

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Regulación de la transcripción del gen de la
subunidad $\beta 2$ de Na^+ , K^+ -ATPasa»**

**Autor: Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez
Director: Dr. D. Pablo Martín Vasallo,
Dr. D. Julio Ávila Marrero**

Departamento de Bioquímica y Biología molecular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de La Laguna



Avda. Astrofísico Francisco Sánchez, s/n
38206 La Laguna, Tenerife
Teléfono: 34 922 318358 Fax: 34 22 318354

D. Pablo Martín Vasallo, Catedrático, y D. Julio Ávila Marrero, Profesor Asociado, ambos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna,

C E R T I F I C A M O S: que D. Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación que se incluyen en la memoria titulada "*Regulación de la transcripción del gen de la subunidad β_2 de Na^+, K^+ -ATPasa*", y que presenta para la obtención del grado de Doctor en Biología.

Hemos revisado la presente memoria y estimamos que se corresponde con los objetivos propuestos y resultados obtenidos y en consecuencia autorizamos su presentación como tesis doctoral para defensa pública ante el tribunal que sea designado al efecto.

En La Laguna a doce de Noviembre de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo. Dr. Pablo Martín Vasallo

Fdo. Dr. Julio Ávila Marrero

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Pablo Martín Vasallo, mi maestro, que me enseña a investigar y encamina mi curiosidad científica.

Al Dr. Julio Ávila Marrero, por su ayuda, eficaz y constante, en mi aprendizaje.

A mis compañeros de laboratorio, que hacen del trabajo un lugar atractivo: Dra. Elisa Trujillo, Irene Cózar, Dr. Manuel Macía, Dra. Emilia Lecuona y Dr. Luis Miguel González.

A mis "vecinos" del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por su apoyo permanente, tanto personal como científico.

A la Dra. Margarita Álvarez de la Rosa, que con sus ánimos me ha acompañado durante todo este trabajo.

A los Dres. Acaimo González, Marian Martínez y Pedro Domínguez, por su ayuda desde la distancia.

A la Dra. Teresa Alonso, por aconsejarme en el manejo de líneas celulares en cultivo, y a María Rosa Arnau, por su eficaz ayuda en el Animalario de la Universidad de La Laguna.

A los Dres. David Schuber y Ana Aranda, por las líneas celulares empleadas en este trabajo. A la Dra. Kathleen Sweadner por proporcionarme el anticuerpo RNT β 3.

Y a mi familia.

El trabajo ha sido financiado por el FIS, proyectos 93/0831 y 96/0453.

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción

LA BOMBA DE SODIO: IMPORTANCIA FISIOLÓGICA	1
LA FAMILIA DE LAS P-ATPASAS: CARACTERÍSTICAS COMUNES, CICLO DE FUNCIONAMIENTO Y RELACIONES EVOLUTIVAS	1
ESTRUCTURA DE Na^+, K^+ -ATPASA	4
ISOFORMAS DE Na^+, K^+ -ATPASA: VARIACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN TISULAR Y DURANTE EL DESARROLLO	5
SUBUNIDAD α : ESTRUCTURA-FUNCIÓN	9
SUBUNIDAD β : ESTRUCTURA-FUNCIÓN. AMOG	13
SUBUNIDAD γ : ESTRUCTURA-FUNCIÓN	19
REGULACIÓN DE Na^+, K^+ -ATPASA	21
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	23
ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y FACTORES QUE LA MODIFICAN: ACETILACIÓN/DESACETILACIÓN DE HISTONAS Y METILACIÓN DEL DNA	23
INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN. COMPLEJO RNA POL II. ACTIVADORES Y REPRESORES TRANSCRIPCIONALES	33
TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LOS ELEMENTOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN	37
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA SUBUNIDAD β 2 DE Na^+, K^+ -ATPASA	45

Capítulo II: Planteamiento experimental

Capítulo III: Material y Métodos

PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	55
PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	60
PCR Y DISEÑO DE CEBADORES	62
CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	63
WESTERN BLOTS	64
INMUNOFLUORESCENCIA	67
PREPARACIÓN DE FACTORES NUCLEARES	68
HIPERSENSIBILIDAD A NUCLEASAS: DNASA I, NUCLEASA S 1 Y NUCLEASA	

MICROCOCAL	69
PROTECCIÓN A LA EXONUCLEASA BAL 31	72
DETERMINACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN	73
SOUTHWESTERN BLOTS	74
EXPERIMENTOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)	75

Capítulo IV: Resultados

EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA $\beta 2$ EN LÍNEAS CELULARES EN CULTIVO	83
HIPERSENSIBILIDAD A DNasa 1	86
HIPERSENSIBILIDAD A NUCLEASA S1	92
SENSIBILIDAD A NUCLEASA MICROCOCAL	94
PATRONES DE METILACIÓN	100
RESISTENCIA A LA EXONUCLEASA BAL 31	106
EXPERIMENTOS DE RETARDO EN GEL	107
EXPERIMENTOS DE SOUTHWESTERN BLOT	111

Capítulo V: Discusión

DEL MODELO UTILIZADO	115
DEL PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y DE LA METODOLOGÍA	116
DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA SUBUNIDAD β DE Na^+, K^+ -ATPASA EN LÍNEAS CELULARES	117
DE LA HIPERSENSIBILIDAD A DNasa 1 Y NUCLEASA S 1	118
DE LA SENSIBILIDAD A NUCLEASA MICROCOCAL	123
DE LA METILACIÓN	125
DE LA PRESENCIA DE SECUENCIAS REPETITIVAS TIPO SINEs	127
DE LA RESISTENCIA A BAL 31	128
DE LOS EXPERIMENTOS DE RETARDO EN GEL	128
DE LOS EXPERIMENTOS DE SOUTHWESTERN BLOTTING	130
DE LOS RESULTADOS TOMADOS EN SU CONJUNTO	131
PERSPECTIVAS FUTURAS	133
Conclusiones	137
Bibliografía	141

Apéndice 1	167
Apéndice 2.....	169
Apéndice 3: Abreviaturas	173

Capítulo I

Introducción

La bomba de sodio: importancia fisiológica

El sistema enzimático Na^+, K^+ -ATPasa, también conocido como "bomba de sodio", funciona en todas las células animales como el principal regulador de las concentraciones intracelulares de los cationes Na^+ y K^+ . Durante su ciclo de actividad bombea, contra gradiente de concentración, 3 cationes Na^+ hacia el exterior de la célula y 2 cationes K^+ hacia el interior por cada molécula de ATP hidrolizada (Sweadner, 1989). El mantenimiento de una baja relación $\text{Na}^+:\text{K}^+$ intracelular resulta esencial para la actividad de muchas enzimas celulares. Además, el gradiente electroquímico creado por la Na^+, K^+ -ATPasa es fundamental para el mantenimiento del potencial de reposo celular, para la actividad de tejidos excitables como el cerebro, el músculo esquelético o el músculo cardíaco, para la captación de nutrientes y para la regulación del pH y la concentración intracelular de otros iones como el Ca^{2+} . La bomba de sodio tiene una gran importancia farmacológica, ya que es el receptor de los glicósidos cardiotónicos (Sweadner, 1989).

La familia de las P-ATPasas: características comunes, ciclo de funcionamiento y relaciones evolutivas

La Na^+, K^+ -ATPasa se clasifica dentro del grupo de ATPasas de tipo P (Palmgren y Axelsen, 1998). Estas proteínas se caracterizan por ser transportadores de membrana con una sola subunidad catalítica que media la traslocación contra gradiente de iones gracias a la energía proporcionada por el ATP y que tienen en común la existencia de un intermediario fosforilado en su ciclo de reacción. Todas las P-ATPasas comparten un dominio de fosforilación común compuesto por los aminoácidos DKTGT, de los cuales es el aspartato el que es fosforilado (Walderhaug y cols., 1985; Axelsen y Palmgren, 1998). Durante su ciclo de reacción su estructura pasa, al menos, por dos conformaciones, denominadas E1 y E2. La fosforilación fuerza la enzima a entrar en E2 y la defosforilación subsiguiente la devuelve

al estado E1. En el caso de la Na^+, K^+ -ATPasa el mecanismo de reacción puede representarse mediante el modelo de Post-Albers (figura 1, Heyse y cols, 1994). La conformación E1 expone los sitios de unión a cationes al citoplasma. Una vez fosforilada la enzima los iones Na^+ unidos se ocluyen (son incapaces de intercambiarse con el medio acuoso) y se produce una transición espontánea al estado E2, que deja los sitios de unión abiertos hacia el lado extracelular. La unión de K^+ inicia la defosforilación de la enzima y la oclusión de los cationes, que son liberados al medio intracelular cuando se une el ATP e induce un cambio de conformación de E2 a E1. A este modelo se le ha añadido una explicación electrostática, según la cual en la conformación E1 no ocluida existen dos sitios de unión cargados negativamente por los que compiten el Na^+ y el K^+ y un tercer sitio neutro y altamente específico para el Na^+ . La unión del Na^+ a este último sitio es electrogénica y desencadena la oclusión de los cationes (Heyse y cols, 1994).

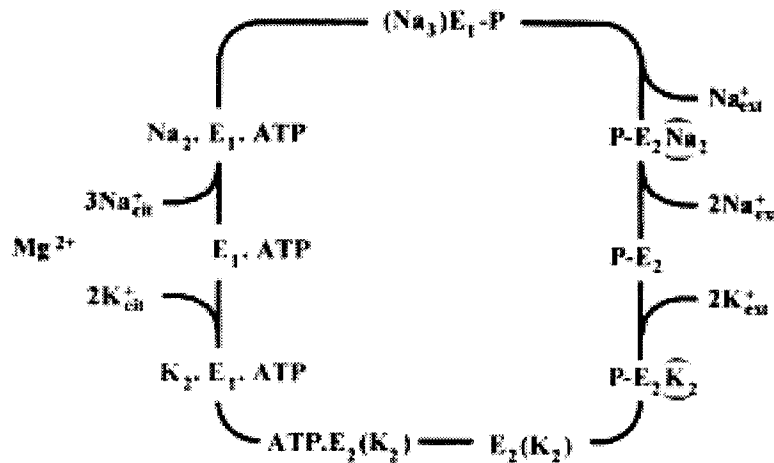


Figura 1. **Ciclo de Albers-Post.** Esquema que representa el transporte de Na^+ y K^+ por la bomba de sodio mediante un ciclo de fosforilación-defosforilación en el que alternan dos estados conformacionales. Los guiones indican uniones covalentes y los puntos, uniones no covalentes. Entre paréntesis, cationes en estado ocluido. (Tomado de Heyse y cols, 1994).

Las P-ATPasas han sido identificadas en todos los organismos estudiados, con la única excepción de la bacteria parásita *Borrelia burgdorferi*. Son capaces de transportar distintos iones (K^+ , Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}) y otros sustratos cargados como fosfolípidos (Palmgren y Axelsen, 1998). Aunque las secuencias pueden llegar a tener similitudes muy bajas, todas estas enzimas comparten ocho segmentos altamente conservados; se cree que estas zonas de la proteína son las implicadas en la comunicación entre la hidrólisis del ATP y el cambio conformacional, la unión de iones y la unión de ATP. Mediante la comparación de estos segmentos conservados se puede establecer un árbol evolutivo (figura 2).

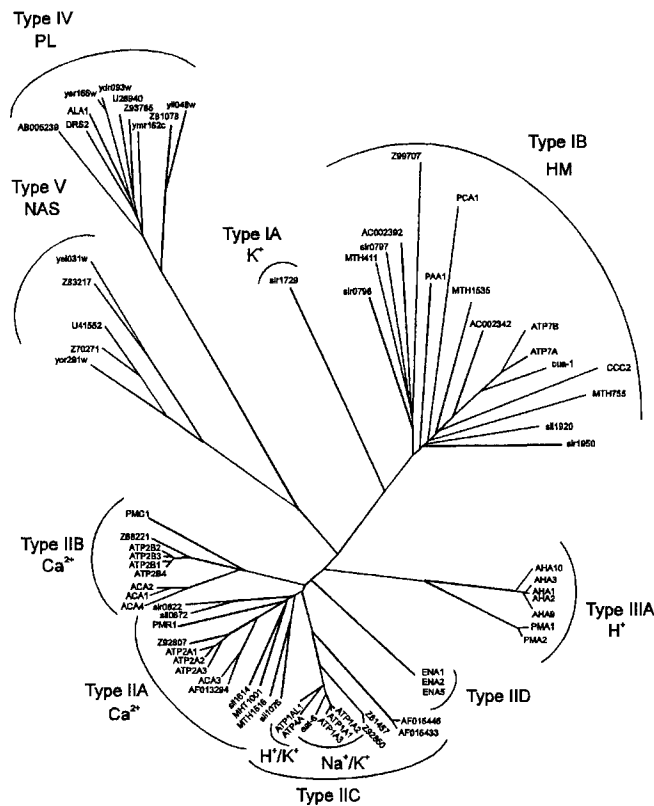


Figura 2. **Árbol filogenético de las P-ATPasas.** Los nombres en cada rama indican el nombre de la proteína, el nombre del *locus* o bien el número de acceso de GenBank (National Center for Biotechnology Information, NIH, EEUU) donde se puede encontrar la secuencia de DNA. Abreviaturas: HM, metales pesados; PL, fosfolípidos; NAS, especificidad no asignada. (Tomado de Palmgren y Axelsen, 1998).

El resultado es que las P-ATPasas se agrupan según su especificidad de sustrato y no según la relación evolutiva de las especies donde han sido caracterizadas, lo que indica que la aparición de una nueva especificidad de sustrato se acompaña de un rápido cambio en la tasa de evolución de la secuencia (Axelsen y Palmgren, 1998). Se puede llegar a la misma conclusión teniendo en cuenta que una misma P-ATPasa, como por ejemplo la Na^+, K^+ -ATPasa, guarda una similitud del 60% entre especies tan distantes como camarón y humanos, mientras que dos P-ATPasas de la misma especie, como por ejemplo Na^+, K^+ -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasa tienen una similitud del 50%.

Estructura de Na^+, K^+ -ATPasa

La subfamilia IIC de las P-ATPasas (X^+, K^+ -ATPasas) tiene en común, además de su ciclo catalítico, la capacidad de intercambiar un catión (como Na^+ o H^+) por K^+ y el requerimiento de una subunidad β asociada de forma no covalente a la α formando un heterodímero (figura 3).

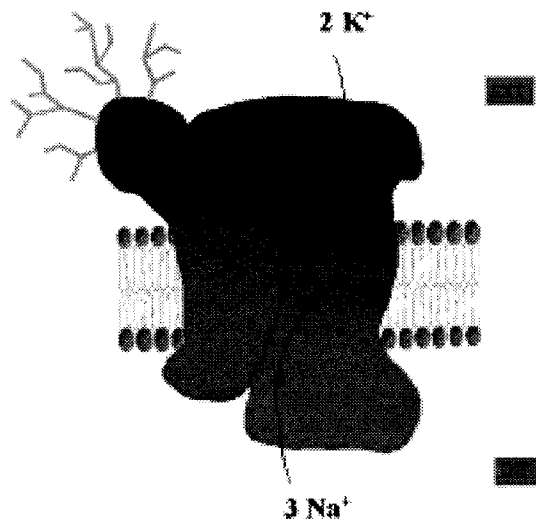


Figura 3. Modelo esquemático que representa la Na^+, K^+ -ATPasa en forma de heterodímero $\alpha\beta$.

En el caso de Na^+, K^+ -ATPasa puede encontrarse una tercera subunidad, denominada γ , aunque sólo está presente en algunos tejidos como el riñón y el páncreas. La subunidad α , o subunidad catalítica, es una proteína de unos 112 kDa que, como en el resto de P-ATPasas, contiene los sitios de unión a cationes y ATP, además del de unión de glicósidos cardiotónicos (Sweadner, 1989). La subunidad β , también llamada subunidad reguladora, es una glicoproteína de aproximadamente 55 kDa implicada en la biogénesis y en la actividad del sistema (Beggah y cols, 1997). La subunidad γ es un pequeño polipéptido de sólo 10 kDa cuyo papel en el sistema es aún controvertido.

La unidad mínima funcional de Na^+, K^+ -ATPasa es el heterodímero $\alpha:\beta$ unido en una estequiometría 1:1, aunque hay datos que apoyan la hipótesis de que *in vivo* se encuentra como una asociación $(\alpha\beta)_2$, dado que se han encontrado evidencias de interacciones homotípicas $\alpha-\alpha$ y $\beta-\beta$ en sistemas de expresión heteróloga (Blanco y cols, 1994; Colonna y cols, 1997a). Es necesario tener en cuenta además que la bomba de sodio está en estrecha interacción con los lípidos de membrana que la rodean, como lo demuestran los resultados que indican que la composición de las membranas es capaz de alterar la actividad Na^+, K^+ -ATPasa (Yeagle y cols, 1988).

Isoformas de Na^+, K^+ -ATPasa: variaciones en la distribución tisular y durante el desarrollo.

La Na^+, K^+ -ATPasa es una familia multigénica. Tanto la subunidad α como la β poseen isoformas codificadas por genes independientes localizados en distintos cromosomas. Hasta ahora se han identificado cuatro isoformas de la subunidad α ($\alpha 1-4$) (Shull y cols, 1986; Shamraj y Lingrel, 1994) y tres de la subunidad β ($\beta 1-3$) (Martín-Vasallo y cols. 1989, Malik y cols, 1996). Las isoformas de α comparten un 85% de identidad entre sí;

cada una de las isoformas está a su vez conservada entre un 90 y un 99% entre distintas especies de vertebrados (Takeyasu y cols, 1990). Las isoformas de β son más divergentes y tienen entre un 40 y un 50% de identidad entre ellas, aunque al igual que las isoformas de α , están altamente conservadas entre especies (90-99%) (Malik y cols, 1996). La expresión de las isoformas de Na^+, K^+ -ATPasa es específica de tejido y de tipo celular, estando además sometida a regulación diferencial durante el desarrollo. Es importante resaltar que un determinado tipo celular puede expresar varias isoformas de la subunidad α y de la β a la vez. Dado que las distintas combinaciones de isoformas de las subunidades α y β son capaces de formar una Na^+, K^+ -ATPasa funcional en sistemas de expresión heterólogos, parece lógico pensar que en una célula que expresa distintas isoformas de ambas subunidades se pueden formar a la vez distintas isoenzimas de Na^+, K^+ -ATPasa (Blanco y cols, 1995a y b). La existencia de varias isoformas de las subunidades de Na^+, K^+ -ATPasa, su regulación diferencial y la posibilidad de formar distintas isoenzimas simultáneamente da una idea de la altísima especialización que necesitan las células animales respecto al manejo del Na^+ y del K^+ .

Las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ de Na^+, K^+ -ATPasa suelen considerarse como genes constitutivos (*housekeepers*), dado que se expresan en prácticamente todos los tipos celulares estudiados. Hay unas pocas excepciones, sobre todo para la isoforma $\beta 1$, que está ausente en reticulocitos (Stengelin y Hoffman, 1997) y en fibras glicolíticas de contracción rápida en músculo esquelético (Lavoie y cols, 1996). La isoforma $\alpha 2$ se expresa principalmente en músculo cardiaco y esquelético, y en tejido adiposo. $\alpha 3$ está en elevada concentración en las neuronas del SNC. Por último, $\alpha 4$ parece ser una isoforma específica de testículo (Shamraj y Lingrel, 1994), aunque hay que recordar que hasta ahora no hay ningún dato bioquímico (sólo la similitud de su secuencia) que indique que $\alpha 4$ es capaz de formar una bomba de sodio funcional.

La proteína $\beta 2$ está concentrada principalmente en el sistema nervioso (Martín-Vasallo y cols, 1989; Lecuona y cols, 1996; Peng y cols, 1997), aunque también se ha encontrado en músculo esquelético (concretamente en fibras glicolíticas de contracción rápida, Lavoie y cols, 1996) y en músculo cardiaco (Wang y cols, 1996). Es importante resaltar que en otros tejidos se encuentra mRNA de $\beta 2$ sin que se detecte la proteína, aunque la cantidad de mRNA es muy baja comparada con los tejidos que sí expresan la proteína (figura 4; Martín-Vasallo y cols, 1989; Ávila y cols, 1998). Esto indica que, aunque la regulación de la expresión de la proteína $\beta 2$ se ejerce principalmente a nivel transcripcional, no se trata de una regulación estricta; no se puede descartar la presencia de algún mecanismo adicional de regulación traduccional.

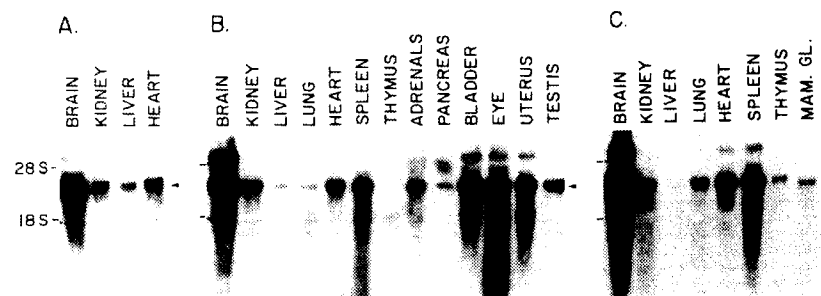


Figura 4. **Expresión del mRNA de la subunidad $\beta 2$ en tejidos de rata.** *Northern blot* con RNAs preparados de tejidos de rata de 2 días de edad (A), 2 semanas (B) y adultas (C). (Tomado de Martín-Vasallo y cols, 1989).

La expresión de la subunidad $\beta 2$ varía durante el desarrollo; este hecho ha sido comprobado tanto detectando el mRNA en *northern blots* (figura 4; Martín-Vasallo y cols, 1989) como la proteína mediante inmunohistoquímica (Lecuona y cols, 1996). El mRNA de $\beta 2$ aparece en bajos niveles en el hígado de la rata neonata, pero en la adulta desaparece por completo. En el riñón los niveles de mRNA son también más altos en el neonato que en el adulto. Recientemente se ha comprobado que el riñón fetal expresa la proteína $\beta 2$ (sin que se detecte $\beta 1$), mientras que a partir del

nacimiento ésta desaparece rápidamente al tiempo que los niveles de mRNA decaen (Burrow y cols, en prensa) .

En el SNC de la rata $\beta 2$ incrementa su expresión desde el estadio P0 hasta el P10. Además, tiene una localización celular diferencial en neonatos y en adultos (figura 5 ; Lecuona y cols, 1996).

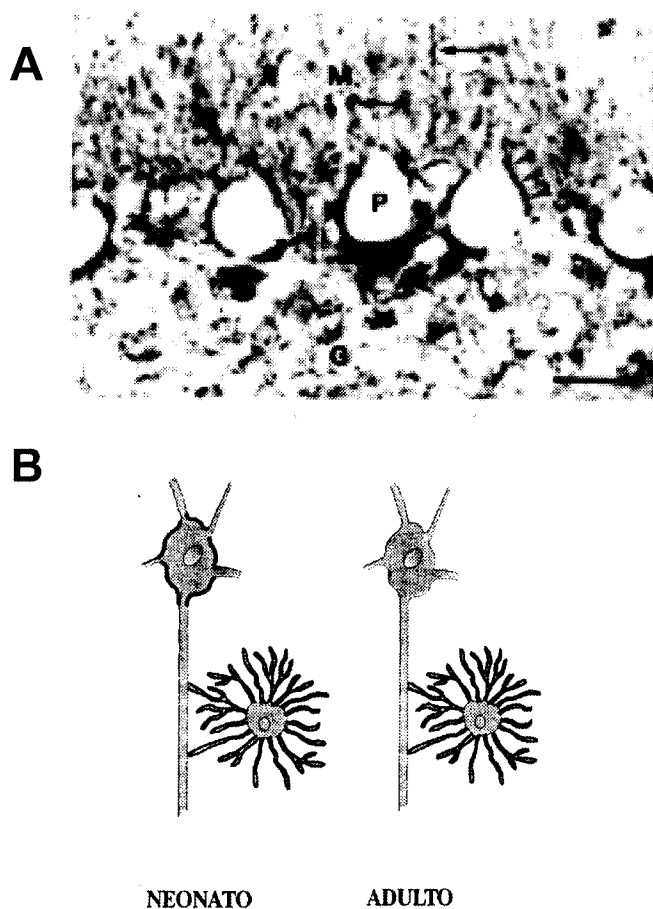


Figura 5. **A. Immunolocalización de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en cerebelo de rata adulta.** Los terminales axonales de las células en cesta sobre las células de Purkinje (P) son positivos (flecha gruesa). Se observa tinción puntiforme en la superficie dorsolateral de las células de Purkinje (cabezas de flecha) y en la capa molecular (M) (flechas). También son inmunopositivas las neuronas de la capa granular (G). Barra: 25 μm (tomado de Lecuona y cols., 1996). **B. Esquema de las diferencias en la inmunolocalización de la subunidad $\beta 2$ en SNC de rata neonata y adulta.** El trazo grueso alrededor de las células indica la presencia de $\beta 2$.

La isoforma $\beta 3$ se expresa predominantemente en pulmón y testículo de rata adulta, estando presente también en hígado y músculo esquelético. El riñón, el corazón y el cerebro contienen solamente trazas. En el estadio P7 el músculo esquelético y el pulmón son los más enriquecidos en $\beta 3$, mientras que en hígado prácticamente está ausente (Arystarkhova y Sweadner, 1997), lo que demuestra que la expresión de esta proteína también está regulada durante el desarrollo.

Subunidad α : estructura-función

La subunidad α es una proteína de unos 110 KDa. Su secuencia comparte un patrón de hidrofobicidad muy parecido al resto de las subunidades α de las P-ATPasas, aunque con numerosas ambigüedades. Esto ha conducido a la necesidad de un estudio experimental de la topología de la subunidad α en la membrana plasmática. Se han propuesto distintos modelos a partir de los datos obtenidos de técnicas muy diversas como proteólisis selectiva, modificación química y mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales. Se ha demostrado que tanto el extremo amino como el carboxilo están situados en el citoplasma; en el extremo N-terminal de la proteína hay claramente cuatro segmentos transmembrana, pero los resultados han resultado contradictorios al analizar la zona C-terminal de la proteína. Actualmente el modelo más aceptado (figura 6) incluye seis segmentos transmembrana en el C-terminal (sumando un total de 10). La conclusión más importante que se ha obtenido de estos estudios es que fragmentos que por su secuencia no son especialmente hidrofóbicos pueden constituir pasos transmembrana si son estabilizados por interacciones proteína-proteína (en el caso de Na^+, K^+ -ATPasa, interacciones α - α o α - β), siendo además muy dinámicos (en oposición a los clásicos segmentos transmembrana altamente hidrofóbicos, como los del N-término de la subunidad α de Na^+, K^+ -ATPasa) y posiblemente de gran importancia para los cambios de conformación funcionales de las proteínas (Karlisch, 1997).

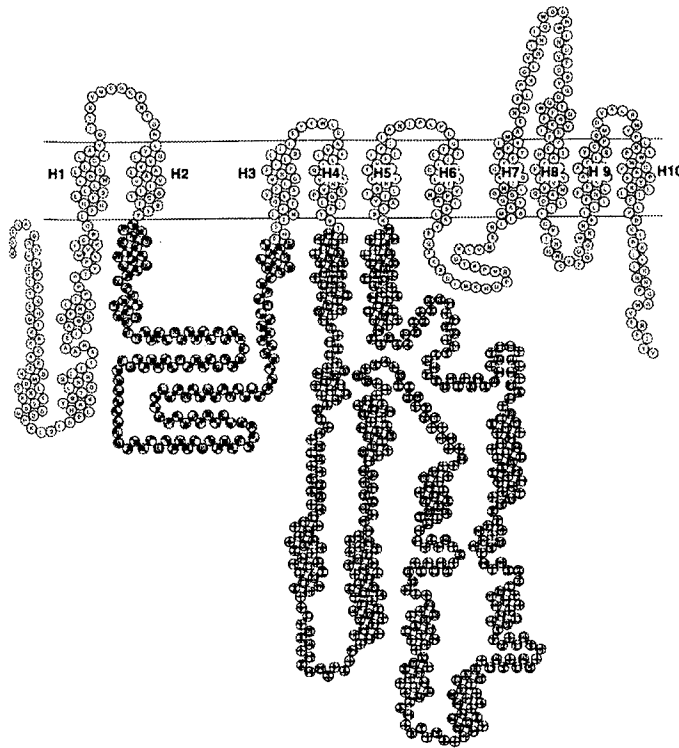


Figura 6. **Modelo topológico de la subunidad α de Na^+, K^+ -ATPasa.**
(Tomado de Colonna y cols, 1997b).

En la figura 6 se puede observar que existe un largo lazo intracelular situado entre los segmentos transmembrana 4 y 5. En esta zona se sitúa el sitio de fosforilación y el sitio de unión de ATP. La identificación de los residuos implicados en la unión y la oclusión de los cationes transportados ha resultado mucho más problemática. Mediante modificación química y mutagénesis dirigida se han identificado residuos aminoacídicos funcionalmente importantes en los segmentos transmembrana H4, 5, 6, 8 y 9. La sustitución de estos residuos mediante mutagénesis ha resultado en enzimas inactivas o con modificaciones en las afinidades aparentes por el Na^+ y por el K^+ . Entre estas mutaciones existen algunas que modifican la afinidad sólo por uno de los dos cationes (Blostein y cols, 1997). Aunque la naturaleza del sitio de unión y oclusión de cationes es aún poco conocida, el modelo más aceptado actualmente lo describe como una región ocupada consecutivamente tanto por el Na^+ como por el K^+ durante la traslocación y

que es capaz de acomodar los cambios en la selectividad de unión de estos cationes dependiendo de la conformación de la enzima.

El interés en la caracterización de los elementos implicados en la unión de cationes es aún mayor si se tiene en cuenta que las isoformas de la subunidad α tienen distintas afinidades por el Na^+ y por el K^+ . Estas diferencias explicarían, al menos en parte, el fundamento fisiológico de la existencia de isoformas de Na^+, K^+ -ATPasa y de su distribución diferencial. Sin embargo los datos obtenidos han sido en muchas ocasiones contradictorios (Sweadner, 1989; Jewell y Lingrel, 1991), dependiendo en muchas ocasiones del sistema de expresión heteróloga utilizado o del modelo analizado. De la misma manera, la construcción de quimeras entre las distintas isoformas para localizar los sitios de unión de cationes muestran que estos están formados por distintos segmentos de la proteína a la vez (Jewell y Lingrel, 1993). La conclusión es que la afinidad por Na^+ y por K^+ no es una propiedad inamovible de cada una de las isoformas, sino más bien una mezcla de las características de la proteína, el entorno y la asociación con otras proteínas como la subunidad β , como se expone más adelante.

Otra zona objeto de una investigación intensiva ha sido la de unión de glicósidos cardiotónicos, debido a su gran importancia farmacológica y a las distintas sensibilidades a la inhibición de la actividad enzimática que las isoformas de la subunidad α muestran por estas drogas. La afinidad por ouabaína difiere según la especie estudiada (Sweadner, 1989). En la rata la isoforma $\alpha 1$ tiene una afinidad por ouabaína de 3×10^{-5} , dos órdenes de magnitud inferior a la de $\alpha 2$ y tres respecto a la de $\alpha 3$. Sin embargo la isoforma $\alpha 1$ humana sí presenta una alta afinidad por ouabaína. Las bases moleculares de estas diferencias se comprenden bien en la actualidad (Sweadner, 1993). La sustitución de dos aminoácidos en el lazo extracelular entre H1 y H2 (figura 6) es suficiente para cambiar la alta afinidad de $\alpha 1$ humana a la baja afinidad característica de la $\alpha 1$ de rata. También hay

evidencias de que la zona transmembrana H1 y el lazo extracelular entre H3 y H4 están involucrados en la unión de ouabaína (Canessa y cols, 1993).

Las zonas de la estructura de la subunidad α que median la interacción con la β también han sido objeto de estudio mediante la construcción de quimeras y la utilización del sistema del doble híbrido en levaduras. Se ha llegado a la conclusión de que la región extracelular comprendida entre los segmentos H7 y H8 es la responsable de la unión a β (Colonna y cols, 1997a).

Otra característica de interés en la molécula es la presencia de secuencias consenso de fosforilación por PKC en el extremo carboxilo y por PKA en el amino. Se ha demostrado en numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que estos residuos son de hecho fosforilados, aunque el efecto de esta modificación sobre la actividad Na^+, K^+ -ATPasa es en numerosos casos contradictoria, incluso cuando se utilizan preparaciones de enzima purificadas. La explicación dada a este hecho es que la fosforilación no tiene un efecto directo sobre Na^+, K^+ -ATPasa, sino que más bien debe regular la interacción de la subunidad α con otras proteínas (Feschenko y cols, 1997). Por otra parte, un resultado muy interesante ha sido obtenido recientemente por Cheng y cols (1997), en el que se demuestra que la respuesta de Na^+, K^+ -ATPasa a la fosforilación por PKC depende del estado de fosforilación de la Ser⁹⁴³, que es el blanco de la PKA. Hay que resaltar que la mayor parte del trabajo sobre la regulación por fosforilación de la subunidad α se ha realizado con la isoforma $\alpha 1$ de distintas especies, mientras que la fosforilación de $\alpha 2$ y $\alpha 3$ permanece poco estudiada. El sitio de fosforilación por PKA se encuentra conservado en las tres isoformas, mientras que los sitios diana de PKC lo están en menor grado. Estudios preliminares en sistemas heterólogos indican que la modulación debida a proteínas kinasas podría ser diferencial según la isoforma implicada (Blanco y Mercer, 1997).

La estructura de la subunidad α contiene información que determina su localización subcelular. Se ha demostrado que α interacciona con

moléculas del citoesqueleto como la anquirina, la fodrina o la espectrina. En concreto, el sitio de unión a anquirina se sitúa en el gran lazo intracelular que queda entre H4 y H5 (Jordan y cols, 1995). Tanto H⁺,K⁺-ATPasa como Na⁺,K⁺-ATPasa están restringidas a dominios de membrana específicos en las células epiteliales, de manera que pueden mediar el transporte vectorial de los cationes. Las señales que determinan tanto la localización apical de H⁺,K⁺-ATPasa como la basolateral de Na⁺,K⁺-ATPasa han sido localizadas en una corta secuencia de ocho aminoácidos del cuarto segmento transmembrana de ambas proteínas (Caplan, 1997).

Recientemente se ha propuesto una nueva función para la subunidad α de Na⁺,K⁺-ATPasa. Se ha demostrado la interacción física y funcional con FGF-2, ya que no sólo coimmunoprecipitan ambas proteínas sino que además la expresión de la subunidad α en células COS inhibe la exportación de FGF-2. La secreción de esta proteína sigue una vía independiente de retículo endoplásmico/Golgi, por lo que se ha propuesto que la subunidad α podría funcionar a modo de chaperona implicada en esta vía (Florkiewicz y cols, 1998).

Subunidad β : estructura-función. AMOG

Todas las subunidades β secuenciadas hasta el momento, ya sean de Na⁺,K⁺-ATPasa o de H⁺,K⁺-ATPasa, comparten una homología significativa entre ellas (figura 7), con elementos altamente conservados, aunque se pueden distinguir hasta cuatro grupos de secuencias. Tres de ellos corresponden a las isoformas β 1, β 2 y β 3 de Na⁺,K⁺-ATPasa en distintas especies, mientras que el cuarto agrupa a las subunidades β de H⁺,K⁺-ATPasa. Los porcentajes de identidad entre estos cuatro grupos apuntan a un gen ancestral común a partir del cual se originó el grupo de la isoforma β 1 y un segundo grupo que dio origen a la subunidad β de H⁺,K⁺-ATPasa y a las isoformas β 2 y β 3 de Na⁺,K⁺-ATPasa (Malik y cols, 1996; Ávila y cols, 1998).

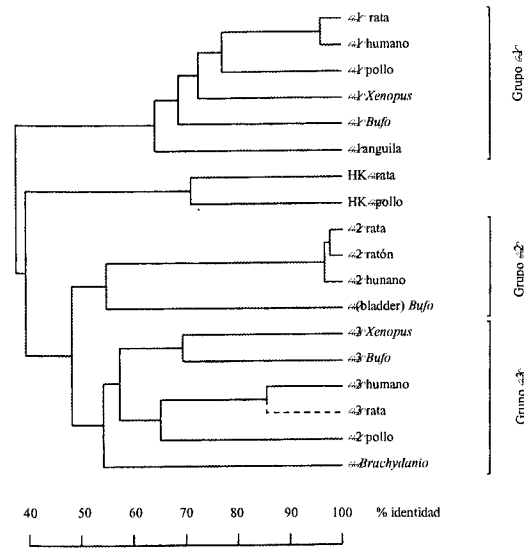


Figura 7. **Relaciones de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las isoformas de la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa.** La escala en la parte inferior de la figura indica el porcentaje de identidad entre isoformas. La línea de puntos indica que la secuencia de la isoforma $\beta 3$ de rata proviene de un clon parcial. (Adaptado de Malik y cols, 1996).

La evidencia bioquímica y la secuencia de aminoácidos indican que la subunidad β es una proteína transmembrana de tipo II, que tienen como característica poseer su extremo amino en el interior de la célula y un segmento hidrofóbico que ejerce como dominio transmembrana y como péptido señal que permanece sin cortar (Lipp y Dobberstein, 1986). En el caso concreto de β este dominio transmembrana es único, quedando una zona intracelular muy corta, de aproximadamente 39 aminoácidos, y la mayor parte de la proteína expuesta al exterior (figura 8). En todas las subunidades β identificadas hay seis residuos de cisteína conservados que son capaces de formar tres puentes disulfuro (figura 8). Además existe una serie de sitios potenciales de N-glicosilación, cuyo número varía entre las distintas proteínas y entre especies (Martin-Vasallo y cols, 1989; Malik y cols, 1996). La glicosilación hace que las subunidades β exhiban un peso molecular aparente en un gel de electroforesis desnaturizante superior al predicho por la secuencia. La cantidad de glicosilación es muy variable,

cambiando para una misma proteína según el tejido estudiado o el estadio de desarrollo del organismo (Lecuona y cols, 1996). Esto sugiere que los oligosacáridos no son esenciales para la función de la subunidad β , lo cual viene apoyado por la observación de que la inhibición de la glicosilación por tunicamicina no tiene influencia en la función de la enzima (Takeda y cols, 1988). Lo mismo ocurre cuando se eliminan los sitios consenso de N-glicosilación por mutagénesis dirigida (Beggah y cols, 1997). Sin embargo en ambos casos se observa una mayor sensibilidad de la subunidad β a proteasas y un descenso en la eficiencia de ensamblaje con la subunidad α . Este efecto es aditivo y no depende de ningún oligosacárido en concreto.

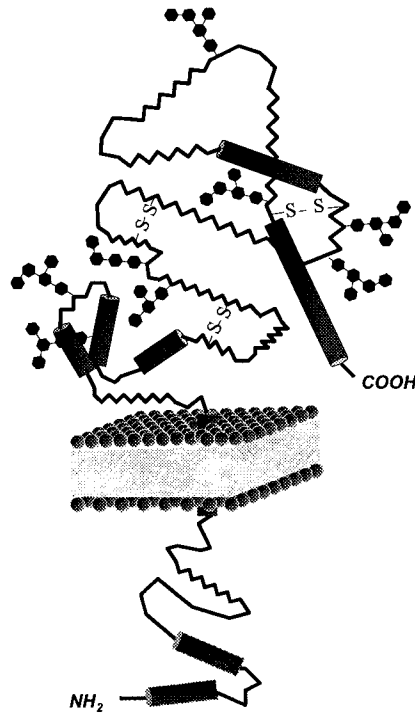


Figura 8. **Modelo de la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa.** Basándose en las predicciones a partir de la secuencia de aminoácidos, se representan las zonas plegadas en forma de hélice α (cilindros) y de hoja β . También se indica la posición de los tres puentes disulfuro (S-S) y los sitios potenciales de glicosilación, en este caso los característicos de la isoforma $\beta 2$.

La función de la subunidad β y de sus isoformas en el ciclo catalítico de Na^+, K^+ -ATPasa no está aún bien definida. A pesar de que todas las actividades catalíticas las realiza la subunidad α , se ha visto en diversos sistemas de expresión heteróloga que las distintas isoformas de la subunidad β son capaces de modular la afinidad de las subunidades α tanto por el K^+ (Jaisser y cols, 1992) como por el Na^+ (Blanco y cols, 1995a y b). Este hecho se ve corroborado por datos obtenidos a partir de Na^+, K^+ -ATPasa endógena en distintos tejidos (Therien y cols, 1996) o de sistemas *in vitro* (Shainskaya y Karlish, 1996). Sin embargo, la sustitución de una isoforma de β por otra no tiene ningún efecto en las afinidades por ouabaína de las subunidades α .

Se ha demostrado que la subunidad β tiene un papel muy importante en la biogénesis estructural y funcional del sistema Na^+, K^+ -ATPasa (Geering, 1991; Ueno y cols, 1997). Sólo las subunidades α que se ensamblan con subunidades β en el retículo endoplásmico son expresadas de forma estable, adquieren sus propiedades funcionales y son transportadas hasta la membrana plasmática. La misma subunidad β sufre una maduración estructural con el ensamblaje, reflejada en una mayor resistencia a la proteólisis (Geering y cols, 1996). Los requerimientos estructurales para el ensamblaje α - β han sido parcialmente caracterizados (Colonna y cols, 1997a), encontrándose que distintas regiones de la subunidad β participan en la interacción con α . La adquisición de una conformación compatible con el ensamblaje podría estar mediado por chaperonas moleculares, como sugiere el hecho de que las proteínas β recién sintetizadas se asocian a la proteína BiP (Beggah y cols, 1996). Existen pocos datos acerca del papel que podrían jugar las distintas isoformas de la subunidad β en el proceso de biogénesis de Na^+, K^+ -ATPasa. En el músculo esquelético la expresión de las isoformas de β es específica de cada tipo de fibra muscular. Bajo el estímulo de la insulina se produce un aumento de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa correlacionado con una traslocación específica de $\alpha 2$ y $\beta 1$ desde

membranas intracelulares hasta la membrana plasmática. En las fibras donde existe $\alpha 2$ y $\beta 2$ pero no $\beta 1$, esta traslocación no tiene lugar (Lavoie y cols, 1996), lo que sugiere que las distintas isoformas de β podrían estar implicadas en una regulación diferencial de la maduración de Na^+, K^+ -ATPasa.

Al contrario que la subunidad α , en determinados sistemas β es capaz de alcanzar la membrana plasmática por separado (Ueno y cols, 1997). En general la estequiometría $\alpha:\beta$ es 1:1, pero existen tejidos donde esta proporción sufre variaciones. En el músculo esquelético la presencia de un exceso molar de β sobre α se asocia a una mayor actividad enzimática, lo que implica que cambios en la cantidad de la subunidad β podrían modular la actividad del sistema activando la bomba de sodio mediante algún proceso de oligomerización (Lavoie y cols, 1997). Otra posible explicación para este hecho es la presencia de subunidades α de otras ATPasas de tipo P que se asociarían con la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa. Esta posibilidad ha sido demostrada en el caso de las membranas apicales del epitelio del colon distal. En estas membranas está presente la subunidad $\beta 1$ de Na^+, K^+ -ATPasa, sin que existan subunidades α detectables. Sin embargo sí que se encuentra la subunidad α de la H^+, K^+ -ATPasa colónica. Se ha demostrado que esta proteína se asocia *in vivo* a $\beta 1$ de Na^+, K^+ -ATPasa en las membranas apicales del epitelio del colon distal y del riñón (Codina y cols, 1998) y ambas son capaces de producir una H^+, K^+ -ATPasa funcional cuando se coexpresan en oocitos de *Xenopus* (Codina y cols, 1996).

Recientemente se ha descubierto una nueva función de la subunidad β de la H^+, K^+ -ATPasa gástrica. Como ya se ha dicho, esta enzima debe su localización apical en células epiteliales a una señal presente en la subunidad α . Sin embargo, la reinternalización de H^+, K^+ -ATPasa en respuesta a estímulos destinados a interrumpir la secreción gástrica de HCl está mediada por una señal situada en el extremo citoplasmático de la subunidad β , concretamente un residuo de tirosina. Cuando esta tirosina se

sustituye por una alanina mediante mutagénesis dirigida y se construye una línea de ratones transgénicos homocigóticos para esta mutación se comprueba que la H^+, K^+ -ATPasa está permanentemente en la membrana apical secretando H^+ al medio (Courtois-Coutry y cols, 1997). Se desconoce si la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa podría cumplir alguna función similar, aunque carece de la señal de tirosina en su extremo citoplasmático.

La subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa tiene un interés adicional, ya que fue caracterizada independientemente como una molécula de adhesión en glía (AMOG) que media la interacción entre astrocitos y neuronas, específicamente la migración de las neuronas granulares del cerebelo sobre las prolongaciones de los astrocitos durante el desarrollo (Antonicek y cols, 1987; Gloor y cols, 1990). Este efecto se demostró específico de la isoforma $\beta 2$ utilizando un modelo *in vitro* de crecimiento de neuritas sobre un lecho de fibroblastos transfectados con $\beta 1$ o con $\beta 2$ /AMOG (Müller-Husmann y cols, 1993). Sin embargo, la generación de una línea de ratones transgénicos con el gen de la subunidad $\beta 2$ delecionado (Magyar y cols, 1994) ha puesto en entredicho el papel de $\beta 2$ como una molécula de adhesión clásica. Los animales de esta línea muestran trastornos motores a partir de 15 días después de su nacimiento y mueren 2-3 días después con ventrículos cerebrales mayores de lo normal, degeneración de los fotorreceptores de la retina y de las terminaciones de los astrocitos y con estructuras vacuoladas en todo el cerebro. Por otra parte, la citoarquitectura del cerebelo y la migración de las neuronas granulares parece normal. Si $\beta 2$ /AMOG es efectivamente una molécula de adhesión, su actividad debe solaparse con otras proteínas que son capaces de compensar su pérdida en el ratón $\beta 2$ /AMOG $-/-$ de forma que el cerebelo continúa desarrollándose correctamente. Los propios autores sugieren que el fenotipo encontrado podría explicarse por defectos en la actividad Na^+, K^+ -ATPasa de la cual $\beta 2$ /AMOG es parte constituyente. Homogenizados de cerebro tienen una actividad Na^+, K^+ -ATPasa normal en estos ratones, pero la distribución de $\beta 2$ es específica de tipo celular y su ausencia podría provocar cambios

indetectables al homogenizar todas las células. Otro resultado contradictorio es que, a pesar de que el ratón deficiente en $\beta 2$ muere rápidamente, trasplantes del telencéfalo de los ratones $\beta 2/AMOG^{-/-}$ son capaces de sobrevivir indefinidamente (> 500 días) en el ratón receptor de fenotipo salvaje sin que en ellos exista expresión detectable de $\beta 2$ proveniente del huésped (Isenmann y cols, 1995). Posteriormente se ha demostrado que la muerte de los fotorreceptores de la retina se produce por un aumento en el porcentaje de estas células que sufren apoptosis (Molthagen y cols, 1996).

Durante la redacción de esta memoria se han publicado los resultados obtenidos al generar una línea de ratones *knock-in* $\beta 2/\beta 1$, en la que a la vez que se inactiva el gen de la isoforma $\beta 2$ se introduce una copia del cDNA de la isoforma $\beta 1$, quedando ésta bajo los elementos de control del gen de $\beta 2$ (Weber y cols, 1998). A pesar de que la cantidad de mRNA de la subunidad $\beta 1$ sólo alcanza el 15% de la expresión normal de $\beta 2$, es suficiente para prevenir la letalidad observada en el mutante $\beta 2^{-/-}$. La morfología del SNC es normal. El único defecto que persiste es la degeneración de las células fotorreceptoras de la retina. Estos resultados indican que la isoforma $\beta 1$ es capaz de sustituir las funciones de la isoforma $\beta 2$, al menos en determinados tipos celulares, pero no aclaran la posible participación de $\beta 2$ en los procesos de adhesión entre astrocitos y neuronas

Otras proteínas estudiadas independientemente en el SNC, como GP50 en rata (Paladino y cols, 1989) o el antígeno *Nervana*, del SNC de *Drosophila* (Sun y Salvaterra, 1995), han resultado ser homólogas a la subunidad β de Na^+,K^+ -ATPasa.

Subunidad γ : estructura-función

La existencia de una tercera subunidad componente de Na^+,K^+ -ATPasa fue postulada por primera vez por Forbush y cols (1978), que encontraron un pequeño polipéptido de aproximadamente 10 KDa en

preparaciones purificadas de Na^+, K^+ -ATPasa renal que reaccionaba con derivados de la ouabaína con la misma probabilidad que la subunidad α . Esta subunidad se ha denominado γ y se asocia en proporciones equimolares con los dímeros α - β (Reeves y cols, 1980). La prueba definitiva de que este componente no era un producto de degradación de las subunidades α o β provino del clonaje de la subunidad γ de mamíferos (Mercer y cols, 1993). La subunidad γ coimmunoprecipita con complejos α - β y su distribución a lo largo de la nefrona es idéntica a la de la isoforma $\alpha 1$. El polipéptido γ consta de 58 aminoácidos que constituyen una proteína transmembrana de tipo I, con el extremo amino-terminal hacia el exterior de la célula (Therien y cols, 1997). La secuencia está altamente conservada (similitud del 93%) entre distintas especies de mamíferos (Mercer y cols, 1993, Kim y cols, 1997).

La expresión de la subunidad γ está restringida principalmente a la médula renal y al páncreas (Therien y cols, 1997, Kim y cols, 1997), aunque, al igual que la isoforma $\beta 2$, aparece transitoriamente en el hígado durante el desarrollo (Kim y cols, 1997).

La función de la subunidad γ dentro del sistema enzimático bomba de sodio no está clara, aunque recientemente se han producido avances significativos en su estudio. La importancia de esta proteína se deduce no sólo de su secuencia altamente conservada entre especies, sino del hecho de que otras ATPasas de tipo P también se encuentran acompañadas de pequeños proteolípidos análogos (Mercer y cols, 1993), aunque sin homología de secuencia, siendo el mejor conocido el asociado a la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levaduras (Navarre y cols., 1994). Por otra parte, se sabe que la presencia de la subunidad γ no es esencial para el funcionamiento del sistema, ya que hay tejidos en los que no se encuentra y sin embargo poseen actividad Na^+, K^+ -ATPasa. En experimentos de expresión heteróloga de Na^+, K^+ -ATPasa en levaduras, la presencia de la subunidad γ no tiene ningún efecto sobre el sistema (Scheiner-Bobis y

Farley, 1994). Sin embargo, cuando se utilizan otros sistemas heterólogos de expresión como las células de insecto sf9 (Minor y cols., 1998) u oocitos de *Xenopus* (Béguin y cols., 1997) se comprueba no sólo que γ se asocia específicamente con complejos α - β (y no con subunidades α de otras P-ATPasas), sino que además es capaz de modular la activación por K^+ de la enzima y de aumentar su actividad. Por otra parte, la subunidad γ es capaz por si sola de actuar como un canal de entrada de cationes a la célula en oocitos de *Xenopus* (Minor y cols., 1998). Otras pequeñas proteínas con similitudes de secuencia del 50% con la subunidad γ actúan como canales específicos de cationes, como por ejemplo CHIF (Attali y cols, 1995). La posible función de la subunidad γ como canal de cationes se ve apoyada por los resultados de Jones y cols (1997), que muestran que la subunidad γ es fundamental para el desarrollo del blastocisto de ratón y que se localiza no sólo en la membrana basolateral del epitelio trofoectodérmico junto con Na^+,K^+ -ATPasa sino que además se encuentra en la membrana apical. La ausencia de γ disminuye la actividad Na^+,K^+ -ATPasa, aunque la enzima purificada mantiene intactas sus propiedades. Se postula que γ activa Na^+,K^+ -ATPasa proporcionándole Na^+ intracelular o bien actuando como una vía de pérdida de K^+ ; ambos mecanismos posibilitan el transporte vectorial de Na^+ .

Regulación de Na^+,K^+ -ATPasa

La actividad de Na^+,K^+ -ATPasa puede ser modulada de distintas formas, mediante la acción de efectores directos o indirectos. Los efectores directos incluyen sus propios ligandos, el Na^+ , el K^+ y el ATP. El de mayor relevancia fisiológica entre ellos parece ser el Na^+ ; un aumento en la concentración intracelular de Na^+ se traduce inmediatamente en una activación de la bomba. El K^+ extracelular no parece tener tanta importancia, aunque la actividad Na^+,K^+ -ATPasa podría ser importante en la recaptación de K^+ mediada por astrocitos (Sweadner, 1995). Por último crece cada vez

más la evidencia de que existen varios análogos endógenos de la ouabaína que participarían en la regulación de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa directamente (Schneider y cols, 1998). Las implicaciones fisiológicas de estos compuestos son, evidentemente, enormes.

La actividad Na^+, K^+ -ATPasa también es regulada por efectores indirectos, cuya forma de actuación es variada. En general ejercen su acción induciendo modificaciones post-traduccionales en la enzima, una redistribución de bombas desde reservorios intracelulares hasta la membrana plasmática o cambios en la expresión de las subunidades. Un ejemplo de los dos primeros casos es la acción de la insulina sobre la bomba de sodio. Esta hormona estimula la actividad Na^+, K^+ -ATPasa en el músculo esquelético, hígado, riñón y adipocitos (Ewart y Klip, 1995). Este efecto es importante para compensar el aumento de $[\text{Na}^+]_i$ debido a la activación hormonal del transportador de aminoácidos acoplado a Na^+ y el intercambiador de $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$, además de mediar la reabsorción de K^+ por el músculo después de las comidas. El mecanismo de activación es distinto según el tejido. En hepatocitos parece ser secundario al aumento de $[\text{Na}^+]_i$, mientras que en adipocitos y en células del túbulo colector del riñón se ha propuesto un aumento en la afinidad de la Na^+, K^+ -ATPasa por el Na^+ dependiente de un factor citosólico. En músculo esquelético se ha demostrado una redistribución específica de isoformas desde compartimentos internos de la célula a la membrana plasmática en respuesta a la insulina (Lavoie y cols, 1996).

Existen numerosos estudios que describen cambios en la expresión de las distintas subunidades de Na^+, K^+ -ATPasa en respuesta a diferentes estímulos, aunque hasta ahora no se ha detectado ninguno capaz de modificar la expresión de $\beta 2$, ya sea el mRNA o su producto proteico. La descripción detallada de las distintas situaciones en las que se modifican los niveles del resto de las isoformas de las subunidades α o β queda fuera del ámbito de este estudio.

Regulación de la expresión génica

Existen varios puntos clave en los cuales se controla la expresión génica en las células eucariotas. Dejando aparte los procesos característicos del procesamiento de las proteínas ya sintetizadas, los principales puntos de control en la expresión de un gen son la activación estructural de la cromatina, la iniciación de la transcripción, la terminación de la elongación del mRNA, el procesamiento, transporte y traducción del mRNA, y la estabilidad de esta molécula. En general se acepta que la mayor parte de los eventos reguladores que controlan la expresión génica tienen relación con la iniciación de la transcripción, proceso que necesita la activación estructural de la cromatina, aunque existen muchos ejemplos en los que también participa la estructura y la estabilidad del mRNA sintetizado.

Estructura de la cromatina y factores que la modifican: acetilación/desacetilación de histonas y metilación del DNA.

El DNA en el núcleo celular se encuentra organizado y densamente compactado en forma de cromatina. La unidad básica de organización de la cromatina es el nucleosoma (Kornberg y Lorch, 1992; figura 9), alrededor del cual se enrollan 145 pb de DNA y cuyo núcleo está compuesto por un octámero de proteínas histonas, H2A, H2B, H3 y H4, dos de cada clase. Las histonas H1 y H5 no parecen estar implicadas en el enrollamiento del DNA. H1 se asocia al complejo del nucleosoma en el lugar donde entra y sale del núcleo del nucleosoma el DNA en células diferenciadas, aumentando en 20 pb la secuencia de DNA unida. La separación entre cada nucleosoma es variable según la especie y el tejido. Las interacciones adicionales entre las histonas y el DNA convierten la forma extendida en conformaciones cada vez más condensadas, denominadas fibras de 10 y 30 nm. Al parecer la histona H1 tiene un papel muy importante en la estabilización de las

estructuras de orden superior en la cromatina (Thoma y cols, 1979), aunque esta función ha sido puesta en entredicho (Svaren y Hörz, 1996).

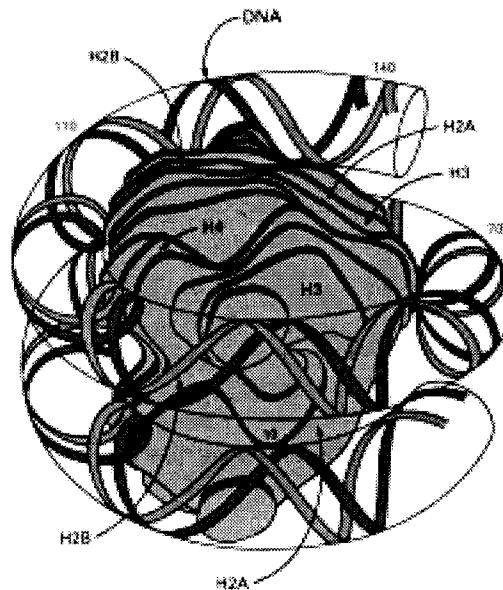


Figura 9. **Representación esquemática de la estructura de un nucleosoma.** El DNA se empaqueta formando una superhélice levógira alrededor del octámero de histonas. Se marca la situación de cada una de las histonas. (Tomado de Stryer, 1995).

Se ha acumulado gran cantidad de evidencias de que la condensación del DNA eucariótico en forma de cromatina no sólo tiene una función "física", logrando mantenerlo en el interior del núcleo celular, sino que además ejerce como un represor general de la expresión génica (Beato y Einfeld, 1997; Wu, 1997). Este efecto se extiende desde el nivel de los nucleosomas, que impiden el acceso de los factores de transcripción al DNA (aunque existen algunos factores que son capaces de unirse al DNA empaquetado en nucleosomas; Beato y Einfeld, 1997), hasta las estructuras de orden superior que determinan la existencia de regiones enteras silenciadas. Por tanto, la estructura de la cromatina tiene que ser modificada para facilitar la transcripción. Los elementos responsables de esta modificación no pueden ser solamente los factores de transcripción, ya que su energía de unión no es suficiente para sobrepasar la del DNA con la

superficie del nucleosoma (a menos que existan muchos sitios de unión consecutivos) (Felsenfeld, 1996). En la mayor parte de los casos se requiere la cooperación de otros cofactores y de las histonas. Se ha demostrado la existencia de varios complejos proteicos capaces de remodelar la cromatina en un proceso dependiente de ATP (revisado por Wu, 1997; Kadonaga, 1998). El primero descrito fue el complejo SWI/SNF de levaduras (Peterson y Herskowitz, 1992), que tiene homólogos en *Drosophila (brahma)* y en humanos (BRG1 y HBRM). Este complejo ejerce como un regulador transcripcional positivo de un limitado número de genes en levaduras y puede ser aislado como componente de la holoenzima RNA polimerasa II. Aunque todavía no se explica bien cómo ejerce su acción de forma selectiva, existen evidencias de que debe hacerlo a través de la interacción con proteínas específicas de unión a DNA. Recientemente se ha purificado a partir de células de eritroleucemia murina un complejo de remodelación de la cromatina requerido *in vitro* por el factor de transcripción EKLF (*erythroid Krüppel-like factor*) para la generación de un promotor hipersensible a nucleasas y transcripcionalmente activo en el gen de la β -globina. Se ha denominado E-RC1 y está relacionado inmunológicamente con los homólogos de SWI/SNF en mamíferos (Armstrong y cols, 1998). Este constituye un buen ejemplo de como el aparato de transcripción no interacciona con el DNA, sino más bien con la cromatina. Se han descrito otros complejos de remodelación de cromatina dependientes de ATP, como NURF (*Nucleosome Remodeling Factor* de *Drosophila*), RSC (*Remodeling the Structure of Chromatin* de *Saccharomyces*), etc. Todos ellos contienen una subunidad relacionada con SWI/SNF y que es un miembro de la familia de proteínas de unión a ribonucleósidos trifosfato. Se ha propuesto que esta subunidad actuaría como un motor de traslocación del DNA dependiente de ATP que interrumpe la unión entre el DNA y las histonas (Kadonaga, 1998).

Existen otros factores con capacidad para modificar la estructura de la cromatina (Wu, 1997; Kadonaga, 1998). Aunque el proceso de la transcripción se ha venido relacionando desde hace mucho tiempo con la

acetilación de histonas y la influencia de ésta en la estructura de la cromatina, sólo muy recientemente se han comenzado a comprender las bases moleculares de esta relación (Pazin y Kadonaga, 1997). Los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina del extremo N-terminal de las histonas, particularmente la H3 y la H4, pueden ser acetilados. El extremo N-terminal está orientado hacia el exterior del nucleosoma y se ha postulado que la neutralización de la carga positiva de los residuos de lisina debido a la acetilación disminuye la afinidad de la interacción histona-DNA y hace más accesible el DNA a los factores de transcripción. Existe una correlación positiva (aunque no universal) entre la acetilación de histonas y la actividad génica. Se ha progresado mucho en la identificación de las enzimas responsables de la acetilación/desacetilación de histonas. Entre las proteínas con actividad histona-acetil transferasa identificadas existen factores de transcripción basales (TAFII250) y coactivadores transcripcionales (GCN5, SRC-1, etc). Por otra parte una histona-deacetilasa similar a la proteína de levaduras RPD3 está implicada en la represión de la transcripción. Se ha visto que represores específicos de secuencia establecen una asociación con histona-deacetilasas a través de varias proteínas de unión, siendo la más conocida de ellas Sin3 y sus homólogos de mamíferos mSin3A y B (figura 10).

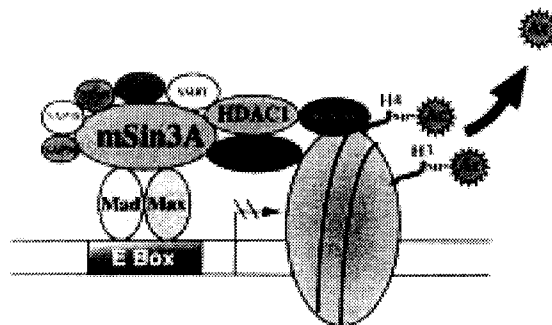


Figura 10. **Modelo de la interacción entre un represor transcripcional y las enzimas histona-deacetilasas a través de mSin3A.** En este caso se representa al represor heterodimérico Mad-Max, que se une específicamente a las secuencia E-Box e interacciona con la proteína mSin3A. Ésta a su vez interacciona con al menos siete polipéptidos, entre ellos las histona-deacetilasas 1 y 2 (HDAC1, HDAC2), que ejercen su acción desacetilando las histonas H3 y H4, lo que se traduce en una represión de la transcripción. (Tomado de Razin, 1998).

Sin embargo la relación entre la actividad histona-deacetilasa y la represión de la transcripción parece compleja, ya los tratamientos con inhibidores de estas enzimas como la tricostatina A o en las levaduras con *rpm3* interrumpido no se produce una activación génica global e incluso hay genes cuya expresión resulta reprimida (de Robertis y cols, 1996).

En un trabajo de reciente publicación (Zhang y cols., 1998) se ha demostrado la existencia en células humanas de un complejo proteico, llamado NuRD, que posee tanto la capacidad de remodelar la estructura de la cromatina de forma dependiente de ATP como la actividad histona-deacetilasa. Esto podría resultar paradójico, ya que hasta ahora se pensaba que la actividad de remodelación de la cromatina dependiente de ATP actuaba como activador transcripcional, mientras que la desacetilación de histonas estaba conectada con la represión. Sin embargo, la coexistencia de la actividad de remodelación de la cromatina y de acetilación/desacetilación de histonas podría proporcionar un nuevo mecanismo de regulación transcripcional. La necesidad de mecanismos que unan ambas actividades se entiende si se tiene en cuenta que la unión a las histonas de proteínas como las de la familia RbAp, mediadoras de la actividad histona-desacetilasa, depende de la alteración de la estructura de los nucleosomas (Verreault y cols, 1997). Zhang y cols. (1998) proponen un modelo en el que proteínas específicas de unión a DNA dirigen la unión de complejos como NuRD al promotor de un gen. NuRD catalizaría la remodelación de la cromatina en esa región, de forma que las histonas quedarían accesibles a la unión de las proteínas RbAp, permitiendo la deacetilación de las mismas. De esta manera se logra que la represión mediante deacetilación de histonas sea específica de genes concretos, explicándose los resultados dispares obtenidos con los mutantes de *rpm3* y con la tricostatina descritos anteriormente.

Hasta ahora se ha hablado de la remodelación de la cromatina, pero no de los factores que contribuyen al ensamblaje de esta estructura, esencial en el mantenimiento de la funcionalidad del genoma. El ensamblaje es

dependiente de ATP y parece estar mediado por un complejo proteico denominado ACF (*ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor*) junto con una chaperona de histonas. ACF contiene una subunidad de la familia de las proteínas de unión a nucleósidos trifosfato, al igual que todos los complejos de remodelación de la cromatina. Esto sugiere una relación entre el ensamblaje de la cromatina, su remodelación y la regulación de la transcripción. Además, una subunidad de la chaperona de histonas es idéntica a una proteína asociada a histona-deacetilasas y está relacionada con una histona-acetil transferasa. Sin embargo, es más probable que esta última relación esté implicada en el transporte de las histonas desde el citoplasma hasta el núcleo y en su estabilidad que en procesos relacionados con la transcripción (Kadonaga, 1998).

Una modificación común del DNA es la adición enzimática de un radical metilo a alguna de las bases que lo componen. Entre los eucariotas, la principal (posiblemente la única) base modificada es la citosina, que se convierte en 5-metilcitosina (5mC). En animales el 90% de las 5mCs se encuentran en el dinucleótido CpG. Los niveles de 5mCpG varían mucho según las especies animales. Los vertebrados presentan el mayor porcentaje de metilación, mientras la mayoría del resto de las especies animales (por ejemplo, conocidos organismos modelo como *Drosophila* o *C. elegans*) no poseen 5mCpG detectables (Bird, 1994). Por tanto la metilación del DNA no tiene una función biológica universal, aunque su importancia en el desarrollo de los mamíferos ha sido puesta de manifiesto con la generación de un ratón deficiente en la enzima DNA-metiltransferasa, que muere durante la gestación (Li y cols, 1992). Existe evidencia experimental de que la metilación del DNA afecta a la transcripción de los genes, aunque en algunos casos la relación entre ambos procesos parece circunstancial. De cualquier manera, la presencia de 5mCpG interfiere en la mayor parte de los casos con el proceso de la transcripción (Bird, 1994). Se han propuesto dos mecanismos por los cuales la metilación podría contribuir a la represión transcripcional. El primero de ellos es el bloqueo directo de la unión de un

factor activador de la transcripción a su secuencia diana. El segundo sería mediante la atracción de proteínas mediadoras de la represión. Aunque parece ser que ambos mecanismos tienen lugar en la célula, la identificación de proteínas de unión a 5mCpG (por ejemplo, MeCP1, MeCP2 y la histona H1; Nan y cols, 1997) ha proporcionado evidencia genética de que el segundo de ellos es el más importante. Genes hipermetilados, y por tanto silenciados, vuelven a transcribirse cuando se inactivan los genes de las proteínas de unión a 5mCpG. (Bird, 1994; Nan y cols., 1997). La unión de estas proteínas al dinucleótido CG metilado no parece estar afectada por las secuencias flanqueantes. Además, se ha demostrado que son capaces de unirse al DNA empaquetado en forma de cromatina. Si se tiene en cuenta la amplia distribución de 5mCpG a lo largo de todo el genoma se deduce que estas proteínas poseen una función de represión inespecífica de la transcripción. Esta función podría ser importante para reducir el "ruido de fondo" transcripcional, que sería incompatible con los complejos programas de expresión génica de las células diferenciadas (Nan y cols, 1997). Un factor crucial en la represión mediada por proteínas de unión a 5mCpG es la densidad de estos dinucleótidos. La efectividad de la represión será mayor en zonas con concentraciones locales elevadas de 5mCpG. Por otra parte existen evidencias de que los dinucleótidos metilados están en exceso respecto a la proteína MeCP2. Esto tiene como consecuencia que, dado que existen diferencias en las cantidades de MeCP2 entre distintos tejidos, la efectividad de la inhibición será mayor en unos que en otros. El SNC presenta altos niveles de expresión de MeCP2 y por tanto el mecanismo de represión "global" sería muy efectivo en este tejido (Nan y cols, 1997).

Un aspecto importante para comprender la funcionalidad de la metilación del DNA es la existencia de regiones ricas en el dinucleótido CpG y que se encuentran constitutivamente sin metilar. Estas zonas se denominan islotes CpG y ocupan aproximadamente el 1-2% del genoma de un mamífero. Se caracterizan por poseer un contenido en G+C mayor del 50% y por tener un porcentaje de dinucleótidos CpG parecido al de GpC

(ambos estando cercanos al valor teórico predicho). En el resto del genoma el dinucleótido CpG se caracteriza por estar en un porcentaje inferior al predicho teóricamente si la probabilidad de su aparición fuese independiente (Bird, 1986). La predicción, comprobada en muchas ocasiones, es que los islotes CpG se encuentran sin metilar, al menos en células germinales. Los islotes CpG se encuentran generalmente en la región 5' de los genes, característica que los ha hecho útiles en el clonaje de genes al azar. Todos los genes expresados constitutivamente poseen uno o varios islotes CpG asociados, aunque también se encuentran casos de islotes CpG en genes cuyo producto proteico aparece sólo en algunos tejidos.

Se ha demostrado que los promotores de genes de expresión constitutiva de células de mamíferos, que como se ha dicho se localizan invariablemente en islotes CpG, están estrechamente relacionados con orígenes de replicación de DNA. Esos resultados son relevantes porque sugieren que la transcripción y la replicación del DNA podrían compartir elementos comunes de regulación (Delgado y cols, 1998).

Es importante señalar que la existencia de 5mC aumenta mucho la carga mutacional que tienen que soportar los organismos, ya que, a pesar de la existencia de un sistema específico de reparación, un tercio de las mutaciones puntuales caracterizadas que dan lugar a enfermedades humanas derivan de la transición CpG a TpG. Aunque multitud de organismos son capaces de desarrollarse sin metilación en su genoma, parece haber alguna ventaja en la introducción de estos mecanismos en vertebrados que compensa el incremento en la carga mutacional, ya que se ha hecho imprescindible para el desarrollo (Li y cols, 1992; Bird, 1992). Esta ventaja podría encontrarse en un aumento de la estabilidad del genoma debido a la metilación. Las células deficientes en el gen de la DNA metiltransferasa presentan un fenotipo mutador cuyas características sugieren que la metilación del DNA impide recombinaciones mitóticas y/o contribuye a la segregación eficiente de los cromosomas durante la mitosis (Chen y cols, 1998).

A lo largo de 1998 tres grupos han puesto de manifiesto un mecanismo molecular que conecta el silenciamiento de la expresión génica mediante metilación con la estructura de la cromatina (revisado por Razin, 1998). Se ha descrito que MeCP2 interacciona a través de parte de su dominio represor de la transcripción con el correpresor mSin3A, que es responsable del reclutamiento de histona-desacetilasas en levaduras, *Drosophila* y mamíferos. Como se describió anteriormente, Sin3A se une a proteínas que reconocen secuencias silenciadoras específicas, pero se ha demostrado que, en mamíferos, anticuerpos contra MeCP2 inmunoprecipitan mSin3A y la actividad histona-desacetilasa (figura 11). La desacetilación de las histonas H3 y H4 hace a los promotores de los genes inaccesibles a los factores de transcripción. Para que el gen se active, el complejo represor se debería reemplazar por un activador que acetilara las histonas de nuevo. Existen datos de algunos genes como el de la vitelogenina en los que parece existir un mecanismo activador similar al propuesto.

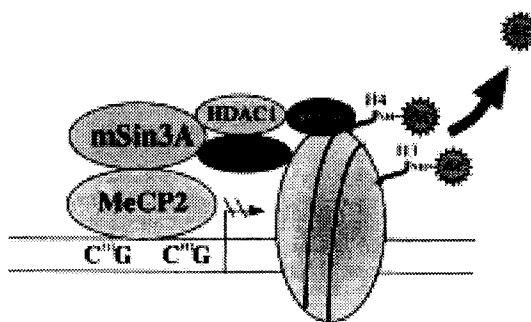


Figura 11. **Modelo de la represión transcripcional estable inducida por MeCP2 y mediada por mSin3A.** El complejo se forma inicialmente con la unión de MeCP2 a los dinucleótidos mCpG. (Tomado de Razin, 1998).

Estos datos sugieren un mecanismo para el mantenimiento de estructuras específicas en la cromatina después de cada replicación del DNA. Las metiltransferasas metilan el DNA inmediatamente después de su replicación. Los dinucleótidos 5mCpG unirían MeCP2, que a su vez dirigiría la desacetilación de las histonas (que en los nucleosomas recién formados están acetiladas) y el restablecimiento de la estructura de la cromatina en la misma forma que tenía antes de la replicación del DNA (Razin, 1998).

De cualquier forma, hay que resaltar que existen mecanismos de represión de la transcripción dependientes de metilación pero independientes de la acetilación/desacetilación de histonas. Un ejemplo es la histona H1, que se sitúa en las zonas de unión entre nucleosomas en el caso de que estén altamente metiladas, impidiendo el libre movimiento de los mismos (Svaren y Hörz, 1996).

Con los datos expuestos en esta sección parece evidente que la transcripción de los genes eucarióticos es una red interconectada de factores de transcripción y de complejos modificadores de la cromatina, y que parece imposible llegar a comprender la regulación de la transcripción de un gen sin tener en cuenta el papel que juega la cromatina en el proceso. En la figura 12 se muestra un diagrama esquemático de las relaciones potenciales existentes entre la cromatina y la transcripción.

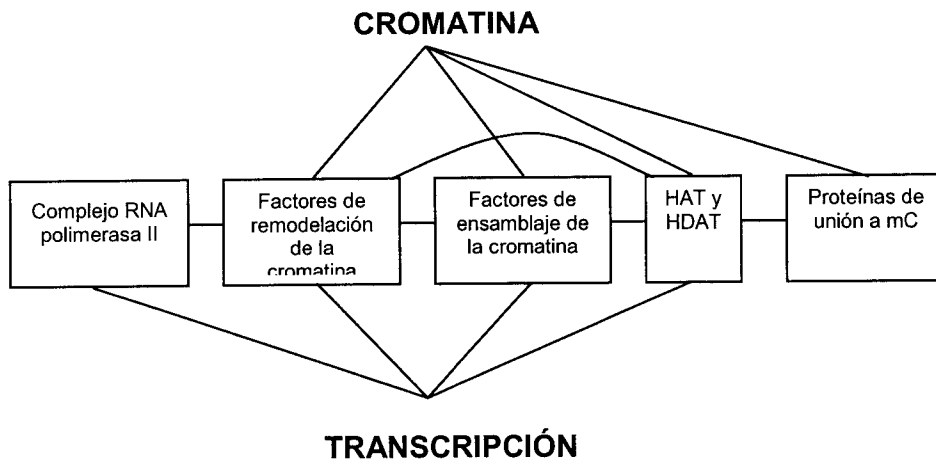


Figura 12. Factores que relacionan la estructura de la cromatina con la regulación de la transcripción y posibles interacciones entre ellos. Las conexiones propuestas están en todos los casos apoyadas por datos experimentales, aunque algunas de ellas están aún sujetas a polémica. Por otra parte pueden existir otras conexiones además de las esquematizadas. (Adaptado de Kadonaga, 1998).

Iniciación de la transcripción. Complejo RNA pol II. Activadores y represores transcripcionales

La enzima clave en la iniciación de la transcripción es la RNA polimerasa. La expresión diferencial de genes en los organismos eucarióticos es responsabilidad de la RNA polimerasa II (RNA pol II). Se ha logrado desarrollar un modelo esquemático del ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción de la RNA pol II (Buratowski, 1994; Ogbourne y Antalis, 1998; figura 13). La actividad de la RNA pol II depende completamente de una serie de factores de transcripción auxiliares (GTFs según las siglas en inglés de *General Transcription Factors*). Los GTFs se congregan en la zona proximal del promotor del gen y ejercen de plataforma para la incorporación de la RNA polimerasa II. En esta zona existe, en la mayor parte de los genes eucariotas, un elemento conocido como caja TATA, situada aproximadamente 25 pb a 5' del inicio de transcripción. De todos los GTFs el único que interacciona con una secuencia específica es la proteína de unión a TATA (TBP) (en los genes en los que la caja TATA está ausente la transcripción parece basarse en la iniciación mediada por otros factores de transcripción como Sp1 o ETS -Pugh y Tjian, 1991; Kaufmann y cols, 1996-). La TBP y algunos factores asociados forman el complejo denominado factor de transcripción IID (TFIID). El ensamblaje continúa con la incorporación de TFIIA. Esta unión provoca un cambio conformacional y permite la entrada al complejo de TFIIIB, que a su vez facilita la unión de un complejo preensamblado de TFIIIF y la RNA pol II en su forma no fosforilada. A continuación entran en el complejo TFIIIE, TFIIH y un agregado de proteínas conocido como mediador. En este momento la iniciación de la transcripción está completa, pero la RNA pol II debe ser fosforilada para que comience la elongación. Con la fosforilación se eliminan TFIIIB, TFIIIE y TFIIH (aclaramiento del promotor). Según se sugiere en un trabajo de reciente publicación (Orphanides y cols, 1998), es necesaria además la presencia de un factor de remodelación para facilitar la elongación a través del DNA

molde organizado en nucleosomas. Una vez finalizada la transcripción la RNA pol II debe ser defosforilada para que pueda comenzar un nuevo ciclo.

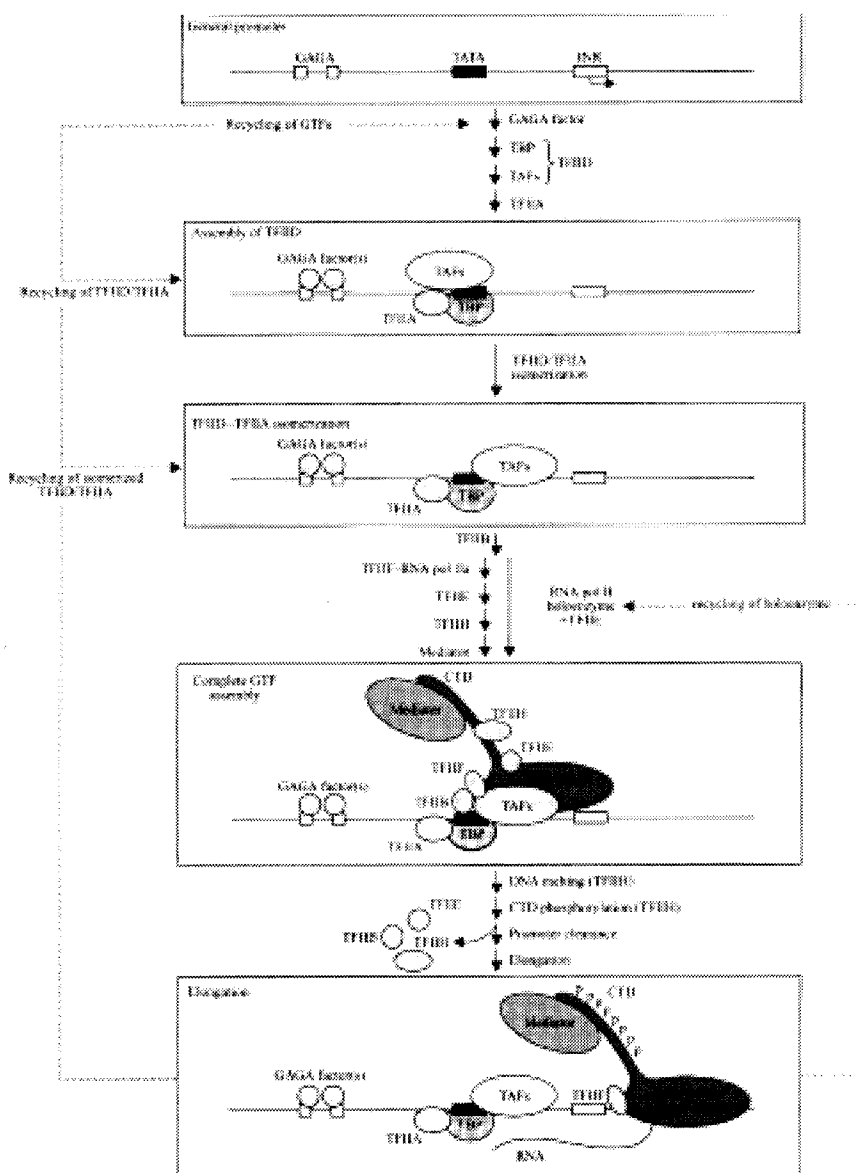


Figura 13. **Ensamblaje de los factores generales de transcripción en un promotor eucariótico típico.** Se muestra un promotor con caja TATA, una secuencia de iniciación (INR) con el inicio de transcripción y dos elementos GAGA. Se esquematiza la secuencia de ensamblaje de los GTFs al promotor y el inicio de la elongación del mRNA. (Tomado de Ogbourne y Antalis, 1998).

Recientemente se ha identificado un complejo formado por la RNA pol II, TFIIB, TFIIH y el mediador que puede ensamblarse de manera independiente al promotor y que se ha denominado holoenzima RNA pol II. Se ha postulado que este es realmente el mecanismo de formación del complejo iniciador de la transcripción *in vivo* (Greenblatt, 1997). Se ha sugerido que la holoenzima RNA pol II es capaz de mediar señales represoras o activadoras. El grupo de Ptashne ha publicado datos que sugieren que los activadores podrían funcionar incorporando la holoenzima como un complejo al promotor (Barberis y cols, 1995). También podría ser mediador de alteraciones en la estructura de la cromatina y transducir señales activadoras o represoras mediante el estado de fosforilación de la RNA pol II, que influiría en la elongación y la terminación de la transcripción.

Por otra parte hay cada vez mayor evidencia de que lo que se denomina holoenzima RNA pol II son en realidad complejos con diferencias en su composición, capaces de interactuar con una gran cantidad de factores de unión a DNA. Es muy probable que el ensamblaje de los GTFs y la iniciación de la transcripción difiera en los distintos promotores (Goodrich y cols, 1996). Esto añade un nuevo mecanismo de regulación para la expresión de grupos de genes específicos de un tejido o una etapa del desarrollo (Chang y Jaehning, 1997). El análisis de la función de cada uno de los componentes del aparato de transcripción en la regulación de la transcripción de un determinado grupo de genes ha experimentado un gran avance gracias a la descripción del genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae*. Con esta información se ha podido estudiar simultáneamente la expresión de todos los genes de esta levadura y los cambios producidos por la mutación de componentes claves de la holoenzima RNA pol II, del factor de transcripción general TFIID y de un complejo de remodelación de la cromatina (Holstege y cols, 1998). Los resultados obtenidos apoyan la idea de que los componentes del aparato de transcripción participan en la regulación de la transcripción de grupos específicos de genes, de forma que se superponen al control ejercido por los factores de transcripción

específicos. Además, se ha puesto de manifiesto que el complejo de iniciación de la transcripción incluye las dianas finales de las vías de transducción de señales.

El aparato de transcripción basal sólo consigue niveles mínimos de expresión. Se necesitan otros factores para incrementar las tasas de transcripción. Por el contrario, es necesario un mecanismo de represión para silenciar el gen por completo, aunque parece ser que el mecanismo de represión de la transcripción no es tan importante en eucariotas como en procariontes (Ogbourne y Antalis, 1998). Se han identificado muchos activadores y sus secuencias diana, mientras que los represores se conocen peor. En la mayor parte de los promotores eucariotas se encuentran secuencias consenso para la unión de factores como NF1 o Sp1, situadas generalmente en los 100 primeros pb a 5' del inicio de transcripción. Estos factores son muy importantes para aumentar las tasas de transcripción, pero existen muchos otros elementos capaces de responder a estímulos externos (por ejemplo, los elementos de respuesta a glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas tiroideas, etc).

Existen varios mecanismos mediante los cuales los activadores pueden ejercer su función (Goodrich y cols, 1996). El más obvio es mediante el reclutamiento directo de GTFs al promotor. También podrían alterar la conformación de los complejos de iniciación parcialmente ensamblados o mediar la modificación covalente de los mismos (por ejemplo provocando su fosforilación). En realidad se sabe que las interacciones proteína-proteína son fundamentales, pero los mecanismos precisos de activación no se conocen con detalle. Las interacciones proteína-proteína se ven facilitadas en muchas ocasiones por la unión de factores con capacidad de inducir curvatura en el DNA. Se han encontrado activadores de la transcripción a gran distancia, incluso a varias Kpb (Bou-Gharios y cols, 1996), del promotor basal, tanto en dirección 5' (la mayoría) como en dirección 3'.

El papel de los activadores es muy importante en la especificidad de la transcripción. El ejemplo más extremo que se conoce es el factor Myo D, que sólo se encuentra en células musculares y que por sí solo es capaz de transformar fibroblastos en miocitos (Olson, 1990). También los represores son importantes en la determinación de la especificidad de la expresión génica (Ogbourne y Antalis, 1998).

Técnicas de estudio de los elementos implicados en la regulación de la transcripción.

Una vez que se conoce la secuencia de nucleótidos de un gen, especialmente en su zona 5', se puede abordar el estudio de la regulación de su expresión mediante una gran variedad de técnicas. A continuación se describen esquemáticamente las más usuales.

Análisis de promotores mediante mutagénesis *in vitro*

Esta técnica se utilizó por primera vez con el gen de la timidina kinasa de herpesvirus (McKnight y Kingsbury, 1982) y consiste en el cambio o deleción de zonas concretas de un gen (generalmente la región 5') comprobando como se afecta la expresión del mismo en un sistema celular en el que se introduce la construcción (líneas celulares transfectadas, oocitos de *Xenopus*, etc). Generalmente la zona 5' se acopla a un gen, denominado gen *reporter* cuyo producto se detecta fácilmente y que no está presente en el sistema celular elegido (luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa, β -galactosidasa). Mediante deleciones seriadas se localizan zonas que activan o inhiben la transcripción de forma significativa respecto al control. Estas zonas se pueden definir con resolución creciente hasta llegar al nivel de un sólo nucleótido. Con esta aproximación se han identificado gran número de secuencias reguladoras, lo que ha dado lugar al aislamiento de factores implicados en la regulación de la expresión génica. Por ello esta

técnica es la de elección en la mayor parte de los estudios preliminares sobre regulación de la expresión.

Sin embargo su utilización presenta algunos problemas. En primer lugar en eucariotas complejos como los mamíferos pueden existir secuencias reguladoras a gran distancia del inicio de transcripción o en el interior del gen, por lo que el fragmento inicial elegido, a pesar de ser capaz de dirigir la expresión del gen *reporter*, podría no contener todas las secuencias reguladoras necesarias *in vivo*. Otro problema mucho más importante es que en los experimentos de transfección transitoria el promotor puede empaquetarse o no con histonas nucleares de igual forma que lo hace el gen en la célula (Beato y Eisfeld, 1997). Ya se ha descrito antes la enorme importancia de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. Por último hay que tener en cuenta que las deleciones en un promotor provocan cambios en las distancias entre dos secuencias reguladoras a menos que se introduzcan fragmentos de DNA heterólogos (cuyo efecto también es difícil de controlar). Estos cambios pueden alterar por completo las interacciones entre las proteínas, de manera que se obtiene un efecto que no es específico de la zona delecionada. De esta manera, y a pesar de que se trata de una técnica de extraordinaria utilidad, los resultados obtenidos carecen en muchas ocasiones de significado fisiológico y por tanto es necesario complementarlos con otros procedimientos.

Una mejora fundamental de esta técnica ha sido la generación de organismos transgénicos que incluyen en su genoma las construcciones con el promotor del gen de interés acoplado a un gen *reporter* (un ejemplo de este tipo de estudio se puede ver en el trabajo de Bou-Gharios y cols, 1996). De esta manera se evitan varios de los inconvenientes descritos, ya que en primer lugar se puede determinar si el fragmento elegido dirige la expresión del gen *reporter* con la misma especificidad de tejido y durante el desarrollo que tiene el gen en estudio. Se utiliza un sistema mucho más cercano al fisiológico para el análisis de las secuencias reguladoras.

Ensayos bioquímicos de transcripción *in vitro*

Los primeros sistemas de transcripción *in vitro* fueron desarrollados a principios de los años 80 (Luse y Roeder, 1980; Dynan y Tjian, 1983) y han permitido precisar las funciones de los GTFs y de proteínas reguladoras específicas. Se pueden utilizar extractos nucleares (crudos o fraccionados) o sistemas reconstituidos a partir de factores purificados (Zhang y cols, 1996).

Esta técnica tiene, además de la lógica dificultad experimental, los inconvenientes derivados de ensayar *in vitro* un proceso tan extraordinariamente complejo como la transcripción.

Identificación de factores reguladores mediante ensayos de retardo en gel, *Southwestern blots* y técnicas de *footprinting in vitro*

Para identificar los posibles factores específicos implicados en la regulación de la transcripción de un gen se puede ensayar la unión de proteínas procedentes de extractos nucleares de distintos tejidos (o un tejido en distintos estados fisiológicos) a pequeños fragmentos del promotor. La mezcla de factores nucleares y de sondas de DNA, convenientemente marcadas, se someten a una electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida. Si la sonda se une a alguna proteína puede detectarse un retardo en la migración electroforética del DNA (Carey, 1991). Si además se sospecha qué factor nuclear puede estar provocando el retardo y se dispone de anticuerpos que lo reconocen específicamente, se puede comprobar la identidad del factor añadiendo los anticuerpos a la reacción. En algunos casos se provoca un retardo adicional en la migración electroforética, ya que aumenta el peso molecular del complejo (*supershift*), mientras que en otras ocasiones se inhibe la unión debido a la competición del anticuerpo. Con esta técnica se puede estudiar además el efecto de cofactores como hormonas o cationes divalentes en la unión de los factores nucleares al DNA. También se ha utilizado de forma cuantitativa para estudiar las cinéticas de unión proteína-DNA.

Para la identificación de factores de transcripción también se utiliza la técnica de *Southwestern blot*, en la que las proteínas se separan según su peso molecular en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, se transfieren a una membrana y se renaturalizan *in situ* tras haber eliminado todo el detergente que tenían unido. A continuación se incuba la membrana con una sonda de DNA bicatenario correspondiente a un fragmento del promotor de interés y marcada radiactivamente. Mediante autorradiografía se puede detectar si existen proteínas en la membrana capaces de unirla (figura 14).

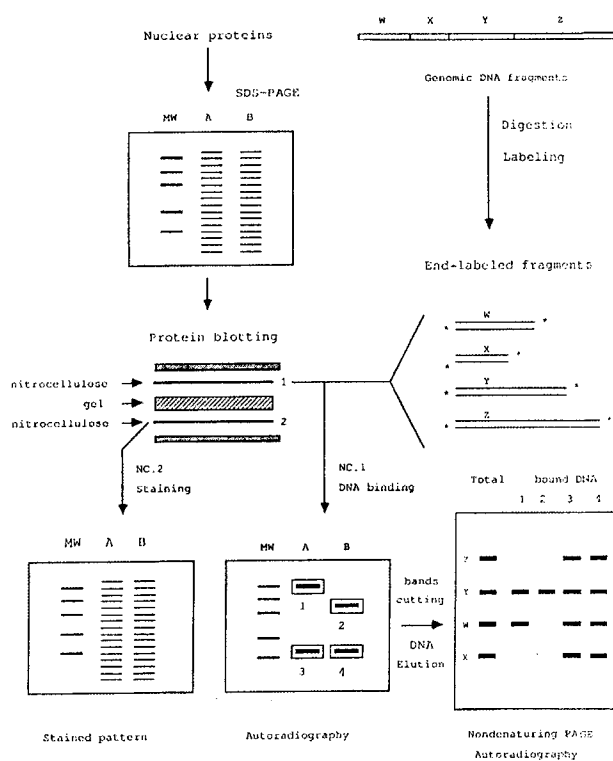


Figura 14. Sumario del procedimiento de identificación de proteínas de unión a DNA mediante *Southwestern blot*. (Tomado de Lelong, 1993).

El inconveniente de estas dos técnicas es que las proteínas reguladoras pueden estar presentes pero no unirse debido a que el medio no tiene las condiciones necesarias para la interacción o en el caso del *Southwestern blot* porque no son capaces de renaturalizar o porque actúan

como heterodímero en la unión. Además, incluso aunque una proteína interaccione con la sonda, nada indica que esto tenga relevancia fisiológica. La utilización de esta técnica es secundaria al mapeo de las secuencias de importancia en la regulación.

La secuencia con la que interacciona un factor proteico se puede determinar con una resolución a nivel de nucleótido mediante las técnicas de *footprinting in vitro*, basadas en la protección que la proteína unida ejerce sobre el DNA frente al ataque de distintas sondas, tanto enzimáticas (generalmente la DNasa I) como químicas (por ejemplo, dimetil sulfato). La comparación de los fragmentos de degradación del DNA unido a la proteína y del DNA purificado permiten localizar las zonas de interacción. Esta técnica es muy eficaz utilizada con los experimentos de retardo en gel.

Hipersensibilidad a nucleasas y sondas químicas en tejidos y células permeabilizadas. Resistencia a la acción de exonucleasas

La estructura de la cromatina está ligada estrechamente a la regulación de la transcripción. Un test comunmente utilizado para detectar zonas importantes en la regulación de la expresión de un gen es la localización mediante marcaje indirecto (figura 15) de los sitios con hipersensibilidad a DNasa I dentro del promotor de ese gen (Wu, 1980, 1984 y 1989), que representan zonas en las que la condensación de la cromatina es menor y que suelen coincidir con sitios de unión de factores de transcripción. Una ventaja adicional de esta técnica es que permite el rastreo de varias kilobases de DNA a la vez. El mapeo de hipersensibilidad a DNasa I se puede realizar tanto en núcleos aislados de tejidos o células como en células permeabilizadas en cultivo.

También se pueden utilizar otras nucleasas más específicas, como la nucleasa S1, específica de DNA monocatenario (Michelotti y cols, 1996), o la nucleasa micrococcal, que pone de manifiesto la presencia o no de nucleosomas en una zona concreta y si éstos se encuentran en posiciones

definidas respecto a la secuencia de DNA (Thoma, 1996). También se han utilizado distintos agentes químicos que modifican el DNA de forma más o menos específica (Gross y Garrard, 1988, y referencias incluidas). En cualquier caso, e independientemente de la sonda utilizada, el método de detección más empleado es el del marcaje indirecto, resumido en la figura 15.

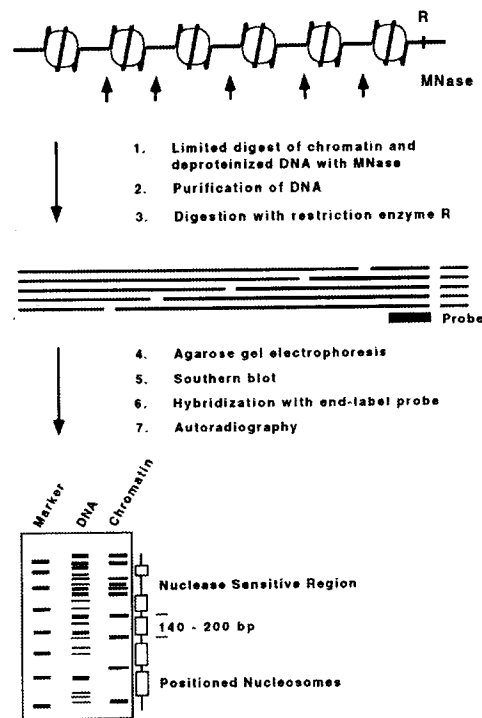


Figura 15. **Detección de hipersensibilidad a nucleasas mediante marcaje indirecto.** En este caso se esquematiza un experimento con nucleasa micrococcal, aunque la técnica de detección es independiente de la nucleasa utilizada. (Tomado de Thoma, 1996).

Siguiendo una aproximación similar se puede determinar la presencia de factores proteicos fuertemente unidos al DNA debido a la barrera que representan al progreso de las exonucleasas como Bal 31 o Exo III (Wu, 1989). Las histonas no constituyen una barrera para estas exonucleasas, lo que hace a este test específico para detectar factores de transcripción.

Análisis de metilación con enzimas de restricción

Como ya se ha comentado, la metilación del DNA es una modificación importante para la regulación de la expresión génica. Existen isosquizómeros de enzimas de restricción que difieren en su sensibilidad a la metilación de la diana. En concreto, Msp I corta en CCGG esté o no metilada la citosina, mientras que Hpa II corta en la misma diana sólo si no hay 5mC. Esta diana incluye el dinucleótido CpG, que acapara el 90% de la metilación del genoma de mamíferos. Se puede hacer un mapeo a baja resolución de la metilación mediante southern blot de varias kilobases del promotor de un gen en distintos tejidos y fases del desarrollo. El inconveniente de esta aproximación radica en el bajo número de residuos CpG analizados.

***Footprinting in vivo* del DNA genómico mediante LM-PCR**

Con esta técnica se logra un mapa de alta resolución (nucleótido a nucleótido) de las zonas de DNA en estrecho contacto con proteínas en las células vivas. El concepto de protección es igual al del *footprinting in vitro*, aunque en este caso el tratamiento con sondas químicas o enzimáticas se realiza con el DNA en un estado más próximo al fisiológico. Se puede aplicar a tejidos, en cuyo caso hay que aislar núcleos previamente, o a células en cultivo. Si la sonda es capaz de atravesar la membrana plasmática, como es el caso del dimetil sulfato, no es necesario ningún tratamiento previo, lo que tiene la ventaja de realizar el experimento en condiciones fisiológicas. Con otro tipo de sondas como la DNasa I es necesario permeabilizar primero las células o aislar sus núcleos. La visualización de los fragmentos de DNA generados es mucho más problemática en este caso ya que se parte de una mezcla compleja de DNA genómico fragmentado. El procedimiento utilizado se basa en una PCR mediada por ligación (LM-PCR, figura 16). Con un cebador específico de la secuencia a analizar se realiza una primera extensión para formar un fragmento bicatenario al que se pueda unir una corta secuencia conocida mediante ligación. Esta ligación es orientada debido a que el fragmento tiene un extremo romo y otro protuberante. Este

molde es el utilizado para la PCR, que utiliza un segundo oligonucleótido específico, anidado al anterior, y un cebador complementario al fragmento común. El paso final consiste en la utilización de un tercer cebador específico marcado radiactivamente para una extensión que producirá los fragmentos analizados posteriormente mediante electroforesis y autorradiografía.

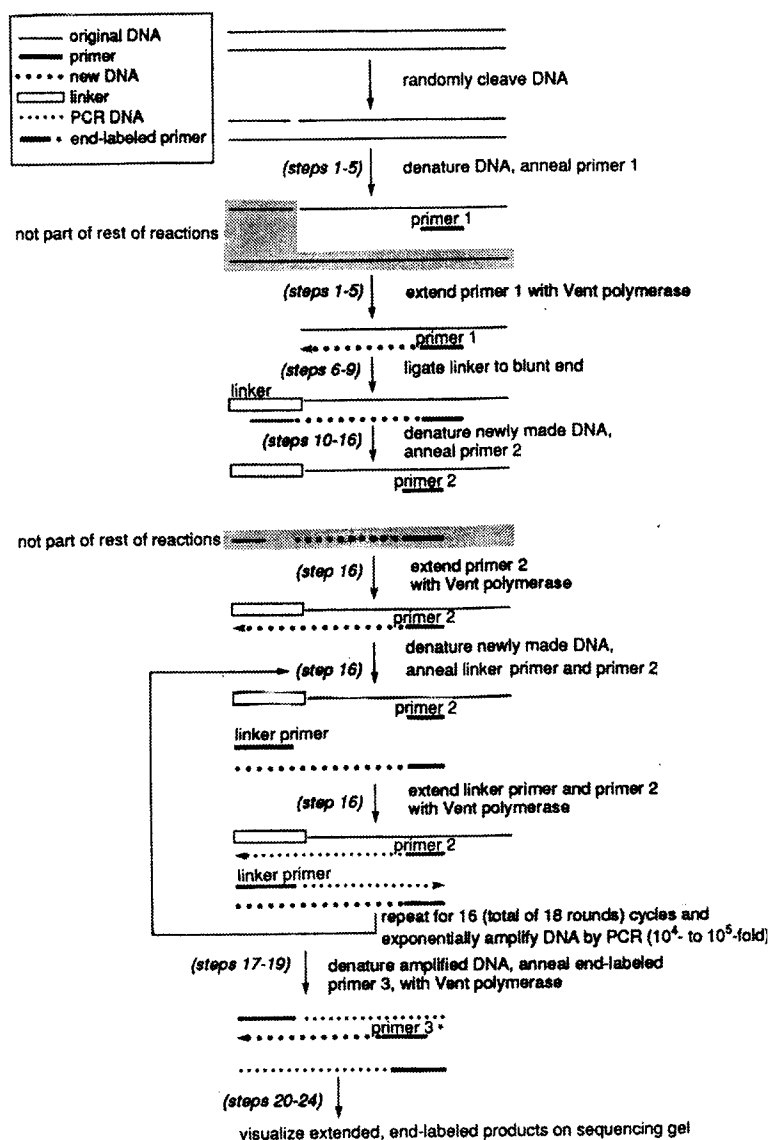


Figura 16. Procedimiento de LM-PCR. (Tomado de Mueller y cols, 1992).

Una vez determinadas las secuencia a las que se une una proteína in vivo se puede deducir si se trata de un factor de transcripción conocido o si por el contrario podría constituir un lugar de unión de un nuevo factor (o una secuencia consenso nueva para la unión de un factor ya conocido). Esta técnica se puede aplicar a cualquier zona que se sepa de importancia en la regulación de un gen, como por ejemplo las determinadas con la hipersensibilidad a nucleasas. El principal inconveniente de este procedimiento es que no detecta proteínas importantes en la regulación que no se unen a DNA (p.e. factores de transcripción que interactúan con otros factores o con la RNA pol pero no con el DNA), además de su complicación técnica. No se pueden analizar zonas muy grandes de DNA, por lo que hay que tener un mapeo previo obtenido por otros medios.

La LM-PCR también se puede utilizar en el análisis de la metilación partiendo de DNA genómico purificado, ya que la reacción de hidrazina + piperidina corta específicamente citosinas no metiladas (Maxam y Gilbert, 1980).

Regulación transcripcional de la expresión del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa

Se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos de regulación transcripcional de las isoformas de Na^+, K^+ -ATPasa, especialmente de los de la subunidad β .

El gen que codifica la isoforma $\beta 2$ ha sido clonado y secuenciado íntegramente en ratones (Magyar y Schachner, 1990) y humanos (Ávila y cols, 1998), y parcialmente en ratas (Kawakami y cols, 1990).

El grupo de Kawakami analizó la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en rata acoplado 2.8 Kb de esta zona a genes *reporter* y realizando delecciones seriadas para definir las zonas implicadas en la regulación de la transcripción (Kawakami y cols, 1992). Las células utilizadas en este estudio,

B103, son una línea derivada de neuroblastoma de rata (Schuber y cols, 1974) que expresan la subunidad β_2 (Martín-Vasallo y cols, 1989). En la figura 17 se muestran los resultados iniciales de este análisis.

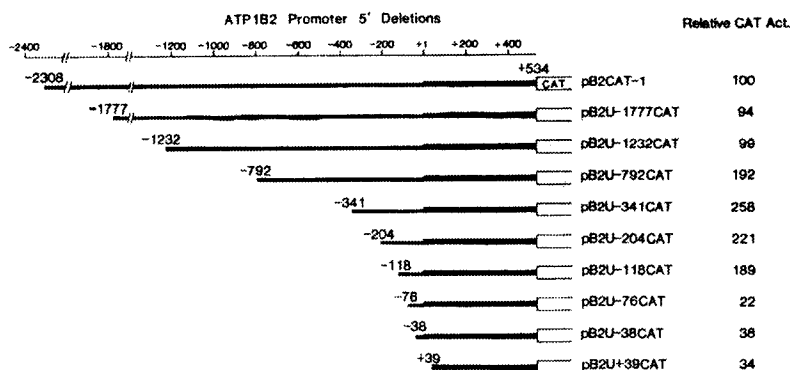


Figura 17. Construcciones utilizadas por Kawakami y cols (1992) para la localización de zonas de la región 5' del gen de la subunidad β_2 implicadas en la regulación de su expresión. A la derecha se muestran los valores de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) relativizados a la construcción con 2,3 Kpb del promotor, a la que se asigna valor 100.

A pesar de encontrar variaciones sustanciales en la expresión del gen *reporter* a partir de la tercera delección (a -1232 pb del inicio de transcripción), sólo se profundizó el análisis a partir de -118 pb. Mediante delecciones, sustituciones por secuencias heterólogas y mutaciones puntuales, los autores identificaron dos elementos reguladores positivos cuya función se compensa mutuamente. El primero de ellos está situado entre -156 y -138 y corresponde a la secuencia de unión del factor de transcripción general Sp1. El segundo elemento regulador, denominado AMRE (AMOG regulatory element), se sitúa entre los nucleótidos -88 y -77 y también contiene la secuencia mínima de unión para Sp1, aunque las bases flanqueantes son algo diferentes. Esta secuencia está conservada entre rata y ratón, pero no totalmente en humanos. En el mismo estudio se ensayó el efecto activador de la transcripción de este elemento y de la secuencia consenso de Sp1, que es ligeramente distinta, en la línea B103 y en otras líneas celulares que no expresan β_2 , como C6 (astrocitoma de rata), MDCK (riñón de perro) y

3Y1 (embrión de rata). El patrón de activación encontrado fue 3Y1>B103>MDCK>C6. Por tanto AMRE no es específico de células de sistema nervioso central y ni siquiera de células que expresen $\beta 2$. Por otra parte, su patrón de activación es distinto al de Sp1, aunque en un estudio posterior del mismo grupo (Kawakami y cols, 1993), se demostró mediante distintas técnicas que la proteína que interacciona con AMRE en B103 y en cultivos primarios de astrocitos es, de hecho, Sp1. El patrón diferente de activación de AMRE y de la secuencia consenso de Sp1 puede ser explicado por afinidades diferentes de la proteína hacia las dos secuencias, por efectos posicionales o porque la actividad de Sp1 es muy variable dependiendo del tejido estudiado (Robidoux y cols, 1992).

Sp1 se ha encontrado en todas las células estudiadas hasta ahora, aunque sus niveles de expresión son variables. Forma parte de una familia génica de elevada homología, cada vez con más elementos identificados y que se unen a secuencias similares. Como ya se ha descrito anteriormente, Sp1 interacciona con la maquinaria basal de transcripción y con elementos reguladores a mayor distancia, apareciendo en la mayor parte de los promotores estudiados. Además ha sido implicado en otros procesos como el mantenimiento de los islotes CpG libres de metilación, remodelación de la estructura de la cromatina y regulación de la expresión de genes del ciclo celular, estando la misma actividad de Sp1 modulada por ciclinas (Marin y cols, 1997 y referencias incluidas). Estos datos hacen pensar que Sp1 tiene, además de su papel en la activación de la maquinaria basal de transcripción, una función general en el establecimiento de la competencia para la transcripción y la regulación del ciclo celular.

Aunque parece que Sp1 puede tener un papel importante dentro del promotor de $\beta 2$, su acción no es capaz de explicar por sí sola la compleja regulación a la que está sometida la expresión de este gen. Por tanto, es lógico pensar que existan otros factores implicados en la regulación de la transcripción del gen de la subunidad $\beta 2$.

Los intentos de encontrar elementos que regulen la transcripción de las subunidades α y β de forma coordinada no han tenido éxito. La comparación de los promotores de todas las isoformas da como resultado algunas secuencias comunes muy cortas (Kawakami y cols, 1990), pero hasta ahora no se ha demostrado que ninguna de ellas sea relevante, excepto Sp1, que se ha visto que participa en la regulación de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ además de $\beta 2$ (Murakami y cols, 1997). Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta que las secuencias consenso de Sp1 se encuentran en la mayor parte de los genes eucariotas. En cualquier caso las comparaciones entre los promotores de las subunidades de Na^+, K^+ -ATPasa resulta problemática, ya que los fragmentos homólogos son muy cortos y la mayor parte de la secuencia es completamente diferente.

Capítulo II

Planteamiento experimental

El sistema enzimático Na^+, K^+ -ATPasa puede constituirse a partir de cuatro isoformas de la subunidad α y tres isoformas de la subunidad β . La distribución de estas isoformas es específica de tipo celular y está modulada durante el desarrollo. El trabajo de nuestro grupo se ha centrado en la isoforma β_2 , incluyendo su identificación, el clonaje de su cDNA y del gen que la codifica en humanos y su distribución en distintos tejidos y células. Los elementos que regulan la expresión de la isoforma β_2 de Na^+, K^+ -ATPasa son poco conocidos. Por tanto se ha planteado el estudio de la regulación de la transcripción de la subunidad β_2 mediante los siguientes objetivos concretos:

1. búsqueda de un modelo adecuado para este estudio: elección de especie animal y tejido o línea celular. Determinación de los patrones de expresión de las isoformas de la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa en dicho modelo,
2. caracterización de la estructura de la cromatina en el promotor del gen de la isoforma β_2 de Na^+, K^+ -ATPasa: hipersensibilidad a endonucleasas, distribución de nucleosomas y determinación de patrones de metilación en tejidos y líneas celulares,
3. estudio de los factores de transcripción que interactúan con las zonas hipersensibles a endonucleasas mediante técnicas de protección a exonucleasas, ensayos de retardo en gel y *southwestern blot*.

Capítulo III

Material y Métodos

1. Preparación y análisis de DNA

Plásmidos y cultivo de bacterias

Los vectores de clonaje utilizados rutinariamente fueron pBluescript KS (\pm) (Stratagene) y pGEM-T (Promega), este último para el clonaje de los productos amplificados mediante PCR con *Taq* polimerasa. La cepa de *Escherichia coli* en la que se propagaron las construcciones fue XL1-Blue. Los métodos de ligación, transformación y corte con enzimas de restricción fueron los estándar, descritos por Sambrook y cols (1989).

La preparación de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli* crecidos toda la noche en medio líquido Luria-Bertani (10 gr/L de triptona, 5 gr/L de extracto de levadura, 10 gr/L de NaCl, pH 7) con los antibióticos de selección adecuados. Se utilizó un kit comercial (High Pure Plasmid Isolation Kit, Boehringer Mannheim) para la purificación de los plásmidos.

La secuencia de todas las sondas utilizadas fue comprobada mediante clonaje y secuenciación siguiendo el método de los dideoxinucleótidos (Sanger y cols, 1977) con el kit comercial Sequenase[®] (United States Biochemicals).

DNA genómico

La preparación de DNA genómico a partir de líneas celulares o de tejidos se realizó según describe Sambrook y cols (1989), salvo en el caso de los experimentos de *footprinting in vivo*, descritos más adelante. La cuantificación del DNA se realizó mediante espectrofotometría UV a 260 nm; su pureza se determinó mediante el cociente de esta absorbancia y la obtenida a 280 nm. La integridad de la muestra extraída se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa y purificación de fragmentos de DNA

El análisis del DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa SeaKem (FMC Bioproducts) a concentraciones variables en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) o TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA). El tampón de carga utilizado fue 40% (p/v) sacarosa, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% xilen cianol (1 parte por cada 5 de muestra). En cada gel se incluyeron como marcadores de peso molecular muestras de DNA de fago λ (Promega) digerido con las enzimas de restricción BstEII o HindIII (Promega) o bien una escalera de 15 fragmentos de 100 pb (desde 100 hasta 1500; Gibco BRL). Las electroforesis se desarrollaron a una diferencia de potencial constante (50-125 V) hasta que la migración del azul de bromofenol alcanzó 3/4 partes de la longitud del gel. La tinción del DNA se realizó mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ en agua) durante 15 minutos. Para reducir la fluorescencia de fondo el gel se lavó durante 5 minutos en agua. Las bandas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta de 312 nm y se fotografiaron con el sistema ImageStore 5000/7500 (UltraViolet Products).

Los fragmentos de DNA se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma). Para fragmentos de tamaño menor a 1000 pb se utilizó agarosa Nusieve GTG (FMC Bioproducts). Tras teñir el gel y recortar la banda de interés con un bisturí estéril se fundió la agarosa en 4 volúmenes de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) a 65°C. La agarosa fundida se eliminó mediante extracciones sucesivas con fenol, fenol:cloroformo y cloroformo. Por último el DNA se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 7 y 2 volúmenes de etanol, y se resuspendió en un volumen adecuado de TE.

Marcaje de sondas y oligonucleótidos

- Marcaje homogéneo de sondas de DNA bicatenario con ^{32}P : aproximadamente 50 ng de DNA purificado mediante electroforesis en gel de agarosa se desnaturalizaron calentándolos a 100°C durante 10 minutos. El tubo se transfirió rápidamente a hielo y se añadieron hexanucleótidos de secuencia al azar (Boehringer Mannheim), 50 μCi (3000 Ci/mmol) de ^{32}P - α -dCTP (NEN), 0,3 mM de los restantes deoxinucleótidos sin marcar (Promega) y 5 u del fragmento Klenow de la DNA polimerasa (Promega) en un volumen final de 20 μL . La reacción de marcaje se incubó a 37°C durante 30 minutos y se detuvo añadiendo 1 μL de EDTA 0,5 M pH 8. Tras llevar el volumen hasta 100 μL con TE se separaron los nucleótidos no incorporados mediante centrifugación a través de una columna de exclusión molecular Sephadex G-50 (Pharmacia), siguiendo el método descrito por Sambrook y cols. (1989). El porcentaje de incorporación se calculó comparando la radiactividad presente en 1 μL de la reacción antes y después de pasar por la columna de exclusión.
- Marcaje de sondas de DNA bicatenario en su extremo 5' con ^{32}P : entre 1 y 50 pmoles de extremos de productos de PCR (libres de fosfato en 5') se marcaron mediante la acción de 20 u de polinucleótido kinasa (Promega) y 50 pmoles de ^{32}P - γ -CTP (3000 Ci/mmol, NEN) durante 60 minutos a 37°C . Tras detener la reacción con 1 μL de EDTA 0,5 M pH 8 se purificó el DNA marcado mediante filtración en columna de exclusión Sephadex G-50 (Pharmacia).

Southern blots

El DNA fue separado mediante geles de agarosa de concentraciones desde 0,8 a 1,5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de interés. Tras teñir el gel con bromuro de etidio según se ha descrito y fotografiarlo, se procedió a la transferencia del DNA a una membrana de nylon cargada

positivamente (Boehringer Mannheim) siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y cols (1989). Este método se basa en la desnaturalización *in situ* del DNA con 0,5 M NaOH en presencia de 1,5 M NaCl, seguido de una neutralización con 1 M Tris-HCl pH 7,4 y 1,5 M NaCl, y la transferencia por capilaridad del DNA a la membrana en presencia de 10X SSC (1X SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7). La transferencia se desarrolló durante al menos 16 horas. El DNA se unió covalentemente a la membrana de nylon mediante luz ultravioleta (1200 mJ/cm^2) con un *crosslinker* UVP modelo CL-1000.

La membrana se prehibridó durante al menos 2 horas a 42°C en una solución de 50% (v/v) formamida, 0,5% (p/v) SDS, 6X SSPE (1X = 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, 1 mM EDTA, 13 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), 5X reactivo de Denhart (1X = 0,02% Ficoll, 0,02% polivinilpirrolidona, 10 mg/ml BSA) y 100 $\mu\text{gr/mL}$ de DNA desnaturalizado de esperma de salmón. Seguidamente se añadió la sonda marcada homogéneamente con ^{32}P (10 ng/mL a una actividad específica de al menos 10^9 cpm/ μgr), previamente desnaturalizada calentándola durante 5 minutos a 100°C , en una solución de 50% formamida, 0,5% SDS, 6X SSPE, 100 $\mu\text{gr/mL}$ de DNA de esperma de salmón. La hibridación se desarrolló a 42°C durante al menos 20 horas.

El exceso de sonda se eliminó mediante dos lavados de 5 minutos cada uno con 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente. La sonda hibridada inespecíficamente se lavó 2 veces, 15 minutos cada vez, con 0,2X SSC, SDS 0,1% a 60°C . En algunos casos se realizó un último lavado con 0,1X SSC, 0,1% SDS a 65°C . Una vez finalizados los lavados la membrana se envolvió en plástico "Saran Wrap" y se expuso a una película de rayos X (Kodak X-OMAT AR) en chasis con pantalla de amplificación a -80°C . La duración de la exposición dependió de la longitud de la sonda utilizada, variando entre 24 horas y 7 días.

Reciclaje de membranas

Con el objeto de utilizar una segunda sonda en una misma membrana, ésta se trató durante 1 hora con una solución de 50% formamida, 2X SSPE a 65°C, eliminando así la sonda hibridada previamente. Tras varios lavados con 0,1X SSPE a temperatura ambiente, la membrana se reutilizó procesándola como se ha descrito.

Análisis de secuencias

La localización de dianas de enzimas de restricción se llevó a cabo mediante un programa desarrollado por el Dr. Tongjia Yin en la Universidad Estatal de Nueva York y disponible en internet en la siguiente dirección: <http://darwin.bio.geneseo.edu/~yin/WebGene/RE.html>. Las comparaciones entre secuencias se realizaron con el programa "ClustalW", del EMBL-*European Bioinformatics Institute* y disponible en la dirección de internet: <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>.

La búsqueda de secuencias consenso para la unión de factores de transcripción se realizó con el programa "MatInspector V2.2" (<http://www.gsf.de/cgi-bin/matsearch.pl>).

El contenido en el dinucleótido CpG se determinó con el programa "CpG", desarrollado en el EMBL-*European Bioinformatics Institute* y disponible en internet en la dirección <http://www2.ebi.ac.uk/cpg/>. Este programa sigue el método establecido por Gardiner-Garden y Frommer (1987) para la identificación de islotes CpG. El valor umbral, que determina cuándo el algoritmo del programa establece la existencia de un islote CpG, se situó en 20. La localización de secuencias repetitivas en el promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa se realizó con el programa Repeat Masker2 (Smit y Green, University of Washington Genome Center, datos no publicados), disponible en internet en la dirección: <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>.

2. Preparación y análisis de RNA

Purificación de RNA

En la extracción de RNA total a partir de tejidos o líneas celulares se utilizó el kit comercial "QuickPrep Total RNA Extraction Kit" (Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el método de extracción consistió en la homogenización de aproximadamente 100 mg de tejido o 1×10^7 células con un Potter en 225 μL de tampón con tiocianato de guanidinio y N-lauril sarcosina (el fabricante no especifica en ningún caso las concentraciones ni la composición exacta de las soluciones utilizadas). El homogenizado se transfirió a un tubo eppendorf y se añadieron 525 μL de cloruro de litio, 4,5 μL de β -mercaptoetanol 14,3 M y 750 μL de trifluoroacetato de cesio. Tras incubar cada tubo 15 minutos a 0°C , se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente en una microcentrífuga (Biofuge A, Heraeus). Debido a sus diferentes densidades, el RNA sedimenta formando un pellet en el fondo del tubo mientras que el DNA y las proteínas permanecen en solución. Una vez retirado el sobrenadante, el pellet de RNA se lavó con la misma solución de tiocianato de guanidinio, N-lauril sarcosina, cloruro de litio y trifluoroacetato de cesio y se centrifugó de nuevo. Tras un lavado adicional con 1,5 mL de etanol al 70%, el pellet se resuspendió en agua desionizada tratada con 0,1% de DEPC y la concentración de RNA y su pureza se determinó mediante espectrofotometría UV a 260 y a 280 nm.

Northern blots

Se siguió el método descrito por Sambrook y cols (1989). Todo el material utilizado fue de plástico estéril y desechable o bien fue tratado con agua con 0,1% de DEPC y autoclavado para evitar la contaminación por RNasas. Se siguió el mismo tratamiento para las soluciones acuosas utilizadas. Aproximadamente 20 μgr de RNA total se separaron en un gel desnaturante de agarosa al 1% con 7% formaldehído y 1X tampón de

cámara (20 mM MOPS, 8 mM acetato sódico y 1 mM EDTA, pH 7). La muestra de RNA se preparó calentándola durante 10 minutos a 70°C en presencia de 1X tampón de cámara, 7% formaldehído, 50% formamida y 1 µgr de bromuro de etidio. Antes de cargar las muestras se mantuvo el gel durante 15 minutos a 60 V. El tampón de carga consistió en 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilen cianol, 50% de glicerol y 1X de tampón de cámara. Los primeros 30 minutos se mantuvo la diferencia de potencial de 60 V. El resto de la electroforesis se desarrolló a 120 V hasta que el azul de bromofenol llegó a las $\frac{3}{4}$ partes del gel. Se fotografió el gel y se eliminó el formaldehído lavando 4 veces, 15 minutos cada una, en agua desionizada y tratada con DEPC. La transferencia a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) se desarrolló en 20X SSC durante toda la noche siguiendo el método descrito por Sambrook y cols (1989). El RNA se unió covalentemente a la membrana con luz UV (1200 mJ/cm²).

Para la detección de los mRNAs de interés se utilizaron sondas de DNA bicatenario marcadas homogéneamente con ³²P. Las sondas utilizadas fueron:

- cDNA β 2: fragmento que comprende 461 pb del extremo 5' no traducido, toda la región codificante (868 pb) y 434 pb del extremo 3' no traducido (total 1763 pb) del cDNA de β 2 de rata (Martín- Vasallo y cols, 1989).
- β -actina: sonda obtenida mediante PCR (ver *Apéndice*) a partir de cDNA de riñón de rata y complementaria a un fragmento de 330 pb que corresponde a los últimos 26 nucleótidos del segundo exón y los primeros 304 del tercer exón del gen de la β -actina (GenBank V01217; Nudel y cols, 1983).

Las sondas se desnaturalizaron calentándolas durante 5 minutos a 100°C en 500 µL de solución de prehibridación (50% formamida, 5X SSPE, 2X reactivo de Denhart y 0,1% SDS). La membrana se prehibridó durante 2 horas y se añadió la sonda directamente a la solución de prehibridación. La

hibridación se prolongó durante 20 horas. El exceso de sonda se eliminó lavando brevemente con 2X SSC, 0,1% SDS. La sonda hibridada de forma inespecífica se lavó tratando la membrana dos veces, 15 minutos cada una, con 0,2X SSC, 0,1% SDS a 60°C. La señal de radiactividad se detectó mediante autorradiografía con película Fuji RX en chasis con pantalla de amplificación a - 80°C.

Para reutilizar las membranas se eliminó la sonda previamente hibridada de la forma descrita para los *Southern blots*.

3. PCR y diseño de cebadores

Los oligonucleótidos que sirvieron como cebadores para las reacciones de PCR y las condiciones de reacción seguidas en cada caso particular se recogen en el *Apéndice*. Su síntesis se realizó en nuestro laboratorio en un sintetizador de oligonucleótidos modelo PCR-mate 391 (Applied Biosystems) o bien se encargó a una casa comercial (MedProbe, Noruega; Boehringer Mannheim, Alemania).

El diseño de los cebadores se realizó a partir de las secuencias depositadas en el GenBank (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, EEUU), o bien se obtuvo la secuencia de la referencia indicada en el *Apéndice*. Se siguió una serie de precauciones generales en el diseño de los oligonucleótidos: evitar apareamientos intramoleculares; ausencia de secuencias complementarias entre los extremos 3' de cada pareja de cebadores; T_m similar para ambos oligonucleótidos; contenidos G/C y A/T intermedios.

El cDNA utilizado como molde para la obtención de la sonda β -actina se sintetizó mediante la acción de la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV, Promega) utilizando oligo-p(dT)₁₅ (Boehringer Mannheim) como cebador específico de mRNA. La reacción se desarrolló en 20 μL de 10 mM Tris, 50 mM cloruro potásico y 5 mM MgCl_2 . Los

desoxinucleótidos 5'-trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, Promega) se utilizaron a 1 mM cada uno. A esta mezcla se añadieron 1.6 µg de oligo-p(dT) y 20 u de retrotranscriptasa AMV. Además, se incorporaron a la reacción 50 u de inhibidor de RNasa (Boehringer Mannheim). La reacción se incubó durante 10 minutos a 25°C y posteriormente 60 minutos a 42°C. La retrotranscriptasa AMV fue inactivada calentando la reacción hasta 99°C durante 5 minutos. El cDNA así sintetizado se almacenó a -20°C hasta su uso.

El resto de las PCRs utilizaron como molde DNA genómico de riñón de rata purificado de la forma descrita anteriormente.

Para la reacción de PCR se utilizó *Taq* DNA polimerasa (Bioline) a una concentración de 0.02 u/µL, cebadores a 0.5 µM cada uno y dNTPs a 0.125 µM cada uno. La composición del tampón de reacción fue 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris·HCl (pH 8.8 a 25°C) y 0.01% Tween[®] 20. En cada caso se añadió MgCl₂ hasta la concentración final indicada en el *Apéndice*. La mezcla se cubrió con aceite mineral (Sigma) y se incubó durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el DNA. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer con los patrones de ciclos, tiempos y temperaturas indicados en el *Apéndice*. Tras finalizar el número de ciclos programado, la reacción se sometió a una etapa final de elongación durante 15 minutos a 72°C. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su análisis.

4. Cultivo de líneas celulares

Todas las líneas celulares utilizadas (tabla 1) son derivadas de tejidos de rata y han sido caracterizadas ampliamente con anterioridad. Su cultivo se realizó en Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma) a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Se utilizaron placas de 25 y 75 cm² (Corning o Costar). El pase de las células se realizó por tripsinización siguiendo métodos estándar. Las células

destinadas a inmunocitoquímica se crecieron en placas multipocillo sobre portaobjetos de 20 mm de diámetro tratados previamente con gelatina (0,25 mg/mL) y con poly-L-lisina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para mejorar la adhesión de las células. Los experimentos se realizaron con las células a un 90% de confluencia aproximadamente. La conservación a largo plazo de las células se realizó en medio de cultivo con 8% de dimetilsulfóxido a -150°C .

Línea	Origen	Fuente	Referencia
B35	Neuronal	Dr. D. Schubert (The Salk Institute, La Jolla, California)	Schubert y cols., 1974
B50	Neuronal	Dr. D. Schubert (The Salk Institute, La Jolla, California)	Schubert y cols., 1974
B82	Glia	Dr. D. Schubert (The Salk Institute, La Jolla, California)	Schubert y cols., 1974
B103	Neuronal	Dr. D. Schubert (The Salk Institute, La Jolla, California)	Schubert y cols., 1974
NRK	Epitelio renal	Dra. A. Aranda (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid)	Cosgaya y cols., 1997

Tabla I - Líneas celulares utilizadas durante este estudio.

5. Western blots

Preparación de microsomas

Las células crecidas en cultivo se lavaron dos veces con PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) en frío y se levantaron de la placa en la misma solución. Tras sedimentarlas centrifugando 3 minutos a 1000 g se resuspendieron en 2 mL de tampón de lisis frío (Hepes 10 mM pH 7,4, 50 mM sacarosa, coctel comercial de inhibidores de proteasas -Complete[®], Boehringer Mannheim-) y se

homogenizaron en un Potter con émbolo de teflón y vaso de vidrio a 2000 rpm. La solución se llevó hasta 8% (p/v) de sacarosa y 1 mM MgCl₂ y se centrifugó 2 veces, 10 minutos cada una, a 1000 g para eliminar células sin romper y orgánulos celulares como núcleos y mitocondrias. El sobrenadante se centrifugó durante 30 minutos a 10⁵ g en una ultracentrífuga (Beckman L8-M). El pellet se resuspendió en tampón de lisis y se almacenó a -80°C hasta su uso. La fracción obtenida contiene la membrana plasmática y las membranas del retículo y del aparato de Golgi (Coppi y Guidotti, 1997). La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976) comparando las muestras con patrones de BSA a concentraciones conocidas.

Deglicosilación de proteínas

Las proteínas a deglicosilar (de 10 a 100 µgr) se diluyeron en 20 mM tampón fosfato pH 7, 10 mM EDTA, 0,2% SDS, 1% β-mercaptoetanol, y se calentaron durante 5 minutos a 100°C. Una vez enfriada la muestra se añadió el mismo tampón, pero con 5% Triton X-100 en lugar de SDS, a una proporción 1:10 y 0,08 u por µgr de proteína de N-glicosidasa F (Boehringer Mannheim). La muestra se incubó durante 2 horas a 37°C.

Electroforesis

Las muestras se mezclaron con tampón de carga al 3X (62 mM Tris-HCl pH 6,8, 3,33% glicerol, 0,67% SDS, 1,67% β-mercaptoetanol, 0,0004% azul de bromofenol) y se calentaron durante 5 minutos a 100°C. La separación de las proteínas se llevó a cabo en un sistema de geles discontinuos de poliacrilamida-SDS (Laemli, 1970) al 10%. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas conocidas preteñidas con azul de Coomassie (Sigma). La electroforesis se desarrolló en una cubeta Hoefer SE600 a 100 mA y a temperatura ambiente hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

Transferencia

Tras la electroforesis el gel se equilibró durante 15 minutos en el tampón de electrotransferencia (20 mM Tris, 192 glicina, 20% metanol, pH 8,3-8,4) y las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluorado (PVDF, Inmobilon-P, Millipore), previamente hidratada con metanol y agua desionizada y equilibrada en tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron 200 mA a 4°C durante toda la noche.

Detección

Una vez finalizada la transferencia se lavó la membrana varias veces en PBS y se bloqueó durante 1 hora en PBS con 5% leche desnatada y 0,2% Tween-20. Para la detección de las isoformas de la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa se utilizaron anticuerpos policlonales específicos bien caracterizados (tabla II).

Anticuerpo	Isoforma	Dilución	Fuente	Referencia
SpET β 1	β 1	1:7500	P. Martin-Vasallo	González-Martínez y cols., 1994
SpET β 2	β 2	1:10000	P. Martin-Vasallo	González-Martínez y cols., 1994
RTN β 3	β 3	1:5000	K.J. Sweadner	Arystarkhova y Sweadner, 1997

Tabla II - Anticuerpos utilizados en este estudio.

Los anticuerpos se diluyeron en PBS con 0,5% leche desnatada y 0,2% Tween[®] 20 y se incubaron con las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS y 0,2% Tween[®] 20 se aplicó el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo unido a peroxidasa (Boehringer Mannheim) a 1:10000 en la misma solución que el anticuerpo primario. La incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces la membrana con PBS y Tween[®] 20 0,2% y varias veces con PBS. La actividad peroxidasa se reveló mediante

quimioluminiscencia con el sistema ECL Plus (Amersham) y se detectó con película Fuji RX durante tiempos de exposición variables.

Reciclaje de membranas

Las membranas de PVDF se reutilizaron eliminando el anticuerpo unido mediante tratamiento con una solución 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoetanol durante 30 minutos a 50°C, seguido de varios lavados en PBS a temperatura ambiente.

6. Inmunofluorescencia

Las células crecidas en portaobjetos se lavaron 3 veces en PBS y se fijaron durante 5 minutos con paraformaldehído 4% en PBS a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS y se permeabilizaron durante 5 minutos en PBS con 0.25% (v/v) de tritón X-100. Las células se bloquearon durante 30 minutos en PBS con 0,5% de BSA (p/v) y 0.25% de tritón X-100 para evitar el marcaje no específico y se incubaron 12 horas a 4°C con el anticuerpo SpET β 2 a una dilución 1:2000 en la misma solución. Algunas muestras se incubaron sin el primer anticuerpo o con el suero preinmune como controles negativos. Transcurrido el período de incubación con el primer anticuerpo, las células se lavaron 2 veces con PBS, 0,1% BSA, 0,25% triton X-100 y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. El segundo anticuerpo fue anti-IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma) a una dilución 1:150. Posteriormente se realizaron 2 nuevos lavados y se montaron las muestras en glicerol:PBS (9:1) para su observación y fotografía con microscopio de fluorescencia (Olympus BX50).

7. Preparación de factores nucleares

Todos los experimentos con animales se realizaron respetando los criterios de la convención de Helsinki. La preparación de factores nucleares sigue los protocolos descritos por Krause y Gehring (1989) y Andrews y Faller (1991). Los tejidos de rata (cerebelo e hígado de ratas Sprague-Dawley adultas -2 meses de edad- procedentes del animalario de la Universidad de La Laguna y sacrificadas mediante dislocación cervical) se homogenizaron en frío con un Potter de émbolo de teflón y vaso de cristal a 2000 rpm en 4 mL/gr de tampón (15 mM HEPES pH 7.6, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,15 mM espermina, 0,5 mM espermidina, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.34 M sacarosa, coctel de inhibidores de proteasas -Complete[®], Boehringer Mannheim-). En el caso de los factores de líneas celulares se utilizó el mismo tampón de homogenización para levantar las células de la placa, que previamente había sido lavada dos veces con PBS en frío. Los pasos siguientes son comunes para las células en cultivo y los tejidos. Tras centrifugar 10 minutos a 4000 g se resuspendió el pellet en el tampón de homogenización (4 mL/gr). Seguidamente el extracto crudo se centrifugó a través de 5 mL de sacarosa 0.8 M en el mismo tampón, durante 15 minutos a 4000 g. El pellet obtenido se resuspendió en tampón de extracción de factores nucleares (20 mM Hepes pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM fluoruro de fenil metil sulfonilo) y se agitó vigorosamente durante 15 minutos a 4°C. Finalmente se centrifugó el extracto a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976).

8. Hipersensibilidad a endonucleasas: DNasa I, nucleasa S1 y nucleasa micrococcal.

El procedimiento seguido para la determinación de hipersensibilidad a DNasa I es el descrito por Wu (1980, 1989) con modificaciones. Ratas Sprague-Dawley de aproximadamente dos meses de edad (machos o hembras indistintamente, procedentes del animalario de la Universidad de La Laguna) se sacrificaron mediante dislocación cervical. Aproximadamente 0.3 gr de cerebelo y 0.5 gr de hígado de rata adulta se homogenizaron en un Potter con émbolo de teflón y vaso de cristal en 10 mL de un tampón compuesto por 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM β -mercaptoetanol, 0.15 mM espermína, 0.5 mM espermidina y 15 mM Tris-HCl pH 7.4 previamente enfriado (Hewish y Burgoyne). El tampón de homogenización se suplementó con una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Complete[®], Boehringer Mannheim). El homogenizado se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 4000 g en frío. El sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de tampón de digestión de DNasa I frío (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 15 mM β -mercaptoetanol, 0.34 M sacarosa, 15 mM Tris-HCl pH 7.4, inhibidores de proteasas -Boehringer-). La suspensión se repartió en alícuotas de 100 μ L y se añadieron cantidades progresivamente mayores de DNasa I (Boehringer Mannheim, liofilizado disuelto a 1 mgr/mL en 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 μ gr/mL BSA, 50% glicerol, conservado a -20°C). Las condiciones de digestión se determinaron empíricamente y fueron las siguientes:

- a temperatura ambiente durante 10 minutos, con 0, 5, 10, 20 y 40 μ gr/mL DNasa I
- a 37°C durante 5 minutos, con 0, 5, 10, 15, y 20 μ gr/mL DNasa I

Como control de la especificidad de la acción de la DNasa I se realizaron digestiones de DNA genómico purificado de cerebelo de rata.

Aproximadamente 20 μgr de DNA en el tampón de digestión descrito se incubaron durante 2 minutos a 37°C en presencia cantidades cada vez mayores de DNasa I (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 0.16 $\mu\text{gr}/\text{mL}$).

La digestión con nucleasa micrococcal se llevó a cabo en el mismo tampón de digestión con DNasa I suplementado con 0.4 mM CaCl_2 (Wu, 1989). Tras resuspender el sedimento en 2 mL, se repartió la muestra en alícuotas de 100 μL , que fueron incubadas a 37°C durante 7 minutos. Las cantidades de nucleasa micrococcal (Pharmacia) añadidas fueron 0, 450, 600, 750 y 900 u/mL. También se realizaron controles con DNA genómico purificado de cerebelo de rata. 20 μgr de DNA se digirieron en el tampón descrito. Las condiciones fueron 3 minutos a 37°C con 1.5, 3, 6 y 12 u/mL de nucleasa micrococcal.

Las muestras utilizadas en la digestión con nucleasa S1 se resuspendieron en 2 mL de tampón frío (3 mM ZnCl_2 , 1 mM EDTA, 30 mM acetato sódico pH 4.5, Michelotti y cols, 1996) y se repartieron en alícuotas de 100 μL . Cada alícuota se centrifugó durante 1 minuto a 13000 g y se resuspendió de nuevo en tampón de digestión. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces. A continuación se llevaron los tubos a 37°C y se añadieron cantidades cada vez mayores de nucleasa S1 (Promega), desde 0 hasta 1500 u/mL. La incubación se prolongó durante 15 minutos.

En todas las digestiones con endonucleasas, la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de 1% SDS, 20 mM EDTA. Tras añadir 20 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ de RNasa A (Boehringer Mannheim), las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se realizó un tratamiento con proteinasa K (Boehringer Mannheim) a 100 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ durante 3 horas a 50°C. Las muestras se extrajeron con un volumen de fenol equilibrado a pH 8 y antes de seguir su procesamiento se comprobó el grado de digestión del DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Las reacciones con niveles adecuados de digestión se purificaron mediante extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y con cloroformo. Tras

su precipitación, el DNA se resuspendió en agua desionizada y estéril. Las muestras que se trataron con una enzima de restricción (indicada en cada caso en la sección de *Resultados*) se resuspendieron en 87 μ L de agua y se añadieron 10 μ L del tampón de digestión (10X) adecuado para la enzima utilizada. La mezcla fue tratada con 10 u de la enzima de restricción durante 1 hora aproximadamente a la temperatura específica para cada enzima, se añadieron 20 u más y se continuó la reacción toda la noche. El DNA se recuperó mediante precipitación y los fragmentos se separaron con una electroforesis en gel de agarosa a la concentración especificada en cada caso. A cada muestra se le mezcló una pequeña cantidad (aproximadamente 10 ngr) de marcadores de peso molecular (fago λ cortado con HindIII o BstEII o bien una escalera de 100 pb). Los patrones de digestión por DNasa I, nucleasa micrococcal o nucleasa S1 se analizaron mediante *Southern blot*, utilizando sondas marcadas con 32 P- α -CTP según se ha descrito anteriormente. Las sondas empleadas fueron las siguientes:

- DHSP1: utilizada junto con la enzima de restricción Bso BI. Fue obtenida mediante PCR a partir de DNA genómico de riñón de rata con los cebadores F- y R-DHSP1 (*Apéndice*); comprende desde el nucleótido 724 hasta el 946 (numeración relativa al inicio de transcripción). El fragmento resultante de 236 pb (que incluye las dianas de restricción introducidas con los cebadores) se sitúa en el inicio del primer intrón del gen de β 2 (figura 25, *Resultados*). Su secuencia fue comprobada mediante clonaje en pBluescript KS(-) y secuenciación por el método de los dideoxinucleótidos (Sanger y cols, 1977), resultando exactamente igual a la descrita por Kawakami y cols (1990).
- DHSP2: utilizada junto con la enzima de restricción Nco I. Obtenida en dos pasos de digestión a partir del plásmido pPR β 2 (este plásmido se construyó a partir de pBluescript KS(-) y el fragmento de la región 5' del gen de β 2 amplificado por los cebadores F- y R-PR β 2, descritos en el *Apéndice*. El fragmento abarca desde aproximadamente -2,3 Kb del

inicio de transcripción hasta justo después del inicio de la secuencia codificante). Primero se digirió el plásmido con Hpa I y la banda de 1.8 Kpb generada se purificó en un gel de agarosa y se trató con Nco I. Tras la separación de los productos mediante electroforesis se purificó la banda de 430 pb, que corresponde al DNA entre las posiciones -792 y -362 respecto al inicio de transcripción (figura 25, *Resultados*).

Las membranas hibridadas con DHSP1 se expusieron a la película radiográfica (Kodak X-OMAT AR) durante 7 días aproximadamente en chasis con pantalla de amplificación a -80°C . Las hibridadas con DHSP2 se expusieron durante 2-3 días. Una vez reveladas las películas se procedió a rehibridar las membranas según el procedimiento descrito anteriormente con sondas específicas para los marcadores de peso molecular. De esta manera se compararon los tamaños de las bandas obtenidas con marcadores internos, eliminando así los errores generados por las variaciones de movilidad entre carril y carril.

9. Protección a la exonucleasa Bal 31.

El extracto crudo de núcleos utilizado para los experimentos de hipersensibilidad a nucleasas se purificó centrifugando a través de sacarosa 0,8 M de la forma descrita para la preparación de factores nucleares. El pellet se resuspendió en 1 mL de tampón de digestión de DNasa I (apartado anterior). Para permitir la acción de Bal 31 los núcleos se digirieron parcialmente con bajas concentraciones de DNasa I. La actividad de Bal 31 necesita altas concentraciones de sales, por lo que la digestión con DNasa I tiene que realizarse en un paso anterior. Los núcleos se resuspendieron en el tampón de digestión de DNasa I y se trataron con 2 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ de esta enzima durante 3 minutos a 37°C . Los núcleos se centrifugaron 1 minuto a 13000 g y se resuspendieron en tampón de digestión de Bal 31 (Kumani y cols, 1996), consistente en 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 12 mM MgCl_2 , 12 mM CaCl_2 , 1 mM EDTA, 0.3 M sacarosa, inhibidores de proteasas

(Boehringer Mannheim). Se añadieron 5 o 7.5 u/mL de Bal 31 (Promega) y la digestión se prolongó durante 5 minutos a 37°C.

La purificación y el análisis del DNA se realizó según se describe en el apartado anterior.

10. Determinación de patrones de metilación

Los patrones de metilación de la zona 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa se caracterizaron mediante el uso de isoesquizómeros de enzimas de restricción con diferencias en su sensibilidad a la metilación de las citosinas presentes en sus dianas. La pareja de isoesquizómeros utilizada fue Hpa II / Msp I, que al tener una diana de sólo cuatro nucleótidos (CCGG) posee altas frecuencias de corte y permite examinar un mayor número de posiciones en el DNA. La actividad endonucleasa de Hpa II se inhibe cuando aparece el patrón de metilación C^mCGG , mientras que Msp I es capaz de cortar en su diana aunque aparezca el dinucleótido ^mCpG .

Se analizaron DNAs genómicos de cerebelo, riñón e hígado de rata adulta y de neonato (estadío postnatal 2), y de las líneas celulares B82 y NRK. La purificación del DNA se realizó según describen Sambrook y cols (1989). Aproximadamente 20 μgr de DNA se cortaron con 30 u de Msp I o de Hpa II a lo largo de toda la noche a 37°C en un volumen final de 100 μL . Como control interno de la eficacia de la digestión en dos reacciones se añadieron 50 ngr del plásmido pPR $\beta 2$. Tras concentrar el DNA por precipitación con etanol, se separaron los fragmentos generados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) según se ha descrito anteriormente.

Los *Southern blots* se hibridaron con la sonda PR β 2, obtenida mediante digestión con Eco RI y Bam HI del plásmido pPR β 2, descrito en el apartado número 8 (*Hipersensibilidad a endonucleasas*).

La hibridación se realizó según el protocolo descrito. La membrana se expuso a una película Kodak X-Omat AR en un chasis con pantalla de amplificación a -80°C durante 24 horas.

11. Southwestern blots

La técnica de *Southwestern* se llevó a cabo según el procedimiento de Antalis y cols. (1993) con pequeñas modificaciones. Aproximadamente 100 μg de factores nucleares de hígado o cerebelo de rata adulta (preparados según se ha descrito) se desnaturalizaron mediante calentamiento a 65°C en presencia de 0.2% de SDS y se separaron mediante electroforesis discontinua en un gel con 0.1% SDS y 8% poliacrilamida (Laemli, 1970). Tras la electroforesis se cortó el gel en dos mitades. Una se utilizó para tinción con azul de Coomasie. La otra se utilizó para la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell) en tampón 25 mM Tris, 192 mM glicina durante toda la noche a 200 mA.

Con el objeto de retirar el SDS unido a las proteínas, las membranas de nitrocelulosa con los factores nucleares se trataron con una solución 7 M clorhidrato de guanidinio, 50 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.25% leche desnatada, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, durante 1 hora a t.a. Para renaturalizar las proteínas se lavó la membrana varias veces con una solución 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 0.25% leche desnatada, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, y se incubó en la misma solución durante 16 horas a 4°C . Seguidamente la membrana se bloqueó en una solución 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% leche desnatada, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poli [d(I-C)], 50 mM Tris-HCl pH 7.5 durante 1 hora a t.a.

La hibridación se llevó a cabo en 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 μ gr/ml poli [d(I-C)], 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Las sondas utilizadas (iguales a las descritas en los experimentos de retardo en gel; ver siguiente apartado) se marcaron en un extremo ^{32}P - γ -ATP mediante el uso de la enzima polinucleótido kinasa siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Tras dos horas de incubación a t.a. se procedió a lavar la membrana varias veces con 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, Tris-HCl pH 7.5, 10 minutos cada vez. Este proceso se repitió hasta que la solución de lavado no presentaba trazas de radiactividad detectables con un contador Geiger. Normalmente fueron necesarios tres lavados. La membrana se envolvió en plástico "Saran Wrap" y se expuso a una película Fuji RX durante una noche a -80°C con pantalla de amplificación.

12. Experimentos de retardo en gel (EMSA)

Para los experimentos de retardo en gel se utilizó un kit comercial (DIG Gel Shift Kit, Boehringer Mannheim) con marcaje quimioluminiscente.

Sondas

Se utilizaron tres sondas (#1 a #3) de aproximadamente 150 pb y que solapan una media de 30 pb entre sí con objeto de impedir que alguna secuencia específica de unión a una proteína se vea interrumpida por situarse en el extremo de las sondas. Las sondas de DNA utilizadas comprenden la zona desde -300 hasta +90 respecto al origen de transcripción del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa. En la figura 18 se puede ver un esquema de la disposición en el gen de la subunidad $\beta 2$ de estos fragmentos de DNA.

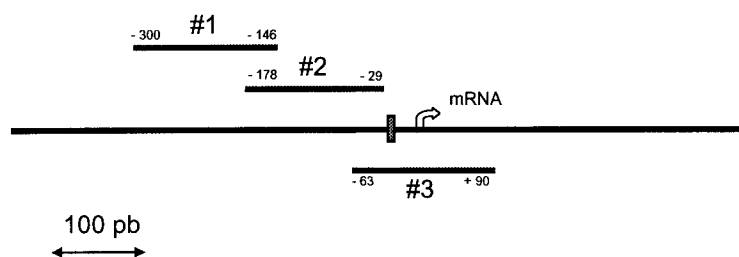


Figura 18. **Disposición de sondas para EMSA.** En azul, y numeradas del 1 al 5, las sondas utilizadas en los experimentos de retardo en gel. Se indica la posición de la caja TATA (caja naranja) y del inicio de transcripción (flecha curva). En cada una de las sondas se indican los nucleótido donde comienza y donde acaba numerados respecto al inicio de transcripción.

Aproximadamente 100 ngr de cada sonda previamente purificada mediante electroforesis en gel de agarosa fueron utilizados en la reacción de marcaje, que está basada en la incorporación en el extremo 3' de la sonda del nucleótido modificado digoxigenina-ddUTP mediante la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal en presencia del CoCl_2 . La mezcla de reacción (250 mM cacodilato potásico, 25 mM Tris-HCl pH 6.6, 0,25 mg/ml BSA, 50 μM digoxigenina-ddUTP, 5 mM CoCl_2 , 50 u deoxinucleotidil transfersasa terminal) se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, el DNA se precipitó llevando la solución a 400 mM de LiCl, añadiendo dos 2,5 volúmenes de etanol al 100% y manteniendo la solución a -80°C durante 30 minutos. El precipitado se recogió centrifugando a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. El pellet se lavó tres veces seguidas añadiendo 500 μL de etanol al 70% y centrifugando durante 5 minutos en las mismas condiciones. Finalmente el pellet se secó en un evaporador Speedvac y se resuspendió en 25 μL de tampón TEN (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl).

La eficiencia de marcaje se determinó comparando diluciones seriadas de la sonda marcada respecto a diluciones de un control

proporcionado por el kit. Se depositó 1 μL de cada dilución en una membrana de nylon (Boehringer Mannheim) y se detectó mediante quimioluminiscencia según la forma descrita en el apartado *Revelado* (ver más adelante).

Reacciones de unión proteína-DNA

El experimento básico de unión de proteínas a DNA consistió en mezclar cantidades cada vez mayores de factores nucleares, preparados como se ha descrito anteriormente, con una cantidad fija de sonda marcada con digoxigenina (aproximadamente 0,8 ng) en presencia de competidor inespecífico (poli [d(I-C)], 50 ng/ μL). Como tampón de unión se utilizó 25 mM Hepes, 1 mM EDTA, 10 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 1 mM DTT, 0,2% (p/v) Tween[®] 20, 30 mM KCl, poli-L-lisina 5 ng/ μL , pH 7,6. El volumen total de reacción fue 20 μL . Como controles de retardos no específicos se incluyeron mezclas sin factores nucleares, con factores previamente calentados a 100°C durante 5 minutos, o en presencia de un exceso molar de aproximadamente 125 veces de sonda sin marcar. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les añadió tampón de carga (glicerol hasta 5% (v/v), 0,25X TBE), se transfirieron a hielo y se cargaron en el gel de electroforesis lo antes posible.

Electroforesis

Se utilizó un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en tampón TBE 0,25X, de dimensiones 13x10x0,1 cm. En todos los casos el gel se formó el día anterior al experimento con objeto de que el persulfato amónico utilizado en la polimerización se degradara completamente y así evitar su interacción con las muestras. Como tampón de cámara se utilizó TBE 0,25X. Antes de cargar las muestras se realizó una pre-electroforesis a 4°C y a 100 V hasta que la intensidad de corriente alcanzó un valor constante (típicamente 4 mA, alcanzados en 1-2 horas). La aplicación de las muestras se realizó con una jeringa Hamilton de 50 μL a la vez que se

aplicaba una diferencia de potencial de 300 V para minimizar el tiempo de entrada en el gel y de esta manera evitar al máximo la disociación de los complejos DNA-proteína. La electroforesis prosiguió a 100 V hasta que el colorante xilen-cianol alcanzó las 3/4 partes del gel. Sólo se utilizaron colorantes como referencia (azul de bromofenol y xilen-cianol) en un carril, en el que no había muestra, para evitar que pudieran interferir con los complejos DNA-proteína (Carey, 1991).

Transferencia

El DNA se electrotransfirió durante 30 minutos y con una intensidad de 400 mA a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) y preequilibrada en TBE al 0,25X, que fue el tampón de transferencia utilizado. Posteriormente la membrana se equilibró en 10X SSC y el DNA se unió covalentemente al nylon mediante luz UV (1200 mJ/cm^2).

Revelado

La membrana se equilibró brevemente en tampón de lavado (0.1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl, Tween[®] 20 0,3%, pH 7,5) y se incubó durante 30 minutos en 100 mL de solución de bloqueo, consistente en un reactivo de bloqueo comercial (Boehringer Mannheim) al 1% en 0.1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl, pH 7,5. Esta misma solución se utilizó para diluir 1:10000 el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim). La membrana se incubó con 20 mL de la solución diluida de anticuerpo durante 30 minutos. El exceso de anticuerpo se retiró lavando 2 veces 15 minutos cada vez con tampón de lavado. La membrana se equilibró en 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl_2 , pH 9,5 durante 5 minutos y se incubó en 10 mL de solución de revelado (el sustrato quimioluminiscente de fosfatasa alcalina utilizado fue CSPD[®] 0,1 mg/mL, Boehringer Mannheim) durante otros 5 minutos. Tras eliminar el exceso de líquido se selló la membrana en una bolsa de hibridación y se incubó

durante 15 minutos más a 37°C. La exposición se realizó durante 2 horas a una película de rayos X (Fuji RX).

Capítulo IV

Resultados

Expresión de la isoforma $\beta 2$ en líneas celulares en cultivo

La expresión de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en las líneas celulares NRK, B35, B50, B82 y B103 fue estudiada mediante *northern blot*, *western blot* e inmunocitoquímica. En la figura 19A se observa que en las líneas B35 y B82 existe mRNA de $\beta 2$, pero en muy bajo nivel comparado con el del cerebro de rata adulta. En las líneas NRK, B50 y B103 no se detecta el mRNA de $\beta 2$. La misma membrana recuperada e hibridada con una sonda complementaria a la β -actina da una idea de las cantidades relativas de RNA en cada carril (figura 19B). Se puede ver de esta manera que la diferencia entre cerebro de rata adulta y las dos líneas celulares en las que se detecta mRNA de $\beta 2$ es aún mayor, ya que los carriles correspondientes a las líneas celulares contienen más RNA total que el del cerebro de rata.

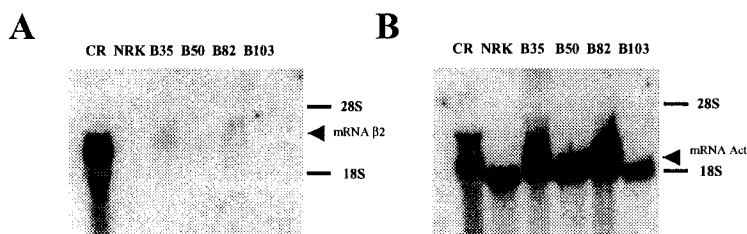


Figura 19. **Detección del mRNA de la subunidad $\beta 2$ mediante *Northern blot* en líneas celulares de rata.** Aproximadamente 20 μgr de RNA total de cerebro de rata adulta (CR) y de distintas líneas celulares se separaron en un gel desnaturizante de agarosa al 1% y se transfirieron a una membrana de nylon según se describe en la sección *Material y Métodos*. Como referencia de peso molecular se señala la migración de los rRNAs 28S y 18S. **A**, expresión de $\beta 2$. **B**, la misma membrana rehibridada con una sonda específica para β -actina.

Con objeto de comprobar si niveles tan bajos de mRNA eran capaces de producir proteína $\beta 2$ detectable en la línea B82, se utilizó un antisuero generado en nuestro laboratorio y ampliamente caracterizado, que reconoce esta proteína de forma muy específica, tanto en *western blot* como en

inmunofluorescencia (Gonzalez-Martínez y cols, 1994; Peng y cols, 1997). En los *western blots* se utilizó como control positivo microsomas de cerebelo de rata adulta. Las muestras se duplicaron y una de ellas se sometió a una deglicosilación como un test adicional de especificidad. Como puede verse en la figura 20A, el antisuero SpET $\beta 2$ no fue capaz de reconocer ninguna banda específica en las muestras de las líneas celulares, incluso sobreexponiendo la película y analizando hasta 100 μgr de proteínas. Sin embargo, el antisuero detectó perfectamente la proteína $\beta 2$ en sólo 10 μgr de los controles positivos. Al sondar la misma membrana con el antisuero SpET $\beta 1$, sí se detectó, aunque muy débilmente, la proteína $\beta 1$ en su forma deglicosilada (figura 20B). La forma glicosilada se detecta siempre con menor eficacia debido al impedimento que representan las cadenas de azúcares a la unión del anticuerpo. Sin embargo, la línea B82 posee altos niveles de la subunidad $\beta 3$ (figura 20C). Las masas moleculares aparentes de las tres isoformas, tanto en su forma glicosilada como no glicosilada, son coherentes con las descritas previamente en la literatura (González-Martínez y cols, 1994; Arystarkhova y Sweadner, 1997).

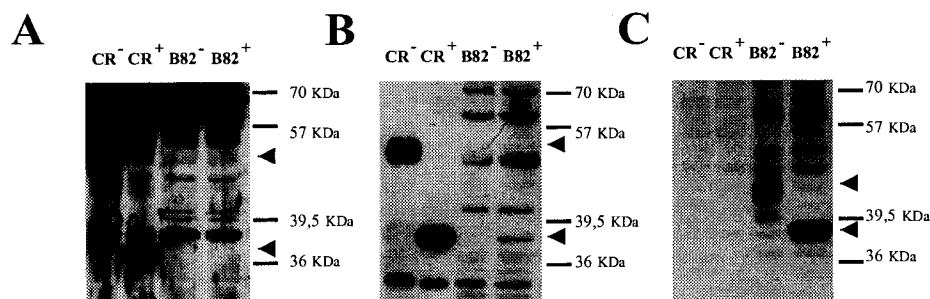


Figura 20. **Expresión de las isoformas de la subunidad β en microsomas de la línea B82.** 100 μgr de proteínas microsomales de B82 (B82⁻, proteínas nativas; B82⁺, deglicosiladas) y 10 μgr de proteínas microsomales de cerebro de rata adulta (CR⁻, nativas; CR⁺, deglicosiladas) se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF (*Material y Métodos*). Se indica la migración de cuatro marcadores de peso molecular y su masa en KDa. La misma membrana se sonó consecutivamente con tres anticuerpos distintos. Las cabezas de flecha señalan la forma glicosilada y la deglicosilada de las proteínas. **A**, detección de la isoforma $\beta 2$ con el antisuero SpET $\beta 2$. **B**, detección de $\beta 1$ con SpET $\beta 1$. **C**, detección de $\beta 3$ con RNT $\beta 3$.

También se estudió la expresión de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en células NRK mediante *western blot*. Utilizando el mismo procedimiento que en el caso de la línea B82 no fue posible detectar la presencia de la subunidad $\beta 2$ (figura 21A). La subunidad $\beta 1$ está presente en muy bajo nivel (figura 21B), al límite de la sensibilidad de la técnica. La expresión de la subunidad $\beta 3$ no fue comprobada en esta línea celular.

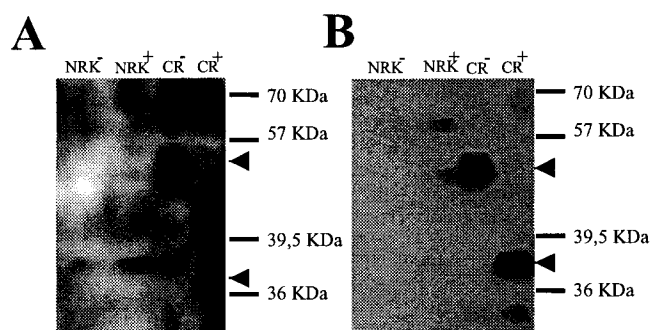


Figura 21. **Expresión de las isoformas de la subunidad β en microsomas de células NRK.** 100 μgr de proteínas de microsomas de la línea NRK, nativas (NRK⁻) o deglicosiladas (NRK⁺) se analizaron mediante *western blot* según se ha descrito anteriormente. Como control se incluyeron 10 μgr de proteínas de microsomas de cerebro de rata adulta (CR⁻, nativas; CR⁺, deglicosiladas). Se indica la migración de los marcadores de peso molecular, su masa en KDa y la posición de la forma glicosilada y deglicosilada de las proteínas. **A**, membrana sondada con el antisuero SpET $\beta 2$, específico para detectar la subunidad $\beta 2$. **B**, la misma membrana sondada con SpET $\beta 1$, específico de la subunidad $\beta 1$.

La expresión de la subunidad $\beta 2$ en las células B82 se estudió también con la ayuda de una técnica más sensible como es la inmunofluorescencia. Como puede observarse en la figura 22A, la inmunotinción con el antisuero SpET $\beta 2$ produjo una señal positiva, aunque débil, en las células B82. La distribución subcelular de $\beta 2$ es homogénea en estas células, encontrándose tanto en el soma como en las prolongaciones (figura 22A). En este experimento se incluyó un control negativo en el que se substituyó el anticuerpo específico por suero preinmune, teniendo como

resultado una tinción inespecífica muy tenue (figura 22B) y claramente inferior a la obtenida con el antisuero SpET $\beta 2$.

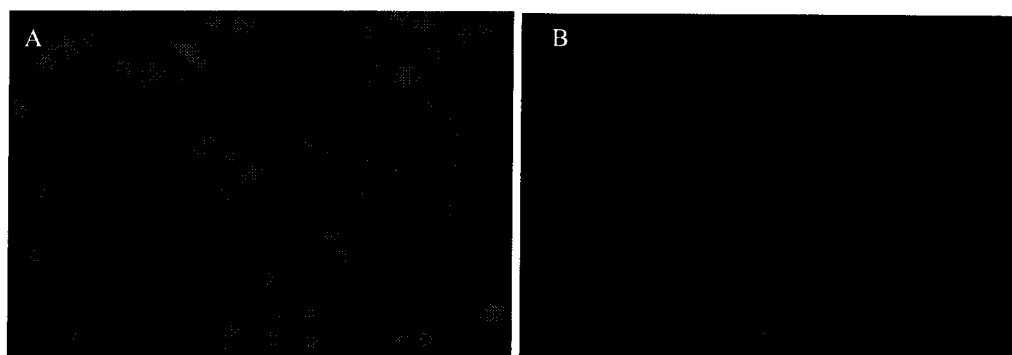
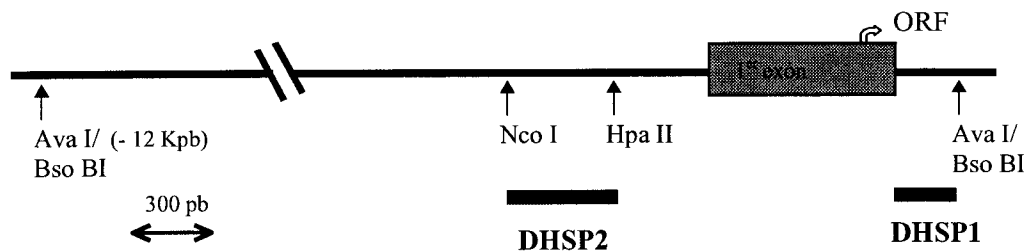


Figura 22. Localización por inmunofluorescencia indirecta de la subunidad $\beta 2$ en la línea celular B82. A, inmunoreactividad para la subunidad $\beta 2$ tanto en el soma como en las prolongaciones de las células B82. B, control con suero preinmune.

Hipersensibilidad a DNasa I

Para realizar un rastreo a baja resolución de zonas hipersensibles a DNasa I en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en rata se eligió la enzima de restricción Ava I, con diana en la secuencia CPyCGPuG. Esta enzima tiene un único punto de corte en la secuencia disponible del gen de $\beta 2$ de rata, concretamente en el primer intrón (figura 23). La sonda utilizada para el *Southern blot* (DHSP1) se muestra en la figura 23. Es un fragmento de 236 pb cuyo extremo 3' coincide con la diana Ava I. La siguiente diana Ava I hacia el extremo 5' se intentó determinar cortando DNA genómico purificado de cerebelo de rata y analizándolo mediante *Southern blot*. Sin embargo todos los intentos para obtener un fragmento de tamaño discreto en el *Southern blot* fracasaron. La actividad de Ava I se ve inhibida por la presencia de un radical metilo en la posición 5 de la citosina central de su diana (Cpy^{5m}CGPuG) (McClelland y cols, 1994). Debido a esto se empleó un

isosquizómero de Ava I denominado Bso BI y cuya actividad es insensible a la metilación. Bso BI produce un fragmento de aproximadamente 12 Kpb, según se pudo determinar con los marcadores de peso molecular (DNA de fago λ cortado con Hind III o Bst EII), de forma que la siguiente diana Ava I / Bso BI hacia 5' está aproximadamente a - 8,7 Kpb respecto al inicio de



transcripción.

Figura 23. **Esquema de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en rata.** El primer exón del gen se representa con una caja y se indica el inicio de la zona codificante (ORF). También se indican las dianas de enzimas de restricción que sirven como referencia para las sondas DHSP1 y DHSP2, utilizadas en los experimentos de hipersensibilidad a nucleasas.

Como experimento control preliminar se digirió parcialmente DNA genómico purificado de rata con cantidades crecientes de DNasa I. En la figura 24A se pueden ver los resultados de la curva de digestión. Al cortar este DNA con Bso BI y analizarlo en un *Southern blot* con la sonda DHSP1 se comprueba que la DNasa I lo degrada rápidamente de forma inespecífica, quedando un rastro a lo largo de todo el carril y sin que puedan apreciarse bandas de un tamaño discreto.

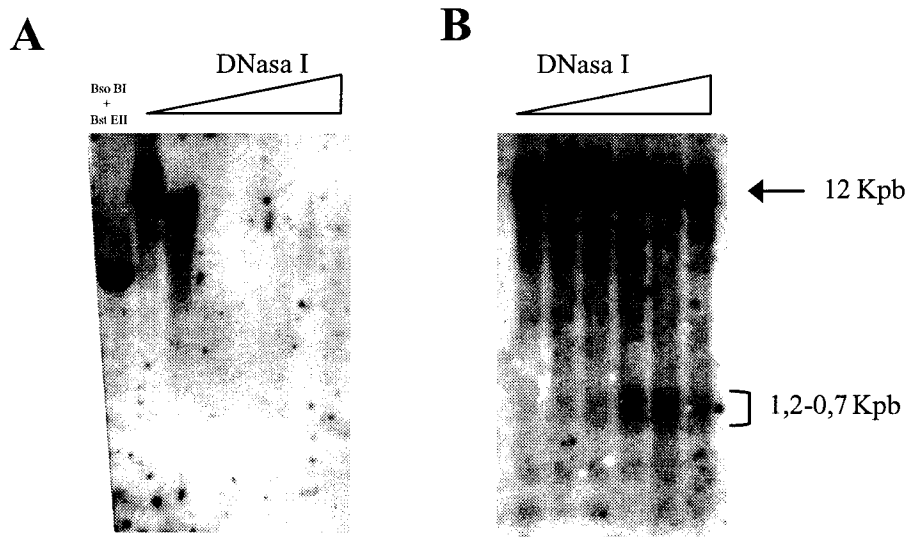


Figura 24. **Hipersensibilidad a DNasa I de la zona 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en cerebelo de rata adulta.** 20 μ gr de DNA tratado con DNasa I se purificó, se cortó con Bso BI, se separó en un gel de agarosa al 0,8% y se transfirió a una membrana de nylon. La sonda utilizada para el análisis fue DHSP1. **A**, DNA genómico purificado tratado *in vitro* con DNasa I a 37°C (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 y 0,16 μ gr/mL); en el primer carril, control digerido con Bso BI y Bst EII, que da lugar a un fragmento de 2168 pb. **B**, núcleos de cerebelo de rata adulta tratados durante 5 minutos a 37°C con concentraciones cada vez mayores de DNasa I (0, 5, 10, 15, 20 y 40 μ gr/mL). La flecha señala el fragmento generado por el corte Bso BI/Bso BI. El corchete señala la banda que indica la presencia de una zona hipersensible a DNasa I.

El análisis de los patrones de digestión de DNasa I en extractos crudos de núcleos de cerebelo de rata adulta indica la existencia de una sola zona hipersensible a la digestión con esta nucleasa en las 12 Kpb que incluye el fragmento Bso BI/Bso BI. Esta zona tiene un tamaño aproximado comprendido entre 1.2 y 0.7 Kpb, lo que la sitúa entre -250 y +200 respecto al inicio de transcripción aproximadamente (figura 24B). Aparece un cierto número de bandas adicionales, pero no parecen específicas de la acción de la DNasa I, ya que no incrementan su intensidad a lo largo de la curva de digestión. Con objeto de comparar este patrón con el existente en tejidos que no expresen $\beta 2$ se analizaron con el mismo procedimiento hígado y riñón de rata adulta. Las muestras de cerebelo y de hígado se separaron en el mismo gel de agarosa de manera que las bandas resultantes fueran

comparables. La intensidad de la señal que produce DNasa I es mayor en cerebelo que en hígado (figura 25A y 25B) para reacciones de digestión similares, según se comprueba en el análisis del DNA previo al corte con Bso BI (figura 25C). Además, la banda que aparece en hígado no es tan ancha como la del cerebelo, indicando esto que la región hipersensible a DNasa I es menor. En riñón también aparece un patrón de hipersensibilidad con características similares a las del hígado (datos no mostrados).

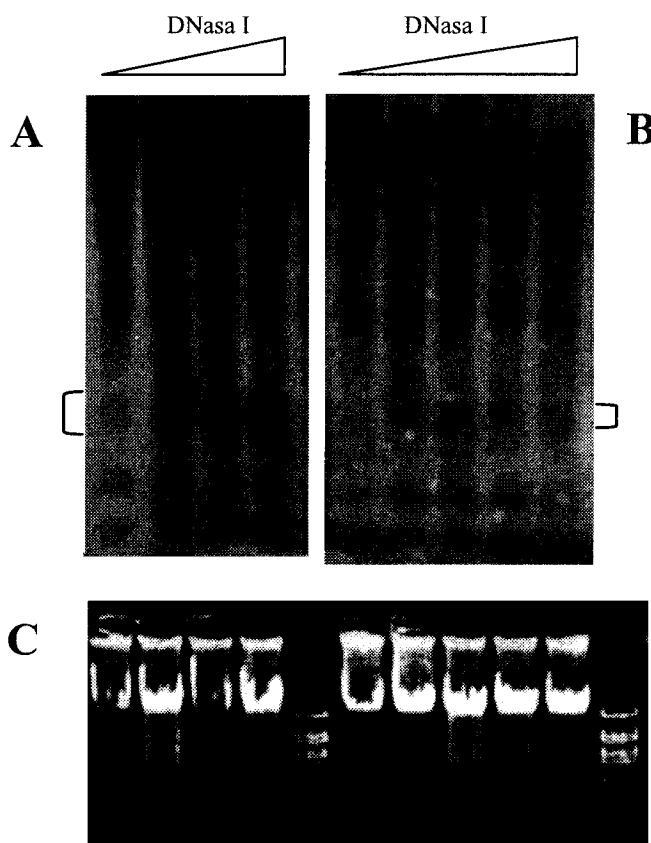


Figura 25. **Comparación de los patrones de hipersensibilidad a DNasa I en cerebelo e hígado de rata adulta.** Muestras de núcleos de cerebelo e hígado de rata tratados con DNasa I (0, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{gr}/\text{mL}$) se procesaron en paralelo. 20 μgr de cada DNA cortados con Bso BI se analizaron en el mismo *Southern blot* con la sonda DHSP1. **A**, cerebelo. **B**, hígado. **C**, gel de agarosal 0,8% teñido con bromuro de etidio que muestra los patrones de digestión de cerebelo e hígado con DNasa I antes de cortar el DNA con Bso BI. Muestras en el mismo orden que en A y B. Carriles 5 y 11, fago λ cortado con Bst EII.

Para el análisis a mayor resolución de la zona hipersensible a DNasa I se emplean enzimas de restricción que hagan que las bandas de interés queden entre 1,5 y 0,5 Kpb y se separa el DNA en geles de agarosa más concentrados (1.5% en lugar del 0.8% inicial) (Wu, 1989). En este caso concreto el subfragmento que aparece al cortar con Bso BI tiene el tamaño correcto, por lo que se procedió a la separación de DNAs equivalentes a los utilizados en el anterior apartado en geles de agarosa al 1.5%. Como análisis independiente del mismo fragmento se utilizó una segunda diana de restricción como referencia acompañada de una segunda sonda. La enzima utilizada fue Nco I, que corta a -792, y la sonda (DHSP2) un fragmento de DNA que incluye desde esa diana Nco I hasta la siguiente diana Hpa II, situada justo antes del inicio de la zona hipersensible (-362, 430 pb) (figura 23). Como marcador de peso molecular se incluyó en cada carril una escalera de 100 pb.

Los resultados del análisis con la sonda DHSP1 (figura 26A) sitúan la zona hipersensible a DNasa I en cerebelo entre -165 y +80 (la numeración se refiere siempre al inicio de transcripción). Con la sonda DHSP2 (figura 28B) se obtiene una situación para la zona hipersensible prácticamente idéntica (-170 hasta +70). En dos repeticiones de ambos experimentos las diferencias en la estimación de esta región no pasaron de 10 pb, coherente con las diferencias obtenidas entre las sondas DHSP1 y DHSP2.

Es importante señalar que la intensidad de la banda a lo largo de la zona hipersensible en cerebelo no es homogénea; se aprecia una zona interna resistente a nucleasas, que da lugar a dos bandas separadas aunque no bien resueltas por la electroforesis (figura 26A).

En hígado, al igual que ocurría en el análisis a baja resolución, la zona definida por su hipersensibilidad a DNasa I es menor que en cerebelo. Con la sonda DHSP1 esta región se detecta entre -70 y +35 (figura 26A). Los resultados con DHSP2 son similares: -90 hasta +20 (figura 26B). Estas diferencias y las encontradas en dos repeticiones de ambos experimentos

son similares a las determinadas en el caso del cerebelo y sitúan el rango de error de este mapa en ∇ 10-20 pb. En hígado no se detecta la zona interna resistente a DNasa I que se puede observar en cerebelo.

En el experimento de hipersensibilidad a DNasa I detectada con la sonda DHSP1 se utilizó una referencia adicional (figura 26A, carril 4), consistente en el producto de la reacción de digestión de DNA genómico purificado con Bso BI + Nde I. Esta última enzima, Nde I, tiene una diana de corte en -120, o sea, dentro de la zona hipersensible y a unos 90 pb a 5' de la caja TATA. Con este marcador adicional se cofirma el mapa obtenido mediante la escalera de 100 pb.

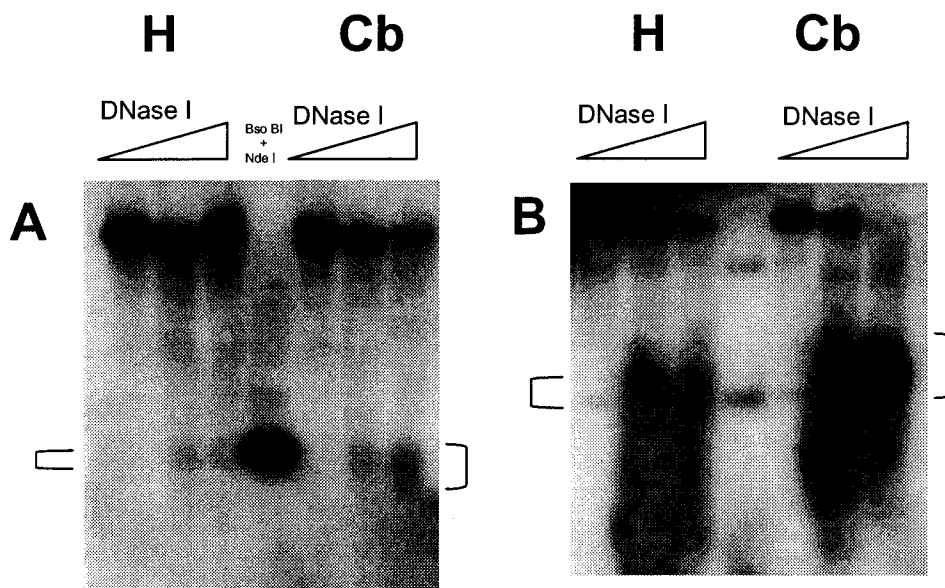


Figura 26. **Localización precisa de la región de hipersensibilidad a DNasa I.** Muestras de DNA tratadas y procesadas como en los experimentos descritos en las figuras 24 y 25 se separaron en un gel de agarosa al 1,5% y se transfirieron a una membrana de nylon. **A**, *Southern blot* de hígado (H) y cerebelo (Cb) de rata adulta con la sonda DHSP1. En el carril 4, control consistente en la digestión de DNA genómico con Bso BI y Nde I, que produce un fragmento de 1054 pb. Los corchetes señalan los límites de la región hipersensible. La cabeza de flecha señala la presencia de una zona interna resistente a nucleasas en el caso del cerebelo. **B**, *Southern blot* de los mismos tejidos con la sonda DHSP2.

Hipersensibilidad a nucleasa S1

La nucleasa S1 fue la segunda sonda enzimática utilizada para localizar zonas hipersensibles a nucleasas en el promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa. En cerebelo, la zona hipersensible a DNasa I también es atacada preferentemente por la nucleasa S1 (figura 27A).

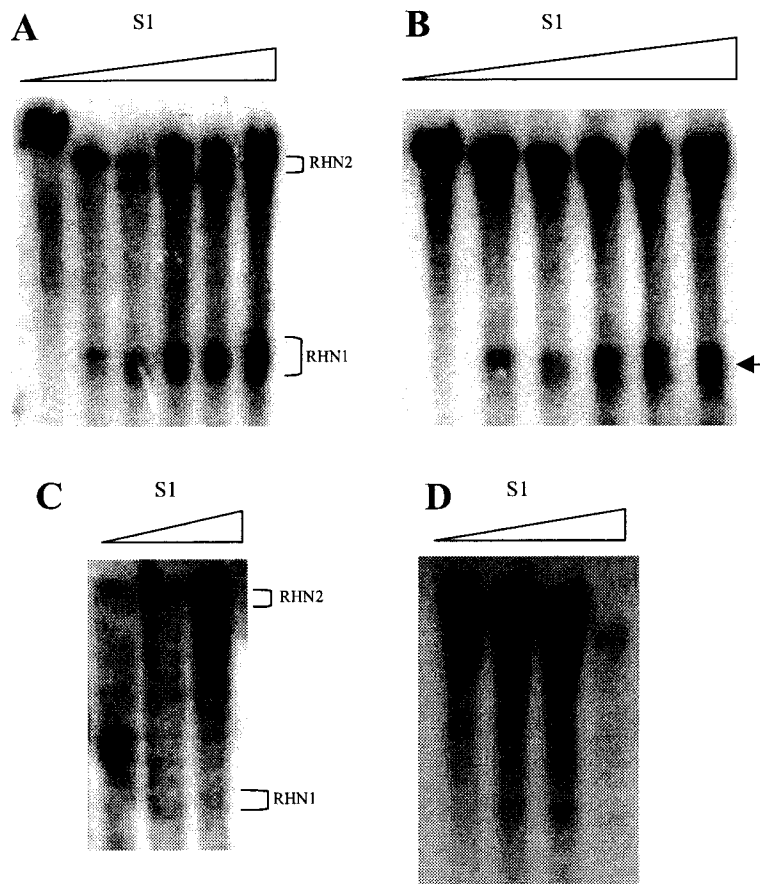


Figura 27. **Hipersensibilidad a nucleasa S1 en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$.** Núcleos de cerebelo e hígado de rata adulta se trataron con concentraciones crecientes de nucleasa S1 (0, 300, 600, 900, 1200 y 1500 u/mL) durante 15 minutos a 37°C. 20 μgr de los DNAs purificados se cortaron con Bso BI y se analizaron mediante *Southern blot* con la sonda DHSP1. **A**, DNA de cerebelo separado en un gel de agarosa al 0,8%. Con corchetes se indican las dos regiones hipersensibles, denominadas RHN1 y RHN2. **B**, DNA de cerebelo en un gel al 1,5%. La flecha indica una zona de menor intensidad en la región hipersensible. **C**, hígado de rata adulta; gel de agarosa al 0,8%. **D**, DNA de hígado en gel al 1,5%.

Sin embargo aparece una nueva zona, no detectada por DNasa I, que se localiza aproximadamente entre -7 y -7,5 Kpb respecto al inicio de transcripción. Su intensidad aumenta al mismo tiempo que la cantidad de nucleasa S1 empleada, lo que indica que aparece debido a la acción de esta enzima. Para distinguir las dos regiones hipersensibles a nucleasas detectadas, se denominó RHN1 a la más cercana al inicio de transcripción y que es detectada tanto por DNasa I como por nucleasa S1, y RHN2 a la más alejada, que sólo se detecta con nucleasa S1 (figura 27A).

Se realizó un análisis a mayor resolución de la zona RHN1 generada por nucleasa S1 para comprobar si su localización es idéntica a o no a la detectada por DNasa I en cerebelo. Los resultados, mostrados en la figura 29B, indican que esta región está situada entre -265 y + 35 respecto al inicio de transcripción. Al igual que en el caso de la digestión con DNasa I, la banda tiene en realidad una zona central de menor intensidad.

En hígado aparecen ambas zonas. RHN2 es similar al cerebelo, tanto por el ancho de la banda como por su intensidad (figura 27C). RHN2, al igual que en el caso de la DNasa I, tiene menor intensidad que en cerebelo (figura 27C) y no se observa la zona interna de resistencia a nucleasas. Sin embargo la localización de RHN1 es algo distinta a la generada por DNasa I en el mismo tejido, ya que se sitúa desde -165 a -65 respecto al inicio de transcripción (figura 27D).

En la figura 28 se muestra un esquema resumiendo la situación de las zonas hipersensibles a DNasa I y a nucleasa S1 detectadas en este estudio.

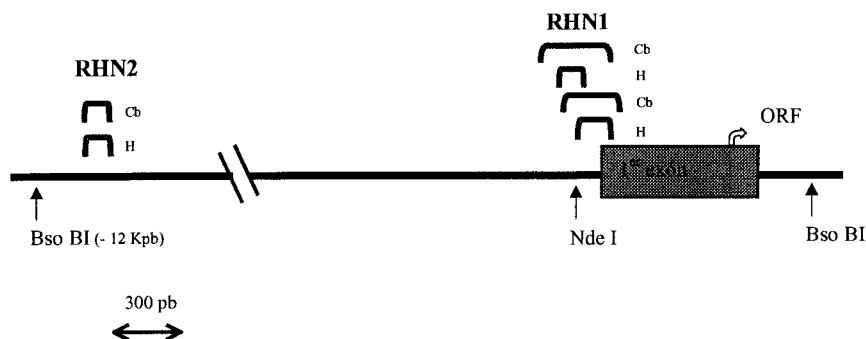


Figura 28. **Representación esquemática de las zonas de hipersensibilidad a nucleasas.** Los corchetes en negro indican las zonas hipersensibles a DNasa I en cerebelo (Cb) e hígado (H). Los corchetes azules indican las regiones de hipersensibilidad a nucleasa S1. La región RHN2 no está representada a escala.

Sensibilidad a nucleasa micrococcal

La nucleasa micrococcal corta de forma preferencial en los segmentos espaciadores entre nucleosomas del DNA empaquetado en forma de cromatina (Dingwall, 1981). Al digerir con esta enzima el DNA de núcleos aislados y separar los fragmentos mediante electroforesis en un gel de agarosa se observa un patrón en escalera de fragmentos discretos cuyo tamaño difiere en aproximadamente 200 pb (variable según la especie y el tejido estudiados), longitud del DNA protegido por un nucleosoma. Sin embargo no todas las regiones del DNA están empaquetadas en nucleosomas e incluso si estos están presentes pueden no tener distribución regular (Thoma, 1992). Las propiedades de corte de la nucleasa micrococcal se utilizaron para estudiar la presencia y distribución de los nucleosomas en distintas regiones del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.

Cuando se analizaron los fragmentos resultantes de la digestión de núcleos de cerebelo e hígado de rata en un gel de agarosa se obtuvo, como era de esperar, en un patrón en escalera, característico del corte de la nucleasa micrococcal (figura 29).

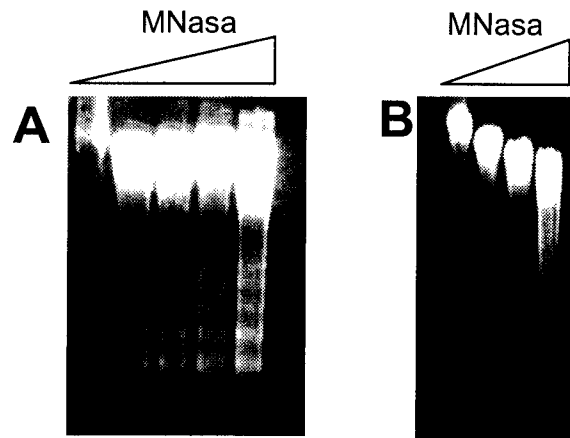


Figura 29. **Patrón de corte de nucleasa micrococcal en cerebelo e hígado de rata adulta.** Núcleos de cerebelo e hígado de rata adulta se trataron con concentraciones crecientes de nucleasa micrococcal (MNasa; 0, 450, 600, 750 y 900 u/mL) durante 7 minutos a 37°C. 20 µgr de DNA purificado se separaron en un gel de agarosa al 1,5%. **A**, cerebelo. **B**, hígado.

Estos mismos geles fueron transferidos a una membrana de nylon con objeto de determinar la distribución de nucleosomas en distintas regiones del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa mediante *Southern blot* con el uso de sondas específicas. En primer lugar se realizó una hibridación con la sonda cDNA $\beta 2$ (*Material y Métodos*), que incluye toda la región codificante de este gen. Los resultados (figura 30) indican una distribución de nucleosomas a lo largo de la región codificante del gen de la subunidad $\beta 2$ similar a la observada cuando se analiza DNA total (figura 29), tanto en cerebelo como en hígado, aunque el DNA de cerebelo presenta una señal más débil si se compara con los patrones observados en el DNA total (figura 29).

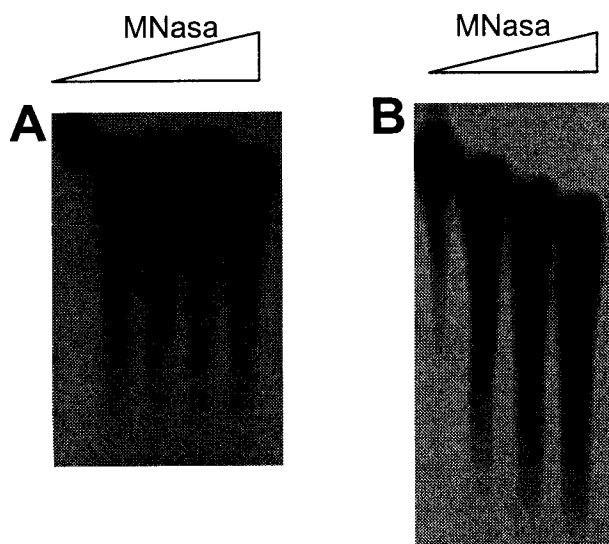


Figura 30. **Patrón de digestión de nucleasa micrococcal a lo largo de la región codificante del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.** *Southern blot* con la sonda cDNA $\beta 2$. **A**, cerebelo. **B**, hígado.

Utilizando la misma membrana se procedió a estudiar la disposición de los nucleosomas en la región caracterizada previamente como hipersensible a DNasa I y en una zona adyacentes en dirección 5' mediante el uso de sondas adecuadas. La primera de ellas, denominada 1F2R, fue amplificada con los oligonucleótidos del mismo nombre (*apéndice 1*) y abarca desde -300 hasta -29 respecto al inicio de transcripción, solapando por lo tanto con la región sensible a DNasa I. La segunda sonda utilizada fue DHSP2, descrita en el apartado anterior y que se sitúa entre los nucleótidos -792 y -362 respecto al inicio de transcripción, situándose así en posición 5' a la zona hipersensible a DNasa I. Los resultados (figura 31) muestran un patrón diferencial en hígado y en cerebelo. El hígado sigue conservando una distribución regular de nucleosomas en las dos regiones estudiadas (figura 31B y 31D), al igual que en la zona codificante del gen (figura 30) y en el DNA total (figura 29), pero hay fragmentos de mayor intensidad que otros, cosa que no ocurría al sondear con cDNA $\beta 2$ (figura 30). Por el contrario el cerebelo presenta una señal muy débil y una distribución irregular de los

nucleosomas con ambas sondas (figura 31A y 31C). Sin embargo si se observan los fragmentos de mayor peso molecular se puede ver una diferencia entre las dos regiones estudiadas en cerebelo. Con la sonda 1F2R aparece una escalera de fragmentos de alto peso molecular (figura 31A), que indican la presencia de nucleosomas en zonas alejadas de la sonda (ya que ésta no hibrida con fragmentos menores). En el caso de DHSP2 estos fragmentos apenas se detectan (figura 31C).

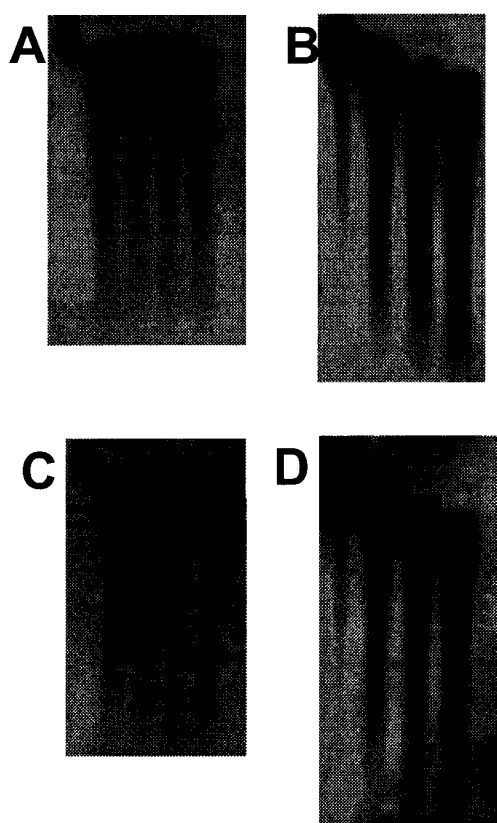


Figura 31. **Patrones de digestión de nucleasa micrococcal en la región hipersensible a DNasa I y en la regiones adyacente en dirección 5'.** *Southern blot* con las sondas 1F2R (A, B) y DHSP2 (C, D). A, C, DNA obtenido de cerebelo de rata adulta. B, D, DNA de hígado de rata adulta.

En numerosos promotores y secuencias reguladoras de la transcripción se ha visto que los nucleosomas se sitúan sobre una secuencia de DNA determinada (Thoma, 1992; Beato y Eisfeld, 1997). La presencia de un patrón de nucleosomas altamente irregular en cerebelo

sugirió estudiar su posición respecto a la secuencia de DNA mediante la técnica de marcaje indirecto (Wu, 1980; Thoma, 1996), que es la misma que se utilizó en los experimentos de hipersensibilidad a nucleasas para localizar las zonas degradadas preferencialmente. Los núcleos aislados de cerebelo se trataron con nucleasa micrococcal de la misma manera que en el experimento anterior. Una vez purificado el DNA se cortó con las enzimas de restricción Bso BI y Nco I (puntos de corte a +946 y -792 respectivamente; figura 23) y los fragmentos resultantes se separaron en una electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó la sonda DHSP1 (*Material y Métodos*) para el análisis del DNA mediante *Southern blot*. Debido a que la nucleasa micrococcal presenta especificidad de secuencia en su actividad se utilizó un control de DNA genómico de rata digerido *in vitro* con esta enzima para detectar puntos preferenciales de corte debidos a la secuencia. Los fragmentos resultantes se analizaron de la misma forma que el DNA obtenido de los núcleos de cerebelo tratados con nucleasa micrococcal. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 32.

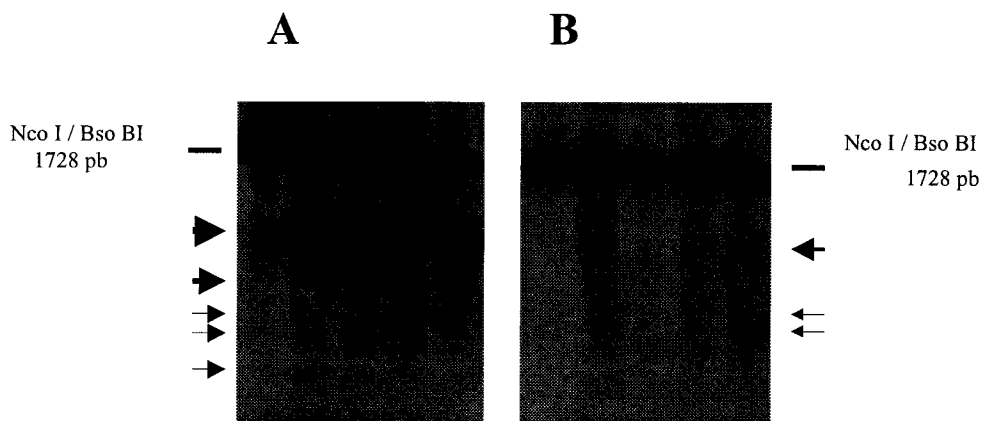


Figura 32. **Localización de los puntos de corte de nucleasa micrococcal en la región comprendida entre -792 y +946 del gen de la subunidad $\beta 2$.** Aproximadamente 20 μgr de DNA procedente de núcleos de cerebelo tratados con nucleasa micrococcal y DNA genómico purificado digerido con la misma enzima fueron cortados con Bso BI y Nco I y analizados mediante *Southern blot* con la sonda DHSP1. **A**, DNA obtenido de núcleos de cerebelo tratados con nucleasa micrococcal. **B**, DNA genómico tratado *in vitro* con nucleasa micrococcal.

La nucleasa micrococcal corta el DNA *in vitro* con relativa especificidad, lo que produce algunos fragmentos discretos (figura 32B). Esta actividad no interfiere en la interpretación de los datos ya los fragmentos generados por esta enzima al digerir los núcleos de cerebelo tienen una intensidad muy superior a los producidos en DNA genómico purificado (figura 32A), lo que indica una especificidad de corte mucho mayor. Esta comparación es posible ya que se analizaron cantidades de DNA iguales en ambos casos, lo que puede comprobarse si se observa la intensidad de los fragmento Bso BI / Nco I generados.

Existen dos puntos hipersensibles a nucleasa micrococcal en la región analizada en los núcleos de cerebelo (indicados en la figura 32A con flechas gruesas), y al menos tres puntos adicionales de menor intensidad (flechas finas). Las zonas resistentes a la nucleasa entre estos puntos de corte indican la posible presencia de nucleosomas en fase respecto a la secuencia (ver *Discusión*). En cada uno de los carriles se mezclaron pequeñas cantidades de un patrón de peso molecular consistente en una escalera de 100 pb. La recuperación de la membrana y la hibridación con una sonda complementaria al patrón de pesos moleculares (datos no mostrados) permitió calcular la longitud de los fragmentos generados por la nucleasa micrococcal. De esta manera se determinó un tamaño de 1000 a 1100 pb aproximadamente para el fragmento de mayor intensidad y un tamaño de entre 700 y 800 pb para el siguiente fragmento. Los tres restantes, de intensidad menor, resultaron tener unos tamaños aproximados en torno a 600, 500 y 350 pb. Como estos fragmentos se detectan con la sonda DHSP1, cuyo extremo 3' coincide con la diana Bso BI, se puede calcular la posición de los sitios de corte preferencial de nucleasa micrococcal sobre la secuencia de DNA. De esta manera, el fragmento principal se sitúa en torno a -170 pb respecto al inicio de transcripción, en una zona coincidente con el extremo de la región hipersensible a DNasa I. El segundo fragmento en intensidad se sitúa inmediatamente a 5' del inicio de transcripción y los tres restantes en el interior de la zona transcrita.

Patrones de metilación

La ausencia de corte de la enzima Ava I en los experimentos de hipersensibilidad a nucleasas y el funcionamiento normal de su isosquizómero insensible a la metilación Bso BI, sumado a la importancia que tiene esta modificación en la estructura de la cromatina, llevó a considerar el estudio de los patrones de metilación de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa de rata.

En primer lugar se realizó un análisis del contenido en el dinucleótido CpG en la región 5' de la subunidad $\beta 2$ en rata por medio del programa CpG (ver *Material y Métodos*). Como se expuso en el apartado *Introducción*, el 90% de la base modificada 5mC se encuentra formando parte de este dinucleótido. El resultado indica la presencia de una región candidata a islote CpG de 1 Kpb de longitud que comienza en el nucleótido - 12 y que se prolonga hasta el + 1039 (numeración respecto al inicio de transcripción). Entre los nucleótidos - 2308 (hasta donde llega la secuencia disponible) y - 12 el programa detecta algunas zonas positivas, pero ninguna de ellas sobrepasa los 50 nucleótidos de largo. En general los islotes CpG descritos son iguales o mayores a 1 Kpb, por lo que secuencias tan cortas no se consideran como tales (Bird, 1986).

Como elemento de comparación se analizaron las regiones 5' de los genes de la subunidad $\beta 2$ en ratón y humanos. También se incluyeron como controles el gen de la subunidad $\alpha 1$ de Na^+, K^+ -ATPasa, que es un gen constitutivo y por tanto debe poseer un islote CpG en su región 5', y el gen del fibrinógeno de rata, cuya región 5' se encuentra libre de islotes CpG (Bird, 1986). En todos los casos se tomó como referencia el inicio de la región codificante (nucleótido ATG) y se eligieron 1300 pb hacia 5' (este número es el máximo que se puede escoger, ya que no se conoce la secuencia más hacia 5' en el caso del gen de la subunidad $\beta 2$ en humanos). Como se representa esquemáticamente en la figura 29, el programa CpG detectó candidatos a islotes CpG en posiciones conservadas entre los

genes de la subunidad $\beta 2$ de rata, ratón y humanos. Como era previsible, también se detecta un islote CpG en la región 5' de la subunidad $\alpha 1$, mientras que la del gen del fibrinógeno tiene niveles normales de este dinucleótido.

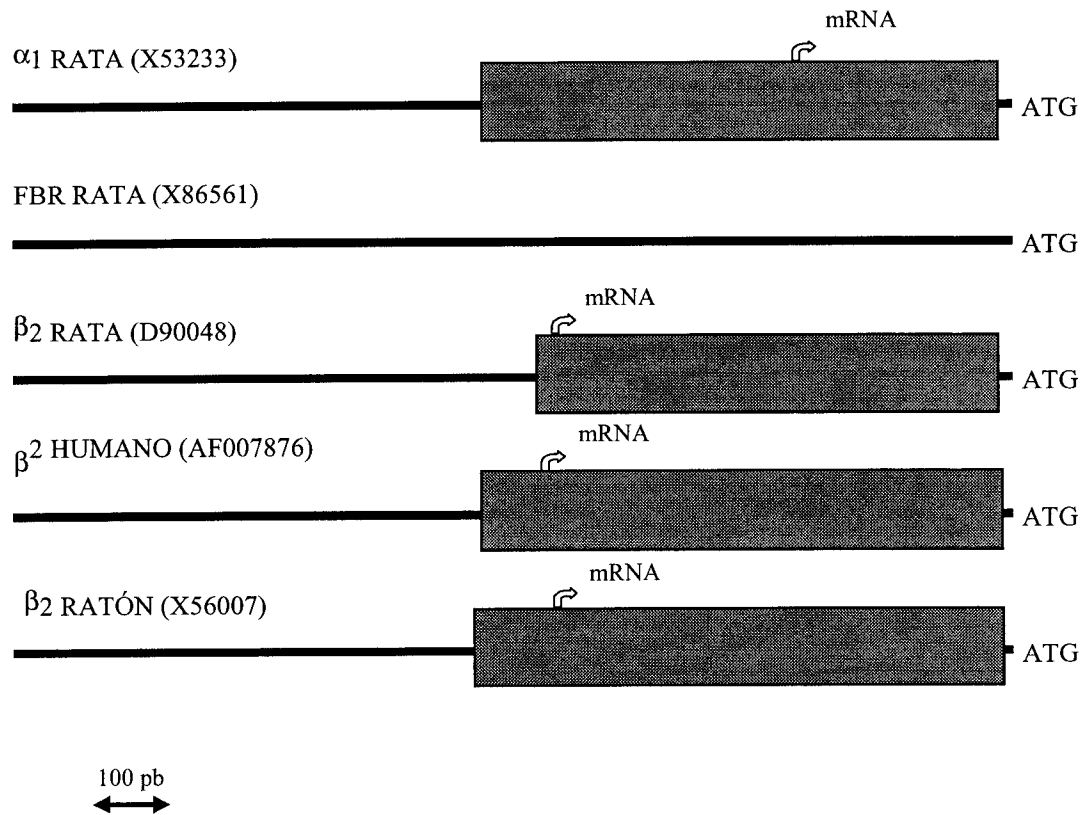


Figura 29. Localización de islotos CpG en la región 5' de los genes de la subunidad $\beta 2$ en rata, ratón y humanos y comparación con los genes de la subunidad $\alpha 1$ y del fibrinógeno de rata. Entre paréntesis, número de acceso a la secuencia en GenBank. Se eligieron secuencias de igual longitud (1300 pb) inmediatamente a 5' del inicio de la secuencia codificante (señalado como ATG). Las cajas indican la presencia de un islote CpG. El inicio de transcripción se indica con una flecha curva y con mRNA. En el caso del gen del fibrinógeno no se señala inicio de transcripción, ya que es variable. FBR = fibrinógeno.

Para que las secuencias con las características propias de un islote CpG puedan ser consideradas como tales es necesario además que se

encuentren constitutivamente libres de metilación, al menos en células germinales (Bird, 1986). En las células somáticas el patrón puede variar y en muchas ocasiones se correlaciona con la actividad del gen. Por tanto, se procedió al análisis de los patrones de metilación del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa de rata en distintos tejidos y etapas del desarrollo. Concretamente se eligió cerebelo, hígado y riñón de rata adulta y los mismos tejidos de individuos con dos días de edad (P2). Como se ha expuesto anteriormente el cerebelo expresa siempre altos niveles del mRNA de la subunidad $\beta 2$, mientras que en el riñón decrece a los pocos días del nacimiento y en el hígado desaparece por completo (Martín-Vasallo y cols, 1989).

El procedimiento escogido fue un análisis a baja resolución mediante el uso de isosquizómeros de enzimas de restricción que incluyen en su diana el dinucleótido CpG y que difieren en su sensibilidad a la metilación. La pareja utilizada fue Hpa II / Msp I, con diana en la secuencia CCGG. La enzima Msp I es capaz de cortar la secuencia C^mCGG , mientras que Hpa II ve inhibida su actividad por la presencia del grupo metilo. Las dianas de estas dos enzimas en el gen de la subunidad $\beta 2$ se muestran en la figura 31.

En un experimento preliminar se determinó que los únicos fragmentos detectados en un *Southern blot* son los comprendidos entre el nucleótido -2207 y el -374 (1833 pb) y entre el -374 y el +446 (820 pb). El resto de los fragmentos generados son demasiado pequeños, incluidos los producidos por cortes hacia 5' y 3' de la secuencia conocida, de donde se deduce que las siguientes dianas Hpa II / Msp I deben estar muy cerca en el genoma. Para comparar la efectividad de corte de Msp I y de Hpa II se utilizaron cantidades iguales de DNA (20 μgr) procedente de la misma muestra en ambas reacciones. Como control de la actividad de las enzimas de restricción utilizadas se llevaron a cabo reacciones adicionales incluyendo, además del DNA genómico, aproximadamente 10 ngr del plásmido pPR $\beta 2$, que al estar propagado en *E. coli* está libre de la presencia de 5mC. Este

plásmido produce fragmentos de igual tamaño que el DNA genómico al ser cortado con Hpa II / Msp I si se detecta el *Southern blot* con la misma sonda. De esta manera se pudo comprobar que ambas enzimas eran igualmente activas en la mezcla de reacción (datos no mostrados).

El resultado del *Southern blot* (figura 30) muestra cómo las dianas situadas a -374 y +446 están libres de metilación en todos los casos estudiados, ya que tanto Msp I como Hpa II son capaces de cortar con la misma efectividad, liberando el fragmento del tamaño correspondiente (833 pb). La única excepción lo constituyen las células NRK, que deben tener un alto grado de metilación en alguna o ambas dianas (figura 30), de manera que Msp I corta con una efectividad muy superior a la de Hpa II.

Por el contrario, la diana situada en -2207 respecto al inicio de transcripción sí está metilada en todos los tejidos y líneas celulares estudiados. Msp I corta normalmente y produce un fragmento de 1833 pb, pero Hpa II presenta mucha menor actividad (figura 30). El fragmento que aparece tiene un tamaño en torno a 6 Kpb, salvo en la línea NRK, donde alcanza unas 8 Kpb. Por tanto, la zona metilada abarca aproximadamente 6,3 Kpb (8 en NRK) hacia 5' del inicio de transcripción del gen de la subunidad $\beta 2$ de rata, hasta que se encuentra otra diana Hpa II / Msp I libre de metilación. Este experimento se repitió dos veces con resultados iguales en ambos casos.

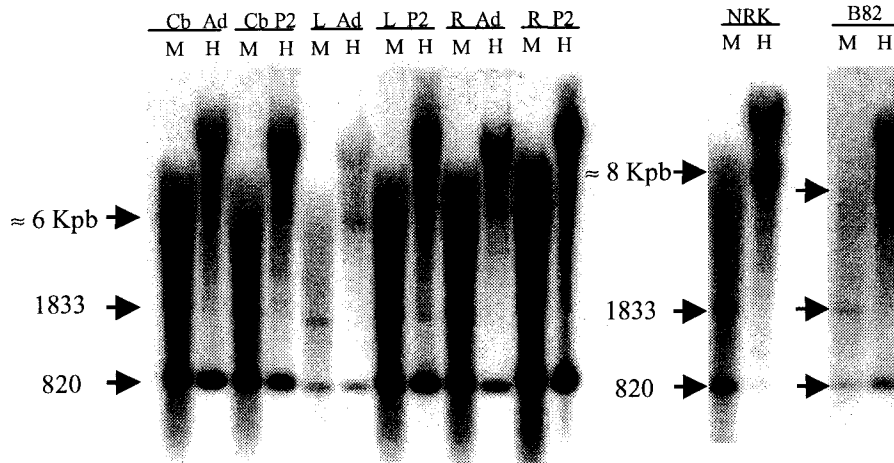


Figura 30. Resultados del análisis de los patrones de metilación de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en tejidos de rata. 20 μgr de DNA genómico purificado de los distintos tejidos indicados se cortaron con Msp I o con Hpa II, los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se analizaron mediante *Southern blot*. Abreviaturas: Cb, cerebelo; L, hígado; R, riñón; Ad, adulto; P2, dos días de edad; M, Msp I; H, Hpa II.

En la figura 31 se esquematiza la situación de las dianas de restricción estudiadas y su metilación.

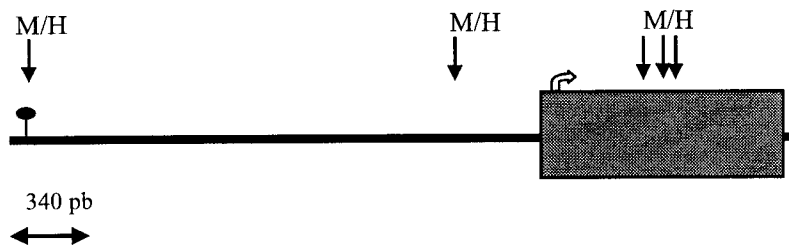


Figura 31. Esquema de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ con los patrones de metilación encontrados en los distintos tejidos y líneas celulares analizados. Se muestra la posición del islote CpG (caja), el inicio de transcripción (flecha curva) y la posición de las dianas Msp I / Hpa II (M/H). La presencia de metilación en todos los tejidos y líneas celulares en la diana -2207 se indica con un círculo azul.

La intensa señal de fondo apreciable en el *Southern blot* del experimento descrito (figura 30) se debe probablemente a la presencia de zonas repetitivas en el promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ de rata, que al ser utilizado como sonda hibrida parcialmente con muchas otras zonas del genoma que contienen estas mismas secuencias. La presencia de secuencias repetitivas en el DNA estudiado se comprobó mediante el uso del programa Repeat Masker2 (*Material y Métodos*). Los resultados se presentan de forma esquemática en la figura 32. Se detectan siete zonas repetitivas, tres de ellas de la familia SINE (*Short Interspersed Elements*) tres de la familia LTR () y una de la familia scRNA (*small cytoplasmic RNA*) (para una revisión reciente sobre estas secuencias, ver Smit, 1996). Además se estudió la presencia de este tipo de secuencias en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en ratón (figura 32).

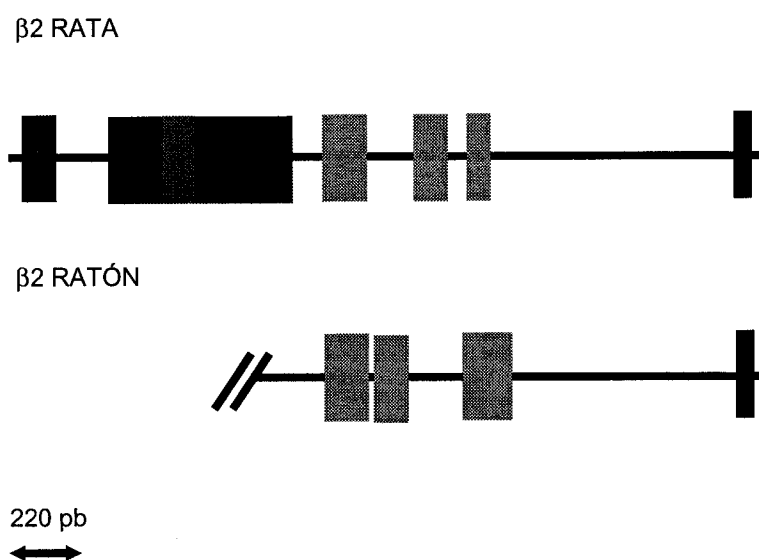


Figura 32. Situación de las regiones repetitivas en la zona 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en rata. Se representa la caja TATA (caja color negro, no a escala). En naranja, secuencias repetitivas de la familia SINE. En azul, secuencias tipo LTR. En verde, tipo scRNA.

Resistencia a la exonucleasa Bal 31

La presencia de factores unidos fuertemente al DNA impide su degradación mediante exonucleasas, pero la presencia de histonas no representa una barrera para la actividad de estas enzimas (Wu, 1984). Para comprobar si las regiones hipersensibles a nucleasas contienen factores unidos al DNA se procedió a caracterizar la resistencia de estas zonas a la acción de la exonucleasa Bal 31 (Gross y Garrard, 1988; Kumani y cols, 1996) mediante la técnica de marcaje indirecto, la misma utilizada en los experimentos de hipersensibilidad a nucleasas. Para que las exonucleasas puedan ejercer su acción es necesario digerir parcialmente el DNA en los núcleos aislados, empleando para ello enzimas de restricción o, de forma alternativa, endonucleasas como DNasa I o nucleasa micrococcal (Wu, 1989). Estos experimentos presentaron numerosos problemas técnicos que sólo hicieron posible el análisis en núcleos de cerebelo y únicamente mediante la acción previa de DNasa I. La utilización de esta enzima tiene el inconveniente de producir una población de fragmentos igual a la que tiene que aparecer si existe resistencia a Bal 31. Sin embargo se puede distinguir esta resistencia si otras bandas en el *Southern blot* son degradadas y la zona hipersensible se mantiene intacta. Los núcleos digeridos con bajas concentraciones de DNasa I se trataron posteriormente con Bal 31, se purificó el DNA y tras cortar con la enzima Bso BI se analizaron los fragmentos generados mediante *Southern blot* con la sonda DHSP1. Los resultados de este experimento (figura 36) muestran cómo la adición de cantidades crecientes de Bal 31 degrada de manera progresiva el fragmento Bso BI / Bso BI, pero no el equivalente al generado por DNasa I. De esto se deduce que en esta región se encuentran factores proteicos fuertemente unidos al DNA, sin que se detecten zonas similares en ningún otro punto de las 12 Kpb analizadas. Es importante señalar que el inicio de la zona resistente a Bal 31 en su extremo 5' no coincide exactamente con el de la región hipersensible a DNasa I, sino que se sitúa más cerca del inicio de

transcripción (figura 36). En tres experimentos independientes se obtuvieron los mismos resultados de forma altamente reproducible.

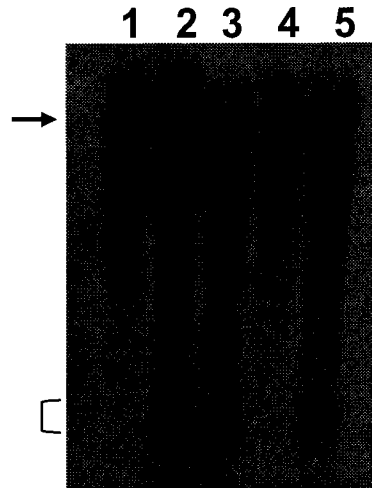


Figura 36. **Resistencia a Bal 31 en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.** Como controles se muestran los DNAs purificados de núcleos control sin tratamiento (carril 1), tratados sólo con Bal 31 (carril 4) o sólo con DNasa I (carril 5). Los núcleos tratados consecutivamente con DNasa I y con Bal 31 se muestran en los carriles 2 (5 u/mL Bal 31) y 3 (7,5 u/mL). El tratamiento con DNasa I fue de 10 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ (*Material y Métodos*). Se señala el fragmento Bso BI / Bso BI (flecha) y la zona hipersensible a DNasa I y de resistencia a Bal 31 (corchete).

Experimentos de retardo en gel

En la figura 18 (*Material y Métodos*) se muestra la disposición de las tres sondas utilizadas en los experimentos de retardo en gel. Estas sondas tienen una longitud aproximada de 150 pb y solapan entre sí unas 30 pb. En los tres casos el experimento consistió en la adición de cantidades progresivamente mayores de factores nucleares obtenidos de cerebelo e hígado de rata adulta. Una de las reacciones con concentraciones intermedias de factores nucleares se duplicó y se añadió un exceso de aproximadamente 125 moles de sonda sin marcar como control de la

especificidad de los retardos. Otra reacción se realizó en ausencia de factores nucleares, que fueron sustituidos por el tampón en el que se almacenan (*Material y Métodos*). Cada uno de los retardos se repitió un mínimo de tres veces, con resultados reproducibles en todos los casos.

En la figura 37 se muestran los resultados obtenidos con la sonda número 1, que se sitúa entre -300 y -156 respecto al inicio de transcripción, solapando parcialmente en su extremo 3' con las zonas hipersensibles a DNasa I y nucleasa S1.

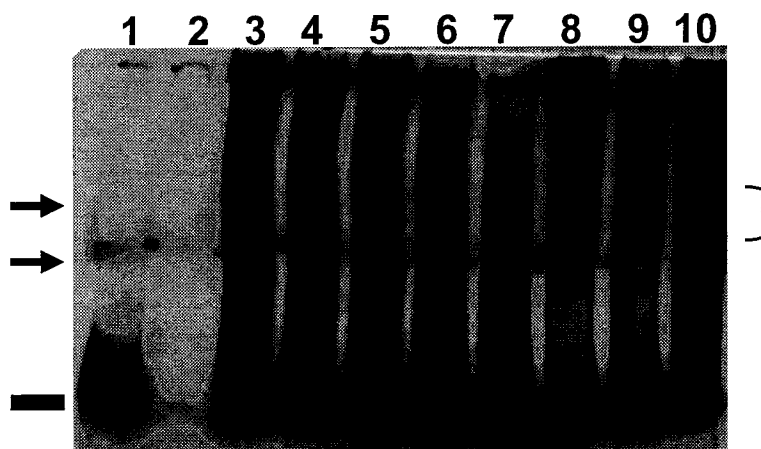


Figura 37. **Experimento de retardo en gel con la sonda número 1.** La situación de la sonda libre se señala con una línea. Los retardos provocados por los factores nucleares de cerebelo de rata adulta (carriles 3, 4, 5 y 6; 1.75, 3.5, 7 y 14 μgr de factores respectivamente) se señalan con flechas. Carril 7: competición con sonda no marcada (7 μgr de factores de cerebelo). Carriles 8, 9 y 10, retardo con factores nucleares de hígado (1.75, 3.5 y 7 μgr) (señalados con un corchete).

Los factores nucleares de cerebelo provocan dos bandas específicas de retardo, además de algunas de mayor tamaño y aspecto más difuso. Por su parte, los factores de hígado dan como resultado un patrón diferente compuesto por varias bandas seguidas que no se resuelven totalmente. La competición con sonda no marcada (carril 7, figura 37) anula la formación de

retardos. La sonda sin factores de transcripción añadidos (carril 1, figura 37) migra como una sola banda sin que se produzca ningún retardo.

En la figura 38 se muestra el experimento de retardo en gel utilizando la sonda número 2 (-178 a -29 respecto al inicio de transcripción). De nuevo aparecen dos bandas de retardo, pero en este caso son evidentes tanto al utilizar factores nucleares de hígado como de cerebelo. La competición con sonda fría provoca una disminución de la intensidad de las bandas formadas por los complejos DNA-proteína, sin llegar a anularlos por completo. Existe una banda adicional muy cercana al pocillo. Debido a su gran tamaño y a su intensidad, se debe probablemente a la formación de complejos inespecíficos entre la sonda y los factores nucleares.

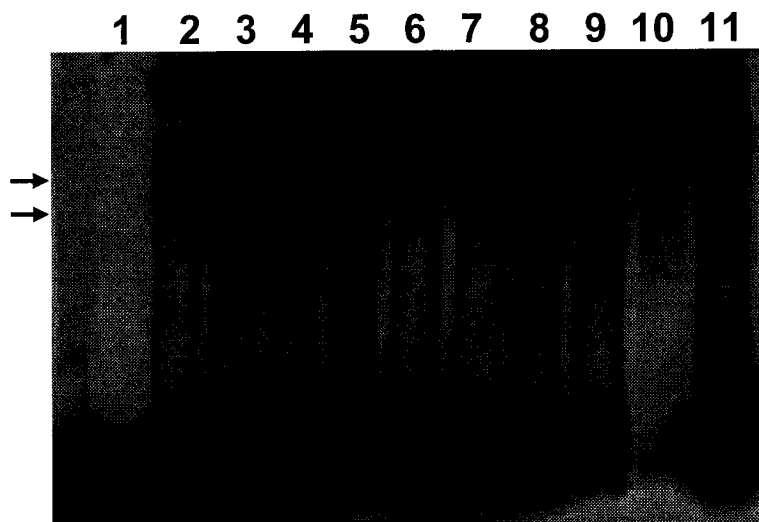


Figura 38. **Experimento de retardo en gel con la sonda número 2.** Carril 1, sonda sin factores nucleares. Carriles del 2 al 5, retardos provocados por cantidades progresivamente mayores de factores nucleares de cerebelo (1.175, 3.5, 7 y 14 μ gr). Carril 6, competición de la unión de factores de cerebelo (7 μ gr) con sonda número 2 sin marcar. Carriles del 7 al 10, retardos con factores de hígado (igual cantidad que en cerebelo). Carril 11, competición de sonda sin marcar con factores de hígado (7 μ gr). Los retardos específicos se indican con flechas.

El último fragmento analizado fue la sonda número 3 (-63 a + 90 respecto al inicio de transcripción). En la figura 39 se muestra como con factores de cerebelo aparecen de nuevo dos bandas principales de retardo. Los factores de hígado también provocan dos bandas de retardo, aunque cuantitativamente presentan diferencias con las obtenidas con factores de cerebelo. De nuevo la sonda no marcada compite parcialmente con la formación de estos complejos. Este hecho podría deberse al orden de adición de los componentes de la reacción, ya que se ha demostrado que este factor puede influir en la especificidad de las uniones DNA-proteína (Demczuk y cols, 1991).

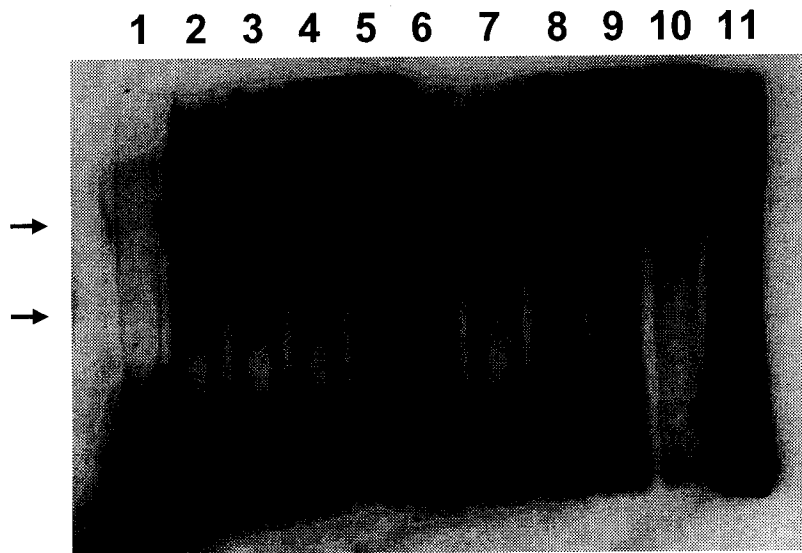


Figura 39. **Experimento de retardo en gel con la sonda número 3.** Carril 1, sonda sin factores nucleares. Carriles del 2 al 5, con factores nucleares de cerebelo (1.75, 3.5, 7 y 14 μgr). Carril 6, competición de la unión de factores de cerebelo (7 μgr) con sonda número 2 sin marcar. Carriles del 7 al 10, retardos con factores de hígado (1.75, 3.5, 7 y 14 μgr). Carril 11, competición de sonda sin marcar con factores de hígado (7 μgr). Los retardos específicos se indican con flechas.

Experimentos de *Southwestern blot*

El *Southwestern blot* se utilizó como técnica complementaria a los retardos en gel para la detección de factores proteicos específicos que interaccionen con la región definida por su hipersensibilidad a nucleasas en el gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa. En un mismo gel desnaturalizante de poliacrilamida se separaron cantidades equivalentes de factores nucleares obtenidos de cerebelo e hígado de rata adulta. Una de las porciones del gel se cortó para su tinción con azul de Coomasie con objeto de confirmar que las cantidades de proteína utilizadas en el experimento eran comparables, como de hecho resultó (figura 40A).

El resto de factores nucleares se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se renaturalizó *in situ* (*Material y Métodos*). La membrana se dividió en cuatro fragmentos, cada uno de ellos con un carril de factores nucleares de cerebelo y otro de hígado, y se hibridó con las mismas tres sondas utilizadas en los experimentos de retardo en gel y con la sonda β -actina, correspondiente a un fragmento de la zona codificante de este gen (*Material y Métodos*), como control (figura 40).

Al analizar los resultados se desecharon las bandas que aparecen en la hibridación con dos o más sondas y que por tanto se interpretan como inespecíficas. Entre las bandas específicas las de mayor interés son las que están presentes sólo en los factores de un tejido, ya que podría representar proteínas importantes en la regulación del gen de la subunidad $\beta 2$. Este tipo de bandas aparece con mayor frecuencia en la sonda número 1 (figura 40C), mientras que en la sonda 2 no existe ninguna proteína de unión específica de tejido (figura 40D). Finalmente, en la sonda número tres se detectan al menos tres bandas diferenciales (figura 40E). En general son más abundantes las proteínas específicas en hígado que en cerebelo, tejido que sólo presenta una banda diferencial en la unión con la sonda número 1. Otras proteínas que se han tenido en cuenta son las que producen una señal cuantitativamente diferente entre los dos tejidos estudiados. La

hibridación con la sonda de β -actina muestra algunas bandas específicas, pero en menor medida que las sondas correspondientes al gen de la subunidad $\beta 2$.

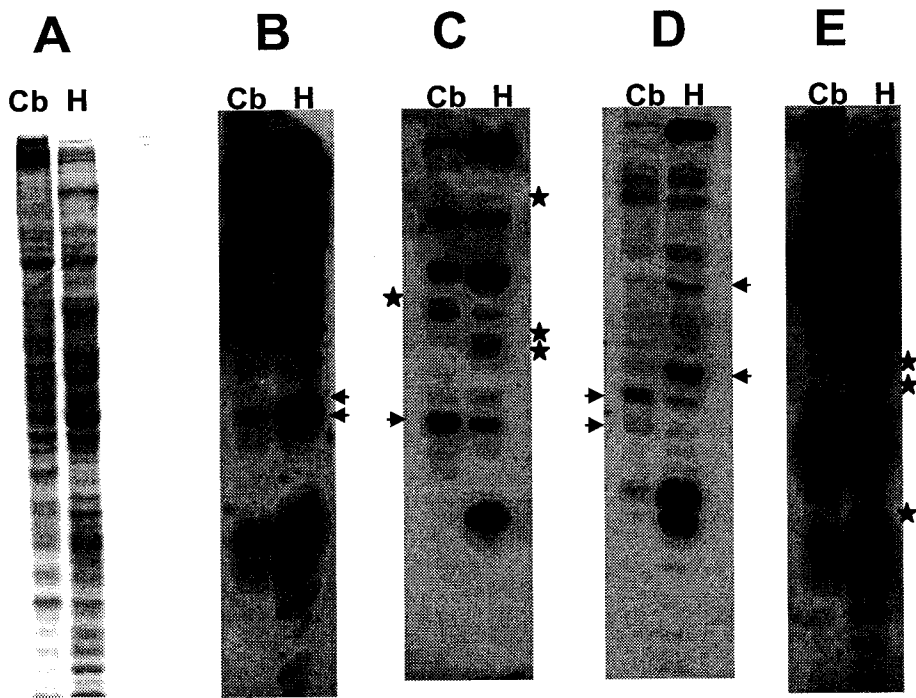


Figura 40. *Southwestern blot* con sondas de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa. **A**, tinción de las proteínas con azul de Coomassie. **B**, hibridación con la sonda β -actina. **C**, hibridación con la sonda número 1. **D**, hibridación con la sonda número 2. **E**, hibridación con la sonda número 3. Los asteriscos indican bandas específicas de tejido. Las cabezas de flecha marcan bandas con diferencias cuantitativas entre tejidos.

Capítulo V

Discusión

Del modelo utilizado

Como ya se expuso en la *Introducción*, el gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa ha sido caracterizado en distintos animales, incluyendo el ratón, la rata y los humanos. La rata presenta diversas ventajas que han hecho que haya sido elegida en este trabajo como modelo de estudio de la expresión del gen de la isoforma $\beta 2$. En primer lugar es el organismo donde mejor se han caracterizado los patrones de expresión de esta proteína, especialmente en SNC y concretamente en cerebelo (Peng y cols, 1997, y referencias incluidas). Es además el único modelo dónde se han efectuado trabajos previos sobre la regulación del gen objeto de este estudio (Kawakami y cols, 1992, 1993). También presenta la ventaja de que las únicas líneas celulares descritas que expresan el gen de interés provienen de SNC de rata (Martín-Vasallo y cols, 1989). Sin embargo hay que señalar que sería deseable ampliar los estudios sobre el gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa al ratón, ya que este animal proporciona la oportunidad de analizar *in vivo* las regiones reguladoras de la transcripción mediante la generación de cepas transgénicas. Esta aproximación permite analizar en múltiples tejidos y en condiciones fisiológicas la influencia de secuencias determinadas sobre la expresión de un gen (MacDonald y Swift, 1998).

Las líneas celulares positivas para la expresión de la subunidad $\beta 2$, como B35 y B82, resultaron tener unos niveles muy bajos tanto del mRNA como de la proteína $\beta 2$, no comparables a los presentes en los tejidos que expresan la proteína en condiciones fisiológicas. Por ello se prefirió utilizar como modelo de estudio tejidos de rata adulta, concretamente el cerebelo y el hígado, como positivo y negativo respectivamente para la expresión de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.

Del planteamiento experimental y de la metodología

Al igual que la mayoría de los casos estudiados, la expresión de la proteína $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa se correlaciona estrechamente con los niveles de transcripción del gen que la codifica. La expresión de altos niveles del mRNA de la subunidad $\beta 2$ parece ser el paso limitante para la síntesis de esta proteína, por lo que este trabajo se ha centrado en la transcripción del gen de dicha subunidad.

La aplicación de la mutagénesis *in vitro* al estudio de la regulación de la transcripción del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa ha proporcionado resultados poco esclarecedores (Kawakami y cols, 1992) acerca de los elementos implicados en la expresión específica de tejido de esta proteína. Debido a esto se planteó una aproximación diferente, que incluyera elementos como la estructura de la cromatina, implicados en la regulación de la expresión génica en condiciones fisiológicas. La caracterización de la estructura de la cromatina en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa se llevó a cabo mediante estudios de hipersensibilidad a nucleasas con distintas especificidades de corte y la determinación de sus patrones de metilación, tanto en tejidos que expresan esta proteína como en otros que no lo hacen. La sensibilidad a nucleasas permite establecer con precisión qué regiones de una zona concreta del DNA están expuestas a la interacción con factores relacionados con el metabolismo del mismo, como por ejemplo reguladores de la transcripción (Gross y Garrard, 1988). La acción de la nucleasa micrococcal presenta una ventaja adicional, ya que con ella se logra determinar la presencia y posición de los nucleosomas en la región de interés. De esta manera, además de determinar posibles diferencias en la estructura de la cromatina en distintas situaciones fisiológicas en las que se encuentre el gen, se puede componer un mapa que acota las zonas de interés para la búsqueda de elementos reguladores. La búsqueda de dichos elementos se abordó mediante el uso de varias técnicas alternativas y complementarias entre sí, como son la

resistencia a exonucleasas, que indica la presencia de factores fuertemente unidos al DNA, los ensayos de retardo en gel y los experimentos de *Southwestern blotting*. Estas dos últimas técnicas detectan la unión *in vitro* de proteínas al DNA y por tanto tienen que estar complementadas por otros experimentos que indiquen la relevancia fisiológica de estas interacciones.

De la expresión de las isoformas de la subunidad β de Na^+, K^+ -ATPasa en líneas celulares

Con anterioridad a este trabajo se había descrito la presencia del mRNA de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en las líneas celulares B35, B50, B82 y B103 (Martín-Vasallo y cols, 1989), lo que las hacía ideales como modelo para estudiar los mecanismos reguladores de la expresión de este gen. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con esos datos, ya que se encontraron niveles de expresión muy bajos o nulos, aunque hay que resaltar que no se puede realizar una comparación directa, ya que en el trabajo original no se incluye una referencia de la sensibilidad del método como la hibridación con el mRNA de $\beta 2$ de cerebro de rata o la detección de actina. En el caso de la línea B82, la única estudiada con mayor detalle, es posible detectar el mRNA y su producto proteico, pero siempre cerca del límite de sensibilidad de las técnicas utilizadas. En cualquier caso la cantidad de mRNA de la subunidad $\beta 2$ es muy inferior a la del cerebro de rata. Sorprendentemente, esta línea celular expresa altos niveles de la subunidad $\beta 3$ de Na^+, K^+ -ATPasa, superiores a los del tejido de donde proviene, donde esta isoforma tiene una expresión muy baja (Arystarkhova y Sweadner, 1997). Por lo tanto las líneas celulares estudiadas no conservan los patrones de expresión de las isoformas de la subunidad β del tejido que las originó y no son adecuadas para el estudio de la expresión del gen de la isoforma $\beta 2$.

La línea NRK, derivada de riñón de rata, no expresa la subunidad $\beta 2$, según se ha podido comprobar en este trabajo y con los datos obtenidos por otros laboratorios (K.J. Sweadner, comunicación personal). El riñón de rata adulta tampoco expresa la proteína $\beta 2$, aunque su mRNA se transcribe en bajos niveles (Martín-Vasallo y cols, 1989; Ávila y cols, 1998). Sin embargo, estas células poseen un patrón de metilación anormal, no detectado en ninguno de los otros tejidos y células estudiados, ya que las citosinas incluidas en el islote CpG presentan esta modificación. La hipermetilación selectiva de genes en líneas celulares, acompañada de una inhibición en su expresión, ha sido ampliamente descrita (Antequera y cols, 1990). Este efecto se da en genes específicos de tejido que no parecen ser imprescindibles para la célula en cultivo, ya que los genes constitutivos se mantienen libres de metilación y se expresan normalmente. Además parece aumentar con el número de pases de cultivo a que se somete la línea celular (Antequera y cols, 1990). Por tanto esta línea celular tampoco constituye un buen modelo de expresión del gen de la subunidad $\beta 2$, ya que la estructura de su zona 5' está sometida a modificaciones que no parecen ser propias del tejido del que se deriva.

De la hipersensibilidad a DNasa I y nucleasa S1

Las aproximadamente 12 Kpb analizadas en dirección 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa de rata muestran un sólo sitio hipersensible a DNasa I, situado en torno al inicio de transcripción tanto en tejidos que expresan activamente el gen como en otros que no lo hacen.

Típicamente las regiones hipersensibles en 1 Kpb inmediatamente anterior al extremo 5' de un gen activo son las más relevantes para la regulación de la expresión génica, coincidiendo con el promotor basal, activadores y/o represores de la transcripción (Gross y Garrard, 1988; Kumari y cols, 1996; y referencias contenidas en estos artículos). Sin embargo, existen ejemplos en los que zonas hipersensibles a mayor

distancia del promotor basal tienen un importante papel en la regulación, como las encontradas en torno a -17 Kpb del inicio de transcripción en el gen del colágeno $\alpha 2(I)$ murino (Bou-Gharios y cols, 1996). En el caso de la subunidad $\beta 2$ no se puede descartar la presencia de regiones importantes más allá de -12 Kpb, límite del análisis realizado en este trabajo.

Por otra parte, el grado de sensibilidad a DNasa I y la amplitud de la región detectada en torno al inicio de transcripción del gen de la subunidad $\beta 2$ sí son específicos de tejido. Ambos son mayores en cerebelo, tejido donde se expresa la subunidad $\beta 2$, que en hígado o riñón, donde se encuentra casi totalmente inactivo. Una situación similar se presenta en el promotor del gen *c-fos*. Una región hipersensible de 50 pb situada justo a 5' del inicio de transcripción en el gen inactivo se amplía tanto hacia 5' como hacia 3', adentrándose en la zona transcrita, hasta alcanzar una longitud de 200 pb cuando se induce su expresión (Herrera y cols, 1997).

Muchos genes que presentan una expresión específica de tejido poseen zonas hipersensibles a DNasa I de forma diferencial y correlacionadas con el estado de activación del mismo (diversos ejemplos en Babiss y cols, 1986; Gross y Carrard, 1988; Vuillaumier y cols, 1997). Lo mismo ocurre en genes inducibles (como los de las proteínas de choque térmico; Wu, 1980) o en los alelos activos e inactivos del cromosoma X (Yang y Caskey, 1987). Sin embargo hay genes que poseen sitios constitutivamente hipersensibles a DNasa I (Gross y Garrard, 1988). Entre estos hay que destacar, por su relación a la situación de la subunidad $\beta 2$, los genes que en algún momento del desarrollo se expresan en un tejido para luego pasar a ser inactivos. En estos casos se suelen mantener las regiones hipersensibles incluso después de la inactivación (Forrester y cols, 1986; Gross y Garrard, 1988). En el caso de $\beta 2$, los dos tejidos estudiados como controles negativos, hígado y riñón adultos, expresan en algún momento del desarrollo la proteína (Martín-Vasallo y cols, 1989; Burrow y cols, en prensa), lo que podría explicar la presencia de la zona hipersensible.

Alternativamente se podría pensar que la existencia de una zona accesible a factores nucleares en el extremo 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en tejidos en los que éste no es activo podría deberse a la existencia de un represor. Para que esto fuese posible, el hipotético represor debería ser más activo en hígado, donde no se observa mRNA de $\beta 2$, que en riñón, donde éste está presente en bajo nivel.

Una explicación alternativa viene de la constatación de que los sitios hipersensibles a DNasa I aparecen en ocasiones antes de que se inicie la transcripción activa de un gen (Burch y Weintraub, 1983). Esto suele ocurrir en genes que deben activarse rápidamente en respuesta a señales estimuladoras, como el gen de *c-fos* (Herrera y cols, 1997). En el caso de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa no se ha encontrado hasta ahora ningún estímulo que active la transcripción de esa forma, por lo que no parece probable que el mantenimiento de una estructura de la cromatina transcripcionalmente competente sea la explicación de la presencia de la región de hipersensibilidad a DNasa I en tejidos que no expresan el gen.

Finalmente se puede explicar la presencia de la zona hipersensible en hígado y riñón debido al islote CpG que el gen de la subunidad $\beta 2$ posee en su región 5' (ver más adelante en el apartado *De la metilación*).

Otra característica que diferencia la zona hipersensible a DNasa I en cerebelo de la de hígado es la presencia de una zona interna resistente a la acción de la nucleasa. Mediante el análisis de alta resolución se pudo determinar que esta zona coincide aproximadamente con el inicio de transcripción y su zona inmediatamente a 5', que incluye la caja TATA. Existen otros casos en los que se ha detectado una región resistente de características similares. De hecho, a partir de estos datos se obtuvo la primera prueba de la unión *in situ* de proteínas a la caja TATA, en concreto a la del gen *hsp70* (Wu, 1984).

En este estudio también se analizó la hipersensibilidad a nucleasa S1, cuya acción es más específica que la de DNasa I, cortando preferencialmente en zonas de DNA monocatenario o que no tienen conformación en B-DNA (Gross y Garrard, 1988). Existen numerosos estudios en los que se caracterizan zonas hipersensibles a la nucleasa S1 en distintos genes y organismos, aunque hasta ahora no se han podido elucidar con precisión ni las moléculas ni los mecanismos que generan la hipersensibilidad a esta enzima en los cromosomas (Michelotti y cols, 1996). La asociación de zonas hipersensibles a DNasa I y a nucleasa S1 parece ser muy habitual, habiéndose descrito en numerosos estudios (Brito y cols, 1993). En el caso de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa de rata, S1 cortó preferencialmente dos zonas, tanto en cerebelo como en hígado. Una de ellas abarca la región previamente caracterizada como hipersensible a DNasa I, siendo más amplia en su extremo 5' en el caso del cerebelo. La segunda no aparece con DNasa I y se encuentra a unas 7 Kpb del inicio de transcripción.

Durante el tratamiento con nucleasa S1 los núcleos se exponen a un pH ácido (concretamente pH 4,5). Bajo estas condiciones las secuencias de DNA compuestas por repeticiones homopurina/homopirimidina con simetría "en espejo" son capaces de adoptar una estructura en triple hélice denominada forma H del DNA (Lyamichev y cols, 1986). Esta estructura se forma cuando una zona homopurina/homopirimidina, que se mantiene unida en forma de *duplex* mediante enlaces de Watson-Crick, interacciona con la hebras de pirimidinas de la secuencia simétrica mediante enlaces de Hoogsteen, dejando a la hebra de purinas en forma de DNA monocatenario, de forma que es sensible a la acción de la nucleasa S1. La tendencia a formar esta estructura se ve potenciada con la longitud de la secuencia repetitiva, el superenrollamiento negativo y los pHs bajos.

Existe evidencia de que las zonas repetitivas ricas en secuencias homopurina/homopirimidina pueden funcionar como secuencias reguladoras de la transcripción mediante la unión de proteínas específicas (por ejemplo

en el promotor de *Ultrabithorax*, en *Drosophila*; Biggin y Tjian, 1988). Además se localizan frecuentemente en la región 5' de los genes eucariotas, como por ejemplo en el de la isoforma $\alpha 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa (Potaman y cols, 1996).

La zona RHN1 es hipersensible tanto a DNasa I como a nucleasa S1, por lo que puede descartarse que el origen de este efecto se deba solamente a la exposición de los núcleos a pH ácido. El análisis de la secuencia del gen de la subunidad $\beta 2$ en esta zona muestra al menos tres secuencias repetitivas homopurina/homopirimidina, siendo la mayor de ella de 32 nucleótidos, aunque con alguna interrupción (figura 41). Ninguna de ella posee simetría aparente, pero al estar situadas en la región inmediatamente a 5' de la zona hipersensible a DNasa I, podrían ser las responsables de esta ampliación de la zona hipersensible cuando se utiliza nucleasa S1. El hecho de que esta zona sea hipersensible en cerebelo y no en hígado hace pensar que podría tener algún significado funcional.

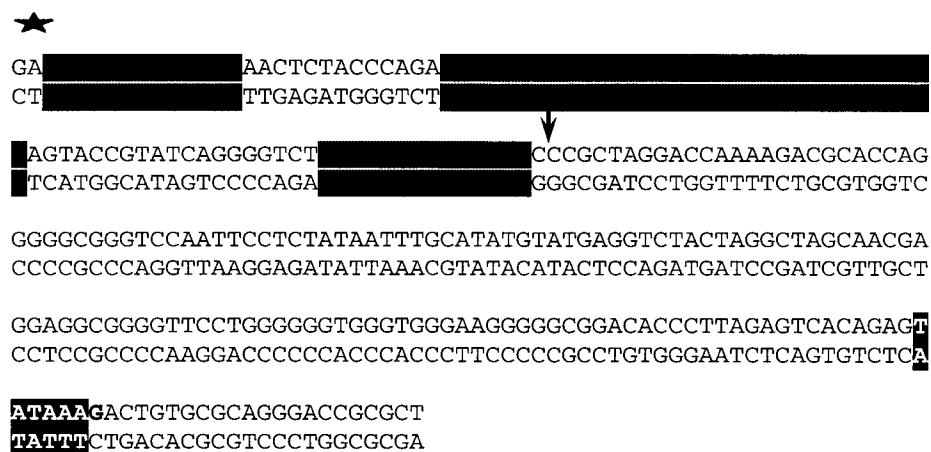


Figura 41. **Presencia de secuencias repetitivas homopurina / homopirimidina en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.** En negro se señala la caja TATA. La flecha señala el inicio aproximado de la región hipersensible a DNasa I. La estrella, el inicio de la región hipersensible a nucleasa S1. En azul, secuencias repetitivas homopurina / homopirimidina.

La segunda zona hipersensible a S1 (RHN2) podría deberse a un artefacto, ya que no es degradada preferentemente por DNasa I. La secuencia de la zona dónde aparece la segunda región de hipersensibilidad no ha sido determinada, por lo que no se puede afirmar que la presencia de una zona homopurina/homopirimidina sea la razón de su aparición.

Por último, y al igual que en el caso de la DNasa I, al tratar con nucleasa S1 núcleos de cerebelo de rata se observa una zona resistente en el interior de la región hipersensible RHN1, ausente en hígado. Este dato aporta una prueba más respecto a la ocupación de la caja TATA del gen de la subunidad $\beta 2$ por factores proteicos en cerebelo pero no en hígado.

De la sensibilidad a nucleasa micrococcal

La utilización de distintas sondas en los *Southern blots* permitió poner de manifiesto las diferencias en cuanto a presencia de nucleosomas entre las distintas regiones del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa y entre tejidos que expresan o no esta proteína. La sonda correspondiente a la secuencia codificante del gen reveló la presencia de nucleosomas con distribución regular tanto en cerebelo como en hígado, lo que ha sido descrito anteriormente en numerosos estudios (por ejemplo, Shimada y cols, 1985). En el cerebelo la escalera de fragmentos de DNA da una señal muy débil, con los fragmentos más difusos que en hígado. Este efecto concuerda con los cambios que induce en los nucleosomas la RNA pol II a lo largo de la transcripción (Wu y cols, 1979).

Al utilizar una sonda solapante con la región hipersensible a nucleasas las diferencias entre hígado y cerebelo se hacen mucho más evidentes. En el hígado continúan existiendo nucleosomas con una distribución regular, aunque las distintas intensidades de los fragmentos dan idea de cierta distorsión en la estructura, que se ve reflejada en la hipersensibilidad a nucleasas. En el cerebelo la presencia de nucleosomas

es menos evidente y su distribución es irregular. En ambos casos la presencia de un islote CpG cercano y por tanto la probable existencia de histonas acetiladas (Razin, 1998) debe contribuir a la desestructuración del patrón regular. Esta distorsión es mayor en cerebelo, correlacionándose con el estado transcripcionalmente activo del gen.

El efecto se hace notar incluso cuando se utiliza una sonda situada inmediatamente a la región de hipersensibilidad a nucleasas en dirección 5'. Una situación muy similar ha sido descrita por Herrera y cols. (1997) en el promotor del gen de *c-fos*. Sólo en los fragmentos mayores del patrón en escalera (por tanto los que contienen secuencias más alejadas de la sonda) se recupera una disposición normal de nucleosomas, evidente tanto en hígado como en cerebelo.

Mediante la técnica del marcaje terminal indirecto (Wu, 1980; Thoma, 1996) se pudo determinar la posición de los nucleosomas en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ en cerebelo. El sitio preferencial de corte de nucleasa micrococcal situado a -170 respecto al inicio de transcripción coincide exactamente con el final de la región hipersensible a DNasa I. Esto implicaría la presencia de un nucleosoma situado en fase que determinaría la extensión de la región hipersensible en dirección a 5'. Sin embargo hay que tener en cuenta que en esa zona también se sitúa una zona preferencial de corte de la nucleasa S1. La nucleasa micrococcal es capaz de cortar en regiones de DNA monocatenario, de forma similar a nucleasa S1 (Dingwall y cols, 1981). Este hecho impide esclarecer si realmente existe un nucleosoma en fase en esa región, aunque resalta la importancia de esta secuencia en la determinación de la región hipersensible a DNasa I y, posiblemente, en la regulación de la transcripción del gen. El resto de las 600 pb analizadas hacia 5' de esta región no muestran sitios de corte preferencial para la nucleasa micrococcal, lo que implica que o bien no hay nucleosomas o bien estos no están situados en fase respecto a la secuencia.

En dirección a 3' se encuentra una zona resistente a nucleasa micrococcal coincidente con la caja TATA. Serían las proteínas unidas a esta secuencia y a las adyacentes, y no un nucleosoma, las que protegerían al DNA de la degradación por nucleasa micrococcal. Una situación similar se da en el promotor del gen de la dihidrofolato reductasa humana (Shimada y cols, 1985).

A partir de este punto aparecen una serie de bandas dispuestas regularmente pero de muy poca intensidad. Esto corresponde a la presencia de nucleosomas en la región codificante. La señal difusa se podría deber tanto al efecto ya citado de la RNA pol II como a la baja tasa de actividad que posee la nucleasa micrococcal en secuencias ricas en G-C (Dingwall y cols, 1981), ya que esta zona coincide con la situación del islote CpG, enriquecido en estos dos nucleótidos.

De la metilación

La presencia de un islote CpG en la zona 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ y la ausencia de metilación en esta región de forma constitutiva pudo comprobarse en todos los tejidos y líneas celulares estudiados, salvo en las células NRK, que presentan un patrón de metilación anormal. Se ha demostrado que el factor de transcripción Sp1 es crítico para el mantenimiento de los islotes CpG libres de metilación (Brandeis y cols, 1994). En el caso de la subunidad $\beta 2$ existen hasta siete secuencias de unión a Sp1 en la zona del islote CpG, además de las dos existentes en el promotor del gen. Se ha visto que este tipo de agrupación es importante para mantener el islote libre de metilación y que normalmente se asocia a regiones con secuencias repetitivas tipo SINEs (*Alu* en humanos), que normalmente están densamente metiladas (Graff y cols, 1997). El gen de la subunidad $\beta 2$ tiene secuencias repetitivas de este tipo conservadas entre especies, aunque su metilación no pudo ser caracterizada por carecer de dianas para las enzimas de restricción utilizadas. Teniendo en cuenta estos

datos se puede proponer que Sp1 tendría un doble papel en el promotor de $\beta 2$, tanto como activador de la transcripción (Kawakami y cols, 1992) como para mantener el islote CpG libre de metilación.

El islote CpG en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ tiene como consecuencia adicional una posible desrepresión constitutiva, ya que en ausencia de grupos metilo no se une la proteína MeCP2, que induce la desacetilación de histonas (y por tanto una estructura de la cromatina que reprime la transcripción) a través del complejo con la proteína mSin3A (Razin, 1998). En general todos los genes constitutivos poseen un islote CpG en su promotor (Bird, 1986). También existen ejemplos de genes específicos de tejido con islotes CpG asociados, siendo uno de ellos la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa. La presencia de estos islotes constituye una posible explicación al hecho de que algunas proteínas con expresión específica de tejido presentan además niveles bajos de su mRNA en muchos tejidos que no expresan la proteína. Un ejemplo de este último caso es una glicoproteína que se expresa en elevados niveles en el sistema nervioso del hombre y del ratón (aunque su mRNA se encuentra en muchos otros tejidos) y que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, Thy-1. El gen *thy-1* tiene un islote CpG de 1.6 Kb que comienza 600 bp antes del inicio de transcripción (Kolsto y cols, 1986). Cuando esta proteína se expresa en una línea celular neuronal, el crecimiento de las neuritas de estas células sobre un lecho de astrocitos se inhibe, aunque esto no ocurre si la superficie de células es de otro tipo, como células de Schwann o glía embrionaria. El efecto se revierte con Thy-1 soluble, que debe saturar el receptor (Tiveron y cols, 1992). La expresión del gen *thy-1* tiene como requisito necesario pero no suficiente la existencia de la zona libre de metilación en su región 5'. Es posible que esta sea la misma situación que la del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.

En los genomas de organismos que presentan la base modificada 5mC existe una correlación positiva entre la hipometilación de secuencias CpG en zonas próximas a promotores, la presencia de sitios hipersensibles

a nucleasas y la transcripción del gen. Al parecer la demetilación del dinucleótido CpG es necesaria pero no suficiente para el establecimiento de zonas de hipersensibilidad a nucleasas, mientras que la metilación suprime la formación de estas zonas. Este efecto se puede producir a través de multitud de mecanismos, como la unión de proteínas como la MeCP2 (con la consiguiente desacetilación de las histonas H3 y H4; Razin, 1998) o la histona H1. Esta última proteína produce una expansión de la condensación del genoma de forma cooperativa. También puede ocurrir un cambio en el posicionamiento de los nucleosomas o una alteración en la afinidad de unión de factores que actúan en *trans* (Gross y Garrard, 1988).

De la presencia de secuencias repetitivas tipo SINEs

Los genes de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en rata y en ratón poseen varias secuencias de la familia SINE situadas en posiciones conservadas. Se ha demostrado que las secuencias *Alu*, pertenecientes a la familia SINE, son capaces de actuar en algunos casos como reguladores de la transcripción, tanto uniendo factores de transcripción específicos como dando lugar a estructuras tipo cruciforme (para una revisión de *Alu* como secuencias funcionales, ver Szmulewicz y cols, 1998). Sin embargo en el caso concreto del gen de la subunidad $\beta 2$ en rata estas secuencias están situadas muy lejos de la zona hipersensible a nucleasas y por tanto no es probable que tengan un significado funcional como el propuesto. Las secuencias tipo *Alu* también son una fuente de variabilidad debido a que ejercen como mutágenos al insertarse en distintas zonas del genoma (Szmulewicz y cols, 1998). Se podría especular que la presencia de este tipo de secuencias en la región 5' de los genes de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en distintos animales podría haber tenido algún papel en la evolución de la especificidad de expresión de esta proteína, aunque no existen datos que sostengan esta hipótesis.

De la resistencia a Bal 31

Los experimentos de resistencia a Bal 31 determinan la existencia de uno o varios factores fuertemente unidos a la región promotora del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en cerebelo de rata. Esta región coincide con la zona hipersensible a DNasa I en el mismo tejido, aunque comienza más cerca del inicio de transcripción. En esta región se sitúan las secuencias consenso de unión a Sp1, cuya capacidad de unión a esta proteína ya ha sido demostrada (Kawakami y cols, 1993). Esto no descarta la presencia de factores adicionales y del complejo basal de transcripción, cuya presencia sugieren los resultados de hipersensibilidad a DNasa I y nucleasa S1.

La región denominada RHN2, en la que corta de forma preferencial la nucleasa S1 pero no DNasa I, no presenta ninguna barrera al avance de Bal 31, por lo que podría tratarse de un artefacto, como ya se ha discutido anteriormente.

Los elevados niveles de nucleasas endógenas y la escasa actividad de Bal 31 en las preparaciones de hígado de rata impidieron el estudio de este tejido mediante la técnica de resistencia a exonucleasas. Por motivos similares no se pudo utilizar en ningún tejido enzimas de restricción, que son de gran utilidad en este tipo de estudio, ya que permiten abrir el DNA la acción de las exonucleasas en zonas concretas (Wu, 1984; 1989).

De los experimentos de retardo en gel

La utilización de la técnica de retardo en gel ha permitido la identificación preliminar de complejos de unión proteína-DNA específicos de distintas zonas de la región promotora del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en rata. Los retardos detectados con las sondas número 2 y número 3 son producidos de manera similar tanto por factores nucleares de cerebelo como de hígado, con variaciones cuantitativas únicamente. Estas

diferencias, que reflejan la abundancia de las proteínas formadoras del complejo en los núcleos de cada tejido, podrían regular el gen cambiando la efectividad de su transcripción, pero no parecen explicar la expresión con especificidad de tejido. La sonda número 2 incluye las dos secuencias de unión a Sp1 que se han caracterizado en el promotor de la subunidad $\beta 2$ de rata (Kawakami y cols., 1992; 1993), por lo que se podría pensar que es esta proteína la causante del retardo. Se ha descrito que Sp1 tiene niveles de expresión distintos según el tejido estudiado (Marín y cols, 1997), lo que sería coherente con los resultados obtenidos. Por otra parte, esta proteína produce varios complejos retardados a la vez (Kawakami y cols, 1993), lo que también concuerda con los resultados de este trabajo. En cualquier caso, estos resultados no permiten afirmar que de hecho sea Sp1 el causante de los retardos detectados con la sonda número 2.

Las condiciones en las que se realizan reacciones de unión DNA-proteína afectan a la formación de los complejos (Carey, 1988), por lo que no se puede descartar que existan proteínas que interaccionan *in vivo* de forma diferencial con las regiones de DNA estudiadas, pero que no son capaces de hacerlo con las condiciones utilizadas en los experimentos *in vitro*.

Sin embargo, la sonda número 1 sí presenta retardos específicos de tejido, por lo que esta zona podría contener secuencias consenso para la unión de proteínas implicadas en la regulación diferencial de la expresión del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa. La utilización del programa "MatInspector" para la detección de secuencias consenso de factores conocidos no muestra ningún positivo claro en los nucleótidos conservados entre rata, ratón y humanos. Estas secuencias conservadas se encuentran aproximadamente en las primeras 450 pb en dirección 5' desde el inicio de transcripción (ver comparación en el *apéndice 2*), mientras que al analizar fragmentos más distales en dirección 5' esta homología se pierde. De las zonas conservadas resulta especialmente interesante una cuya secuencia no es reconocida por ningún programa de comparación con bases de datos

de secuencias consenso de unión de factores de transcripción (*apéndice 2*). Sin embargo, su estructura palindrómica es característica de sitios de fijación de factores de transcripción y por tanto podría ser la responsable de alguno de los retardos observados con la sonda número 1, aunque este hecho no ha sido comprobado experimentalmente.

De los experimentos de *Southwestern blotting*

A pesar de la aparición de múltiples bandas, correspondientes a proteínas que unen la sonda de DNA, el número de positivos específicos de cerebelo o de hígado es muy bajo. Tanto en la sonda número 2 como en la número 1 son más abundantes en los factores nucleares de hígado las proteínas que unen DNA de forma diferencial, lo que podría apuntar a la existencia de represores que actuarían sobre el promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa.

Existe una cierta cantidad de bandas comunes a todas las sondas utilizadas, y que por tanto se interpretan como uniones inespecíficas de proteínas al DNA. Otras bandas aparecen sólo con una de las sondas pero tanto en cerebelo como en hígado y por tanto no parecen corresponder a candidatos a la regulación específica del gen de la subunidad $\beta 2$, aunque las intensidades de la señal, y por tanto la cantidad de proteína, sean diferentes.

Hay que destacar que la sonda control correspondiente a parte de la zona codificante del gen de la β -actina de rata resulta en patrones casi idénticos en cerebelo y en hígado, en contraste con la mayor especificidad de unión que muestran las sondas correspondientes al promotor del gen de la subunidad $\beta 2$.

El principal inconveniente de esta técnica es la imposibilidad de predecir si los factores de transcripción de interés son capaces de renaturalizar bajo las condiciones experimentales empleadas. Además cabe la posibilidad de que actúen en forma de heterodímeros, impidiendo por

tanto la unión a DNA al separarlos en un gel desnaturalizante. Sin embargo se ha descrito un alto número de factores que renaturalizan de manera efectiva en estas condiciones (Antalis y cols, 1993; Lelong, 1993; y referencias incluidas en estos artículos).

De los resultados tomados en su conjunto

La distribución de la isoforma $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa presenta un patrón muy complejo de expresión, que alcanza su máximo nivel en el SNC. Desde su caracterización inicial (Martín-Vasallo y cols, 1989), esta proteína se ha presentado como específica de células de la glía o de neuronas. El estudio riguroso de sus patrones de expresión demuestra que no es específica de ningún tipo celular determinado, variando según la zona del SNC estudiada (Lecuona y cols, 1996; Peng y cols, 1997). La complejidad de este patrón de expresión aumenta si se tiene en cuenta que la isoforma $\beta 2$ está presente en otros tejidos (Lavoie y cols, 1996), y en algunos de ellos sólo en una etapa específica del desarrollo (Burrow y cols, *en prensa*). Estos datos hacen pensar que probablemente no exista una secuencia de regulación común para todos los tipos celulares en los que se expresa, sino más bien que actúan distintos mecanismos dependiendo del tejido concreto. El cerebelo, modelo de estudio en este trabajo, es probablemente dónde la subunidad $\beta 2$ se expresa de manera más homogénea, lo que facilita la interpretación de los resultados.

La compleja y a la vez estricta regulación a que se ve sometida la expresión de la proteína $\beta 2$ contrasta con los datos publicados recientemente acerca de la caracterización del ratón *knock-in* $\beta 2/\beta 1$ (Weber y cols, 1998). De este trabajo se deduce que la isoforma $\beta 2$ puede ser reemplazada por $\beta 1$ con escasas consecuencias fenotípicas en cuanto a la arquitectura del SNC y a la supervivencia de los animales, lo que cuestiona la necesidad de una expresión altamente regulada de $\beta 2$. La existencia de

isoenzimas de Na^+, K^+ -ATPasa y la consiguiente especialización en el manejo de Na^+ y K^+ , debe tener consecuencias fenotípicas sutiles, pero no por ello menos importantes, y que deben ser la causa de que se haya seleccionado esta compleja organización del sistema de transporte Na^+, K^+ -ATPasa, del que la subunidad $\beta 2$ forma parte.

Los datos obtenidos a lo largo de este trabajo permiten situar el estudio de la regulación de la expresión del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en un contexto más cercano al fisiológico, en el que se pueden integrar resultados que provengan de sistemas *in vitro*, que tomados de manera aislada difícilmente pueden explicar el complejo patrón de expresión de este gen.

Se ha delimitado mediante distintas técnicas y con resultados coherentes entre sí la región que probablemente controla la transcripción regulada del gen de la subunidad $\beta 2$. De la misma manera, se han caracterizado diferencias estructurales entre el gen en estado activo e inactivo, correlacionándolas con las particularidades que presenta la secuencia del DNA de esta región del gen de la subunidad $\beta 2$. La estructura parcialmente distorsionada de los nucleosomas en la zona que abarca el inicio de transcripción en el hígado se puede explicar debido a la presencia de un islote CpG y el consiguiente mantenimiento de la acetilación de las histonas. La diferente estructura que muestra el promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ en cerebelo en esa misma región hace pensar en la existencia de un mecanismo de remodelación de la cromatina que acompañaría la activación transcripcional de este gen. En este sentido resulta de especial interés la repetición homopurina / homopirimidina en el extremo 5' de la zona hipersensible a DNasa I en cerebelo que, según pone de manifiesto la nucleasa S1, adopta una estructura distinta en cerebelo que en hígado.

Según se ha podido comprobar, existen distintos factores proteicos, aún sin caracterizar detalladamente, que se unen de forma específica de tejido al promotor del gen de la subunidad $\beta 2$. Con las técnicas utilizadas no

es posible distinguir si estos factores están implicados en la remodelación o por el contrario su unión se vería facilitada por este proceso, actuando entonces como activadores o represores transcripcionales.

Perspectivas futuras

Basándome en los resultados obtenidos en este trabajo y como continuación del estudio de los elementos que dirigen la regulación específica de tejido y durante el desarrollo del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa, me gustaría comentar algunas líneas sobre las que podría basarse el desarrollo futuro de este proyecto.

Para la caracterización de los factores de transcripción implicados en la regulación del gen, sería ideal la aplicación de la técnica *de footprinting in vivo*. Como se describe en el apartado de *Introducción*, esta técnica permite identificar con resolución de un nucleótido las zonas de unión de proteínas a DNA. La determinación de las zonas de importancia en la regulación mediante los experimentos de hipersensibilidad a nucleasas permite acotar la zona analizada mediante *footprinting in vivo*. Además se podría comparar la unión de proteínas al promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ en cerebelo y en hígado, obteniendo de esta manera datos acerca de las secuencias implicadas en la regulación específica de tejido. La identificación de estas secuencias facilitaría enormemente la caracterización y el aislamiento de los factores de transcripción implicados. Además de la comparación con los bancos de datos de secuencias consenso de unión de proteínas a DNA, se podría realizar experimentos de retardo en gel con pequeños oligonucleótidos, que dan lugar a uniones más específicas.

Para la investigación de la relación entre los patrones de metilación de la región 5' del gen y su transcripción y la influencia que ejerce esta modificación del DNA sobre la estructura de la cromatina en el promotor se tratarían las líneas celulares utilizadas en este estudio con un análogo de

citocina, 5-azadeoxicitidina, que tiene como efecto demetilar *in vivo* el DNA genómico de las células (Litt y cols, 1997).

Este estudio se ha centrado en la regulación de la transcripción del gen. Sin embargo sería deseable comprobar si en la regulación de la expresión de la proteína $\beta 2$ están implicada la estabilidad del mRNA o efectos post-traduccionales.

Resultaría también de gran utilidad extender los experimentos sobre la estructura de la cromatina de este gen al ratón, como primer paso para comprobar la conservación de elementos reguladores sugerida por la similitud de las secuencias del promotor en ambas especies. La utilización de este modelo da pie al empleo de cepas transgénicas para el análisis de la regulación del gen de la subunidad $\beta 2$ (MacDonald y Swift, 1998). Por otra parte, se ha descrito la generación de un ratón *knock-out* para Sp1 (Marín y cols, 1997), que podría resultar de gran utilidad para la caracterización del papel de este factor de transcripción en la regulación de la expresión de la isoforma $\beta 2$.

Una dificultad en el estudio de la regulación de la expresión del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa es la carencia de un sistema en el que se induzca o se reprima este gen en respuesta a un estímulo conocido. Como ya se ha descrito anteriormente, la subunidad $\beta 2$ se expresa durante el desarrollo renal de la rata, siendo reprimido el gen al llegar a la fase adulta. La caracterización de los cambios estructurales del promotor del gen de la subunidad $\beta 2$ durante este proceso podría resultar interesante para una mayor comprensión de los mecanismos de regulación del mismo, en los que forzosamente están implicados procesos de remodelación de la cromatina.

Conclusiones

- 1) La caracterización estructural de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa de rata mediante DNasa I demuestra la existencia de una zona altamente accesible situada en torno al inicio de transcripción. La amplitud de dicha zona es mayor en tejidos como el cerebelo, que expresan altos niveles de la subunidad $\beta 2$, que en tejidos que no la expresan o la presentan en muy baja cantidad, como el hígado o el riñón. La nucleasa S1 produce un patrón de hipersensibilidad similar, indicando la presencia de DNA en forma monocatenaria o, al menos, no-B. La presencia de esta estructura puede explicarse, al menos en regiones determinadas, por las características particulares de la secuencia de DNA.
- 2) La distribución de nucleosomas en la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa de rata se correlaciona con el estado de activación del mismo. El hígado presenta nucleosomas regularmente dispuestos, mientras que en cerebelo se encuentran con espaciamiento irregular pero en una posición definida con respecto a la secuencia y relacionada con los patrones de hipersensibilidad a DNasa I y nucleasa S1.
- 3) El gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa posee un islote CpG en su zona 5' conservado entre especies. La ausencia de metilación en los residuos de citosina en el gen de la rata se extiende fuera del islote CpG hacia zonas cercanas en situación 5'.
- 4) En cerebelo, se encuentran barreras de resistencia a la progresión de la exonucleasa Bal 31 coincidentes con la zona hipersensible a las endonucleasas DNasa I y S1. Esto es indicativo de la presencia de factores fuertemente unidos al DNA en esta región. La fijación de proteínas nucleares a la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ es diferencial en cerebelo y en hígado de rata, como se ha demostrado mediante dos técnicas diferentes: experimentos de retardo en gel y *Southwestern blot*.

- 5) La regulación de la expresión específica de tejido de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa se ajusta al siguiente modelo: la ausencia constitutiva de metilación en la zona próxima al inicio de transcripción facilita una estructura de la cromatina parcialmente desorganizada debido a la acetilación de las histonas, lo que explicaría que algunos tejidos tengan muy bajos niveles de mRNA de $\beta 2$. Sin embargo, en cerebelo tiene que actuar algún mecanismo adicional de remodelación, cuya acción podría inducirse por alguno de los factores proteico que se ha detectado que se unen de manera específica a esta zona del gen. De esta forma toda la región promotora quedaría accesible a factores de transcripción como Sp1, necesarios para la expresión de altos niveles del mRNA de la subunidad $\beta 2$.

Bibliografia

- Andrews, N.C. y Faller, D.V.** (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA binding proteins from limiting number of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19, 2499.
- Antalis, T.M., Godbolt, D., Donnan, K.D. y Stringer, B.** (1993) Southwestern blot mapping of potential regulatory proteins binding to the DNA encoding plasminogen activator inhibitor type 2. *Gene* 134, 201-208.
- Antequera, F., Boyes, J. y Bird, A.** (1990) High levels of *de novo* methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503-514.
- Antonicek, A., Persohn, E. y Schachner, M.** (1987) Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *J. Cell Biol.* 104, 1587-1595.
- Armstrong, J.A., Bieker, J.J. y Emerson, B.M.** (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF *in vitro*. *Cell* 95, 93-194.
- Arystarkhova, E. y Sweadner K.J.** (1997) Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta 3 subunit -The presence of beta 3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 22405-22408.
- Attali, B., Latter, H., Rachamim, N. y Garty, H.** (1995) A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K⁺ channel activity in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6092-6096.
- Ávila, J., Álvarez de la Rosa, D., González-Martínez, L.M., Lecuona, E. y Martín-Vasallo, P.** (1998) Structure and expression of the human Na,K-ATPase β 2-subunit gene. *Gene* 208, 221-227.

- Axelsen, K.B. y Palmgren, M.G.** (1998) Evolution and substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Molec. Evol.* 46, 84-101.
- Babiss, L.E., Bennett, A., Friedman, J.M. y Darnell, Jr., J.E.** (1986) DNase I-hypersensitive sites in the 5'-flanking region of the rat serum albumin gene: correlation between chromatin structure and transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6504-6508.
- Barberis, A.J., Pearberg, J., Simkovich, N., Farrell, S., Reinagel, P., Bamdad, C., Sigal, G. y Ptashne, M.** (1995) Contact with a component of the RNA polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell* 81, 359-368.
- Beato, M. y Einfeld, K.** (1997) Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 25, 3559-3563.
- Beesley, P.W., Paladino, T., Gravel, C., Hawkes, R.A. y Gurd, J.W.** (1987) Characterization of gp50, a major glycoprotein present in rat brain synaptic membranes, with a monoclonal antibody. *Brain Res.* 408, 65-78.
- Beggah, A., Mathews, P., Béguin, P. y Geering, K.** (1996) Degradation and endoplasmic reticulum retention of unassembled α - and β -subunits of Na,K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J. Biol. Chem.* 271, 20895-20902.
- Beggah, A.T., Jaunin, P. y Geering, K.** (1997) Role of glycosilation and disulfide bond formation in the β subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 10318-10326.
- Béguin, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, A., Claeys, D., Horisberger, J.-D. y Geering, K.** (1997) The γ subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16, 4250-4260.

- Bellard, M., Dretzen, G., Giangrande, A. y Romain, P.** (1989) Nuclease digestion of transcriptionally active chromatin. En: *Methods in Enzymology* (Wassarman, P.M., y Kornberg, R.D., eds.) Academic Press, New York, vol. 170, pp. 317-346.
- Biggin, M.D. y Tjian, R.** (1988) Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* 53, 699-711.
- Bird, A.P.** (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.
- Bird, A.P.** (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell* 70, 5-8.
- Bird, A.P.** (1994) DNA methylation. En: *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Kendrew, J., ed.), Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 275-277.
- Blanco, G., Koster, J.C. y Mercer, R.W.** (1994) The α subunit of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8542-8546.
- Blanco, G., Koster, J.C., Sánchez, G. y Mercer, R.W.** (1995a) Kinetic properties of the alpha 2 beta 1 and alpha 2 beta 2 isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 34, 319-325.
- Blanco, G., Sánchez, G. y Mercer, R.W.** (1995b) Comparison of the enzymatic properties of the Na,K-ATPase alpha 3 beta 1 and alpha 3 beta 2 isozymes. *Biochemistry* 34, 9897-9903.
- Blanco, G. y Mercer, R.W.** (1997) Regulation of the $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ isozymes of the Na,K-ATPase by Ca^{2+} , PKA, and PKC. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 572-575.

- Blostein, R., Wilczynska, A., Karlsh, S.J.D., Argüello, J.M. y Lingrel, J.B.** (1997) Evidence that Ser⁷⁷⁵ in the α subunit of the Na^+, K^+ -ATPase is a residue in the cation binding pocket. *J. Biol. Chem.* 272, 24987-24993.
- Bou-Gharios, G., Garrett, L.A., Rossert, J., Niederreither, K., Eberspaecher, H., Smith, C., Black, C. y de Crombrughe, B.** (1996) A potent far-upstream enhancer in the mouse pro $\alpha 2(I)$ collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 134, 1333-1344.
- 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.* 7, 248-54.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. y Cedar, H.** (1994) Sp1 elements protect a CpG island from *de novo* methylation. *Nature* 371, 435-438.
- Brito, N., Gonzalez, C. y Marzluf, G.A.** (1993) Hypersensitive sites in the 5' promoter region of nit-3, a highly regulated structural gene of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 175, 6755-6759.
- Buratowski, S.** (1994) The basics of basal transcription by RNA polimerase II. *Cell* 77, 1-3.
- Burrow, C.R., Devuyst, O., Li, X., Gatti, L. y Wilson, P.D.** Expression of the $\beta 2$ subunit and apical localization of the Na^+, K^+ -ATPase in the metanephric kidney. *Am. J. Physiol.*, en prensa.
- Canessa, C.M., Horisberger, J.D. y Rossier, B.C.** (1993) Mutation of a tyrosine in the H3-H4 ectodomain of Na,K-ATPase alpha subunit confers ouabain resistance. *J. Biol. Chem.* 268, 17722-17726.
- Caplan, M.J.** (1997) Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am. J. Physiol.* 272, F425-F429.

- Carey, J.** (1988) Gel retardation at low pH resolves *trp* repressor-DNA complexes for quantitative study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 975-979.
- Carey, J.** (1991) Gel retardation. En : *Methods in Enzymology* (Sauer, R.T., ed.) Academic Press, New York, vol. 208, pp. 103-117.
- Codina, J., Kone, B.C., Delmas-Mata, J.T. y DuBose, Jr., T.D.** (1996) Functional expression of the colonic H⁺,K⁺-ATPase α -subunit - Pharmacological properties and assembly with X⁺,K⁺-ATPase β -subunits. *J. Biol. Chem.* 271, 29759-29763.
- Codina, J., Delmas-Mata, J.T. y DuBose, Jr., T.D.** (1998) The alpha-subunit of the colonic H⁺,K⁺-ATPase assembles with beta1-Na⁺,K⁺-ATPase in kidney and distal colon. *J. Biol. Chem.* 273, 7894-7899.
- Colonna, T.E., Huynh, L. y Fambrough, D.M.** (1997a) Subunit interactions in the Na,K-ATPase explored with the yeast two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 272, 12366-12372.
- Colonna, T.E., Kostich, M., Hamrick, M., Hwang, B., Rawn, J.D. y Fambrough, D.M.** (1997b) Subunit interactions in the sodium pump. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 498-513.
- Coppi, M.V. y Guidotti, G.** (1997) Intracellular localization of Na,K-ATPase α 2 subunit mutants. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 312-321.
- Cosgaya, J.M., Perona, R. y Aranda, A.** (1997) Retinoic acid induces secretion of transforming growth factors by PC12 pheochromocytoma cells. *Oncogene* 14, 579-587.
- Courtois-Coutry, N., Roush, D., Rajendran, V., McCarthy, J.B., Geibel, J., Kashgarian, M. y Caplan, M.** (1997) A tyrosine-based signal targets H/K-ATPase to a regulated compartment and is required for the cessation of gastric acid secretion. *Cell* 90, 501-510.

- Chang, M. y Jaehning, J.A.** (1997) A multiplicity of mediators: alternative forms of transcription complexes communicate with transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 25, 4861-4865.
- Chen, R.Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. y Jaenisch, R.** (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395, 89-93.
- Cheng, X.J., Hoog, J.O., Nairn, A.C., Greengard, P. y Aperia A** (1997) Regulation of rat Na^+ - K^+ -ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. *Am. J. Physiol.* 273, C1981-C1986.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- De Robertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K. y Spierer, P.** (1996) The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* 384, 589-591.
- Delgado, S., Gómez, M., Bird, A. y Antequera, F.** (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J.* 17, 2426-2435.
- Demczuk, S., Donovan, M., Franklin, G. y Ohlsson, R.** (1991) Order of probe and nuclear protein extract addition can determine specificity of protein-DNA complexes in tested mobility shift assays. *Nucleic Acids Res.* 19, 677-678.
- Dingwall, C., Lomonosoff, G.P. y Laskey, R.A.** (1981) High sequence specificity of micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res.* 9, 2659-2673.

- Dynan, W.S. y Tjian, R.** (1983) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32, 669-680.
- Emanuel, J.R., Garetz, S., Stone, L. y Levenson, R.** (1987) Differential expression of Na⁺,K⁺-ATPase α - and β -subunit mRNAs in rat tissues and cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9030-9034.
- Ewart, H.S. y Klip, A.** (1995) Hormonal regulation of the Na⁺,K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* 269, C295-C3111.
- Felsenfeld, G.** (1996) Chromatin unfolds. *Cell* 86, 13-19.
- Feschenko, M.S., Wetzel, R.K. y Sweadner, K.J.** (1997) Phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinases. Sites, susceptibility and consequences. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 479-488.
- Florkiewicz, R.Z., Anchin, J. y Baird, A.** (1998) The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 544-551.
- Forbush III, B., Kaplan, J.H. y Hoffman, J.F.** (1978) Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 17, 3667-3676.
- Forrester, W.C., Thompson, C., Elder, J.T. y Groudine, M.** (1986) A developmentally stable chromatin structure in the human β -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1359-1363.
- Frech, K., Quandt, K. y Werner, T.** (1997) Finding protein-binding sites in DNA sequences: the next generation. *TIBS* 22, 103-104.

- Gardiner-Garden, M. y Frommer, M.** (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261-282.
- Geering, K.** (1991) The functional role of the beta-subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett.* 285, 189-193.
- Geering, K., Beggah, A., Good, P., Girardet, S., Roy, S., Schaer, D. y Jaunin P.** (1996) Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH₂ terminus of the beta subunit with the alpha subunit. *J Cell Biol.* 133, 1193-1204.
- González-Martínez, L.M., Ávila, J., Martí, E., Lecuona, E. y Martín-Vasallo, P.** (1994) Expression of the β -subunit isoforms of the Na,K-ATPase in rat embryo tissues, inner ear and choroid plexus. *Biol. Cell* 81, 215-22.
- Goodrich, J.A., Cutler, G. y Tjian, R.** (1996) Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84, 825-830.
- Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K.J., Pagliusi, S., Frank, R. y Schachner, M.** (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell. Biol.* 110, 165-174.
- Graff, J.R., Herman, J.G., Myöhänen, S., Baylin, S.B. y Vertino, P.M.** (1997) Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicate both upstream and downstream regions in *de novo* methylation. *J. Biol. Chem.* 272, 22322-22329.
- Greenblatt, J.** (1997) RNA polimerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 310-319.
- Gross, D.S. y Garrard W.T.** (1988) Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 159-197.

- Herrera, R.E., Nordheim, A. y Stewart, A.F.** (1997) Chromatin structure analysis of the human *c-fos* promoter reveals a centrally positioned nucleosome. *Chromosoma* 106, 284-292.
- Hewish, D.R. y Burgoyne, L.A.** (1973) Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 504-510.
- Heyse, S., Wuddel, I., Apell, H.J. y Stürmer, W.** (1994) Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants. *J. Gen. Physiol.* 104, 197-240.
- Holstege, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Inh Lee, T., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. y Young, R.A.** (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.
- Hsieh, C.-L., Cheng-Deutchs, A., Gloor, S., Schachner, M. y Francke, U.** (1990) Assignment of Amog (Adhesion Molecule on Glia) gene to mouse chromosome 11 near Zfp-3 and Asgr-1,2 and to human chromosome 17. *Somat. Cell Molec. Gen.* 16, 401-405.
- Ikeda, K. y Kawakami, K.** (1996) *Cis*-elements involved in differential expression of Na⁺-K⁺-ATPase α 2 subunit gene in muscle differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1308, 67-73.
- Isenmann, S., Molthagen, M., Brandner, S., Bartsch, U., Kühne, G., Magyar, J.P., Sure, U., Schachner, M. y Aguzzi, A.** (1995) The AMOG/ β 2 subunit of Na,K-ATPase is not necessary for long-term survival of telencephalic grafts. *Glia* 15, 377-388.
- Jaisser, F., Canessa, C.M., Horisberger, J.-D. y Rossier, B.C.** (1992) Primary sequence and functional expression of a novel ouabain

resistant Na,K-ATPase -The β subunit modulates potassium activation of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 16895-16903.

Jewell, E.A. y Lingrel, J.B. (1991) Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2 and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 266, 16925-16930.

Jewell, E.A. y Lingrel, J.B. (1993) Chimeric rat Na,K-ATPase alpha1/alpha3 isoforms: analysis of the structural basis for differences in Na^+ requirements in the alpha 1 and alpha 3 isoforms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 671, 120-133.

Jones, D.H., Davies, T.C. y Kidder, G.M. (1997) Embryonic expression of the putative γ subunit of the sodium pump is required for acquisition of fluid transport capacity during mouse blastocyst development. *J. Cell Biol.* 139, 1545-1552.

Jordan, C., Püschel, B., Koob, R. y Drenckhahn, D. (1995) Identification of a binding motif for ankyrin on the α -subunit of Na^+, K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 270, 29971-29975.

Kadonaga, J.T. (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-313.

Karlish, S.J. (1997) Organization of the membrane domain of the Na/K-pump. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 30-44.

Kaufmann, J., Verrijzer, P., Shao, J. y Smale, S.T. (1996) CIF, an essential cofactor for TFIIID-dependent initiator function. *Genes Dev.* 10, 873-886.

- Kawakami, K., Okamoto, H., Yagawa, Y. y Nagano, K.** (1990) Regulation of Na⁺,K⁺-ATPases II. Cloning and analysis of the 5'-flanking region of the rat NKAB2 gene encoding the β 2 subunit. *Gene* 91, 271-274.
- Kawakami, K., Suzuki-Yagawa, Y., Watanabe, Y., y Nagano K.** (1992) Identification and characterization of the *cis*-elements regulating the rat AMOG (adhesion molecule on glia)/Na,K-ATPase β 2 subunit gene. *J. Biochem.* 111, 515-522.
- Kawakami, K., Watanabe, Y., Araki, M. y Nagano, K.** (1993) Sp1 binds to the adhesion molecule on glia regulatory element that functions as a positive transcription regulatory element in astrocytes. *J. Neurosc. Res.* 35, 138-146.
- Kim, J.W., Lee, Y., Lee, I.A., Kang, H.B., Choe, Y.K. y Choe, I.S.** (1997) Cloning and expression of human cDNA encoding Na,K-ATPase γ -subunit. *Biochem. Biophys. Acta* 1350, 133-135.
- Kolsto, A.B., Kollias, G., Giguere, V., Isobe, K.I., Prydz, H. y Grosveld, F.** (1986) The maintenance of methylation-free islands in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 14, 9667-9678.
- Kornberg, R.D. y Lorch, Y.** (1992) Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 563-87.
- Krause, H.M. y Gehring, W.J.** (1989) Stage-specific phosphorylation of the fushi tarazu protein during *Drosophila* development. *EMBO J.* 8, 1197-204.
- Kumari, M., Stroud, J.C., Anji, A. y McCarrey, J.R.** (1996) Differential appearance of DNase I-hypersensitive sites correlates with differential transcription of P_{gk} genes during spermatogenesis in the mouse. *J. Biol. Chem.* 271, 14390-14397.

- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lane, L.K., Shull, M.M., Whitmer, K.R. y Lingrel, J.B.** (1989) Characterization of two genes for the human Na, K -ATPase β subunit. *Genomics* 5, 445-453.
- Lavoie, L., Roy, D., Ramlal, T., Dombrowski, L., Martín-Vasallo, P., Marette, A., Carpentier, J.-L. y Klip, A.** (1996) Insulin-induced translocation of Na^+, K^+ -ATPase subunits to the plasma membrane is muscle fiber type specific. *Am. J. Physiol.* 270, C1421-C1429.
- Lavoie, L., Levenson, R., Martín-Vasallo, P. y Klip A.** (1997) The molar ratios of α and β subunits of the Na^+, K^+ -ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. *Biochemistry* 36, 7726-7732.
- Lecuona, E., Luquín, S., Ávila, J., García-Segura, L.M. y Martín-Vasallo, P.** (1996) Expression of the $\beta 1$ and $\beta 2$ (AMOG) subunits of the Na, K -ATPase in neural tissues: cellular and developmental distribution patterns. *Brain Res. Bull.* 40, 167-174.
- Lelong, J.-C.** (1993) Simultaneous characterization of DNA-binding proteins and their specific genomic DNA target sites. En: *Methods in Enzymology* (Wu, R., ed.) Academic Press, New York, vol. 218, pp. 609-618.
- Li, E., Bestor, T.H. y Jaenisch, R.** (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.
- Lipp, J. y Dobberstein, B.** (1986) Signal recognition particle-dependent membrane insertion of mouse invariant chain: a membrane-spanning

protein with a cytoplasmically exposed amino terminus. *J. Cell Biol.* 102, 2169-2175.

Litt, M.D., Hansen, R.S., Hornstra, I.K., Gartler, S.M. y Yang, T.P. (1997) 5-azadeoxycytidine-induced chromatin remodeling of the inactive X-linked HPRT gene promoter occurs prior to transcription factor binding and gene reactivation. *J. Biol. Chem.* 272, 14921-14926.

Luse, D.S. y Roeder, R.G. (1980) Accurate transcription initiation on a purified mouse beta-globin DNA fragment in a cell-free system. *Cell* 20, 691-699.

Lyamichev, V.I., Mirkin, S.M. y Frank-Kamenetskii, M.D. (1986) Structures of homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3, :667-669.

Magyar, J.P. y Schachner, M. (1990) Genomic structure of the adhesion molecule on glia (AMOG, Na/K-ATPase β 2 subunit. *Nucleic Acids Res.* 18, 6695-6696.

Magyar, J.P., Bartsch, U., Wang, Z.-Q., Howells, N., Aguzzi, A., Wagner, E.F. y Schachner, M. (1994) Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on glia, the β 2 subunit of murine Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Cell Biol.* 127, 835-845.

Malik, N., Canfield, V.A., Beckers, M.-C., Gros, P. y Levenson, R. (1996) Identification of the mammalian Na,K-ATPase β 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 22754-22758.

Malik, N., Canfield, V.A., Sanchez-Watts, G., Watts, A.G., Scherer, S., Beatty, B.G., Gros, P. y Levenson, R. (1998) Structural organization and chromosomal localization of the human Na,K-ATPase β 3 subunit gene and pseudogene. *Mammalian Genome* 9, 136-143.

- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. y Philipson, S. (1997)**
Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89, 619-628.
- Martín-Vasallo, P., Dackowski, W., Emanuel, J.R. y Levenson R. (1989)**
Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase β subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 264, 4613-4618.
- Maxam, A.M. y Gilbert, W. (1980)** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. En : *Methods in Enzymology* (Grossman, L. y Moldave, K., eds.) Academic Press, New York, vol. 65, pp. 499-563.
- McClelland, M., Nelson, M. y Raschke, E. (1994)** Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22, 3640-3659.
- MacDonald, R.J. y Swift, G.H. (1998)** Analysis of transcriptional regulatory regions *in vivo*. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 983-994.
- McKnight, S.L. y Kingsbury, R. (1982)** Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217, 316-324.
- Mercer, R.W., Schneider, J.W., Savitz, A., Emanuel, J.R., Benz, Jr., E.J. y Levenson, R. (1986)** Rat-brain Na,K-ATPase β -chain gene: primary structure, tissue-specific expression, and amplification in ouabain-resistant HeLa C+ cells. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3884-3889.
- Mercer, R.W., Biemesderfer, D., Bliss, Jr., D.P., Collins, J.H. y Forbush III, B. (1993)** Molecular cloning and immunological characterization of the γ polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 121, 579-586.

- Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D. y Levens, D.** (1996) Multiple single-stranded *cis* elements are associated with activated chromatin of the human *c-myc* gene in vivo. *Molec. Cell. Biol.* 16, 2656-2669.
- Minor, N.T., Sha, Q., Nichols, C.G. y Mercer R.W.** (1998) The gamma subunit of the Na,K-ATPase induces cation channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6521-6525.
- Molthagen, M., Schachner, M. y Bartsch, U.** (1996) Apoptotic cell death of photoreceptor cells in mice deficient for the adhesion molecule on glia (AMOG, the beta 2-subunit of the Na,K-ATPase). *J. Neurocytol.* 25, 243-255.
- Mueller, P.R., Garrity, P.A. y Wold, B.** Ligation-mediated PCR for genomic sequencing and footprinting. En: Current protocols in molecular biology (Ausubel, F.M. y otros, eds.). Greene and Wiley, 1992, suplemento 20, pp. 15.5.1-15.5.26.
- Müller-Husmann, G., Gloor, S. y Schachner, M.** (1993) Functional characterization of β isoforms of murine Na,K-ATPase. The adhesion molecule on glia (AMOG/ β 2), but not β 1, promotes neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 268, 26260-26267.
- Murakami, Y., Ikeda, U., Shimada, K. y Kawakami, K.** (1997) Promoter of the Na,K-ATPase α 3 subunit gene is composed of *cis* elements to which NF-Y and Sp1/Sp3 bind in rat cardiocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1352, 311-324.
- Nan, X., Campoy, F.J. y Bird, A.** (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-481.

- Navarre, C., Catty, P., Leterme, S., Dietrich, F. y Goffeau, A.** (1994) Two distinct genes encode small isoproteolipids affecting plasma membrane H(+)-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 21262-21268.
- Newman, P.R. y Shull, G.E.** (1991) Rat gastric H,K-ATPase β -subunit gene: intron/exon organization, identification of multiple transcription initiation sites, and analysis of the 5'-flanking region. *Genomics* 11, 252-262.
- Nomoto, M., Gonzalez, F.J., Mita, T., Inoue, N. y Kawamura, M.** (1995) Analysis of *cis*-acting regions upstream of the rat Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ subunit gene by in vivo footprinting. *Biochim. Biophys. Acta* 1264, 35-39.
- Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z. y Yaffe, D.** (1983) The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11, 1759-1771.
- Ogbourne, S. y Antalis, T.M.** (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* 331, 1-14.
- Olson, E.N.** (1990) Myo D family: a paradigm for development?. *Genes Dev.* 4, 1454-1461.
- Orlowski, J. y Lingrel, J.B.** (1988) Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit mRNAs. *J. Biol. Chem.* 263, 10436-10442.
- Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.-H., Luse, D.S. y Reinberg, D.** (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105-116.

- Paladino, T., Beesley, P.W. y Gurd, J.W.** (1989) Molecular characterization of GP50: a neuron-specific, synaptic-enriched glycoprotein. *J. Neurochem.* 53, 1902-1909.
- Palmgren, M.G. y Axelsen, K.B.** (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 37-45.
- Pazin, M.J. y Kadonaga, J.T.** (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89, 325-328.
- Peng, L., Martín-Vasallo, P. y Sweadner, K.J.** (1997) Isoforms of Na,K-ATPase α and β subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J. Neurosci.* 17, 3488-3502.
- Peterson, C.L. y Herskowitz, I.** (1992) Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573-583.
- Potaman, V.N., Ussery, D.W. y Sinden, R.R.** (1996) Formation of a combined H-DNA/open TATA box structure in the promoter of the human Na,K-ATPase $\alpha 2$ gene. *J. Biol. Chem.* 271, 13441-13447.
- Pugh, B.F. y Tjian, R.** (1991) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.
- Razin, A.** (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three-way connection. *EMBO J.* 17, 4905-4908.
- Reeves, A.S., Collins, J.H. y Schwartz, A.** (1980) Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1591-1598.
- Robidoux, S., Gosselin, P., Harvey, M., Leclerc, S. y Guerin, S.I.** (1992) Transcription of the mouse secretory protease inhibitor p12 gene is

- activated by developmentally regulated positive transcription factor Sp1. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3796-3806.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Scheiner-Bobis, G. y Farley, R.A.** (1994) Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1193, 226-234.
- Schneider, R., Wray, V., Nimtz, M., Lehmann, W.D., Kirch, U., Antolovic, R. y Schoner, W.** (1998) Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J. Biol. Chem.* 273, 784-792.
- Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J.H., Culp, W. y Brandt, B.L.** (1974) Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249, 224-227.
- Shainskaya, A. y Karlish, S.J.D.** (1996) Chymotryptic digestion of the cytoplasmic domain of the β subunit of Na/K-ATPase alters kinetics of occlusion of Rb^+ ions. *J. Biol. Chem.* 271, 10309-10316.
- Shamraj, O.I. y Lingrel, J.B.** (1994) A putative Na^+, K^+ -ATPase α -subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12952-12956.
- Shimada, T., Inokuchi, K. y Nienhuis, A.W.** (1985) Chromatin structure of the human dihydrofolate reductase gene promoter -Multiple protein-binding sites. *J. Biol. Chem.* 261, 1445-1452.

- Shull, G.E., Greeb, J. y Lingrel, J.B.** (1986) Molecular cloning of three distinct forms of the Na,K-ATPase α -subunit from rat brain. *Biochemistry* 25, 8125-8132.
- Shyjan, A.W., Canfield, V.A. y Levenson, R.** (1991) Evolution of the Na,K- and H,K-ATPase β subunit gene family: structure of the murine Na,K-ATPase β 2 subunit gene. *Genomics* 11, 435-442.
- Smit, A.F.A.** (1996) Origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 6, 743-749.
- Smith, C.L. y Hager, G.L.** (1997) Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J. Biol. Chem.* 272, 28171-28174.
- Stengelin, M.K. y Hoffman, J.F.** (1997) Na,K-ATPase subunit isoforms in human reticulocytes: evidence from reverse transcription-PCR for the presence of alpha1, alpha3, beta2, beta3, and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5943-5948.
- Stryer, L.** (1995) *Biochemistry*. 4^a ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Sun, B. y Salvaterra, P.M.** (1995) Two *Drosophila* nervous system antigens, Nervana 1 and 2, are homologous to the β subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5396-5400.
- Svaren, J. y Hörz, W.** (1996) Regulation of gene expression by nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 6, 164-170.
- Sweadner, K.J.** (1989) Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 185-220.
- Sweadner, K.J.** (1993) Multiple digitalis receptors: a molecular perspective. *Trends Cardiovasc. Med.* 3, 2-6.

- Sweadner, K.J.** (1995) Na,K-ATPase and its isoforms. En: Neuroglia (Kettenmann, H. y Ransom, B.R., eds.) Oxford University Press, New York, pp. 259-272.
- Szmulewicz, M.N., Novick, G.E. y Herrera, R.J.** (1998) Effects of *Alu* insertions on gene function. *Electrophoresis* 19, 1260-1264.
- Takeda, K., Noguchi, S., Sugino, A. y Kawamura, M.** (1988) Functional activity of oligosaccharide-deficient (Na,K)ATPase expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 238, 201-204.
- Takeyasu, K., Lemas, V. y Fambrough, D.M.** (1990) Stability of Na^+, K^+ -ATPase alpha-subunit isoforms in evolution. *Am. J. Physiol.* 259, C619-C630.
- Therien, A.G., Nestor, N.B., Ball, W.J. y Blostein, R.** (1996) Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271, 7104-7112.
- Therien, A.G., Goldshleger, R., Karlsh, S.J.D. y Blostein, R.** (1997) Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 272, 32628-32634.
- Thoma, F., Koller, T. y Klug, A.** (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructure of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403-427.
- Thoma, F.** (1992) Nucleosome positioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1130, 1-19.
- Thoma, F.** (1996) Mapping of nucleosome positions. En: Methods in Enzymology (Adhya, S., ed.) Academic Press, New York, vol. 274, pp. 197-214.

- Tiveron, M.C., Barboni, E., Pliego Rivero, F.B., Gormley, A.M., Seeley, P.J., Grosveld, F., Morris, R.** (1992) Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* 355, 745-748.
- Ueno, S., Takeda, K., Noguchi, S. y Kawamura, M.** (1997) Significance of the β -subunit in the biogenesis of Na^+/K^+ -ATPase. *Bioscience Rep.* 17, 173-188.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R. y Stillman, B.** (1997) Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* 8, 96-108.
- Vuillaumier, S., Dixmeras, I., Messaï, H., Lapoumèroulie, C., Lallemand, D., Gekas, J., Chehab, F.F., Perret, C., Elion, J. y Denamur, E.** (1997) Cross-species characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene reveals multiple levels of regulation. *Biochem. J.* 327, 651-662.
- Walderhaug, M.O., Post, R.L., Saccomani, G., Leonard, R.T. y Briskin, D.P.** (1985) Structural relatedness of three ion-transport adenosine triphosphatases around their active sites of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 260, 3852-3859.
- Wallrath, L.L., Lu, Q., Granok, H. y Elgin, S.C.R.** (1994) Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays* 16, 165-170.
- Wang, J., Schwinger, R.H.G., Frank, K., Müller-Ehmsen, J., Martín-Vasallo, P., Pressley, T.A., Xiang, A., Erdmann, E. y McDonough, A.** (1996) Regional expression of sodium pump subunit isoforms and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the human heart. *J. Clin. Invest.* 98, 1650-1658.

- Weber, P., Bartsch, U., Schachner, M. y Montag, D.** (1998) Na,K-ATPase subunit $\beta 1$ *knock-in* prevents lethality of $\beta 2$ deficiency in mice. *J. Neurosci.* 18, 9192-9203.
- Wu, C., Wong, Y.-C. y Elgin, S.C.R.** (1979) The chromatin structure of specific genes II: disruption of chromatin structure during gene activity. *Cell* 53, 433-440.
- Wu, C.** (1980) The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* 286, 854-860.
- Wu, C.** (1984) Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature* 311, 81-84.
- Wu, C.** (1989) Analysis of hypersensitive sites in chromatin. En : Methods in Enzymology (Wassarman, P.M., y Kornberg, R.D., eds.) Academic Press, New York, vol. 170, pp. 269-289.
- Wu, C.** (1997) Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J. Biol. Chem.* 272, 28171-28174.
- Yang, T.P. y Caskey, T.** (1987) Nuclease sensitivity of the mouse HPRT gene promoter region: differential sensitivity on the active and inactive X chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2994-2998.
- Yeagle, P.L., Young, J. y Rice, D.** (1988) Effects of cholesterol on $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 27, 6449-6452.
- Zhang, H., Iler, N. y Abate-Shen, C.** (1996) Rigorous and quantitative assay of transcription *in vitro*. En: Methods in Enzymology (Adhya, S., ed.) Academic Press, New York, vol. 273 pp. 273, 86-99.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.-P., Lane, W.S. y Reinberg, D.** (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a

complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 95, 279-289.

Apéndice

Nombre	Referencia ¹	Aplicación	5'-nt ²	Secuencia (5' a 3')	Condiciones PCR	Tamaño ³
F-PRβ2	D90048	Clonaje promotor β2	26	GGAATTC AACCTGGCTGGCTTCTGT ⁴	30" 94°/30" 62°/2'68" 2 ciclos; 30" 94°/30" 66°/2'68" 10 ciclos; 30" 94°/30" 66°/2'+20" cada ciclo, 20 ciclos	2906
R-PRβ2			2917	CGGGATCCCGCAGCTCTTCTTCTCTT		
F-Act	Nudel y cols, 1983	Obtención sonda β-actina	1668	AGGCCAACCCGCGAGAAGATGACC	30" 95°/30" 60°/30" 72°	330
R-Act			2463	GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC	1,5 mM MgCl ₂ , 35 ciclos	
3F	D90048	Obtención sonda #3	2009	GCTTGTTTTTCGGTTTGAG	30" 95°/30" 52°/30" 72°	154
3R			2162	CCCTGGTGGTCTTTTGG	1 mM MgCl ₂ , 35 ciclos	
2F	D90048	Obtención sonda #2	2130	AAGAGCCCGCTAGGACCAA	30" 95°/30" 55°/30" 72°	149
2R			2279	CTCTGTGACTCTAAGGGTGT	1,5 mM MgCl ₂ , 35 ciclos	
1F	D90048	Obtención sonda #1	2246	TGGGAAGGGGGCGGACA	30" 95°/30" 58°/30" 72°	152
1R			2398	GTGGGAGCTGGGGCCGG	1,5 mM MgCl ₂ , 35 ciclos	
F-DHSP1	D90048	Obtención sonda DHSP1	3023	GGAATTCGGGCTGGCGCGGAAAGG	30" 95°/30" 60°/30" 72°	236
R-DHSP1			3245	CGGGATCCAGGGGGCTCTGCGGGGAA	1,5 mM MgCl ₂ , 35 ciclos	

¹ Se cita el código de la secuencia depositada en GenBank (National Center for Biotechnology Information, NIH, EEUU) a partir de la cual se ha diseñado el oligonucleótido o bien el trabajo de donde se ha obtenido la secuencia.

² Número de la base 5' del oligonucleótido en la secuencia depositada en GenBank

³ Longitud en pares de bases del producto de PCR

⁴ Las bases en negrita son dianas de Eco RI (F-PRβ2) y BamHI (R-PRβ2) añadidas a los cebadores y que no están presentes en la secuencia diana

Apéndice 2

Comparación entre las secuencias de la región 5' del gen de la subunidad $\beta 2$ de Na^+, K^+ -ATPasa en humanos, ratón y rata.

PROHUMB2	TCCCGACCCTAGAGTCCCGTCACGACCCCTGACCCTTACACCACAACCTCT
PROMUSB2	GGT-----GCTCCAGCAAGCGTGG
PRORATB2	AGCTT-CCTCAGAGCTGGAGCATCAGTTGTAGGAGCTCCAACAAACATGG
	* * * * *
PROHUMB2	CCCGAAGTCCCTCTGCACTACCCTTCTACCCCTTCGGAGACXTXCACCTG
PROMUSB2	GCTGGAGATCAGACCTGGTGGGGAGGGGCGGCTG-GAAGGCA-GGACCCA
PRORATB2	AGGGGAGAGCAGACCTG-TGGGTGGGGG-GACTG-GGAGGCA-GGGCATA
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	TCTCGGTCCACC---ACACCTGTCCCC---GACACTCT-AACCTCTTCCT
PROMUSB2	TGCAGACCTGGCTGTAGATC-----AGGGACACAGGAAATTTGGGG
PRORATB2	TGCAGACCTGGCGGTAGAACTAAGTTAAAGGATGCACGGAAATTTCTGGGG
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	CCTCAGACC--CCTG--ACCATCGCCGAGGTTGTCCCTTG-----CAGG
PROMUSB2	C-TCAAACAAGTTTGGAAGATGGCAGGGACCCCTGGTCTATGGAGAACAGG
PRORATB2	CCTCAGACAAGTTTGGAAGATGGCAGGGACCCCTGGTCTGGAGAACAGG
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	AGACCCCCACGG-GAAATAGGTAGAGACGCCCCGGACAGGATCG---AA
PROMUSB2	TAGGTTGGACAAAGGAGCCAGTGAACCGAGAAAGAAAGGGCGTCTCTGT
PRORATB2	T----TGGACAAAGGAGCCAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	GGGAGGACCGAGGCCGCTCAGGGCC---GACCAGAGAAGCGAGAGAAAGA
PROMUSB2	GGTGGCTTCTATCCCTCTCTATGTTCTAGTTTCTAGGCTCTTTCTTGGTG
PRORATB2	GAAGGCTTCTATCCCTCTCTGTGTTCTAGTTTCTAGGCTCTTTCTTGGTG
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	ACTAGAGATCTCTAGCTCTTTATTCTCTGACATCTGCCCCATCTGCTC
PROMUSB2	TCTGGCGCTTGCTT-TTCTTTATTCTCTCACATTCAGCCC--TCTGTTC
PRORATB2	TCTGGCGCT----T-TTCTTTATTCTCTCACATTCAGCCC--TCTGTTC
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	CCGGACTCTTCCGCCCATCTGTATCTTAGTCTCTTTCTAA-CTCCCTGC
PROMUSB2	C-GGAGGCTTTCGAAGTAACTCTATCTTAGTCTCTTTTAAATTCCTGC
PRORATB2	C-GGAGGCTTTCGAAGTAACTCTATCT-----CTTTTAAATTCCTGC
	* * * * * * * * * * *
PROHUMB2	CTGGGGCCCC-ACCTTTGAGCATATATCGGCTTCTCTCTGCCGTTGT
PROMUSB2	CCCGGGCCCCCACTTTTGGAGTACGTATCAGCTCGTCTTTTCAAGT--TTGA
PRORATB2	CCAGAGCCCCCACTTTTGGAGTACGTATCGGCTTGTTTTTCGGT--TTGA
	* * * * * * * * * * *

PROHUMB2 GTTCTCTG-GGTTATCTTCCCTCT--ACTCCGCCCGGACAC--GCC
 PROMUSB2 GCCTCTCAGGAGGTG--TTCTCTCTTTAGGTCTACCCAGACTCTCACC
 PRORATB2 GCTTCTAAGGGGTGATTTTTCCTTCAACTCTACCCAGACTC--ACC
 * *** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

PROHUMB2 CTCT-ATCTCTTCCCTCCACCTGTCCAGTCTAGTACCTGGGGTG-GGG
 PROMUSB2 CTCTTGTCTTCTTTTCCAATCTTGTTCAGTACTGTACCTGGGGTCTGGG
 PRORATB2 TTCT-GTTTTCTTTTCCCACCTGTTCAGTACCGTATCAGGGTCTGGG
 *** * * * ** * * ** ** * * ** * ** * ** *

PROHUMB2 GTAATGGAGAGACAGCTAGGTCCTAAG-----A
 PROMUSB2 GTA-GGAAGAACCCGCTAGGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 PRORATB2 GAAAGGAAGAGCCCGCTAGGACCAAAAGAC-----
 * * * ** * ** * ** * * *

PROHUMB2 GAAGTCA--GGGGGCTGGGCCAACCTCTCCAT-ATTTA**CATATGTATGA**
 PROMUSB2 AAAGGCCCCAGGGGGCGGGTCCAATCCATCT-TCATTTG**CATATGTATGA**
 PRORATB2 ---GCACCAGGGGGCGGGTCCAATTCTCTATAATTTG**CATATGTATGA**
 * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * ** * ** * ** *

PROHUMB2 **CG**CTCGCCTGGGCCAGTGGCGAGGAGCGGACGTTCTGGGGG----TGG
 PROMUSB2 **CG**-TCTCCTGAGCGAGCAACGAAGAGGCGGGTTCCTGAGGGGTGGGTGG
 PRORATB2 **CG**-TCTACTAGGCTAGCAACGAGGAGCGGGTTCCTGGGGGTGGGTGG
 ** ** * * * * * ** * ** * ** * * * * * *

PROHUMB2 GAAGGGGGCGGGCACCCCCAGAGCCGACAGAG GACCGCGCTCGGC
 PROMUSB2 GAAGGGGGCGGACACCCCTCAGATCACAGAC GACTGTGCGCAGG
 PRORATB2 GAAGGGGGCGGACACCCCTAGAGTACAGAG GACTGTGCGCAGG
 ***** ** * ** * * ** * ** * ** * * * *

PROHUMB2 GACCGCGGGCCCCG-ACTGCTGAGGAGCGGACGCTCCGCCGTTGGGGGCC
 PROMUSB2 GTTCGCGCTCCC-GCACTGCTGAGGAGCGGAGCCTCCGATTGGGGGGCCC
 PRORATB2 GACCGCGCTCCCCGCACTGCTGAGGAGCGGAGCCTCCGATTGGGGG-CCC
 * **** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2 CCCATCCCTGGCTGTCCCC--AGCTGCGCGTCCCCGCCCA-CCCC
 PROMUSB2 CT-ATCCTTGTG--TTTCCCCACAAGTCTGTCCCCGCCAGCTCCC
 PRORATB2 CT-ATCCTTGGCAGCCCCCCCCCACTGCTCGTCCCCGCCAGCTCCC
 * **** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2 GTCCCCGCCCA-CCCCGC-GGCTGAGCCACCACCGGTGCAGTGGTCTC
 PROMUSB2 GTCCCCGCCAGCTCCCCTGGCTGGGCCAACTGTGGTGTGGTGTGCG
 PRORATB2 GTCCCCGCCAGCTCCCCTGGCTGGGCCAACTGTGGTGTGGTGTGCG
 ***** * * * * * ** * ** * ** * * ** * *

PROHUMB2 CGCTTGGCGAGCGAGCCTTGA-----GCTTCGTTCCACAGCTTCT
 PROMUSB2 CGTTTGTGCGGAGGAGCCTTAATCGGCCACCTGCCGCTTCTACAGCCTCT
 PRORATB2 CGTTTGTGCGGAGGAGCCTTAATCGGCCACCTGCCGCTTCCACTGCCTCT
 * ** * * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2 TTGCATCTTGGATTTTCGGGGCGCCCCCTCCCCACCTCTCTGCCTTT
 PROMUSB2 TTGCATCTCGGATTTTCGGGGCGGCTCCCTCCCCATCTTTCCCTGCTTCT
 PRORATB2 TTACATCTCGGATTTTCGGGGCGGCTCCCTCCCCATCTTTCCCTGCTTCT
 * * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2 TTGTACCCCGCTTTTTTCTGCGTTCGCTCGGTTTTGTAGCCGCTGCT
 PROMUSB2 TTGCACCC-CGTTTTTCTGCGTTCGCTCGAATTTGGAGCCGCTGCTGG
 PRORATB2 TTGCACCC--GCTTTTTCTGCGTTCGCTCGAATTTGGAGCCGCTGCTGG
 ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2 TTTTGCACCCCATTTTCGTTTTGTTTCTAGACGGTTTGGCGGGGGTGAAG

```

PROMUSB2      TTTTGCACCCCTTTTTGTTTT-CTTCTAGGCGGT---GTGTGGGGTGAAG
PRORATB2      TTTTGCACCCCTTTTTGTTTTGCTTTTAGGCGGT---GTGTGGGGTGAAG
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2      CTGCATTCATACCCCTTCCTCTTGTTATTCTCCCCTGCTCTGACAGCACC
PROMUSB2      GTGCCTCGGCATCCCTTTCCTGGTTATCTTCCCTGTTTTGACAGCCCC
PRORATB2      GTGCCTTGGCATCCCTTCCTCTGGTTATCTTCCCTGTTTTGACAGCCCC
*** * * * * * * ** * ** * ** * * ** * * ** * ** *

PROHUMB2      CCTTTTCATCGCAGTTGGGGGGCCTAGGATCGGTGCATCTTCCGCCGCGC
PROMUSB2      CCTTTCTATCGCAGTCGGGGGGCCTAGCCTCGGTGCACCTTC-GCCGCAC
PRORATB2      CCTTTCTATCGCAGTCGGGGGACCTAGCCTCGGTGCACCTCC-GCCGCAC
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2      TGCCAGCACCCCGCAGCGGTGGTTCGTGCACCCCGGAATCTGCAGCAGCT
PROMUSB2      TGCCAGCAGACCACAGTGCCTGGCTGTGCACCCCGGAATTTGCAGCAGCT
PRORATB2      TGCCAGCAGACCACAGCGGTGGCTGTGCACCCCGGAATTTGCAACAGCT
***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2      GCATATCTGAGG---GGGTCTCCTTTGCCCGCGCCGCTTCGCTCCCCGT
PROMUSB2      GTATATCTG---ACTGGAGTCTCCCT-GCCT-----GCTCCCGC-----GC
PRORATB2      GCATATCTGTGATCGGAGTCTCCCTCGCCT---CGTCCCGC-----GC
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2      GCTTTTGGGTGTGTGGAGGGCTTCAGT-CGCGGCGCCCCGCTTCTCCGC
PROMUSB2      GCATTTGG-TGCGTGGAGGGCTTCAGCGCGCACGCCCGGCTTCTCCGC
PRORATB2      TCATTCCG-TGCGTGGAGGGCTTCAGCGCGCAACGCCCGGCTTCTCCGC
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2      AACCCCCGCCCCGCGCCGGACTCGCCCCGCGCCACCAAG█GTCATC
PROMUSB2      AGCCCCAGCAGCGCGCCGGACTCCCCCGTGCCTCCAAG█GTCATC
PRORATB2      AGCCCCAGCAGCGCGCCGGACTCGCCCCGCTGCCTCCAAG█GTCATC
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PROHUMB2      CAGA
PROMUSB2      CAGA
PRORATB2      CAAA
** *
    
```

ABREVIATURAS

5mC: 5-metilcitosina

A: amperios

BSA: albúmina de suero bovino

cdNA: ácido desoxirribonucleico complementario

Ci: curios

Da: daltons

dATP: desoxiadenosín 5'-trifosfato

dCTP: desoxicitidín 5'-trifosfato

ddUTP: didesoxiuridín 5'-trifosfato

dGTP: desoxiguanidín 5'-trifosfato

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótido 5'-trifosfato

DTT: ditioneitol

dTTP: desoxitimidín 5'-trifosfato

EDTA: ácido etilen diamino tetraacético

FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico 2

g: fuerza centrífuga relativa

gr: gramos

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

J: julios

KDa: kilodalton

L: litros

m: metros

MOPS: ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico

mRNA: RNA mensajero

[Na⁺]_i: concentración intracelular de Na⁺

p/v: peso/volumen

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PKA: proteína kinasa A

PKC: proteína kinasa C

Pu: purina

Py: pirimidina

RNA: ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribosómico

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato sódico

SNC: sistema nervioso central

t.a.: temperatura ambiente

Tris: tris-hidroximetil amino metano

u: unidades enzimáticas

UV: ultravioleta

V: voltios