexanucleótidos reportados como análogamente protegidos para los genes $\alpha 1-AT$ y Apo-A1 (Hardon y col. 1988); dicho hexanucleótido consenso se encuentra también presente en las secuencias de transferrina y antitrombina III, lo que posibilitó que los oligonucleótidos PRI_{Tf} y H_{AT3} compitiesen por LF-A1 como se vió anteriormente.

El patrón de bases interferentes se presenta en una disposición idéntica en los casos de PRI_{Tf} y de H_{AT3} , confirmando que estas dos

Figura 33



Determinación de los sitios de contacto de LF1 y LF-A1

Ensayos de interferencia de unión por metilación realizados sobre los oligonucleótidos PRITf, HAT3 y A α 1AT. 1 indica la hebra superior y 2 la hebra inferior. Los triángulos y cuadrados sólidos indican purinas interferentes y los abiertos indican sitios de interferencia parcial. En la parte inferior de la figura se muestra la síntesis de los resultados, en el caso de PRITf las hebras están invertidas para facilitar la comparación con HAT3.

regiones de DNA son reconocidas por el mismo factor hepático τ_f LF1. La secuencia que involucra los puntos de contacto con el factor, incluye también el hexanucleótido análogo a $A_{\alpha 1AT}$, pero se extiende más allá explicando por qué el oligonucleótido de la antitripsina no es capaz de competir por τ_f LF1, ya que en efecto carece de la secuencia completa necesaria para ser reconocido por el factor.

Motivos de contacto de τ_f LF1 y de LF-A1 determinados por interferencia de unión por metilación

Se indican en relieve las bases que metiladas interfieren con el reconocimiento de cada factor y la zona general de contacto se indica en negrita subrayada. Nótese que las hebras de PRI_{τ_f} se encuentran invertidas respecto de la convención generalmente utilizada, para facilitar la comparación. R indica puRina e Y pYrimidina.

LF-A1

$A_{\alpha 1AT}$

-128CCCAGCCAG**TGGACTTA@CCC**CTGTTTGCTC-98
GGGTCGGTC**ACCT@AATCGG@**GACAAACGAG

τ_f LF1

PRI_{τ_f}

-49TTGTCTGGGCGC**AATCTTT@ACCTC**CCGTGT-79
GACCCGCG**TTAGAACT@GAG**GGCACAAACA

HAT3

-92CCGGTCATC**ACCTTT@ACCTC**AGTTC-68
AGTAG**TCC@AACT@GAG**TCAAGGGCC

Consenso

ARYCTTT@ACCTC

TYRCAAACCT@GAG

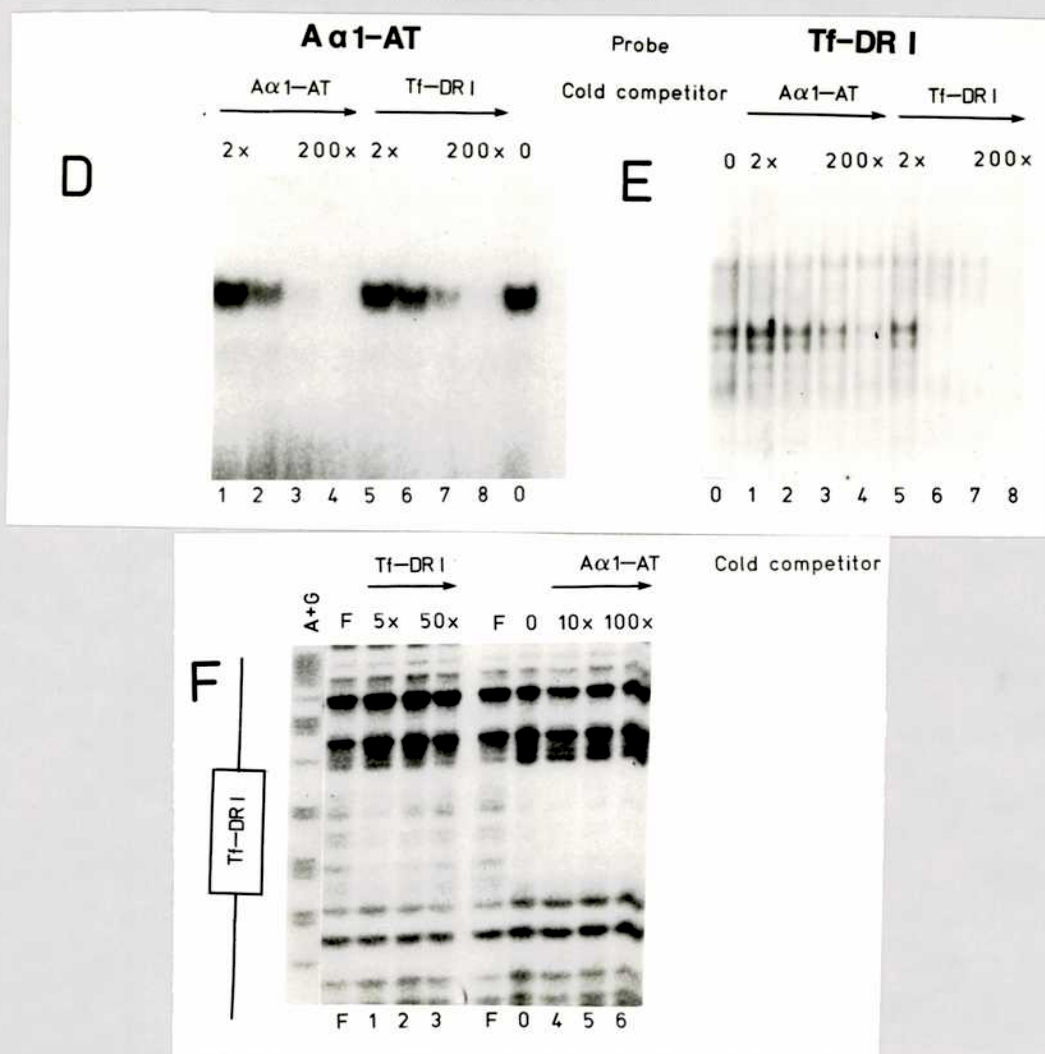
3) Caracterización de τ_f LF2

Estudio de la región análoga al sitio de reconocimiento de τ_f LF2 en $\alpha 1$ -AT, sitio de acción de LF-A1

La posibilidad que LF-A1 fuese la proteína que reconozca la región DRI_{τ_f} fue también considerada. Para estudiar esta relación se realizaron

distintos ensayos; primeramente el patrón de bandas obtenido por geles de retardamiento de DNA con de $(^{32}\text{P})\text{DRI}_{\text{Tf}}$ y $(^{32}\text{P})\text{A}_{\alpha 1\text{AT}}$ es distinto como se ve en las figuras 28 y 31. Este dato no es suficiente para asegurar que TfLF2 no sea LF-A1, ya que existen evidencias que el mismo factor puede dar patrones diferentes de migración dependiendo del DNA al que se encuentra ligado (Landschultz y col. 1988). Ensayos cruzados en geles de retardamiento de DNA indicaron que TfLF2 , marcado con $(^{32}\text{P})\text{DRI}_{\text{Tf}}$, no es competido por $\text{A}_{\alpha 1\text{AT}}$ (figura 34e), pobremente por $\text{H}_{\text{AT}3}$ (dato no mostrado) y PRI_{Tf} (como se vió en el capítulo anterior) y mucho mejor por el oligonucleótido homólogo (figuras 34e); la competición realizada por el método de "foot print" confirma este resultado (figura 34f). Por otro lado, LF-A1, marcado con $(^{32}\text{P})\text{A}_{\alpha 1\text{AT}}$, es competido pobremente por DRI_{Tf} y es mejor competido por el oligonucleótido homólogo ($\text{A}_{\alpha 1\text{AT}}$) como se ve en la parte d de la figura 34. Otro elemento a tomar en cuenta es la estabilidad térmica que indica que LF-A1 se inactiva a 65°C en tanto que TfLF2 resiste esta temperatura y es inactivado a 80°C . Estos elementos sugieren que el factor TfLF2 no es el factor que reconoce el dominio A de la $\alpha 1\text{-AT}$, es decir no es LF-A1.

Figura 34

Ensayos de competición para los factores LF-A1 y Tf-LF2

D) Ensayo de competiciones cruzadas por gel de retardo empleando como sonda al oligonucleótido (^{32}P)- $\text{A}\alpha_1\text{AT}$. Depósito 0: ensayo con 6 μg de extractos nucleares hepáticos en ausencia de competidores; 1 a 4: competiciones contra un exceso de 2, 10, 40 y 200 veces del oligonucleótido $\text{A}\alpha_1\text{AT}$ frío respectivamente; 5 a 8: competiciones contra un exceso de DRI_{Tf} frío de 2, 10, 40 y 200 veces respectivamente.

E) Ensayo de competiciones cruzadas por gel de retardo empleando como sonda al oligonucleótido (^{32}P)- DRI_{Tf} ; el orden de los depósitos es el mismo que en la figura a.

F) Ensayo de competiciones cruzadas por *foot print* sobre el fragmento de 210 bp *Hind* III-*Pst* I (-615/-405) del gen, de la hTf marcado en esta última posición A+G; F) DNA libre; 0) en ausencia de competidores; 1 a 3) competiciones contra un exceso de 5, 25 y 50 veces del oligonucleótido DRI_{Tf} respectivamente; 4 a 6) competiciones contra un exceso de 10, 50 y 100 veces del oligonucleótido $\text{A}\alpha_1\text{AT}$ respectivamente.

Capítulo III

Estudio de los factores que interactúan con las regiones PRIIT_f, CRT_f y DRIIT_f

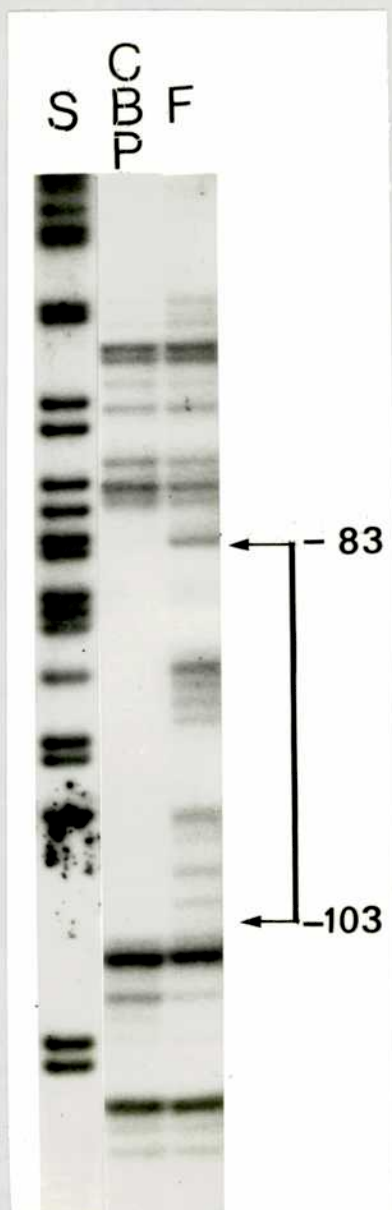
Introducción

Como se mencionó en el capítulo I, los factores que interactúan con las regiones PRIIT_f, CRT_f y DRIIT_f, no parecen ser tejido específicos, en tanto no se evidenciaron diferencias entre los ensayos realizados a partir de extractos hepáticos y de células HeLa. Sus sitios de reconocimiento incluyen módulos descritos en la literatura como sitio de unión de los factores C/EBP, CTF/NF1 y Sp1, para PRIIT_f, CRT_f y DRIIT_f respectivamente. En este capítulo se estudió la posibilidad de que dichas proteínas fuesen activas en cuanto al reconocimiento de secuencias en el gen, y por tanto que pudiesen ser factores reguladores de la expresión del gen de la transferrina humana.

Resultados

1) Caracterización del o los factores que interactúan con la región PRIIT_f

Como se describió en el capítulo I, la región que se denominó PRIIT_f (región proximal II) cubre los nucleótidos que van de la posición -103 hasta la posición -83. El factor responsable de la protección encontrada parece estar presente tanto en células hepáticas como en HeLa, y según los experimentos realizados por geles de retardamiento de ADN reconoce al oligonucleótido PRIIT_f de manera específica. Dentro de esta región se encontró una secuencia (5' CCAAT 3') en la hebra inferior; este pentanucleótido es característico del sitio de reconocimiento de una familia de proteínas que no están descritas como tejido específicas, y que actúan como factores de transcripción. La fijación de éstas se encuentra frecuentemente en la región promotora a alrededor de 80 bp cadena arriba del sitio cap, precisamente como el factor que reconoce la región PRIIT_f. Un experimento de determinación de improntas realizado en el laboratorio, con el factor C/EBP (CCAAT-Enhancer Binding Protein)

Figura 35

Ensayo de determinación de improntas realizado con el factor C/EBP purificado

Ensayo de determinación de improntas realizados sobre el fragmento de 180 bp *Dde* I-*Dde* I (-150*/+30) marcado en la posición -150. S indica secuencia A+G, CBP indica el ensayo realizado con el factor C/EBP purificado a partir de hígado (Johnson y col. 1987) y F corresponde al DNA libre.

purificado a partir de hígado (Graves y col. 1986 y Johnson y col. 1987) mostró que este factor es capaz de proteger la región PRII_{Tf} dando exactamente el mismo perfil que los extractos nucleares hepáticos (figura 35).

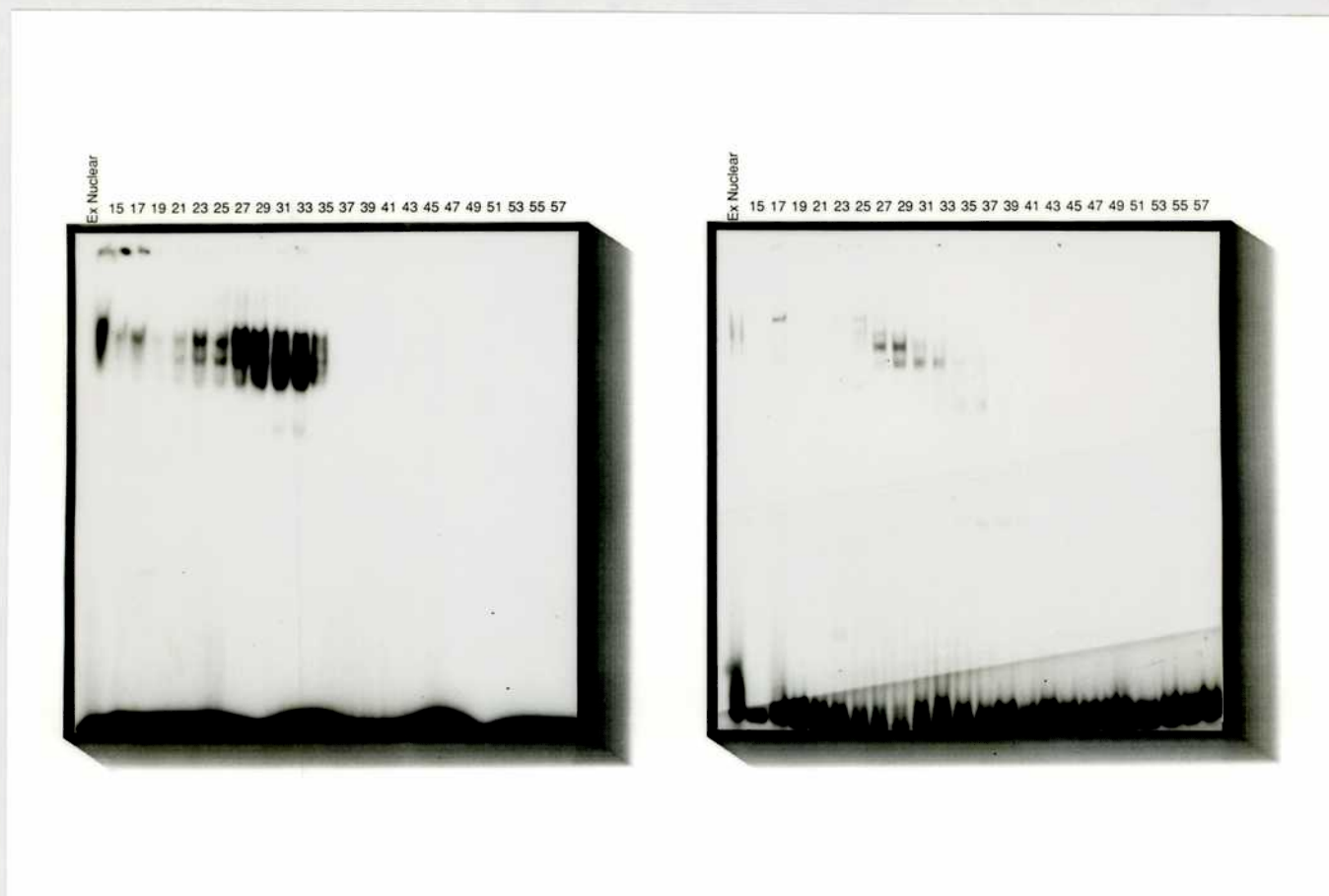
Como se indicó anteriormente los ensayos de inactivación térmica permitieron establecer que el factor que protege esta región se detecta por el método de "foot print" aun luego de calentar los extractos hepáticos o de células HeLa por 5 min a 80°C , comportandose como el factor C/EBP. Para caracterizar un poco más al factor se lo cromatografio a través de una columna de afinidad de PRII_{Tf} -sepharosa determinandose la actividad por geles de retardamiento de ADN con la sonda (^{32}P) PRII_{Tf} . Las fracciones activas que fueron eluidas con una concentración de KCl 0,5 M fueron reunidas y se las pasó por una columna de AcA34 para determinar el peso molecular aparente del o los factores en cuestión. La figura 36a muestra el perfil de elución determinado por geles de retardamiento de ADN. Los complejos que reconocen PRII_{Tf} no se separan mayormente entre si en función de su radio de Stokes, obteniendose para ellos un altos pesos moleculares aparentes (aproximadamente 200 a 100 kilodaltons).

La determinación de los sitios de contacto del o los factores que interactúan con PRII_{Tf} se realizó por el método de interferencia de reconocimiento por metilación, como se muestra en la figura 37. El patrón obtenido no es suficientemente claro, si bien confirma que la región PRII_{Tf} es reconocida por una "CAATT Binding Protein", ya que los sitios de contacto circunscriben el pentanucleótido CCAAT.

PRII_{Tf} o Región Proximal II

GAGGGGCGATTGGGCAACCCGGC
CCGCTAACCGTTGGCCGCTCC

Las evidencias aquí descriptas, así como la estabilidad térmica descripta anteriormente (ver figura 24) si bien no lo permiten afirmar con seguridad sugieren que el factor nuclear que se fija sobre PRII_{Tf} podría ser un C/EBP "like"

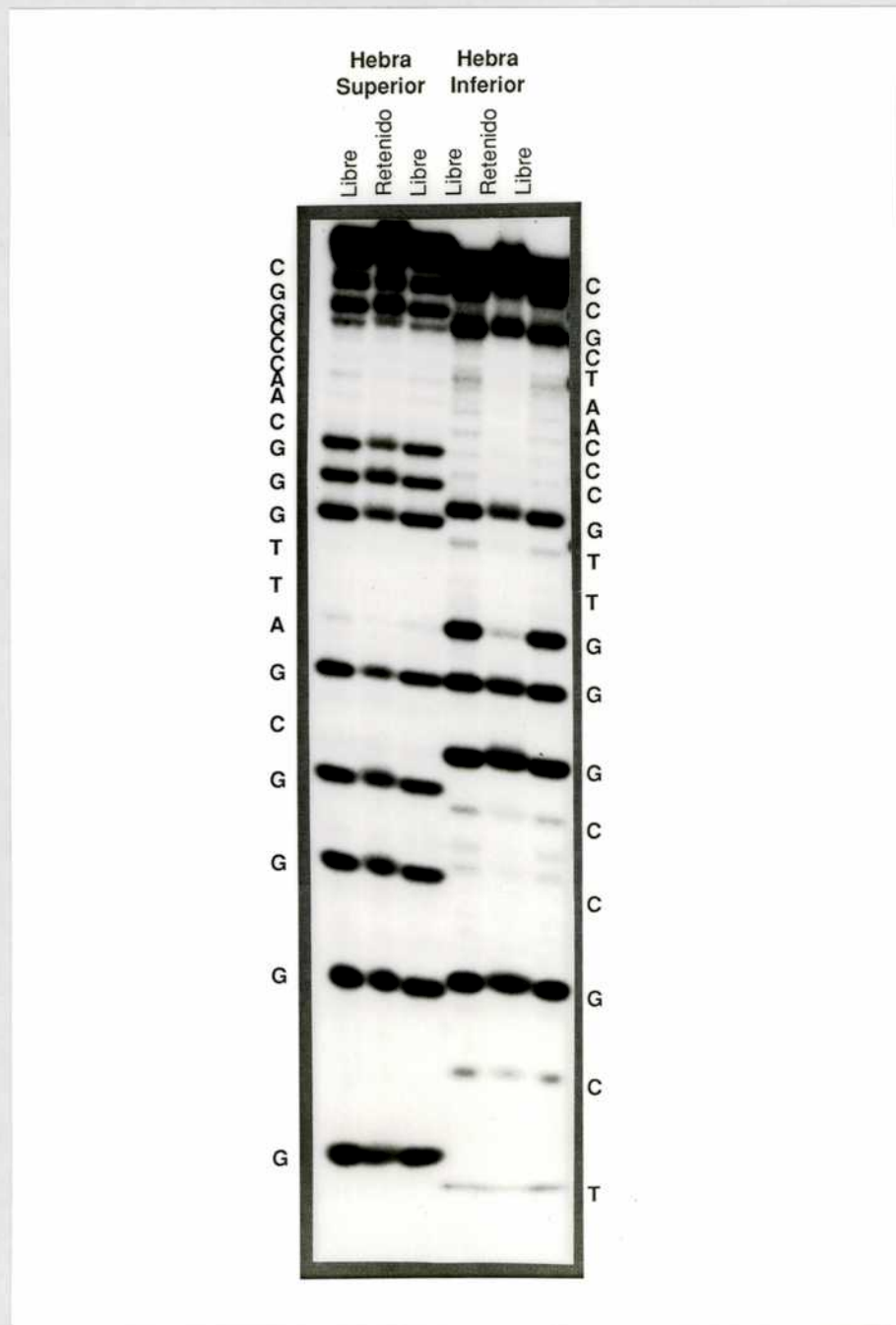
Figura 36

Filtración por geles de los factores que reconocen los oligonucleotidos PRII_{Tf} y DRII_{Tf}

Ensayo por geles de retardamiento de la filtración por AcA 34 de 1 ml de extracto nuclear bruto de hígado de rata, realizado como se describe en materiales y métodos. V₀: fracción 17; β-galactosidasa (400 kD): fracción 19; Piruvato kinasa (220 kD): 28; Creatina fosfokinasa (80 kD): 44; Vi: 47.

- A) Gel de retardamiento realizado con el oligonucleotido PRII_{Tf} marcado
 B) Gel de retardamiento realizado con el oligonucleotido DRII_{Tf} marcado

Figura 37



Ensayo de identificación de los puntos de contacto del factor que reconoce $PRII_{Tf}$.

Ensayo de interferencia de unión por metilación realizado sobre el oligonucleótido $PRII_{Tf}$ realizado como se describe en materiales y métodos

2) Estudio del factor que reconoce la región CR_{Tf}.

Como se describió en el capítulo II una impronta fue identificada entre los nucleótidos -193 y -162, que fue denominada CR_{Tf} por región central.

CR_{Tf} o Región Central

-193CTGTGCTGGACTCCTTCCACTCGCGGGTCGTC-162
 -193GACACGACCTGAGGAAGGTGAGCGCCAGCAG-162

Como se mencionó anteriormente, se identificó una alta homología dentro de la región central CR_{Tf} con el sitio consenso descrito para CTF/NF1 (5' TGG^A/C N₅ GCCAAT 3'). Este factor pertenece también a la familia CCAAT, y ha sido encontrado en distintos tejidos, existiendo la presunción que es un factor ubicuitario. En el caso que la impronta obtenida en la región CR_{Tf} fuese debida a la fijación de CTF/NF1 sería posible impedir la protección de la región compitiendo con otro ADN que contenga una secuencia de reconocimiento por el factor en cuestión. Ante la posibilidad de contar con un oligonucleótido incluyendo el sitio de fijación de NF1 presente en adenovirus 2 (NF1_{Ad}) se decidió realizar un ensayo de "foot-print" en presencia de un exceso de dicho oligonucleótido.

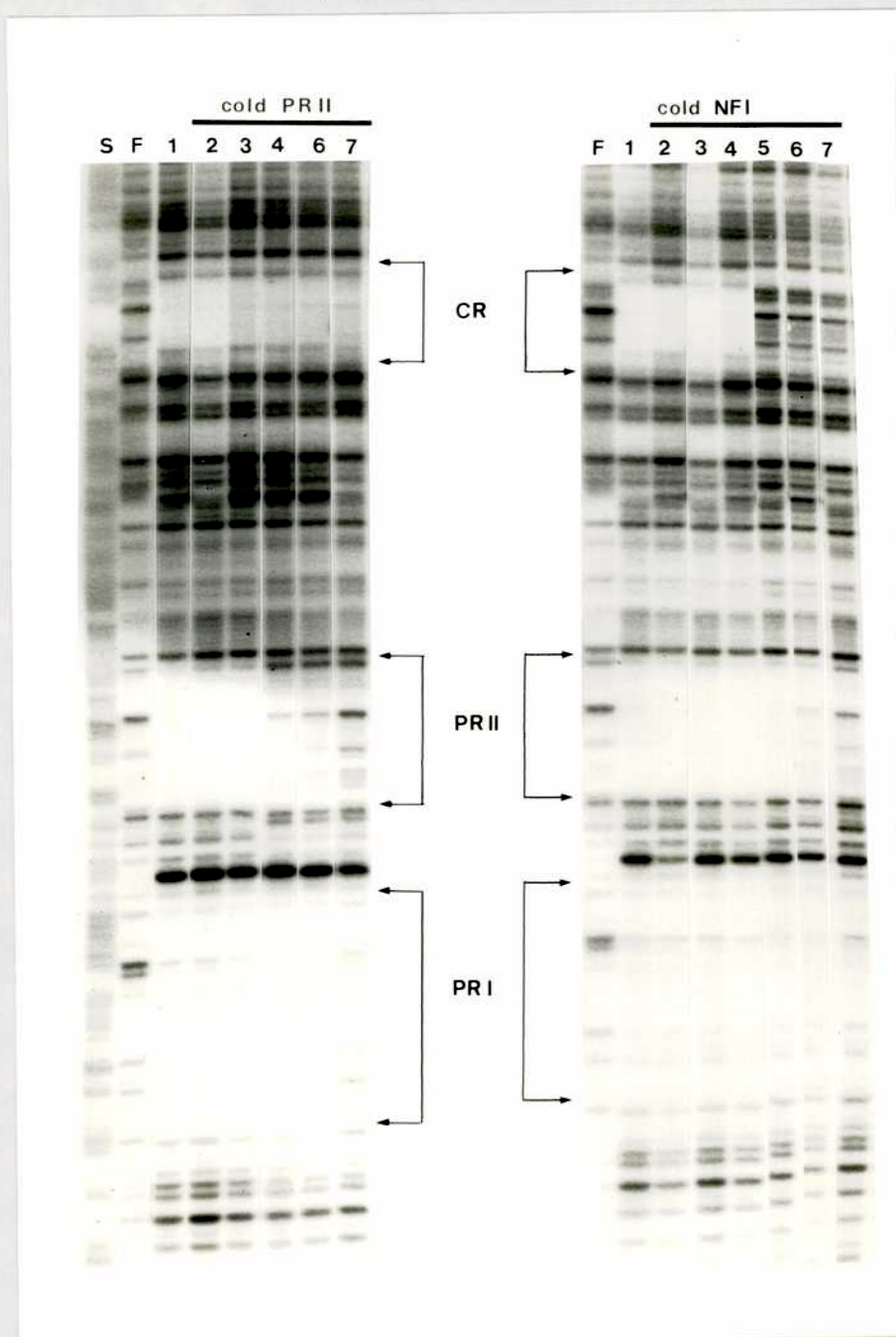
Oligonucleótido CTF/NF1 de Adenovirus 2 (NF1_{Ad})

TATT**TTG**ATTGA**AGCAAT**ATGATAATGA
 ATAAA**ACT**AACTTCGTTATACTATTACA

El ensayo indicó que el oligonucleótido es capaz de competir por el factor que se une a la región CR_{Tf}, como se ve en la figura 38; además se evidenció una competición menor por el factor que reconoce PR_{II}T_f, lo que podría justificarse por el hecho que los factores que reconocen ambas regiones son aparentemente pertenecientes a la misma familia de proteínas-CCAAT. El caso contrario se observó en el experimento en que se empleó como competidor frío al oligonucleótido PR_{II}T_f, indicando que los factores son distintos y también en este caso se observa una mínima competición cruzada, confirmando que están relacionados (figura 38).

La competición contra el oligonucleótido de adenovirus sugiere que la protección observada en CR_{Tf} podría deberse al factor CTF/NF1,

Figura 38



Ensayos de competición de las regiones CCAAT de la hTf

Ensayos de competición realizados por el método de *foot print* sobre el fragmento de 300 bp *Nar I-Pst I* (-310/-10) marcado en la posición -10 empleando como competidores a los oligonucleótidos PII_{Tf} y NF1_{Ad}. S indica secuencia A+G, F corresponde al DNA libre. Los depósitos 1 a 7 corresponden a competiciones con un exceso de competidor frío de 5, 10 15, 20, 50 100 y 200 veces respectivamente

teniendo en cuenta además que este factor esta presente en células HeLa y en hepatocitos. Un ensayo posterior se realizó para determinar la relación existente entre el factor que protege la región CR_{Tf} y CTF/NF1. Este último, purificado a homogeneidad a partir de células HeLa (Jones y col. 1987), fue utilizado para realizar una determinación de improntas. Como se observa en la figura 39 el factor protege la región CR_{Tf}, presentando un perfil idéntico al obtenido con los extractos nucleares hepáticos (otra protección, pero más débil, fue observada en la región PR_{II}_{Tf}) Estas evidencias sugieren que el factor que reconoce la región CR_{Tf} es CTF/NF1 o una proteína nuclear similar.

3) Caracterización del factor que reconoce la región DR_{II}_{Tf}

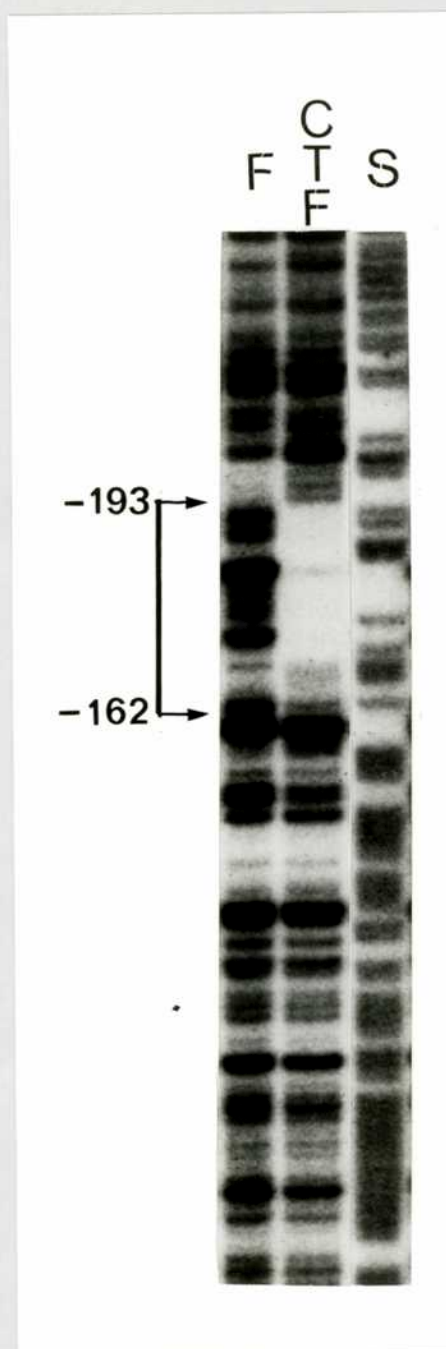
La quinta región que se detectó por el método de foot print, a la que se llamó DR_{II}_{Tf}, se extiende entre los nucleótidos -614 y -591. El factor que reconoce esta secuencia lo hace en forma específica y no es competido por los oligonucleótidos correspondientes a las otras regiones protegidas de la transferrina. Como se comentó anteriormente en esta región se encontró una secuencia correspondiente al módulo de reconocimiento de un factor ubicuo llamado Sp1 ("Specific Protein 1" Dynan y col. 1983, y Kadonaga y col. 1986). La caja "GC", correspondiente al sitio de reconocimiento de este factor (5' GGCGGG 3') se encuentra en el extremo 5' de la región DR_{II}_{Tf}, subrayada en el esquema que se muestra a continuación

DR_{II}_{Tf} o Región Distal II

-614GAGGCGGGGAAGTTTCCAGCCCA-591

-614CTGGCGGGCTTCAAAGGTCGGGT-591

La posibilidad de contar con el factor purificado permitió realizar un experimento de determinación de improntas. El factor utilizado se mostró activo protegiendo los módulos "GC" presentes en el promotor de SV40 (resultado no mostrado), pero cuando fue utilizado en la determinación de improntas sobre los distintos fragmentos del gen de la hTf no se detectaron protecciones en ninguna región, ni dentro de DR_{II}_{Tf} ni en otra caja "GC" presente entre los nucleótidos -47 y -42, indicando que la región DR_{II}_{Tf} no sería el sitio de acción de este factor.

Figura 39

Ensayo de determinación de improntas realizado con el factor CTF/NF1 purificado

Ensayos de identificación de improntas realizado sobre el fragmento de 300 bp *Nar I-Pst I* (-310/-10) marcado en la posición -10. S indica secuencia A+G, CTF indica el ensayo realizado con el factor CTF/NF1 purificado a homogeneidad a partir de células HeLa (Jones y col. 1987) y F corresponde al DNA libre.

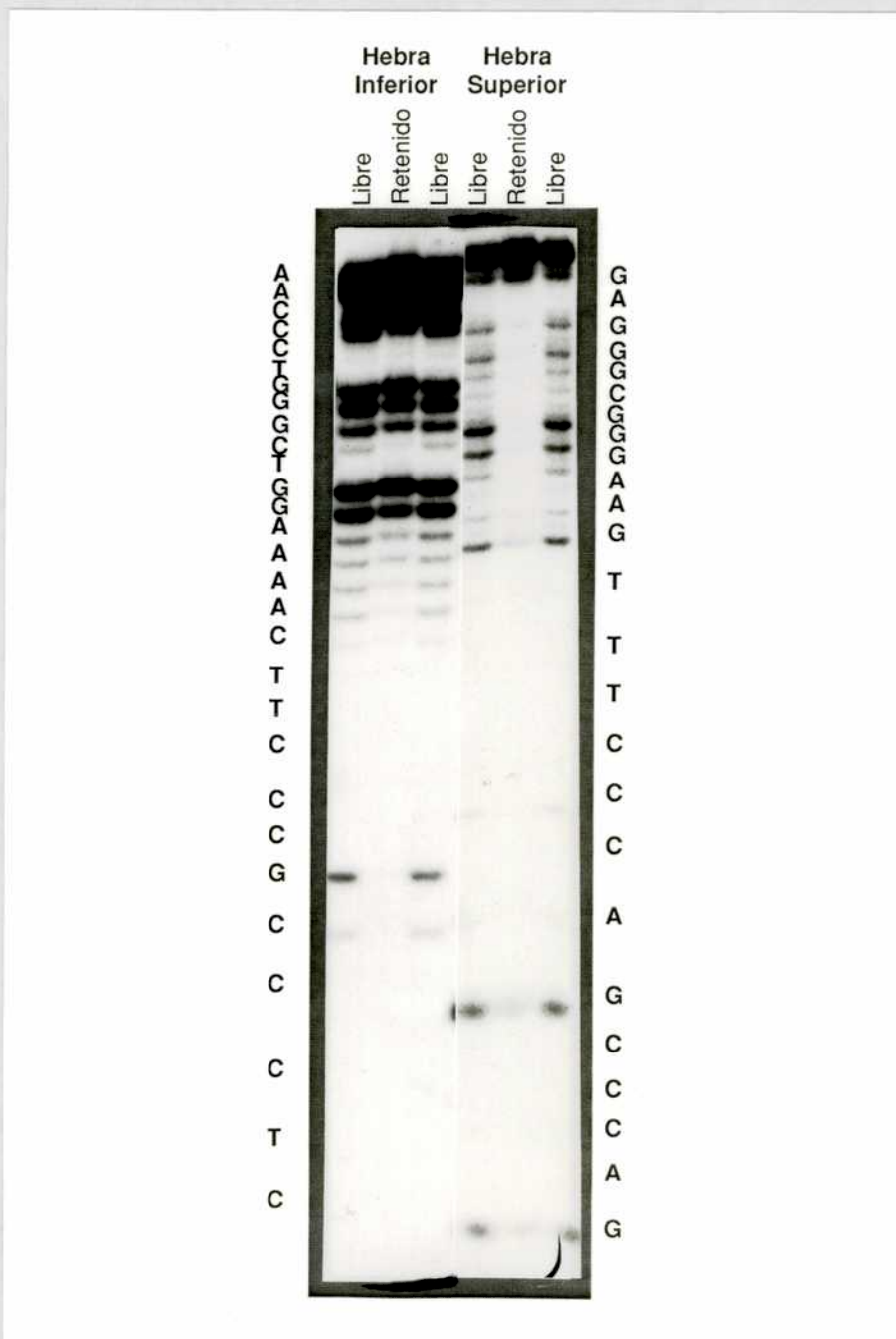
El o los factores que reconocen DRII_{Tf} fueron parcialmente purificados por filtración a través de tamices moleculares (figura 36b) y posteriormente por columnas de afinidad de DRII_{Tf}-sepharosa. Los complejos fueron identificados por geles de retardamiento de ADN en las distintas fracciones eluidas, como se vió en la figura 36b las proteínas o complejos que reconocen DRII_{Tf} parecen ser de pesos moleculares variados. Un análisis por PAGE-SDS de las proteínas presentes en las fracciones purificadas luego de la columna de afinidad permitió identificar un enriquecimiento relativo de un polipéptido de alrededor de 80.000 kD (dato no mostrado) si bien la preparación dista de ser pura.

El análisis realizado por el método de interferencia de reconocimiento por metilación permitió identificar los puntos de contacto del factor sobre el oligonucleótido como se puede ver en la figura 40. En el esquema que se muestra a continuación se destacan las bases identificados como sitios de contacto.

Sitios de interferencia sobre DRII_{Tf}
 GCTTGAGGGCGGGAAGTTTTCCAGCCCAGGGCTT
 CGAACTCCC GCCCTTCAAAGGTTCGGGTCCCGAA

Un análisis más detallado del sitio consenso de reconocimiento de Sp1 fue (presentado por Kadonaga y col. 1986 y Briggs y col. 1986) dando una secuencia (5' G/T GGGCGG G/A G/A C/T 3'), si bien la secuencia del sitio de reconocimiento de DRII_{Tf} no coincide plenamente con ellos, se puede ver que los sitios de contacto están centrados en la caja "GC", indicando que este factor es de alguna manera "Sp1-Like".

Figura 40



Identificación de los puntos de contacto del factor que reconoce DRII_{Tf}.

Ensayo de interferencia de unión por metilación realizado sobre el oligonucleótido DRII_{Tf} realizado como se describe en materiales y métodos

DISCUSION

Descripción general del mecanismo de transcripción.

Recientemente ha sido establecido que en la propia secuencia nucleotídica de un gen existen elementos que regulan su expresión, es decir elementos en "*cis*" con dicho gen. Estos elementos de la matriz genómica son reconocidos por factores del núcleo que no pertenecen al DNA, es decir que actúan en "*trans*". Aun si el mecanismo preciso no ha sido todavía completamente comprendido, la información acumulada sugiere que, en gran parte, el nivel de la expresión génica es el resultado del efecto combinado de una serie de factores trans interactuando con múltiples secuencias cis.

Secuencias ubicadas en regiones alejadas del sitio de iniciación de la transcripción se han revelado de importancia como reguladoras de la expresión. Estas secuencias han sido encontradas dentro de intrones [como en el caso del primer activador descrito en eucariotes, que actúa aumentando el nivel de la expresión de los genes de inmunoglobulinas (Augereau y col. 1986)], en la región 5' lejana [como para la albúmina de rata a 10 kbp del sitio cap (Pinker y col. 1987)] y en la región 3' [a cinco kb del sitio de poliadenilación del gen del receptor de células T (Krimpenfort y col. 1988)]. Sin embargo, en la mayoría de los casos las primeras 100 a 200 bp juegan un *rol* crucial en la eficacia y selectividad de la expresión en distintos tipos de células. La tendencia actual es de llamar "*región promotora* o *promotor*" a la secuencia cercana al sitio cap que es necesaria y suficiente para permitir la expresión eficiente y precisa de un gen cuando es transfectado. En el caso que dicha expresión no se manifieste más que en ciertos tipos celulares, se trata entonces de un promotor tejido específico. En general los elementos que se encuentran en el promotor son una región rica en "AT" que se denomina caja "TATA" o de "Hogness-Goldberg" y uno o más módulos llamados "UPEs" (Upstream promotor elements), en muchos casos uno de ellos lleva una caja "CCAAT" (Dorn y col. 1987; Raymondjean y col. 1988). Existen también descriptas secuencias que no siendo necesarias para la

transcripción la modulan de una manera positiva ("*activadoras*") o negativa ("*inhibidoras*") [como los receptores de hormonas esteroides o los sitios de regulación por metales] Un tipo especial dentro de estas secuencias moduladoras son los llamados "*enhancers*" y "*silencers*" (Brand y col. 1985) que actúan en general en forma independiente de la orientación y la posición en que se encuentren, modulando la expresión hasta a varias kilobases de distancia del sitio de iniciación.

Los elementos que actúan en cis consisten en una cantidad limitada de módulos de alrededor de 10 a 12 bp a los cuales se unen diferentes proteínas. El complejo final, que debe ser activo transcripcionalmente, es el resultado de las interacciones proteína-DNA y proteína-proteína de los elementos cis y trans que lo conforman.

Las evidencias recientemente acumuladas indican que la expresión tejido específica es conferida por la interacción de factores trans, presentes en un determinado sistema, con sus sitios de reconocimiento en el DNA, ya sea en secuencias promotoras o activadoras ("*enhancers*"). Alternativamente, como fue demostrado en el caso del gen humano de la proteína que une retinol ("*RBP*") la expresión tejido específica puede estar determinada por un mecanismo de control negativo, en este caso, la presencia de represores en los tejidos donde el gen no se expresa, inhiben la transcripción (Colantuoni y col. 1987).

En la mayoría de los casos distintos sistemas vivos (cultivos celulares o animales) transcriben apropiadamente genes exógenos cuando estos son introducidos en ellos por microinyección o transfección (Brinster y col 1982 y 1986; Palmiter y col. 1986). Esto implica que la información para la expresión es una propiedad constitutiva del aparato transcripcional de la célula. Esto permite la utilización de genes mutados, obtenidos por remplazos de determinadas secuencias y/o deleciones, para identificar los elementos "cis" que son activos en dicho sistema o tipo celular. A su vez para que la presencia de un determinado dominio de DNA altere el nivel de expresión obtenido, es necesaria la presencia, en dicho sistema, de los elementos capaces de decodificar esta información. Es decir por más que un determinado gen conteniendo la información en "cis" necesaria para su expresión sea introducido en distintos tipos celulares, por transfección o por la construcción de animales transgénicos, solo va a ser expresado en el sistema donde se

encuentren disponibles los factores con los que debe interaccionar para dar el complejo de iniciación transcripcional. Por lo tanto muchas cuestiones relacionadas con el mecanismo molecular de la expresión tejido específica de los genes pueden ser abordadas a través de la identificación de estos factores trans, específicos de un tipo celular o no, y estudiando como son a su vez regulados ellos mismos.

Un determinado tipo celular se caracteriza por las proteínas que expresa, o sea que en él están presentes los elementos trans para decodificar la información en cis de sus genes específicos. Esto implica que en este sistema, no siendo limitantes los factores *trans*-cripcionales para un transgen originario de este tejido, se puede modificar el DNA exógeno, por deleciones o recombinaciones, de manera de obtener información sobre qué regiones son importantes y cuál es la función que ellas cumplen, sea promotora, activadora, etc. Sin embargo todavía es necesario diferenciar el producto de la expresión del endógeno de la del transgen introducido. Para ello se debe modificar el producto a transcribir, sea poniendo bajo la regulación de la secuencia a estudiar el gen original con deleciones para hacerlo más pequeño (minigén) y por ende diferenciable, sea por cambiar directamente la secuencia estructural. Un marcador en este caso cuya utilización se ha difundido últimamente es el gen bacteriano que codifica para la enzima Cloranfenicol acetil transferasa (Overbeek y col. 1985), cuya actividad, ausente en eucariotes, es fácilmente medible, por lo que ha sido utilizado en este trabajo.

Discusión de las observaciones descriptas en este trabajo

Resultados I

Animales transgénicos.

Poco es lo que se puede decir de estos resultados, solo que son los primeros ensayos en la obtención de sistemas transgénicos para el estudio del gen de la hTf.

Con respecto a los experimentos realizados con el minigén mgTf, de 35 animales nacidos de huevos microinyectados con dos preparaciones distintas del minigén no se obtuvo ningún ratón transgénico, siendo que la estadística de obtención que registra la literatura oscila entre 10 y 30 % respecto del total de huevos microinyectados (Wagner y col. 1985 y Brinster y col. 1986). Dos posibles explicaciones podrían dar cuenta de estos resultados, por un lado simplemente que las dos preparaciones del minigén utilizadas estaban contaminadas con alguna sustancia tóxica para los huevos, cosa que no parece posible porque el número de animales nacidos de las cigotas inyectadas está dentro de lo esperado (10 %), además la preparaciones se realizaron en forma análoga para los distintos minigenes; la otra posibilidad es que el producto de transcripción obtenido sea letal en alguno de los estadios embrionarios, teoría que es difícilmente comprobable.

En cuanto a los estudios realizados con el minigen mgTf-CAT, por experimentos de transfección transitoria se ha verificado que la región entre las posiciones -4000 y +39 posee los elementos necesarios para ser reconocida por la maquinaria transcripcional presente en las células de hepatomas en cultivo cuando es introducida en estas por coprecipitación con fosfato de calcio. Esto implica que el promotor de la hTf se encuentra inscripto dentro de esta secuencia. Además, se pudo determinar que los elementos contenidos en dicha región no son suficientes para permitir la expresión en células HeLa o bien alguno de ellos actúa en forma tal como para impedir dicha expresión, a partir de estos elementos se esperaba la expresión tejido específica del transgen en los animales transgénicos.

En los experimentos "in vivo" sobre 31 animales nacidos de cigotas microinyectadas con mgTf-CAT se obtuvieron cinco animales transgénicos, dos de los cuales se perdieron antes de poder establecer una cepa. En los tres restantes se verificó que llevan el transgen integrado en arreglos en tandem de múltiples copias como ha sido descripto para varios genes (Brinster y col. 1986).

Respecto de la ausencia de expresión observada en las tres líneas hasta ahora estudiadas existen varias probables justificaciones. Las secuencias procarióticas del vector fueron descriptas como inhibidoras putativas de la expresión para el caso de la β -globina (Townes y col.

1985), la α -actina (Krumlauf y col. 1985) y la α -fetoproteína (Hammer y col. 1985), si bien muchos animales transgénicos obtenidos llevando secuencias plasmídicas expresan correctamente el transgen. Otra posibilidad es que la expresión del gen implique la presencia de ciertos elementos que permitan la apertura y decondensación de la cromatina en la región circundante. Sitios de fijación a la matriz nuclear o de acción de topoisomerasas podrían, en cierto estadio del desarrollo, hacer accesible la secuencia en cuestión a la maquinaria transcripcional de la célula y una vez abierta la cromatina no ser más necesarias. Krimpenfort y col. (1988) no pudieron obtener animales transgénicos que expresaran la cadena β del receptor de células T hasta que incluyeron en el transgén 11 kbp de la región 3' no codante; posteriormente observaron que un fragmento de 550 bp ubicado en 3' a 5 kbp del sitio de poliadenilación es necesario para la expresión en ratones transgénicos, además de actuar como un enhancer. Una tercera posibilidad no descartada (postulada por Palmiter y col. 1986) es, por contrapartida, la presencia dentro de la secuencia insertada de "silencers" (Brand y col. 1985) que serían reconocidos por proteínas presentes solo en un determinado período del desarrollo.

Estos argumentos podrían dar cuenta de la ausencia de expresión de un transgen dentro de células que han recorrido todo un camino de diferenciación, por oposición a su expresión claramente observada en los experimentos de transfecciones transientes. En estos últimos la transcripción se efectúa en células ya diferenciadas y el DNA es introducido en un estado distinto del de la cromatina, libre de proteínas, o sea accesible a la acción de la maquinaria transcripcional. Esta situación fue reportada para la α -fetoproteína (Vogt y col. 1988) en la que el promotor es suficiente para dirigir la expresión en células hepáticas transfectadas en tanto que si la transfección se realiza sobre células embrionarias F9 y luego se induce la diferenciación solo se expresan los vectores que llevan el promotor y el enhancer. En el caso de la hTf, como se comenta más adelante, se encontró un enhancer dentro de la región (-4000/+39), lo que indicaría que éste no es suficiente para permitir la activación del gen durante la diferenciación. La ausencia de expresión también podría deberse a la falta de un factor de transcripción, ya que estos también están sometidos a una expresión diferencial durante la diferenciación celular (Cereghini y col. 1988; Panduro y col. 1987).

Actualmente se sigue intentando la obtención de animales que expresen correctamente un transgén hTf a partir de distintas construcciones que carecen de secuencias plasmídicas. La obtención de éstos permitirá encarar los estudios de regulación de la expresión de la hTf en distintos tejidos para diferentes etapas del desarrollo.

Resultados II

1) Determinación de elementos cis presentes en la región 5' del gen de la hTf.

Experimentos de transfecciones transientes fueron implementados para estudiar la regulación de la expresión del gen de la hTf; para ello, como se vio, fue construido un vector en el que un fragmento de 4000 bp de la región 5' no codante del gen se colocó delante del gen estructural CAT. El fragmento (-4000/+39) de la región 5' del gen de la hTf es capaz de dirigir la expresión tejido específica del gen en células de hepatoma, implicando que dentro de esta región se encuentran, al menos, los elementos necesarios para dirigir la expresión en este tipo de tejido. Por el contrario dentro de esta región o no están presentes los elementos necesarios para ordenar la activación de la maquinaria transcripcional de las células HeLa o existe algún elemento negativo que impide dicha activación.

Una región del mismo fragmento, pero reducida a 659 bp (-620/+39) contiene aun los elementos necesarios para dirigir la expresión tejido específica del gen CAT en los experimentos de transfecciones transientes, evidenciando que los elementos promotores están todavía contenidos dentro de esta región, siendo siempre insuficientes o inhibidores para la expresión en HeLa.

El nivel de actividad alcanzado por la enzima CATsa en los cultivos transfectados por este vector es aproximadamente la mitad del que se alcanza con el fragmento de 4000 bp entero. Esto presupone la existencia en la región (-4000/-620), de elementos que en su conjunto actúan como

activadores. Un análisis más fino realizado posteriormente en el laboratorio (Shaeffer y col., manuscrito en preparación), confirmó la presencia de una región enhancer ubicada entre -3600 a -3300 que actúa también sobre un promotor heterólogo (SV40) en forma independiente de su posición y orientación. Los últimos experimentos realizados en el laboratorio indican la presencia de zonas protegidas por extractos nucleares hepáticos identificadas por el método de improntas dentro de esta región.

Asimismo estos análisis de transfecciones revelaron que la regulación tejido específica de la expresión parece no deberse a ningún elemento negativo presente en la región de (-4000/-119) ya que este fragmento colocado delante del promotor de SV40 no impidió la expresión del gen CAT en células HeLa. Aunque estos resultados no descartan la posibilidad que algún elemento negativo actúe sobre el promotor de transferrina en células HeLa, esta posibilidad parece improbable.

2) Estudios "in vitro" de la interacción entre factores nucleares y la región 5' del gen de la hTf

Otras metodologías utilizadas en el estudio de la regulación de la transcripción emplean técnicas "in vitro". Entre ellas el método de determinación de impronta sobre el DNA, geles de retardamiento de DNA e interferencia de reconocimiento por metilación. Estas técnicas permiten estudiar las relaciones fisicoquímicas entre determinadas regiones de DNA y factores proteicos que las reconocen así como cofactores diversos.

Identificación en la región 5' (-650/+30) de sitios de reconocimiento de factores nucleares.

Experimentos de determinación de improntas con DNAsa I permitieron identificar la presencia de varios factores nucleares que interaccionan con la región de 659 bp. Con extractos provenientes de hígado de rata o humano así como con provenientes de hepatomas humanos en cultivo se identificaron cinco regiones protegidas que fueron llamadas según su posición respecto del sitio cap $PRITf$, $PRIIIf$, $CRIf$, $DRIf$ y $DRIIIf$. Bajo las mismas condiciones experimentales extractos nucleares provenientes de cultivos de células HeLa determinaron un

patrón de protección de DNA tan solo en tres de las cinco regiones. Esto implicaría que los factores hepáticos responsables de la protección de las regiones PRI_{Tf} y DRI_{Tf} no son activos en células HeLa, o están ausentes o en baja concentración. Los cinco factores parecen ser distintos entre sí y todos reconocen específicamente las secuencias correspondientes a sus sitios de unión en el DNA, cuando estas se encuentran en oligonucleótidos.

3) Promotor proximal

Los análisis de diferentes construcciones obtenidas por deleciones en el extremo 3' del fragmento de (-4000/+39) de la hTf dentro del vector Tf-CAT, permitieron identificar una región de 74 bp que contiene elementos necesarios para la transcripción tejido específica, ya que el vector que contiene la región (-4000/-45) del gen de la hTf es capaz de dirigir la expresión del gen CAT solamente en las células de hepatoma, en tanto que otro que va de (-4000/-119) carece de actividad promotora indicando que los elementos presentes en dicha región (-119/-45) son requeridos para la transcripción.

Significativamente la presencia o ausencia de la región semejante a la caja TATA no altera la transcripción, dato que es coherente con los experimentos de determinación de improntas en los que no se encontró protegida dicha región, indicando ésto que no solo dicha secuencia no es reconocida por factores presentes en células hepáticas o HeLa, sino que tampoco su presencia es necesaria para la transcripción. El comportamiento de la hTf es en este sentido distinto del descrito para el gen de la ovotransferrina o conalbúmina de pollo, en el que la secuencia de la caja TATA es el sitio de reconocimiento de un factor y en el que la región, que la incluye abarcando las primeras 44 bases hacia 5' del sitio cap es suficiente para dar una expresión en hígado y en oviducto en forma específica (Dierich y col.1987)

El dato combinado de la expresión de los vectores (-625/+39) y (-4000/-45)Tf-CAT, permite globalmente acotar la región promotora a un fragmento de 580 bp (-625/-45). dentro del cual se inscriben las cinco regiones que se identificaron como sitios de unión de factores hepáticos. Además, la ausencia de actividad observada en la construcción (-4000/-

119) indica que la región que va de -119 a -45 respecto del sitio cap contiene elementos que son imprescindibles para la transcripción. Dentro de esta secuencia se encuentran las dos regiones proximales definidas dentro del gen de la hTf, PRI_{Tf} y PRII_{Tf}. Experimentos posteriores realizados en el laboratorio (Shaeffer y col.) han confirmado la importancia de esta región acotando el promotor mínimo del gen a un fragmento que va de la posición -125 a -45 y que conserva la tejido especificidad en lo que respecta a células hepáticas y HeLa. Esto indicaría que la sola presencia de los sitios PRI_{Tf} y PRII_{Tf} en acción coordinada con los factores transcripcionales que los reconocen sería suficiente para permitir el anclaje de la RNA-polimerasa II y los otros factores necesarios para conformar un complejo de iniciación de la transcripción activo. Es de destacar que las regiones PRI_{Tf} o PRII_{Tf} separadas no fueron suficientes para dirigir la expresión del gen CAT, indicando que es necesaria la interacción de los dos factores que reconocen estas secuencias.

4) Estudio de la región PRI_{Tf} y del factor TfL.F1

Los resultados mencionados llevaron a intentar estudiar algo más detalladamente las regiones promotoras, fundamentalmente PRI_{Tf}, que las evidencias señalaban como la responsable de la tejido especificidad. Es de señalar que en el momento de realizados estos experimentos no se encontraba descrito en la literatura ningún factor de transcripción hepato-específico, ni aun ninguna proteína que reconociera secuencias hepáticas aunque no se le hubiera asignado todavía una actividad transcripcional (1986-1987); la primera descrita fue HNF1, reportada por Courtois y col. en 1987. Posteriormente Kugler y col. (1988) mostraron que elementos promotores de los genes de la albúmina, la α -1 antitripsina (dominio B), y del β -fibrinógeno, todos unen una proteína común que sería HNF1. Por otro lado Costa y col.(1988) describieron una proteína que se une a secuencias de DNA específicas de proteínas expresadas en hígado y que reconoce múltiples secuencias nucleotídicas en regiones regulatorias en los genes de la α 1 antitripsina, transthyretina, la albúmina y de SV40.

Las regiones PRI_{Tf} y DRI_{Tf} contienen cada una un decanucleótido idéntico ubicado en hebras distintas y ambas son protegidas de manera

tejido específica, ésto indicaba la posibilidad de que en nuestro caso también se tratase de un mismo factor. Experimentos de competencias cruzadas en geles de retardamiento y "foot print", identificación de sitios de contacto así como una caracterización térmica permiten en conjunto concluir que T_fLF1 y T_fLF2 , las proteínas que se fijan sobre los sitios PRI_{Tf} y DRI_{Tf} respectivamente, son factores hepáticos distintos.

4a) Estudio de la región análoga a PRI_{Tf} y DRI_{Tf} en ATIII

Los elementos PRI_{Tf} y DRI_{Tf} de la transferrina no son solo homólogos entre sí sino que comparten secuencias análogas, un decanucleótido común, con una serie de regiones 5' de genes que se expresan en distintos tejidos (ver capítulo II), entre ellos el gen hepático de la antitrombina III (AT III). La secuencia análoga en dicho gen se encuentra dentro de una región promotora mínima que presenta la tejido especificidad, al menos en lo que respecta a células de origen hepático respecto de HeLa. La probabilidad de que T_fLF1 y/o T_fLF2 fuesen factores empleados para la transcripción de otros genes se estudió inicialmente en la AT III.

Estudiando el dominio análogo en dicho gen se encontró que también está protegido por extractos hepáticos en experimentos de determinación de improntas; además el factor responsable de la protección no se evidenció en extractos proteicos de células HeLa, como es el caso para T_fLF1 y T_fLF2 .

Experimentos de geles de retardamiento, foot prints, ensayos de competición cruzada así como de interferencia de reconocimiento por metilación, evidenciaron que el factor que reconoce la región H_{AT3} se comporta como si fuera T_fLF1 , el factor activo sobre la región PRI_{Tf} de la transferrina. El estudio detallado de los sitios interferentes de los factores que reconocen PRI_{Tf} y H_{AT3} permitió establecer un sorprendente grado de homología entre las bases presentes en el sitio de contacto con la proteína. Tan solo dos bases presentaron distinta importancia en estos experimentos, esto podría estar relacionado con las diferencias de afinidad registradas respecto de PRI_{Tf} y H_{AT3} . El motivo de reconocimiento es (5' APuPyCTTTGACCT 3').

Estas evidencias permiten inferir que la utilización del factor T_fLF1 no es prerrogativa exclusiva del mecanismo de iniciación de transcripción de la Tf, sugiriendo que este factor probablemente integre la batería de elementos de los que se sirve el hígado, en distintas y precisas combinaciones, para biosintetizar sus proteínas.

Por otro lado, como se comentó anteriormente, los experimentos de Shaeffer y col. (manuscrito en preparación) definieron una región más precisa entre los nucleótidos -125 y -45 que contiene los elementos necesarios y suficientes para expresarse de una manera tejido específica en células de origen hepático. Ninguna deleción en esta secuencia pudo convertir el promotor hepato-específico en uno que no lo fuera. En dicha región solamente fueron detectados dos elementos cis protegidos por el método de improntas, PRI_{Tf} y $PRII_{Tf}$. La responsabilidad del comportamiento tisular parece reposar sobre el factor que reconoce PRI_{Tf} , es decir sobre T_fLF1 , que además es necesario para la transcripción ya que $PRII_{Tf}$ se manifestó también protegida por extractos de HeLa. Sin embargo no es posible descartar totalmente la posibilidad que el factor responsable de la protección de $PRII_{Tf}$ en células HeLa y en hígado sea distinto; recientemente Paonessa y col. (1988) aislaron de extractos hepáticos una proteína semejante a NF1 pero no idéntica al factor CTF/NF1 ya descrito, indicando que aun los factores que se los identificaba como ubicuos pueden presentar características distintas según el tejido del que provengan.

4b) El factor hepático LF-A1 es distinto de T_fLF1 y de T_fLF2

Por otro lado, recientemente Hardon y col. (1988) describieron un factor específico de hígado, al que llamaron LF-A1 y que reconoce secuencias dentro de los promotores mínimos de $\alpha 1$ -antitripsina y apolipoproteína A I, dos proteínas séricas producidas por el hígado como es el caso de la Tf y de la AT III. La secuencia de reconocimiento de este factor indicada por los autores, esta inscrita dentro del decanucleótido análogo de PRI_{Tf} , DRI_{Tf} y HAT_3 como se vió en el capítulo III. Esta analogía de secuencias fue la única encontrada entre los factores específicos de hígado descritos y las regiones en estudio de la transferrina y de la antitrombina III, por lo que se presentó como

necesario confirmar o descartar la posibilidad que se tratase del mismo factor. Utilizando los mismos métodos experimentales con los que se estudió la región H_{AT3} fue posible verificar que LF-A1 no es el factor nuclear que interactúa ni con la región PR_{Tf} o H_{AT3} ni con DR_{Tf} . El oligonucleótido correspondiente al dominio A de la $\alpha 1AT$ que de hecho liga el factor LF-A1 dando el mismo patron de interferencia por metilación que el descrito en la literatura, se muestra incapaz de competir por los factores T_fLF1 o T_fLF2 en experimentos de geles de retardamiento como en determinación de improntas, ya que no tiene la secuencia suficiente para ser reconocido por el factor.

Por el contrario el hecho que los motivos que reconocen T_fLF1 y T_fLF2 contengan en su extremo 3' el hexanucleótido consenso indicado en los trabajos de Hardon y col., como esencial para el reconocimiento de una secuencia por LF-A1 podría ser la explicación de por qué el complejo LF-A1, marcado con $A_{\alpha iAT}$ es competido por los oligonucleótidos PR_{Tf} , H_{AT3} y DR_{Tf} .

Como resultados de estos experimentos se ha demostrado que tres factores distintos, presentes en extractos nucleares de hígado, T_fLF1 , T_fLF2 y LF-A1, pueden reconocer distintos subgrupos de regiones 5' reguladoras de la expresión génica conteniendo secuencias homólogas. Esto indica que la presencia de secuencias homólogas dentro de sitios de unión al DNA de factores trans no parece ser una condición suficiente "per se " para concluir que las proteínas que interactúan con las secuencias en cuestión son idénticas. Es interesante remarcar el caso de las proteínas-CCAAT, donde secuencias alrededor de las cajas CCAAT pueden determinar la unión de diferentes factores pertenecientes a la misma familia de proteínas (ver más adelante $PR_{II T_f}$).

El factor de transcripción COUP que interactúa con el promotor de ovoalbúmina (Bagchi y col. 1987) ha sido purificado ultimamente y se definieron los sitios de contacto con el DNA (Tsai y col. 1988). La posición de las bases interferentes es similar a las encontradas para T_fLF1 , sobre una secuencia con alto grado de homología. Sorprendentemente COUP ha sido detectado y purificado a partir de extractos proteicos provenientes de núcleos de células HeLa. Como se evidenció en este trabajo no se observaron protecciones en las regiones H_{AT3} y PR_{Tf} por el método de *foot print* en extractos provenientes de estas células. Además también

hemos demostrado que el promotor proximal de la transferrina, conteniendo solamente las regiones PRI_{Tf} y $PRII_{Tf}$, no es activo en células HeLa. Quizas la relación entre COUP y $TfLF1$ sea la misma que existe entre la proteína "NF1-L"(Liver) aislada de hígado (ver más arriba) y CTF/NF1 aislada a partir de células HeLa (Paonessa y col. 1988).

El hecho que COUP, $TfLF1$ y aun $TfLF2$ y LF-A1 pertenezcan o no a una misma familia de factores de transcripción es una pregunta que debe esperar todavía información estructural para ser respondida y para establecer una posible relación evolutiva o funcional.

Un estudio a realizar es verificar si la interacción de LF-A1 con las regiones de hTf (PRI y DRI) que se observó por geles de retardamiento, puede llegar a tener alguna significación funcional. En el sistema transcripcional este factor podría interactuar con el promotor de hTf, (aunque presente menor afinidad in vitro por esta región que la proteína LF1) y regular la expresión del gen quizás a través de un mecanismo de unión mutuamente excluyente. Lo mismo se piensa hacer para COUP, para lo que se están implementando ensayos de transcripción "in vitro". Este tipo de mecanismo fue observado en el gen de la $\alpha 1$ antitripsina humana (Monaci y col. 1988); una región protegida en "foot prints" constituye un sitio de reconocimiento para dos proteínas (LF-B1 y LF-B2), cuya unión a dicha secuencia es mutuamente excluyente.

Hasta el momento, varias proteínas implicadas en la expresión hepato-específica, además de $TfLF1$ y $TfLF2$, ya han sido identificadas. Ellas son HNF1 activo en los genes de la albúmina de xenopus, rata y ratón, de la $\alpha 1$ antitripsina humana, del β -fibrinógeno de rata y la α feto proteína de ratón (Courtois y col. en 1987 y Kugler y col. en 1988), LF-A1 como ya se mencionó para los genes humanos de la $\alpha 1$ antitripsina y la apolipoproteína A I (Hardon y col. en 1987), LF-A2 y LF-B1, también para la $\alpha 1$ antitripsina (Monaci y col. en 1988) y finalmente NF1-L para los genes humanos de la albúmina y de la RBP (Paonessa y col 1988)

5) Estudio de las regiones "CCAAT" presentes en el gen de la hTf

5a) Estudio de la región $PR_{II}T_f$

Como se mencionó anteriormente, $PR_{II}T_f$ se encuentra dentro del promotor mínimo del gen y comporta un módulo "CCAAT" en la hebra inferior. Los experimentos de competiciones cruzadas indican claramente que el factor que reconoce este elemento es distinto del que reconoce la región CR_{Tf} . La región $PR_{II}T_f$ es reconocida por el factor C/EBP purificado a partir de hígado, dando el mismo patrón de protección en los experimentos de improntas. Los geles de retardamiento realizados con extractos provenientes de células HeLa o hepáticas mostraron una serie de bandas que copurifican conjuntamente y que no se separan mayormente por su peso molecular. Esto podría deberse a proteólisis parciales del factor que reconoce este elemento o a que distintos factores similares son afines por el oligonucleótido.

En muchos de los genes estudiados se ha descrito que un elemento promotor UPE incluye un módulo "CCAAT". Este parece ser también el caso para el gen de la hTf . Los experimentos realizados en el laboratorio confirmaron que la presencia de este factor es necesaria para la actividad promotora, pero no es suficiente, necesitando también la presencia del elemento $PR_{I}T_f$.

5b) Estudio de la región CR_{Tf}

El factor que reconoce el elemento CR_{Tf} , también parece ser de la misma familia "CCAAT". La homología de secuencia con el factor ya descrito CTF/NF1 es importante, asimismo un oligonucleótido correspondiente al sitio de fijación de la proteína en adenovirus es capaz de competir eficientemente por el factor hepático o de HeLa que protege la región CR_{Tf} . Además, la misma proteína purificada a partir de células HeLa da un patrón de protección idéntico al obtenido con los extractos brutos. Estas evidencias sugieren fuertemente que el factor que reconoce este elemento de la región 5' de la hTf es CTF/NF1. Posteriores análisis son necesarios para confirmar esta teoría.

La idea de un factor único que actuaría sobre un elemento "CCAAT" ha sido arrasada por numerosas publicaciones sobre distintos factores pertenecientes a la familia "CCAAT" (Dorn y col. 1987;

Raymondjean y col 1988; Oikarinen y col. 1987; Goding y col. 1987; Hooft y col. 1987). Como se mencionó anteriormente en el trabajo de Paonessa y col. (1988) se purificó y clonó un factor de hígado "NF1-L(iver)" que reconoce (5' TGGCA 3'), la mitad de la secuencia canónica del sitio de unión de NF1 (presente en los genes humanos de la albúmina (Cereghini y col. 1987) y la proteína que une retinol, RBP); análisis de Northern revelaron especies diferentes de mRNA presentes en distintas combinaciones en cada tejido analizado. También se puso en evidencia que algunos factores "CCAAT" están compuestos por distintas subunidades heterólogas (Chodosh y col. 1988; Hatamoshi y col. 1988; van Wijnen y col. 1988). No solo se trata de productos probablemente de genes diferentes, sino que ultimamente también se ha comprobado que pueden provenir del mismo gen por "splicing" alternativo (Santoro y col. 1988, precisamente para el mismo factor CTF/NF1). Habiéndose descubierto recientemente que un factor de transcripción (Sp1) es una glicoproteína (Jackson y col. 1988), tampoco puede descartarse que distintas actividades correspondan a distintas glicosilaciones de un mismo polipéptido. Como si esto fuera poco el factor C/EBP ha sido clonado (Landschultz y col. 1988) confirmandose que en el mismo polipéptido se encuentra la actividad de reconocimiento "CCAAT" para la α globina (entre otros genes) y para el "enhancer core" común a varios virus; las dos secuencias reconocidas por la misma proteína son totalmente distintas, indicando que existen dos regiones de reconocimiento de DNA o una sola que es bifuncional. No solo dos funciones de activación se pueden encontrar en un polipéptido, el factor de levadura RAP1 purificado y clonado reconoce un elemento activador y un "silencer" (Shore y col. 1987). Estas apreciaciones que en general podrían ser confirmadas no solo para factores-CCAAT, sino para todos los factores específicos de iniciación, sintetizan el complejo desafío que implica el estudio del mecanismo de iniciación transcripcional.

6) Estudio de las regiones distales de la región 5' del gen de la hTf

6a) Estudio de la región DRIT_f

Los análisis cromatográficos y las caracterizaciones por resistencia a la temperatura, las competiciones cruzadas así como los distintos

patrones de retardamiento en geles y de metil interferencia permitieron clasificar al factor que interactúa con esta región, τ_f LF2, como un factor distinto de τ_f LF1 y de LF-A1. Los análisis realizados por transfecciones transientes (Schaeffer y col. en preparación) permitieron asignar una actividad positiva a la región de DNA correspondiente al sitio donde se encuentra DRI_{τ_f} , indicando la posibilidad de que τ_f LF2 sea, de hecho, un factor transcripcionalmente activo dentro del mecanismo general de iniciación

6b) Estudio de la región DRII_{τ_f}

El estudio de esta región recién se ha comenzado, por lo tanto no se tiene mucha información sobre ella. Este elemento es reconocido con alta afinidad por un factor o factores que parecen ser el/los mismos en hígado y en HeLa. El hecho de contener una caja "GC" dentro de su secuencia sugirió la posibilidad de ser el sitio de fijación de Sp1, situación que fue descartada por experimentos de determinación de improntas con Sp1 purificado de células HeLa, el cual no reconoció la región DRII_{τ_f} . La determinación de los sitios de contacto con la proteína confirmó esta apreciación, evidenciando puntos de interferencia distintos que los registrados por Sp1, aunque situados alrededor de la caja "GC", por lo que podría decirse que se trata de un factor "Sp1-like". Una búsqueda inicial por computadora en el banco de secuencias de Los Alamos indicó que secuencias análogas se encuentran en varios genes, entre ellos, significativamente el gen de la ATIII. La presencia también en este gen del sitio de reconocimiento de τ_f LF1 podría no ser casual indicando quizás una interacción entre los factores correspondientes.

REFERENCIAS

- Aisen, P. and Litowsky, I. (1980) Iron transport and storage proteins. Ann. Rev. Biochem. **49**, 357-393.
- Aldred, A.R., Dickson, P.W., Marley, P.D. and Schreiber, G. (1987) Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. J. Biol. Chem. **262**, 5293-5297.
- Anderson, B.F., Baker, H.H., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M. and Baker, E. N. (1987) Structure of human lactotransferrin at 3.2 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 1769-1773.
- Augereau, P. and Chambon, P. 1986. The mouse immunoglobulin heavy chain enhancer : effect on transcription in vitro and binding of proteins present in Hela and lymphoid B cell extracts. EMBO J. **5**, 1791-1797.
- Babinet, C., Farza, H., Morello, D., Hadchouel, M. and Pourcel, C. (1985) Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. Science **230**, 1160-1163.
- Bagchi, M.L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1987) Mol. Cell. Biol. **4**, 4151-4158.
- Bailey, S., Evans, R.W., Garratt, R.C., Gorinsky, B., Hasnain, S., Horsburgh, C., Jhoti, H., Lindley, P.F., Mydin, A., Sarra, R. and Watson, J.L. (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3.3 Å resolution. Biochemistry **27**, 5804-5812.
- Barnes, D. and Sato, G. (1980) Cell **22**, 649.
- Bazett-Jones, D.P., Yeckel, M. and Gottesfeld, J.M. 1985. Nuclear extracts from globin-synthesizing cells enhance globin transcription *in vitro*. Nature **317**, 824-828.
- Becker, P.B., Ruppert, S. and Schütz, G. 1987. Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. Cell **51**, 435-448.

- Bezkorovainy, A. (1987) Iron proteins Iron and Infection (Ed by John Wiley & Sons) 27 - 69.
- Bienz, M. and Pelhan, H.R.B. (1986) Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancers in the xenopus hsp70 gene and when linked to a heterologous promoter Cell, 45, 753.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523
- Bloch, B., Popovici, T., Levin, M., Tuil, D. and Kahn, A. (1985) Transferrin in oligodendrocytes of the rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6706-6710.
- Bodner, M., and Karin, M. 1987. A pituitary-specific *trans*-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. Cell 50, 267-270.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brand, A.H., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R. and Nasmyth, K. (1985) Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. Cell 41, 41-48.
- Briggs, M.R., J.T. Kadonaga, S.P. Bell, and R. Tjian. 1986. Purification and biochemical characterization of the promoter specific transcription factor Sp1. Science 243: 47.
- Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1982) Induction of foreign genes in animals. Trends Biochem. Sci. 7, 438-440.
- Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1986) Introduction of genes into the germ line of animals. Harvey Lectures, Series 80, pp. 1-38. New York: Liss.
- Brown, J.P., Hewick, R.M., Hellström, K.E., Doolittle, R.F. and Dreyer, W.J. (1982) Nature 296, 171.

- Bucher, P. and Trifonov, E.N. (1986) Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. Nucleic Acids Res. **14**, 10009.
- Buetti, E. and Diggelman, H. (1983) EMBO J. **2**, 1423 - 1429.
- Cao, Z., Barron, E.A., Carrillo, A.J. and Sharp, Z.D. (1988) Reconstitution of cell-type-specific transcription of the rat prolactin gene *in vitro*. Mol. Cell Biol. **7**, 3402-3408.
- Cedar H. (1988) DNA methylation and gene activity. Cell **53**, 3-4.
- Cereghini, S., Blumenfeld, M. and Yaniv, M. 1988. A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. Genes and Dev. **2**, 957-974.
- Cereghini, S., Raymondjean, M., Garcia Carranca, A., Herbomel, P. and Yaniv, M. (1987) Factors involved in control of tissue-specific expression of albumin gene. Cell **50**, 627-638.
- Chen, L.H. and Bissell, M.J. (1987) Transferrin mRNA level in the mouse mammary gland is regulated by pregnancy and extracellular matrix. J. Biol. Chem. **262**, 17247-17250.
- Chevrette, M., M. Guertin, B. Turcotte, and L. Bélanger (1987) The rat alpha-fetoprotein gene: characterization of the 5'-flanking region and tandem organization with the albumin gene. Nucleic Acids Res. **15**, 1338.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Biochemistry **18**, 5294-5299.
- Choder, M., Bratosin, S. and Aloni, Y. (1984) A direct analysis of transcribed minochromosomes: all transcribed SV40 minichromosomes have a nuclease-hypersensitive region within a nucleosome-free domain. EMBO J. **3**, 2929.
- Chodosh, L.A., Baldwin, A.S., Carthew, R.W. and Sharp, P.A. (1988) Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. Cell **53**, 11-24.

- Chodosh, L.A., Carthew, R.W., and Sharp, P. (1986) A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor. Mol. Cell. Biol. **6**, 4723-4733.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1991-1995.
- Coluanti, V., Pirozzi, A., Blance, C. and Cortese, R. (1987) EMBO J. **6**, 631-636.
- Comb, M., Birnberg, N.C., Seasholtz, A., and Goodman, H.M. (1986) Nature **323**, 353 - 356.
- Constantini, F. and Lacy, E. (1981) Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. Nature **294**, 92-94.
- Costa, R.H., Crayson, D.R., Xankopoulos, K.G., and Darnell, J.E., Jr. (1988) The cell specific enhancer of the mouse Transthyretin (prealbumin) gene binds to a common factor on one side and a liver-specific factor at two other sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3840-3844.
- Courey, A.J., Plon, S.E. and Wang, J.C. (1986) The use of psoralen-modified DNA to probe the mechanism of enhancer action. Cell **45**, 567.
- Courtois, G., J.G. Morgan, L.A. Campbell, G. Fourel, and G.R. Crabtree (1987) Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha-1-antitrypsin promoters. Science **238**, 688-692
- De Simone, V., G. Ciliberto, E. Hardon, G. Paonessa, F. Palla, L. Lundberg, and R. Cortese. 1987. Cis and trans-acting elements responsible for cell-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene. EMBO J. **6**, 2759-2766.
- Dierich, A., Gaub, M. P., Le Penec, J. P., Astinotti, D. and Chambon, P. (1987) Cell-specificity of the chicken ovoalbumin and conalbumin promoters EMBO J. **6**, 2305-2312.

- Dignam, J.D., Lebowitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res. **11**, 1475-1489.
- Dorn, A., Bollekens, J., Staub, A., Benoist, C., and D. Mathis (1987) A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. Cell **50**, 863-872.
- Dynan, W.S., and R. Tjian (1985) Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. Nature **316**, 774-778.
- Ekblom, P., Thesleff, L., Saxen, L., Miettinen, A. and Timpl, R. (1983) Transferrin as a fetal growth factor: acquisition of responsiveness related to embryonic induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2651-2655.
- Fire, A., Samuels, M., and Sharp, P.A. (1984) Interactions between RNA polymerase II, factors and template leading to accurate transcription. J. Biol. Chem. **259**, 2509,
- Flores, O., Maldonado, E., Burton, Z., Greenblatt, J. and Reinberg, D. (1988) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. J. Biol. Chem. **263**, 10812-10816.
- Focus (BRL) Vol. 3 N° 2, p4 (Enero 1981).
- Fried, M. and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. **9**, 6506-6525.
- Fried, M., and D.M. Crothers (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. **9**, 6505.
- Galas, D.J. and Schmitz, A. (1978) DNase footprinting : a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. Nucleic Acids Res. **5**, 3157-3170.
- Garner, MM and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions applications to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. Nucleic Acis Res. **9**, 3047-3060.

- Gerard, R.D., Montelone, B.A., Walter, C.F., Innis, J.W. and Scott, W.A. (1985) Role of specific simian virus 40 sequences in the nuclease-sensitive structure in viral chromatin. Mol. Cell. Biol. **5**, 52.
- Gidoni, D., Kadonaga, J.T., Barrera-Saldana, J., Takahashi, K., Chambon, P., and Tjian, R. (1985) Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. Science **230**, 511-517.
- Godbout, R., Ingram, R.S. and Tilghman, S.M. (1988) Fine-structure mapping of the three mouse α -fetoprotein gene enhancers. Mol. Cell. Biol. **8**, 1169-1178.
- Godbout, R., R. Ingram, and S.M. Tilghman (1986) Multiple regulatory elements in the intergenic region between the alpha-fetoprotein and albumin genes. Mol. Cell. Biol. **6**, 477-487.
- Goding, C.R., Temperley, S.M. and Fisher, F. (1987) Multiple transcription factors interact with the adenovirus-2 EII-late promoter: evidence for a novel CCAAT recognition factor. Nucleic Acids Res. **15**, 7761-7780.
- Goodbourn, S., Burstein, H. and Maniatis, T. (1986) Cell **45**, 601-610.
- Gordon, J.W. and Ruddle, F.H. (1985) DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow—a review. Gene **33**, 121-136.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 7380-7384.
- Gorinsky, B., Horsburgh, C., Lindley, P.F., Moss, O.S., Parker, M. and Watson, J.L. (1979) Evidence for the bilobal nature of differic rabbit plasma transferrin. Nature **281**, 157-158.
- Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986) Tissue specific *in vitro* transcription from the mouse albumin promoter. Cell **47**, 767-776.
- Graham, F. L. and Van Der Eb, A. J. (1973) Virology **52**, 456-467.

- Graves, B.J., P.F. Johnson, and S.L. McKnight (1986) Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene. Cell **44**, 565.
- Gunzburg, J (1985) Biochemie**67** 563 - 582.
- Hai, T., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Green, M.R. (1988) Analysis of the role of the transcription factor ATF in the assembly of a functional preinitiation complex. Cell **54**, 1043-1051.
- Hammer, R.E., Idzerda, R.L., Brinster, R.L. and McKnight, G.S. (1986) Estrogen regulation of the avian transferrin gene in transgenic mice. Mol. Cel. Biol. **6**, 1010-1014.
- Hardon, E.M., Frain, M., Paonessa, M., and Cortese, R. (1988) EMBO J. **7**, 1711-1719.
- Harris, J. W. and Keller Meyer, R. W. (1974) in The Red Cell. A Commonwealth Fund Book (Harvard University Press), pp. 79-96.
- Hatamochi, A., Golumbek, P.T., Van Schaftingens, E. and de Crombrughe, B. (1988) A CCAAT DNA binding factor consisting of two different components that are both required for DNA binding. J. Biol. Chem. **263**, 5940-5947.
- Herr, W. and Clarke, J. (1986) The SV40 enhancer is composed of multiple functional elements than can compensate for one another. Cell **45**, 461.
- Herr, W. and Guzman, Y., (1985) Duplications of a mutated simian virus 40 enhancer restore its avtivity. Nature, **313**, 711.
- Hooft van Huijsduijnen, R.A.M., Bollekens, J., Dorn, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1987) Properties of a CCAAT bos-binding protein. Nucleic Acids Res. **15**, 7265-7282.
- Horikoshi, M., Hai, T., Lin, Y.S., Green, M.R. and Roeder, R.G. (1988) Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. Cell **54**, 1033-1042.

- Horikoshi, M., Sekimizu, K. and Natori, S. (1984) Analysis of the stimulatory factor of RNA polymerase II in the initiation and elongation complex. J. Biol. Chem. **259**, 608.
- Huebers, H.A., Josephson, B., Huebers, E., Csiba, E. and Finch, C.A. (1984) Occupancy of the iron binding sites of human transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 4326-4330.
- Idzerda, R.L., Huebers, H., Finch, C.A. and McKnight, G.S. (1986) Rat transferrin gene expression: Tissue-specific regulation by iron deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3723-3727.
- Jackson, S.P. and Tjian, R. (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: Implications for mechanisms of transcriptional regulation. Cell **55**, 125-133.
- Jeltsch, J.M. and Chambon, P. (1982) The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. Eur. J. Biochem. **122**, 291-295.
- Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J. and McKnight, S.L. (1987) Purification of the transcription factor CBP. Genes and Develop. **1**, 133-146.
- Jones, K.A., J.T. Kadonaga, P.J. Rosenfeld, T.J. Kelly, and R. Tjian (1987) A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. Cell **48**, 79-89.
- Jones, K.A., K.R. Yamamoto, and R. Tjian. 1985. Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter *in vitro*. Cell **42**, 559.
- Kadonaga, S.T. and Tjian, R.T. (1986) Affinity purification of sequence specific DNA binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **83**, 5889.
- Kahn, A., Levin, M. J., Zakin, M. M. and Bloch, B. (1987) in Oncogenes, Genes and Growth Factors, ed. Guroff, G., pp. 277-309.
- Keleher, C.A., Goutte, C. and Johnson, A.D. (1988) The yeast cell-type-specific repressor $\alpha 2$ acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. Cell **53**, 927-936.

- Knowles, B. B., Howe, C. C. and Aden, D. P. (1980) Science **209**, 497-499.
- Krimpenfort, P., de Jong, R., Uematsu, Y., Dembic, Z., Steinmetz, M. and Berns, A. (1988) Transcription of T cell receptor β -chain genes is controlled by a downstream regulatory element. EMBO J. **7**, 745-750.
- Krumlauf, R., Hammer, R.E., Brinster, R.L., Champman, V.M. and Tilgham, S.M. (1985) Regulated expression of α -fetoprotein genes in transgenic mice. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **50**, 371-378.
- Kugler, W., Wagner, U. and Ryffel, G.U. (1988) Nucleic Acids Res. **16**, 3165-3174.
- Laemmli, U.K. (1970) Nature **227**, 680.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J. and McKnight, S.L. (1988) Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. Genes and Develop. **2**, 786-800.
- Leff, S.E., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1986) Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. Ann. Rev. Biochem. **55**, 1091.
- Levin, M., Tuil, D., Uzan, G., Dreyfus, J.C. and Kahn, A. (1984) Expression of the transferrin gene during development of non-hepatic tissues: high levels of transferrin mRNA in fetal muscle and adult rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. **122**, 212.
- Lin, F.L., Sperle, K. and Sternberg, N. (1985) Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 1391.
- Loyter, A., Scangos, G.A. and Ruddle, F.H. (1982) Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 422.
- Lucero, M., Schaeffer, E., Cohen, G.N. and Zakin, M. M. (1986) The 5' region of the human transferrin gene: structure and potential regulatory sites. Nucleic Acids Res. **14**, 8692.

- Lum, J.B., Infante, A.J., Makker, D.M., Yang, F. and Bowman, B.H. (1986) Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes. J. Clin. Invest. **77**, 841-849.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. **53**, 154.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning, a laboratory manual Ed: Cold spring Harbor Laboratory
- Maniatis, T., Goodvourn, S. and Fischer, J.A. (1987) Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science **236**, 1237-1245.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. Meth. Enzymol. **65**, 499-540.
- McGillivray, R.T., Mendez, E., Shewale, J.G., Sinha, S., Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1983) The primary structure of human serum transferrin. J. Biol. Chem. **258**, 3543-3553.
- McKlelland, A. and Ruddle, F. (1987) The transferrin receptor gene. in Oncogenes genes and growth factors (John Wiley & sons Ed.) 311-330.
- McKnight, G.S., Hammer, R.E., Kuenzel, E.A. and Brinster, R.L. (1983) Expression of the chicken transferrin gene in transgenic mice. Cell **34**, 335-341.
- McKnight, G.S., Lee, D.C. and Palmiter, R.D. (1980b) Transferrin gene expression: regulation of mRNA transcription in chick liver by steroid hormones and iron deficiency. J. Biol. Chem. **255**, 148-153.
- McKnight, G.S., Lee, D.C., Hemmaplardh, D., Finch, C.A. and Palmiter, R.D. (1980a) Transferrin gene expression: effect of nutritional iron deficiency. J. Biol. Chem. **255**, 144-147.
- McKnight, S. and Tjian, R. (1986) Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. Cell **46**, 795-805.

- McMaster, G.K., and G.G. Carmichael (1977) Analisis of single and double strand nucleic acids on poliacrilamide and agarose gels by using glioxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4835.
- Metz-Boutigue, M.J., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spick, G., Montreuil, J. and Jolles, P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. Eur. J. Biochem. **145**, 659-676.
- Mizushima-Sugano, J., and Roeder, R.G. (1986) Cell-type specific transcription of an immunoglobulin κ light chain gene *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8511-8515.
- Monaci, P., Nicosia, A. and Cortese, R. (1988) Two different liver-specific factors stimulate *in vitro* transcription from the human α A - antitrypsin promoter. EMBO J. **7**, 2075-2087.
- Morgan, E. H. (1983) in Plasma Protein Secretion by the Liver, eds. Glaumann, H., Peters Jr., T. and Redman, C. (Academic Press, London), pp. 331-355.
- Mulvihill, E.R., Le Pennec, J.P. and Chambon P. (1982) Cell **28**, 621 - 632.
- Nelson, C., Albert, V.R., Elsholtz, H.P., Lu, L.I.W. and Rosenfeld, M.G. (1988) Activation of cell-specific expression of rat growth and prolactin genes by a common transcription factor. Science **239**, 1400-1405.
- Noguchi, T., K. Yamada, H. Inoue, T. Matsuda, and T. Tanaka (1987) The L and R type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. J. Biol. Chem. **262**, 14366.
- Oikarinen, J., Hatamochi, A. and de Crombrughe, B. (1987) Separate binding sites for nuclear factor 1 and a CCAAT DNA binding factor in the mouse α 2(I) collagen promoter. J. Biol. Chem. **262**, 11064-11070.
- Oliviero, S., G. Morrone, and R. Cortese (1987) The human haptoglobin gene: transcriptional regulation during development and acute phase induction. EMBO J. **6**, 1905.

- Overbeek, P.A., Chepelinsky, A.B., Khillan, J.S., Piatigorsky, J. and Westphal, H. (1985) Lens-specific expression and developmental regulation of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene driven by the murine α A-crystallin promoter in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7815+7819.
- Palmiter, R.D. (1986) Germ-line transformation of mice. Ann. Rev. Genet. **20**, 465-499.
- Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) Transgenic mice. Cell **41**, 343-345.
- Panduro, A., F. Shalaby, and D.A. Shafritz (1987) Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of liver-specific gene expression during rat development. Genes and Develop. **1**, 1172.
- Paonessa, G., Gounari, F., Frank, R. and Cortese, R. (1988) Purification of a NF-1-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA. EMBO J. **7**, 3115-3123.
- Park, I., Schaeffer, E., Sidoli, A., Baralle, F.E., Cohen, G.N. and Zakin, M.M. (1985) Organization of the human transferrin gene: direct evidence that it originated by gene duplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3149-3153.
- Pinkert, C.A., D.M. Ornitz, R.L. Brinster, and R.D. Palmiter (1987) An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. Genes and Develop. **1**, 266.
- Plon, S.E. and Wang, J.C. (1986) Transcription of the Human β -globin gene is stimulated by an SV40 enhancer to which it is physically linked but topologically uncoupled. Cell **45**, 575-580.
- Prochownik, E.V. (1985) Nature **316**, 845-848.
- Ptashne, M. (1986) Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. Nature **322**, 697.

- Raymondjean, M., S. Cereghini, and M. Yaniv (1988) Several CCAAT binding proteins coexist in eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 757.
- Reinberg, D., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1987) Factors involved in specific transcription in mammalian RNA polymerase II: Functional analysis of initiation factors TFIIA and TFIID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site. J. Biol. Chem. **262**, 3322.
- Rose, T.M., Plowman, G.D., Teplow, D.B., Dreyer, W.J., Hellström, K.E. and Brown, J.P. (1986) Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1261-1265.
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P.C. and Tjian, R. (1988) A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. Nature **334**, 218-224.
- Sawadogo, M.S. and Roeder, R.G. (1985a) Factors involved in specific transcription by human polymerase II : analysis by a rapid and quantitative *in vitro* assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 4394-4398.
- Sawadogo, M.S. and Roeder, R.G. (1985b) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. Cell **43**, 165-175.
- Schaeffer, E., Lucero, M.A., Jeltsch, J.M., Py, M.C., Levin, M.J., Chambon, P., Cohen, G.N. and Zakin, M.M. (1987) Complete structure of the human transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. Gene **56**, 109-116.
- Scheidereit, C., A. Heguy, and R. Roeder (1987) Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter *in vitro*. Cell **51**, 783.
- Schleif, R. (1987) Why should DNA loop? Nature **327**, 369-370.

- Schorpp, M., W. Kugler, U. Wagner, and G. U. Ryffel (1988) The hepatocyte-specific promoter element HP1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. J. Mol. Biol., in press.
- Schöler, H.R. and Gruss, P. (1985) Cell type-specific transcriptional enhancement *in vitro* requires the presence of *trans*-acting factors. EMBO J. 4, 3005.
- Sentenac, A. (1985) Eukaryotic RNA polymerases. CRC Critical Reviews in Biochemistry 18, 31.
- Sergeant, A., Bohmann, D., Zentgraf, H., Weiher, H. and Keller, W. (1984) A transcription enhancer acts *in vitro* over distances of hundreds of base-pairs on both circular and linear templates but not on chromatin-reconstituted DNA. J. Mol. Biol. 180, 577.
- Shindelman, J.E., Ortmeyer, A.E. and Sussman, H.H. (1981) Int. J. Cancer 27, 329.
- Shirm, S., Jiricny, J. and Schaffner, W. (1987) The SV40 enhancer can be dissected into multiple segments, each with a different cell type specificity. Genes and Development. 1, 65.
- Shore, D. and Nasmyth, K. (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. Cell 51, 721-732.
- Short, N.J. (1988) Regulation of transcription. Flexible interpretation. Nature 334, 192-193.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503.
- Staudt, L.M., H. Singh, R. Sen, T. Wirth, P.A. Sharp, and D. Baltimore (1986) A lymphoid specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. Nature 323, 640.
- Stuart, G.W., Searle, R.F. and Palmiter R.D. (1986) Nature 317, 828 - 821.
- Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. and Greaves, M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4515.

- Suzuki, Y., Tsuda, M., Takiya, S., Hirose, S., Suzuki, E., Kameda, M. and Osamu, N. (1986) Tissue specific transcription enhancement of the fibroin gene characterized by cell-free systems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 9522.
- Taek Lee, N., Chi-Bom-Chae, A. and Kierszenbaum, A. (1986) Contrasting levels of transferrin gene activity in cultured rat Sertoli cells and intact seminiferous tubules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8174-8181.
- Tamura, T., Egly, J.M. and Chambon, P. (1988) A general RNA polymerase b transcription factor (BTF1) is involved in the formation of stable preinitiation complexes irrespective of the presence of the TATA box. Sometido a publicación.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1986) Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. Nature **324**, 34.
- Townes, T.M., Lingrel, J.B., Chen, H.Y., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1985) Erythroid-specific expression of human β -globin genes in transgenic mice. EMBO J. **4**, 1715-1723.
- Trowbridge, I.S. and Omary, M.B. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3040.
- Tsai, S.Y., Sagami, I., Wang, H., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1987) Cell **50**, 701-709.
- Tuil, D., Vaulont, S., Levin, M.J., Munnich, A., Moguilewsky, M., Bouton, M.M., Brissot, P., Dreyfus, J.C. and Kahn, A. (19..) Transient transcriptional inhibition of the transferrin gene by cyclic AMP. FEBS Lett. **189**, 310-314.
- Ullmann, A and Danchin, A. (1986) *Microbiologie Générale, Protocoles Experimentales*, Institut Pasteur. (Gasser, F. ed.)
- Uzan, G., Frain, M., Park, I., Besmond, C., Maessen, G., Sala-Trepat, J., Zakin, M. and Kahn, A. (1984) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human transferrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. **119**, 273-281.

- Van Dyke, M. and Dervan, P.B. (1983) Methidium propyl-EDTA-Fe(II) and DNase I report different small molecule binding sites on DNA. Nucleic Acids Res. **11**, 5555-5566.
- van Wijnen, A.J., Massung, R.F., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1988) Human H1 histone gene promoter CCAAT box binding protein HiNF-B is a mosaic factor. Biochemistry **27**, 6534-6541.
- Vogt, T.F., Compton, R.S., Scott, R.W. and Tilghman, S.M. (1988) Differential requirements for cellular enhancers in stem and differentiated cells. Nucleic Acids Res. **16**, 487-500.
- Voss, S.D., Schlokot, U. and Gruss, P. (1986) The role of enhancers in the regulation of cell-type-specific transcriptional control. Trends in Biochem. Sciences **11**, 287.
- Wagner, E.F. and Stewart, C.L. (1985) Integration and expression of genes introduced into mouse embryos. in Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development, ed. J. Rossant, R.A. Pederson. Cambridge Univ. Press, in press.
- Wasylyk, B. (1988) Transcription elements and factors of RNA polymerase b promoters of higher eukariotes. CRC Critical Reviews in Biochemistry **23**,
- Weber, F., de Villlliers, J., and Schaffner, W. (1984) An SV40 "enhancer trap" incorporates exogenous enhancers or generates enhancers from its own sequences. Cell **36**, 983.
- Weintraub, H. (1985) Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. Cell **42**, 705.
- Wildeman, A., Zenke, M., Schatz, C., Wintzerith, M., Grundström, T., Matthes, H., Takahashi, K. and Chambon, P. (1986) Specific protein binding to the SV40 enhancer *in vitro*. Mol. Cell Biol. **6**, 2098-2105.
- Williams, J. (1985) in Proteins of Iron Storage and Transport, eds. Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R. and Mazurier (Elsevier Science Publishers), pp. 13-23.

- Wingeder, E. (1988) Compilation of transcription regulatory proteins. Nucleic Acids Res. **16**, 1879-1902
- Yamamoto, K.R. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. Ann. Rev. Genet. **19**, 209.
- Yang, F., Lum, J.B., McGill, J.R., Moore, C.M., Naylor, S.L., Van Bragt, P.H., Baldwin, W.D. and Bowman, B. (1984) Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localisation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2752-2756.
- Yaniv, M. and Cereghini, S. (1986) Structure of transcriptionally active chromatin. CRC Critical Reviews in Biochemistry **21**, 1.
- Yaniv, M., (1984) Biology of the cell **50**, 203 - 216.
- Zenke, M., Grundström, T., Matthes, H., Wintzerith, M., Schatz, C., Wildetian, A. and Chambon, P. (1986) Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer function EMBO J. **5**, 387-397.

Alfonso Ortiz

Alfonso Ortiz