

64



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION Y AISLAMIENTO DE CLONAS GENOMICAS DEL GEN *osa* DE RATON

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

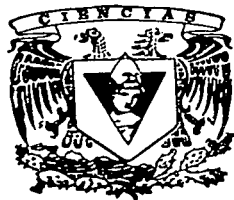
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANGEL FRANCISCO FLORES ALCANTAR



DIR. DE TESIS: DRA. HILDA LOMELI BUYOLI



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.

... a la Dirección General de Bibliotecas de la
... a difundir en formato electrónico e impreso el
... contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Angel Fco. Flores

Aiscankar

FECHA: 13 de septiembre del 2002

FIRMA: 



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen Osa de ratón"
 realizado por Angel Francisco Flores Alcantar
 con número de cuenta 09515648 - 0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dra. Hilda Lomeli Buyoli	<i>H Lomeli</i>
Propietario		
Propietario	Dra. Martha Veronica Vázquez Laslop	<i>M V L</i>
Propietario	Biol. Luis Manuel Gutierrez Galindo	<i>L M G</i>
Suplente	Dr. Luis Felipe Jimenez Garcia	<i>L F J</i>
Suplente	Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera	<i>A J V</i>

Consejo Departamental de Biología **FACULTAD DE CIENCIAS**
 U.N.A.M.

E. Novelo

 Dr. Eberto Novelo Maldonado



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

Gracias a mi Madre, la Señora Yolanda Alcantar Cortes.

Gracias a la Dra. Hilda Lomelí Buyoli por darme la oportunidad de realizar el proyecto.

Gracias a la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología por la ayuda brindada en la realización del proyecto.

Gracias a IQ: Virgilio Juárez, por la el apoyo técnico en el transcurso del proyecto.

Gracias a la Dra. Patricia Joseph por los conocimientos aportados en el taller, así como por la oportunidad de ingresar al IBT.

Gracias a mis Hermanos Victor, Elvira, Marisela, Gabriela y Adrián

Gracias a todos mis amigos, en especial a Blanca, Magueys y FFF.

Gracias a DGPA y PROBETEL, por el apoyo económico brindado para la realización del proyecto.

Parte de esta tesis fue financiada por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, en el proyecto IN 201199.

Dedicar es decir Gracias y dar reconocimiento, pero muchas veces es difícil saber a quien dedicar, puesto que no todos lo merecen. Este caso es distinto, pues la dedicación es para alguien que ha *dedicado* su vida a seis pedazos de su corazón. Uno de ellos trata de expresar en estas líneas la gratitud y reconocimiento, en nombre de los demás, así como la gran admiración que al menos yo siento por ti, Señora que siempre me haz acompañado. Este trabajo es un pequeño homenaje a la señora Yolanda Alcantar Cortes. Gracias Mamá por darme tu vida y mucho más.

*Para que pueda ser, he de ser otro,
salir de mí, buscarme entre los otros,
los otros que no son si yo no existo,
los otros que me dan plena existencia.*

Octavio Paz

Esos muchos otros merecen ser nombrados porque todos me han dado algo, siempre han estado y estarán presentes.

Por supuesto mi Mamá y mis hermanos Víctor, Elvira, Marisela, Gabriela, Adrián y demás familia. Otros, mis amigos Mauricio, Erick, Rogelio, Blanca, Edgar "Balan", Fernando, Ernesto "Neto", Daniel "Güero", Jenry, Daniel, Arturo, Yorks, Mónica, Karina, Daisy, Paty, Iván, y los que me faltan de la FFF; otros... por supuesto a mis compañeros y amigos de Ciencias, David, Ricardo, Janet, Gabriel Otero, Rocío, Karla, Whalecha, Jorge, Ezequiel, Aldo, Edgar, Leonardo, Kary y todos los guerreros y guerreras en pie de lucha, esperando que esta sea una de tantas tesis de los "warriors".

Otros... el lab. Hilda, Vero, Denhi, Diana, Virk, Laura, Toño, Enrique, a Louis (mi gurú) y Martha.

Un pequeño recordatorio de Nancy, quien sigue presente desde donde este, al igual que a Karina que aunque no se ha ido, ya fue.

Falta nombrar también a Israel amigo de la no tan lejana infancia. A Karla "Burbuja".

No puedo dejar de mencionar a mis ciber-amigos y que de cierta forma me apoyaron y soportaron, por mencionar algunos... Lizeth,

Nice (Bere), Crosby (Rosy), Maya (Linda), Frida, Ana Ibarra, Kish@(Faviola), etc.

Me faltaba mencionar a "otros", la Fam.

Granillo Alcántara y todas sus vertientes, así como a mis tíos Juvencio Flores, Marcos Tlahuex y familia. Por supuesto a todos aquellos que me brindaron su apoyo en algún momento. Además de Natividad

Oaxaca, donde aprendí a valorar y a aprovechar lo que se tiene.

*De vez en cuando es bueno
ser consciente
de que hoy
de que ahora
estamos fabricando
las nostalgias
que descongelarán
algún futuro.*

M. Benedetti

*El mundo es como un laberinto, para el que
entra ancho, pero para el que sale
demasiado estrecho*

Umberto Eco

՝ սոյ Կարգի գեպ չտըն Կ ամենայո՛ս Կարգ
- գեպ Երեմեանեպեարմայ չտոյ Կարգի գեպ
Կտեպեարմայ Ե Կտեպեարմայ Կ Կ Երեմեայո

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen *Osa* de ratón

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	3
Las genes Homeóticos	3
Regulación del los genes Homeóticos	4
Grupo de genes <i>Polycomb</i>	5
Grupo de genes <i>trithorax</i>	6
Los genes <i>PcG</i> y <i>trxG</i> también se encuentran en distintos organismos	6
El Complejo <i>BRAHMA</i>	8
Características del gen <i>Osa</i>	9
3. Antecedentes	11
Se ha identificado el cDNA de <i>Osa</i> en ratón	11
Antecedentes del Laboratorio	12
4. Objetivos	14
5. Justificación	14
6. Material y Métodos	15
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de la cepa hospedera del bacteriofago	15
Titulación del banco genómico λ FIX II	16
Primera vuelta de búsqueda del gen <i>Osa</i>	16
Transferencia del DNA a filtros de nylon	19
Obtención y purificación de la sonda	18
Marcaje radiactivo de la sonda, hibridación en filtro y revelado de la película expuesta	19
Segunda y tercer vuelta de búsqueda del gen <i>osa</i>	20
Purificación del DNA contenido en el fago	20
Subclonación del gen <i>osa</i>	21
Mapeo de la subclona	22
7. Resultados	24
Búsqueda de clona del gen <i>osa</i> en el banco genómico λ - FIX II	24
Obtención del DNA de las clonas aisladas del gen <i>osa</i>	25
Subclonación de insertos positivos en pKS	27
Mapeo del gen <i>osa</i>	27
Secuenciación	27
Digestiones con enzimas de restricción	29
Reacciones en Cadena de la Polimerasa	34
8. Discusión	41
9. Conclusiones	45
10. Apéndice 1	46
11. Apéndice 2	47
12. Apéndice 3	48
14. Apéndice 4	50
15. Bibliografía	51

**IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE CLONAS GENOMICAS
DEL GEN *osa* DE RATÓN**

RESUMEN

Los genes homeóticos fueron originalmente identificados en *D. melanogaster*. Se sabe que estos genes, también llamados HOM o HOX, especifican la identidad de segmentos corporales durante el desarrollo embrionario (De Robertis et al., 1990). Debido a que su papel en la embriogénesis es esencial, ha habido gran interés en entender como se regula su expresión. En *Drosophila* se ha demostrado que los genes HOM están regulados por complejos protéicos que participan en el reordenamiento de cromatina. Uno de estos complejos, esta formado por genes del grupo trithorax (Orlando et al., 1998). Dentro del grupo trithorax, se identificó el gen *Osa* como un componente importante de un complejo remodelador de la cromatina conocido como complejo Brahma (Kennison and Tamkun, 1988). Mutantes de *Drosophila* para el gen *osa*, presentan alteraciones en la expresión de los genes HOM y afecciones severas en el desarrollo temprano, por ejemplo en la segmentación. (Vázquez et al., 1999)

En mamíferos se han localizado homólogos de los genes homeóticos y de los factores que los regulan, incluyendo algunos que pertenecen al complejo trithorax (Schumacher and Magnuson, 1997; van Lohuizen, 1998). En el laboratorio donde se realizó este trabajo, se clonaron fragmentos parciales de DNA que contienen secuencias del gen *osa* de ratón. Estos fragmentos se obtuvieron por RT-PCR a partir de cDNA de embrión y contienen secuencias correspondientes a regiones conservadas entre diferentes especies incluyendo, la mosca de la fruta. Utilizando los fragmentos mencionados como sondas para hibridación, en este trabajo, se llevó a cabo el tamizado de un banco genómico de ratón y se logró el aislamiento de clonas que contienen dominios funcionales. Posteriormente, estas clonas fueron subclonadas en el vector llamado pKS y mapeadas con enzimas de restricción, con la finalidad de poder construir un vector que en el futuro permita crear la mutante nula de ratón para el gen *osa*. De esta manera se podrá abordar el estudio de la función de este gen durante el desarrollo de ratón.

INTRODUCCIÓN

> LOS GENES HOMEÓTICOS

Durante las décadas pasadas se identificó un grupo de genes que intervienen en decisiones relativas al establecimiento del esquema corporal embrionario. Estos genes codifican para factores transcripcionales y forman parte de una familia conocida como "genes homeóticos" (con *caja homeótica* o genes HOM). El descubrimiento de los genes HOM se debió en gran medida al trabajo de Walter J. Gehring Y Richard L. McGinnis, quienes identificaron una zona de secuencia homóloga conservada en ciertos genes. Fragmentos provenientes de estas regiones se utilizaron como sondas para identificar otros genes que compartieran la misma homología. De esta manera, se encontraron en la mosca de la fruta, 10 genes diferentes pertenecientes a la familia HOM (De Robertis et al., 1990). La región homóloga en los genes homeóticos se denomina caja homeótica y codifica para un dominio de 60 aminoácidos que se llama homeodominio. El homeodominio reconoce y se une a secuencias específicas de DNA en los genes que son regulados por proteínas homeóticas (De Robertis et al., 1991; De Robertis et al., 1990).

Los genes HOM son también llamados "*selectores homeóticos*" (Biggin and McGinnis, 1997; Garcia-Bellido, 1975); ya que pueden producir identidades regionales en el embrión temprano, siendo expresados en patrones únicos que generan campos celulares con potencial para transformarse en tejidos y órganos específicos (De Robertis et al., 1991; De Robertis et al., 1990).

Otro aspecto interesante y de gran relevancia de los genes homeóticos, es el que se refiere a su organización dentro del genoma. Sabemos que los HOM se agrupan y se localizan dentro de un mismo cromosoma. Además de esto, el orden en el que se localizan dentro del cromosoma es colineal con el orden en el que se expresan, así como con el dominio en el que actúan a lo largo del eje antero - posterior (Biggin and McGinnis, 1997; De Robertis et al., 1991; De Robertis et al., 1990).

Los *selectores homeóticos* en *D. melanogaster* se encuentran divididos en dos complejos: *bithorax* y *Antennapedia* (*Antp*). El complejo *bithorax* controla las diferencias de los segmentos abdominales y torácicos del cuerpo, mientras que el complejo *Antennapedia* controla las identidades de los segmentos del tórax y cabeza (De Robertis et al.,

1990). En otros insectos los genes de los complejos bithorax y Antp pertenecen a un solo complejo llamado complejo HOM (Alberts et al., 1994). Por su parte, en mamíferos se han caracterizado cuatro complejos tipo HOM, que pudieron haberse producido por la duplicación doble del complejo ancestral HOM también presente en invertebrados. Los complejos descritos en mamíferos (particularmente estudiados en ratón), se conocen como los grupos HoxA, HoxB, HoxC y HoxD (De Robertis et al., 1991; De Robertis et al., 1990; Gould, 1997).

La relación evolutiva entre los complejos HOX y el complejo HOM ancestral se manifiesta por la similitud de secuencia entre genes que se encuentran en regiones equivalentes dentro del complejo. Con base en este tipo de observaciones, los genes HOX se han clasificado en trece grupos de paralogía¹ (De Robertis et al., 1990).

➤ *REGULACION DE LOS GENES HOMEOTICOS*

Dada la importancia de los genes homeóticos en determinar identidades morfológicas y definir el plan corporal, conocer los mecanismos que establecen y mantienen sus patrones de expresión son esenciales para entender la embriogénesis. La regulación de los genes homeóticos a nivel transcripcional involucra grandes regiones regulatorias en *cis*, así como la participación de complejos protéicos específicos tales como los denominados Polycomb y trithorax (revisado en (Brock and van Lohuizen, 2001; Gebuhr et al., 2000; Jacobs and van Lohuizen, 1999; Jacobs and van Lohuizen, 2002; Pirrotta, 1998).

El modelo que más se ha utilizado para estudiar la regulación de la expresión de los genes HOM es el de la mosca de la fruta. En ésta se ha encontrado que el establecimiento del patrón de expresión y la posterior heredabilidad de éste en distintos tipos celulares, ocurre a través de dos procesos independientes. El primero depende de la expresión de los *genes de segmentación*, cuyas proteínas son factores transcripcionales que se unen directamente a secuencias regulatorias presentes en los genes homeóticos, estableciendo de esta manera, los dominios de expresión de los genes HOM (Jacobs and van Lohuizen, 1999; Simon and Tamkun, 2002). En el segundo proceso, intervienen los complejos Polycomb y trithorax para hacer posible el mantenimiento de los patrones establecidos de la forma antes descrita. Tanto los genes

¹ Se entiende por paralogía cuando un gen se duplica en el genoma y una de esas copias puede cambiar más rápidamente, porque la otra copia del gen puede llevar a cabo la función del mismo.

del grupo *trithorax* (*trxG*) como los genes del grupo *Polycomb* (*PcG*) tienen la propiedad de reorganizar la cromatina para determinar la accesibilidad o inaccesibilidad del DNA a los factores de transcripción (revisado en (Simon and Tamkun, 2002).

➤ Grupo de genes *Polycomb* (*PcG*)

Los genes *Polycomb* son por definición aquéllos que intervienen en mantener el silenciamiento de genes homeóticos a través de divisiones celulares y en generaciones sucesivas. Algunos de estos genes participan formando grandes complejos multiprotéicos, que actúan estableciendo una configuración en la cromatina, resultando inaccesible para la maquinaria basal de la transcripción (Fig. 1). Algunas de las proteínas *Pc* son necesarias en el establecimiento del estado epigenético y su expresión continua es requerida para el silenciamiento (Beuchle et al., 2001; Brock and van Lohuizen, 2001; Jacobs and van Lohuizen, 1999; Jacobs and van Lohuizen, 2002; Paro et al., 1998; Pirrotta, 1998).

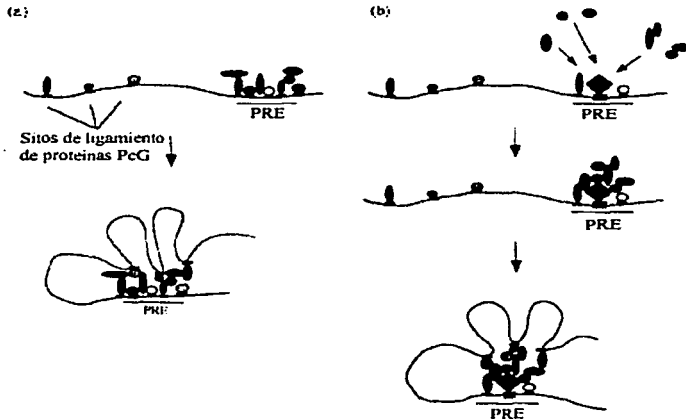


Fig. 1. Modelos de la formación del complejo PcG. (a) Este modelo es conocido como de "Ensamble cooperativo" (b) Se muestra el modelo conocido como "Modelo de reclutamiento" (Jacobs and van Lohuizen, 1999)

➤ *Grupo de genes trithorax (trxG)*

Una vez que se establecen los dominios de expresión de los genes homeóticos, algunas proteínas trithorax se encargan de mantener el estado activo de la transcripción (revisado en (Paro et al., 1998; Pirrotta, 1998; Poux et al., 2002; Schumacher and Magnuson, 1997). Sugiriendo que la función de algunos *trxG* es antagónica a la de los genes Polycomb, debido a que pueden determinar una configuración en la estructura de la cromatina que es permisiva para la transcripción (Paro et al., 1998; Pirrotta, 1998; Poux et al., 2002; van Lohuizen, 1999). La acción remodeladora de algunas proteínas *trxG* depende de la actividad de una ATPasa que usualmente constituye el corazón de los complejos remodeladores (Simon and Tamkun, 2002). Se han descrito distintos complejos remodeladores de la cromatina (CRC), en donde algunas de las subunidades que la forman son proteínas *trxG*. El CRC más estudiado de ellos es el complejo SWI/SNF de levadura, cuyo homólogo en *Drosophila* es el denominado complejo Brahma (Elfring et al., 1998; Gebuhr et al., 2000; Kal et al., 2000; Papoulas et al., 1998). A éste nos referiremos mas adelante.

PRE's

Una pregunta de gran interés es cómo los complejos PcG y *trxG* actúan reconociendo genes específicos y cómo son reclutados a regiones regulatorias. Si bien se conoce muy poco de este tema, se sabe que existen regiones presentes en el DNA denominadas PRE's (Polycomb Responsive Elements) que son sitios de reconocimiento que contribuyen a nuclear la unión cooperativa de los complejos remodeladores. Los PRE's no tienen secuencias muy específicas por lo que se ignora como funcionan para atraer a los complejos remodeladores (Beuchle et al., 2001; Gebuhr et al., 2000; Jacobs and van Lohuizen, 2002; Narlikar et al., 2002; Paro et al., 1998; Simon and Tamkun, 2002; van Lohuizen, 1999).

➤ *Los genes PcG y trxG también se encuentran en distintos organismos*

En los últimos años se ha incrementado el número de genes identificados en vertebrados con homología y estructura similar a los miembros de PcG y *trxG* de *Drosophila* (Gould, 1997; Schumacher and Magnuson, 1997; van Lohuizen, 1998; van Lohuizen, 1999). Algunos de

estos genes han sido mutados en ratón, con lo cual se ha demostrado que también participan en la regulación de genes homeóticos (Gould, 1997; Schumacher and Magnuson, 1997). Ejemplos de mutaciones para genes PcG en ratón son: Las mutaciones en *Bmi1* (homólogo en mosca *Psc*) y *M33* (homólogo en *D. melanogaster* *Pc*), que muestran transformaciones homeóticas en el esqueleto axial. En experimentos donde ambos genes están deletados en un mismo ratón, se observan daños más severos, así como cambio en la expresión de genes *Hox* en el mesodermo somítico (Bel et al., 1998)

Cuando la mutación de *M33* es homociga nula, ocasiona que la mayor parte de los embriones se mueran antes del destete y que los sobrevivientes muestren reversión sexual (Kato-Fukui et al., 1998).

También se han descrito fenotipos para mutantes de genes *trx* como la mutación en el gen *snf5/ini1* (*Snr1* de mosca), que cuando es homociga nula resulta letal en el estadio de preimplantación. En individuos heterocigos, se despliegan características de tumores rhabdoides², así como tumores en el sistema nervioso central (Klochender-Yeivin et al., 2002). La mutante del gen *BRG1* (*brm* de mosca), cuando es homociga nula es letal y las heterocigas muestran diferentes tumores epiteliales (Bultman et al., 2000).

Otro homólogo de *brm* en ratón es el gen *brm*, el mutante de este gen muestra fenotipo normal en ratones recién nacidos, pero en el adulto hay un incremento en la proliferación celular en algunos órganos como hígado, corazón, bazo, sugiriendo que este gen interviene en la regulación del ciclo celular (Reyes et al., 1998). La mutación para el gen *MLL* (*trx* en mosca) muestra una alteración en la expresión de genes *Hox* y la identidad de segmentos es anormal. En ratones heterocigos se observan anomalías en el esqueleto; los embriones homocigos son letales. La doble mutación *MLL* (gen *trxG*) y *Bmi 1* (gen *PcG*), presenta un fenotipo "normalizado", sugiriendo un efecto antagónico de genes en la determinación de la identidad de los segmentos (Hanson et al., 1999). En la tabla 1 se presenta una lista de los genes de *PcG* y *trxG* que se han identificado en mamíferos.

² Tumores ocasionados por los virus llamados rhabdovirus.

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen *Osa* de ratón

Tabla 1. Genes PcG y trxG en *Drosophila* y en mamífero.

PcG	Motivo de Proteína	Homólogo en mamífero
<i>Polycomb (Pc)</i>	Cromodominio	<i>M33, Mpc2</i>
<i>Posterior sex combs (psc)</i>	RING finger	<i>Bmi1, Me1 18</i>
<i>Polyhomeotic (ph)</i>	Dominio AHH, dedo de zinc	<i>Mph1 / rac28</i> <i>Hph2, Hph1</i>
<i>Enhancer de zeste (E (z))</i>	Conjunto de dominios	<i>Enx1 / EZH2,</i> <i>Enx2 / EZH1</i>
<i>Polycomb - like (Pcl)</i>	Dedo de PHD	<i>M96</i>
<i>Extra sex combs (esc)</i>	Repeticiones WD40	<i>Edd</i>
<i>Sex combs on midleg (Sem)</i>	Dominio AHH	
	Dedos de zinc	
TrxG		
<i>trithorax (trx)</i>	Conjunto de dominio Dedo de PDH	<i>MII, ALL</i>
Brahma (BRM)	Bromodominio	BRM / mBRM
<i>Absent, small or homeotic disc 1 (ash 1)</i>	Dominio de ATPasa	HBRG 1 / mBrG 1
	Conjunto de dominios, dedo de PHD, anclajes AT	
<i>trithorax - like (Trl)</i>	Motivo Tramtrack, dedo de zinc	
<i>E(var)3-93D</i>	Motivo Tramtrack	
	Fs (1) h	
	Bromodominio	RINGS3

> EL COMPLEJO BRAHMA

Utilizando un esquema de selección genética consistente en identificar la supresión de mutantes de pérdida de función de genes *Pc*, el grupo del Dr. Kennison identificó una variedad de genes que forman parte de grupo *trx* y algunos de ellos forman parte del complejo *Brm* en *D. melanogaster* (Kennison and Tamkun, 1988). El primer gen del complejo, que se aisló de fenotipos *Polycomb*, se llamó *brahma (brm)* y como se mencionó anteriormente, codifica para una ATPasa con un bromodominio que representa la subunidad catalítica del complejo. *brm* se expresa en todos los estadios del desarrollo de *D. melanogaster*³, aunque con mayor intensidad en el período embrionario y larvario (Elfring et al., 1998).

Otros genes identificados por Kennison y Tamkun que interactúan con *brm* son *moira (mor)* y *osa*, se sabe ahora que estos genes codifican para subunidades del complejo (Collins et al., 1999; Crosby et al., 1999). Los aspectos relacionados con el gen *osa* son de particular importancia en este contexto, dado que es este gen es el objeto de estudio del presente trabajo de tesis. Por ello, nos referiremos a este gen con detalle.

³ Hecho corroborado con ensayos de Western blot

En mamífero, se han identificado genes que forman parte del complejo brahma de humano llamado hSWI/SNF, dentro de estos genes se encuentran BRG1 y BRM (que forman las subunidades catalíticas)(Simon and Tamkun, 2002), BAF 57, BAF250⁴. Se ha demostrado que los productos de algunos de estos genes, pueden interaccionar con receptores nucleares de hormonas. Por ejemplo se ha visto que BAF 57⁵, puede interaccionar con el receptor de estrógeno para poder activar la transcripción, además de que es estimulada por el propio estrógeno(Belandia et al., 2002), otro ejemplo es el de BAF250, que estimula la activación transcripcional del receptor de glucocorticoides, donde la región correspondiente al extremo C-terminal puede interaccionar directamente con el receptor in vitro(Nie et al., 2000).

➤ *Características del gen osa.*

El gen *osa* en *D. melanogaster*, es codificado en una proteína que cuenta con un marco abierto de lectura (ORF), de 2713 residuos de aminoácidos. La comparación de su secuencia proteica entre humano y *Drosophila* mostró tres dominios funcionales (Treisman et al., 1997). Entre estos dominios, el que mejor se ha descrito es el llamado dominio ARID (también es conocido como dominio DEAD - RINGER). Este dominio incluye una secuencia de aproximadamente 80 aminoácidos que se caracteriza por su alto contenido de residuos de prolina. Para el caso de *osa* la riqueza de prolinas presentes en el dominio ARID representa el 17% de los residuos de aminoácidos totales en la proteína(Treisman et al., 1997). ARID se ha identificado en una gran diversidad de proteínas que se caracterizan por unirse a DNA in vitro (Iwahara and Clubb, 1999; Iwahara et al., 2002). Los otros dos dominios funcionales, se conocen como OHD1 y OHD2 para el cDNA de ratón(Kozmik et al., 2001) ó EHD1 (equivalente a OHD1) y EHD2 (equivalente a OHD2) para el cDNA de la proteína homóloga de humano, en esta último, se reporto que dichos dominios pueden interaccionar entre sí además de que el dominio EHD2 puede interaccionar con la subunidad catalítica del complejo en humano, la subunidad BRG1 (Hurlstone et al., 2002). OSA también muestra dominios LXXLL (Nie et al., 2000), estos dominios

⁴ Parece ser el homólogo de *osa* en humano, ver más adelante.

⁵ Subunidad presente solo en SWI/SNF de mamíferos.

están implicados en la interacción con receptores nucleares (Heery et al., 1997).

Se ha sugerido que las proteínas que contienen un dominio ARID, dependen de este para la unión a DNA (Kortschak et al., 2000), se ha propuesto un modelo que describe las interacciones existentes entre el DNA y el dominio ARID, que se ilustra en la Figura 2 (Iwahara and Clubb, 1999; Iwahara et al., 2002). La presencia de ARID en la proteína OSA sugiere que dentro del complejo Brahma, esta podría funcionar uniendo al complejo Brm con el DNA (Collins et al., 1999; Dallas et al., 1998; Dallas et al., 2000; Hurlstone et al., 2002)

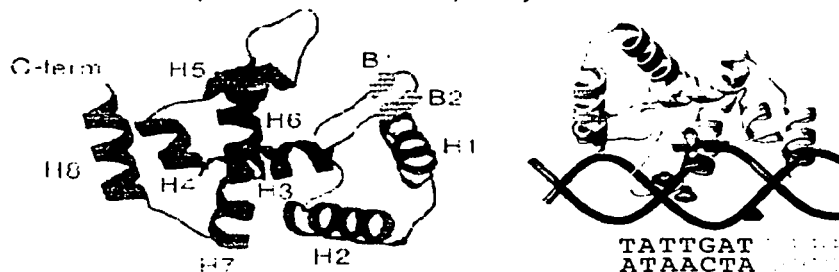


Fig. 2 . En la parte izquierda se presenta el modelo de la estructura para el dominio ARID, donde la proteína OSA parece tener mucha similitud con otras proteínas. En la parte derecha se presenta el modelo hipotético de interacción del dominio ARID con el DNA (Iwahara and Clubb, 1999).

Por otra parte es interesante que además de ser parte del complejo remodelador, *osa* fue inicialmente identificado como la mutante *eyelid* (*eld*), que se caracterizó como un antagonista de la señalización de la cascada transduccional en la que participa *wingless* (*wg*) durante el desarrollo de *Drosophila* (Collins and Treisman, 2000; Treisman et al., 1997). La mutante *eld/osa* están afectadas en el patrón del disco imagal del ojo. No se asegura que *eld/osa* tenga efecto pleiotrópico o si solo es parte del complejo Brahma.

En humano se han descrito genes que muestran homología con *osa*. Tal es el caso del gen que codifica para la subunidad BAF250 de los complejos humanos hSWI/SNF - A o BAF. Este gen muestra similitud con *osa* en tres dominios, uno corresponde al dominio ARID y los otros a dos dominios ubicados cerca del extremo carboxilo terminal (Nie et al., 2000). Se ha sugerido que esta proteína está implicada en la activación

transcripcional del receptor de glucocorticoides. También se sugiere que BAF250 confiere especificidad al complejo hSWI/SNF - A, puesto que puede reclutar al complejo a través de interacción proteína - DNA y proteína - proteína (Nie et al., 2000); el gen de BAF250, inicialmente fue identificado como p270, y recientemente se ha encontrado que es homólogo de *osa* (Dallas et al., 1998; Dallas et al., 2000). Recientemente se reportó otro cDNA homólogo a *eld/osa*, este fue reportado para humano y muestra los dominios ARID, OHD1 y OHD2 y que tiene alrededor de 5461 pb, al cual llamaron hELD/OSA1. En este reporte también se demuestra que hay una interacción entre los dominios OHD1 y OHD2 y también ven la interacción del dominio OHD2 con el gen BRG1 (el cual es una de las dos subunidades catalíticas del complejo en humano) (Hurlstone et al., 2002).

ANTECEDENTES

➤ *Se ha identificado el cDNA de osa en ratón*

De acuerdo a la secuencia genómica de *osa* reportada para humano, Kozmik y col. clonaron y aislaron el cDNA de *osa* en ratón (cDNA - *osa1*) (Kozmik et al., 2001). El producto de este cuenta con un alto contenido de prolina⁶, glutamina y serina que representan el 33% del contenido total. La región codificante comprende 1902 residuos de aminoácidos. Al comparar el cDNA de humano con el encontrado por Kozmik y col. se infiere que el gen sufre un proceso de maduración del RNA conocido como "*splicing alternativo*", puesto que hay una diferencia de 217 residuos dentro de la secuencia de ratón (del 2967nt al 3618nt). Ambas isoformas contienen una alta homología a la proteína OSA de *D. melanogaster*. Los pesos moleculares predichos para las isoformas tanto pequeña y grande son 182 y 206 KDa respectivamente. Cuentan con tres dominios conservados: el dominio ARID cerca del N-terminal (entre los aminoácidos 627 y 721), y dos dominios de homología a OSA (OHD1 se encuentra entre 1261 y 1348 residuos; y OHD2 1585 y 1899 residuos) cerca del extremo C-terminal (Fig. 3). La localización cromosomal de *osa* fue obtenida por medio de un híbrido radiado de hámster / ratón. Se asignó que *Osa1* se encuentra en la región central de cromosoma 4 de ratón (Kozmik et al., 2001).

⁶ Al igual que la proteína OSA de mosca.

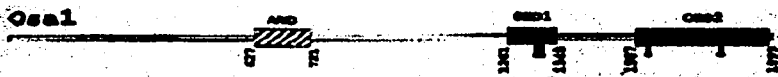


Fig. 3. Esquema de la proteína Osa1, además se muestra la estructura secundaria del dominio OHD2 con varias α -hélices β -plegadas. (Kozmik et al., 2001)

En la Fig. 4 se muestran hibridaciones *in situ* hechas por Kozmik y col. en distintos estadios del desarrollo de ratón. Se observa que a los 9.5 y 10.5 días de desarrollo su expresión es muy ubicua (Figs. 4b y 4c), pero la expresión se eleva en la zona lateral del mesodermo de las yemas de las extremidades, vesículas ópticas, tubo neural y cerebro (Figs. 4j, 4e y 4f). Después a los 11.5 y 12.5 DPC (después del coito), la expresión de *osa1* es más restringida, encontrándose solo en los interdígitos de las extremidades, mesodermo dorsal/ metencéfalo, neocortex y el tubo neural (Figs. 4d y 4g). Además se encontró expresión de *Osa1* en el cristalino del ojo a los 10.5 días, pero esta expresión es transitoria y es claramente visible solo a los 11.5 (Fig. 4h y 4i).

ANTECEDENTES DEL LABORATORIO.

En el grupo de la Dra. Lomelí existe interés por generar y estudiar la mutante nula de ratón del gen *osa*. Para obtener clonas genómicas de *osa*, inicialmente se aislaron fragmentos parciales del gen. Para ello se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos para ser utilizados como "primers o primeros" en experimentos de RT-PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron con base en la secuencia reportada para el cDNA de ratón. Se hicieron dos pares de oligonucleótidos. Con un par de ellos se amplificó la región correspondiente al dominio ARID; el otro se dirigió a la región de homología OHD1 (ver Fig. 3 para ubicar los dominios). Los fragmentos de RT-PCR se clonaron en el plásmido pKS y sirvieron como sondas para realizar la búsqueda de clonas genómicas que se reporta en este trabajo.

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen osa de ratón

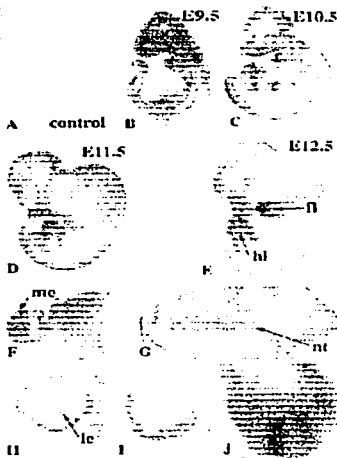


Fig. 4. Expresión de *osa1* durante el desarrollo embrionario de ratón. Las imágenes son hibridaciones in situ, utilizando el fragmento sentido como control negativo (ver Fig. 7) (A) o el fragmento antisentido (ver Fig. 7) (B a J). Vistas laterales de E9.5 (B), E10.5 (C), E11.5(D), y E12.5 (E) de embriones de ratón. (F) vista dorsal de embrión de 12.5 días que muestra la expresión de *Osa1* en el mesencéfalo. Vista dorsal de E11.5 donde se detecta *Osa1* en el tubo neural, (H,I) expresión en el cristalino a los 11.5 días y la declinación de esta a los 12.5 días de desarrollo respectivamente (J) extremidad que muestra la expresión de *osa* en interdigitos con 12.5 días de desarrollo. (Kozmik et al 2001)

OBJETIVOS

- * Aislar clonas genómicas de ratón con homología al cDNA de *osa* de *D. melanogaster*.
- * Mapear y secuenciar fragmentos de dichas clonas, para diseñar y construir un vector que permita llevar a cabo recombinación homóloga en células totipotenciales de ratón.

JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente se conocen homólogos de *PcG* y de *trxG* en ratón y se ha demostrado que ejercen funciones similares a las de *Drosophila*, tales como la regulación de genes homeóticos. En el ratón, algunas de las mutantes de genes del *trxG*, presentan además fenotipos muy interesantes en el desarrollo temprano, así como en el control de la proliferación y la sobrevivencia de algunas líneas celulares (por ejemplo, las células hematopoyéticas), además de cambiar los patrones de expresión de genes *HOM* (Gould, 1997; Klochendler-Yeivin et al., 2002; Schumacher and Magnuson, 1997; van Lohuizen, 1999). Se predice entonces que el estudio de la función de los *trxG* en ratón, aportarán más al conocimiento de la biología del desarrollo de este organismo.

En el laboratorio se tiene una colaboración con la Dra. Martha Vázquez, quien ha aislado varios genes de *Drosophila* que interaccionan genéticamente con *brahma*. Entre ellas identificó y describió por primera vez a la mutante *osa* de *Drosophila*. Parte de esta colaboración consiste en crear la mutante nula de *osa* en ratón. Para la que se necesita la clona genómica. Por tanto la clonación y el mapeo del gen *osa* (a partir de una biblioteca genómica), resulta indispensable para abordar el estudio de este gen en mamíferos. El conocimiento de la estructura genómica del gen *osa* permitirá diseñar un vector para hacer recombinación homóloga en células embrionarias totipotenciales y eventualmente generar el ratón mutante, que permitirá analizar las el papel del gen *osa* tanto en el desarrollo embrionario, como en la regulación génica.

MATERIAL Y MÉTODOS

El banco utilizado en este proyecto es un banco de DNA genómico comercial llamado λ FIX II (Stratagene); este banco, así como la cepa bacteriana *E. coli* XL1 Blue MRA, fueron donados por el Lab. del Dr. Collin Stewart.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de la cepa hospedera del bacteriófago

La cepa hospedera del fago λ - *FIX II* es *E. coli* *XL1 - Blue MRA*, que es una cepa modificada de uso exclusivo para este banco, y que no tiene resistencia a ningún tipo de antibiótico. Por tanto es necesario garantizar condiciones de esterilidad para asegurar que los cultivos con esta cepa no se contaminen.

Un día antes de la titulación o para el despliegue de la librería, se deben crecer las bacterias hospederas en medio de cultivo líquido LB (Apéndice 3), adicionando con maltosa 0.2% y sulfato de magnesio ($MgSO_4$) $10mM^1$. Después de 6 horas de incubación a $37^\circ C$, se mide la densidad bacteriana en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, deteniendo su crecimiento cuando la densidad sea de 1^2 (en esta medición, la solución que se utiliza como blanco es medio LB estéril); una vez que las bacterias tengan dicha densidad, se centrifugan a 2000 rpm. por 15 minutos y se resuspenden con agitación suave en 30 ml de $MgSO_4$ $10mM$. Estas bacterias pueden guardarse a $4^\circ C$ y utilizarse por 5 días máximo.

El medio de cultivo que sirve como sustrato inferior de la infección es el NZCYM (Apéndice 3). Este medio es vaciado a cajas Petri³ de 24 a 48 hrs. previo al sembrado del cespel⁴ y 20 min. antes de realizar la infección fago - bacteria hay que procurar que las cajas a que pierdan el exceso de agua.

El medio en el que se mezcla la infección fago - bacteria es el conocido como agar suave NZCYM (Apéndice 3), que se menciona más adelante.

¹ Se adicionan estos compuestos al medio, pues favorecen la infección, porque el bacteriófago se une al receptor de maltosa, y el $MgSO_4$, ayuda en la adsorción del fago al interior de la bacteria.

² Debido a que las bacterias crecen de forma exponencial y en esa densidad están en un crecimiento óptimo.

³ La medida recomendada para las cajas utilizadas en la primera vuelta es de 150 mm. x 15 mm.

⁴ Así se le llama a las bacterias infectadas con los fagos y el medio agar suave que los sostiene.

Titulación del banco genómico λ FIX II

La titulación de cualquier librería de bacteriófagos (genómicos o de cDNA), consiste en saber cuántas placas de infección es capaz de generar la librería por unidad de volumen (generalmente se expresa en pfu⁵/ml). Para poder desplegar correctamente el número requerido de placas líticas durante la búsqueda, se utilizan cajas Petri de 100 x 15 mm., con medio de cultivo NZCYM como sustrato inferior.

Como título de partida se toma el que es indicado por el proveedor de la librería (STRATAGEN), para este banco fue de 1×10^6 pfu/ μ l. A partir de este cálculo se hicieron las diluciones con buffer SM, estas fueron secuenciales a partir del almacén inicial, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} ; de las tres últimas diluciones, se tomaron 2 μ l para generar aproximadamente 2000, 200 y 20 respectivamente placas líticas, puesto que es número de placas que pueden ser contabilizadas fácilmente.

En el siguiente paso se realiza la infección de 200 μ l de la cepa hospedera con la cantidad de fagos que se indica arriba, y poner en esta misma mezcla fago - bacteria en 200 μ l de buffer SM (Apéndice 3), para diluir un poco las bacterias y que la eficiencia de la infección aumente. Se incubaron en 15 minutos a 37°C.

Una vez que se incubó esta infección, se le agregó medio agar suave NZCYM (a una temperatura de 55°C), se agitó y se vació a la caja Petri extendiendo este césped por toda la superficie. Se incubó a 37°C por 12 horas, contándose las placas de infección. El cálculo para saber el título real de la librería es la siguiente:

$$\# \text{ de placas contabilizadas} \times \text{ factor de dilución} = \text{Título Real del Banco.}$$

Primera vuelta de búsqueda del gen osa

Para poder realizar la primer vuelta de búsqueda de un gen, se necesita saber el número de placas líticas que se deben tener para encontrar por lo menos una clona positiva. Tomando en cuenta que es un banco genómico, se tienen que hacer los siguientes cálculos:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)} = 806,000$$

N = Número de placas líticas que se necesitan para encontrar una secuencia de DNA.

$$f = \frac{\text{promedio de inserto}(16 \text{ Kb})}{CG}$$

P = Probabilidad deseada.

f = Proporción fraccional del genoma en una recombinante.

CG = Número de bases del genoma de ratón (3.3×10^9).

⁵ Unidades formadoras de placas

De acuerdo a estos cálculos, determinamos que había que desplegar 806,000 placas líticas para encontrar al menos una clona con secuencias homólogas a la sonda del gen *osa*. El despliegue de esta primer vuelta con 35,000 placas de infección por caja a partir del título calculado (2.4×10^6), se realizó utilizando diluciones a partir de la alícuota de la librería. Se hicieron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , obteniendo un orden de magnitud de 1,000 pfu/ μ l para la segunda dilución.

La infección para la primera vuelta, se realiza de acuerdo a las recomendaciones del protocolo del banco, y se llevo a cabo con:

- 250 μ l de bacterias crecidas con las condiciones en que se crecieron para calcular el título
- 350 μ l de buffer SM
- 14.58 μ l de la dilución 10^{-3} (arriba mencionada)

Esta mezcla se mantuvo entre 15 - 20 minutos a 37°C con agitación, para que los bacteriófagos infectaran a las bacterias hospederas. Transcurrido el tiempo se lleva la mezcla hasta 6 ml de Agar Suave NZCYM, (Temp. de 55°C aprox.) agitándose y vaciando a la caja Petri, extendiendo la mezcla por toda la superficie.

La incubación de los fagos se realizó a 42°C , induciendo a los mismos a entrar en su fase lítica. El tiempo de crecimiento de las placas líticas es de aproximadamente de 9 hrs., por lo que hubo que checar las cajas después de este tiempo.

Una vez que las placas líticas tengan un tamaño de entre 2-3 mm de diámetro, se sacan de la incubadora y se conservan a 4°C por lo menos 2 horas, para poder transferir el DNA a filtro de nylon.

Transferencia del DNA a filtros de nylon

Este proceso necesita soluciones que deben ser hechas y esterilizadas previamente. Se utilizaron tres soluciones: Sol. desnaturalizante, Sol. neutralizante y SSC 2x .

Es importante mencionar que solo durante la primera vuelta, para cada caja Petri se transfieren dos filtros, debido a que de esta manera se puede tener un mejor control en la selección de clonas que muestren señal positiva (después de la hibridación y exposición de los filtros), pues aquellas placas líticas que reporten señal positiva, y que además puedan sobrelaparse en los dos filtros hechos para cada caja, se aíslan para hacer las siguientes fases de la búsqueda.

El primer paso de la transferencia, es poner sobre el agar suave que contiene las placas líticas un filtro de nylon por aproximadamente 2 minutos, para permitir que el DNA de las placas de infección se pegue al filtro. Una vez pasado el tiempo de transferencia se retiran los filtros de la caja y se someten a cuatro tratamientos de 5 minutos cada uno. En el primero se utiliza una solución alcalina (Apéndice 3) que actúa como desnaturalizante, con la finalidad de separar la doble hélice del DNA que se pegó al filtro de nylon y que corresponde en su mayoría al DNA del bacteriófago; en los dos siguientes tratamientos se tiene que neutralizar el efecto de la solución anterior, por lo que se utiliza la solución neutralizante (Apéndice 3), y el último proceso sirve para quitar el posible agar suave que se haya pegado al filtro. Los tres primeros tratamientos se realizan en papel filtro humedecido con la respectiva solución, en el último se embeben los filtros en SSC 2x (Apéndice 3) para poder quitar manualmente el exceso de agar suave.

Obtención y purificación de la sonda

Las sondas fueron hechas en el laboratorio de la Dra. Hilda Lomelí; la forma en que se obtuvieron fue utilizando oligonucleótidos que van de 28 a 30 nucleótidos (nt) flanqueados por sitios Eco RI, llamados "primeros o primers" dirigidos hacia los dominios OHD1⁶ y ARID⁷. Ambos primers se utilizaron en experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), utilizando como molde a cDNA de embrión de ratón de 14 Días de desarrollo (obtenido por medio de Transcriptasa reversa). Las condiciones para la reacción de PCR fueron 96°C, 30 sec; 58°C, 1 min.; 72°C, 5 min. Estos experimentos generaron dos tipos de sondas, una correspondiente al dominio OHD1 de aproximadamente 407 pares de bases (pb) "sonda OHD1" y otra correspondiente al dominio ARID de 371 pb "sonda ARID" los fragmentos fueron secuenciados⁸ y se compararon con el cDNA - *osa1* de ratón reportado por Kozmik y col.⁹ para *Osa*. Los dos casos las secuencias mostraban una similitud de 99% con respecto a esta secuencia (ver alineamientos en apéndice A).

⁶ Estos primers fueron a partir de la secuencia de DNA reportada para el gen homólogo en humano, puesto que todavía no se reportaba la secuencia de cDNA - *osa1*

⁷ Estos primers fueron diseñados a partir de la secuencia de cDNA reportada por Kozmik y col. para *osa* en ratón

⁸ Este procedimiento fue hecho por la unidad de secuenciación del IBT

⁹ En este proyecto el cDNA reportado por Kozmik y col., se le refiere como cDNA - *osa1*.

Los fragmentos de cDNA del gen *Osa*, se encuentran dentro de un vector de clonación conocido como pKS, y se nombraron pKS-OHD1 y pKS-ARID de acuerdo al fragmento contenido en ellos. Estos insertos son liberados al poner las construcciones en presencia de la enzima de restricción EcoRI, para separar el cDNA del vector y por medio del protocolo de purificación de bandas en gel de agarosa se libera el inserto que se usa como sonda (sistema de purificación comercial QUIAGEN).

Marcaje Radiactivo de la sonda, hibridación en filtro y revelado de la película expuesta

El isótopo utilizado para marcar la sonda es ^{32}P - α dCTP, en donde el nucleótido marcado es una citosina y la radiactividad se encuentra en el fosfato que está unido a la desoxirribosa, es decir el fosfato α . El marcaje radiactivo de la sonda se llevó a cabo por medio de un sistema de marcaje comercial basado en pegado al azar (*random primer*) conocido como REDIPRIME II (Biotech), por tanto el protocolo utilizado para tal propósito fué el de este sistema. Adicionalmente se utiliza en este procedimiento, un buffer de hibridación (Apéndice 3), que se preparó horas antes para prehibridar los filtros de nylon en el horno de hibridación a una temperatura de 65°C (generalmente se dejan prehibridando 2 horas); una vez que se prehibridaron los filtros, se agrega la sonda marcada y desnaturalizada al tubo donde están los filtros con buffer de hibridación y se deja hibridando de 8 a 12 horas, la temperatura de hibridación es la misma que la utilizada en la prehibridación.

El siguiente paso fué el lavado de los filtros, y tuvo como propósito quitar la radioactividad que no hibridó con el DNA blanco de manera específica. Para tal fin se utiliza una solución de lavado basada en fosfatos (Apéndice 3), haciendo tres lavados de 20 min. cada uno a 65°C con agitación vigorosa para desplazar a la radioactividad no integrada. Ya lavados los filtros se verifica la cantidad de radiactividad contenida en ellos por medio de un contador Geiger y exponiéndose de cuatro a cinco días. Después de estos días de exposición se revelaron las películas para revisar que rastros pueden ser placas dobles positivas. Las señales que se repitan deben corresponder a una placa lítica que presuntamente contiene parte o todo el gen *osa*. Esta placa se aísla con ayuda de pipetas Pasteur estériles, utilizando la parte ancha para picar la zona donde se está la placa, esta se deposita en buffer SM con cloroformo al 2%. Una vez

depositada es necesario agitarla para poder liberar los fagos del agar suave. Esta preparación se utiliza para la infección de la segunda vuelta.

Segunda y tercera vuelta de búsqueda del gen Osa

Para la segunda y tercera vuelta de selección, se utilizaron los bacteriófagos colectados como se indicó en la primera vuelta (ver arriba). Se infectan cajas con aproximadamente 100 y 1000 placas líticas. Para ello se utilizó una dilución 1:1000 de la placa original (en el caso de la tercer vuelta se hizo la dilución de la placa colectada en la segunda vuelta). Para efectuar el despliegue se tomaron dos diferentes volúmenes, que fueron 1 y 10 μ l. Para realizar la infección se siguió el protocolo del banco, y se utilizó:

- 150 μ l de Buffer SM
- 150 μ l de bacterias crecidas a $OD_{600} = 1.0$ (cepa E. Coli XL1 - Blue MRA)
- 1 y 10 μ l de la clona aislada en la primer o segunda vuelta según sea el caso.

A diferencia de la primera vuelta de la búsqueda, en la segunda y tercera vuelta las placas líticas no son confluentes, y pueden colectarse aisladas, para tal motivo se utilizó la parte delgada de pipetas Pasteur estériles. Los bacteriófagos contenidos en las placas fueron resuspendidos en buffer SM con cloroformo 2%.

Purificación del DNA contenido en el fago

Para purificar el DNA del fago se utilizaron bacterias de la cepa de E. coli XL1 - Blue MRA crecidas en medio LB enriquecido con $MgCl_2$ 10mM y glucosa 0.2 %. Al igual que en la búsqueda del gen se dejaron crecer solo hasta $OD_{600} = 1$, se centrifugaron y resuspendieron en 30 ml de $MgCl_2$ 10mM.

1. De la placa aislada en la tercera vuelta se toman 250 μ l y se incuban con 200 μ l de las bacterias tratadas. Ambas se ponen a 37°C para permitir la infección de los fagos a las bacterias. Una vez pasado este tiempo se le agregan 6 ml de medio LB líquido (con $MgCl_2$ 10 mM y glucosa 0.2%) y se ponen a crecer por 12 h a 37°C con agitación.

Una vez que pasaron las 12 h se ponen 100 μ l de cloroformo por infección y se regresan a 37°C por 15 minutos más.

2. Cada infección se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos. Se puede guardar 1ml del sobrenadante a 4°C para futuras infecciones.
3. Se toma el sobrenadante en un tubo limpio y se ponen 20 µl de DNasa - RNasa a 10 µg/ml a cada tubo. La concentración final debe ser de 4 µg/ml. Este tratamiento se incuba por 60 minutos a 37°C.
4. Se adicionan 1.6 ml de 40% PEG₆₀₀₀ + 16% NaCl 2.74 M, se mezcla y se coloca en hielo en el cuarto frío mínimo por una hora.
5. Se centrifuga a 8000 rpm por 10 minutos.
6. Se decanta el sobrenadante evitando perder el precipitado.
7. Se disuelve el precipitado en 400 µl de EPB (buffer de la proteasa K), y se transfiere a tubos Eppendorf. Se ponen 4 µl de SDS 20% y 10 µl de proteasa K a 10 µg/ml. Se incuba a 37°C por lo menos una hora.
8. Se hacen tres extracciones:

1ª	fenol : cloroformo
2ª y 3ª	cloroformo.
9. En el siguiente paso se ponen 40µl de acetato de potasio 2M y se afora a 1 ml con etanol absoluto frío. Se coloca a -70°C por lo menos 15 minutos, para precipitar el DNA.
10. Después de este proceso de precipitación, el DNA se puede lavar con etanol 70% o en su defecto se toma el DNA directamente del tubo donde se precipitó con etanol absoluto, se pasa a un tubo limpio. Se deja secar a temperatura ambiente.
11. Una vez que el DNA perdió el exceso de alcohol se resuspende en 50 µl de buffer TE.
Una vez que se hizo el anterior protocolo ya se puede liberar el DNA genómico del vector.

Subclonación del gen osa

En este proyecto se utilizó el vector pKS en la subclonación (ver mapa en el Apéndice 4). Para subclonar los insertos genómicos presentes en el fago lambda, se hicieron digestiones con las enzimas de restricción Not I, Hind III y Eco RI¹⁰.

Una vez hechas la digestiones de las clonas se corrieron en un gel de Agarosa al 1 %, para determinar su tamaño; hecho lo anterior se ligó el

¹⁰ Las condiciones en que se hicieron las digestiones con estas enzimas son las mismas que se utilizan para el mapeo de la subclona en las digestiones sencillas (Ver más adelante)

vector¹¹ con los fragmentos. El requerimiento para este experimento, es tener al menos 100 ng de DNA que se quiere ligar, por cada 15 ng de vector; para el ligamiento se utilizó un sistema de ligado comercial conocido como "*Rapid DNA Ligation Kit*" (Boehringer), por tanto el protocolo que se siguió es el recomendado en el sistema.

Estas ligaciones fueron introducidas en células competentes (bacterias tratadas para poder introducir DNA ligado dentro de ellas) por medio de electroporación, procediendo a sembrar el césped en placas de LB en presencia de carbenicilina 50 mg/ml (para hacer una primera selección de bacterias, es decir, en este medio crecen las bacterias que incorporaron el vector, pues les confiere resistencia al antibiótico); la siguiente selección es diferenciar las colonias que contengan dentro del vector un fragmento de la clona, de las que solo incorporaron el vector. Esta selección se llevó a cabo por el método de selección X-Gal / IPTG; la última selección es diferenciar a las subclonas que contengan el dominio ARID de las que no lo tienen. La forma en que se hizo fue por medio de una hibridación en colonia usando a la sonda ARID, cuyo protocolo es el mismo que el de la transferencia e hibridación hecha para las placas de infección.

Mapa de la subclona

El tratamiento de DNA con endonucleasas de restricción¹² produce una serie de fragmentos que pueden ser separados de acuerdo a su tamaño (número de pares de bases) usando electroforesis en geles de agarosa. Al conocer los sitios corte sitios de corte de diferentes enzimas de restricción en un fragmento de DNA, pueden formar diagramas conocidos como un "*Mapas de restricción*". Un mapa puede ser generado basándose en dos o más enzimas, puesto que se hacen cortes con una sola enzima (digestión sencilla) y se compara con patrones de restricción de digestiones con dos enzimas, una de las enzimas en esta doble digestión, es la enzima utilizada en la digestión sencilla (Alberts B, et al 2000).

En este trabajo se utilizaron las enzimas *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI, *Pst* I, y *Xho* I.

¹¹ Previamente linearizado con las mismas enzimas utilizadas para cortar el DNA de las clonas y obtener un fragmento para subclonar.

¹² Enzimas que catalizan reacciones de corte en sitios internos de moléculas de DNA por medio del reconocimiento de secuencias específicas (Lewin B. 2000)

Las condiciones de las digestiones fueron las siguientes:

	Concentración final	Cantidad en μl
Muestra de DNA	0.5 - 1 μg/μl	10μl
Buffer de enzima 10x	1x	2 μl
Enzima	50 - 100 U / μl	0.5 - 1 μl
RNAse	500 μg	1 μl
BSA (100x)¹³	1x	0.2 μl
Agua	—	7.8 - 6.8 μl
Total de reacción	—	20 μl

¹³ No es necesario para todas las enzimas

RESULTADOS

Búsqueda de clona del gen osa en el banco genómico λ - FIX II

El primer experimento en este proyecto fue calcular el título del banco genómico. Este ensayo se realizó de acuerdo a la manera descrita en la sección de "Material y Métodos" y se obtuvo un título de 2.4×10^6 pfu/ μ l.

Posteriormente se procedió a sembrar placas líticas para realizar la búsqueda. De acuerdo a la complejidad del genoma de ratón (3.3×10^9 nt) y al tamaño promedio de los insertos en el banco (16 Kb), se calculó que se requerían aprox. 806,000 placas líticas en el despliegue en la primera vuelta del despliegue para obtener al menos una clona positiva.

Se necesitaron varios intentos para poder contar con cajas Petri que tuvieran placas de infección con tamaño adecuado, cantidad necesaria. Una vez que se obtuvieron las placas adecuadas, se realizó la transferencia del DNA del banco a filtros de nylon, obteniendo filtros duplicados por cada caja Petri con placas de infección.

El siguiente experimento fué hacer la hibridación del DNA contenido en los filtros con la *Sonda ARID* (ver ubicación de la sonda en el cDNA en la Fig. 3). Se utilizó esta sonda porque de las que disponíamos en el laboratorio (OHD1 y ARID ver ubicación de las sondas en el esquema del cDNA de la Fig. 3), la sonda ARID era la más cercana a la región 5' del gene, puesto que el tamaño promedio de los insertos en el banco genómico λ FIX II es de 16 Kb y de que el tamaño esperado para el gen *osa* en función del gen que se reportó para humanos es mayor (alrededor de 150 Kb), no se esperaba que las clonas aisladas pudieran contener todo el gen. Por lo tanto, lo más deseable era aislar fragmentos que en lo posible contuvieran regiones regulatorias o cercanas al inicio de la parte codificante. La razón de ello es que el objetivo principal de aislar estas clonas, como ya se mencionó, era poder obtener el material genético para la construcción de un vector que por recombinación homóloga, permitiera inactivar el gen *osa*. Debido a esto, era importante poder acceder al inicio del gen, ya que de otra manera se correría el riesgo de crear mutaciones que no fueran totalmente nulas. Por otra parte se ha visto que el dominio ARID funge como ligando de la proteína OSA hacia el DNA (Collins et al., 1999), entonces si se inactiva el gen a partir de este dominio, es altamente probable que se obtenga una proteína no funcional.

Cabe señalar que el dominio ARID no es exclusivo de proteína OSA, sin embargo el dominio ARID de las distintas proteínas solo conservan algunos residuos de aminoácidos clave, por lo tanto la secuencia nucleotídica no siempre es igual¹, entonces es poco probable que algún otra proteína que cuente con dicho dominio, tenga exactamente la misma secuencia nucleotídica que *osa* y consecuentemente que esas otras secuencias hibriden con nuestra sonda; además la sonda ARID se comparó con el cDNA - *osa*¹ y mostró un 99% de similitud, teniendo la seguridad de que las clonas aisladas fueran realmente clonas de *osa*, ya que la sonda cuenta con aproximadamente 300 pb más aparte del dominio ARID y que corresponden a las regiones contiguas al dominio.

Los resultados de la hibridación de los filtros con la sonda ARID rindieron 13 señales positivas en los filtros duplicados (Fig. 5, Pag. 40), mismas que fueron colectadas para realizar la segunda vuelta de la búsqueda. Los resultados de la segunda vuelta se muestran en la Fig. 6a (Pag. 40), en donde sólo 4 de las 13 clonas encontradas en la primera vuelta mostraron de nuevo señal positiva. Estas fueron recuperadas nuevamente para desplegar la tercera vuelta de selección.

La tercera vuelta tenía la finalidad de lograr el aislamiento de las clonas positivas. Para ello se tomaron las cuatro clonas que fueron aisladas en la segunda vuelta; se hizo el despliegue y se seleccionaron placas según la señal reportada por la hibridación en filtro que se muestra en la Fig. 6b (Pag. 40), confirmando que las cuatro clonas recuperadas de la segunda vuelta muestran señal positiva para la sonda ARID.

Obtención del DNA de las clonas aisladas del gen osa

Con el fin de iniciar la caracterización de las clonas genómicas identificadas, se purificó el DNA del fago contenido en las placas aisladas siguiendo el protocolo que se presenta en "Material y Método". El DNA obtenido se muestra en la Figura 7.

Posteriormente se hicieron digestiones con las enzimas de restricción *Not* I, *Eco* RI y *Hind* III de cada una de las clonas, para compararlas a través de sus patrones de restricción y, de esta manera determinar si se trataba de clonas generadas independientemente o si era la misma clona. El patrón obtenido se puede ver en la Figura 8. Las

¹ Debido a la tasa de mutaciones silenciosas, estas no alteran el producto proteico, aunque no el mRNA no sea el mismo

Identificación y aislamiento de clones genómicos del gen Osa de ratón

digestiones con *Eco* RI y *Hind* III sugieren que se obtuvieron tres clones diferentes, es decir las clones 2 λ y 7 λ son idénticas, pero son diferentes a las clones 6 λ y 1 λ , estas últimas tampoco se parecen entre ellas.

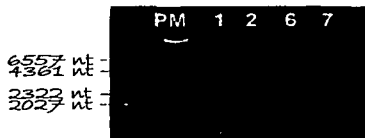


Fig. 7. Gel de agarosa 0.8 %, donde se muestra el DNA aislado de las cuatro clones para Osa genómico; basándose en este gel y a la medición en el espectrofotómetro se determinó que la concentración de estas muestras es de 100 ng / μ l.

El gel que muestra las digestiones (Fig. 8), fue transferido a una membrana de nylon por medio de transferencia alcalina. Posteriormente se sometió a hibridación con la sonda *ARID* (Fig. 8 derecha). Esto se realizó para saber que tamaño y número de fragmentos contienen al dominio *ARID* en cada digestión. Se pudo determinar que el fragmento positivo de *Not* I era de entre 16 y 19 Kb, mientras que en los patrones obtenidos con las otras dos enzimas, dos fragmentos eran positivos para la sonda *ARID* en cada caso, lo cual sugería la presencia de un intrón dentro del dominio *ARID* (ver adelante).

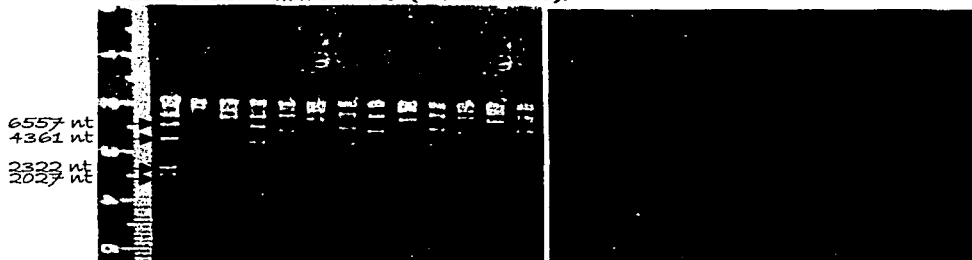


Fig. 8. Digestiones hechas con las Enzimas de Restricción *Eco* RI, *Hind* III y *Not* I de las clones obtenidas de la búsqueda en el banco genómico λ FIX II, la imagen de la derecha es la hibridación de estas digestiones con la Sonda *ARID*.

De acuerdo al diseño de la construcción del banco usado, *Not* I debía liberar el inserto completo, si bien no se excluía la posibilidad de que hubiera un sitio interno de *Not* I dentro del mismo y por lo tanto se liberara mas de un fragmento. Para el caso de las clones que se obtuvieron en este trabajo no parece haber un sitio interno de *Not* I,

puesto que la suma de los fragmentos de *Eco* RI y *Hind* III, corresponde aproximadamente al tamaño del fragmento de *Not* I.

Subclonación de insertos positivos en pKS.

Dado que esta hibridación identificó bandas positivas de igual tamaño para todas las clonas, se decidió utilizar la clona 2 λ , en una ligación con pKS. Para lograr esto, el vector fué digerido con *Eco* RI, *Hind* III y *Not* I por separado, en la ligación se utilizó la digestión correspondiente de la clona referida. De las colonias obtenidas después de la transformación, se seleccionaron por hibridación, colonias positivas para la sonda ARID, puesto que este dominio es la referencia para poder acercarse al extremo 5' del gen. Obteniéndose subclonas de las tres enzimas utilizadas; el inserto de la subclona que presentaba mayor tamaño es el que corresponde a la ligación con *Not* I, su tamaño oscila entre 15 - 18 Kb² (una vez caracterizado el inserto se determino que su tamaño es de 15 Kb), esta subclona fue llamada NArid. En la figura 9 se muestra el fragmento aislado, así como la banda del vector. Se optó por mapear a NArid, puesto que contiene la totalidad del inserto.

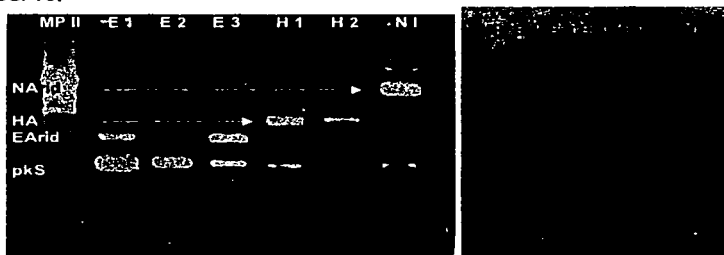


Fig. 9. Gel que muestra el DNA del fragmento subclonado, para las clonas hechas tanto en *Eco* RI, *Hind* III, y *Not* I, en la imagen de la derecha se muestra la hibridación donde se comprueba que las subclonas contienen la sonda que corresponde al Dominio ARID.

Mapeo del gen Osa

a. Secuenciación

En la actualidad, el primer paso para obtener el mapa de un gen es consultar la información disponible en las bases de datos, ya que varios genomas han sido secuenciados en su totalidad. El DNA genómico de

² Este parámetro es amplio debido a que el marcador de peso molecular no es preciso en el lugar en que se encuentra el inserto.

ratón está casi completamente secuenciado. Sin embargo, la información se ha ido liberando gradualmente. Por ello, se procedió a revisar las secuencias genómicas presentes en las bases de datos (sitio www.ensembl.org/Mus_musculus) con relación al gen *osa*. Al momento en que realizamos la primera búsqueda, no estaba disponible la secuencia genómica de *osa* de ratón, sin embargo se pudo acceder a la secuencia genómica de humano de este mismo gen. Esta secuencia como se verá fué de utilidad para avanzar en nuestro mapeo.

Se decidió entonces realizar un mapeo experimental de la clona genómica aislada. Lo primero que se planteó fue mandar a secuenciar³ el inserto en forma parcial (en la Fig. 10 se muestra los lugares en que se secuencia a NArid). Esto se hizo a partir de los extremos del inserto, para lo cual se utilizaron los *primeros* T3 y SK contenidos en el polylinker del pKS. Así mismo, se utilizaron *primeros* diseñados en los extremos del dominio ARID (mArid 1 y mArid 2) basándose en el cDNA-*osa1*. La intención de este análisis era localizar secuencias correspondientes a este cDNA dentro del inserto genómico y de esta forma, determinar qué partes del cDNA reportado por Kozmik y col., estaban contenidas en la subclona NArid y de qué manera se encontraban orientadas. Las secuencias resultantes del análisis mostraron que los extremos del inserto no presentaban homología alguna con el cDNA - *osa1*, por lo tanto debían ser secuencias intrónicas, (al menos los \approx 500 nt secuenciados). Esta misma conclusión se obtuvo cuando se analizó la secuencias del primero mArid 1; a diferencia de la secuencia obtenida para mArid 2, que mostró similitud del 98 % en 70 nt con el cDNA - *osa1* cuando se hizo el análisis correspondiente, confirmándose que teníamos una subclona de *Osa* con el Dominio ARID. En el siguiente diagrama se muestran los sitios de donde se secuenció NArid, así como las incógnitas inmediatas:

³ Unidad de síntesis y secuenciación del IBT

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen *Osa* de ratón

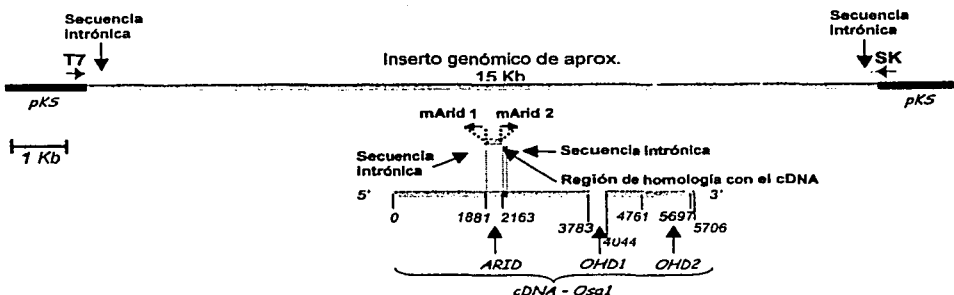


Fig. 10. En este esquema se representan las secuencias obtenidas (en naranja) a partir de la secuenciación con los oligonucleótidos (T7, SK, mArid 1 y mArid 2), en azul se representa la zona de la secuencia de mArid 2 que empalma con la secuencia del cDNA. Aun no sabemos en que parte del inserto está ubicado el dominio ARID, por lo tanto no se representa en un lugar específico del inserto (rojo), en negro se representa el vector pKS. Las flechas representan la dirección de los oligonucleótidos.

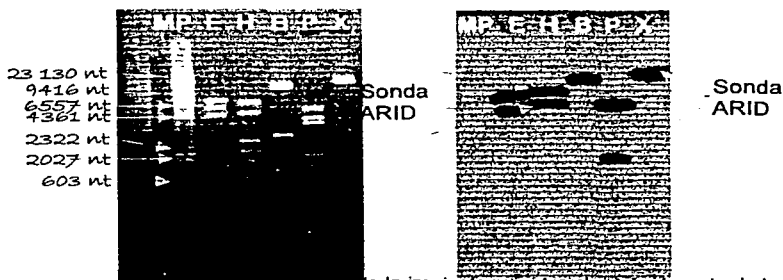


Fig. 11. La imagen de la izquierda muestra el patrón de corte de las enzimas *Eco* RI (E), *Hind* III (H), *Bam* HI (B), *Pst* I (P), *Xho* I (X), en la imagen de la derecha se muestra la hibridación de este patrón con la sonda ARID.

b. Digestiones con enzimas de restricción.

Debido a que la secuenciación no aportó la información deseada, se recurrió a un mapeo del inserto NArid con enzimas de restricción, en donde con digestiones dobles se ubicarían sitios para diferentes enzimas. Además, combinando digestiones dobles con hibridaciones, se podría determinar la ubicación de ARID dentro de los insertos. De inicio, se digirió con las enzimas de restricción *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Bam* HI y *Xho* I (Fig. 11). Estas endonucleasas fueron elegidas porque

son algunas de las que están presentes en el polylinker de pKS como sitios únicos. El uso de estas enzimas tenía además el propósito de ver si eran únicas dentro del inserto genómico y se ubicaban en posiciones adecuadas para que pudieran utilizarse en etapas posteriores, en la construcción del vector para la recombinación homóloga.

Las digestiones sencillas con estas enzimas generaron el número de fragmentos que se pueden ver en la figura 11 e indican el número de sitios de corte dentro del inserto genómico, los cuales se señalan en la tabla inferior. Estas digestiones también sirvieron para hacer una mejor estimación del tamaño total del inserto, ya que por ser mayor de 12 Kb es muy difícil estimar su tamaño directamente en un gel al 1% de agarosa. Por ello es más recomendable, sumar los tamaños de las bandas obtenidas con cada una de las enzimas. El tamaño del inserto resultó ser 15 Kb. La enzima Xho I no se siguió utilizando ya que no contenía sitios dentro del inserto.

Enzima	Eco RI	Hind III	Bam HI	Pst I
Longitud de las distintas bandas (en Kb)	6	6.5	14	7
	5.9	5	2.5	4
	4	3	1.5	3
	1.2	2.2		2
		0.8		1.1
		0.6		
Sitios de corte	4	5	2	4

El patrón de digestiones sencillas se transfirió a nylon, e hibridó con la sonda ARID (Fig. 11 derecha): este ensayo mostró que para tres de las cinco enzimas utilizadas, la sonda empalmaba en dos bandas. La sonda correspondiente al dominio ARID tiene 371 nt, y no se corta con ninguna de las enzimas utilizadas en el análisis. Por lo tanto, que la sonda hibride con mas de un fragmento, se interpreta como que el dominio ARID esta separado por un fragmento de DNA que no aparece en el cDNA (mRNA), pero que sí esta contenido en la secuencia genómica de *osa*. Estas secuencias que no aparecen en el mRNA son no codificantes y se llaman intrones. Consecuentemente se puede decir que el dominio ARID está codificado por dos exones, puesto que hibrida con dos bandas, y por lo tanto se le denomina exar5' y exar3', dependiendo de alguno de estos se ubica hacia el extremo 5' o 3' del gen.

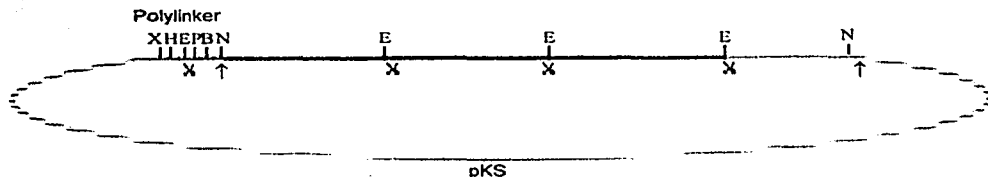


Fig. 12. Modelo donde se representa a un inserto de DNA dentro del vector pKS, los sitios de corte están representados con líneas negras, la letra representa la enzima con la que es digerido el fragmento, *Eco* RI (E), *Not* I (N), *Bam* HI (B), *Pst* I (P), *Hind* III (H) y *Xho* I (X). Las tijeras representan todos los cortes de *Eco* RI y las flechas representan los cortes de *Not* I en la subclona. Se puede ver que cuando se digiere con las dos enzimas se genera un fragmento más que cuando se digiere solo con *Eco* RI.

Los tamaños del vector, inserto y polylinker no son proporcionales, pKS 2.9 Kb, inserto 15 Kb, polylinker = 230 pb.

En la siguiente etapa, se utilizó un razonamiento de manera general para ubicar uno de los fragmentos que se producen con cada una de las enzimas utilizadas que se explica a continuación: Las enzimas que se utilizaron para las digestiones simples (*Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I y *Bam* HI) tienen un sitio de reconocimiento dentro del polylinker de la manera en que se indica en la figura 12. Como se observa, el sitio de *Not* I que se utilizó para introducir el inserto genómico, se ubica posterior a los de estas enzimas. Esta organización tiene la implicación de que al cortar con una sola de las enzimas de las que preceden al sitio de *Not* I, el DNA del vector, quedará unido a una parte del inserto genómico, tal como se indica en el ejemplo (en rojo). Esta situación se modificará al realizarse digestiones dobles del tipo *Eco* RI/*Not* I, *Hind* III/*Not* I, *Pst* I/*Not* I y *Bam* HI/*Not* I, ya que en estos casos si se separará el vector del inserto genómico en sus dos extremos. De esta manera la comparación de las digestiones sencillas con las digestiones dobles (Fig. 13), hará posible deducir a que distancia del sitio de *Not* I (en rojo) se encuentra uno de los sitios de cada una de las enzimas, como en este ejemplo sería el de *Eco* RI.

El gel que se muestra en la figura 13 fué transferido a nylon para hacer una hibridación con la sonda ARID (Fig. 13 derecha). Con este experimento pudimos determinar que parte del dominio ARID se encontraba presente en los fragmentos que se ubicaron adyacentes al sitio *Not* I (lejano al polylinker, en este proyecto se le llamará sitio

*NotIa*⁴), ya que en todos los casos, este fragmento era positivo a la sonda ARID. Basandonos en estos resultados y en el ejemplo de la Fig. 12 se logro tener una primera aproximación del mapeo para la subclona *NARid*, que se muestra en el Mapa 1.

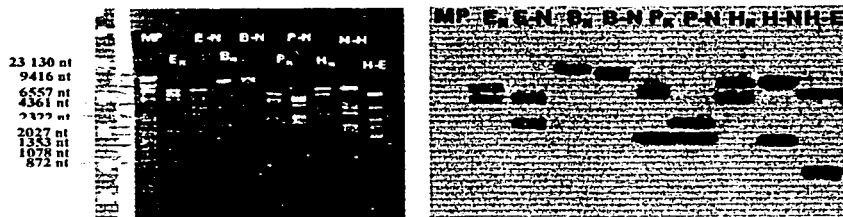
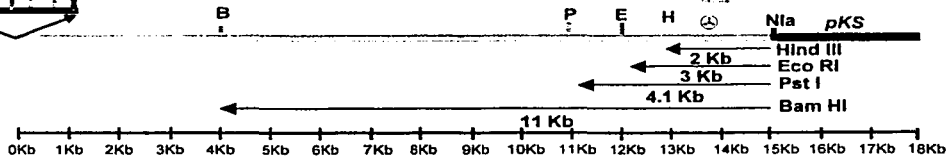


Fig. 13. La imagen de la izquierda muestra los patrones de corte para dobles digestiones (E - N [Eco RI - Not I], B - N [Bam HI - Not I], P - N [Pst I - Not I], N - H [Not I - Hind III] y H - N [Hind III - Eco RI]) y también muestra los patrones de corte para digestiones sencillas con las enzimas Eco RI (E_N), Bam HI (B_N), Pst I (P_N) y Hind III (H_N). En la imagen de la derecha se muestra la hibridación con la sonda ARID de los patrones de corte de la imagen contigua, el asterisco amarillo muestra a la banda que es de mayor peso molecular en digestiones sencillas y que desaparece cuando se digiere con *Not I* y alguna otra enzima, con asterisco marrón se muestra a la banda que aparece resultado de la doble digestión.



Mapa 1. En rojo se representa el inserto genómico de *osa*, en negro se representa el vector en el que se subclonó (vector pKS), la línea verde representan la zona en que debe hibridar la sonda ARID con alguno de los dos exones, a la izquierda de la figura se representa la zona del polylinker del vector y cada letra representa los primeros sitios de corte de las enzimas de restricción, es decir *Not I* (N), *Hind III* (H), *Eco RI* (E), *Pst I* (P) y *Bam HI* (B). El fragmento producido por el corte con las enzimas indicadas, está indicado con flechas negras para cada enzima.

⁴ También se pueden ver que *NARid* contiene otro sitio de *Not I*, es decir el sitio en donde se encuentra la región múltiple de clonación, este sitio esta incluido siempre se mencione al polylinker en el proyecto, a diferencia de *Not Ia*.

Con la información derivada del análisis anterior se pudo diseñar una estrategia lógica para ubicar otros de los sitios de las enzimas utilizadas. Para este ejercicio se consideró como referencia, el sitio de Bam HI señalado en el mapa 1. Se eligió Bam HI debido a que solo hay dos sitios en el inserto genómico y el que hibrida con la sonda ARID es grande (≈ 11 Kb) y por lo tanto contiene a otros sitios de Eco RI, Hind III y Pst I. Se procedió entonces a realizar digestiones dobles con Bam HI y cada una de las otras enzimas (es decir, Eco RI/Bam HI; Pst I/Bam HI y Hind III/Bam HI), las cuales se muestran en la figura 14.

A partir de un análisis en el que se compararon los patrones de las digestiones sencillas (p. Ej. Eco RI y Bam HI) y la doble correspondiente (Eco RI/Bam HI), se definió cuales fragmentos de la doble digestión se conservaban de cada una de las digestiones sencillas, y cuales nuevos se generaban, tomándose en cuenta los tamaños producidos por las digestiones dobles en relación con las sencillas. De esta forma, se pudo definir, todos los sitios de Eco RI, Bam HI y un fragmento más de Pst I. Sin embargo solo se pudieron localizar inequívocamente, algunos de los sitios de Hind III.

También se ubicaron las otras bandas que híbridan con la sonda ARID, estas fueron colocadas contiguas a otra banda que muestra señal positiva para la sonda, en el mapa 2 se puede ver la ubicación de las bandas ubicadas.

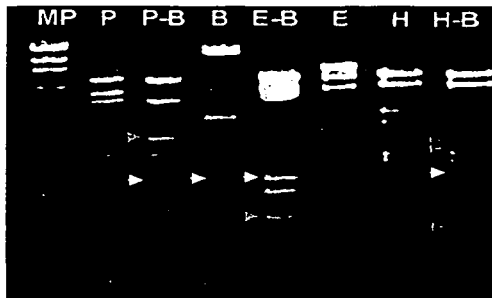
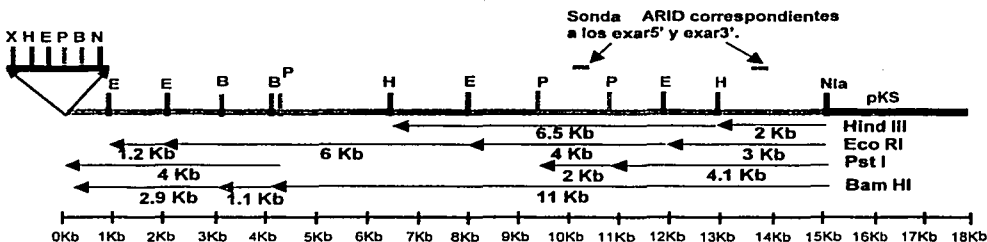


Fig. 14. Gel que muestra dobles digestiones con Bam HI y otra enzima, también aparecen los patrones de corte de digestiones sencillas para las enzimas utilizadas en el mapeo. Las letras representan un patrón de corte específico, para Pst I (P), para Pst I - Bam HI (P - B), B (Bam HI), Eco RI - Bam HI (E - B), E (Eco RI), H (Hind III) y H - B (Hind III - Bam HI)

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen *osa* de ratón



Mapa 2. En rojo se representa el inserto genómico de *osa*, en negro al vector pKS, en líneas verdes se representa la zona en que debe hibridar la sonda ARID para los dos exones, del lado izq. se representa al polylinker, cada letra representa los sitios de corte de las enzimas, es decir Not I (N), Hind III (H), Eco RI (E), Pst I (P) y Bam HI (B).

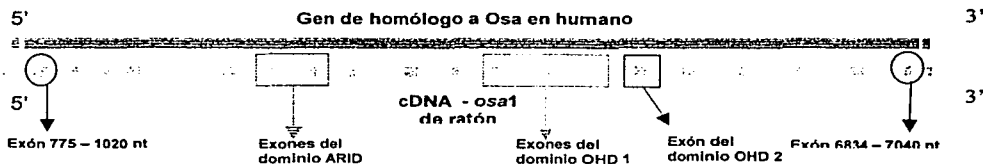


Fig. 15. Este esquema representa la comparación del cDNA (gris) con la secuencia genómica reportada para *osa* en humano (morado), en un recuadro rojo se denota el lugar y número de exones del dominio ARID, en un recuadro café los exones del dominio OHD1 y en un recuadro verde el exón del dominio OHD2. Los espacios entre cada fragmento gris (es decir de cDNA), representan los intrones.

c. Reacciones en cadena con la Polimerasa Taq.

Las reacciones de polimerasa en cadena (PCR) también son ampliamente utilizadas para obtener información relacionada con la organización de una clona genómica. En este trabajo, el PCR ayudó a definir la orientación del inserto genómico dentro de pKS y el contenido de cDNA correspondiente. Para tal fin se diseñaron primers dirigidos a zonas del cDNA - *osa1* ubicados hacia el extremo 5'. Ya se tenían indicios de que la orientación de la subclona era hacia el extremo 5' del cDNA, debido a que se hizo una hibridación de la subclona con la sonda OHD1 y el resultado fue negativo. Como se menciona en la introducción OHD1 es un dominio ubicado hacia el extremo 3' del cDNA, al dar negativo para la subclona es muy probable que la subclona contuviera su orientación al extremo 5'.

Para definir tanto la orientación como el número de exones contenidos en la subclona genómica, se diseñaron *primers* dirigidos a zonas del cDNA ubicados hacia el extremo 5'. Los *primers* se diseñaron basándose en la comparación del gen *osa* de humano de la base de datos y del cDNA de ratón (Fig. 15), puesto que desconocíamos la organización de exones e intrones y el tamaño de los intrones contenidos en el gen de ratón. El gen de humano pudo utilizarse como referencia, ya que se sabe que generalmente se conservan las posiciones exón - intrón entre mamíferos, por tanto también se conserva el tamaño de los exones. El análisis de la estructura del gen de humano nos permitió ubicar el fragmento de cDNA - *osa1* comprendido entre los nucleótidos 775 y 1020 como un exón único. Este exón es la primer secuencia identificable del cDNA de ratón en el gen de humano. Aparentemente anterior a esta posición en el gen de humano se encuentra un intrón muy grande (al menos de 20 Kb⁵), por lo tanto la secuencia reportada de humano, no alcanza a abarcar al inicio del gen si este es igual que el inicio de *osa* en ratón. Con base en lo anterior se diseñaron *primers* para el exón identificable más cercano al extremo 5' (del nucleótido 775 al 1020⁶). Estos *primers* se llamaron *ex775* y *ex1020*. El objetivo de diseñar estos *primers* es confirmar la dirección que muestra la subclona.

Aunque no se tenían rastros acerca de los primeros exones de *osa*, es decir, los correspondientes al inicio de la transcripción y de la traducción, se diseñó un oligonucleótido a partir del cDNA reportado por Kozmik y col., dirigido al inicio de la región codificante (*primer ini1*). También se diseñó otro oligonucleótido ubicado a 300 pb hacia abajo (*ini300*), este último fue dirigido a una posición cercana al inicio de la región codificante, minimizando la probabilidad de que un intrón quedara dentro de estas posiciones y se dificultara la obtención de un producto de PCR. El objetivo de utilizar estos *primers* es para saber si la subclona contenía el inicio de la traducción.

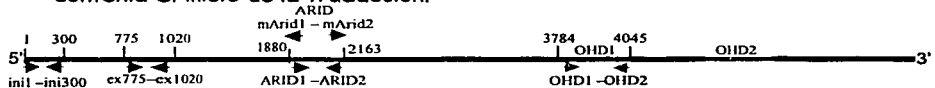


Fig. 16. Representación de la ubicación del cDNA de *Osa* de ratón los *primers* diseñados a partir del cDNA reportado por Kozmik y col.

⁵ Se sugiere este número porque antes del exón 775 - 1020, hay 20, 000 pb que no muestran homología con el cDNA

⁶ Los exones fueron nombrados a partir de la ubicación de los en que se diseñaron los nucleótidos en el cDNA

En la Fig. 16 se representan lugares del cDNA en que fueron diseñados todos los primers utilizados en el proyecto.

Se hicieron PCR's con cada uno de estos pares de primers utilizando como templates a la subclona NArId y las clonas aisladas de la biblioteca (1λ, 2λ, 6λ y 7λ). El resultado de este análisis indicó que únicamente los primers del exón 775 - 1020 podían generar un producto tanto en NArId como en las clonas genómicas, como se observa en la figura 17. De estos experimentos se concluyó que la subclona genómica incluía al menos de la posición 775, en que se ubica el *primer ex775* y va a la posición 2163 donde esta ubicado el primer ARID2. Esta conclusión también implica que la región correspondiente a la posición 775 debe estar más cercana a donde están los sitios del polylinker, y ARID como ya se demostró anteriormente, está ubicada del lado contrario, o sea cercano al sitio de *NotIa*, esta conclusión surgió ya que revisando el Mapa 2, nos dimos cuenta que la distancia que hay entre ARID y el extremo del vector (en el sitio *NotIa*) es a lo más de 2 Kb. En esta distancia no podría ubicarse el exón 775 - 1020, puesto que la comparación del cDNA con el gen *Osa* de humano muestra una mayor distancia (de al menos 6 Kb) entre estos dos exones.

El resultado negativo del PCR con ini1 e ini300 (Datos no mostrados) sugiere al menos dos posibilidades. Primera, que los *primers* no puedan generar un fragmento porque exista un intrón grande entre ellos que dificulte la formación de un producto de PCR; la segunda opción es que la subclona no contenga el inicio de la región codificante y que por eso la amplificación por PCR sea negativa. En ensayos del mismo tipo, que se mencionan en la discusión, se comprueba que los primers ini1 e ini300, son capaces de generar bandas de PCR en clonas de *osa* contenidas en vectores de clonación conocidos como BACs⁷. Por lo que se concluye que NArId no abarca hasta el inicio de la región codificante, a diferencia de los BAC's donde se sugiere que si contienen dicha región.

Se realizaron otros PCR's que sirvieron para definir la distancia entre ARID y el sitio de *Not I* (que queda aislado del polylinker), donde se utilizaron los primers mArId 2 y SK; así como la distancia que habría del exón 775 - 1020 al polylinker para el cual se utilizaron los primers ex1020 y T3, tomando como premisa que este exón es muy cercano al extremo del inserto. Para estos ensayos se tomó como template al DNA de la subclona. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura

⁷ Cromosomas Artificiales de Bacteria.

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen Osa de ratón

18, donde se muestra que la distancia entre el extremo del dominio ARID y el extremo del vector es de aproximadamente 500 nt, y la distancia del exón 775 al otro extremo del inserto es de 1000 nt. Esta distancia sugiere que ya no existen otros exones antes de 775 - 1020 o después de ARID. Lo anterior es confirmado en la comparación del cDNA con el DNA humano, ya que los intrones que se reportan en este cotejo, son mayores a la distancia obtenida de estos experimentos. Estos datos ayudan a la delimitación de NARid, y se concluye que la subclona contiene del nucleótido 775 al 2163 del cDNA - *osa1* de ratón, representando el 20% del mismo.

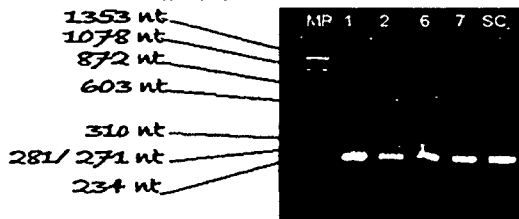


Fig. 17. Este gel muestra el PCR que se realizó utilizando los oligonucleótidos ex775 y ex1020; MP (Peso Molecular), 1 (clona genómica 1), 2 (clona genómica 2), 6 (clona genómica 6), 7 (clona genómica 7), SC (subclona NARid).

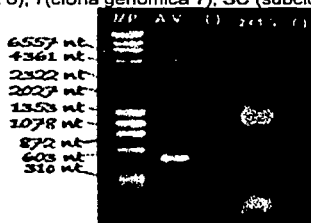


Fig. 18. Gel que muestra ensayos de PCR para saber las distancias que hay entre el vector y el exón del dominio ARID de la subclona (A-V), también se muestra el PCR para saber la distancia del exón 775 - 1020 y el vector (241 - V), [controles negativos (-)]

Otro ensayo de PCR que se realizó fue para saber la distancia entre los exones del dominio ARID (como primer's se utilizaron ARID1 y ARID2), el resultado se muestra en la figura 19, donde se muestra un producto de PCR cercano a los 3.5 Kb, atribuyendo esta longitud al intrón ahí presente.

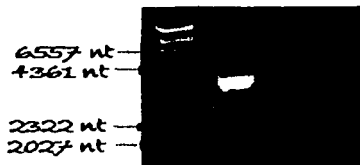


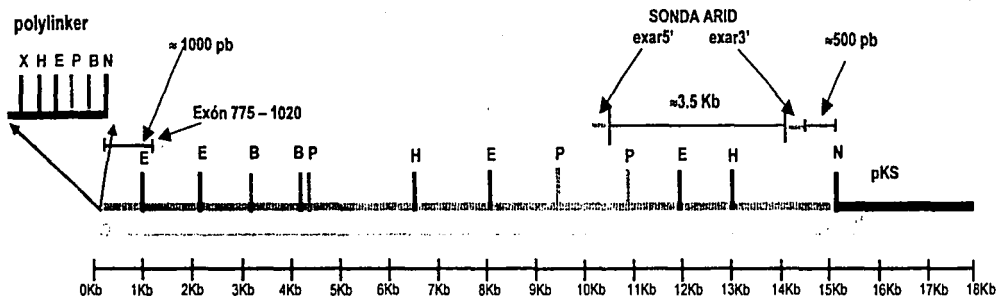
Fig. 19. Esta imagen muestra la distancia que hay entre los exones del dominio ARID, es importante destacar que esta distancia es de cerca de 3.8Kb, pero dentro del fragmento generado se esta tomando en cuenta al dominio ARID que es de 200 pb que deben ser quitados para definir el tamaño del intrón.

En la última etapa del proyecto se visitó de nueva cuenta el sitio www.ensembl.org/Mus_musculus, con el objetivo de revisar si se había liberado la secuencia de *Osa*, tomando nuevamente al cDNA reportado por Kozmik y col. (Kozmik et al, 2001). Esta búsqueda mostró que una secuencia es muy similar al cDNA - *osa1*, y se localiza en el cromosoma 4 del organismo (tomando como premisa que *Osa* se encontraba en el localizado en el cromosoma 4(Kozmik , et al 2001))[en el Apéndice 2 se muestra el resumen de exones e intrones de la búsqueda].

Esta comparación arrojó una serie de observaciones que confirman datos obtenidos en los experimentalmente en el proyecto:

1. Confirma la cantidad de cDNA contenida en NARid, puesto que al lado del exón de ARID dirección 3' hay un intrón de 1.5 Kb y del exón 775 - 1020 hacia el extremo 5' hay un intrón de 20 Kb, y como ninguno de los extremos puede cubrir esta distancia, la subclona queda delimitada como se propuso anteriormente.
2. El exón llamado 775 - 1020, muestra una longitud similar, al de la comparación con DNA humano, en todo caso los oligonucleótidos diseñados para localizarlo se ubican dentro del exón correspondiente, generando productos con el tamaño de la secuencia esperada.
3. En esta comparación, el intrón que separa al dominio ARID muestra una longitud de 3.6 Kb, que es un tamaño similar al obtenido por ensayos de PCR (3.5 Kb).
4. Basándose en la comparación (Ver Apéndice 2), se sugiere que la subclona NARid contiene aproximadamente el 20% del cDNA, como también se había propuesto.

El modelo final del mapeo parcial y la caracterización de la subclona NARid se muestra en el mapa 3.



Mapa 3. En rojo se representa el inserto genómico de Osa, en negro al vector pKS, en líneas verdes se representa la zona en que debe hibridar la sonda ARID, del lado izquierdo de la figura se representa la zona del polylinker del vector y cada letra representa los sitios de corte de las enzimas de restricción en ambos extremos, es decir Not I (N), Hind III (H), Eco RI (E), Pst I (P) y Bam HI (B). Al lado derecho se muestra la ubicación sugerida por el PCR para el exón 775-1020.

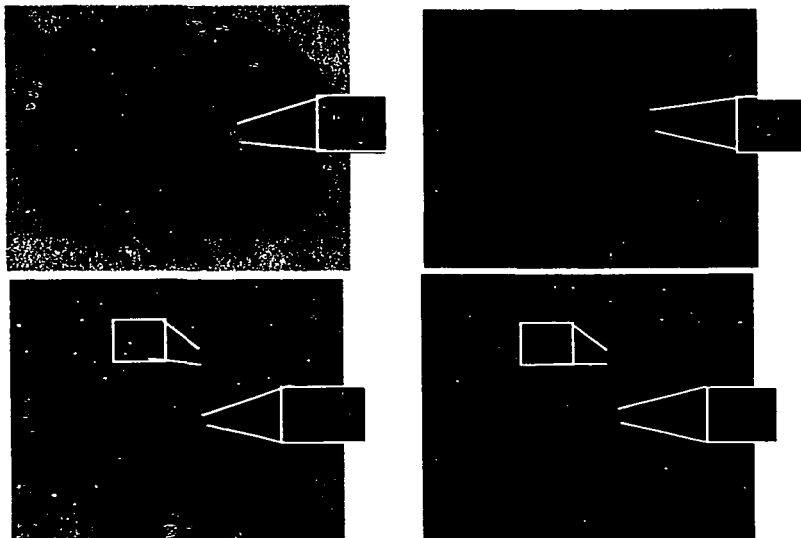


Fig. 5. Películas que muestran tres de las trece señales positivas encontradas en la primer vuelta de selección, en la imagen se muestra un aumento de la señal resaltado por líneas blancas.

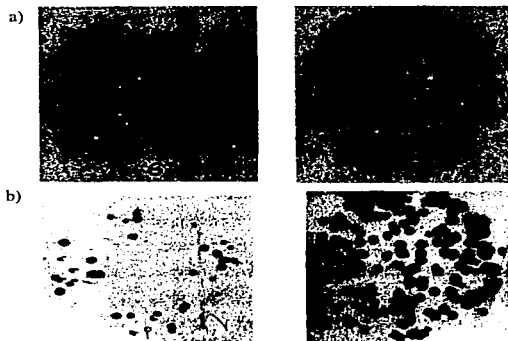


Fig. 6. Esta imagen muestra la segunda (a) y tercera (b) vuelta de la búsqueda en la librería genómica, se muestran dos densidades de placas fílicas distintas, las imágenes de la izquierda tienen menor densidad que en las de la derecha, facilitando el aislamiento de la placa de infección.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se realizó una búsqueda en una biblioteca genómica de ratón, donde se identificaron clonas del gen *osa*. Se utilizaron sondas correspondientes a secuencias de dominios homólogos al gen, identificadas tanto en humano como en *D. melanogaster* (Dallas, et al. 1998; Iwahara and Clubb 1999; Dallas, et al. 2000). Una sonda corresponde a un dominio cercano al extremo 5' del gen (*ARID*) y la otra sonda corresponde a un dominio que se encuentra hacia el extremo 3' (*OHDI*) (Dallas, et al. 1998; Iwahara and Clubb 1999; Dallas, Pacchione et al. 2000; Kozmik, et al. 2001)

En este proyecto se lograron aislar, tres distintas clonas genómicas de *Osa* de ratón, de estas se subclonó en el vector pKS en sitios *Not I* y se mapeó un inserto de 15 Kb, que corresponde al inserto total de una de las clonas genómicas. El mapeo parcial con las endonucleasas de restricción *Eco RI*, *Hind III*, *Bam HI* y *Pst I* de estas subclonas, permitió saber que ninguna de las enzimas mencionadas contiene un sitio dentro del inserto que facilite la construcción de un vector para la recombinación homóloga (VRH), necesario para la creación de una mutación nula en ratón.

A través de experimentos de recombinación homóloga en células embrionarias totipotenciales, idealmente se logra deletar la región codificante de un gen de interés impidiendo la producción de la proteína. Incluso en ocasiones se logran diseños que permiten deletar regiones regulatorias y con ello se evita la transcripción. Sin embargo, en varios esquemas se consigue nulificar la función del gen deletando partes importantes de la proteína (p. Ej. dominios funcionales o dominios de la proteína que sirven la unión a DNA) o alterando la fase de la traducción a partir de una región cercana al inicio de la región codificante. En este sentido las clonas que se aislaron en este trabajo, si bien no contienen el inicio de la traducción, serán de utilidad para el diseño de un VRH que interrumpa la traducción de *osa* aproximadamente a partir del nucleótido 775 al 2259 correspondientes al cDNA, debido a que en esta región esta contenido el dominio ARID que es de unión al DNA.

La construcción de un VRH necesita de ciertas características. Entre ellas se encuentra la de tener regiones homólogas al gen para que pueda haber recombinación con el DNA genómico. Dichas regiones deben tener una longitud de al menos 3.5 Kb (Fig. 20), que formarán los brazos del vector. Se debe contar con un fragmento grande del gen. En este caso el fragmento es de alrededor de 15 Kb, en donde las orillas del fragmento serán los brazos del vector, dejando una longitud considerable entre ellos (Fig. 20).

Para la construcción también es conveniente tener sitios únicos para enzimas de restricción dentro del inserto, al que se desea incluir como fragmento homólogo (ver Fig 20). En la subclona NARid, hasta el momento no se han identificado sitios en el fragmento genómico para llevar a cabo la estrategia más simple en el diseño de recombinación homóloga, por lo que se determinará la presencia de otros sitios de enzimas, que no se encuentren en el polilinker, ni en el vector y que su sitio de reconocimiento sea de al menos seis nucleótidos, por ejemplo Nae I, Pvu I, Bgl I, Nco I.

Sin embargo, a partir de la información que se tiene hasta el momento, se puede proponer un esquema para la construcción de un vector que involucra varios pasos; utilizando sitios de Pst I, que están ubicados a 4 Kb de ambos extremos del inserto (Mapa 3). Aunque para el caso de Pst I nos faltó ubicar un sitio, sabemos que éste sitio se debe encontrar hacia la parte central del inserto y no nos afecta en el diseño que se propone para la construcción del VRH.

Primero se propone digerir a la subclona con Pst I; las bandas que interesan para esta propuesta sólo son dos, la banda que queda unida al vector y la banda de 4 Kb que es separada del vector en el polilinker (ver Mapa 3 y Fig. 21); posteriormente se procedería a aislar estos fragmentos para ligarlos nuevamente entre sí, solo que al hacer esta ligación, se incluiría también un oligonucleótido adaptador, que se diseñaría con el objetivo de destruir los sitios de Pst I y producir alguno nuevo, finalmente se tendrían varios eventos de ligación posibles, donde el inserto podría quedar orientado en dos direcciones y el adaptador podría insertarse en ambas posiciones, en una o en ninguna. Para obtener la construcción deseada se tendría que seleccionar de entre las que se generaron. Esta propuesta, igualmente implicaría una búsqueda de una enzima que tenga sitios de reconocimiento en NARid, por lo tanto esta opción se contempla sólo en el caso de no encontrar alguna otra enzima que presente un patrón único de corte.

Identificación y aislamiento de clonas genómicas del gen *Osa* de ratón

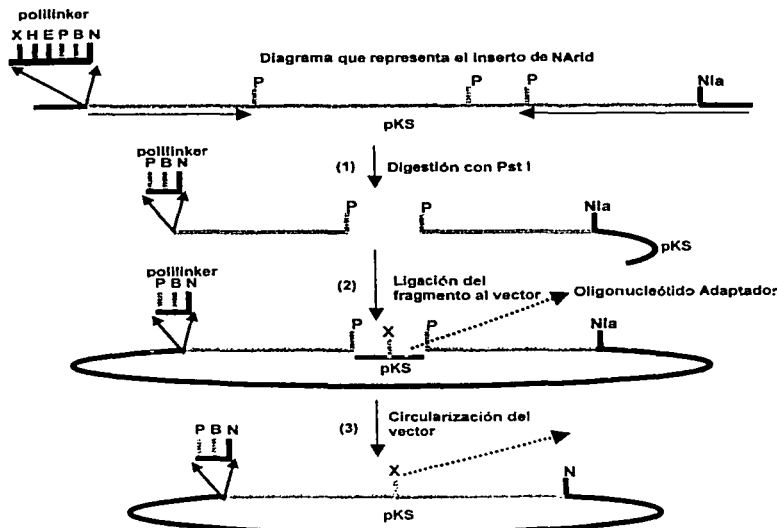


Fig. 20. Representación de la construcción de un VRH, donde la línea roja representa al inserto del gen, la línea negra representa al vector de clonación, las letras representan los sitios de corte, donde P es Pst I. Las flechas negras representan las bandas que servirán como brazos en la recombinación homóloga. Los tamaños tanto del inserto (15 Kb), como del vector (2.9 Kb) y del polilinker (=230pb) no son proporcionales

Una vez que se produce el vector con los brazos en los extremos, estos son unidos a un fragmento de DNA que contiene genes útiles para el proceso posterior. Estos son genes de resistencia, tales como Neo, para seleccionar los eventos de inserción en el genoma y un gen reportero (p. ej. *lac Z*) que permite el seguimiento de la expresión del gen en el embrión (esquema 5, siguiente página).

La ubicación del inserto en el gen es cercana al extremo 5' del mismo, pero no contiene regiones regulatorias ó el inicio de la traducción. La búsqueda de gen en el sitio www.ensembl.org/Mus_musculus, basándose en el cDNA, indicó la presencia de un intrón de alrededor 20 Kb cerca del inicio del gen (entre los nt 774 y 775 del cDNA). Por esta razón era improbable obtener el inicio de la traducción en una clona aislada con la sonda ARID, ya que el tamaño límite del inserto es de entre 15 y 20 Kb y ARID se encuentra identificado a 8 Kb del intrón de 20 Kb. Sin embargo, como el inserto contiene un dominio de

pegado al DNA (ARID), que es importante para la función de la proteína *in vivo* (Collins, et al. 1999). Se espera que al deletar este dominio del gen, se elimine la función del gen, generando el ratón "nulo" para *osa*.

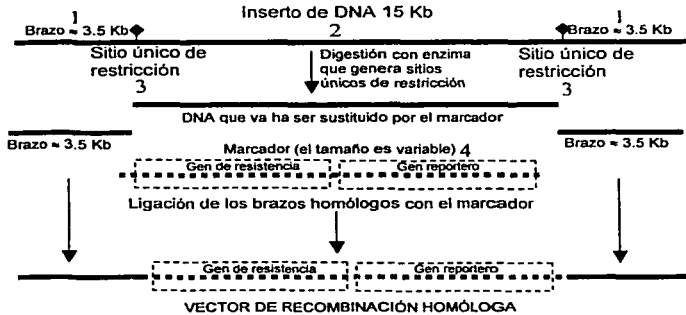


Fig. 21. Representación de la construcción de un vector de recombinación homóloga a partir de un fragmento de DNA. La línea negra representa el DNA de que se van a tomar los brazos del vector, los rombos negros representan los sitios únicos de corte de alguna enzima, y la línea verde representa el marcador del vector. Cabe mencionar que el marcador casi nunca es del tamaño mismo que el fragmento de DNA que había entre los brazos.

Gracias a una colaboración de con el lab. del Dr. Collin Stewart, se cuentan con clonas de BAC's (Cromosomas Artificiales de Bacterias), que contienen secuencias del dominio ARID y del dominio OHD1. Los BAC's son vectores de clonación que pueden contener de 100 a 150 Kb de DNA exogeno. Por tal razón había una gran probabilidad de que alguna de estas clonas contuviera todo el gen. Consecuentemente se podrían aislar fragmentos que contuvieran tanto regiones regulatorias como a la región codificante del extremo amino terminal de la proteína, por lo que se daría paso a la caracterización del inicio del gen, así como a la construcción de otros vectores de recombinación homóloga, ayudando en la delección total de la función de la proteína OSA en ratón. En relación con estas clonas hemos hecho experimentos de PCR, utilizando los *primers* ini1 e ini300 y pudimos amplificar productos de PCR. Gracias a este ensayo pudimos confirmar que tenemos clonas que contienen la región codificante del extremo amino terminal de la proteína, a diferencia de la subclona NARid que no contiene el dicha región puesto que no pudimos obtener productos de PCR con estos mismos primers. Adicionalmente en este ensayo se demostró que entre ini1 e ini300 existe un intrón del al menos 1.5 Kb.

CONCLUSIONES

- Se aislaron tres distintas clonas del gen *Osa* de ratón, que contenían al dominio ARID (1 λ , 6 λ , y 2 λ -7 λ).
- La subclonación y mapeo del inserto de la clona 2 λ aportaron que el fragmento del gen contiene al 20% del cDNA de ratón.
- La subclona NArId no contiene el incluyendo a la región codificante del dominio ARID pero esta ubicado hacia el extremo 5' del gen y es de utilidad en la construcción del vector de recombinación homóloga.
- Se logró mapear el inserto denominado NArId con las enzimas *Eco* RI, *Bam* HI, *Pst* I, *Hind* III, con estas y otras que se caracterizarán en un futuro cercano se podrá realizar la construcción de un vector para la recombinación homóloga.

APÉNDICE 1

Alineamiento de la sonda ARID con el cDNA de Osa de ratón, este alineamiento muestra un 99% de similitud. La figura esquematiza e lugar físico donde son homólogas estas secuencias, es decir el dominio ARID. En negrita se representa al primero mArid 1, en itálicas mArid 2 la única diferencia en la comparación esta subrayada y en negritas.



APÉNDICE 2

Comparación del cDNA - *osa1* de ratón con el gen reportado para humano (derecha), también se muestra los exones generados en la comparación del cDNA con secuencia genómica de ratón correspondiente al cromosoma 4 del este organismo.

Tamaño del exón en Ratón	Exón a partir del cDNA	Exón en DNA genómico de ratón	Exón en DNA genómico de humano en base al cDNA de ratón	Tamaño del exón en Humano
208 nt	1 - 209	2066840 - 2067048		
453 nt	205 - 658	2068882 - 2069335		
178 nt	603 - 783	2070179 - 2070357		
252 nt	769 - 1020	2093396 - 2093648	775 - 1016	241 nt
98nt	1012 - 1110	2093894 - 2093992	1013 - 1107	94 nt
181 nt	1103 - 1284	2094726 - 2094907	1104 - 1274	170 nt
321 nt	1265 - 1586	2095480 - 2095801	1272 - 1587	315 nt
148 nt	1584 - 1732	2096406 - 2096554	1585 - 1733	148 nt
294 nt	1694 - 1997	2096615 - 2096909	1730 - 1842	112 nt
225 nt	1840 - 2064	2098277 - 2098502	1841 - 2054	213 nt
221 nt	2036 - 2259	2100282 - 2100503	2050 - 2260	210 nt
524 nt	2220 - 2738	2101847 - 2102371	2391 - 2660	131 nt
209 nt	2377 - 2588	2102165 - 2102374	2393 - 2566	173 nt
114 nt	2713 - 2827	2102997 - 2103111	2565 - 2718	153 nt
159 nt	2869 - 3031	2103231 - 2103390	2716 - 2828	112 nt
896 nt	2965 - 3861	2103188 - 2104684	2870 - 2967	97 nt
125 nt	3858 - 3983	2104989 - 2105114	2966 - 3056	90 nt
1247 nt	3981 - 5229	2107524 - 2108771	3114 - 3860	764 nt
			3859 - 3990	131 nt
950 nt	5606 - 6553	2109110 - 2110060	3989 - 4136	147 nt
827 nt	6124 - 6955	2109630 - 2110457	4201 - 5731	1710 nt
302 nt	6737 - 7039	2109266 - 2110381	5760 - 5852	92 nt
			5890 - 6023	133 nt
			6032 - 6089	57 nt
			6136 - 6760	624 nt
			6834 - 7040	206 nt

Dominio
ARID

Dominios
OHD1 y
OHD2

APÉNDICE 3

Medios de Cultivo.

Medio LB

10 g de NaCl

10 g Triptona

5 g de extracto de levadura

Bacto - agar 15 g / L (Medio sólido)

Bacto - agar 7 g / L (Agar suave)

Bacto - agarosa 15 g /L (Medio sólido)

Bacto - agarosa 7 g /L (Agar suave)

Para medio líquido

Aforar a 1 L de agua.

Ajustar a pH 7 con NaOH

5N

Autoclaverar y vaciar a
cajas Petri

Después de agregar agar o agarosa:

Aforar a 1 L de agua.

Ajustar a pH 7 con NaOH 5N

Autoclaverar y vaciar a cajas Petri

Medio NZY

5 g de NaCl

2 g de MgSO₄ 7H₂O

10 g de NZ amina (caseína
hidrolizada)

NZY sólido 15 g de agar o agarosa

NZY suave 7 g de agarosa

Para medio líquido:

Aforar a 1 L

Ajustar el pH a 7.5

Autoclavear

Una vez agregado agar o agarosa:

Aforar a 1 L

Ajustar el pH a 7.5

Autoclavear

Para hacer los medios de selección por resistencia a antibiótico:

Antibiótico	Concentración de almacenamiento	Temperatura de almacenamiento	Concentración de trabajo
Ampicilina	50 mg/ml en H ₂ O	- 20°C	100µg/ml (1/500)
Cloramfenicol	34 mg/ml en etanol	- 20°C	170µg/ml (1/200)
Tetraciclina	5mg/ml en etanol	- 20°C	50µg/ml (1/100)

Buffer's y Soluciones

Buffer SM (Phage Buffer)

5.8 g de NaCl
2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
50 ml de Tris HCl 1M (pH 7.5)
5 ml de gelatina 2% (w/v)
Aforar a 1L de agua
Autoclavear

Solución Desnaturalizante

1.5 M de NaCl
0.5 M de NaOH

Solución Neutralizante

1.5 M de NaCl
0.5 M de Tris HCl (pH 7.2)
0.001 M EDTA

Buffer de hibridación

0.5 M de NaH_2PO_4 (pH 7.2)
7 % SDS
1 mM EDTA (pH 8.0)

Buffer TE

10 mM Tris HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

Buffer SSC 20 x

175.3 g de NaCl
88.2 g de Citrato de Sodio
800 ml de Agua
Ajustar a pH 7 con NaOH 10 N

EDTA (0.5M)

186.1 g de $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$
disolver en 700ml de agua
Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 N
y aforar a 1 L.

SDS 10%(Dodecil Sulfato de Sodio)

100 g de SDS
Se disuelve en 1 L de agua

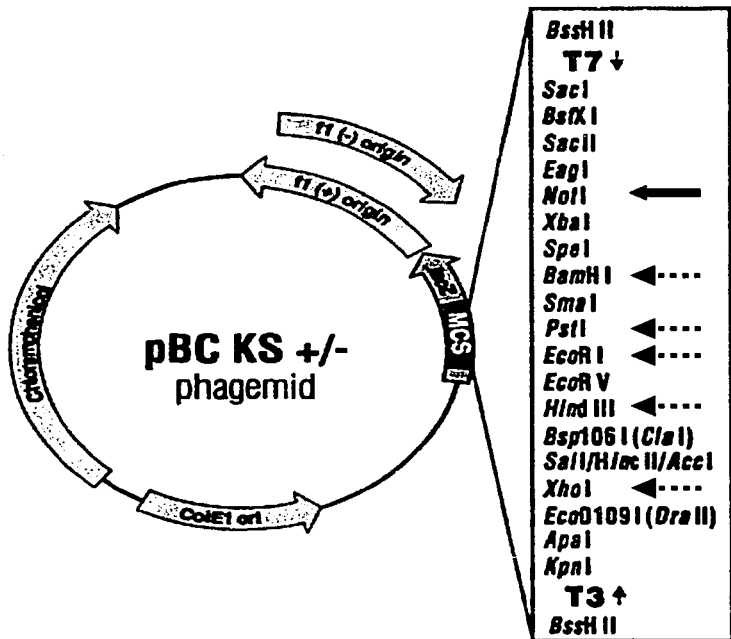
Solución de lavado

40 mM NaH_2PO_4
1 % SDS

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 4

Mapa del vector utilizado en la subclonación. Se muestran los sitios de restricción, con flechas punteadas se marcan los sitios de las enzimas utilizadas en el mapeo de restricción. Con una flecha negra se muestra el sitio en que se insertó el fragmento mapeado.



BIBLIOGRAFÍA

Asp, P., Wihlborg, M., Karlen, M. and Farrants, A. K. (2002). Expression of BRG1, a human SWI/SNF component, affects the organisation of actin filaments through the RhoA signalling pathway. *J Cell Sci* **115**, 2735-46.

Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M. and Clevers, H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *Embo J* **20**, 4935-43.

Bel, S., Core, N., Djabali, M., Kieboom, K., Van der Lugt, N., Alkema, M. J. and Van Lohuizen, M. (1998). Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes in mice. *Development* **125**, 3543-51.

Belandia, B., Orford, R. L., Hurst, H. C. and Parker, M. G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *Embo J* **21**, 4094-103.

Beuchle, D., Struhl, G. and Muller, J. (2001). Polycomb group proteins and heritable silencing of Drosophila Hox genes. *Development* **128**, 993-1004.

Biggin, M. D. and McGinnis, W. (1997). Regulation of segmentation and segmental identity by Drosophila homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development* **124**, 4425-33.

Brock, H. W. and van Lohuizen, M. (2001). The Polycomb group--no longer an exclusive club? *Curr Opin Genet Dev* **11**, 175-81.

Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G. et al. (2000). A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell* **6**, 1287-95.

Carr, A. and Biggin, M. D. (1999). A comparison of in vivo and in vitro DNA-binding specificities suggests a new model for homeoprotein DNA binding in Drosophila embryos. *Embo J* **18**, 1598-608.

Collins, R. T., Furukawa, T., Tanese, N. and Treisman, J. E. (1999). Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *Embo J* **18**, 7029-40.

- Collins, R. T. and Treisman, J. E. (2000). *Osa*-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev* **14**, 3140-52.
- Crosby, M. A., Miller, C., Alon, T., Watson, K. L., Verrijzer, C. P., Goldman-Levi, R. and Zak, N. B. (1999). The trithorax group gene *moira* encodes a brahma-associated putative chromatin-remodeling factor in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **19**, 1159-70.
- Dallas, P. B., Cheney, I. W., Liao, D. W., Bowrin, V., Byam, W., Pacchione, S., Kobayashi, R., Yaciuk, P. and Moran, E. (1998). p300/CREB binding protein-related protein p270 is a component of mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 3596-603.
- Dallas, P. B., Pacchione, S., Wilsker, D., Bowrin, V., Kobayashi, R. and Moran, E. (2000). The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Mol Cell Biol* **20**, 3137-46.
- De Robertis, E. M., Morita, E. A. and Cho, K. W. (1991). Gradient fields and homeobox genes. *Development* **112**, 669-78.
- De Robertis, E. M., Oliver, G. and Wright, C. V. (1990). Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Sci Am* **263**, 46-52.
- Elfring, L. K., Daniel, C., Papoulas, O., Deuring, R., Sarte, M., Moseley, S., Beek, S. J., Waldrip, W. R., Daubresse, G., DePace, A. et al. (1998). Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* **148**, 251-65.
- Fry, C. J. and Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* **11**, R185-97.
- García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* **0**, 161-82.
- Geubhr, T. C., Bultman, S. J. and Magnuson, T. (2000). *Pc-G/trx-G* and the SWI/SNF connection: developmental gene regulation through chromatin remodeling. *Genesis* **26**, 189-97.

Gould, A. (1997). Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes. *Curr Opin Genet Dev* 7, 488-94.

Hanson, R. D., Hess, J. L., Yu, B. D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N. M., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., Seto, M. et al. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14372-7.

Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-6.

Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrotta, V. (2000). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* 20, 3187-97.

Hurlstone, A. F., Olave, I. A., Barker, N., van Noort, M. and Clevers, H. (2002). Cloning and characterization of hELD/OSA1, a novel BRG1 interacting protein. *Biochem J* 364, 255-64.

Iwahara, J. and Clubb, R. T. (1999). Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *Embo J* 18, 6084-94.

Iwahara, J., Iwahara, M., Daughdrill, G. W., Ford, J. and Clubb, R. T. (2002). The structure of the Dead ringer-DNA complex reveals how AT-rich interaction domains (ARIDs) recognize DNA. *Embo J* 21, 1197-209.

Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M. (1999). Cellular memory of transcriptional states by Polycomb-group proteins. *Semin Cell Dev Biol* 10, 227-35.

Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M. (2002). Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602, 151-61.

Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. and Verrijzer, C. P. (2000). The Drosophila brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* 14, 1058-71.

- Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Shiroishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K. and Higashinakagawa, T. (1998). Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* **393**, 688-92.
- Kennison, J. A. and Tamkun, J. W. (1988). Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8136-40.
- Klochender-Yeivin, A., Muchardt, C. and Yaniv, M. (2002). SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 73-9.
- Kortschak, R. D., Tucker, P. W. and Saint, R. (2000). ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci* **25**, 294-9.
- Kozmik, Z., Machon, O., Kralova, J., Kreslova, J., Paces, J. and Vlcek, C. (2001). Characterization of mammalian orthologues of the *Drosophila* *osa* gene: cDNA cloning, expression, chromosomal localization, and direct physical interaction with Brahma chromatin-remodeling complex. *Genomics* **73**, 140-8.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-87.
- Nie, Z., Xue, Y., Yang, D., Zhou, S., Deroo, B. J., Archer, T. K. and Wang, W. (2000). A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol Cell Biol* **20**, 8879-88.
- Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. and Paro, R. (1998). Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *Embo J* **17**, 5141-50.
- Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A. and Tamkun, J. W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**, 3955-66.
- Paro, R., Strutt, H. and Cavalli, G. (1998). Heritable chromatin states induced by the Polycomb and trithorax group genes. *Novartis Found Symp* **214**, 51-61; discussion 61-6, 104-13.
- Pirrotta, V. (1998). Polycomb-ing the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* **93**, 333-6.

Poux, S., Horard, B., Sigrist, C. J. and Pirrotta, V. (2002). The Drosophila trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* **129**, 2483-93.

Reyes, J. C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C. and Yaniv, M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J* **17**, 6979-91.

Schumacher, A. and Magnuson, T. (1997). Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet* **13**, 167-70.

Simon, J. A. and Tamkun, J. W. (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-8.

Treisman, J. E., Luk, A., Rubin, G. M. and Heberlein, U. (1997). eyelid antagonizes wingless signaling during Drosophila development and has homology to the Bright family of DNA-binding proteins. *Genes Dev* **11**, 1949-62.

van Lohuizen, M. (1998). Functional analysis of mouse Polycomb group genes. *Cell Mol Life Sci* **54**, 71-9.

van Lohuizen, M. (1999). The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 355-61.

Vazquez, M., Moore, L. and Kennison, J. A. (1999). The trithorax group gene osa encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* **126**, 733-42.