

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Caracterización funcional del promotor del
gene Scn7A de ratón que codifica para el
canal de sodio Na_x

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

MARCO ANTONIO MORALES BUENDIA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México

Diciembre 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

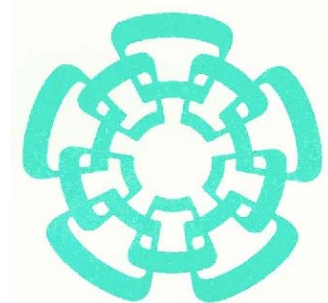


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



CINVESTAV-IPN

El presente estudio se llevo a cabo en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección de la Dra. María del Refugio García-Villegas.

Esta tesis se realizó con el apoyo de una beca incluida en el proyecto "Aislamiento y caracterización de reguladores genéticos a larga distancia en promotores de genes neuronales" financiado por el CONACYT (No. 34397-N).

ÍNDICE

	página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
I. Proteínas transmembranales que transportan moléculas específicas.....	2
II. Canales de Na ⁺ sensibles a voltaje.....	4
III. Clasificación de los canales de Na ⁺ sensibles a voltaje.....	7
IV. Canal de sodio Na _x	11
V. Mecanismos de transcripción en eucariontes.....	17
OBJETIVOS.....	22
I. Objetivo general.....	22
II. Objetivos específicos.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
I. Clonación del fragmento genómico de ratón correspondiente al promotor de Na _x en el sitio de restricción <i>EcoRI</i> del vector pBluescript II SK ⁺	23
II. Identificación del DNA plasmídico de las colonias bacterianas transformadas con pBSSK ⁺ / <i>EcoRI</i> + BNa _x -1/ <i>EcoRI</i>	24
III. Secuenciación del fragmento genómico de 4.1 kb.....	26
IV. Análisis de secuencias.....	28
V. Clonación del promotor de Na _x en el vector pβ-gal Básico.....	29
VI. Ensayos de transfección transiente.....	31
VII. Ensayo de la actividad de luciferasa y de β-galactosidasa.....	33
RESULTADOS.....	35
I. Mapeo del extremo 5' del mRNA de Na _x	35
II. Clonación del fragmento genómico río arriba al extremo 5' de Na _x	37
III. Secuenciación del fragmento genómico de 4.1 kb y ubicación de los sitios de inicio de la transcripción.....	45
IV. Análisis funcional del promotor transcripcional del canal Na _x	52

V. Actividad del promotor del canal Na_x en respuesta a db AMPc.....	57
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70

RESUMEN

El canal de sodio Na_x es un canal activado por incremento de la concentración extracelular de sodio (Hiyama *et al.*, 2002. *Nat. Neurosci.* 5:511), el cual es expresado predominantemente en neuronas y células de Schwann de ganglios de la raíz dorsal (Watanabe *et al.*, 2000. *J. Neurosci.* 20:7743). Nuestro interés es identificar elementos de DNA que se encuentren involucrados en la expresión tejido-específica del gene del canal Na_x de ratón. Mediante ensayos de amplificación rápida de extremos de cDNA del mRNA de ganglios de la raíz dorsal de ratón encontramos que el promotor del gene del canal Na_x presenta varios sitios de inicio de la transcripción y además nuestros resultados indican que el promotor no contiene caja TATA. Clonamos y secuenciamos un fragmento de DNA genómico de 3.6 kb de la región flanqueante al extremo 5' del gene Na_x de ratón y mediante ensayos de transfección transiente de las líneas celulares Neuro 2A y NG108-15, demostramos que el fragmento de 3.6 kb presenta actividad de promotor transcripcional, sin embargo, el promotor también es activo en la línea celular L6 (muscular) que no expresa el mRNA del gene del canal Na_x, lo que indica que no contiene todos los elementos de regulación genética tejido-específica. Adicionalmente, encontramos que un fragmento de 400 pb de la región proximal al promotor y el inicio del exón 1 es capaz de responder a la inducción con dibutilil AMPc en la línea celular Neuro 2A. Nuestros resultados sugieren que los elementos para la expresión tejido-específica del gene del canal Na_x de ratón probablemente se encuentren distantes al sitio de inicio de la transcripción.

INTRODUCCIÓN

I. Proteínas transmembranales que transportan moléculas específicas

La membrana plasmática es una barrera de permeabilidad selectiva entre la célula y el medio extracelular. Esta función de barrera es importante ya que permite a la célula mantener la concentración de solutos en su citosol que son diferentes de aquellos que se encuentran en el fluido extracelular y en cada uno de los compartimentos intracelulares. Sin embargo, para hacer uso de esta barrera las células han tenido que desarrollar formas de transferir moléculas específicas a través de sus membranas para captar nutrientes esenciales, productos metabólicos de desecho y regular las concentraciones iónicas intracelulares. El transporte de iones inorgánicos y pequeñas moléculas orgánicas a través de la bicapa lipídica es llevado a cabo por proteínas transmembranales especializadas, cada una de las cuales es responsable por la transferencia de un ión o molécula específica.

Se considera que existen dos clases principales de proteínas de membrana que median el transporte de sustancias orgánicas e inorgánicas: Las proteínas acarreadoras y los canales proteicos (Alberts *et al.*, 1994). Todas son proteínas integrales de membrana y poseen un alto grado de especificidad por la sustancia transportada (Lodish *et al.*, 2002).

Todos los canales proteicos y muchos acarreadores permiten el paso de solutos a la membrana solo pasivamente (transporte pasivo). Si la molécula transportada no tiene carga, simplemente la diferencia en su concentración en ambos lados de la membrana (gradiente de concentración) dirige el transporte pasivo y determina su dirección de transporte. Sin embargo, si el soluto lleva una carga neta su gradiente de concentración y la diferencia de potencial eléctrico al atravesar la membrana influye en su transporte. De hecho, casi todas las membranas plasmáticas tienen una diferencia de potencial eléctrico, con el interior normalmente negativo con respecto al exterior. Esta diferencia de potencial favorece la entrada de iones cargados positivamente a la célula, pero desfavorece la entrada de iones cargados negativamente (Nason, 1996).

Las células también requieren proteínas transportadoras que bombeen activamente ciertos solutos a través de la membrana en contra de su gradiente electroquímico; este proceso se conoce como transporte activo y es mediado siempre por proteínas acarreadoras. En el transporte activo el bombeo realizado por proteínas acarreadoras es direccional porque se acopla a una fuente de energía metabólica, tal como la hidrólisis de

ATP o un gradiente iónico. Así, el transporte por proteínas acarreadoras puede ser activo o pasivo, mientras que el transporte por canales proteicos es siempre pasivo (Planas, 1985).

Los canales son proteínas que forman poros hidrofílicos que atraviesan la membrana plasmática (Hille, 1992). La mayoría de estas proteínas están relacionadas específicamente con el transporte de iones inorgánicos y son denominados canales iónicos. Por su eficiencia en el transporte, los canales tienen una ventaja sobre los acarreadores en que más de 1 millón de iones pasan a través de un canal cada segundo, lo cual es en proporción 1000 veces mayor que la velocidad del transporte mediado por cualquier proteína acarreadora conocida. Por otro lado, los canales no pueden acoplarse a una fuente de energía para llevar a cabo un transporte activo, ya que su transporte es siempre mediado de forma pasiva. Así, la función de los canales iónicos es permitir a iones inorgánicos específicos (principalmente el Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Cl^-) difundir rápidamente a través de la bicapa lipídica (Alberts *et al.*, 1994).

Dos propiedades importantes distinguen a los canales iónicos de un simple poro acuoso. La primera es que ellos muestran selectividad a un tipo específico de ión, esta selectividad se basa en el tamaño del canal, las cargas eléctricas que lo revisten y en el tamaño y carga de los iones. La segunda propiedad importante es que los canales iónicos no están siempre abiertos, estos tienen puertas que pueden abrir brevemente y después cerrar de nuevo. En la mayoría de los casos las puertas se abren en respuesta a estímulos específicos. Los principales tipos de estímulos que se sabe causan la apertura de los canales son los cambios en el voltaje al atravesar la membrana (canales sensibles a voltaje), por estímulos físicos (mecanorreceptores y canales sensibles al calor) ó por la unión de un ligando (canales activados por ligandos extracelulares o intracelulares) (Waxman, 1997).

Los canales iónicos sensibles a voltaje pueden en realidad asumir 3 estados conformacionales (cerrado, abierto o inactivado) y como su nombre lo indica, responden a una despolarización membranal con una transición del estado cerrado al abierto seguida de una inactivación intrínseca (Vega y Félix, 2001). En este aspecto, células excitables (neuronas, células musculares y endocrinas) han hecho uso de canales catiónicos sensibles a voltaje para la recepción, conducción y transmisión de distintas señales, como por ejemplo generar los potenciales de acción (Alberts *et al.*, 1994). El flujo iónico que se genera por la actividad de los canales crea corrientes eléctricas minúsculas (en el orden de 10^{-12} a 10^{-10} amperios por canal) suficientes como para producir cambios rápidos en el voltaje transmembranal, es decir el potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular.

En virtud de que los iones de Na^+ y Ca^{++} se encuentran a concentraciones mayores en el espacio extracelular que en el interior de las células, la apertura de los canales iónicos selectivos a Na^+ o Ca^{++} causa que estos cationes entren a la célula y despolaricen la membrana plasmática, como consecuencia de esto se abren más canales de Na^+ los cuales admiten más iones de Na^+ causando más despolarización (Vega y Félix, 2001). Este proceso continúa de la misma forma y tiene una duración de 1-2 milisegundos, así el potencial eléctrico en la región local de la membrana ha cambiado su valor del resto de -70 mV a casi $+50$ mV que es el valor del potencial de equilibrio del Na^+ (Alberts *et al.*, 1994). En contraste, cuando los iones de K^+ salen o los de Cl^- entran a la célula a través de canales abiertos, el interior celular se vuelve negativo o hiperpolarizado (Vega y Félix, 2001).

De hecho, la activación e inactivación de los canales de Na^+ y K^+ son la base del potencial de acción, que representa la señal integrativa que permite a las células excitables conducir la información para el control de una gran variedad de eventos fisiológicos entre los que se encuentran la generación y propagación de impulsos nerviosos, secreción de sustancias hacia el espacio extracelular, contracción muscular y regulación del volumen celular (Karp, 1998).

II. Canales de Na^+ sensibles a voltaje

Los canales de Na^+ sensibles a voltaje son las principales moléculas responsables de generar los potenciales de acción y representan la base fisiológica de la transmisión de señales en el Sistema Nervioso, su función es esencial para la eficiente generación y propagación del impulso nervioso en el Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico (Hodgkin y Huxley, 1952).

Después del trabajo de Hodgkin y Huxley (1952) y gracias a las herramientas de electrofisiología, biología molecular, ópticas y cristalografía de Rayos X, se ha revelado la existencia de una gran variedad de canales iónicos que pueden distinguirse con base a su selectividad del ión, sensibilidad a voltaje, conductancia iónica, inactivación y sensibilidad a agentes bloqueadores (Constanzo, 2000). Así pues, desde hace algunos años, una gran variedad de genes y transcritos de proteínas de canales iónicos han sido aislados y caracterizados.

Usando anticuerpos e información de secuencias de proteínas homólogas, se han aislado clones de DNA complementario (cDNA) que codifican para subunidades α de

canales de Na⁺ sensibles a voltaje, como por ejemplo la subunidad α del canal de Na⁺ del órgano eléctrico de la anguila eléctrica *Electrophorus electrophorus* (Noda *et al.*, 1984), la subunidad α de cerebro de rata (Noda *et al.*, 1986; Auld *et al.* 1988; Kayano *et al.* 1988; Joho *et al.* 1990), de músculo esquelético de rata (Trimmer *et al.*, 1989; Kallen *et al.*, 1990), de músculo cardíaco de rata (Rogart *et al.*, 1989), de músculo esquelético y cardíaco de humano (Gellens *et al.*, 1992; George *et al.*, 1992a) y de cerebro humano (Ahmed *et al.*, 1992).

Los canales de Na⁺ sensibles a voltaje son miembros de una superfamilia en la que se incluyen los canales de K⁺ sensibles a voltaje, los canales de Ca⁺⁺ sensibles a voltaje y los canales dependientes de nucleótidos cíclicos. Los miembros de los canales de Ca⁺⁺ y Na⁺ contienen cuatro dominios homólogos en la subunidad α , mientras que en los canales dependientes de nucleótidos cíclicos y los de K⁺ el canal mínimo funcional consiste de 4 subunidades α de dominio-simple que se agregan para producir una estructura hetero u homotetramérica (Jan y Jan, 1992).

La topología de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje consiste de un complejo de proteínas formado por una subunidad conductora de iones (subunidad α) de ~260 kDa la cual está asociada con una o más subunidades auxiliares que contienen solamente un segmento transmembranal, como las subunidades β_1 , β_2 y β_3 (de ~30 a ~40 kDa) que están unidas de manera no covalente a través de puentes disulfuro a la subunidad α (Isom *et al.*, 1994; 1995). Aunque las subunidades α son capaces por sí mismas de conducir iones, las subunidades auxiliares juegan un papel funcional muy importante en la modulación y estructuración del canal (Messner y Catterall, 1985). La subunidad α de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje contiene cuatro dominios homólogos, dentro de cada dominio hay 6 segmentos transmembranales llamados S1 a S6 y una región P (SS1-SS2) entre S5 y S6 que comprende la región del poro (figura 1) (Goldin, 2001).

Activación. Cada uno de los cuatro dominios homólogos contiene un motivo denominado S4 (figura 1), el cual consiste de un segmento de 20 residuos de aminoácidos que llevan una carga positiva neta, tales cargas dentro del campo eléctrico son requeridas para conferir la sensibilidad a voltaje y se ha propuesto que la estructura S4 podría formar parte del mecanismo sensor a voltaje en los canales iónicos sensibles a voltaje (Noda *et al.*, 1986; Greenblatt *et al.*, 1985; Guy y Conti, 1990). Esto se confirmó con mutagénesis dirigida para el caso de los canales de Na⁺ (Stühmer *et al.*, 1989) y posteriormente para los canales de K⁺ (Papazian *et al.*, 1991; Liman *et al.*, 1991). Las modificaciones con residuos de aminoácidos cargados negativamente o con carga neutra en S4 pueden causar

cambios en la activación (Stühmer *et al.*, 1989; Papazian *et al.*, 1991; Liman *et al.*, 1991), esto sugiere que además de la carga global de S4, también son importantes las interacciones entre los residuos, sus propiedades y su conformación. Recientemente en experimentos de neutralización, los resultados sugieren que el sensor a voltaje podría estar formado por un grupo el cual incluye a S2, S3 y S4, con la mayoría de la contribución dada por las cargas de S4 (Bezanilla, 2000).

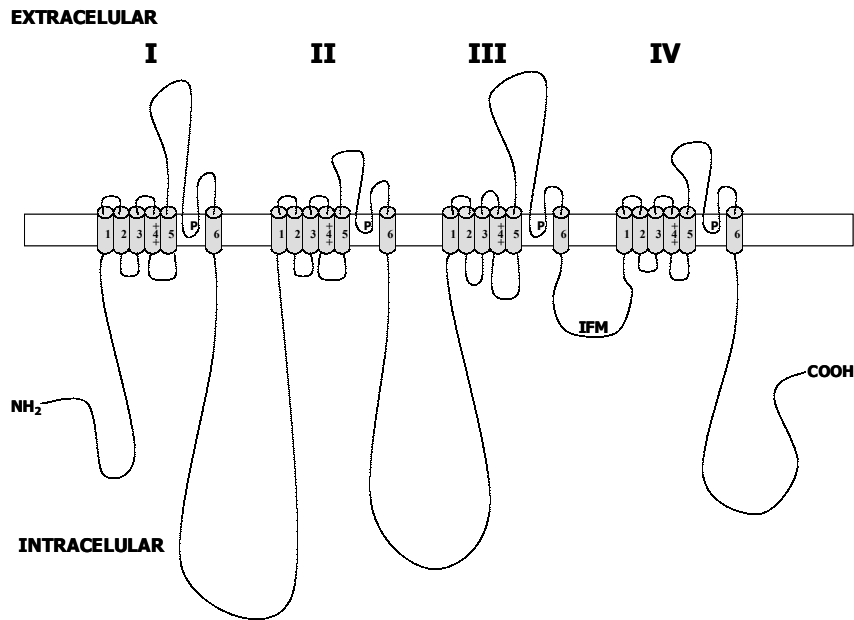


Figura 1. Topología de los canales de Na^+ sensibles a voltaje. La subunidad α de los canales de Na^+ consta de cuatro dominios homólogos, que están marcados I-IV y los seis segmentos transmembranales en cada dominio están marcados 1-6, además, el segmento S4 de cada dominio encargado de la activación se indica con ++. El asa citoplasmática que conecta el dominio III con el IV está marcada como IFM (inactivación rápida). Esquema modificado de Novarovic *et al.*, 2001.

Poro del canal. Uno de los problemas más desafiantes relacionados con los canales iónicos es la estructura y localización del poro del canal. Guy y Seetharamulu (1986) propusieron que la unión entre S5 y S6 (región SS1-SS2) forma parte del poro del canal. La primera mutación en un canal sensible a voltaje que localizó el poro fue de hecho una mutación en la región 387 (sustitución de ácido glutámico por glutamina) del canal $\text{Na}_v1.2$ (Noda *et al.*, 1989), la cual no solo afectó la susceptibilidad del canal a tetrodotoxina (TTX) y a saxitoxina (STX), sino también a la conductancia. La TTX y la STX son toxinas muy potentes y selectivas que actúan sobre los canales de Na^+ , las cuales ocluyen la salida del poro formando uniones por puentes de hidrógeno con las regiones SS1-SS2 del canal. Por ejemplo, un solo residuo en el dominio I de la región SS2 de la secuencia de aminoácidos del canal $\text{Na}_v1.2$ de rata es crucial para la unión de la TTX (figura 2) (Cummins *et al.*, 1999; Akopian *et al.*, 1996; Satin *et al.*, 1992). La TTX ha sido

comúnmente usada como una herramienta para bloquear a los canales de Na⁺, sin embargo, se ha establecido que varios tipos de isoformas de canales de Na⁺ son resistentes a altas concentraciones de TTX (Yoshida, 1994).

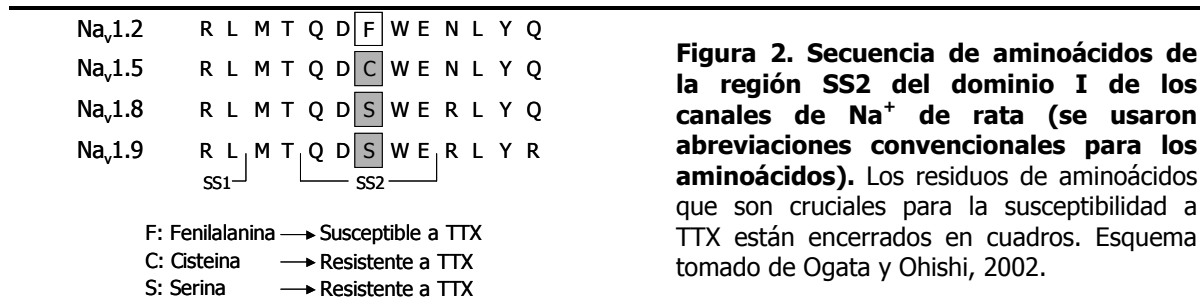


Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la región SS2 del dominio I de los canales de Na⁺ de rata (se usaron abreviaciones convencionales para los aminoácidos). Los residuos de aminoácidos que son cruciales para la susceptibilidad a TTX están encerrados en cuadros. Esquema tomado de Ogata y Ohishi, 2002.

Inactivación. El asa que conecta al dominio III con el IV ha sido implicada en la inactivación de los canales de Na⁺. La primera línea de evidencia fue obtenida por Vassilev *et al.*, (1988), quien mostró con anticuerpos contra esa región (pero no contra las uniones I-II ó II-III) que se retardaba la inactivación de los canales de Na⁺ en células musculares de rata. Otra evidencia fue proporcionada por Patton y Goldin (1991) quienes examinaron la importancia del tamaño del asa que conecta al dominio III con el IV del canal de Na⁺ construyendo un mutante que contenía inserciones de aminoácidos en ambos extremos de esta región y sus resultados sugieren que el incremento del tamaño de la región entre el dominio III-IV puede disminuir la velocidad de inactivación del canal de Na⁺.

Para determinar los aminoácidos específicos que podrían ser esenciales para la inactivación rápida, West y colaboradores (1992) estudiaron canales Na_v1.2 de cerebro de rata y construyeron mutaciones de aminoácidos no polares (isoleucina, fenilalanina ó metionina) en el asa entre el dominio III y IV (adyacentes al motivo IFM), estas mutaciones resultaron en canales de Na⁺ que no mostraron inactivación. Para determinar cual de los tres residuos adyacentes al IFM era importante para la inactivación, West mutó individualmente a cada uno de estos residuos por glutamina. No obtuvo resultados significativos en las mutaciones realizadas en la isoleucina y en la metionina, pero la mutación de la fenilalanina en la posición 1489 redujo dramáticamente la inactivación rápida, casi a la misma magnitud que las tres mutaciones. Estos resultados indican que la fenilalanina en la posición 1489 es crítica para la rápida inactivación de los canales de Na⁺.

III. Clasificación de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje

Desde hace algunos años, una gran variedad de diferentes isoformas de canales de Na⁺ sensibles a voltaje de mamíferos han sido clonadas, caracterizadas y expresadas

funcionalmente. Estas isoformas han sido clasificadas como miembros de la familia Na_v1 con nueve miembros. Para esta clasificación se utiliza la nomenclatura propuesta por Goldin *et al.*, 2000, la cual consiste del prefijo Na_v para indicar el ión a que es permeable y el principal regulador fisiológico, seguido de un número que indica la familia de genes (Na_v1). El número que sigue después del punto decimal identifica la isoforma específica (ejemplo $\text{Na}_v1.1$). La homología entre las nueve isoformas de la familia Na_v1 es aproximadamente de 75 %.

Aunque el papel funcional de las isoformas de la familia Na_v1 es principalmente formar un potencial de acción en células excitables, estudios recientes indican que ellos también pueden influenciar en el comienzo de la actividad eléctrica en neuronas, a través de las constantes o resurgentes corrientes de Na^+ (Raman y Bean, 1997). Esto ha llevado a un nuevo concepto en el que los mismos canales de Na^+ pueden integrar en conjunto el disparo de la conducta neuronal. Además, algunas de las isoformas de la familia Na_v1 se expresan preferentemente en subpoblaciones de neuronas sensoriales que se especializan en la sensación al dolor (Cummins *et al.*, 1999; Akopian *et al.*, 1996).

Las neuronas sensoriales primarias (neuronas de ganglio de raíz dorsal y neuronas del ganglio trigémino) son responsables de transmitir información somatosensorial en el Sistema Nervioso Periférico y comunicar la señal sensorial resultante al Sistema Nervioso Central, además, estas células se caracterizan por presentar diferencias en la expresión de receptores a neurotrofinas. Las neuronas sensoriales primarias son el punto de inicio de los estados de dolor y después de algunas lesiones estas células pueden dar lugar a actividad espontánea anormal la cual puede producir dolor crónico (Ochoa y Torebjork, 1980; Nordin *et al.*, 1984). La posición de las neuronas sensoriales primarias como sitios distales de la generación del impulso a lo largo del camino nociceptivo, ha producido un intenso interés en los mecanismos fundamentales en la generación y transmisión del potencial de acción en estas células, en estados de enfermedad caracterizados por dolor. Los canales de Na^+ sensibles a voltaje los cuales producen la corriente de entrada a la membrana necesaria para la producción del potencial de acción en el Sistema Nervioso de los mamíferos, son por supuesto expresados en neuronas sensoriales primarias y han surgido como objetivos importantes en el estudio molecular de la fisiopatología del dolor y en la búsqueda de nuevas terapias para el dolor.

Estudios electrofisiológicos han demostrado que después de una lesión los axones de las neuronas motoras exhiben cambios en la excitabilidad, incrementando la expresión de canales de Na^+ sobre el cuerpo celular y las dendritas (Kuno y Llinas, 1970); cambios

similares fueron observados en neuronas sensoriales después de una transección axonal (Gallego *et al.*, 1987; Gurtu y Smith, 1988). Estas observaciones, junto con las observaciones clínicas y experimentales sobre la eficacia parcial de agentes bloqueadores de canales de Na⁺ en estados de dolor (Chabal *et al.*, 1989; Devor *et al.*, 1992; Omana-Zapata *et al.*, 1997; Rizzo, 1997) estableció la relación entre la actividad de los canales de Na⁺ y la hiperexcitabilidad de neuronas sensoriales ocasionadas por el dolor.

Evidencia experimental muestra que el cambio en la organización de canales de Na⁺ en el axolema de una neurona podría afectar la actividad del nervio, llevando a una disfunción sensorial y motora (Novakovic *et al.*, 1998). En humanos esto podría contribuir a mecanismos fisiopatológicos de varias enfermedades neurológicas tal como la esclerosis múltiple, epilepsia, neuropatías periféricas y dolor neuropático.

Desde hace algunos años, se han descrito casi una docena de canales de Na⁺ sensibles a voltaje molecularmente distintos y la mayoría se encuentran localizados en el cromosoma 2 de humano donde se encuentran los genes de canales de sodio Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v 1.7 y NaG; esta organización se conserva en el cromosoma 2 de ratón (Tabla I). Neuronas de ganglio de raíz dorsal que se sabe exhiben múltiples corrientes de Na⁺ (Kostyuk *et al.*, 1981; Roy y Narahashi, 1992; Caffrey *et al.*, 1992; Elliott y Elliott, 1993) expresan por lo menos seis transcritos de canales de Na⁺ (Black *et al.*, 1996). Los canales Na_v1.1 y Na_v1.6 (expresados también en altos niveles por otro tipo celular neuronal dentro del Sistema Nervioso Central) se sabe que producen corrientes de Na⁺ susceptibles a TTX y son expresados en altos niveles en neuronas de ganglio de raíz dorsal. Además, neuronas de ganglio de raíz dorsal expresan cuatro transcritos adicionales de canales de Na⁺ los cuales no son expresados en niveles significativos en otro tipo celular neuronal:

- 1) Na_v1.7: expresado preferentemente en neuronas de ganglio de raíz dorsal (Toledo-Aral *et al.*, 1997), produce una corriente rápida y transitoria de Na⁺ susceptible a TTX (Cummins *et al.*, 1998).
- 2) Na_v1.8: expresado preferentemente en pequeñas neuronas de ganglio de raíz dorsal y del trigémino; mantiene una corriente de Na⁺ resistente a TTX (Akopian *et al.*, 1996).
- 3) Na_v1.9: expresado en neuronas del trigémino exhibe un 47 % de identidad a nivel de aminoácidos con el canal Na_v1.8 (Dib-Hajj *et al.*, 1998); estudios recientes reportan que, cuando Na_v1.9 es expresado en células HEK293 codifica un canal resistente a TTX (Tate *et al.*, 1998).

- 4) NaG: canal de sodio que fue inicialmente clonado de una genoteca de astrocitos y fue considerado como glia-específico (Gautron *et al.*, 1992), pero también es expresado en neuronas de ganglio de raíz dorsal (Black *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 2000).

La expresión preferencial de Na_v1.8 y Na_v1.9 en neuronas de ganglio de raíz dorsal proporciona una correlación a nivel molecular porque estas células expresan varias corrientes de Na⁺ que son resistentes a TTX. Hay de hecho evidencia de que los canales de Na⁺ resistentes a TTX juegan un papel importante en la conducción del potencial de acción dentro de neuronas sensoriales y sus axones (Jeftinija, 1994). Esto sugiere que estos canales pueden representar objetivos importantes para el tratamiento farmacológico del dolor. Na_v1.7 y NaG también pueden representar blancos moleculares útiles para la manipulación farmacológica de neuronas de ganglio de raíz dorsal por su expresión preferencial en estas células (Waxman *et al.*, 1999).

Tabla I. Propiedades de las subunidades α de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje

Nombre	Nombre tradicional	Símbolo genético	Localización cromosomal	Susceptible a TTX	Localización predominante	expresión en GRD
Na_v1.1	Tipo I, rata I, Scn1a, HBSCI	SCN1A	M:2 H:2q24	S	SNC y SNP	+++
Na_v1.2	Tipo II, rata II, HBSCII	SCN2A	M:2 H:2q23-24	S	SNC	+
Na_v1.3	Tipo III, rata III	SCN3A	M:2 H:2q24	S	SNC	-
Na_v1.4	SKM1, μ 1	SCN4A	M:11 H:17q23-25	S	Músculo esquelético	-
Na_v1.5	SKM2, rH1, H1	SCN5A	M:9 H:3p21	R	Músculo cardíaco	-
Na_v1.6	Tipo IV, NaCh6, Na6, PN4, Scn8A	SCN8A	M:15 H:12q13	S	SNC, SNP y glia	+++
Na_v1.7	PN1, hNE, Nas	SCN9A	M:2 H:2q24	S	Células de Schwann de SNP	+++
Na_v1.8	SNS, PN3, NaNG	SCN10A	M:9 H:3p22-24	R	Neuronas sensoriales (SNP)	+++
Na_v1.9	SNS2, NaN, NaT, Scn12A	SCN11A	M:9 H:3p21-24	R	SNP	+++
Na_x	Na _v 2.1, Na _v 2.2, Na _v 2.3, SCL11, NaG	SCN7A	M:2 H:2q21-23	R	Corazón, útero, glia, SNP	+

M: ratón, H: humano. S: susceptible, R: resistente. +++: abundante, +: presente, -: ausente. TTX: tetrodotoxina, GRD: ganglio de raíz dorsal. Tabla tomada de Ogata y Ohishi, 2002.

Está establecido que la expresión de canales de Na⁺ en neuronas no es estático, por el contrario, es un proceso altamente dinámico. Durante el desarrollo, el nivel de expresión de algunos canales de Na⁺ se incrementa, mientras la expresión de otros decreta en la mayoría del Sistema Nervioso (Beckh *et al.*, 1989; Waxman, *et al.*, 1994; Felts *et al.*, 1997). Por lo menos algunos de estos cambios en el desarrollo aparecen como reflejo de efectos regulatorios de neurotrofinas y otros factores de crecimiento sobre la transcripción de varios genes de canales de Na⁺. Las neurotrofinas activan diversos patrones específicos

y complejos de la expresión génica, necesarios para inducir la especialización neuronal y mantener la diferenciación del fenotipo.

Estudios *in vitro* demostraron que el factor de crecimiento neural (NGF) puede afectar la expresión de los canales de Na⁺ en neuronas de ganglio de raíz dorsal (Aguayo y White, 1992). Usando un modelo *in vitro* que asemeja una axotomía, Black *et al.* (1997) mostraron que la liberación directa de NGF a los cuerpos celulares de ganglio de raíz dorsal actúa disminuyendo la regulación del mRNA de Na_v1.3 y mantiene altos los niveles del mRNA de Na_v1.8 en neuronas de ganglio de raíz dorsal. Después de estas observaciones Dib-Hajj *et al.* (1998) estudiaron neuronas de ganglio de raíz dorsal *in vivo* después de una axotomía y demostraron que la administración de NGF exógeno a la región proximal del nervio da como resultado una sobre-regulación de corrientes de Na⁺ resistentes a TTX y de los niveles del mRNA de Na_v1.8.

Parece probable que la expresión de los canales de Na⁺ en neuronas de ganglio de raíz dorsal refleje efectos de combinación de múltiples factores neurotróficos. El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) ha sido estudiado y se ha encontrado que no altera las corrientes de Na⁺ en neuronas de ganglio de raíz dorsal, aunque afecta la expresión de las corrientes mediadas por receptor GABA en estas células (Oyelese *et al.*, 1997). Se ha encontrado que el factor neurotrófico derivado de glia (GDNF) modula la expresión de Na_v1.9 en algunas subpoblaciones de neuronas de ganglio de raíz dorsal, las cuales se sabe expresan el receptor *ret* (Fjell *et al.*, 1999). La expresión de neurotrofinas y el acceso a las pozas periféricas de varias neurotrofinas son alteradas en varias situaciones patológicas asociadas con dolor y esto puede contribuir a la expresión anormal de canales de Na⁺.

IV. Canal de sodio Na_x

En 1992 se aisló y caracterizó un cDNA a partir de una genoteca de cultivos de astrocitos de rata; el cDNA codifica la porción carboxilo terminal de la subunidad α del canal de sodio que se denominó NaG (número de acceso del GenBank M96578) y se demostró mediante ensayos de Northern blot, ensayos de protección a degradación con RNasas e hibridación *in situ* que el mRNA de NaG es expresado en astroglia y células de Schwann derivadas de ganglio de raíz dorsal. *In vivo* el mRNA de NaG es detectado no sólo en cerebro, ganglio de raíz dorsal y nervio ciático, sino también fuera del Sistema Nervioso incluyendo músculo esquelético, cardíaco y pulmón (Gautron *et al.*, 1992). En el mismo año se aisló otro cDNA a partir de músculo esquelético y cardíaco de humano que

codifica la subunidad α del canal de sodio llamado hNa_v2.1 (secuencia de cDNA de ~7.2 kb, número de acceso del GenBank M91556) que se expresa en corazón y en útero; el segmento S4 de este canal presenta diferencias con otros canales de Na⁺ sensibles a voltaje clonados previamente (George *et al.*, 1992b).

En 1994 clonó el cDNA del canal de sodio mNa_v2.3 a partir de la línea celular de tumor atrial AT-1 de ratón y ésta mostró 68 % de identidad a nivel de aminoácidos con la secuencia del canal hNa_v2.1 en regiones funcionalmente importantes como el segmento que forma el poro y el segmento S4 que corresponde al sensor a voltaje en canales de Na⁺ sensibles a voltaje. También se reportó que el mRNA de mNa_v2.3 se expresa en corazón y en útero. La secuencia reportada de cDNA de mNa_v2.3 de 5.4 kb (número de acceso del GenBank L36179) comienza con 251 pb de la región 5' UTR del mRNA, un marco de lectura abierta de 5043 pb, 2 codones de paro (TAA y TGA) y 82 pb que corresponden a la región 3' UTR del mRNA (Felipe *et al.*, 1994). Años después se aisló una clona de cDNA a partir de una genoteca de ganglio de raíz dorsal de rata que codifica una proteína de 195 kDa que se denominó SCL11 (número de acceso del GenBank Y09164), parecida a los canales de Na⁺ sensibles a voltaje; esta proteína presenta 87 % de homología con el canal mNa_v2.3, 72 % con hNa_v2.1 y 98 % con el canal NaG, correspondiendo este cDNA a un splicing alternativo de la subunidad α del canal NaG (Akopian *et al.*, 1997).

Todas estas clonas de cDNA aisladas por diferentes grupos de investigación a partir de diferentes tejidos y organismos se considera ahora que corresponden a la misma isoforma, a la que se ha denominado como canal de sodio Na_x (Goldin *et al.*, 2000). El prefijo Na se refiere al ión al que es permeable y la "x" se refiere a que se desconoce el principal regulador fisiológico de este canal de sodio. La estructura del canal Na_x difiere de las isoformas de la familia Na_v1, presentando menos del 50 % de homología en su secuencia (figura 3).

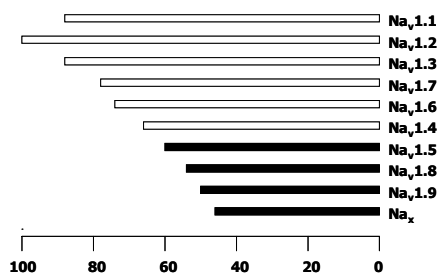


Figura 3. Representación esquemática de la homología a nivel de secuencia de aminoácidos de las subunidades α de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje. La homología de aminoácidos es expresada en % de identidad a la isoforma Na_v1.2. Las isoformas sensibles a TTX están marcadas en barras blancas y las resistentes a TTX están marcadas en barras negras. Esquema tomado de Ogata y Ohishi, 2002.

Originalmente se consideraba que Na_x era un tipo de canal de Na⁺ sensible a voltaje por el porcentaje de identidad que presenta con los canales de la familia Na_v1, es por eso que se trató de expresar funcionalmente en sistemas heterólogos como oocitos de *Xenopus*, células de ovario de hámster (CHO) y células embrionarias 293 de riñón humano (HEK293), sin poder obtener registros electrofisiológicos. Esto se debe a que Na_x difiere con los canales de Na⁺ sensibles a voltaje en regiones clave para la función del canal como lo son el sensor a voltaje y regiones involucradas con la inactivación.

Los segmentos S4 son importantes para sensor el voltaje (Stühmer *et al.*, 1989), el S4 de Na_x es marcadamente diferente a los de la familia Na_v1 (figura 4), ya que Na_x posee un número reducido de residuos de aminoácidos cargados positivamente. Asimismo, el asa que conecta el dominio III con el IV el cual es importante para el proceso de la rápida inactivación esta pobremente conservado (Patton *et al.*, 1992).

Na _x	L	V	Q	L	L	L	L	R	I	I	H	V	L	R	P	G	K	G	P	K	V
Na _v 1.2	L	F	R	V	I	R	L	R	I	G	R	I	L	R	L	I	K	G	A	K	G
Na _v 1.5	L	F	R	V	I	R	L	R	I	G	R	I	L	R	L	I	R	G	A	K	G
Anguila	L	F	R	V	I	R	L	R	I	A	R	V	L	R	L	I	R	A	A	K	G

Figura 4. Secuencia de aminoácidos del segmento S4 del dominio IV del canal Na_x de rata en comparación con otros canales de Na⁺ (rata y anguila eléctrica). Los residuos de aminoácidos de Na_x que no son iguales a los otros residuos de los canales de Na⁺ están encerrados en cajas de color gris. Los residuos con carga positiva están encerrados en cajas blancas. Esquema tomado de Ogata y Ohishi, 2002.

Recientemente se ha demostrado que el canal de sodio Na_x se expresa predominantemente en neuronas y células de Schwann de ganglio de raíz dorsal del Sistema Nervioso Periférico y en menor proporción en pulmón y corazón, mientras que en el Sistema Nervioso Central sólo se expresa en pequeñas subpoblaciones neuronales en el órgano circunventricular, órgano subfornical y laminas terminales del órgano vasculoso (Watanabe *et al.*, 2000). Además, se ha sugerido que Na_x sea una isoforma relacionada con el transporte o absorción de iones Na⁺ ya que es un canal que no se activa por cambios en el voltaje, sino por incremento de la concentración de Na⁺ extracelular teniendo un umbral de activación a una concentración de ~160mM específica para sodio (Hiyama *et al.*, 2002). Esto podría producir una variedad de efectos celulares importantes e indudablemente añade un nuevo mecanismo que diversifica la función de los canales de Na⁺, además, es de resaltar la expresión tan específica del canal de sodio Na_x en neuronas de ganglio de raíz dorsal sin embargo hasta la fecha se desconoce su papel fisiológico en estas células.

En cuanto a la regulación de la expresión del gene del canal de sodio Na_x , Poiraud y colaboradores (1999) caracterizaron recientemente al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata y analizaron los mecanismos de expresión tejido-específica en este canal. Para analizar los mecanismos de expresión aislaron la región 5' correspondiente al gene y mostraron que la transcripción del mRNA de Na_x proviene de un solo promotor con múltiples sitios de iniciación y proponen con estudios en ratones transgénicos, que 600 pb correspondientes a la región proximal del promotor y el primer exón, son suficientes para dirigir la expresión del gene reportero β -galactosidasa en neuronas del Sistema Nervioso Periférico y Central, mientras que la expresión en células de Schwann depende de los elementos contenidos entre la región -6500 y -1050 río arriba de los sitios de iniciación transcripcional; los elementos específicos para la expresión en pulmón están localizados entre la región -1050 y -375. Usando experimentos de footprinting (huella) *in vivo* en neuronas de ganglio de raíz dorsal, sugieren que varias proteínas nucleares se unen en varios sitios en la región proximal al promotor de Na_x .

En un trabajo posterior del mismo grupo de investigación se propone que los niveles del mRNA del gene del canal de sodio Na_x de rata en astrocitos y células de Schwann sea modulado de forma célula-específica por varios factores de crecimiento, hormonas y segundos mensajeros intracelulares (Gautron *et al.*, 2001). Adicionalmente, se observaron cambios importantes en el nivel del mRNA de Na_x en los 2 tipos de glia en respuesta a la activación de la proteína cinasa A y al tratamiento con el factor de crecimiento glial (GGF) indicando la regulación del gene Na_x por señales neurogliales. En sus experimentos de transfección transiente muestran que una pequeña región genómica (construcción -375 pSKT) soporta una alta actividad transcripcional glia-específica, mientras que parte del primer intrón se comporta como un elemento de regulación negativo. Además, reportan que al aumentar los niveles intracelulares de AMPc se observa una reducción en la actividad del promotor de Na_x en astrocitos y un aumento en células de Schwann.

Los resultados de este grupo de investigación son contradictorios, ya que por un lado reportan que en el ratón transgénico con la construcción -375 pSKT no hay expresión en células de Schwann y en el segundo trabajo hacen experimentos de transfección en dos tipos de glia del Sistema Nervioso Periférico (células de Schwann) y Central (astrocitos) obteniendo actividad en ambos. Además, basan sus conclusiones analizando construcciones en las cuales sólo se obtuvo una sola línea de ratones transgénicos que expresaban el transgene en el ratón adulto, teniendo la posibilidad de que se pudiera haber expresado el gene reportero de manera ectópica.

A la fecha no se ha demostrado la participación de algún factor de transcripción que regule la expresión neuronal del promotor del gene del canal de sodio Na_x de rata, es por eso que nuestro trabajo está enfocado a aislar y caracterizar al promotor transcripcional del gene de expresión neuronal Scn7A (que codifica para la subunidad α del canal de sodio Na_x) de ratón para determinar secuencias de DNA genómico que estén involucradas en la regulación del gene, identificando así los elementos de regulación tejido-específica (sitios de unión a factores de transcripción).

Por otro lado, en la base de datos del GenBank está reportada la secuencia de cDNA de 5.4 kb del gene del canal de sodio Na_x de ratón arriba mencionada (Felipe *et al.*, 1994, número de acceso L36179) y también una secuencia de DNA genómico de 6.9 kb (Watanabe *et al.*, 2000, número de acceso AF190472) en la cual se encuentra el exón que contiene el sitio ATG de inicio de la traducción. Como en la secuencia de cDNA reportada por Felipe y colaboradores (1994) sólo está descrita parte de la región 5' UTR del mRNA de Na_x, en nuestro laboratorio S. Arni, 2001 (comunicación personal –datos no publicados), mapeó el extremo 5' del gene del canal de sodio Na_x de ratón mediante ensayos tipo RACE (amplificación rápida de extremos de cDNA) utilizando el kit "5'/3' RACE" (Roche), para identificar la secuencia completa de la región 5' UTR, para lo cual se diseñó un oligonucleótido (de 23 nt) río abajo del sitio de inicio de la traducción ATG (nt 637-660 de la secuencia de DNA genómico reportada por Watanabe *et al.*, 2000), este oligonucleótido se utilizó para la amplificación de cDNA por RT-PCR a partir del mRNA obtenido de ganglio de raíz dorsal de ratón. Como resultado del ensayo de RACE al 5' del mRNA se obtuvieron 6 clonas de cDNA (clonas pCR14, pCR17, pCR24, pBS3, pBS13 y pBS27) de diferente tamaño.

Adicionalmente, Guerrero y Arni, 2001 (comunicación personal –datos no publicados) identificaron 3 clonas BAC (cromosomas artificiales de bacterias) de DNA genómico que contienen al gene del canal de sodio Na_x de ratón. La caracterización de las clonas BAC Na_x-1 (de 135 kb), Na_x-2 (de 110 kb) y Na_x-3 (de 110 kb), se realizó con 3 enzimas de restricción (*Bam*HI, *Eco*RI y *Sac*I) (figura 5 A) y mediante una hibridación tipo Southern utilizando 2 sondas (una perteneciente al principio de la región codificante y la otra correspondiente al exón del extremo 3' del gene del canal Na_x). La sonda perteneciente al principio de la región codificante hibridó en las 3 clonas BAC (figura 5 B) y la sonda correspondiente al extremo 3' del gene Na_x hibridó sólo en las clonas BAC Na_x-1 y Na_x-3 (figura 5 C). Además, para determinar si alguna de las 3 clonas BAC contenía al promotor transcripcional del gene del canal Na_x realizaron otra hibridación tipo Southern para lo cual

utilizaron a la clona RACE pBS3 para sintetizar una sonda de 450 pb que contiene la región 5' UTR del mRNA de Na_x. Se identificó en las clonas BAC Na_x-1 y Na_x-2 un fragmento de 4.1 kb tanto en la restricción con la enzima *EcoRI* como con la enzima *SacI* y un fragmento de 1 kb cuando se cortó con *BamHI* (figura 5 D), sugiriendo la presencia del promotor transcripcional del gene del canal Na_x en estos fragmentos.

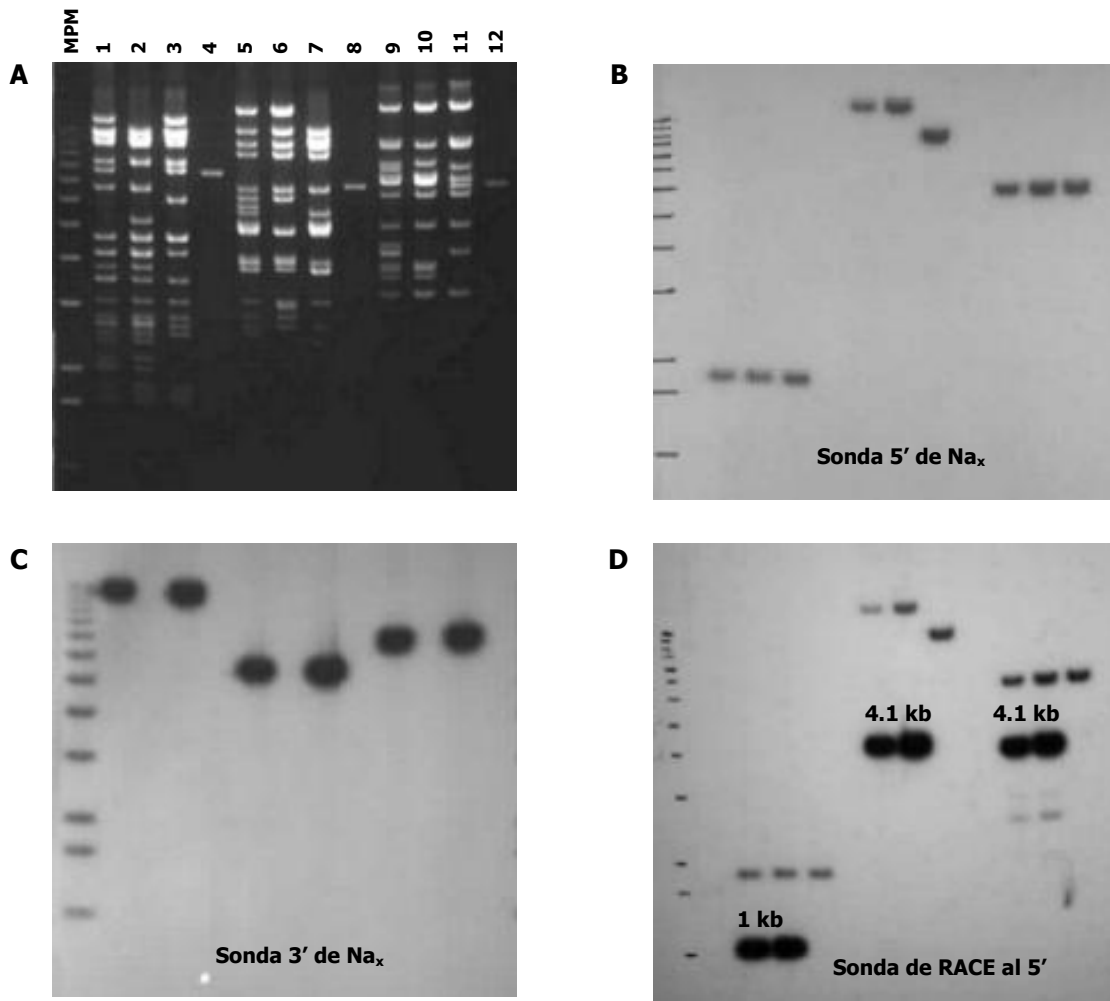


Figura 5. Mapeo de las clonas BAC que contienen al gene del canal de sodio Na_x de ratón. A) Corrimiento en gel de agarosa al 0.8% del DNA de las clonas BAC en el siguiente orden: marcador de peso molecular 1 kb (MPM); carril 1 al 4 clona BAC Na_x-1, Na_x-2, Na_x-3 y pBeloBAC (vector) cortados con la enzima *BamHI*; de los carriles 5 al 8, los mismos DNA's cortados con la enzima *EcoRI*; y del carril 9 al 12 cortados con la enzima *SacI*. **B)** Clonas BAC analizadas por hibridación Southern blot con una sonda del extremo 5' de Na_x (fragmento de 685 pb del exón que contiene el codón ATG), con una sonda del extremo 3' de Na_x (**C**) y con la sonda obtenida a partir de la clona RACE pBS3 (**D**).

V. Mecanismos de transcripción en eucariontes

Desde el descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick (1953) se han realizado estudios sobre la estructura y función de los genes empezando a revelar los misterios de la regulación de su expresión. Durante los últimos años se han realizado investigaciones a nivel molecular de genes de canales iónicos, ya que existen enfermedades en las que estos se ven implicados, así el conocimiento de los mecanismos de regulación de dichos genes proporcionará de pistas muy útiles para entender mejor el mecanismo de acción de las enfermedades asociadas a canales iónicos, además de encontrar nuevos tratamientos.

La expresión de los genes se regula a varios niveles, siendo uno de los más importantes la transferencia de esta información a moléculas de mRNA (Moreno *et al.*, 1999); a este proceso se le llama transcripción y es el proceso celular fundamental que regula el crecimiento, desarrollo, mantenimiento celular y responde a muchos estímulos externos (Locker, 1996).

Los genes eucarióticos se dividen en tres tipos: los genes de la clase I que generan RNA's que forman parte de los ribosomas; los de la clase II cuyos RNA's transportan la información para sintetizar las proteínas (mRNA); y los de la clase III cuyos productos (RNA de transferencia) acarrear los aminoácidos a los ribosomas. La transcripción de cada clase de genes la realizan enzimas específicas llamadas en conjunto RNA polimerasas, a las cuales se les asocia un gran número de proteínas. La complejidad de este proceso es el resultado de la regulación tan fina que ha de ejercerse para mantener la homeostasis intracelular (Moreno *et al.*, 1999).

Los principios básicos que controlan la transcripción en procariontes también son aplicables a los organismos eucariontes. En la mayoría de los casos la transcripción se inicia en un par de bases específico del DNA (sitio +1 o sitio de inicio de la transcripción) o en sitios alternativos a unos pocos pares de bases de distancia. La transcripción es controlada por proteínas (factores de transcripción) que se unen a secuencias de DNA encargadas de la regulación, estas proteínas son equivalentes a los represores y activadores que controlan la transcripción de los sistemas operón en procariontes. Sin embargo, en el control transcripcional de los eucariontes intervienen procesos más complejos que en los procariontes, en particular, los elementos de control del DNA en los genomas eucarióticos a menudo se ubican mucho más lejos del promotor que regulan, en algunos casos, los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes

codificadores de proteínas se fijan a sitios ubicados a decenas de miles de pares de bases hacia el 5' ó hacia el 3' del promotor (Lodish, 2002).

En el proceso de la transcripción participan tanto proteínas como elementos reguladores propios de los genes (Tabla II). Dichos elementos consisten de secuencias nucleotídicas (promotor básico) (figura 6 A) que son reconocidas por factores transcripcionales generales (GTF), estos factores actúan de manera conjunta con activadores transcripcionales gene-específicos que se unen al DNA para regular la actividad de la RNA Polimerasa II (Pol II) durante el inicio de la síntesis del mRNA (Locker, 1996).

Tabla II. Elementos de regulación transcripcional y factores de unión.

Elemento	Factor	
Caja CAAT	NF1/CTF	Se llama así por su secuencia consenso y fue uno de los primeros módulos descritos. Está conservada en varios promotores (pero no en todos). Suele estar situada alrededor de la posición -80, pero puede ejercer su función a distancias muy variables del punto de inicio y se puede encontrar en cualquier orientación.
Caja GC	SP1	Es un activador que se encuentra en muchos promotores y potenciadores, también está involucrado en la unión de elementos de control distantes.
Octámero	Oct-1	Une numerosos factores en tejidos diferentes, algunos ubicuos o algunos tejido-específicos. La secuencia consenso del octámero se encuentra tanto en los promotores como en los potenciadores.
Caja TATA	TBP	Región rica en AT que une a la proteína TBP y da paso a la formación del complejo de inicio de la transcripción (en conjunto con los GTF y la Pol II), usualmente se encuentra a 20-30 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Tabla modificada de Levin, 1994.

Las proteínas que interactúan con la Pol II para llevar a cabo la transcripción generalmente son agrupadas de acuerdo a la función que realizan en este proceso:

- 1) Factores transcripcionales generales (GTF, incluyendo a TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, y los factores generales de elongación SII): estas proteínas en conjunto con la Pol II juegan un papel fundamental en la formación del complejo de iniciación transcripcional y en el proceso de elongación, y además funcionan sin necesidad de moléculas reguladoras y llevan a cabo la transcripción basal de todos los genes de la clase II. La transcripción a nivel basal se presenta en la mayoría de los genes, sin embargo, los requerimientos de síntesis de ciertas proteínas en las células varían, por lo que es necesario que los niveles de transcripción de los genes que codifican estas proteínas se incrementen diferencialmente. La transcripción de estos genes es activada por proteínas que actúan sobre los GTF.
- 2) Proteínas activadoras: son proteínas que se unen directamente al DNA en secuencias específicas del promotor para incrementar la transcripción basal, reconocen secuencias características y al mismo tiempo pueden unir a componentes del complejo de inicio de

la transcripción. Los activadores se encuentran presentes en la mayoría de las células eucarióticas o en ciertos tipos celulares (factores tejido-específicos).

- 3) Coactivadores: funcionan de manera indirecta mediante la unión y modificación de la conformación de los propios activadores o de los GTF para la formación del complejo de inicio de la transcripción (Pugh, 1996). De esta manera se puede explicar cómo con los mismos GTF, que actúan sobre todos los genes en diferentes tipos celulares, se logra inducir niveles de expresión diferentes. Así, la combinación entre diversos activadores y su influencia sobre la maquinaria transcripcional producen niveles de transcripción diferentes, fenómeno que es clave en la regulación de la expresión génica.
- 4) Proteínas represoras: estas proteínas regulan el proceso de transcripción de manera negativa, ya sea bloqueando el acceso de los factores transcripcionales o el de los activadores al promotor o también, uniéndose a secuencias específicas sobre el promotor y actuando directamente sobre el complejo de inicio de la transcripción (Moreno *et al.*, 1999).

Además, existen secuencias localizadas en sitios distantes al promotor, conocidas como potenciadores (enhancers), que incrementan el índice transcripcional del gene al que están asociadas (figura 6 A).

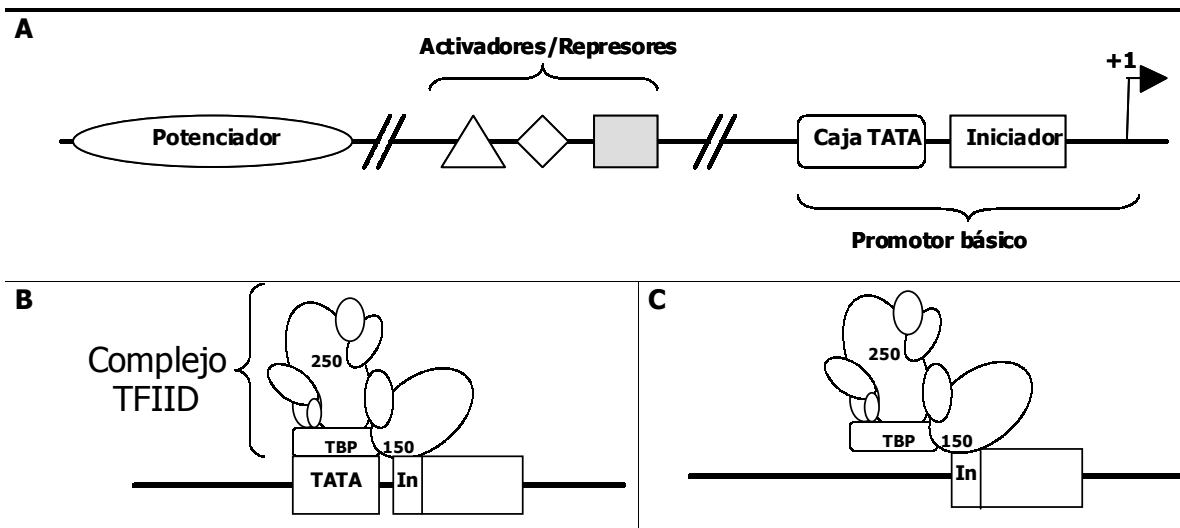


Figura 6. Elementos de la maquinaria transcripcional eucariótica. A) El promotor cuenta con una región básica proximal (caja TATA y el elemento Iniciador) y otra distante que es regulable (activadores y represores); otro elemento de regulación que en ocasiones es tejido-específico es el potenciador que está situado en una región alejada del gene. **B)** Complejo TFIID. La subunidad TBP de la TFIID se une específicamente a la caja TATA que se encuentra río arriba de muchos, pero no de todos los promotores de la Pol II. **C)** Las subunidades TAF_{II}150 y TAF_{II}250 pueden unirse al elemento iniciador. Esquemas modificados de Goodrich *et al.*, 1996.

Complejo de inicio de la transcripción. Dentro de las secuencias que son reconocidas por los GTF destacan la caja TATA. La caja TATA se encuentra localizada normalmente a 25 o 30 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción de muchos genes eucarióticos. De hecho, uno de los primeros ejemplos del reconocimiento del molde de DNA (sitio-específico) por un GTF vino del descubrimiento de que el TFIID puede unirse a las cajas TATA. Estudios subsecuentes identificaron que una sola unidad de el TFIID se une a la caja TATA (esta unidad es denominada proteína de unión a la caja TATA, -TBP) formando así el complejo de iniciación transcripcional (Goodrich *et al.*, 1996).

Una serie de experimentos realizados por Smale y Baltimore (1989) identificaron un segundo elemento perteneciente al promotor, el elemento iniciador. Este elemento fue inicialmente identificado en promotores que no contenían caja TATA (TATA menos), pero subsecuentemente han sido encontrados en muchos promotores de eucariontes superiores (con caja TATA y TATA menos). El iniciador es un elemento pobremente conservado que se encuentra cercano al sitio de inicio de la transcripción.

Una serie de experimentos de footprinting (huella) establecieron que TFIID podría unirse con el elemento iniciador de promotores con caja TATA y TATA menos (Kaufmann y Smale, 1994; Purnell y Gilmour, 1993). Estos resultados indican que un solo GTF, el TFIID, puede reconocer dos elementos distintos del promotor (la caja TATA y el iniciador).

TFIID es un complejo que consiste de nueve subunidades proteicas (figura 6 B), TBP y ocho factores asociados a TBP (TAFs). Como ya se menciono TBP interacciona con la caja TATA, además se ha descrito una subunidad de 150 kDa de TFIID (TAF_{II}150) la cual es suficiente para reconocer y unirse a la secuencia perteneciente al elemento iniciador (figura 6 C). Así, TFIID se puede considerar como un complejo de proteínas que se unen al DNA, formando así el complejo de inicio de la transcripción (Goodrich, *et al.*, 1996). La Tabla III muestra la función de cada GTF:

Tabla III. Componentes del aparato general de transcripción.

Factor	Función
TFIID	Factor de iniciación. TFIID se une al promotor como primer paso de ensamblaje del complejo de preiniciación para formar el sitio de reconocimiento para otros factores de iniciación y para la Pol II.
TFIIB	Factor de iniciación. Une a la Pol II y a TBP. Funciona como conexión entre la Pol II y TFIID o con TBP. Establece el espacio correcto entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción.
TFIIF	Factor de iniciación/elongación. Une a la Pol II. Estabiliza la unión de la Pol II y TFIIB a TFIID en el promotor. TFIIF posee actividad helicasa, misma que abre la doble cadena del DNA en el sitio de inicio de la transcripción, permitiendo a la Pol II utilizar una de las cadenas como molde sobre la cual se sintetizará la molécula de mRNA.
TFIIE	Factor de iniciación. Estabiliza la unión de TFIIF al complejo de preiniciación. TFIIE interactúa con TFIIF y con TFIIF para abrir la doble cadena de DNA.
TFIIH	Factor de iniciación. Tiene actividad de cinasa, ya que ha sido asociada a una ATPasa dependiente de DNA y además tiene actividad de helicasa.
TFIIA	Factor de iniciación. Estimula la transcripción basal cuando TFIID está unido al factor TATA. TFIIA modifica la estructura en la que se encuentra inicialmente el complejo TBP-TAFs y también activa a TBP para que reclute a otros GTF.

Tabla modificada de Locker, 1996.

Al unirse los GTF se da inicio a la elongación de la molécula de mRNA y el complejo de transcripción sufre reacomodos. Por ejemplo, TFIID permanece unido a la región de la caja TATA, los factores TFIIB, A y E son liberados al inicio de la síntesis, mientras que TFIIH lo hace hasta que se han incorporado de 30 a 68 nucleótidos en el transcrito naciente (Zawel *et al.*, 1995).

Es de resaltar que todos los contactos de DNA-proteína en el promotor fueron identificados usando GTF recombinantes y altamente purificados. Bajo estas condiciones el complejo de preiniciación puede ensamblarse (*in vitro*) en el siguiente orden: TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF/Pol II, TFIIE y TFIIH (Goodrich, *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

I. Objetivo general.

Caracterizar funcionalmente al promotor transcripcional del gene neuronal Scn7A de ratón que codifica para el canal de sodio Na_x.

II. Objetivos específicos.

- Clonar el fragmento de DNA genómico de ratón correspondiente al promotor transcripcional del gene del canal de sodio Na_x.
- Secuenciar el fragmento genómico que contiene al promotor de Na_x.
- Transfectar líneas celulares para medir la actividad promotora del fragmento genómico usando a los genes reporteros luciferasa y LacZ.
- Hacer deleciones del fragmento genómico que corresponde al promotor para encontrar la región mínima necesaria para la expresión del gene.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla IV. Descripción de los plásmidos para clonación, vectores de expresión y clonas BAC utilizadas en este trabajo.

PLÁSMIDOS	DESCRIPCIÓN
pBluescript II SK⁺	Vector de clonación (región de clonación múltiple); Ap ^R (Stratagen).
pGL3 Básico	Origen de replicación en <i>E. coli</i> ; contiene el gene reportero luciferasa; carece de secuencias de promotor y potenciadores para una expresión basal de luciferasa en células de mamífero; Ap ^R (Promega).
pGL3 Promotor	Contiene el gene reportero luciferasa; Ap ^R ; y contiene el promotor temprano del virus SV40 (Promega).
pβ-gal Básico	Origen de replicación en <i>E. coli</i> ; contiene el gene reportero LacZ; carece de secuencias de promotor y potenciadores; no expresa niveles significativos de LacZ; Ap ^R (Clontech).
SV40/LacZ	Plásmido pCMVβ al cual se quitó el promotor de citomegalovirus y se substituyó por el promotor del virus SV40 del plásmido pGL3 Promotor; expresa LacZ en células de mamífero; Ap ^R (A. López, 2002).
pCMVβ	Expresa LacZ en células de mamífero a partir del promotor temprano del citomegalovirus y es usado como control de eficiencia de transfección en cotransfecciones con las construcciones que contienen al gene reportero luciferasa; Ap ^R (Clontech).
pNX 3.6 Luc	Fragmento genómico de pMB1 de 3.6 kb (de -3412 a +189) clonado en los sitios de restricción <i>Kpn</i> I/ <i>Nhe</i> I del vector pGL3 Básico (García-Villegas <i>et al.</i> , 2002).
pNX 1.3 Luc	Fragmento genómico de pMB1 de 1.3 kb (de -1145 a +189) clonado en el sitio de restricción <i>Sma</i> I del vector pGL3 Básico (García-Villegas <i>et al.</i> , 2002).
pNX 0.4 Luc	Fragmento genómico de pMB1 de 0.4 kb (de -248 a +189) clonado en el sitio de restricción <i>Hind</i> III del vector pGL3 Básico (García-Villegas <i>et al.</i> , 2002).
CLONAS BAC	DESCRIPCIÓN
Clona BAC Na_x-1	Vector de clonación pBeloBACII; Cm ^R ; fragmento de genoma de ratón de 135 kb (Incyte Genomics).

Tabla V. Líneas celulares y medios de cultivo.

Línea celular	Descripción	No. en ATCC	Medio de cultivo
Neuro 2A	Neuroblastoma de ratón	CCL-131	Medio DMEM*, con 10 % de suero fetal bovino* y suplementado con 1 % ampicilina-estreptomicina*.
NG108-15	Neuroblastoma de ratón	HB-12317	Medio DMEM*, con 10 % de suero fetal bovino*, 1 % de HAT** y con 1 % ampicilina-estreptomicina*.
L6	Mioblasto de rata	CRL-1458	Medio DMEM*, con 10 % de suero fetal bovino* y 1 % de ampicilina/estreptomicina*.

* GIBCO BRL, ** SIGMA.

I. Clonación del fragmento genómico de ratón correspondiente al promotor de Na_x en el sitio de restricción *Eco*RI del vector pBluescript II SK⁺

a) Restricción del plásmido pBluescript II SK⁺ (pBSSK⁺) y de la clona BAC Na_x-1 con la enzima *Eco*RI (New England Biolabs). Se digirieron 5 μg de DNA del plásmido pBSSK⁺ con la enzima *Eco*RI (5 U/μg de DNA) durante 1 h a 37° C en 12.5 μl de volumen final. Posteriormente se corroboró la digestión del plásmido por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % (40 min, 100 V), el cual se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó y fotografió con el programa "GeneSnap" (SYNGENE).

Después, el plásmido pBSSK⁺ cortado con *EcoRI* se defosforiló con 1 U de la enzima fosfatasa alcalina (CIAP -GIBCO BRL) durante 30 min a 37° C (condiciones para extremos cohesivos) en un volumen final de 50 µl. Luego se inactivó la enzima a 75° C durante 10 min en presencia de EDTA (a una concentración final de 5 mM) y el DNA se limpió con una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con etanol.

Por otro lado, se digirieron 2 µg de DNA de la clona BAC Na_x-1 (fragmento de genoma de ratón de 135 kb) con la enzima *EcoRI* (10 U/µg de DNA) adicionados con espermidina (25 mM); esta mezcla se incubó durante toda la noche a 37° C en 20 µl de volumen final. Se comprobó la digestión por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % y posteriormente se limpió el DNA con una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con etanol.

b) Ligación del vector pBSSK⁺/*EcoRI* con BAC Na_x-1/*EcoRI*. Se ligaron 200 ng del vector pBSSK⁺/*EcoRI* (defosforilado) con 1 µg de la clona BAC Na_x-1 cortada con *EcoRI*, siguiendo las indicaciones descritas para la enzima T4 DNA ligasa (GIBCO BRL) para extremos cohesivos.

c) Transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5α (GIBCO BRL) con la mezcla de la ligación. Se incubaron 200 µl de bacterias competentes DH5α en hielo durante 30 min con 10 µl de la mezcla de la ligación. Inmediatamente después, se transfirieron a un baño maría a 42° C por 45 segundos y finalmente se incubaron en hielo por 2 min. A las bacterias transformadas se les adicionaron 800 µl de medio LB (medio Luria-Bertani)¹ y se incubaron en agitación constante a 37° C durante 1 h. De esta transformación se sembraron 4 placas (con 200 µl c/u) de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37° C por toda la noche.

¹ Composición por litro del medio LB: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y para medio sólido se agregó 15 g de agar, por ultimo el pH fue ajustado a 7.0 con NaOH 5 N.

II. Identificación del DNA plasmídico de las colonias bacterianas transformadas con pBSSK⁺/*EcoRI* + BNa_x-1/*EcoRI*

a) Transferencia de las colonias a discos de nylon. Se realizó la transferencia de las colonias obtenidas de la clonación de los diferentes fragmentos *EcoRI* de la clona BAC Na_x-1 a discos de nylon (Boehringer Mannheim). Primero, sobre una de las caras de cada disco de nylon se le realizaron marcas asimétricas, después se colocó cuidadosamente cada disco de nylon sobre la superficie de la placa de agar (cada disco se colocó por el lado que

no tiene marcas sobre las colonias) y una vez colocado el disco se marcaron las cajas sobre las mismas marcas de cada disco teniendo así la orientación de los discos con respecto a las cajas; 5 min después se retiraron los discos y sobre una superficie plana se colocaron 3 pedazos de papel filtro. El primer pedazo fue humedecido con solución desnaturalizante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), el segundo con solución neutralizante (1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7.4) y el tercero con solución 2 X SSC (Solución 20 X SSC: 3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio, pH 7.0). Los discos de nylon se colocaron en cada una de las soluciones 5 min aproximadamente (de tal forma que el lado donde están las colonias bacterianas quede hacia arriba), dejando así el DNA desnaturalizado y expuesto, y éste se fijó en los discos por entrecruzamiento con rayos UV en un entrecruzador "Hybrilinker HL-2000" (UVP Laboratory Products). Después de este procedimiento los discos se lavaron con solución 2 X SSC para eliminar los restos celulares.

b) Prehibridación e hibridación de los discos de nylon. Los discos de nylon se transfirieron a un tubo de hibridación con la solución de prehibridación (1.12 ml de 20 X SSPE, 1.5 ml de SDS al 10 %, 0.75 ml de leche descremada al 10 % y 10.7 ml de agua desionizada) que fue calentada previamente a 65° C aproximadamente y también se agregó 0.9 ml de DNA de esperma de salmón (3.5 mg/ml) que fue calentado a 100° C por 5 min y después enfriado en hielo. Todo esto se incubó en un horno de hibridación a 65° C por 1 h y una vez concluido el tiempo se desechó la solución de prehibridación y se adicionó al tubo la solución de hibridación (560 µl de 20 X SSPE, 750 µl de SDS al 10 %, 350 µl de leche descremada al 10 % y 5 ml de agua desionizada, -solución precalentada a 65° C); además a esta solución se le agregaron 450 µl de DNA de esperma de salmón (3.5 mg/ml) y 1×10^6 cpm/ml de la sonda de 450 pb² (Guerrero y Arni, 2001 –comunicación personal) (ambos desnaturalizados a 100° C por 10 minutos). Esta mezcla se incubó a 65° C por toda la noche y al día siguiente se retiró la solución de hibridación y se hicieron lavados con la solución 2 X SSC, SDS al 0.1 % a temperatura ambiente por 10 min; después a 65° C por 20 min; y finalmente se lavó dos veces con la solución 0.2X SSC, SDS 0.1% a 65° C por 20 min. Los cuatro discos se envolvieron en plástico (kleen pack) de tal forma que no perdieran humedad y se colocaron en un cassette de autoradiografía junto con una película Kodak la cual se expuso 24 h.

² El cDNA de la clona pBS3 del ensayo de RACE al 5' del mRNA del gene del canal Na_x de ratón se utilizó para sintetizar una sonda radioactiva utilizando el kit "Random Primed DNA Labeling" (Roche) y la sonda se marcó con dCTP [α^{32} P].

c) Identificación de las clonas. Al revelar la película de autorradiografía se identificaron 6 colonias positivas en los cuatro discos. Con esto se ubicaron las colonias con la

orientación de los discos y de las cajas que antes ya se había realizado. Ya ubicadas las colonias se transfirieron cada una por separado a tubos con 5 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37° C por toda la noche con agitación. Posteriormente se aisló el DNA mediante la técnica de lisis alcalina para la extracción de DNA plasmídico y las muestras se digirieron con la enzima *EcoRI* para determinar que las 6 clonas tenían el mismo inserto (fragmento de 4.1 kb de la BAC Na_x-1 y el vector pBSSK⁺ de 3 kb). La digestión se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

d) Análisis de restricción para verificar la orientación del fragmento genómico. Se digirió el DNA de las 6 clonas con las enzimas *BglII*, *HindIII*, *NheI*, *SacI*, *XhoI* y *BamHI* (New England Biolabs) para obtener la orientación del fragmento genómico de 4.1 kb en el plásmido y posteriormente se escogió una clona que se denominó **pMB1** de 7.1 kb.

III. Secuenciación del fragmento genómico de 4.1 kb

a) Obtención de DNA plasmídico de pMB1. Con el plásmido pMB1 se transformaron bacterias competentes DH5 α ; con esta transformación se sembró una placa de medio LB/ampicilina (100 µg/ml) y de la placa con las colonias transformadas se tomó una colonia, que se inoculó en 50 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37° C con agitación durante toda la noche. El DNA del plásmido se aisló mediante el kit "High Purity Plasmid Midiprep Purification Systems" (GIBCO BRL), utilizando este kit se obtuvo DNA suficientemente puro para el proceso de secuenciación.

b) Secuenciación del fragmento genómico de 4.1 kb de pMB1. Se midió la concentración del DNA de pMB1 por espectrofotometría y para la reacción de secuenciación se utilizó el kit "ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v2.0" (Applied Biosystems) en un volumen total de 20 µl. El reactivo BigDye consiste de terminadores marcados con un compuesto fluorescentes (terminador A marcado con dicloro[R6G], C marcado con dicloro[ROX], G marcado con dicloro[R110] y T marcado con dicloro[TAMRA]), estos terminadores contienen un donador de fluoresceína que se une al aceptor diclororodamina ya que con este kit la reacción de secuenciación esta basada en fluorescencia. Este reactivo cuenta además con deoxinucleósidos trifosfatos (dATP, dCTP, dITP en lugar de dGTP y dUTP en lugar de dTTP) y con la enzima AmpliTaq DNA polimerasa (una variante de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*) que permite la síntesis de DNA *in vitro* a partir de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para llevar a cabo este proceso el fabricante recomienda 25 ciclos, cada ciclo dividido en tres fases: la primera es a 96° C (10 seg), aquí el DNA de los plásmidos

que sirvieron como moldes se desnaturalizan; el segundo paso es a 50° C (5 seg), a esta temperatura el oligonucleótido se alinea con el DNA templado; y por ultimo a 60° C (4 min), la polimerización del DNA de cadena sencilla gracias a la incorporación de los deoxinucleósidos (marcados) por la AmpliTaq DNA polimerasa. Inicialmente, para las reacciones se utilizaron 500 ng del DNA del plásmido pMB1, 4 µl del reactivo BigDye Terminator, 1 µl de los oligonucleótidos T3 ó T7 (10 pmol) que se unen a la secuencia de pBSSK⁺ y se completan los 20 µl con agua milliQ estéril, las reacciones se amplificaron en un termociclador "GeneAmp PCR System 2400" (Applied Biosystem).

Los productos de PCR se trataron con columnas de purificación "Post Reaction Purification Columns" (SIGMA) para eliminar los nucleótidos fluorescentes no incorporados y las muestras se evaporaron en un Speed Back para posteriormente mandar a analizarlas en la Unidad de Secuenciación del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

c) Subclonación de pMB1. Se realizó la subclonación del plásmido pMB1 como una estrategia para agilizar el proceso de secuenciación del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb. Primero se digirió 1 µg de DNA del plásmido pMB1 con la enzima *Hind*III, después se corroboró la digestión del plásmido por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %, luego se inactivó la enzima a 65° C durante 20 min y por ultimo se religó el plásmido con la enzima T4 DNA ligasa (GIBCO BRL) en condiciones para extremos cohesivos, deletando así un fragmento de 3.2 kb del extremo 5' del fragmento genómico de ratón y generando la construcción pMB1-*Hind*III, que contiene 0.9 kb pertenecientes al extremo 3' del fragmento genómico de ratón.

Posteriormente para generar la construcción pMB1-*Sac*I, se realizó la digestión de 1 µg de DNA del plásmido pMB1 con la enzima *Sac*I, después de inactivar la enzima el plásmido se religó con la enzima T4 DNA ligasa, deletando 2.7 kb del extremo 3' del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb. Esta construcción contiene 1.4 kb del extremo 5' del fragmento genómico de ratón.

d) Diseño de oligonucleótidos para secuenciación. Conforme se generaba la secuencia del DNA del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb clonado en pMB1, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla VI) para continuar secuenciando el DNA del fragmento genómico de 4.1 kb en ambas cadenas. Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa Vector NTI Suite (v.7) con un tamaño de aproximadamente 20 nt, una temperatura media de fusión cercana a los 50° C y con al menos 50 % de contenido de las bases G-C.

Tabla VI. Oligonucleótidos diseñados para secuenciar el fragmento genómico de DNA de ratón de pMB1.

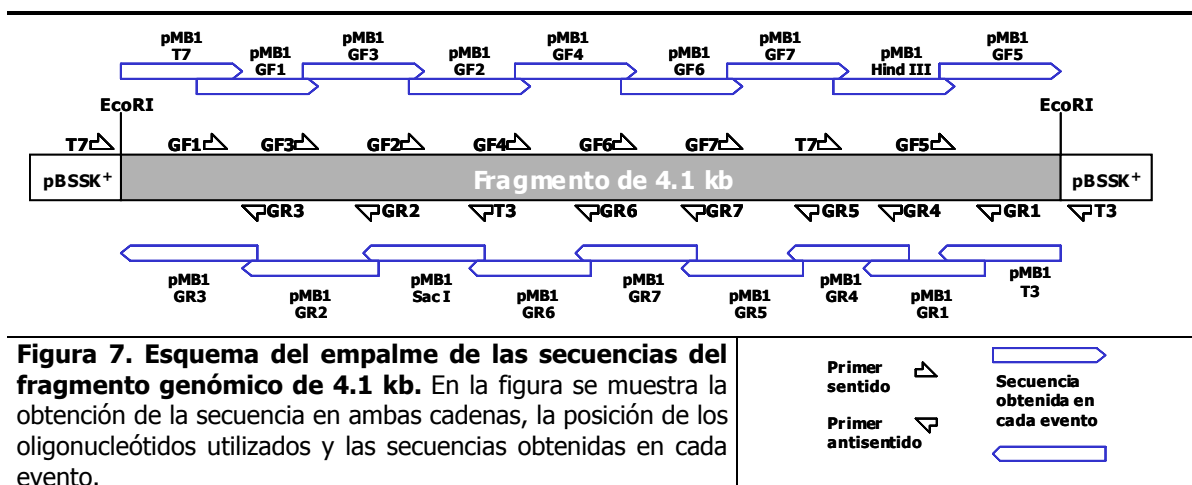
Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	% de G-C	*Tm
GF1	TTCTA TGCAC CTCCC TGATG C	52.4	54.1
GF2	GCACT GCTAA TGAGT GTAGG T	47.6	46.2
GF3	GTGAT CCCAG GTCAA ATGGC	55.0	54.0
GF4	CCCAT ATTCT TTGTG TTGCC C	47.6	53.5
GF5	TCAAT ATCAG CCGCC CACGC	60.0	60.4
GF6	GCATC TTCAG GAACA GGGTC	55.0	50.9
GF7	GGATT GTGTT GGTAA GCATG GC	50.0	55.8
GR1	TGGGC TTGTC TTCTC AGATC	50.0	49.0
GR2	ACTGG GTTTA CATCG CAAGG	50.0	51.7
GR3	AAAAC TACAC CTGG GCTTC A	42.9	50.8
GR4	GTCGG TCAAG GGGGA TTAGG	60.0	54.7
GR5	CCCTG GAAGA TAAGT GAGGC	55.0	50.4
GR6	GTCCC AAACC TAGTA CCCAA C	52.4	49.5
GR7	CCATG CTTAC CAACA CAATC C	47.6	52.0

Los oligonucleótidos "sentido" para secuenciar al fragmento genómico de ratón de 4.1 kb están marcados como GF y los "antisentido" como GR. * Tm= temperatura media de fusión.

IV. Análisis de secuencias

La secuencia del fragmento de 4.1 kb se analizó en el programa Vector NTI Suite (v.7).

a) Empalmes. Las secuencias obtenidas de la Unidad de Secuenciación del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN tuvieron un tamaño promedio de 500 nt. Para poder empalmar todas las secuencias del fragmento genómico de 4.1 kb en las dos cadenas se utilizó el programa "ContingExpress" de la paquetería Vector NTI Suite (v.7). El empalme final de las secuencias realizadas se muestra en la siguiente figura:



b) Alineamientos. Al tener completa la secuencia del fragmento de 4.1 kb se realizaron alineamientos con el programa "AlignX" de la paquetería Vector NTI Suite (v.7). Se alineó la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con las secuencias de cDNA de las 6 clonas del ensayo RACE al 5' del mRNA de Na_x de ratón (S. Arni, 2001, comunicación personal –datos no publicados) y además con la secuencia del cDNA del canal Na_x de ratón (Felipe *et al.*, 1994) con número de acceso en el GenBank L36179.

También se realizaron alineamientos de la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con la secuencia del promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata (Poiraud *et al.*, 1999) con número de acceso en el GenBank AF125160.

V. Clonación del promotor de Na_x en el vector pβ-gal Básico

a) Construcción del plásmido pMB 3.6 β-gal. Se digirieron 5 μg del DNA del plásmido pβ-gal Básico (Clontech) con las enzimas *KpnI* y *NheI* (5 U/μg de DNA) durante 1 h a 37° C en 20 μl de volumen final, después se corroboró la digestión del plásmido en un gel de agarosa al 0.8 % y posteriormente el DNA se limpió con una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con etanol.

Por otro lado, se digirieron 5 μg de DNA del plásmido pNX 3.6 Luc (García-Villegas *et al.*, 2002) con las mismas enzimas y se comprobó la restricción por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %. Después se limpió el DNA con una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con etanol y posteriormente se realizó una electroforesis de la muestra en un gel de agarosa al 0.8 % y se purificó la banda de 3.6 kb (del sitio –3412 a +189) del gel, utilizando el kit "Prep-A-Gen" (BIO RAD).

Después, se ligaron 10 ng de pβ-gal Básico-*KpnI/NheI* con 50 ng del fragmento de 3.6 kb, siguiendo las indicaciones descritas para T4 DNA ligasa (condiciones para extremos cohesivos). Con 10 μl de esta mezcla se transformaron bacterias competentes *E. coli* XL10 GOLD (GIBCO) las cuales se crecieron en placas de medio LB/ampicilina (100 μg/ml) a 37° C durante toda la noche. Se tomaron 10 colonias al azar, de estas se aisló DNA por medio de la técnica de lisis alcalina y las muestras se digirieron con la enzima *HindIII* para identificar la orientación del fragmento de 3.6 kb en el plásmido. Las muestras con el patrón de restricción esperado se denominaron pMB 3.6 β-gal (figura 8).

b) Construcción de la deleción pMB 1.3 β-gal. El DNA del plásmido pβ-gal Básico se digirió con la enzima *SmaI* (5 U/μg de DNA) durante 1 h a 25° C (esta enzima deja

extremos romos), y el DNA del plásmido pNX 3.6 Luc (García-Villegas *et al.*, 2002) con las enzimas *Nco*I y *Nhe*I (5 U/ μ g de DNA). En una electroforesis del plásmido pNX 3.6 Luc-*Nco*I/*Nhe*I se purificó la banda de 1.3 kb (del sitio -1145 a +189) del gel, utilizando el kit "Prep-A-Gen" (BIO RAD). Este fragmento de 1.3 kb se reparó con 1 U de la enzima Klenow (New England Biolabs) adicionando 1 μ l de cada dNTP (0.5 mM) incubando esto a 30° C durante 15 min y posteriormente la enzima se inactivó a 75° C por 10 min.

Se realizó la ligación de 10 ng de p β -gal Básico-*Sma*I con 50 ng del fragmento de 1.3 kb (*Nco*I/*Nhe*I -reparado con Klenow) y con esta mezcla se transformaron bacterias competentes DH5 α y se identificaron las recombinantes con la enzima de restricción *Hind*III, esto también con la finalidad de verificar la orientación del inserto en el plásmido.

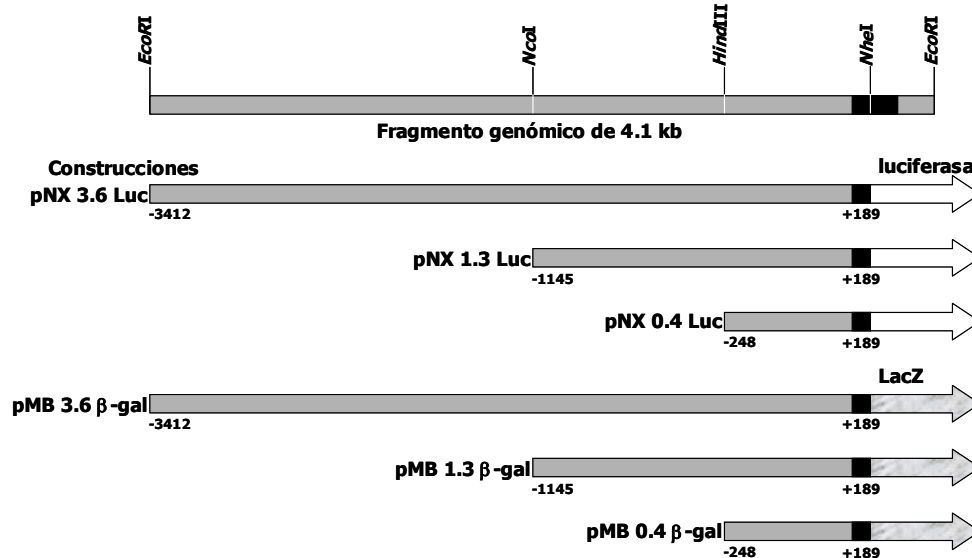


Figura 8. Clonación de diferentes fragmentos genómicos que contienen al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón en los plásmidos pGL3 Básico y p β -gal Básico. En la parte superior del esquema se muestra el fragmento genómico de 4.1 kb donde se indican los sitios de restricción que se utilizaron para generar las deleciones y el exón 1 (caja negra), y en la parte inferior se observan las construcciones que contienen a los genes reporteros luciferasa ó LacZ.

c) Construcción de la deleción pMB 0.4 β -gal. El DNA del plásmido p β -gal Básico y pNX 3.6 Luc se digirieron con la enzima *Hind*III (5 U/ μ g de DNA) durante 1 h 37° C. En una electroforesis del plásmido pNX 3.6 Luc/*Hind*III se purificó la banda de 0.4 kb (del sitio -248 a +189) con el kit "Prep-A-Gen" (BIO RAD). La ligación se realizó con 20 ng de p β -gal Básico-*Hind*III y 30 ng del fragmento de 0.4 kb y con esta mezcla se transformaron bacterias competentes DH5 α . Las bacterias recombinantes se identificaron con la enzima de restricción *Nhe*I.

Para poder llevar a cabo los ensayos de transfección transiente se obtuvieron dos preparaciones independientes de cada construcción y el DNA se aisló utilizando el kit "Plasmid Purification System" (QIAGEN); mediante este kit se obtuvo DNA suficientemente puro para los ensayos de transfección.

VI. Ensayos de transfección transiente

a) Cultivos celulares. Para los ensayos de transfección transiente se utilizaron las líneas celulares Neuro 2A, NG108-15 y L6 (Tabla V). Los cultivos celulares se mantuvieron en cajas de 10 centímetros de diámetro a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂, en su medio de cultivo correspondiente y las células fueron resembradas cada 3-4 días. Para resembrar las células, primero se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos salinos (PBS) y a cada caja se le agregó 500 µl de tripsina-EDTA (GIBCO BRL) e inmediatamente se incubaron a 37° C (5-10 min) para que las células se despegaran de la caja. Después para disgregar completamente las células se agregó 4.5 ml de medio de cultivo, de esta mezcla se tomó 0.5 ml y se sembró en 9.5 ml de medio de cultivo, esto se incubó en las condiciones ya mencionadas.

b) Transfección de la línea celular Neuro 2A con las construcciones con el gene reportero luciferasa. Los cultivos celulares de Neuro 2A se utilizaron al 80 % de confluencia y el día anterior a la transfección se resembraron las células de 2 cajas de cultivo de 10 centímetros de diámetro, luego las células de cada caja se resuspendieron en 50 ml en medio de cultivo y de la suspensión celular se sembraron 2 ml en cada pozo en cajas de cultivo de 6 pozos. Posteriormente las células se incubaron y al día siguiente se realizó la transfección.

Cada construcción se cotransfectó con una cantidad constante (200 ng) del plásmido pCMVβ que contiene el gene reportero LacZ para estandarizar la eficiencia de la transfección. Como controles se utilizaron los plásmidos pGL3 Básico el cual expresa niveles basales de luciferasa y pGL3 Promotor el cual contiene el gene reportero luciferasa bajo la transcripción del promotor del virus SV40 (Tabla IV –Plásmidos). Para la transfección se utilizaron 6 µl de lipofectamina 2000 (GIBCO BRL) por cada 3 µg de DNA (esta cantidad es utilizada por pozo en cajas de cultivo de 6 pozos). Como punto de referencia se tomó al plásmido de mayor tamaño (del cual se utilizaron 3 µg para la transfección) y con base a esto, los demás plásmidos se utilizaron en una relación molar 1:1 con el plásmido de mayor tamaño. Para utilizar la misma cantidad de DNA por

transfección se completó con el plásmido pBSSK⁺, el cual no interfiere en la medición de los genes reporteros. La relación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla VII. Transfección en Neuro 2A con las construcciones que contienen al gene reportero luciferasa.

Plásmido	Tamaño (kb)	Cantidad		pBluescript II SK ⁺		pCMVβ
		(μg)	(μl)*	(μg)	(μl)*	
pNX 3.6 Luc	8.4	3	6	---	---	200 ng
pNX 1.3 Luc	6.1	2.17	4.34	0.83	1.66	
pNX 0.4 Luc	5.2	1.85	3.7	1.15	2.3	
pGL3 Básico	4.8	1.71	3.42	1.29	2.58	
pGL3 Promotor	5	1.77	3.54	1.23	2.46	

Para la transfección se utilizaron dos preparaciones independientes de cada plásmido por duplicado. *El DNA de todos los plásmidos se llevó a una concentración de 0.5 μg/μl.

Al DNA de cada muestra se agregaron 250 μl de medio DMEM sin suero y después por muestra se preparó otro tubo al cual se adicionaron 250 μl de medio DMEM sin suero y 6 μl de Lipofectamina 2000 (esto se mezcló en el vortex y se incubó 5 min a temperatura ambiente). Después, cada muestra (DNA+DMEM) se combinó con la mezcla DMEM+Lipofectamina y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min, para que se formaran los complejos DNA-Lipofectamina.

Posteriormente, se adicionaron los complejos de DNA-Lipofectamina (500 μl) de cada muestra directamente sobre las células de cada pozo y se mezcló suavemente (todo este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad); después se incubaron las células por un periodo de 48 h.

Para la transfección de las líneas celulares NG108-15 y L6 con los plásmidos pNX 3.6 Luc, pNX 1.3 Luc y pNX 0.4 Luc, se siguió el mismo procedimiento empleado en la línea celular Neuro 2A.

c) Transfección de la línea celular Neuro 2A con las construcciones con el gene reportero β-galactosidasa y tratamiento con dibutilil AMP cíclico (db AMPc). El día anterior de la transfección se sembraron las células de 2 cajas de 10 centímetros de diámetro, luego las células de cada caja se resuspendieron en 50 ml en medio de cultivo y de la suspensión celular se sembraron 5 ml en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro. Posteriormente las células se incubaron para realizar la transfección al día siguiente.

Para la transfección se utilizaron 12 μl de lipofectamina 2000 (GIBCO BRL) por cada 6 μg del DNA (cantidad utilizada para cajas de cultivo de 60 mm de diámetro). Como controles se utilizaron los plásmidos pβ-gal Básico que expresa niveles basales del gene reportero LacZ y la construcción SV40/LacZ (A. López, 2002) que expresa LacZ bajo el

control del promotor SV40. Cada plásmido fue cotransfectado con una cantidad constante (200 ng) del plásmido pGL3 Promotor con el reportero luciferasa (Promega) para estandarizar la eficiencia de la transfección. La relación de cada plásmido en la transfección se muestra en la siguiente tabla:

Tabla VIII. Transfección en Neuro 2A con las construcciones que contienen al gene reportero LacZ.

Plásmido	Tamaño (kb)	Cantidad		pBluescript II SK ⁺		pGL3 Promotor
		(μ g)	(μ l)*	(μ g)	(μ l)*	
pMB 3.6 β -gal	11.1	6	12	---	---	200 ng
pMB 1.3 β -gal	8.8	4.76	9.52	1.24	2.48	
pMB 0.4 β -gal	7.9	4.27	8.54	1.73	3.46	
P β -gal Básico	7.5	4.05	8.1	1.95	3.9	
SV40/LacZ	6.7	3.62	7.24	2.38	4.76	

Para la transfección se utilizó una preparación de cada plásmido por duplicado. *El DNA de todos los plásmidos se llevó a una concentración de 0.5 μ g/ μ l.

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, al DNA de cada muestra se agregaron 500 μ l de medio DMEM sin suero y por otro lado 500 μ l de medio DMEM sin suero y 12 μ l de Lipofectamina 2000 para formar los complejos DNA-Lipofectamina (1000 μ l), los cuales se adicionaron directamente sobre las células de cada caja de cultivo (mezclando suavemente) y después esto se incubó por un periodo de 4 h. Posteriormente, los cultivos fueron tripsinados y divididos en 2 (resuspendiendo cada muestra en 4 ml de medio de cultivo y sembrando en 2 pozos, con 2 ml cada uno en una caja de cultivo de 6 pozos) y a uno de ellos se le agregó 20 μ l de db AMPc (concentración final de 1 mM) y el otro se mantuvo en las mismas condiciones. Las células se incubaron por un periodo de 36 h.

VII. Ensayo de la actividad de luciferasa y de β -galactosidasa

a) Ensayo de luciferasa. Se utilizó el kit "Luciferase Assay System" (Promega) que consiste en: Substrato luciferasa (liofilizado), buffer luciferasa y buffer de lisis 5 X. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para la preparación de las soluciones para la medición del gene reportero, indicado en la siguiente tabla:

Tabla IX. Soluciones para la medición del gene reportero luciferasa

Solución de Lisis 1 X	Mezclar 4 volúmenes de agua con 1 volumen de buffer de lisis 5 X.
Solución de ensayo luciferasa	Se mezcló el substrato luciferasa con el buffer luciferasa.

Primero, de las células transfectadas se removió todo el medio de cultivo por aspiración y las células se lavaron 2 veces con PBS 1 X. Después se removió todo el buffer y a cada pozo se le agregaron 200 μ l de solución de lisis 1 X (Tabla IX), manteniendo las

cajas en agitación con rotación suave durante 15 min. Posteriormente se rasparon las células y se transfirió el lisado de cada muestra a un tubo de microcentrífuga (manteniendo el lisado en hielo ó a -70° C durante 15 min), luego se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 2 min a 4° C y se transfirió el extracto celular (sobrenadante) a un tubo nuevo.

Para la medición de la actividad de luciferasa se utilizó el luminómetro TD-20/20 (TURNER DESIGNS) en condiciones estándar (tiempo de integración 10 seg y un nivel de sensibilidad de 52.4 %). Para cada muestra se mezclaron 20 μ l del extracto celular con 100 μ l de solución de ensayo de luciferasa (Tabla IX).

Las mediciones de la actividad de luciferasa se normalizaron con la actividad de β -galactosidasa del plásmido pCMV β y los resultados se muestran como el promedio \pm el error estándar (\pm E. S.) de dos preparaciones independientes de cada construcción por duplicado y se expresa como el múltiplo de la actividad basal obtenida con el plásmido pGL3 Básico (Promega).

b) Ensayo de β -galactosidasa. El ensayo se realizó con el kit “ β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent” (Roche). El contenido del kit es el siguiente: sustrato β -Gal, buffer de ensayo, enhancer, solución de iniciación, inhibidores de proteasa y buffer de lisis 5 X (para el extracto celular).

Tabla X. Preparación de las soluciones para la medición del gene reportero β -galactosidasa

Solución 1. Sustrato.	Mezclar 1 volumen del sustrato β -Gal con 99 volúmenes del buffer de ensayo.
Solución 2. Reactivo de iniciación.	Mezclar 1 volumen de enhancer con 5 volúmenes de solución de iniciación.
Solución 3. Reactivo de lisis 1 X.	Mezclar 4 volúmenes de agua con 1 volumen de buffer de lisis 5X, además disolver una tableta del inhibidor de proteasas.

Se obtuvo el extracto celular con el reactivo de lisis 1 X como se describió anteriormente y para cada muestra se mezclaron 50 μ l de la solución 2 (reactivo de iniciación –Tabla X) más 50 μ l del extracto celular con 100 μ l de la solución 1 (sustrato). La reacción se midió en el luminómetro TD-20/20 (TURNER DESIGNS) a un nivel de sensibilidad de 52.4 % y un tiempo de integración de 5 seg.

Las mediciones de la actividad de β -galactosidasa se normalizaron con la actividad de luciferasa del plásmido pGL3 Promotor obtenida en la misma muestra. Los resultados se muestran como el promedio de una preparación de cada construcción por duplicado y se expresa como el múltiplo de la actividad basal obtenida con el plásmido p β -gal Básico.

RESULTADOS

I. Mapeo del extremo 5' del mRNA de Na_x

En la base de datos del GenBank se encuentra reportada una secuencia de cDNA del canal de sodio Na_x de ratón (Felipe *et al.*, 1994) con número de acceso L36179, que corresponde a: 251 pb de la región 5' no traducida (5' UTR) del mRNA de Na_x, un marco abierto de lectura (ORF –open reading frame) de 5043 pb, 2 codones de paro (TAA y TGA) y 82 pb que pertenecen a la región 3' UTR del mRNA de Na_x. También está reportada la secuencia de DNA genómico de 6.9 kb (Watanabe *et al.*, 2000) con número de acceso AF190472 que contiene al exón "1" reportado por Felipe y colaboradores (1994) donde inicia la región codificante del canal de sodio Na_x de ratón.

En nuestro laboratorio, S. Arni, 2001 (comunicación personal –datos no publicados), realizó ensayos tipo RACE al 5' para determinar el extremo 5' del mRNA del gene del canal de sodio Na_x de ratón. Como resultado del ensayo se obtuvieron 6 clonas de cDNA (clonas pCR14, pCR17, pCR24, pBS3, pBS13 y pBS27) de diferente tamaño que corresponden a múltiples sitios de inicio de la transcripción del mRNA de Na_x. Todas las clonas de cDNA se secuenciaron y en este trabajo se secuenciaron las clonas RACE pCR14 (de 519 pb), pCR24 (de 363 pb) y pBS27 (de 183 pb).

Los datos obtenidos de la secuenciación de las clonas RACE pCR14, pCR24 y pBS27, junto con la secuencia de las otras 3 clonas RACE se alinearon con la secuencia L36179 del GenBank usando el programa "AlignX" de la paquetería Vector NTI Suite (v.7) (figura 9). Encontramos que las primeras 36 pb de las 251 pb de la región 5' UTR del mRNA de Na_x reportadas por Felipe y colaboradores (1994) no presentan homología con las secuencias de cDNA de las clonas RACE al 5' (probablemente las 36 pb pertenezcan al vector donde clonaron al cDNA), las siguientes 215 pb de la región 5' UTR y el principio de la región codificante (codón "ATG" de inicio de la traducción) reportadas por Felipe y colaboradores (1994) presentan homología con las clonas RACE. La parte 5' de las clonas RACE secuenciadas corresponden a la región 5' UTR del mRNA del canal Na_x de ratón, secuencia que no había sido identificada. De aquí en adelante, definimos al sitio +1 del transcrito de Na_x en el extremo 5' de la clona RACE de mayor tamaño (clona pCR14) (figura 9).

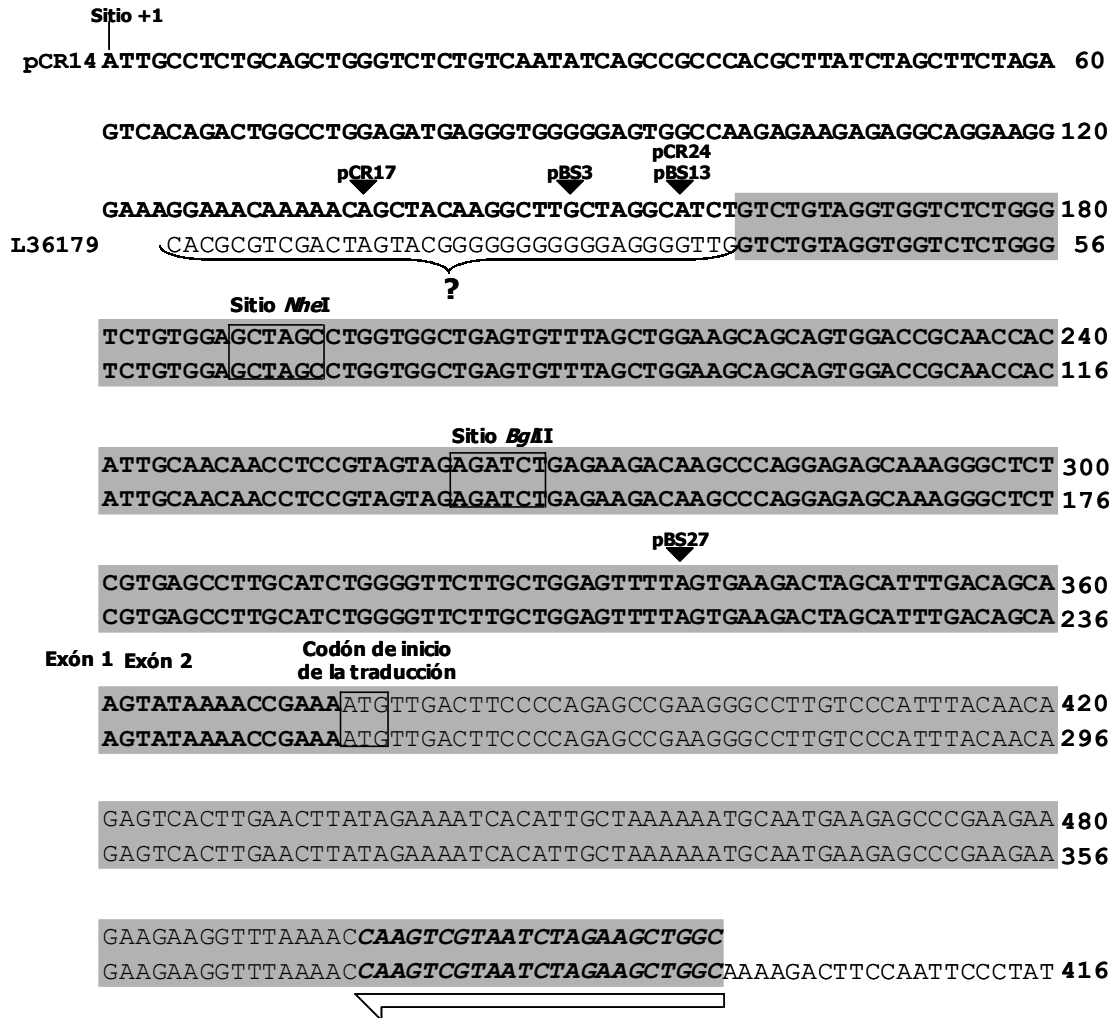


Figura 9. Extremo 5' de las clonas RACE al 5' del mRNA de Na_x. Alineamiento de la secuencia de cDNA de la clona RACE pCR14 (de 519 pb) con la secuencia de cDNA del canal Na_x de ratón (Felipe *et al.*, 1994) con número de acceso en el GenBank L36179. La figura muestra la secuencia obtenida de la región 5' del mRNA del canal Na_x de ratón; la región 5' UTR del mRNA de Na_x con un tamaño de 375 pb se muestra en negritas y en el alineamiento se observan 36 pb de la secuencia L36179 que no pertenecen a la secuencia de Na_x (marcado con ?). En fondo gris se indican las regiones 100 % homólogas, en la figura se indican además los extremos 5' de las clonas RACE (triángulos negros), la posición del oligonucleótido utilizado para el ensayo de RACE al 5' (flecha blanca), el límite entre el exón 1 (de 361 pb) y el exón 2 que contiene el codón ATG y los sitios de restricción *NheI* y *BglII*.

En la secuencia de cDNA L36179, Felipe y colaboradores (1994) reportaron que el exón "1" del gene del canal Na_x de ratón contiene al codón de inicio de la traducción (ATG). Como las secuencias de cDNA son sólo exones se decidió marcar los límites de los mismos en las secuencias de cDNA de las clonas RACE, para lo cual la secuencia de cDNA de la clona RACE pCR14 (de 519 pb) se analizó con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html>) para hacer una comparación con la base de datos del GenBank. Por un lado se encontró el mismo resultado del alineamiento del cDNA de las clonas RACE con la secuencia L36179 y

además se encontró que la secuencia de la clona RACE pCR14 presenta homología con la secuencia de DNA genómico de 6.9 kb del inicio del gene Na_x reportada por Watanabe y colaboradores (2000), con número de acceso AF190472. La homología de estas secuencias se presenta a partir del nucleótido 362 de la secuencia de la clona RACE pCR14 y del nucleótido 503 de la secuencia de DNA genómico, lo que nos indica este resultado es que las primeras 361 pb de la clona RACE pCR14 corresponden al exón 1 del gene del canal Na_x de ratón el cual no se había reportado, por lo tanto, las primeras 502 pb de la secuencia de DNA genómico corresponden a la parte final del intrón 1 y a partir del nucleótido 503 corresponde al exón 2, así con la comparación determinamos donde termina el primer exón y donde comienza el exón 2 que contiene el inicio de la región codificante. Con esta información pudimos determinar que la región 5' UTR del mRNA del canal Na_x tiene un tamaño de 375 pb, 361 pb que corresponden al exón 1 y 14 pb están contenidas en el exón 2 (figura 9). Adicionalmente, en la figura 9 se indican los extremos 5' de las clonas RACE pCR17, pBS3, pBS13, pCR24 y pBS27, que corresponden a diferentes sitios de inicio de la transcripción del mRNA de Na_x .

II. Clonación del fragmento genómico río arriba al extremo 5' del mRNA de Na_x

Guerrero y Arni, 2001 (comunicación personal –datos no publicados), identificaron y mapearon 3 clonas BAC (cromosomas artificiales de bacterias) de DNA genómico que contienen al gene del canal Na_x de ratón. Caracterizaron las clonas BAC Na_x -1, Na_x -2 y Na_x -3 con 3 enzimas de restricción (*Bam*HI, *Eco*RI y *Sac*I) y para determinar si alguna de las 3 clonas BAC contenía al promotor transcripcional del gene del canal Na_x realizaron una hibridación tipo Southern para lo cual utilizaron a la clona RACE pBS3 para sintetizar una sonda de 450 pb que contiene la región 5' UTR del mRNA de Na_x . La sonda hibridó sólo en las clonas BAC Na_x -1 y Na_x -2 identificando un fragmento de 4.1 kb tanto en la restricción con la enzima *Eco*RI como con la enzima *Sac*I y con un fragmento de 1 kb cuando se cortaron con *Bam*HI (figura 5 D). Esto nos indicó que los fragmentos con los que hibridó la sonda contienen la región 5' UTR del mRNA del canal Na_x de ratón y probablemente contenían al promotor transcripcional, es por eso que se decidió clonar el fragmento de mayor tamaño (4.1 kb) de la clona BAC Na_x -1 obtenido por digestión con la enzima *Eco*RI.

Para clonar el fragmento genómico de 4.1 kb se realizó una digestión del DNA de la clona BAC Na_x -1 con la enzima de restricción *Eco*RI, la mezcla de fragmentos generados por la digestión (figura 10 A) se ligó en el vector de clonación pBluescript II SK⁺ (pBSSK⁺) previamente linearizado con la misma enzima de restricción (figura 10 B). Con esta mezcla

de ligación se transformaron bacterias DH5 α las cuales se sembraron en 4 placas de medio LB/ampicilina (100 μ g/ml) y posteriormente se realizó la transferencia de las colonias obtenidas de la clonación de los diferentes fragmentos *EcoRI* de la clona BAC Na $_x$ -1 a discos de nylon.

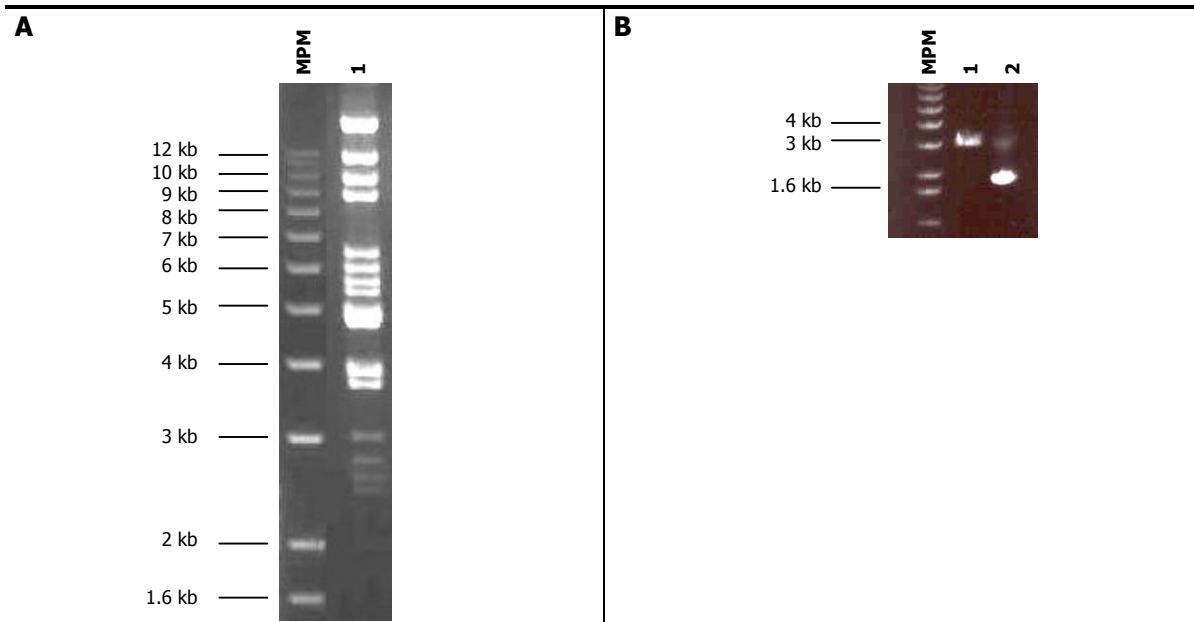


Figura 10. Restricción del DNA de la clona BAC Na $_x$ -1 y del vector pBSSK $^+$ con la enzima *EcoRI*. **A)** Se muestra en un corrimiento en gel de agarosa al 0.8 % la digestión del DNA de la clona BAC Na $_x$ -1 (fragmento de genoma de ratón de 135 kb) con *EcoRI* (carril 1), en la fotografía se muestran los fragmentos generados por la digestión. **B)** Corrimiento en gel de agarosa al 0.8 % de la linearización del plásmido pBSSK $^+$ de 3 kb cortado con la enzima *EcoRI* (carril 1); y carril 2, mismo DNA sin cortar. Como punto de referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (MPM), mostrado a la izquierda de cada fotografía.

Para identificar a las colonias recombinantes que contenían al fragmento genómico de 4.1 kb los discos de nylon se hibridaron con la misma sonda con la cual se identificó por Southern genómico el fragmento de 4.1 kb (sonda de 450 pb de pBS3, Guerrero y Arni, 2001). Con la hibridación se identificaron 6 colonias (figura 11), de las cuales se aisló el DNA correspondiente y posteriormente se utilizó la enzima de restricción *EcoRI* para realizar una digestión del DNA de cada una de las 6 clonas para verificar si contenían al fragmento genómico de 4.1 kb. En la figura 12 A se observa que sólo las clonas 2 y 5 (carriles 2 y 5) presentaron el patrón de restricción esperado que es una banda de 3 kb (vector de clonación pBSSK $^+$) y otra banda de 4.1 kb correspondiente al fragmento identificado por Southern genómico, que pertenece al 5' del gene del canal Na $_x$ de ratón. Por otro lado, las clonas 1, 3, 4 y 6, es probable que no contengan el 5' del gene Na $_x$ por el patrón de restricción que se observa en la figura 12 A. El hecho de haber identificado estas clonas como positivas puede deberse a que el fragmento que se utilizó como sonda

(que corresponde a 215 nt del exón 1 y a 150 nt del exón 2 que contiene el codón ATG) pudo haber hibridado en el exón 2 ó cabe la posibilidad de que se tomaran las colonias equivocadas cuando se ubicaron en la caja de cultivo.

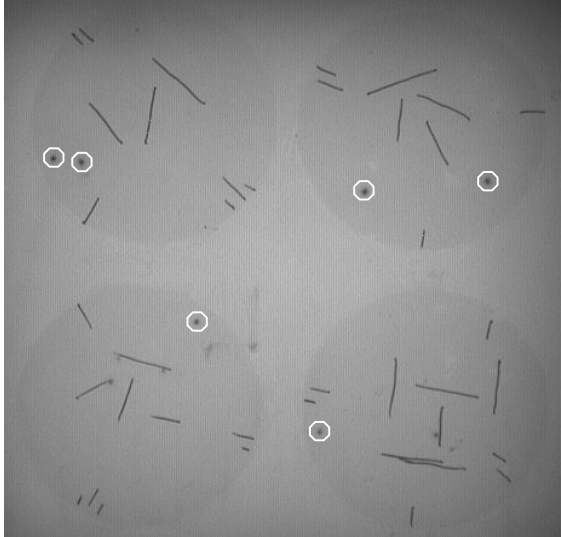


Figura 11. Identificación de clonas portadoras de la región 5' de Na_x . Las colonias obtenidas de la clonación de los diferentes fragmentos *EcoRI* de la clona BAC Na_x -1 se analizaron por hibridación en colonia utilizando como sonda al fragmento de 450 pb de Na_x de la clona RACE pBS3. En la figura se observa la autorradiografía obtenida después de 24 horas de exposición en la cual se muestran con círculos blancos las colonias bacterianas que hibridaron con la sonda y además, se observan las marcas hechas en los discos para tener la orientación de las colonias con respecto a las cajas.

Para confirmar la identidad del fragmento genómico clonado se realizó una digestión del DNA de las clonas 2, 4, 5 y 6 con la enzima *BglII*, ya que en la secuencia de las clonas de cDNA del ensayo de RACE al 5' del mRNA de Na_x , se identificaron los sitios de restricción *NheI* y *BglII* (figura 9). En la figura 12 B se observa que las clonas 4 y 6 generaron 2 bandas una de 3 kb y otra de 2 kb aproximadamente (carriles 4 y 8) y ya que el vector de clonación pBSSK⁺ que tiene un tamaño de 3 kb, no contiene ningún sitio de reconocimiento para *BglII* no es posible que estas bandas correspondan al plásmido esperado. Por otro lado, las clonas 2 y 5 generaron 2 bandas de 3.5 kb aproximadamente (carriles 2 y 6), lo que nos sugiere que el fragmento genómico de 4.1 kb contiene 2 sitios de reconocimiento para *BglII*.

Con base a los resultados obtenidos se decidió mapear más detalladamente a las clonas 2 y 5 utilizando a las enzimas de restricción *NheI*, *EcoRI* y *BglII*, para ubicar el sitio de inicio de la transcripción (sitio +1) del gene del canal Na_x de ratón, con respecto a los sitios *EcoRI* que flanquean al fragmento genómico de 4.1 kb analizado. Al digerir el DNA de las clonas 2 y 5 con la enzima *NheI* (figura 12 C, carriles 1 y 2) se linearizaron los plásmidos generando una banda de 7.1 kb indicando que en las 2 clonas, el fragmento genómico presenta 1 sitio *NheI* (identificado en la secuencia de las clonas RACE, figura 9), posteriormente para determinar a qué distancia se encuentra el sitio *NheI* con respecto a los sitios *EcoRI* se digirió el DNA de las clonas 2 y 5 con las enzimas *NheI* y *EcoRI*. En la

figura 12 C (carriles 3 y 4) se observa la presencia de 3 bandas, una de 3 kb que corresponde al vector de clonación pBSSK⁺, una de 3.6 kb y otra de 0.5 kb, esto nos indica que el sitio *NheI* se ubica a 0.5 kb aproximadamente de uno de los sitios *EcoRI*. Cabe mencionar que en la fotografía se observan algunas bandas extra (marcadas con un asterisco), pero sólo las de 3.6, 3 y 0.5 kb corresponden a la digestión del DNA de los plásmidos (clona 2 y 5) ya que la suma de sus tamaños corresponden al tamaño total de éstos que es de 7.1 kb cuando se linearizan con la enzima *NheI* (figura 12 C, carriles 1 y 2). Estos cortes secundarios han sido observados frecuentemente en el laboratorio al realizar restricciones de DNA genómico con algunas enzimas. Cuando el DNA de las clonas 2 y 5 se cortaron con las enzimas *BglII* y *EcoRI* se generaron 4 bandas (de 3.5, 3, 0.44 y 0.16 kb –figura 12 D, carriles 1 y 2) debido a los sitios *EcoRI* donde se clonó el fragmento genómico y a los 2 sitios *BglII* identificados en la figura 12 B (carriles 2 y 6), esto indica que uno de los sitios *BglII* se encuentra a 0.16 kb de uno de los sitios *EcoRI* y el otro sitio *BglII* se encuentra a 0.44 kb aproximadamente del otro sitio *EcoRI*.

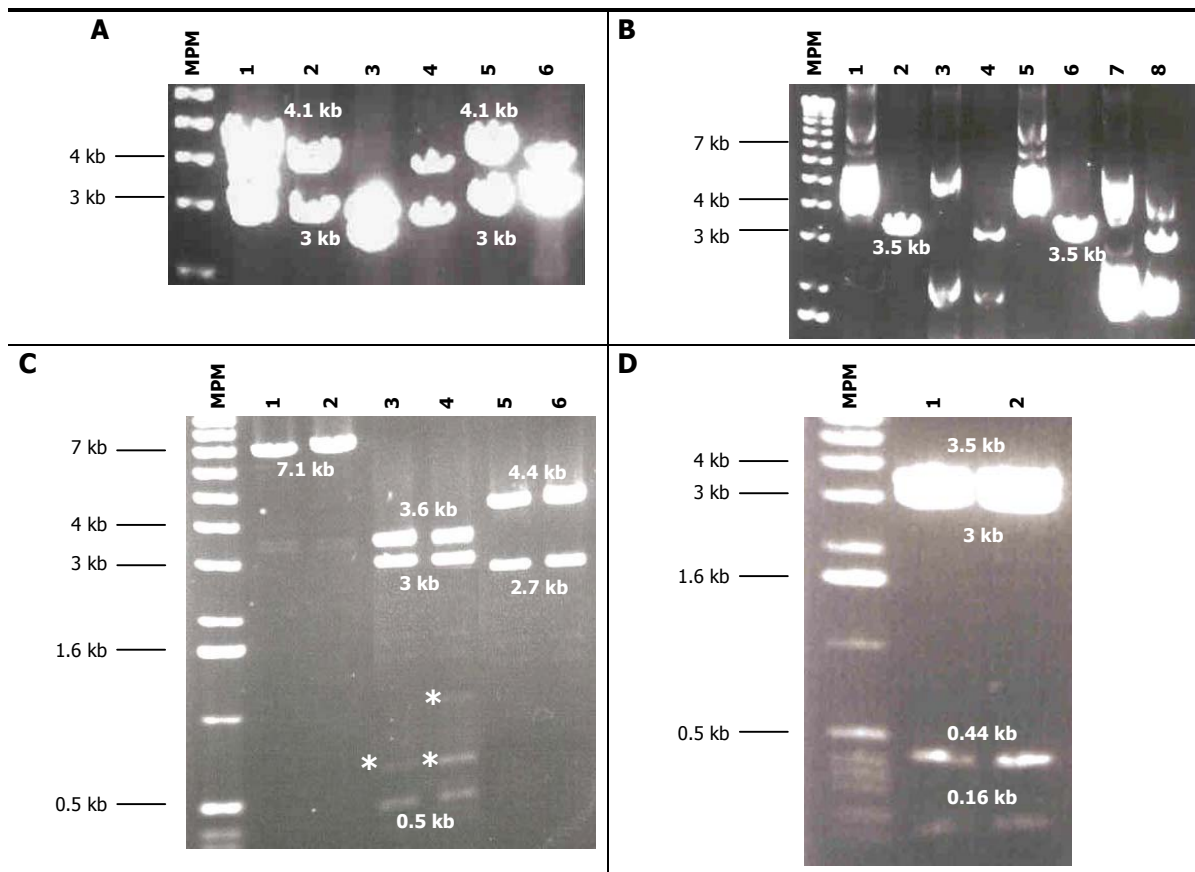


Figura 12. Análisis de restricción de las 6 clonas portadoras de la región 5' de Na_x. La digestión del DNA de las clonas se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y como punto de referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (MPM) indicado a la izquierda de cada fotografía. **A)** Digestión del DNA de las 6 clonas con la enzima *EcoRI*, en el siguiente orden, carril 1, clona 1; carril 2, clona 2;... y carril 6, clona 6. **B)** Digestión del DNA de las clonas 2, 4, 5 y 6 con la enzima *BglII*, en los carriles 1 y 2, clona 2 (sin cortar y cortada); carriles 3 y 4, clona 4 (mismas condiciones); carriles 5 y 6, clona 5; y carriles 7 y 8, clona 6. **C)** Digestión del DNA de las clonas 2 y 5, en el siguiente orden carriles 1 y 2, clona 2 y 5 cortadas con la enzima *NheI*; carriles 3 y 4, mismos DNA's cortados con las enzimas *NheI* y *EcoRI* simultáneamente; y carriles 5 y 6, mismos DNA's cortados con la enzima *SacI*. **D)** Digestión del DNA de las clonas 2 y 5 con las enzimas *BglII* y *EcoRI* simultáneamente (carril 1, clona 2 y carril 2, clona 5). En cada foto se muestra el tamaño de cada banda generada por la digestión en letras blancas y con asteriscos se indican algunas bandas extra o cortes secundarios.

Para continuar mapeando a las clonas 2 y 5 se utilizaron las enzimas *SacI*, *BamHI* y *HindIII*, estas enzimas se utilizaron por que el vector pBSSK⁺ contiene sitios de reconocimiento para estas enzimas en la región de clonación múltiple, adyacentes al fragmento genómico. Los sitios de restricción contenidos en la región de clonación múltiple del vector pBSSK⁺ tienen la característica de encontrarse en el siguiente orden: *KpnI*, *XhoI*, *HindIII*, *EcoRI* (sitio en donde se clonó el fragmento genómico de 4.1 kb), *BamHI* y *SacI* (figura 14). El DNA de las clonas 2 y 5 se digirió primero con la enzima *SacI* y después con las enzimas *SacI* y *EcoRI*, ya que el sitio *SacI* se ubica contiguo al sitio *EcoRI* en el vector de clonación. Cuando se digirieron las clonas 2 y 5 con *SacI* se

generaron 2 bandas, una de 4.4 kb y otra de 2.7 kb, indicando que hay 1 sitio *SacI* en el fragmento genómico de 4.1 kb (figura 12 C, carriles 5 y 6) ya que en el vector pBSSK⁺ (de 3 kb) sólo hay un sitio de reconocimiento para *SacI*, esto nos indica que el sitio *SacI* ubicado dentro del fragmento genómico se encuentra a 2.7 kb de distancia del sitio *SacI* contenido en la región de clonación múltiple (figura 14). En la figura 13 A se observa que cuando el DNA de las clonas 2 y 5 se cortó con las enzimas *SacI* y *EcoRI* se generaron 3 bandas de 2.9, 2.64 y 1.46 kb (en la fotografía se observa la migración de las bandas de 2.9 y 2.64 kb al mismo nivel). Estos resultados nos sugieren que el sitio *SacI* dentro del fragmento genómico de 4.1 kb se ubica a 1.46 kb aproximadamente del otro sitio *EcoRI*, indicándonos la orientación del fragmento genómico dentro del vector de clonación ya que el sitio *SacI* se encuentra en el extremo 5' de dicho fragmento (figura 14). Los resultados obtenidos hasta este punto mostraron el mismo patrón de restricción en el mapeo de las clonas 2 y 5, por lo que se continuó caracterizando solamente a la clona 2.

Cuando se cortó el DNA de la clona 2 con la enzima *BamHI* se generaron 2 bandas, una de 6.3 kb y otra de 0.8 kb (figura 13 B), esto nos indica que el sitio *BamHI* se ubica a 0.8 kb del sitio *EcoRI* en el extremo 3' del fragmento genómico, ya que el sitio *BamHI* en la región de clonación múltiple del vector pBSSK⁺ se ubica inmediatamente después del sitio *EcoRI* (figura 14). En la figura 13 B también se observan varias bandas que no corresponden a fragmentos de la digestión del plásmido (marcadas con un asterisco), ya que la suma de las 2 bandas (de 6.3 y 0.8 kb) concuerdan con el tamaño de la clona 2 (7.1 kb). Por otro lado, el DNA de la clona 2 se cortó con la enzima *HindIII*, generando 3 bandas de 3.9, 1.9 y 1.3 kb, ubicando 3 sitios de corte (uno del vector de clonación y 2 dentro del fragmento genómico) (figura 13 C).

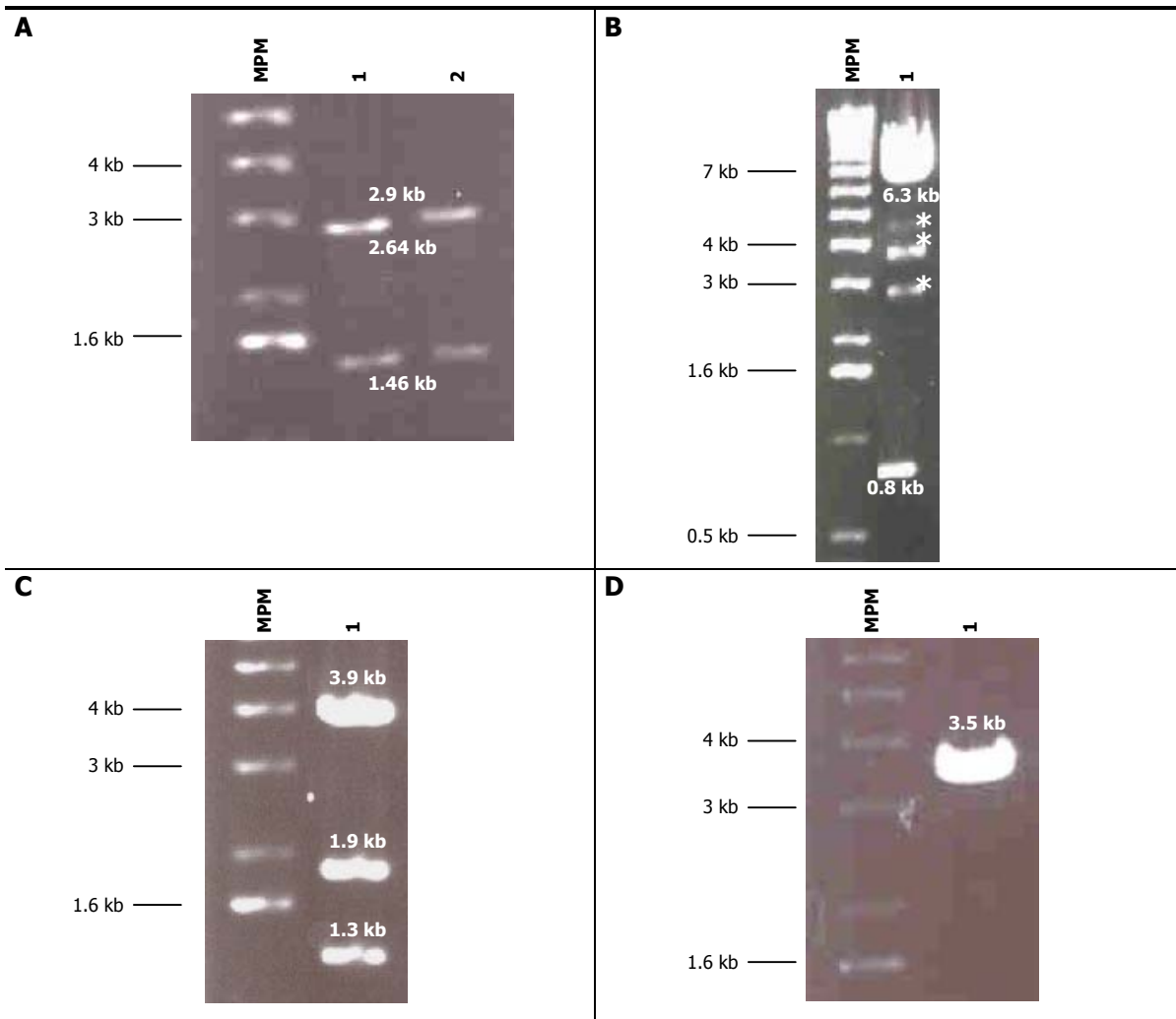


Figura 13. Mapeo de las clonas 2 y 5 para verificar la identidad y orientación del fragmento genómico de 4.1 kb. La digestión del DNA de las clonas 2 y 5 se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y como punto de referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (MPM) indicado a la izquierda de cada fotografía. **A)** Digestión del DNA de las clonas 2 y 5 con las enzimas *SacI* y *EcoRI* (carril 1, clona 2 y carril 2, clona 5); **B)** Digestión de la clona 2 con la enzima *BamHI* (carril 1); **C)** Digestión de la clona 2 con la enzima *HindIII* (carril 1); y **D)** Digestión de la clona 2 con las enzimas *XhoI* y *NheI* simultáneamente (carril 1). En cada fotografía se muestra el tamaño de cada banda generada por la digestión en letras blancas y con asteriscos se indican algunas bandas extra ó cortes secundarios.

Por ultimo, para determinar en qué extremo del fragmento genómico de 4.1 kb se encuentra el sitio *NheI* se digirió el DNA de la clona 2 con las enzimas *XhoI* y *NheI*. Se utilizó la enzima *XhoI* porque este sitio se encuentra contiguo al sitio *EcoRI* en la región de clonación múltiple del vector pBSSK⁺ (figura 14). Con esta digestión se generaron 2 bandas de 3.5 kb aproximadamente (figura 13 D) lo que nos indica que el sitio *NheI* se encuentra en el extremo 3' del fragmento genómico de 4.1 kb a 0.5 kb aproximadamente del sitio *EcoRI*, ya que si se encontraran en el extremo 5' se generarían 2 bandas, una de 0.6 kb y otra de 6.5 kb. Con base en los resultados mostrados utilizando diferentes

enzimas de restricción de forma individual ó una combinación de éstas sobre el DNA de las clonas 2 y 5, se pudo establecer un mapa de sitios de restricción esquematizado en la figura 14 y también se concluye que ambas clonas contienen el fragmento genómico de 4.1 kb. Además, se determinó que el fragmento genómico de 4.1 kb contiene 3.4 kb río arriba del sitio +1 que correspondería al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón, se identificó la presencia del primer exón (de 361 pb) y dado que la secuencia de cDNA del canal Na_x (Felipe *et al.*, 1994) no contiene ningún sitio *EcoRI* podemos deducir que el fragmento de 4.1 kb contiene el principio del primer intrón. Como ambas clonas contienen el fragmento genómico de 4.1 kb se continuó trabajando con la clona 2 que se denominó **pMB1** (figura 14).

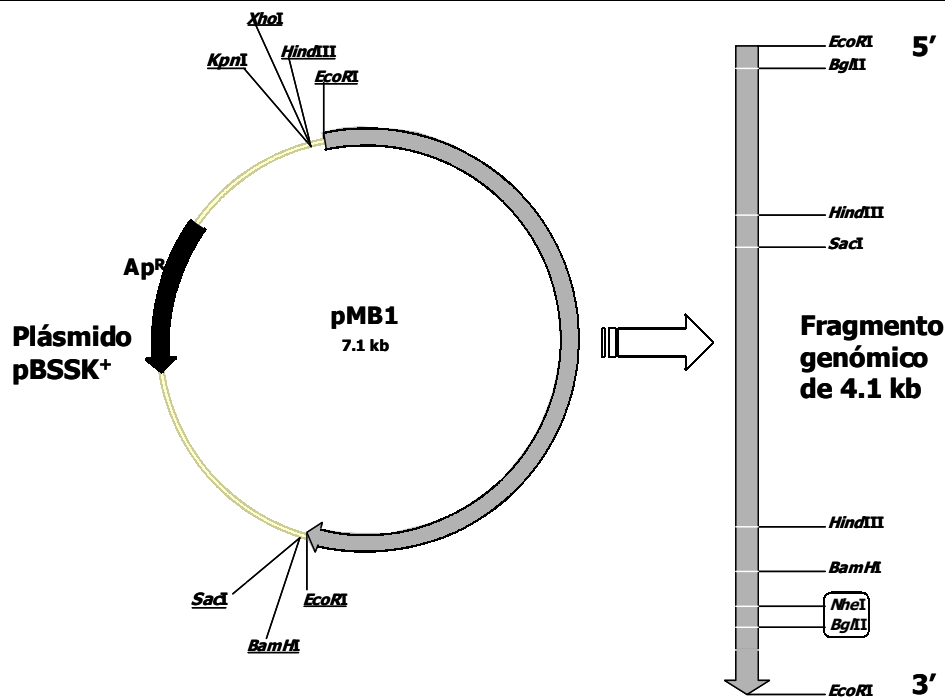


Figura 14. Mapa del plásmido pMB1. En la figura a la izquierda se observa el mapa del plásmido pMB1 de 7.1 kb en el cual se muestra el fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb (obtenido por restricción con *EcoRI*) que corresponde a la región 5' UTR y al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón clonado en el vector pBSSK⁺ en el sitio de restricción *EcoRI*, también se muestran subrayados algunos de los sitios de restricción de la región de clonación múltiple del vector y el gene de resistencia a ampicilina (Ap^R -flecha negra). A la derecha se resumen los datos del mapeo del fragmento genómico identificado con diferentes enzimas y además se indican los sitios de restricción *NheI* y *BglII* (caja blanca) identificados en las secuencias de cDNA de las clonas del ensayo de RACE al 5' del mRNA de Na_x.

III. Secuenciación del fragmento genómico de 4.1 kb y ubicación de los sitios de inicio de la transcripción

Se procedió a secuenciar el fragmento genómico de 4.1 kb que correspondería al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón, al exón 1 y al inicio del primer intrón. Inicialmente, se aisló DNA del plásmido pMB1 suficientemente puro para dicho proceso, además como una estrategia para agilizar la secuenciación del fragmento genómico de 4.1 kb se obtuvieron 2 subclonas de pMB1. La subclonación se realizó cortando el DNA del plásmido pMB1 con la enzima *Hind*III e inmediatamente después de inactivar la enzima de restricción se religó el plásmido deletando así un fragmento de 3.2 kb del extremo 5' del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb, generando la construcción pMB1-*Hind*III que contiene 0.9 kb pertenecientes al extremo 3' del fragmento genómico de 4.1 kb (ver figura 15, parte inferior). Después para generar la construcción pMB1-*Sac*I, se digirió el DNA de pMB1 con la enzima *Sac*I y luego de inactivar la enzima se religó el plásmido deletando 2.7 kb del extremo 3' del fragmento genómico, esta construcción contiene 1.4 kb del extremo 5' del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb (figura 15).

Inicialmente para la secuenciación del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb de pMB1 se usaron los oligonucleótidos T7 y T3 que se unen a la secuencia de pBSSK⁺, y conforme se generó la secuencia del DNA genómico de Na_x se fueron diseñando oligonucleótidos específicos (basados en la secuencia encontrada) para continuar secuenciando el fragmento genómico en ambas cadenas. Se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del programa Vector NTI Suite (v.7), con un tamaño de aproximadamente 20 nt, una temperatura media de fusión cercana a los 50° C y con al menos 50 % de contenido de las bases G-C (Tabla VI).

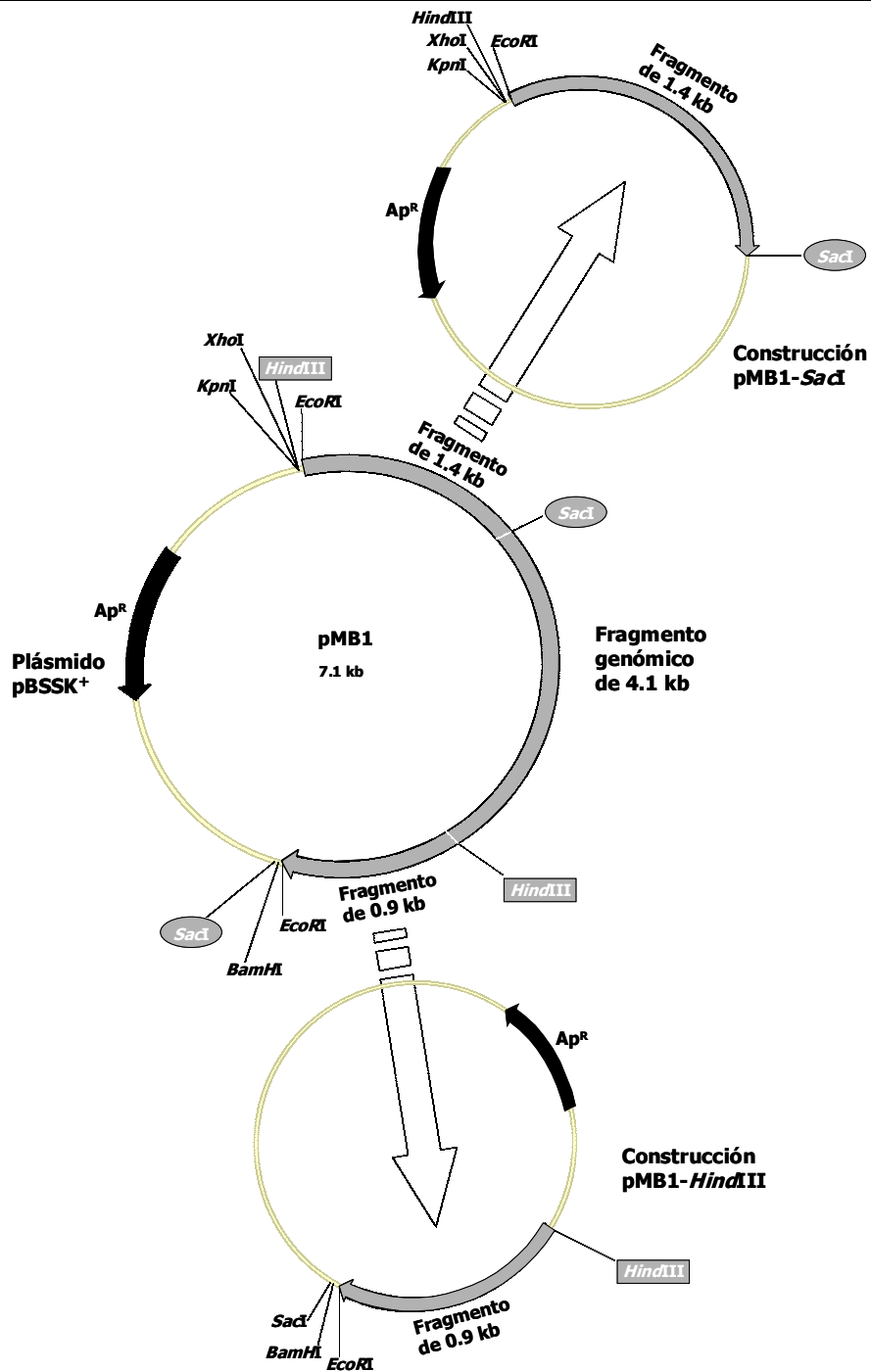


Figura 15. Esquema de la subclonación de pMB1. Al centro de la figura se muestra el plásmido pMB1 de 7.1 kb que contiene el fragmento genómico de 4.1 kb que corresponde al exón 1 y al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón clonado en el vector pBSSK⁺ en el sitio *EcoRI*, además se indica el gene de resistencia a ampicilina (flecha negra -Ap^R), la región de clonación múltiple del vector y los sitios *SacI* (elipse) y *HindIII* (rectángulo) utilizados para generar las deleciones. Arriba se muestra la construcción pMB1-*SacI* de 4.4 kb que contiene un fragmento de 1.4 kb del extremo 5' del fragmento genómico de 4.1 kb. Abajo se muestra la construcción pMB1-*HindIII* que contiene un fragmento de 0.9 kb del extremo 3' del fragmento genómico de 4.1 kb.

Cuando estábamos cerca de concluir la secuenciación del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb contenido en el plásmido pMB1, se liberó en el mes de Mayo del 2002 parte de la secuencia del genoma de ratón en el GenBank y al someter la secuencia que habíamos obtenido del fragmento de DNA genómico de 4.1 kb al programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html>) para hacer una comparación con la secuencia del GenBank, se encontró toda la secuencia de 4.1 kb en un fragmento contiguo secuenciado de 35.9 kb (con número de acceso CAAA01194598). Aunque se tenía la secuencia obtenida del GenBank se decidió terminar la secuenciación del DNA del fragmento genómico de 4.1 kb contenido en el plásmido pMB1, ya que el DNA genómico de ratón de la clona BAC Na_x-1 de donde se clonó el fragmento genómico proviene de la cepa 129/SvJ (Incyte Genomics) y la secuencia del genoma de ratón reportada en el GenBank corresponde a la cepa C57BL/6J (The Mouse Genome Sequencing Consortium, <http://mouse.ensembl.org/>).

Al terminar la secuenciación en ambas cadenas del fragmento de DNA genómico contenido en pMB1, se obtuvo una secuencia de 4106 pb (figura 16) y para determinar si había variaciones en la secuencia que obtuvimos con la secuencia reportada en el GenBank se realizó un alineamiento con el programa "AlignX" de la paquetería Vector NTI Suite (v.7). El resultado del alineamiento mostró que las secuencias presentan 100 % de homología, lo que significa que no hay variaciones en las secuencias de DNA genómico aunque provengan de diferente cepas.

Para localizar los sitios de inicio de la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón, se llevo a cabo un alineamiento de la secuencia del fragmento de DNA genómico de 4.1 kb con la secuencia L36179 y además con las secuencias de cDNA de las 6 clonas del ensayo de RACE al 5' (S. Arni, 2001, comunicación personal –datos no publicados).

Sitio *EcoRI*

1 GAATTCTTCATA GTT GAGTCTC TTCTGCACAT GGATGTAAAG GCTGTAAAA GTGGCAGCAA GGGCTGGTGA AATGGCTCAG TGGGTAAGAG CACCTGACTG
 101 CTCTTCCAAA GGTCCCGAGT TCAAATCCCA GCAACCACAT GGTGGCTCAC AACCATCTGT AAGGAGATCT GACTCCCTCT TCTGGAGTGT CTGAAGACAG
 201 CTACAGTGTA CTTACATATA ACAAAATAAT AAATCTTAAA AAAAAAAGTG GCAGCAAGAG TTTGGATAGA GAAGATACTA CCAATCACAA AATAAAATAT
 301 TTTTAGATGT ATTTTAAAT TAAACATAAT TACATCATAT TATCTTTTTC TTCCCTCCAA CTTCTTCTAT GCACCTCCCT GATGCTCTCT CTCAAATTA
 401 TAGTCTCAA TATATATACA TACATACATA TGTGTGTGTG TGTGTTAAGA TAACTGAAAC AGAGTACATG TGAAGCCCAA GGTGTAGTGT TAAAAACGGA
 501 TATACGTGTG TTTGGTAGAA TAGTTTGATA TTTTACTGTG TTTATATTTA CTCAGGCCTA TGTAAATTC TGGGTGGTGA TATAGATAAA AACGAAGTCC
 601 AGATCCATCT GCATCTTCTGA TACTGATCTG TTGGTGTTAG AATAAACATC CCCTGTTTAC ACAGGCTATA AGAAAAATAG TGATCCAGG TCAAATGGCT
 701 GTTAAAAGA GTATGTTTTT CTTGATGAGC CAGAAGATA ATAAGTGCAC AGCTTCTGTA ATTTGGATG TGCAGAGAT AAAACAGTTT AGAAAAATCA
 801 AATAAATAT CAATATATAT ATTATATGAT ATTATATGTG GSACAAGACT AGACAAGTGC CAAGCAAGA TGTATAAGT AGGGTCCACC TTCTACATAT
 901 CTTTCTGCTT GAGAAAAACA GAGAGACAGT TTAGTTCACCT CTTGAAAAA TAATGATGTG AGAATGTTT CAGCAAATTC CATTATCTAA CAGTGTAGG
 1001 AGAATATTTG TTTTAAATA ATTTAATTTA AATATACTGC TTCTAAACCA AACTTTCTAC CTTGCGATGT AAACCCAGTC TGAAGGCTCT CCTCTGCACC
 1101 TCATCTCTCA GATCGTGAGT TGGCAGTGC CTGTTTGCTC ACACAGATG TAAGATTTGT CTTGTCAGTA CTCCTTTCAA ACAACGATTT ACATGTTTGA
 1201 GACATCTGGT AGGTATTGCT TAAGAAATGC ACACAATTT TAAATTTGCC AAGCTCACAG CTTATTGCC CTCTTCAAT TCTAAGCTTC CTCCTCCAA
 1301 CCATTTTCCC TCCAAATTC ATATGCCCT TAGTTGTGTG TAACCCCTA GGTCCATTA GCACGTCTAA TGAGTGTAGG TACAAGACAA TCAATCAGG
 1401 GTCCTTCCC AGATTTCTAA GTCACCAATA GCTGCTCAGA TAGAGGTAGG ATATTTGAGC TCRACCTCA CCTGTACC TATTGTTT GTCCTTCTT
 1501 TATACAGTC TTGGCAGTGC AGCCACACTG CTGAGCATTC ATTTGTGCCA GAGTCTAACC ATGCTTGGC AAATACTGTT TCACTGTAGA TGTCCGTGAC
 1601 TCCTCGGCTA TGTATTTAT TTCTCTCCC ATAATGATTC CTGGGCTTG AGAGGAGAGG GTGTGATATA TCCTTTTATG GACTAAGCAT CCCATTTCT
 1701 TTGTGTTGCC CAATGTTTG TCCGAGAATA ACTCTATTTA AATAATAAAC TTGTTTGAAG AAGGTGTGA AATTCACATA TTTAAAAAG ATAATTTAAA
 1801 ACCTAGATT CATTCAACAT AATAAAACA AAATGTTCTT CCTTAGCAAC TGTGATCAG TTGGTACTG GTTTGGGACC CAGTAAACA GTGAGTGT
 1901 AAGTTCGGCT TTGTAGAGTG GGTGTAGGT CCAATCAGTA AGTGATAGA GATTATAATA ACATTTGTG CACAATGCAA TAGTGGTAT ATCTTGTGAC
 2001 GGCTGGAGAT TTTATATAGG ACTCTTAGC ACTATGAAG CTATCCAATA AGGACAAAAA TTTCAGGTGA ATGTTAGATT TATATCCCA TTCTATGACT
 2101 CAAGTATACA GCATCTTCAG GAACAGGCTC TACAAGATT TCTTAAAGGC TAACAAAGAG AATAACAATT GTGTATAAG TTGGAATGT GATCTGTGAG
 2201 ACTTGATGGA CAATTAATA ATTTGGTACC AGTAGCTGGC ATCTGCAAT AGGAAAAAT CTGATGCCA TGGAAAGCAA TTCTCTCCC ACTATAGGAT
 2301 AACCCATTT AAAACAAT TAAAGTTATA CACACACAAG CACACACACA CACACGACA GCTATAGTAA TTTTCCATA TGATATTTG CTAGCTTTGA GAATGTTTTA CAAAATTTT
 2401 CACACACACA CACACACACA CACACACACT GCTATAGTAA TTTTCCATA TGATATTTG CTAGCTTTGA GAATGTTTTA CAAAATTTT
 2501 GTGGTTGGAA ATAATAAAG ATAGATAGGA TTGTGTTGGT AAGCATGGCA GATTGCCCCC AAGACAATAC TTTGCACACT AAAGAATTGA TTTGTAATA
 2601 CACTACAAA TGTGGCAAG AAAAAGTGC AATCCATGTA CCATCTTTGA GAAAGAAATC AAGTGGATAT TTGGCATTGC AAAATTTGTA CTTTATTTT
 2701 TAGATTTGAT AATAGTACTA GATTAAATTC TGTAAATAT TTTTATTATC ATGGACATAT GCTGATTTT AACAAACCAT AGTTTTAATA AATCCTGGAC
 2801 AAAATAGGAT TATACAATGA ATGGTCTATG TTGTTTCAA ACCCTCTGCT CATCTCAGAA AACAAACAAA CAAACAAAACA AACACATCTT CCTTAAACCC
 2901 CTCAGAACAC ATTCTAGATG TAGAACATGC CGATTTTTTA AAAGAACAAT AACAGTCTCC TCTGTGCCTC ACTTATCTTC CAGTGGCTAG AGTATGACAC
 3001 AAATATGCAA TGGTTTTTGT CTTCCAATAA AGTACCTCCT AAGCAGTTGC ACACCTGAC AGAACAGCAT CCACCTGCAAT GTCCAGTTCC CATCCTGAG
 3101 GCTGACAGTG CAGGCTGACA TTTTAGCCCC ATGTGTTCTA CTGGGCAGCC AGACCAAGTGT AGGGAAGCT TTCTGCAGAT CAGGACCCCTG CTTTGCAT
 3201 CCTCCCTTA ATATACTTCC CTCCTTTTTT CTACACACTC AGTGGCATAA AACACACAAA TTTAGCGTCA TCCGTCTTTT CCGTCTTCC CACATTTTGA
 3301 ACCTTTCAAT TCTTTGCCA GCTCTCTCCT CTTTCAAAA AATCCATACT CCCCCTGACC GACTGGATCC TTCCAGGGA GCAAGGGAAT GCAAAGCCAC
 3401 TGCTGAAGCT GTTATTGCC CTGACGCTGG GTCTCTGTCA APATCAGCC CCCACGCTTA TCTAGCTTCT AGAGTCACAG ACTGCTCTGG AGATGAGGGT
 3501 GGGGAGTGG CCAAGAGAAG AGAGGCAGGA AGGGAAGGA AACAAAAACA GCTACAAGGC TTGTAGGCA TCTGCTGTA GGTGTCTCT GGGTCTGTGG
 3601 AGTAGCCTG GTGCTGAGT GTTTAGCTGG AAGCAGCAGT GCACCGCAAC CACATGCAA CAACCTCCGT AGTAGATC TGAGAAGACA AGCCCGAGG
 3701 AGCAAAGGC TCTGTGAGC CTTGCATCTG GGGTCTTTC TGGAGTTTTA GTGAAGACTA GCATTTGACA GCAAGTAAAT ACATTTTTT TTTATCTTT
 3801 TAGTGACAAT TCCAGATTG GGGATAGCTC ATGGCTGTAC CCCCCTTTTC GCCTCAATTT CACCCGCCC ACCCGTGTGA CAATCTTGG GAAATGTTG
 3901 AGAATCAAAA AGAACAGTAA TATCTAGACC TGAACTAACA GTTGCAAGT GGTGCTTGC TTTGCATGT TGGTTAGGTA TATCACCAG GTAACCTGAA
 4001 ACCAAGAGAT AATCTGTTT TGTAAAATTT CTAGAATCC CTAGGAAGT ATGGTCAGAA CAGATGAAGC AGGTTATGAG AGTTGGACTA TACTATTAAG
 4101 GAATTC

Sitio *EcoRI*

Figura 16. Secuencia del fragmento genómico de 4106 pb que corresponde al exón 1 y al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón. En la figura se observa la secuencia de 5' a 3' del fragmento genómico y en ambos extremos de la secuencia se muestran los sitios *EcoRI* (subrayados) que se utilizaron para clonar el fragmento genómico de ratón en el vector pBSSK⁺ en el mismo sitio de restricción.

En el alineamiento de la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con la secuencia L36179 encontramos que las primeras 36 pb de la región 5' UTR del mRNA de Na_x reportadas por Felipe y colaboradores (1994) no presentan homología con la secuencia del fragmento genómico de 4.1 kb, estos resultados concuerdan con lo mostrado en el alineamiento de las secuencias de cDNA de las clonas RACE 5' con la secuencia de cDNA del canal Na_x de ratón (figura 9), también se encontró que de las siguientes 215 pb de la región 5' UTR reportadas por Felipe y colaboradores (1994) sólo 201 pb presentan homología en el extremo 3' de la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb a 0.5 kb del sitio *EcoRI*, confirmando los resultados del mapeo del fragmento genómico de 4.1 kb con las enzimas de *NheI* y *BglII*, sitios de restricción ubicados en las secuencias de las clonas de cDNA del ensayo de RACE al 5' (figura 9). Estas 201 pb forman parte del exón 1 que tiene un tamaño de 361 pb formado en su totalidad por región 5' UTR (figura 9) y por otro lado, este resultado nos indicó la

presencia del principio del intrón 1 en el extremo 3' del fragmento genómico de 4.1 kb, ya que las 14 pb restantes de la región 5' UTR reportada por Felipe y colaboradores (1994) que forman parte del exón 2 (figura 9) no presentan homología con el fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb (ver figura 17 A).

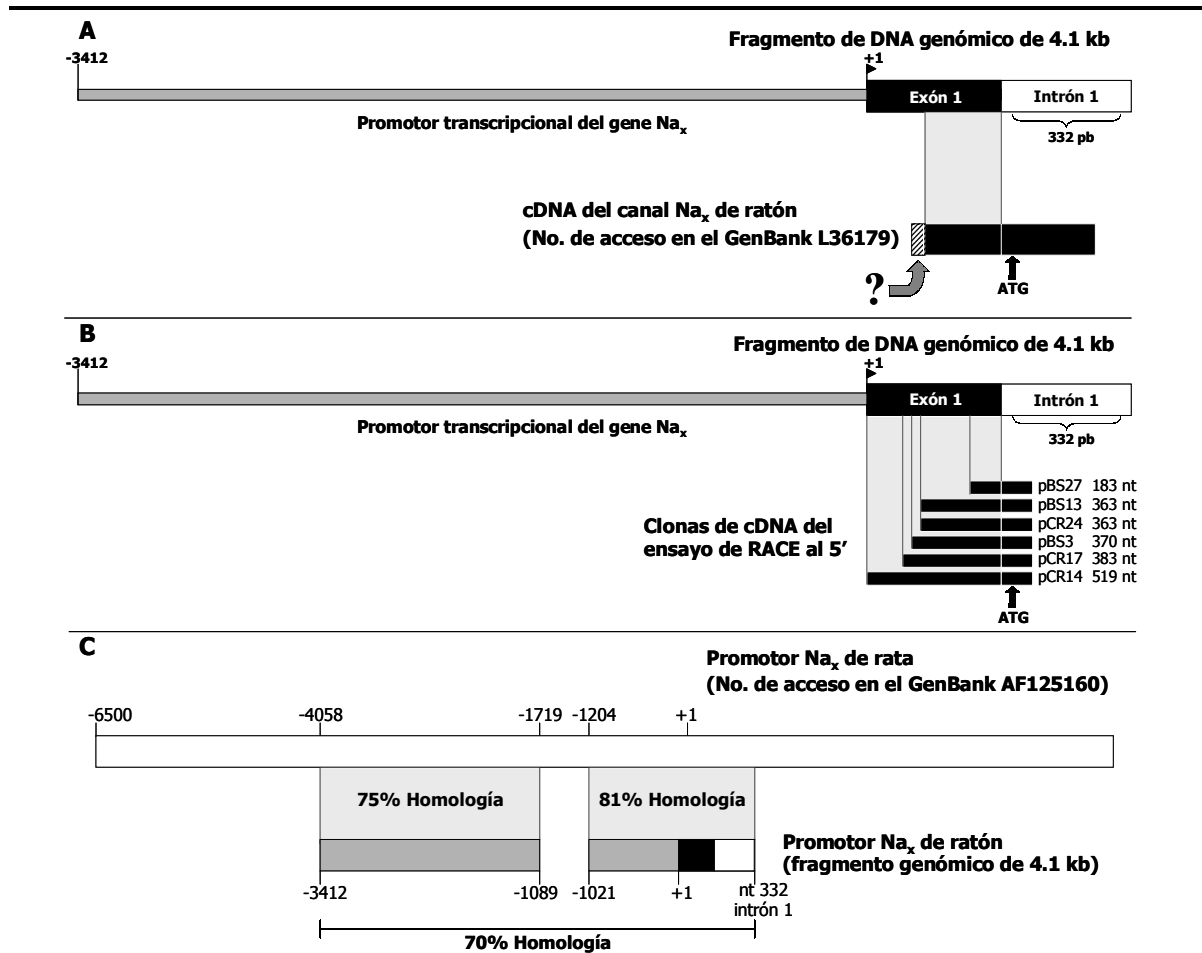


Figura 17. Ubicación del promotor y de los sitios de inicio de la transcripción del gene del canal Na_x de ratón dentro del fragmento genómico de 4.1 kb. **A)** Esquema del alineamiento de la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con la secuencia de cDNA del canal Na_x de ratón (Felipe *et al.*, 1994), se esquematiza el promotor transcripcional del gene Na_x de ratón (de la posición -3412 a +1), el exón 1 que corresponde a región 5' UTR (caja negra) y 332 pb del principio del intrón 1; en la secuencia de cDNA del canal Na_x de ratón se indica la región de 36 nt que no presenta homología con el DNA genómico (marcado con ?), 215 nt de la región 5' UTR y el principio de la región codificante (codón ATG). **B)** Esquema del alineamiento de la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con las secuencias de cDNA de las clonas del ensayo de RACE al 5' del mRNA de Na_x de ratón, en la figura se muestra el tamaño de cada clona y la región de las clonas que presenta homología con la región 5' UTR y además el exón que pertenece al sitio de inicio de la traducción (ATG). **C)** Esquema del alineamiento de la secuencia del promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata (Poiraud *et al.*, 1999) con la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb, en la figura se muestran las regiones de homología y la posición en cada secuencia.

Con el alineamiento de la secuencia de DNA del fragmento genómico de 4.1 kb con las secuencias de cDNA de las clonas del ensayo de RACE al 5' del mRNA de Na_x de ratón encontramos el sitio donde inicia la homología de las clonas RACE con el fragmento genómico de 4.1 kb (figura 17 B) ubicando así la posición de cada sitio de inicio de la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón, identificados por el extremo 5' de cada una de las clonas del ensayo de RACE al 5' y esquematizado en la figura 18.

Con los resultados mostrados en los 2 anteriores alineamientos se deduce que la secuencia río arriba al sitio +1 correspondería al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón y para tener un punto de referencia se comparó mediante un alineamiento la secuencia de DNA del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb con la secuencia de 11.7 kb del promotor del canal Na_x de rata (Poiraud *et al.*, 1999, con número de acceso en el GenBank AF125160). En la secuencia de Poiraud y colaboradores (1999) reportan 6500 nt río arriba del exón 1 que corresponden al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata y parte del intrón 1. También determinaron que la transcripción del mRNA del gene Na_x de rata proviene de un solo promotor con múltiples sitios de iniciación.

En el alineamiento se muestra que la secuencia de DNA del fragmento genómico de 4.1 kb presenta una homología total del 70 % con la secuencia de 11.7 kb del promotor Na_x de rata. En la figura 17 C, se observa realmente que el alineamiento muestra homología con 2 regiones, la primera del sitio -3412 al sitio -1089 de la secuencia del fragmento genómico de ratón que presenta una homología del 75 % con la región del sitio -4058 al sitio -1719 del promotor Na_x de rata, inmediatamente después de este sitio se observa que hay una región de aproximadamente 500 pb en la secuencia de rata que no se encuentra en la secuencia de ratón y por último, del sitio -1021 al nucleótido 332 del intrón 1 de la secuencia de ratón presenta una homología del 81 % con la secuencia de rata en los sitios -1204 al nucleótido 591 del intrón 1. El resultado de este alineamiento nos indica que la secuencia de DNA genómico de ratón muestra un porcentaje de homología considerable con la secuencia del promotor del gene Na_x de rata.

Con base en los resultados obtenidos en el mapeo del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con enzimas de restricción, la secuenciación de dicho fragmento y los diferentes alineamientos, pudimos identificar que en el fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb contenido en el plásmido pMB1, se encuentra el primer exón el cual no había sido reportado y que corresponde en su totalidad a región 5' UTR del mRNA de Na_x que esta precedida por 3412 pb pertenecientes al posible promotor transcripcional del

gene del canal Na_x de ratón y además encontramos en esta secuencia (río abajo del exón 1) un fragmento de 332 pb que pertenecen al principio del intrón 1. El exón 1 tiene un tamaño de 361 pb y determinamos que la transcripción del mRNA del canal Na_x es iniciado por un solo promotor con múltiples sitios de inicio de la transcripción. La información de la estructura determinada del extremo 5' del gene del canal Na_x de ratón se encuentra resumida en la figura 18.

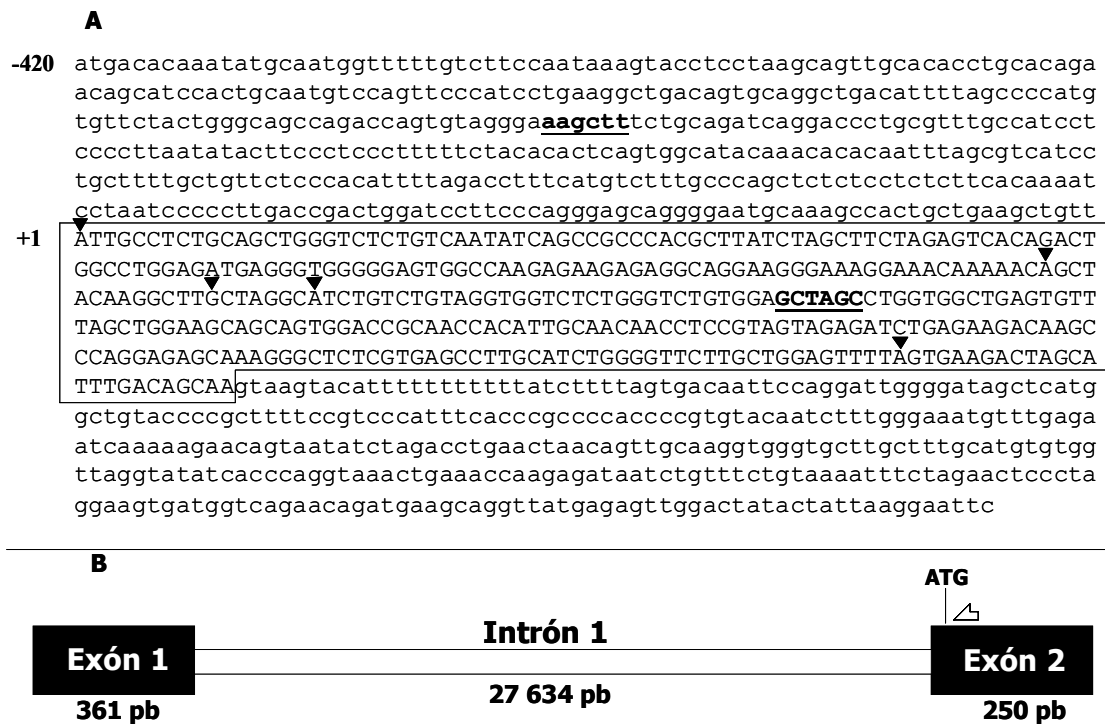


Figura 18. Estructura del extremo 5' del gene del canal Na_x de ratón. A) Parte de la secuencia del fragmento genómico de 4.1 kb de pMB1, con triángulos negros se indican los sitios de inicio de la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón determinados por ensayos de RACE al 5'. Con letras mayúsculas y encerrado se muestra el exón 1 e inmediatamente después el principio del intrón 1 (332 pb). Con letras minúsculas y subrayado se observa el sitio de corte para *Hind*III (sitio -248) y en letras mayúsculas y subrayado el sitio de corte para *Nhe*I (sitio +189). **B)** Esquema del exón 1 y del principio de la región codificante (exón 2) del gene del canal Na_x. El exón 1 tiene un tamaño de 361 pb y la línea delgada (en blanco) representa al intrón 1 con un tamaño de 27 634 pb (datos obtenidos del análisis de las secuencias CAAA01194598 y CAAA01183759). En el exón 2 se muestra el sitio de inicio de la traducción (ATG) y la posición del oligonucleótido usado para los ensayos de RACE al 5' (flecha blanca).

Para determinar *in silico* la estructura completa del gene del canal Na_x de ratón se sometió la secuencia de 4106 pb del fragmento genómico de ratón que corresponde a la región 5' UTR y al promotor transcripcional de Na_x y la secuencia de exones (cDNA) del canal Na_x de ratón reportada por Felipe y colaboradores (1994) al programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmBlast.html>) para hacer una comparación con la secuencia del genoma de ratón del GenBank. En la comparación se encontró la

secuencia completa del gene Na_x de ratón en 11 archivos (con números de acceso CAAA01194598, CAAA01183759, CAAA01162118, CAAA01149478, CAAA01174856, CAAA01104374, CAAA01046143, CAAA01046140, CAAA01046137, CAAA01046134 y CAAA01046131). El tamaño de la secuencia de los 11 archivos es > de 140 kb, conteniendo secuencias río arriba del promotor transcripcional del gene Na_x , la región 5' UTR, los exones e intrones y la región 3' UTR. Con esta información pudimos deducir el tamaño de los exones e intrones del gene del canal Na_x de ratón que se reportan en la tabla XI.

Tabla XI. Composición de exones del gene del canal Na_x de ratón.

Exones	Tamaño (pb)	Intrones	Tamaño (pb)
1 (5' UTR)	361	1	27634
2 (14 pb 5' UTR y ATG)	250	2	4808
3	120	3	237
4	90	4	5107
5	129	5	1653
6	93	6	4378
7	204	7	7682
8	72	8	2717
9	141	9	11656
10	207	10	8741
11	96	11	1077
12	243	12	2795
13	168	13	704
14	357	14	1856
15	435	15	2637
16	108	16	2152
17	153	17	2800
18	177	18	1695
19	108	19	3438
20	276	20	695
21	57	21	423
22	135	22	1644
23	105	23	519
24	270	24	3514
25 (codones de paro TAA y TGA)	1062		

IV. Análisis funcional del promotor transcripcional del canal Na_x

Para evaluar si la región río arriba del sitio +1 dentro del fragmento de DNA genómico de 4.1 kb correspondía al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón analizamos funcionalmente su capacidad de promover la expresión del gene reportero luciferasa, para esto García-Villegas (2002), clonó un fragmento genómico de 3.6 kb de pMB1 que va desde el sitio -3412 al sitio +189 flanqueado por los sitios *KpnI/NheI*. Para facilitar la construcción de las clonas, este fragmento se introdujo de forma dirigida en los sitios de restricción *KpnI/NheI* del vector de expresión pGL3 Básico (Promega) y se denominó pNX 3.6 Luc (figura 8).

Por otro lado, para identificar secuencias que sean importantes para el funcionamiento del promotor del canal Na_x de ratón (ya sea activando o reprimiendo la transcripción del mRNA), a partir del plásmido pNX 3.6 Luc, R. García-Villegas (2002), generó 2 deleciones del extremo 5', a -1145 en el sitio de restricción *NcoI* y a -248 en el sitio de restricción *HindIII*. Estas construcciones se denominaron pNX 1.3 Luc y pNX 0.4 Luc respectivamente (figura 8).

En este trabajo se evaluó la actividad promotora de las construcciones pNX 3.6 Luc, pNX 1.3 Luc y pNX 0.4 Luc transfectándolas transientemente en cultivos de 3 líneas celulares de mamífero, utilizando como método de trasfección Lipofectamina 2000. Las líneas celulares empleadas fueron: Neuro 2A (neuroblastoma de ratón) la cual expresa niveles altos del mRNA del gene del canal Na_x ; NG108-15 (neuroblastoma de ratón) que expresa bajos niveles del mRNA de Na_x ; y L6 (mioblasto de rata) que no expresan el mRNA del gene del canal Na_x . Cada construcción se cotransfectó en cada línea celular con una cantidad constante del plásmido pCMV β (Clontech) que contiene el gene reportero lacZ, esto para estandarizar y normalizar los datos de la actividad de luciferasa conforme a la eficiencia de la transfección. Como controles se utilizaron los plásmidos pGL3 Básico (Promega) el cual contiene al gene reportero luciferasa (sin promotor) y pGL3 Promotor (Promega) el cual contiene al gene reportero luciferasa bajo la transcripción del promotor temprano del virus SV40. La actividad de luciferasa obtenida en las 3 líneas celulares se muestra en la figura 19.

Al transfectar con la construcción pNX 3.6 Luc las 2 líneas celulares (Neuro 2A y NG108-15) que expresan el mRNA de Na_x , se observó una actividad de luciferasa de 5.29 en Neuro 2A y de 3.8 en NG108-15; al comparar estos resultados con la actividad obtenida cuando se transfectaron estas 2 líneas celulares con el vector pGL3 Promotor (actividad de luciferasa de 7.7 en Neuro 2A y de 4 en NG108-15) podemos deducir que el fragmento de 3.6 kb de genoma de ratón en el plásmido pNX 3.6 Luc tiene actividad de promotor, ya que dirige la expresión del gene reportero luciferasa de manera similar al promotor del virus SV40 presente en el vector pGL3 Promotor (Promega). Sin embargo, cuando se transfectó con la misma construcción la línea celular L6 que no expresa el mRNA de Na_x el fragmento de 3.6 kb también es activo presentando una actividad de luciferasa de 5.8 (prácticamente al mismo nivel que cuando se transfecta en Neuro 2A) y cuando se transfectó la línea L6 con el vector pGL3 Promotor se observó una actividad de 23.06, sobrepasando la actividad mostrada en las líneas celulares neuronales. Estos resultados nos indican que el fragmento de 3.6 kb presenta actividad de promotor transcripcional, pero no contiene todos los elementos de regulación tejido-específica, ya

que este fragmento también es activo en la línea celular no neuronal L6 que no expresa el mRNA de Na_x.

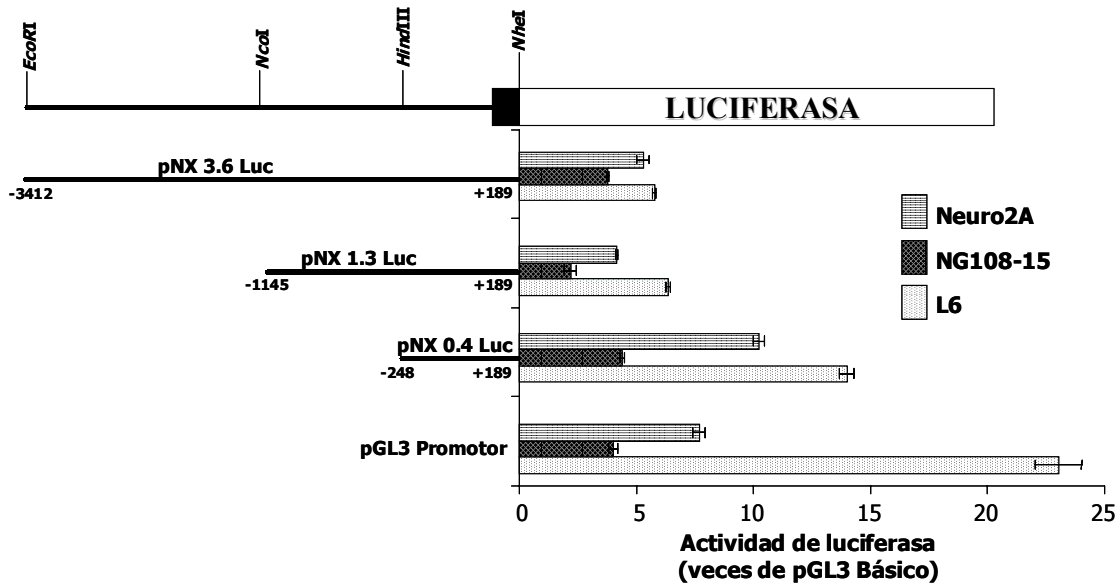


Figura 19. Análisis funcional del fragmento de DNA genómico de 3.6 kb de ratón. Las construcciones pNX 3.6 Luc, pNX 1.3 Luc y pNX 0.4 Luc, se transfectoron transientemente con Lipofectamina 2000 a 3 líneas celulares: Neuro 2A y NG108-15 (neuroblastoma de ratón) y L6 (muscular de rata). La gráfica muestra el valor promedio de actividad de luciferasa (\pm E. S.) obtenido de dos preparaciones independientes de cada construcción por duplicado. Los resultados se expresan como el múltiplo de la actividad basal obtenida con el plásmido pGL3 Básico.

De igual forma al realizar la transfección con las construcciones pNX 1.3 Luc y pNX 0.4 Luc, ambas fueron activas en las 3 líneas celulares. Cuando se transfectoron las 2 líneas celulares neuronales con la construcción pNX 1.3 Luc se observó una actividad de luciferasa de 4.14 en Neuro 2A y de 2.19 en NG108-15, disminuyendo en comparación con la actividad mostrada cuando se transfectoron las mismas líneas celulares con pNX 3.6 Luc, esto tal vez podría deberse a que entre la región -3412 y -1145 se encuentren algunos elementos que intervengan en el control de la transcripción del mRNA de Na_x. Por otro lado, cuando se transfectó la línea celular Neuro 2A con la construcción pNX 0.4 Luc se observó una actividad de luciferasa de 10.22 incrementando de manera significativa, casi el doble de la actividad mostrada cuando se transfectó con pNX 3.6 Luc. Mientras que con la construcción pNX 0.4 Luc en la línea celular NG108-15 mostró una actividad de luciferasa de 4.39, prácticamente al mismo nivel que con la construcción pNX 3.6 Luc.

Los resultados de la actividad de luciferasa en la línea celular L6 con la construcción pNX 1.3 Luc es de 6.34, mientras que con la construcción pNX 0.4 Luc se observó una actividad de 14.02, sobrepasando casi al doble la actividad mostrada con la construcción

pNX 1.3 Luc. Con los resultados mostrados con las 2 deleciones de la construcción pNX 3.6 Luc deducimos que probablemente entre la región -3412 a -248 pudieran encontrarse elementos de DNA que unan factores de transcripción que repriman la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón, ya que con la construcción pNX 0.4 Luc de 437 nt que contiene 248 nt del promotor transcripcional y 189 nt del exón 1, se dirige de manera significativa altos niveles de expresión del gene reportero luciferasa en comparación con las otras 2 construcciones.

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de transfección transiente en 3 líneas celulares, queda demostrado que el fragmento genómico de ratón de 3.6 kb (del sitio -3412 a +189) de pNX 3.6 Luc presenta actividad de promotor transcripcional, pero no contiene todos los elementos de regulación tejido-específica, ya que este fragmento también es activo en la línea celular no neuronal (L6) que no expresa el mRNA del gene del canal Na_x.

Como en los ensayos de transfección transiente quedó demostrado que el fragmento genómico de 3.6 kb corresponde al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón, la secuencia de DNA del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb que secuenciamos en este trabajo se analizó en una base de datos de factores de transcripción (TFSEARCH – Transcription Factor Search, <http://cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) para buscar probables sitios de unión de factores que intervengan o estén implicados en el ensamblaje del complejo de inicio de la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón.

En la secuencia analizada encontramos que el promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón esta desprovisto de una región rica en G+C y se reveló la ausencia de la caja CAAT y la caja TATA. Esta característica ha sido frecuentemente observada en promotores de genes neuronales (Jansen *et al.*, 1995), como por ejemplo el gene cerebro-específico de aldolasa C (Vibert *et al.*, 1989) o el gene prohormona convertasa 1 (PC1) que se expresa predominantemente en células de origen neuroendocrinas (Jansen *et al.*, 1995); ambos poseen un promotor con múltiples sitios de inicio de la transcripción y están desprovistos de caja TATA y CAAT.

En la secuencia de DNA del fragmento genómico de ratón de 4.1 kb que corresponde al promotor transcripcional, al exón 1 y al inicio del intrón 1 del gene del canal Na_x de ratón, se encontraron sitios de homología parcial (con una identidad > a 85 %) para factores que probablemente participan en la regulación de este gene, los sitios encontrados son:

- ✦ C/EBP: familia de factores de transcripción que activan la transcripción *in vitro* e *in vivo* del gene IL-6, pero también son responsables de la regulación de genes que codifican otras citocinas inflamatorias, varias proteínas adipocito-específicas y proteínas virales. El factor C/EBP se une al DNA en la secuencia 5'-TKNNGYAAKATTGCGCAAT-3'.
- ✦ AML-1a: factor de transcripción que está relacionado a la leucemia mieloide, ha sido descrito como el principal regulador de la hematopoyesis (activa la transcripción de varios genes mieloide-específicos) aunque también puede actuar como un elemento de regulación negativa, este factor se une al DNA en la secuencia 5'-TGCGGT-3'.
- ✦ Oct-1: proteínas de homeodominio POU que son reguladores básicos importantes y también son tejido-específicos, regula al gene de histona (H2B) y a los genes de inmunoglobulinas (de cadena pesada y ligera) y se une al DNA en la secuencia 5'-ATGCAAAT-3'.
- ✦ Ap-1: familia de factores de transcripción que juegan un papel en la expresión de muchos genes involucrados en la proliferación celular, este factor es una proteína que forma heterodímeros complejos derivados de la familia Fos y Jun, aunque también puede formar homodímeros y heterodímeros con miembros de la familia ATF/CREB uniéndose al DNA en la secuencia 5'-TGA(C/G)TCA-3', además este factor responde a factores de crecimiento, a TPA (o 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) y a la proteína cinasa C (PKC).
- ✦ NF-kapB: factor que está implicado en la regulación de muchos genes que codifican mediadores de la respuesta inmune en procesos de inflamación e infecciones; factor que es inducible por varios agentes (lipopolisacaridos, TNF, PKA o señales mediadas por la PKC) y reconoce al DNA en la secuencia 5'-GGGACTTCC-3'.
- ✦ GR: factor de transcripción que actúa reprimiendo o activando en respuesta a hormonas glucocorticoides, además coopera con otros factores de transcripción y puede inhibir la interacción con c-Fos y c-Jun; este factor se une al DNA en la secuencia 5'-GGTACANNNTGTTCT-3'.
- ✦ CREB: factor que es importante en una gran variedad de procesos (proliferación celular, diferenciación y respuestas adaptativas), CREB es un miembro de la familia de factores ATF (activadores de la transcripción) y reconoce al DNA en la secuencia 5'-TGACGTCA-3', es estimulado por hormonas, factores de crecimiento, actividad neuronal y por la fosforilación de la serina 133 por la PKA, además interactúa con TAF_{II}110 componente de TFIID.
- ✦ NGFI-C: factor de transcripción que pertenece a la familia de genes NGFI (estimulados por NGF) involucrados con la diferenciación celular, es un factor con 3 dedos de zinc,

una región rica en prolina y que también se conoce como Egr-4; reconoce al DNA en la secuencia 5'-GCGGGGCG-3'.

Los sitios encontrados en la secuencia de DNA del fragmento genómico de 4.1 kb se indican en la siguiente figura:

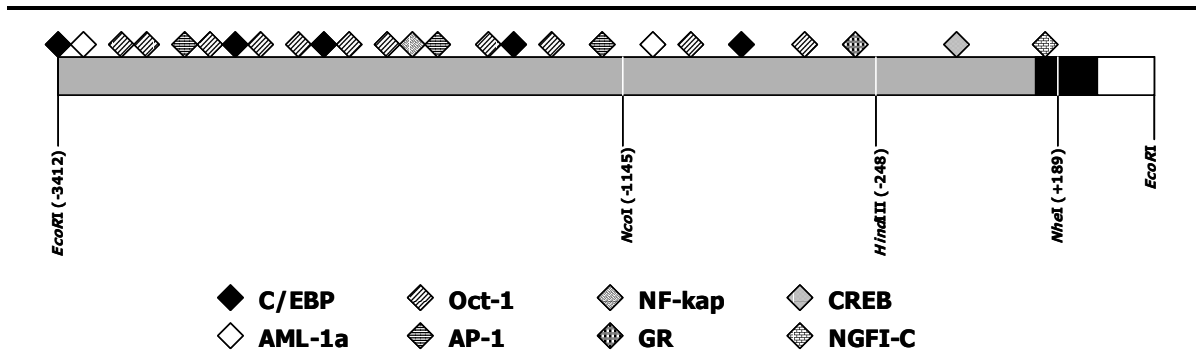


Figura 20. Esquema de la posición de los probables sitios de unión a factores de transcripción que podrían regular al promotor de Na_x . En la figura se muestra el fragmento genómico de 4.1 kb que corresponde al promotor transcripcional, al exón 1 (caja negra) y al inicio del primer intrón del gene del canal Na_x de ratón (caja blanca), además se indican los sitios de restricción que se utilizaron para generar las 3 construcciones que contienen al gene reportero luciferasa. Los probables sitios de unión de factores de transcripción se indican en rombos (en diferente trama).

V. Actividad del promotor del canal Na_x en respuesta a db AMPc

En nuestro laboratorio, se ha demostrado la expresión diferencial del mRNA del gene del canal Na_x en las líneas celulares de neuroblastoma de ratón NG108-15 y Neuro 2A. La línea celular NG108-15 expresa el mRNA del gene del canal Na_x a niveles muy bajos pero al ser diferenciada por tratamiento con 1 mM de dibutilil adenosin monofosfato cíclico (db AMPc –agente permeable a la membrana celular y que es análogo al AMPc ya que activa a la PKA) durante de 48 h se observó un incremento en el nivel del mRNA y contrariamente, en la línea celular Neuro 2A que expresa niveles altos del mRNA de Na_x al ser diferenciada por tratamiento con 1mM de db AMPc ó 20 μ M de ácido retinoico se reduce la expresión del mRNA de Na_x . Es por esto que se decidió determinar si el promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón es capaz de responder al tratamiento con db AMPc, para ello se probó el fragmento genómico de ratón de 3.6 kb (que va del sitio –3412 al sitio +189) y las 2 deleciones del extremo 5' en ensayos de transfección transiente en la línea celular Neuro 2A en ausencia y presencia de db AMPc.

Para llevar a cabo este ensayo, el fragmento de 3.6 kb y las 2 deleciones del extremo 5' que contienen el gene reportero luciferasa se clonaron en el vector de expresión p β -gal

Básico (Clontech) que contiene al gene reportero LacZ (que codifica para la enzima β -galactosidasa), ya que está reportado que la proteína luciferasa se estabiliza por tratamiento con algunos factores de crecimiento o diferenciación celular (Carey y Smale, 2000). Primero, el fragmento de 3.6 kb se extrajo del plásmido pNX 3.6 Luc (R. García-Villegas, 2002) con las enzimas *KpnI/NheI* y se clonó de manera dirigida en el vector β -gal Básico (Clontech) en los mismos sitios de restricción (construcción pMB 3.6 β -gal) y se verificó la orientación del fragmento en el vector por medio de una restricción del DNA del plásmido con la enzima *HindIII* lo que generó 4 bandas (de 7.5, 1.9, 1.3 y 0.4 kb –figura 21 A) las cuales corresponden a los sitios de restricción *HindIII* dentro del fragmento de 3.6 kb y a los sitios del vector; después para clonar el fragmento de 1.3 kb, el plásmido pNX 3.6 Luc se cortó con las enzimas *NcoI/NheI* y se purificó el fragmento de 1.3 kb el cual fue reparado con la enzima Klenow para dejar extremos romos, el fragmento se clonó en el plásmido β -gal Básico (Clontech) en el sitio de restricción *SmaI* que también deja extremos romos (construcción pMB 1.3 β -gal) y para poder verificar la orientación del fragmento se realizó una restricción del DNA del plásmido con la enzima *HindIII* generando 2 bandas una de 8.3 kb y otra de 0.5 kb (figura 21 B) indicando que el fragmento se clonó de manera correcta en el vector; y por último a partir del plásmido pNX 0.4 Luc se purificó el fragmento de 0.4 kb utilizando la enzima *HindIII* que corta en el sitio –248 y en el sitio *HindIII* de la región de clonación múltiple del vector pGL3 Básico (Promega), este sitio se encuentra inmediatamente 3' al sitio *NheI* del fragmento genómico de ratón, así el fragmento de 0.4 kb se clonó en el plásmido β -gal Básico (Clontech) en el sitio de restricción *HindIII* (construcción pMB 0.4 β -gal) y para verificar la orientación del fragmento se realizó una digestión del DNA del plásmido con la enzima *NheI* generando 2 bandas una de 7.5 kb y otra de 0.4 kb (figura 21 C), este resultado nos indica que el fragmento se clonó de manera correcta ya que si el sitio *NheI* del fragmento se encontrara cercano al sitio *NheI* de la región de clonación múltiple del vector solamente se linearizaría.

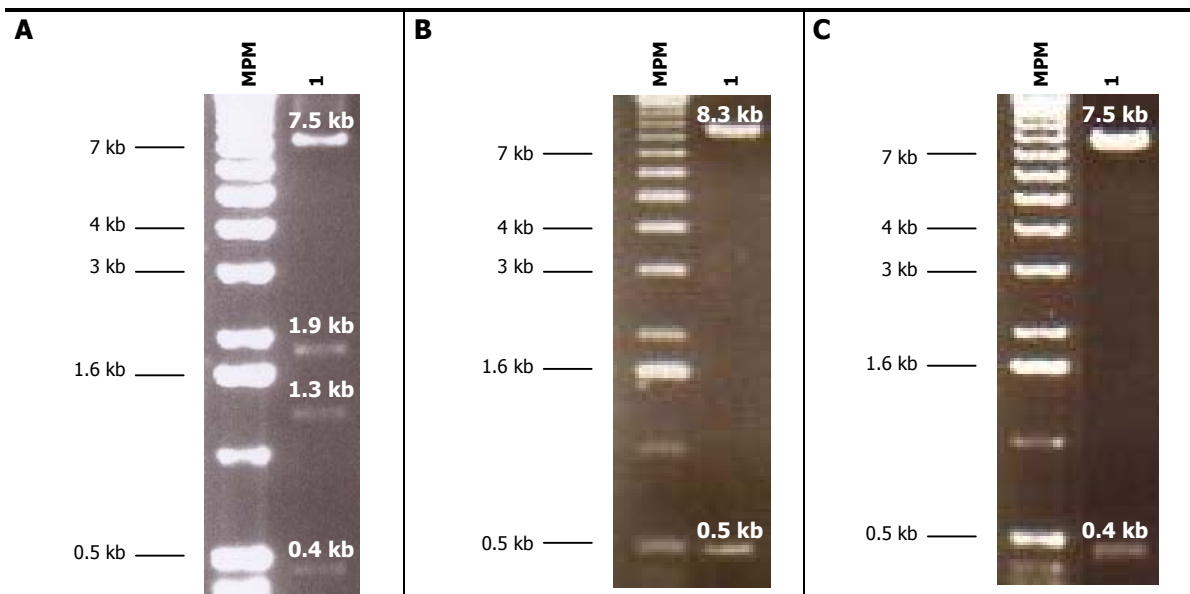


Figura 21. Verificación de la identidad y orientación de las construcciones del promotor de Na_x con el reportero β -gal. La digestión del DNA de los plásmidos pMB 3.6 β -gal, pMB 1.3 β -gal y pMB 0.4 β -gal se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y como punto de referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (MPM) indicado a la izquierda de cada fotografía. **A)** Digestión del DNA del plásmido pMB 3.6 β -gal con la enzima *Hind*III (carril 1). **B)** Digestión del DNA del plásmido pMB 1.3 β -gal con la enzima *Hind*III (carril 1). **C)** Digestión del DNA del plásmido pMB 0.4 β -gal con la enzima *Nhe*I (carril 1). En cada fotografía se muestra en letras blancas el tamaño de cada banda generada por la digestión.

Las 3 construcciones que contienen el gene reportero LacZ se transfectaron transientemente en la línea celular Neuro 2A con Lipofectamina 2000. Cada construcción se cotransfectó con una cantidad constante del plásmido pGL3 Promotor (Promega) que contiene al gene reportero luciferasa bajo el control del promotor temprano del virus SV40 para estandarizar la eficiencia de la transfección, como control se utilizó el plásmido p β -gal Básico (Clontech) el cual contiene al gene LacZ sin promotor y la construcción SV40/LacZ (A. López, 2002); esta construcción expresa LacZ bajo la regulación del promotor temprano del virus SV40. Después de 4 h de transfección los cultivos celulares fueron divididos en 2 y a uno de ellos se le agregó db AMPc (a una concentración final de 1 mM) y el otro se mantuvo en las mismas condiciones.

Cuando se realizó la transfección de la línea celular Neuro 2A con la construcción pMB 3.6 β -gal sin tratamiento con db AMPc se observó una actividad de β -galactosidasa de 9.19, con la construcción pMB 1.3 β -gal se registró una actividad de 23.37 y con la construcción pMB 0.4 β -gal se observó una actividad de 43.39. Por otro lado, cuando se midió la actividad de β -galactosidasa en la transfección de la línea celular Neuro 2A con tratamiento de db AMPc, con la construcción pMB 3.6 β -gal se observó una actividad de 56, utilizando la construcción pMB 1.3 β -gal se registró una actividad de 97 y por último

con la construcción pMB 0.4 β -gal se observó una actividad de 193.7 (figura 22). Al realizar la medición de la actividad de β -galactosidasa cuando se transfectó la línea celular Neuro 2A con la construcción SV40/LacZ sin tratamiento con db AMPc se observó una actividad de 774.49 y con tratamiento se registró una actividad de 1273.63 (figura 22). Estos resultados muestran que cuando se transfectaron las 3 construcciones del promotor de Na_x en la línea celular Neuro 2A y se trataron con db AMPc, se ve incrementada 6 veces la actividad de β -galactosidasa en pMB 3.6 β gal, 4 veces en pMB 1.3 β gal y 4.5 veces en pMB 0.4 β gal, en comparación con la actividad obtenida para cada plásmido sin tratamiento con db AMPc (figura 22). Esto nos indica que el db AMPc regula positivamente al promotor transcripcional del gene del canal de sodio Na_x , ya que al transfectar el plásmido SV40/LacZ (A. López, 2002) en Neuro 2A (con tratamiento de db AMPc) solo presentó un incremento de la actividad de β -galactosidasa de 1.6 veces en promedio en comparación con la actividad sin tratamiento de db AMPc (figura 22).

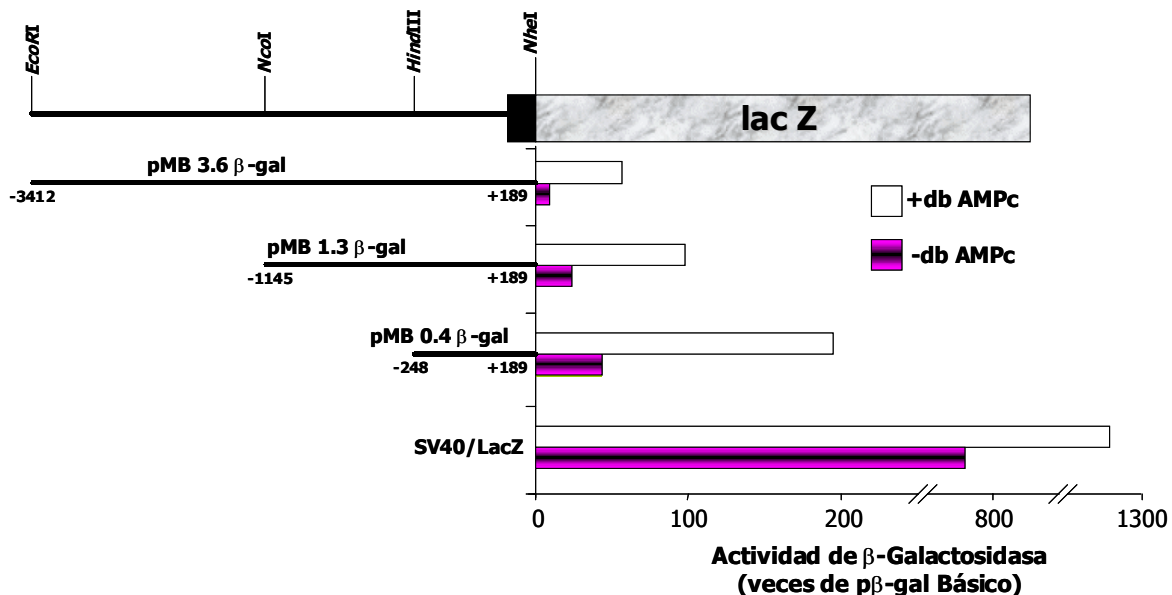


Figura 22. Respuesta del promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón a db-AMPc. Las diferentes deleciones del promotor Na_x descritas en la figura 19 se clonaron en el vector p β -gal Básico (Clontech) que contiene al gene reportero LacZ. Las 3 construcciones se transfectaron transientemente con Lipofectamina 2000 en la línea celular neuronal Neuro 2A. Después de 4 h de transfección los cultivos fueron divididos en dos y a uno de ellos se le agregó db-AMPc (1 mM) y el otro se mantuvo en las mismas condiciones; 36 h después se procedió al ensayo del reportero β -galactosidasa. La gráfica muestra el promedio obtenido de una preparación de cada construcción por duplicado y los resultados se expresan como el múltiplo de la actividad basal obtenida con el plásmido p β -gal Básico.

DISCUSIÓN

La parte central de este trabajo consistió en la clonación y caracterización del promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón. En el presente estudio, inicialmente se secuenciaron 6 clonas obtenidas de los ensayos tipo RACE al 5' (S. Arni, 2001, comunicación personal –datos no publicados) como una estrategia para determinar el extremo 5' del mRNA del gene del canal Na_x de ratón, ya que en la literatura sólo está reportada una secuencia de cDNA del canal Na_x de ratón de 5.4 kb (Felipe *et al.*, 1994, con número de acceso en el GenBank L36179) que contiene 251 pb de la región 5' UTR del mRNA, la región codificante y parte de la región 3' UTR del mRNA; adicionalmente hay reportada una secuencia de DNA genómico de 6.9 kb (Watanabe *et al.*, 2000, con número de acceso en el GenBank AF190472) que comienza con la parte final del intrón 1 del gene del canal Na_x de ratón. Sin embargo, ninguna de las secuencias reportadas en el GenBank corresponden al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón.

A través de la secuenciación de las clonas pCR14, pCR17, pCR24, pBS3, pBS13 y pBS27, derivadas del ensayo de RACE al 5' se encontró que el promotor de Na_x presenta múltiples sitios de inicio de la transcripción, además, definimos el sitio +1 del transcrito del mRNA del gene Na_x en el extremo 5' de la clona RACE más larga secuenciada, 375 pb río arriba del codón "ATG" de inicio de la traducción (figura 9). Otro punto importante es que con los resultados que obtuvimos en la comparación de las secuencias de cDNA de las clonas RACE con la secuencia de DNA genómico (Watanabe *et al.*, 2000) pudimos determinar que las primeras 361 pb de la región 5' UTR del mRNA de Na_x corresponden al exón 1. El tamaño y la secuencia del exón 1 del mRNA de Na_x no se habían reportado en la literatura y por otro lado confirmamos que, el exón 2 que tiene un tamaño de 250 pb inicia con 14 pb de la región 5' UTR del mRNA y contiene al codón ATG de inicio de traducción (figura 9).

A partir de la clona BAC Na_x-1 (fragmento de genoma de ratón de 135 kb) clonamos un fragmento de DNA genómico de 4.1 kb el cual se secuenció en ambas cadenas (figura 16), y utilizando la secuencia obtenida y por medio de un mapeo con enzimas de restricción (figura 14) se identificó la presencia del sitio +1 a 0.7 kb del extremo 3' del fragmento de DNA de 4.1 kb, lo que nos indicó que las 3.4 kb río arriba del sitio +1 deberían corresponder al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón. La secuencia del fragmento de DNA genómico de 4.1 kb se comparó con la secuencia del genoma de ratón liberada en el mes de Mayo del 2002 en el GenBank, encontrando en su totalidad la secuencia de 4.1 kb en un archivo de 35.9 kb (con número de acceso

CAAA01194598), aunque en la base de datos no se hace referencia a que gene corresponde.

Por otro lado, la secuencia del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb se analizó mediante un alineamiento con la secuencia L36179 y con las secuencias de cDNA de las clonas RACE (S. Arni, 2001, comunicación personal –datos no publicados); los resultados indicaron que las primeras 36 pb de las 251 pb de la región 5' UTR del mRNA de Na_x reportada por Felipe y colaboradores (1994) no corresponden al gene del canal Na_x de ratón, ya que no presentan homología con la secuencia del fragmento de DNA genómico de 4.1 kb (figura 17 A). Esto concuerda con lo mostrado en el alineamiento de las secuencias de cDNA de las clonas RACE con la secuencia L36179 (figura 9), confirmando que las primeras 36 pb de la secuencia L36179 tal vez provienen del vector en donde estos autores clonaron el cDNA.

Adicionalmente, con el extremo 5' de cada clona RACE se ubicó la posición de cada sitio de inicio de la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón dentro de la secuencia del fragmento de DNA genómico de 4.1 kb (figura 17 B y 18 A) y en el extremo 3' del fragmento genómico se identificó la presencia del inicio del intrón 1, ya que el exón 2 (identificado en las secuencias de las clonas RACE) no presenta homología con el fragmento de 4.1 kb y esto se demuestra también con la presencia del sitio *EcoRI* que se utilizó para clonar el fragmento genómico, ya que en la secuencia L36179 no existe ningún sitio de reconocimiento para *EcoRI* (figura 17 A y 17 B).

Con los resultados que obtuvimos queda demostrado que dentro del fragmento de DNA genómico de ratón de 4.1 kb del plásmido pMB1 se encuentra el exón 1 (de 361 pb) el cual no había sido reportado anteriormente y que identificamos en este trabajo (figura 18 A). Además, se identificaron 332 pb del primer intrón y 3412 pb río arriba del sitio +1 que corresponden al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón. Es de resaltar que aunque hay un reporte de secuencia genómica del gene del canal Na_x de ratón (Watanabe *et al.*, 2000, con número de acceso en el GenBank AF190472) el promotor transcripcional no había sido reportado.

La secuencia río arriba al sitio +1 se analizó y se encontró que el promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón no presenta una región rica en G+C, además, se reveló la ausencia de secuencias consenso de promotores eucarióticos como son la caja TATA y la caja CAAT. Esta característica ha sido observada frecuentemente en algunos genes neuronales con promotores que presentan inicios de transcripción

heterogéneos como los que encontramos en el promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón, ejemplo de esto es el gene cerebro-específico de aldolasa C (Vibert *et al.*, 1989); el gene prohormona convertasa 1 que se expresa predominantemente en células de origen neuroendocrinas (Jansen *et al.*, 1995); el gene del canal $\text{Na}_v1.2$ que se expresa en el Sistema Nervioso Central (Maue *et al.*, 1990); el gene del receptor de dopamina D_{1A} (Minowa *et al.*, 1992); y el gene $\text{Na}_v1.7$ que se expresa en el Sistema Nervioso Periférico (García-Villegas *et al.*, 2000).

En la literatura existe el reporte de una secuencia de 11.7 kb que corresponde al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata (Poiraud *et al.*, 1999) con número de acceso en el GenBank AF125160. En la secuencia reportada por Poiraud y colaboradores (1999), se encuentran 6500 pb río arriba del exón 1 (que tiene un tamaño de 222 pb) que corresponden al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata, además, en su investigación determinaron mediante ensayos de protección a degradación con RNasas y extensión de primer que la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de rata proviene de un sólo promotor con múltiples sitios de iniciación y al igual que en el promotor del canal Na_x de ratón no encontraron caja TATA en la secuencia analizada.

Por otro lado, para demostrar que el fragmento de DNA genómico de 4.1 kb que secuenciamos presenta actividad de promotor transcripcional se construyeron 3 plásmidos que contienen 3.6, 1.3 y 0.4 kb del fragmento de DNA genómico, analizando así su capacidad de promover la expresión del gene reportero luciferasa. Se demostró mediante ensayos de transfección transiente de 2 líneas celulares de neuroblastoma de ratón (Neuro 2A y NG108-15) que el fragmento de DNA de 3.6 kb flanqueante al 5' del gene del canal Na_x de ratón (del sitio -3412 a +189) presenta actividad de promotor transcripcional ya que dirige la expresión del gene reportero luciferasa de forma similar al promotor del virus SV40 presente en el vector pGL3 Promotor, sin embargo, también se observó que el promotor también es activo en la línea celular L6 (muscular) que no expresa el mRNA de Na_x , estos resultados nos sugieren que el fragmento de DNA genómico de ratón de 3.6 kb no contiene todos los elementos de regulación tejido-específica. En el análisis de las deleciones realizadas al fragmento de DNA de 3.6 kb se observaron diferencias mínimas en el nivel de expresión del gene reportero de la construcción que contiene el fragmento de 1.3 kb (de -1145 a +189) en comparación con la que contiene el fragmento de 3.6 kb, aunque por otro lado, en la construcción que contiene el fragmento de 0.4 kb (de -248 a +189) se observó que dirige de forma significativa altos niveles de expresión del gene reportero luciferasa (figura 19), indicando con esto que la región de 248 pb proximal al

promotor y 189 pb del primer exón corresponde al promotor mínimo transcripcional del gene del canal Na_x de ratón.

En nuestro laboratorio se ha analizado la expresión del mRNA del gene del canal Na_x de ratón en diferentes líneas celulares de neuroblastoma de ratón y se ha visto que una de ellas, la línea celular Neuro 2A, expresa el mRNA de Na_x y cuando estas células se inducen a diferenciación terminal por tratamiento con db AMPc (análogo permeable de AMPc) (Wong *et al.*, 2002) ó ácido retinoico (Jian Mao *et al.*, 2000) se reduce la expresión del mRNA del canal Na_x. Además, en la literatura hay un reporte que indica que el AMPc regula positivamente la actividad del promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata en células de Schwann (Gautron *et al.*, 2001), contrariamente a lo que observamos en los niveles endógenos del mRNA de Na_x de ratón en la línea celular Neuro 2A, es por esto que nos interesó determinar si la expresión del gene reportero, bajo la regulación de 3.6, 1.3 ó 0.4 kb del promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón se podía modular por tratamiento con db AMPc en células Neuro 2A. Para esto se construyeron plásmidos que tenían al gene reportero LacZ en vez del gene reportero luciferasa, dado que se ha reportado que la proteína luciferasa se estabiliza por tratamiento con algunos factores de crecimiento o diferenciación celular (Carey y Smale, 2000).

Los resultados de la actividad β -galactosidasa en la línea celular Neuro 2A sin tratamiento con db AMPc muestran por un lado, prácticamente el mismo patrón de actividad observado con las construcciones que contienen el gene reportero luciferasa, donde el fragmento más corto (fragmento de 0.4 kb, del sitio -248 a +189) presenta mayor actividad; aunque la construcción pNX 0.4 Luc en la línea celular Neuro 2A presenta el doble de la actividad que la construcción pNX 3.6 Luc y en las construcciones con el gene reportero β -gal la construcción pMB 0.4 β -gal presenta en promedio 4 veces más actividad que la construcción pMB 3.6 β -gal. Cuando se transfectaron las 3 construcciones del promotor de Na_x en la línea celular Neuro 2A y se trató con db AMPc se observó que la actividad de β -galactosidasa se ve incrementada en promedio 6 veces en pMB 3.6 β -gal, 4 veces en pMB 1.3 β -gal y 4.5 veces en pMB 0.4 β -gal, en comparación con la actividad registrada para cada plásmido sin tratamiento con db AMPc, lo que nos indica que el db AMPc regula positivamente el promotor transcripcional del gene del canal Na_x (figura 22).

En los resultados de la actividad β -galactosidasa del plásmido SV40/LacZ en la línea celular Neuro 2A (con y sin tratamiento de db AMPc) sus valores se disparan en comparación con la actividad mostrada por la construcción pMB 3.6 β -gal (figura 22), estos resultados no concuerdan con los resultados mostrados con el gene reportero

luciferasa donde la construcción pNX 3.6 Luc presenta una actividad similar al plásmido pGL3 Promotor (Promega) dejando claro que el fragmento de 3.6 kb de genoma de ratón presenta actividad de promotor transcripcional (figura 19). Esto tal vez se deba a la forma en la que se realizó la construcción del plásmido SV40/LacZ, ya que se substituyó el promotor de citomegalovirus del plásmido pCMV β (Clontech) por el promotor del virus SV40 del plásmido pGL3 Promotor (Promega) y esto probablemente dé como resultado que la construcción SV40/LacZ presente mayor actividad transcripcional. Además, se observó que el plásmido SV40/LacZ en la línea celular Neuro 2A cuando es tratada con db AMPc solo presentó un aumento de 1.6 veces en comparación con la actividad sin tratamiento de db AMPc (figura 22).

La construcción pMB 0.4 β -gal dirige altos niveles de expresión del gene reportero LacZ al igual que los resultados mostrados con el gene reportero luciferasa, además, la actividad de β -galactosidasa después del tratamiento con db AMPc se incrementa alrededor de 5 veces, esto sugiere por lo tanto que dentro de la región -248 a +189 del fragmento de DNA genómico de ratón que corresponde al promotor mínimo transcripcional del gene del canal Na_x podrían haber elementos de DNA que unan factores de transcripción importantes durante el ensamblaje del complejo de inicio de la transcripción y que alguno de ellos sea regulado por AMPc. En este aspecto, es probable que la inducción que se observa sea resultado de la presencia del sitio de reconocimiento al factor de transcripción CREB que responde a AMPc y que se encontró al analizar la secuencia de 4.1 kb con el programa TF SEARCH (Transcription Factor Search), este sitio se identificó dentro del fragmento de 0.4 kb en la posición -150 con una homología de 86.9 % cercano a los sitios de inicio de la transcripción (figura 23). Para determinar si este sitio realmente es capaz de unir al factor de transcripción CREB y si éste está involucrado en el ensamblaje del complejo de inicio de la transcripción del mRNA del gene del canal Na_x de ratón en estudios posteriores sería interesante mutagenizar el sitio homólogo a CREB y analizar su efecto en la funcionalidad del promotor de Na_x mediante ensayos de transfección transiente.



Figura 23. Ubicación del probable sitio CREB en la secuencia correspondiente al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón. En la figura se muestra la secuencia consenso de unión del factor de transcripción CREB y la secuencia con 86.9 % de homología identificada en la posición -150 del promotor Na_x, localizada dentro del promotor mínimo de 0.4 kb (del sitio -248 al +189).

Al transfectar transientemente las construcciones β -gal que contienen el fragmento de 3.6 kb y las 2 deleciones del extremo 5' (que corresponden al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón) en la línea celular Neuro 2A se ve inducida su actividad al ser tratadas con db AMPc, pero en contraste, estos resultados no correlacionan con la cinética del mRNA endógeno del canal Na_x observada en la línea celular Neuro 2A al ser diferenciada con db AMPc. Esto tal vez se deba a que el fragmento de 3.6 kb del genoma de ratón probado en los ensayos de transfección transiente no contiene todos los elementos de regulación tejido-específica, es decir, tal vez haya otro mecanismo de regulación tejido-específica de la expresión del gene del canal Na_x de ratón que dependa de secuencias de DNA que no están presentes en el fragmento de 3.6 kb que ensayamos en este trabajo y que sea un mecanismo de regulación de mayor jerarquía que los elementos de respuesta a AMPc. En el caso del mRNA endógeno del gene del canal Na_x en la línea celular Neuro 2A diferenciada con db AMPc, tal vez el efecto del db AMPc sea sobre la diferenciación de esta línea celular haciendo que se apague el gene del canal Na_x y en estas condiciones el db AMPc no podría actuar directamente sobre el promotor mínimo para activarlo (fragmento de 0.4 kb) porque otro mecanismo de represión sería más prioritario.

Adicionalmente, en el análisis de la secuencia del genoma de ratón de 4.1 kb mediante el programa TF SEARCH (Transcription Factor Search) además del sitio de reconocimiento al factor de transcripción CREB, también se encontraron regiones que muestran homología parcial con sitios de unión para los factores de transcripción C/EBP, AML-1a, Oct-1, Ap-1, NF-kap, GR y NGFI-C (figura 12 –RESULTADOS). En cuanto a los probables sitios de unión de factores de transcripción en el promotor de Na_x de rata mediante ensayos de footprinting *in vivo* con DNasaI en cultivos de neuronas de ganglio de raíz dorsal (Poiraud, *et al.*, 1999) y en cultivos de glia (Gautron *et al.*, 2001) se ha sugerido que los sitios NFIL-6, PEA3, REST/NRSF, E-box, AP1 y una región rica en G+C, intervienen en la regulación del gene del canal Na_x de rata, sin embargo, no se ha demostrado experimentalmente que estos sitios tengan algún efecto sobre la funcionalidad del promotor de Na_x de rata. En el presente estudio el análisis de la secuencia del promotor de Na_x de ratón no reveló la presencia de los sitios de regulación propuestos para el promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata.

Poiraud y colaboradores (1999), realizaron estudios en ratones transgénicos para analizar la expresión del canal Na_x de rata en varios tejidos y reportan que un fragmento de 600 pb que contiene la región proximal al promotor y el primer exón (del sitio –375 a

+220) son suficientes para expresar el gene Na_x en neuronas del Sistema Nervioso Periférico y Central, mientras que un fragmento de DNA de la región -6500 a -1050 sería esencial para dirigir la expresión en células de Schwann y las secuencias específicas para la expresión en pulmón están localizadas en la región de -1050 a -375. Contrariamente, nuestros resultados de transfección transiente con diferentes regiones del promotor Na_x de ratón nos indican que aún en 3.6 kb no hay elementos de regulación tejido-específica, ya que el promotor es activo en células neuronales y no neuronales. Sin embargo, es de resaltar que en el reporte de Poiraud y colaboradores (1999) sus conclusiones están basadas en el análisis de 2 construcciones (-375 pSKT y -1050 intron pSKT), en las cuales obtuvieron 1 sola línea de ratones transgénicos que expresaban al transgene en el ratón adulto, teniendo la posibilidad de que sus resultados acerca de la expresión del canal Na_x de rata en los tejidos mencionados no sean tan confiables, ya que es probable que se pudiera haber expresado el gene reportero del transgene de manera ectópica.

Por otro lado, Gautron y colaboradores (2001), realizaron ensayos de transfección transiente en dos tipos de glia: del Sistema Nervioso Periférico (células de Schwann) y Central (astrocitos), y además utilizaron la línea celular hepática HepG2. En sus resultados se observa que las construcciones mostraron actividad en astrocitos y células de Schwann y por otro lado, presentan una muy baja actividad en la línea celular HepG2. También sugieren que dentro del primer intrón hay elementos que ejercen un efecto de regulación negativa en la actividad del promotor de Na_x de rata.

En la comparación que realizamos de la secuencia de DNA genómico de ratón de 4.1 kb con el promotor transcripcional del gene del canal Na_x de rata (Poiraud *et al.*, 1999) se encontró que presentan una homología total del 70 % dividido en 2 regiones, ya que se observó que aproximadamente 500 pb de la secuencia del promotor de rata (del sitio -1719 a -1204) no se encuentran en la secuencia de ratón. En esta comparación, la primera región mostró 75 % de homología y en la región proximal al promotor y al primer exón se observó una homología de 81 % (figura 17 C), con estos resultados de la comparación de las secuencias se podrían explicar las diferencias del reporte donde mencionan que la región proximal al promotor de Na_x de rata y el primer exón contiene elementos que permiten la expresión en neuronas del Sistema Nervioso Periférico y Central (Poiraud *et al.*, 1999) y que la misma región sostiene una fuerte actividad transcripcional glia-específica (Gautron *et al.*, 2001), mientras que con nuestros resultados mostramos que el fragmento de 3.6 kb que corresponde al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón no contiene elementos de regulación tejido-específicos, esto nos sugiere que aunque la homología en la región proximal al promotor y el primer exón

en ambas especies es considerable, es probable que el mecanismo de regulación del gene del canal Na_x en las 2 especies pudiera ser diferente.

De cualquier manera, para determinar si algunos de los sitios de unión para los factores de transcripción que mostraron homología con la secuencia del promotor de Na_x de ratón son responsables de ensamblar el complejo de inicio de la transcripción del gene del canal Na_x de ratón, en estudios posteriores se realizarán ensayos de footprinting para identificar la posición y las proteínas que interactúan con el promotor transcripcional del gene Na_x de ratón.

Además, dado que en este trabajo se determinó que el gene del canal Na_x de ratón no contiene elementos de regulación genética tejido-específica cercanos a su promotor, en estudios posteriores se llevará a cabo una estrategia de genética funcional para modificar por medio de recombinación homóloga con el sistema RED del fago λ la clona BAC Na_x -1 (fragmento de genoma de ratón de 135 kb) que contiene el gene completo del canal Na_x ; el gene reportero LacZ se introducirá en fase con Na_x y además se introducirá también al gene de resistencia a neomicina, para realizar ensayos de transfección estable en células eucariontes y buscar así elementos de regulación genética distales al promotor transcripcional del gene del canal Na_x de ratón.

CONCLUSIONES

1. Se clonó e identificó funcionalmente al promotor transcripcional del gene Scn7A que codifica para la subunidad α del canal de sodio Na_x .
2. El promotor transcripcional del gene del canal Na_x carece de caja TATA y tiene múltiples sitios de iniciación transcripcional, además, encontramos que el fragmento de 437 nt (de -248 a +189) presenta actividad promotora, sin embargo, la actividad no es tejido-específica aún con la construcción que contiene 3.6 kb del promotor.
3. El promotor transcripcional del gene del canal Na_x es inducido con db-AMPC en células Neuro 2A, aunque, el nivel del mRNA endógeno de Na_x disminuye con el mismo tratamiento. Esto sugiere que mecanismos de regulación de mayor jerarquía estén involucrados en la represión del mRNA de Na_x en Neuro 2A.

REFERENCIAS

- Aguayo, L. G., and White, G. (1992). Effects of nerve growth factor on TTX- and capsaicin-sensitivity in adult rat sensory neurons. *Brain Res.* **570**:61-67.
- Ahmed, C. M. I., Ware, D. H., Lee, S. C., Patten, C. D., Ferrer-Montiel, A. V., Schinder, A. F., McPherson, J. D., Wagner-Mcpherson, C. B., Wasmuth, J. J., Evans, G. A., and Montal, M. (1992). Primary structure, chromosomal localization, and functional expression of a voltage-gated sodium channel from human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:8220-24.
- Akopian, A. N., Sivilotti, L., and Wood, J. N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature.* **379**:257-262.
- Akopian, A., Souslova, V., Sivilotti, L., and Wood, J. (1997). Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *FEBS Lett.* **400**:183-187.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell.* 3^a ed. Garland Publishing, Inc. New York, N. Y. USA. p.p. 478-485 y 508-520.
- Auld, V. J., Goldin, A. L., Krafte, D. S., Marshall, J., Dunn, J. M., Catterall, W. A., Lester, H. A., Davidson, N., and Dunn, R. J. (1988). A rat brain Na⁺ channel α subunit with novel gating properties. *Neuron.* **1**:449-461.
- Beckh, S., Noda, M., Lubbert, H., and Numa, S. (1989). Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development. *EMBO.* **8**:3611-3616.
- Bezanilla, F. (2000). The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **80**:555-592.
- Black, J. A., Dib-Hajj, S., McNabola, K., Jeste, S., Rizzo, M. A., Kocsis, J. D., and Waxman, S. G. (1996). Spinal sensory neurons express multiple sodium channel alpha-subunit mRNAs. *Brain Res Mol Brain Res.* **43**:117-31.
- Black, J. A., Langworthy, K., Hison, A. W., Dib-Hajj, S., and Waxman, S. G. (1997). NGF has opposing effects on Na⁺ channel III and SNS gene expression in spinal sensory neurons. *NeuroRep.* **8**:2331-2335.
- Caffrey, J. M., Eng, D. L., Black, J. A., Waxman, S. G., and Kocsis, J. D. (1992). Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* **592**:283-97.
- Carey, M., and Smale, S. (2000). *Transcriptional regulation in eukariotes, concepts, strategies, and techniques.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. United States of America. p.p. 147-152.
- Chabal, C., Russell, L. C., and Burchiel, K. J. (1989). The effect of intravenous lidocaine, tocainide, and mexiletine on spontaneously active fibers originating in rat sciatic neuromas. *Pain.* **38**:333-8.
- Constanzo, L. (2000). *Fisiología.* McGraw-Hill Interamericana. México, D, F. p.p. 15-32.
- Cummins, T. R., Howe, J. R., and Waxman, S. G. (1998). Slow closed-state inactivation: A novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. *Journal of Neuroscience.* **18**:9607-9619.
- Cummins, T. R., Dib-Hajj, S. D., Black, J. A., Akopian, A. N., Wood, J. N., and Waxman, S. G. (1999). A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild type small primary sensory neurons. *J Neurosci.* **19**:RC43.
- Devor, M., Wall, P. D. and Catalan, N. (1992). Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain.* **48**:261-268.
- Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Black, J. A., and Waxman, S. G. (1998). Na_vN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Neurobiology.* **95**:8963-8968.
- Elliott, A. A., and Elliott, J. R. (1993). Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *The Journal of Physiology.* **463**:39-56.

- Felipe, A., Knittle, T., Doyle, K., and Tamkun, M. (1994). Primary Structure and Differential Expression during Development and Pregnancy of a Novel Voltage-gated Sodium Channel in the mouse. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**:30125-30131.
- Felts, P. A., Yokoyama, S., Dib-Hajj, S., Black, J. A., and Waxman, S. G. (1997). Sodium channel α -subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE: different expression patterns in developing rat nervous system. *Mol. Brain Res*. **45**:71-83.
- Fjell J., Cummins, T., Dib-Hajj, S., Fried, K., Black, J., and Waxman, S. G. (1999). Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Brain Res Mol*. **67**:267-282.
- Gallego, R., Ivorra, I., and Morales, A. (1987). Effects of central or peripheral axotomy on membrane properties of sensory neurones in the petrosal ganglion of the cat. *The Journal of Physiology*. **391**:39-56.
- García-Villegas, R., Morales, M. A. y Arni, S (2002). Caracterización funcional del promotor del gene Scn7A de ratón que codifica para el canal de sodio Na_x. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. 4-11 Noviembre. Pto. Vallarta, Jalisco.
- Gautron, S., Dos Santos, G., Koulakoff, A., Pinto-Henrique, D., Gros, F., Berwald, Y. (1992). The glial voltage-gated sodium channel: cell and tissue-specific mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. **89**:7272-7276.
- Gautron, S., Gruszczynski, C., Koulakoff, A., Poiraud, E., Lopez, S., Cambier, H., Dos Santos, G., and Berwald-Netter, Y. (2001). Genetic and epigenetic control of the Na-G ion channel expression in Glia. *GLIA*. **33**:230-240.
- Gellens, M. E., George, A. L. Jr., Chen, L., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., and Kallen, R. G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**:554-58.
- George, A. L. Jr., Komisarof, J., Kallen, R. G., and Barchi, R. L. (1992a). Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel. *Ann. Neurol*. **31**:131-37.
- George, A. L., Knittle, T., and Tamkun, M. (1992b). Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: Evidence for a distinct gene family. *Physiology*. **89**:4893-4897.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N., and Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. **28**:365-8.
- Goldin, L. A. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol*. **63**:871-94.
- Goodrich, J. A., Cutler, G., and Tijan, R. (1996). Contacts in context: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*. **84**:825-830.
- Greenbaltt, R. E., Blatt, Y. and Montal, M. (1985). The structure of the voltage-sensitive Sodium channel. *FEBS Lett*. **193**:125-134.
- Gurtu, S. and Smith, P. A. (1988). Electrophysiological characteristics of hamster dorsal root ganglion cells and their response to axotomy. *Journal of Neurophysiology*. **59**:408-423.
- Guy, H. R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**:508-512.
- Guy, H. R., and Conti, F. (1990). Persuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends Neurosc*. **13**:201-206.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. 2^a ed. Sinaver associates Inc. Soudreland Massachussets U.S.A. p.p 594-599.
- Hiyama, T., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M., Yoshida, S., and Noda, M. (2002). Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience*. **5**: 511-512.
- Hodgkin, A., and Huxley, A.(1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* **117**: 500-544.

- Isom, L. L., De Jongh, K. S., and Catterall, W. A. (1994) Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*. **12**:1183-1194.
- Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F. X., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1995). Structure and function of the β_2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*. **83**:433-442.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1992). Tracing the roots of ion channels. *Cell*. **69**:715-718.
- Jansen, E., Ayoubi, T., Meulemans, S., and Van de Ven, W. (1995). Neuroendocrine-specific expresión of the human prohormone convertse 1 gene. *J. Biol. Chem.* **270**:15391-15397.
- Jeftinija, S. (1994). The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels of small primary afferent fibers. *Brain Res.* **639**:125-34.
- Jian Mao, A., Bechberger, J., Lidintong, D., Galipeau, J., Laird, D. W., and Naus, C. G. (2000). Neuronal differentiation and growth control of Neuro 2a cells after retroviral gene delivery of connexin. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**:34407-34414.
- Joho, R. H., Moorman, J. R., VanDongen, A. M. J., Kirsch, G. E., Silberberg, H., Schuster, G., and Brown, A. M. (1990). Toxin and kinetic profile of rat brain type III sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Brain Res.* **7**:105-113.
- Kallen, R. G., Sheng, Z.-H., Yang, J., Chen, L., Rogart, R. B., and Barchi, R. L. (1990). Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron*. **4**:233-42.
- Karp, G. (1998). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. p.p 144-154.
- Kaufmann, J., and Smale, S. T. (1994). Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* **8**:821-829.
- Kayano, T., Noda, M., Flockerzi, V., Takahashi, H., and Numa, S. (1988). Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* **228**:187-194.
- Kostyuk, P. G., Veselovsky, N. S., and Tsyndrenko, A. Y. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. *Neuroscience*. **6**:2423-30.
- Kuno, M., and Llinas R. (1970). Enhancement of synaptic transmission by dendritic potentials in chromatolysed motoneurons of the cat. *J Physiol.* **210**:807-21.
- Levin, B. (1994). *Genes*. 2ª ed. Editorial Reverte. Barcelona, España. p.p. 617-632 y 741-783.
- Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F., and Koren, G. (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of the mammalian K⁺ channel. *Nature*. **353**:752-756.
- Locker, J. (1996). *Transcription factors*. John Wiley and sons. Huddersfield, U. K. p.p. 2-24.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (2002). *Biología Celular y Molecular*. 7ª reimp. Scientific American Books. New York, N. Y. USA. p.p. 200-220, 575-589 y 910-930.
- Maue, R. A., Kraner, S. D., Goodman, R. H., and Mandel, G. (1990). Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neurons*. **4**:223-231.
- Messner, D. J., and Catterall, W. A. (1985). The sodium channel from rat brain-separation and characterization of subunits. *J. Biol. Chem.* **260**:10597-10604.
- Minowa, M. T., Minowa, T., Monsma, F. J., Sibley, D. R., and Morudian, M. M. (1992). Characterization of the 5' flanking region of the human D_{1A} dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:3045-3049.
- Moreno, J. C., Revol, A., and Barrera, H. (1999). Transcripción génica en eucariontes: De los factores transcripcionales a la enfermedad. *Rev Invest Clin.* **51**:375-384.
- Nason, A. (1996). *Biología*. Limusa Noriega Editores. México, D. F. p.p 452-453.

- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., and Numa, S. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature (London)*. **312**:121-127.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., and Numa, S. (1986). Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature*. **320**:188-192.
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., and Stühmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett*. **259**:213-216.
- Nordin, M., Nystrom, B., Wallin, U., and Hagbarth, K. E. (1984). Ectopic sensory discharges and paresthesiae in patients with disorders of peripheral nerves, dorsal roots and dorsal columns. *Pain*. **20**:231-45.
- Novakovic, S., Eglen, R., and Hunter, J. (2001). Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system. Review, *Trends Neurosci*. **24**:473-8.
- Ochoa, J. L., and Torebjork, H. E. (1980). Paraesthesiae from ectopic impulse generation in human sensory nerves. *Brain*. **103**:835-53.
- Ogata, N. and Ohishi, Y. (2002). Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *J Pharmacol (Jpn)*. **88**:365-377.
- Omana-Zapata, I., Khabbaz, M. A., Hunter, J. C., and Bley, K. R. (1997). QX-314 inhibits ectopic nerve activity associated with neuropathic pain. *Brain Res*. **771**:228-37.
- Oyelese, A. A., Rizzo, M. A., Waxman, S. G., and Kocsis, J. D. (1997). Differential effects of NGF and BDNF on axotomy-induced changes in GABAA-receptor-mediated conductance and sodium currents in cutaneous afferent neurons. *J Neurophysiol*. **78**:31-42.
- Papazian, D. M., Timpe, L. C., Nung Jan, Y., and Jan, L. Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of Shaker Potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. **349**:305-310.
- Patton, D. E., and Goldin, A. L. (1991). A voltage-dependent gating transition induces use-dependent block by tetrodotoxin of rat IIA sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron*. **7**:637-647.
- Patton, D. E., West, J. W., Catterall, W. A., and Goldin, A. L. (1992). Amino acid residues required for fast sodium channel inactivation. Charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**:10905-10909.
- Planas, J. (1985). Elementos de Biología. Ediciones Omega. España. p.p. 126-128.
- Poiraud, E., Gruszczynski, C., Porteu, A., Cambier, H., Escurat, M., Koulakoff, A., Kahn, A., Berwald-Netter, Y., and Gautron, S. (1999). The Na-G ion channel is transcribed from a single promoter controlled by distinct neuron and Schwann cell-specific DNA elements. *The Journal of Neurochemistry*. **73**:2575-85.
- Pugh, B. F. (1996). Mechanism of transcription complex assembly. *Curr Op Cell Bio*. **8**:303-311.
- Purnell, B. A., and Gilmour, D. S. (1993). Contribution of sequences downstream of the TATA element to a protein/DNA complex containing the TATA-binding protein. *Mol Cell Biol*. **13**:2593-2603.
- Raman, I. M., and Bean, B. P. (1997). Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*. **17**:4517-4526.
- Rizzo, M. A. (1997). Successful treatment of painful traumatic mononeuropathy with carbamazepine: insights into a possible molecular pain mechanism. *J Neurol Sci*. **152**:103-6.
- Rogart, R. B., Cribbs, L. L., Muglia, L. K., Kephart, D. D., and Kaiser, M. W. (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:8170-74.
- Roy, M. L., and Narahashi, T. (1992). Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*. **12**:2104-2111.
- Satin, J., Kyle, J. W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L. L., Fozzard, H. A., and Rogart, R. B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*. **256**:1202-1205.

- Smale, S. T., and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as transcription control element. *Cell*. **57**:103-113.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahai, N., Kubo, H. and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*. **339**:597-603.
- Tate, S., Benn, S., Hick, C., Trezise, D., John, V., Mannion, R. J., Costigan, M., Plumpton, C., Grose, D., Gladwell, Z., Kendall, G., Dale, K., Bountra, C., and Woolf, C. F. (1998). Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nat Neurosci*. **1**:653-655.
- Toledo-Aral, J. J., Moss, B. L., He, Z-J., Koszowski, A. G., Whisenand, T., *et al.* (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**:1527-32.
- Trimmer, J. S., Cooperman, S. S., Tomiko, S. A., Zhou, J., Crean, S. M., Boyle, M. B., Kallen, R. G., Sheng, Z., Barchi, R. L., Sigworth, F. J., Goodman, R. H., Agnew, W. S., and Mandel, G. (1989). Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron*. **3**:33-49.
- Vassilev, P. M., Cooperman, S. S., and Catterall, W. A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*. **241**:1658-1661.
- Vega, A. y Félix, R. (2001). Fisiopatología de los canales iónicos sensibles al voltaje. *Avance y Perspectiva*. **20**:83-96.
- Vibert, M., Henry, J., Kahn, A., and Skala, H. (1989). The brain-specific gene for rat aldolase C possesses an unusual housekeeping-type promoter. *Eur. J. Biochem*. **181**:33-39.
- Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C., and Noda, M. (2000). Na_v2/NaG Channel is Involved in Control of Salt-Intake Behavior in the CNS. *The Journal of Neuroscience*. **20**:7743-7751.
- Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of the Nucleic Acids: A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. **171**:737-738.
- Waxman, S. G., Kocsis, J. D., and Black, J. A. (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is re-expressed following axotomy. *J Neurophysiol*. **72**:466-471.
- Waxman, S. G. (1997). Neuroanatomía Correlativa. Editorial El Manual Moderno. México, D. F. p.p. 23-27.
- Waxman, S. G., Dib-Hajj, S., Cummins, T. R., and Black, A. (1999). Sodium channels and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7635-39.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., and Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 10910-10914.
- Wong, C. K. C., Yeung, H. Y., Mak, N. K., DiMattia, G. E., Chan, D. K. O., and Wagner G. F. (2002). Effects of dibutyryl cAMP on stanniocalcin and stanniocalcin-related protein mRNA expression in neuroblastoma cells. *Journal of Endocrinology*. **173**:199-209.
- Yoshida, S. (1994). Tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Cell Mol Neurobiol*. **14**:227-244.
- Zawel, L., Kuman, K. P., and Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes & Dev*. **9**:1479-1490.