

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

LOS GENES *osa* DE RATON: CARACTERIZACION
MOLECULAR Y PATRON DE EXPRESION DURANTE EL
DESARROLLO EMBRIONARIO

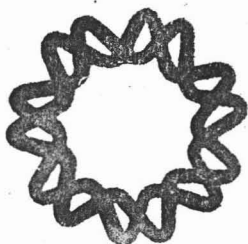
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOLOGO ANGEL FRANCISCO FLORES ALCANTAR



CUERNAVACA, MORELOS.

NOVIEMBRE 2005

M: 350679



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.

Esta tesis lleva una dedicatoria especial, puesto que es para muchas personas importantes en mi vida:

La primer Gran Persona a quien dedico esta tesis es mi Madre la Sra. Yolanda Alcantar Cortes, ya que sin su ayuda, consejos, paciencia y sobre todo Amor, esta tesis no hubiera sido posible. Ma' esta es nuestra segunda!, vamos por más, verdad!!

Otra persona importante en mi Vida y a quién también dedico mi trabajo es Ana Ibarra, esta tesis también es tuya Amor, Ana Mel Ur!

A mis cinco Hermanos, Victor, Elvira, Mary, Gaby y Adrián, con quienes he crecido y reído, además me enseñado muchas cosas de la vida.

Por supuesto, para mis sobrinos, todos y cada uno de ellos por llenarme de alegría con cada una de sus sonrisas y cariños, los quiero muchachos!!!

A una persona que me dejo a la mitad de este sendero, no porque haya querido sino porque así tenía que ser, para mi querido Amigo Edgar (Balan), quien más bien es un hermano para mí y que aunque no físicamente sigue estando y estará conmigo por siempre, Balan para ti, por darme hermandad en vida y por cuidarnos desde donde estés.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de seguir aprendiendo.

A mi jefa la Dra. Hilda Lomelí, por confiar en mí para desarrollar el proyecto, por tenerme paciencia y dejarme decidir.

A la Dra. Diana Escalante, por sus consejos y colaboraciones en desde el inicio de este proyecto y por darme una visión distinta de la Biología del Desarrollo.

Al Dr. Luis Manuel Gutiérrez Galindo, por ayudarme a lo largo de todo este tiempo y que siempre fue buen amigo y excelente crítico.

A mi comité tutorial, Dra. Martha Vázquez, Dra. Hilda Lomelí y el Dr. Roberto Stock por evaluarme objetivamente y darme parte de su tiempo durante mi maestría.

Al jurado evaluador: Dra. Susana Castro, Dr. Gustavo Pedraza, Dr. Iván Velazco, Dra. Diana Escalante y Dra. Hilda Lomelí, por sus objetivas opiniones durante la revisión de este trabajo.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, por los oligonucleótidos que nos fabricaron y la secuenciación de nuestras muestras.

Al I. Q. Virgilio Juárez por el apoyo técnico al inicio del proyecto.

A la M. en C. Laura Socorro Ramírez Angeles, por su valioso apoyo técnico en las hibridaciones y cortes de los embriones aquí presentado.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mi Maestría.

A la DGAPA y DGEP, por que parte de este proyecto fue apoyado por estas instituciones.

A mis compañeros nuevos y viejos del laboratorio: Dra. Lomelí, Dra. Vero Ramos, Dra. Denhí Schnabel, Dra. Escalante, Virk, Laurita, Toño, Dr. Enrique Salas, los nuevos Dra. Leda Torres, Jorge, Beto, Claudia, y los no tan nuevos, pero que emigraron la Pato y Louis; alguien que además de ser mi compañero del laboratorio es un gran amigo Héctor R. Magadan, Gracias Agachón!

A toda mi Familia, por apoyarme, animarme y aguatarme.

A Ana Ibarra, por compartir conmigo mi maestría, parte de nuestras vidas y más, mucho más, Gracias Princesa.

A todos mis Amigos, que a muchos de ellos no los veo frecuentemente pero sé que están en los momentos importantes. Gracias banda por darme su Amistad.

Ahora si!, quiero nombrar a todas las personas que de alguna forma han estado presentes para mí, empiezo con mi familia: Mi mamá Doña Yolanda!., Gracias por tu fuerza, nobleza, Amor, paciencia para cada uno de nosotros sus hijos.

A mis hermanos, que ya nombre, carnales Gracias!., Pa' gracias por todo el apoyo y las porras, Elvis gracias por tu cariño y las risas que me arrancas!, Mary gracias por ayudarme a mamá conmigo durante mi infancia, por los gritos y cortes de cabello, acuerdate, jejeje, Gaby gracias hermana por tu cariño, la ayuda hoy, ayer y siempre, gracias por los cuadernos, lapices, etc, con lo que nos ayudaste durante mi educación!, por supuesto a Adrián carnal gracias por preocuparte por mi, por apoyarme por cuidar a mamá, y pos los walkman, nintendo, tenis; bici etc...., pero sobretodo gracias a todos ustedes por ser mis hermanos y estar juntos!

A Ana Ibarra por compartir conmigo sonrisas y desasones, por el apoyo moral, economico, pero sobre todo por entrar en mi vida, Hace mucho nos buscabamos, quien iba a pensar que el internet y el rock me uniera a ti, TE AMO ANA.

A todos mis amigos, ustedes son mi otra familia; gracias por ser parte de ella, por las risas, buenos momentos y apoyo cuando lo necesitamos:

La FFF

Balan (Edgar), Fernando, Güero, Arturo, Henry, Neto, Yorks, Paty Daisy, Iván, el Gonzo, mis hijas - Yamil, Monica Karina-. Por crecer juntos.

Los CCHeros

Mauricio N. Gómora, Erick, Rogelio, el Shaq (Israel), por las risas y las buenas platicas que tenemos cada ves que los veo.

Los Warrior's

El Gabo Otero, Jorge Ordoñez, Ezequiel, Ergar, Aldo (Abuelo), Arturo (...), Sergio (Chucky), Leonardo (Diablo), Edgardo, Juanito y Lucy, Whaly, Kary, Tony, por ser muy buenos muchachos.

La Banda Cuervo

Blanchiurida, Davideño, Rick y Janet. A todos ustedes por su amistad, apoyo y orientación.

Los IBtescos

Héctor (Agachón), Paty, Javier (Guatus), Louis, El flaco, Chio, Soraya, Brenda, el pichón, Charys, por seguir juntos y no hartarnos de nosotros, a pesar de estar casi 12 horas al día viéndonos las caras.

Gracias a los que me faltaron! Y que me ayudaron sin que se hayan dado cuenta!

Sinceramente
Angel

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
<i>La herencia epigenética</i>	4
<i>Marcas epigenéticas</i>	5
<i>Metilación</i>	5
<i>Acetilación</i>	6
<i>Memoria Celular</i>	6
<i>Genes PcG y trxG y su función en el desarrollo embrionario.</i>	8
<i>PcG y trxG regulan a los genes homeóticos</i>	8
<i>Grupo Polycomb (PcG)</i>	11
<i>Grupo trithorax (trxG)</i>	12
<i>Complejo Brahma o SWI/SNF, BAP, BAF</i>	15
<i>Las subunidades del complejo BAF de ratón</i>	18
<i>osa es un gen trxG de D, melanogaster</i>	20
<i>Estructura molecular de osa/eyelid</i>	21
<u>ANTECEDENTES</u>	22
<i>Funciones y estructura molecular de osa-1 y osa-2 en humano</i>	23
<i>Osa-1 y osa-2 en ratón</i>	24
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	26
<u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	26
<u>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</u>	26
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	28
<i>Selección de clonas que contuvieran el inicio de osa-1 (PCR en colonia).</i>	28
<i>Construcción del vector de recombinación homologa dirigido a osa-1</i>	28
1. <i>Obtención de los brazos de recombinación de osa-1 (brazo 5' y brazo 3'), utilizando ensayos de PCR y clonación en el vector pCR[®] 2.1-TOPO[®].</i>	28
2. <i>Unión de los brazos de recombinación. Ligación del brazo 3' en pKS – brazo 5'.</i>	30
3. <i>Inserción del Marcador de Selección Positiva (SILZNF) en la construcción pKS – brazos 5' – 3'</i>	31
<i>Hibridación in situ de osa-1 y osa-2 en embriones de ratón.</i>	32
<i>Obtención y preparación de la sonda</i>	32
<i>Preparación de los embriones</i>	33
<i>Protocolo de hibridación in situ</i>	34
<u>RESULTADOS</u>	
<i>Los genes osa están conservados a en diferentes organismos</i>	38
<i>Vector de recombinación homóloga para osa-1</i>	40
<i>Obtención de los brazos de recombinación</i>	41
<i>Clonación de los brazos de recombinación de osa-1 (brazo 5' y brazo 3'), utilizando ensayos de PCR, en un vector de clonación (pCR[®] 2.1-TOPO[®]).</i>	42
<i>Unión de los brazos de recombinación</i>	45
<i>Inserción del Marcador de Selección Positiva (SILZNF) en la construcción pKS – brazos 5' – 3'.</i>	46
<i>Caracterización de líneas celulares de ES mutadas para los alelos osa-1, osa-2</i>	51
<i>Patrones de expresión de los genes osa-1 y osa-2 durante el desarrollo embrionario de ratón</i>	56
<i>Patrón de expresión de osa-1 en el desarrollo temprano de ratón.</i>	57
<i>Patrón de expresión de osa-2 durante el desarrollo temprano de desarrollo</i>	65

<u>DISCUSIÓN</u>	70
<i>Patrones de expresión de los genes osa-1 y osa-2</i>	70
<i>Comparación de los patrones de expresión de osa-1 y osa-2 con otras subunidades del complejo BAF</i>	73
<i>Perspectivas para la obtención de ratones mutantes para los genes osa</i>	76
<u>CONCLUSIONES</u>	79
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	81
<u>APENDICE 1</u>	87
<u>APENDICE 2</u>	88
<u>APENDICE 3</u>	89
<u>APENDICE 4</u>	90
<u>APENDICE 5</u>	91
<u>APENDICE 6</u>	101

ABREVIATURAS

HOX u HOM	Genes Homeóticos
<i>trxG</i>	Grupo trithorax
<i>PcG</i>	Grupo Policomb
HAT's-A	<i>Acetil – transferasas de histonas</i> Tipo A
Antp-C	Complejo Antennapedia
btx-C	Complejo bithorax
PRE/TRE	Secuencias de DNA para unión a proteínas <u>P</u> olycomb y <u>t</u> rithorax
PRC1	<u>C</u> omplejo <u>R</u> epresivo <u>P</u> olycomb 1 (Polycomb Repressive Complex 1)
ETP	Proteínas aumentadoras de la función de los genes <i>trithorax</i> y <i>Polycomb</i>
Brahma	Gene brahma
Brg1	Proteína relacionada a Brm (Brm related protein 1)
SWI/SNF	<u>S</u> WItching/ <u>S</u> ucrose <u>N</u> on- <u>F</u> ermeting
BAF	Factores asociados a <u>B</u> rm/ <u>B</u> rg1 (<u>B</u> rm/ <u>B</u> rg1 <u>A</u> ssociated <u>F</u> actors)
BAP	Proteínas asociadas a Brahma (<u>B</u> rm- <u>A</u> ssociated <u>P</u> roteins)
RSC	
PBAP	Asociación de la proteína Polybromo a BAP (Polybromo – associated BAP)
PBAF	Asociación de la proteína Polybromo a BAF (Polybromo – associated BAF)
ARID	Dominio protéico que interacciona con el DNA en regiones ricas en Adenina – Timina.
nt	nucleótidos
aa	aminoácidos
pb	pares de bases
kb	Kilobases
KDa	Kilo daltones
ES	Células embrionarias pluripotentes de ratón
UTR	Región del mRNA no traducida
BAC	Cromosoma Artificial de Bacteria
dpc	Días después del coito
MSP	Marcador de selección positiva
VRH	Vector de recombinación homóloga
SILZNF	Stop IRES Lac Z Flox Neo
IRES	Sitio Aceptor de Ribosoma
Neo	Gene de neomicina
β -Gal	gene β -galactosidasa
β -Geo	Fusión de los genes neo y β -Gal
EVA	Endodermo visceral anterior

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	10
Figura 2	14
Figura 3	15
Figura 4	21
Figura 5	39
Figura 6	41
Figura 7	42
Figura 8	45
Figura 9	46
Figura 10	50
Figura 11	52
Figura 12	54
Figura 13	56
Figura 14	57
Figura 15	58
Figura 16	61
Figura 17	63
Figura 18	64
Figura 19	65
Figura 20	66
Figura 21	68
Figura 22	75

LOS GENES *osa* DE RATÓN: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PATRÓN DE EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

RESUMEN

Debido a la importancia de los genes homeóticos (HOM o HOX) en la embriogénesis, ha habido gran interés en entender como se regula su expresión. En *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que en el mantenimiento de la expresión de los HOM participan complejos protéicos que son capaces de reordenar la cromatina. Uno de ellos conocido como el complejo Brahma en la mosca (SWI/SNF en levadura y BAF en mamífero) ha sido extensamente estudiado desde el punto genético. De esta manera se definió que un componente importante del complejo Brahma es el gen *osa*, que codifica para una subunidad regulatoria. Mutantes de *Drosophila* para este gen, presentan alteraciones en la expresión de los genes HOM y afecciones severas en el desarrollo temprano (Treisman et al. 1997; Vazquez et al. 1999).

En mamíferos se han identificado proteínas homólogas de los factores que regulan a los genes HOX, entre ellos, algunos que pertenecen al complejo Brahma. Previamente identificamos a los genes *osa* de ratón en su genoma (*osa-1* y *osa-2*) a partir de bases de datos, clonamos fragmentos parciales de cDNA y regiones genómicas de *osa-1*. En el presente trabajo se utilizaron clonas genómicas para construir un vector de recombinación homóloga, con el objetivo de generar células troncales embrionarias de ratón (ES) con un alelo nulo del gen *osa-1*. Paralelamente clonamos fragmentos parciales de los genes *osa-1* y *osa-2*, para utilizarlos como

ribosondas en ensayos de hibridación “in situ” en distintos estadios de la embriogénesis, para determinar los patrones de expresión de ambos genes a lo largo del desarrollo. Para el caso de *osa-1*, se utilizaron ribosondas que distinguen isoformas producidas por “splicing” alternativo, se identificó la isoforma que se presenta en mayor cantidad desde etapas tempranas, y encontramos que las dos isoformas tienen patrones de expresión muy similares. Por su parte, *osa-2* presentó un patrón de expresión débil y restringido a algunos tejidos, principalmente al tejido neural durante el desarrollo temprano. Otro último aspecto en el que trabajamos fue en la expansión e identificación molecular de líneas celulares de ES que presentan inserciones del transgene β -Geo en los genes *osa* de ratón, interrumpiendo su expresión. Al momento contamos con una línea mutada de *osa-1*, en donde verificamos con ensayos de RT-PCR que hay un inserto exógeno que interrumpe la expresión de este gene y comprobamos que en su lugar se expresa el reportero β -galactosidasa. El trabajo realizado a lo largo de este proyecto nos provee de diversas herramientas que hacen posible el estudio funcional de los genes *osa* de ratón de manera inmediata.

INTRODUCCIÓN

La Genética, como ciencia que estudia la transmisión, origen y expresión, de las características de los organismos de una generación a otra, surgió con el redescubrimiento de las *leyes de Mendel*, por H. de Vries, K. Correns y E. von Tschermak, que junto con aportaciones de investigadores como C. Nägeli, Van Beneden, T. Boveri y F. Miescher, T. H. Morgan a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, aportaron los cimientos de esta ciencia, concluyendo que: (1) el material genético se encontraba en el núcleo celular, (2) el material genético era una “sustancia ácida rica en fósforo”, (3) los factores hereditarios o genes eran la unidad básica de la herencia (tanto funcional como estructuralmente) y (4) éstos se encuentran ordenados linealmente en los cromosomas como perlas en un collar. La identificación de la sustancia o material hereditario como DNA no se produjo sino hasta 1944 cuando Avery, MacLeod y McCarty identificaron al ácido desoxirribonucleico como el *principio transformante* de Griffith (1928) en el fenómeno de *transformación bacteriana*. Posteriormente A. Hershey y M. Chase confirmaron el papel genético del DNA por estudios de infección viral (con el bacteriófago T2) en *E. coli*, concluyendo que solo el DNA del fago puede propagar la infección y no sus proteínas. En el año de 1953 J. Watson y F. Crick apoyados en datos de otros investigadores, dilucidaron la estructura del DNA, describiéndola como una doble hélice con giro hacia la derecha, cuyo esqueleto consta de azúcar (desoxirribosa) – fosfato, con bases púricas (Adenina y Guanina) y pirimídicas (Timina y Citosina), que se apareaban por medio de puentes de H ($A = T$ y $C \equiv G$). En los últimos 50 años se ha avanzado de forma considerable en el estudio de la transmisión de información genética tanto en estructura, función, regulación, etc. De esta manera, a finales del siglo XIX se definió que el DNA esta

embebido dentro de una matriz protéica llamada cromatina, cuyas funciones son compactar el genoma eucariótico dentro del núcleo celular (revisado en Cavalli 2002; Grewal y Elgin 2002; Grewal y Moazed 2003), además de influir en los patrones y niveles de expresión génica (Turner 2002; Jackson 2003).

La unidad básica de empaquetamiento de la cromatina es el nucleosoma, que es un complejo protéico de ocho subunidades llamadas Histonas (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 y 2 H4), que empaqueta entre de 146 – 167 pb de DNA, (Muchardt y Yaniv 1999; Turner 2002; Elgin y Grewal 2003; Grewal y Moazed 2003). Dentro de la cromatina se reconocen dos regiones de acuerdo al nivel de empaquetamiento, la eucromatina que son zonas del genoma accesibles a factores de transcripción y que son transcripcionalmente activas (Grewal y Moazed 2003), y la heterocromatina, referida como dominios cromatínicos densamente empaquetados y que generalmente son inaccesibles a factores reguladores, así como a la maquinaria basal de la transcripción (Mahmoudi y Verrijzer 2001; Cavalli 2002; Grewal y Moazed 2003).

La herencia epigenética

La *epigénesis*, fue definida por C. Waddington en los años 40's como el estudio de las relaciones fenotipo – genotipo, (Wu y Morris 2001; Cavalli 2002). Actualmente se llama *herencia epigenética* a las alteraciones en el genoma de un organismo sin que ocurran cambios en la secuencia de DNA y que se heredan a través de divisiones celulares (Cavalli C. 2002).

La herencia epigenética es regulada en diversos procesos como en el “mating type” que se lleva a cabo en levadura, o el efecto posicional de variegación,

“imprinting” gamético e inactivación de cromosoma X en mamíferos (Brock y Fisher 2005). Los mecanismos para que se puedan llevar a cabo los fenómenos epigenéticos incluyen modificaciones covalentes de las histonas nucleosómicas como: metilaciones en los residuos de lisinas y argininas (K y R respectivamente), acetilaciones en los residuos de lisina, fosforilaciones en los residuos de serina (S) y ubiquitinaciones, además de modificaciones de bases nucleotídicas como metilaciones y la acción de complejos remodeladores de la cromatina, de las cuales se hablará más adelante (Muchardt y Yaniv 1999; Grewal y Elgin 2002; Holliday y Ho 2002; Narlikar, Fan et al. 2002; Turner 2002; Elgin y Grewal 2003; Grewal y Moazed 2003).

Marcas epigenéticas

Metilación

Este tipo de modificación la catalizan enzimas llamadas metil – transferasas que pueden modificar al DNA o al nucleosoma. Las metil – transferasas de DNA reconocen y modifican los dobletes CpG y los tripletes CpNpG, lo que se ha asociado al silenciamiento génico porque facilita al empaquetamiento de la heterocromatina (Holliday y Ho 2002; Elgin y Grewal 2003; Grewal y Moazed 2003).

Otro tipo de metil – transferasas modifican las regiones N – terminal de las histonas, estas metilaciones pueden intervenir tanto en el mantenimiento del estado activo como represivo de la transcripción. Las metilaciones de los residuos K4 y K9 de H3 y/o K20 de H4 (hechas por las metil – transferasas como TRX y ASH1), promueven el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina para mantener activa la expresión de genes (Turner 2002; Brock y Fisher 2005). Otras metil – transferasas ayudan en el mantenimiento del estado reprimido de la transcripción,

por ejemplo las enzimas que metilan los residuos K9 y K27 de H3 [como las metil – transferasas E(z), Su(var)3-9], que conllevan el reclutamiento de complejos proteicos que condensan el DNA, evitando el acceso a la maquinaria basal de la transcripción (Cavalli 2002; Turner 2002; Elgin y Grewal 2003; Brock y Fisher 2005).

Acetilación

Los dominios de eucromatina están altamente acetilados a diferencia de dominios heterocromáticos que carecen de esta modificación, por lo que generalmente la acetilación se asocia a la activación transcripcional (Grant y Berger 1999). Se propone que la acetilación disminuye el contacto internucleosomal, evitando la compactación de la cromatina, de esta manera se produce un DNA más laxo para iniciar procesos como la transcripción. La acetilación se lleva a cabo en los extremos N – terminal de las histonas, por las enzimas Acetil – transferasas de histonas Tipo A¹(HAT's-A) (Tse et al. 1998; Grant y Berger 1999; Narlikar et al. 2002). Entre las que se encuentran Gcn5 (Kuo et al. 1996), p300/CBP (Ogryzko et al. 1996), PCAF (Xu et al. 1998) y TAF 250, (Mizzen et al. 1996).

Memoria Celular

Las marcas epigenéticas funcionan como un código que ayuda en el mantenimiento de los estados cromatínicos a través de las divisiones celulares; es decir, forman parte de una *memoria celular* que permite conservar un estado transcripcionalmente activo o inactivo (Simon y Tamkun 2002; Turner 2002). Teniendo como base que los nucleosomas modificados son heredados al azar en las cromátidas hermanas después de la división celular, y estos coexisten con nucleosomas

¹ Cuya ubicación es nuclear (Grant P.A. y S. L. Berger, 1999).

no marcados (ya que vienen con el DNA recién replicado), se propone un *mecanismo de memoria celular* que evita la pérdida de marcas epigenéticas², y por tanto desregulación génica. Este mecanismo utiliza a los nucleosomas previamente modificados como marcas de anclaje para los complejos protéicos modificadores (como metil – transferasas o acetil – transferasas, incluso complejos remodeladores de la cromatina), los cuales reestablecen los estados cromatínicos iniciales (activo o inactivo), realizando las modificaciones covalentes en los nucleosomas sin marcar, iguales a las modificaciones de los nucleosomas vecinos. De esta manera se restablecen las marcas epigenéticas previas y se puede conservar el estado activo o inactivo de los genes (Brock y Fisher 2005).

Las enzimas que generan diferentes marcas epigenéticas pueden formar complejos entre ellas durante la regulación específica de genes, por ejemplo el complejo TAC1 de *Drosophila melanogaster* contiene una metil – transferasa de histonas llamada TRX, una HAT-A llamada CREB binding protein (p300/CBP), además de una fosfatasa llamada Sbf1. Se sabe que la HAT – A p300/CBP es un coactivador transcripcional y también puede interactuar con ASH1 (otra metil – transferasa), en ambos ejemplos dichas interacciones son importantes durante la activación transcripcional de genes en *D. melanogaster* (Petruk et al. 2001).

La *memoria celular* tiene un papel esencial durante diversos procesos donde la activación o represión génica puede ser transitoria, pero la decisión resultante en la identidad celular o la diferenciación perdura a lo largo de la vida del organismo, por ejemplo durante el desarrollo embrionario (en la regulación de los genes homeóticos –

² Tanto las acetilaciones como las metilaciones de extremos N – terminal de histonas se heredan establemente a través de procesos como meiosis y mitosis, para mantener o reprimir la transcripción (Cavalli G y Paro R 1998; Cavalli G y Paro R 1999).

HOM o HOX), así como en el crecimiento de algún tejido (van Lohuizen 1999; Simon y Tamkun 2002). Dicho mecanismo no solo depende de marcas epigenéticas, también necesita de complejos multiprotéicos que pueden regular la expresión génica a través de la remodelación de la cromatina. De éstos, los más estudiados son los complejos formados por las proteínas del grupo *Polycomb* (*PcG*) y del grupo *trithorax* (*trxG*), que se identificaron inicialmente en *D. melanogaster* como reguladores de la expresión de los genes homeóticos, pero se sabe que tienen un papel global en la regulación de la transcripción (Jacobs y van Lohuizen 1999; van Lohuizen 1999; Cavalli 2002).

Genes PcG y trxG y su función en el desarrollo embrionario.

PcG y trxG regulan a los genes homeóticos

Los genes homeóticos (*HOM* o *HOX*) o selectores homeóticos fueron identificados inicialmente en *D. melanogaster* por Lewis, Gehring y McGinnis (García-Bellido 1975; Biggin y McGinnis 1997), y subdividen al embrión temprano en campos celulares con potencial para transformarse en órganos y tejidos específicos. Cuando los genes *HOM* se expresan incorrectamente ocurren transformaciones de identidad de un segmento en otro, por ejemplo moscas mutantes en el gene *Ultrabithorax* tienen dos pares de alas en lugar de uno o las mutantes en el gene *Antennapedia*, cuya transformación consiste en poseer un par de patas en lugar de antenas (De Robertis et al. 1990; De Robertis et al. 1991; Biggin y McGinnis 1997). En la mosca se conocen dos complejos de genes *HOM*, el complejo *Antennapedia* (*Antp-C*)³, que especifica los segmentos de la cabeza y tórax (primer y segundo

³ Que contiene a los genes: *Labial* (*lab*), *Probocipedia* (*Pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex comb reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Ant*)

segmentos torácicos) y el complejo *bithorax* (*btx-C*)⁴ que especifica la identidad del tercer segmento torácico y los segmentos del abdomen. (Fig. 1; De Robertis et al. 1990). Estos genes presentan un dominio funcional de aprox. 60 residuos de aminoácidos que interactúa con el DNA, llamado homeodominio (De Robertis et al. 1990; De Robertis et al. 1991). Utilizando al homeodominio como sonda, se han identificado 39 genes *HOM* en mamífero, que se agrupan en cuatro distintos locus génicos, los complejos *Hox - A*, *- B*, *- C* y *-D*, tienen una longitud de 120 Kb cada uno y al igual que en mosca conservan el orden colineal de acuerdo al lugar donde se expresan a lo largo del eje rostro – caudal (antero – posterior, Fig. 1; Duboule y Dolle 1989; McGinnis y Krumlauf 1992; Duboule y Morata 1994; Zeltser et al. 1996). La comparación de las secuencias de estos genes, los agrupan en 13 grupos altamente relacionados, lo que sugiere un evento de duplicación génica del complejo homeótico ancestral (De Robertis et al. 1990; Biggin y McGinnis 1997; Favier y Dolle 1997).

Dado el papel que desempeñan los genes *HOM* o *HOX* en el desarrollo embrionario, se han estudiado ampliamente los mecanismos que establecen y mantienen sus patrones de expresión, con el objetivo de entender la embriogénesis. El modelo más estudiado en la regulación de los genes homeóticos es la mosca de la fruta, en donde el patrón de expresión inicial, es regulado por los genes de segmentación⁵. Como la acción regulatoria de los genes de segmentación es transitoria se necesitan los genes del grupo *trxG* para mantener activa la transcripción y los genes

⁴ Compuesto de tres genes: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) y *abdominal B* (*abdB*)

⁵ Dentro de estos genes, se encuentran los genes *pair - rule*, que se asocian a la activación y los genes *gap* a la represión transcripcional de los genes Homeóticos (Gilbert 2003; Mahmoudi y Verrijzer, 2001)

del grupo *PcG* para reprimirlos (Schumacher y Magnuson 1997; van Lohuizen 1999; Mahmoudi y Verrijzer 2001; Simon y Tamkun 2002; Cavalli 2002).

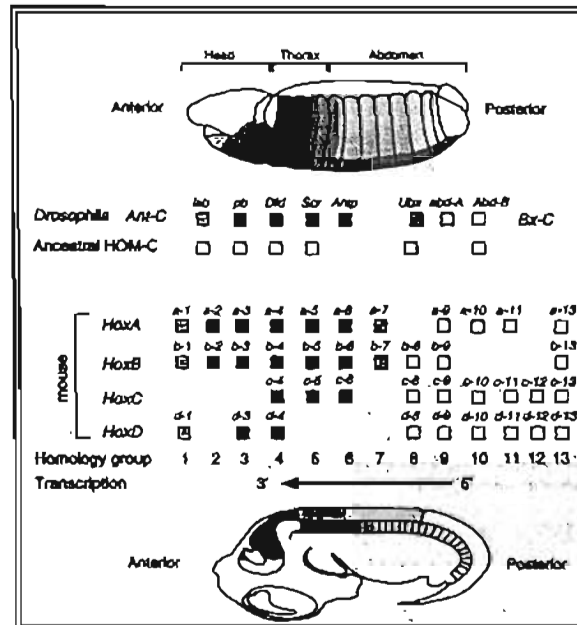


Fig. 1. Complejos homeóticos de *D. melanogaster* y ratón en donde se muestra el patrón de expresión de acuerdo al orden en el cromosoma. La figura ilustra en cuadros del mismo color los genes homólogos entre *D. melanogaster* y ratón (Favier y Dolle 1997).

Ambos grupos de genes forman complejos multiprotéicos que se ligan a elementos regulatorios de DNA específicos a lo largo del genoma llamados PRE/TRE (Polycomb / Trithorax Response Element). Estos elementos regulatorios van desde 100 pares de bases hasta algunas kilobases, se pueden encontrar cerca o lejos del promotor o incluidos en algunos intrones (Ringrose y Paro 2004; Brock y Fisher 2005). Los PRE/TRE son reconocidos por miembros de *PcG* o *trxG* para poder activar o reprimir la expresión génica. Recientes investigaciones indican que hay una gran conservación evolutiva en la regulación de los genes homeóticos mediada por los miembros *PcG* y *trxG* entre mosca y mamífero, aunado a que se han descrito muchos genes de mamífero que presentan homología con miembros *PcG* o *trxG* de *D. melanogaster* (Schumacher y Magnuson 1997).

Grupo Polycomb (PcG)

Los miembros del grupo PcG regulan negativamente a los genes *HOX* en *D. melanogaster*. Es decir, mutantes en genes PcG presentan cambios en la identidad de los segmentos consistentes con la desrepresión de genes HOM (revisado en Papoulas, et al., 1998; Faucheux, et al., 2003), por ejemplo en la mutante *Polycomb (Pc)*, se desreprime al gene *Scr* en el segundo y tercer segmentos, por tanto el segundo y tercer par de patas de la mosca, adquiere la identidad del primer par de patas y aparecen peines sexuales adicionales (Pattatuci y Kaufman 1991).

Se han purificado al menos dos complejos PcG en embriones de mosca, cuya actividad se lleva a cabo mediante interacciones proteína – proteína. El complejo formado por las proteínas Enhancer of Zeste (E(Z)) y el llamado Extra Sex Comb (ESC), que interviene en la iniciación del estado represivo por genes PcG y el complejo de mantenimiento PRC1⁶ (Polycomb Repressive Complex 1)(van Lohuizen 1999; Mahmoudi y Verrijzer 2001; Simon y Tamkun 2002).

Se sabe que el complejo E(Z) – ESC metila el residuo K27 de H3 en la región PRE, reclutando así al complejo PRC1 y generando un estado represivo estable (Jacobs y van Lohuizen 1999; Gebuhr et al. 2000).

En ratón se han caracterizado algunos genes PcG mediante el estudio de mutantes nulas (“knock out”); algunas de ellas son letales cuando son homocigotas, ya sea durante el desarrollo embrionario o en ratones neonatos, además presentan transformaciones homeóticas posteriores a lo largo del eje axial. Por ejemplo, las mutantes en los genes *Bmil* (*Psc* de mosca) y *M33* (*Pc* de mosca), producen

⁶ Integrado por los productos proteicos de los genes *Polycomb (Pc)*, *Polyhomeotic (PH)*, *Posterior sex combs (Psc)* y *Sex combs on midleg (Scm)* (Gebuhr et al. 2000; Simon y Tamkun 2002).

transformaciones del esqueleto axial, malformaciones del esternón por desregulación en la expresión de genes *HOM* y los ratones homocigotos mueren en la etapa neonatal. Estos fenotipos comprueban que genes *PcG* de mamífero además de regular a los genes *HOM*, puede regular otros grupos génicos debido a su letalidad (Schumacher y Magnuson 1997).

Grupo trithorax (trxG)

Las mutantes en genes *trxG* en *Drosophila*, presentan transformaciones anteriores en regiones abdominales, como resultado de una reducción en la expresión de genes homeóticos (Papoulas et al. 1998; Faucheux et al. 2003). Por ejemplo, en mutantes del gene *trx* no hay expresión del gene *Ubx*, ocurriendo una transformación de haltéreo a ala (Ingham 1985). Dentro de este grupo de genes, se encuentran subunidades de complejos protéicos que pueden remodelar la cromatina (*brama*, *moira* y *osa*; Kennison y Tamkun 1988; Simon y Tamkun, 2002). Estos genes son requeridos en la embriogénesis temprana y a través del desarrollo para mantener la expresión de genes homeóticos y otros genes (Mahmoudi y Verrijzer 2001). Aunque los genes del grupo *trxG* se ha asociado al mantenimiento del estado activo de genes, pueden ejercer otras funciones, por ejemplo durante la regulación del ciclo celular en mamíferos, donde el complejo SWI/SNF (al que nos referiremos más adelante), interactúa con la proteína supresora de tumores Retinoblastoma (Rb) durante la represión del gene de *E2F1*⁷ (Trouche et al. 1997).

En extractos de embrión de mosca se han identificado cuatro distintos complejos *trxG*, el complejo ASH1 de 2MDa; el complejo ASH2 de 500kDa; el

⁷ Es un gen que promueve la progresión del ciclo celular

complejo TRX 1MDa y el complejo Brahma de aproximadamente 2MDa (también llamado SWI/SNF; Papoulas et al., 1998; Simon y Tamkun, 2002).

El complejo Brahma/ SWI/SNF puede remodelar la cromatina por medio de la hidrólisis de ATP. Este complejo está formado por una subunidad catalítica esencial que contiene un dominio de ATPasa, regiones de homología a helicasa y un bromodominio⁸ (Marmorstein 2001; Lusser y Kadonaga 2003); se encuentra conservado a través de la evolución, desde levadura hasta mamíferos presentando subunidades homólogas. En levadura la ATPasa del complejo BRAHMA/ SWI/SNF es llamada *swi2/snf2*, en mosca esta subunidad recibe el nombre de *brahma* y en mamíferos se conocen dos ATPasas, BRM y BRG1.

El complejo BRM/ SWI/SNF también posee otras subunidades esenciales, es decir un núcleo protéico⁹ necesario para que el complejo presente actividad remodeladora; así como subunidades accesorias, que regulan y especifican los genes blanco (Tabla 1; Elfring et al. 1998; Crosby et al. 1999; Phelan et al. 1999; Kal et al. 2000).

Se han propuesto cuatro hipótesis sobre la forma en que Brahma/ SWI/SNF puede modificar la cromatina en la activación de la transcripción: (1) el deslizamiento del DNA nucleosomal en la superficie de las histonas; (2) movimientos del octámero de histonas en *cis* y en *trans*, así como el cambio conformacional del mismo; (3) la disociación del nucleosoma del DNA y, (4) el reemplazamiento de histonas por variantes de las mismas (Fig. 2). Es importante mencionar que el complejo BRAHMA/

⁸ Estas regiones pueden servir para interaccionar con DNA en el caso del dominio de helicasa. Se sabe que el bromodominio puede intervenir en la interacción con proteínas, así como en el reconocimiento de histonas acetiladas.

⁹ Definido por las proteínas INI1/BAF155, BAF15, BAF170 y la ATPasa BRG1 o BRM en mamífero (Phelan et al. 1999).

SWI/SNF y los otros complejos que remodelan cromatina trabajan en conjunción con otros factores, como chaperonas de histonas y otras enzimas que también las pueden modificar (como metil – transferasas de DNA; Muchardt y Yaniv 1999; Fry y Peterson 2001; Narlikar et al. 2002; Mohrmann y Verrijzer 2005).

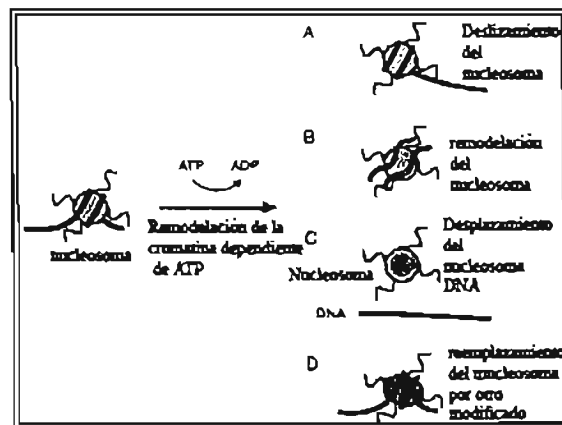


Fig. 2 Se muestran los modelos en que el complejo SWI/SNF puede modificar la cromatina durante la activación de la transcripción. A) Modelo de deslizamiento. B) Modelo del cambio de conformación del nucleosoma. C) Desplazamiento de nucleosoma del DNA. D) cambio de histonas por otras modificadas (Mohrmann y Verrijzer 2005).

Los genes *trxG* pertenecientes al complejo BRAHMA se caracterizaron como supresores de mutantes en genes *PcG*, ya que pueden actuar como activadores en la expresión de genes homeóticos (Tamkun et al. 1992; Kennison 1995). Se han propuesto modelos para explicar como los complejos del grupo *trxG* y *PcG* pueden regular la expresión de genes (Fig. 3). En estos modelos se propone que proteínas aumentadoras de la función de genes del grupos *trxG* y/o *PcG* (*ETP*'s) pueden ligarse a secuencias de DNA para reclutar a dichos complejos remodeladores ya sea interaccionando con ellos o modificando covalentemente a los nucleosomas para que los complejos puedan activar o reprimir a sus genes blancos (Fig. 3a).

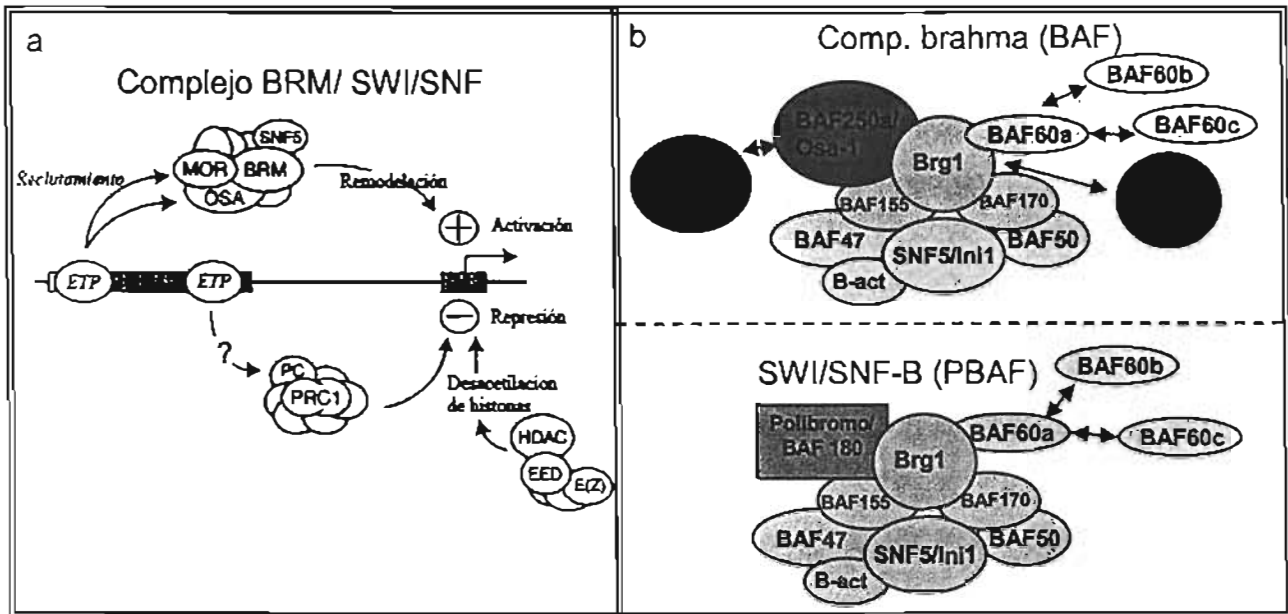


Fig. 3. (a) Modelos de activación y represión génica a través de complejos proteicos *trxG* y *PcG*, mediados por ETP's (Enhancer of trithorax and Polycomb proteins). En la parte superior se representa la activación de genes por el complejo BRAHMA/SWI/SNF y en la parte inferior se representa la represión génica mediada por el complejo PRC1 y E(Z)-ESC (imagen modificada de Mahmoudi y Verrijzer 2001); (b) Esquemas que representan los dos complejos homólogos conservados desde mosca hasta mamíferos, BAF (arriba) y PBAF (abajo), se resaltan las subunidades que les dan identidad a estos complejos (Modificada de Martens y Winston, 2003)

Complejo Brahma o SWI/SNF, BAP, BAF

El complejo BRAHMA/ SWI/SNF se presenta en formas variables dependiendo de la ATPasa que se encuentre asociada, así como la presencia o ausencia de subunidades accesorias. En función de ello se pueden distinguir dos principales asociaciones multiprotéicas: las que incluyen al complejo SWI/SNF en levadura, que está altamente relacionado con los llamados BRAHMA o BAP (Brm-Associated Proteins) de mosca y el complejo BAF (Brm/Brg1 Associated Factors) de mamífero; y otro que se conoce como RSC en levadura y se relaciona al complejo PBAP (Polybromo – associated BAP) de mosca y PBAF (Polybromo – associated BAF) de mamífero (Tabla 1; Nie et al. 2000; Xue et al. 2000; Nie et al. 2003; Mohrmann et al. 2004). Dado que la diversidad de nombres que existen para los complejos SWI/SNF crea confusión, en este trabajo se llamara complejo BAF a los complejos BRAHMA/

SWI/SNF/ BAP/ BAF cuya relación es estrecha; y complejo PBAF a los complejos RSC/ PBAP/ PBAF independientemente del organismo que se trate (Fig. 3b).

Se ha visto que BAF y PBAF participan en distintas funciones desde levadura hasta mamífero. Por ejemplo, se sabe que PBAF de levadura es importante para viabilidad celular; es muy abundante y está implicado tanto en la cohesión de cromátidas hermanas como en la segregación cromosomal; además, no hay solapamiento entre los blancos de este complejo con los del complejo BAF (Wong et al. 2002; Baetz et al. 2004; Huang et al. 2004). En cambio, el complejo BAF de *S. cerevisiae* se identificó por dos distintos esquemas de selección: en uno de ellos se caracterizaban genes que intervinieran en el “mating-type” (SWitching); y en otro se buscaban mutantes que no pudieran crecer en medio con sucrosa (Sucrose Non-Fermenting). Posteriormente se descubrió que estos genes eran parte de un mismo complejo multiprotéico, al que en adelante se llamó SWI/SNF (revisado en Roberts y Orkin, 2004). A diferencia de PBAF, el complejo BAF no es necesario para viabilidad celular y se sabe que interviene en la regulación de genes mitóticos que ayudan en la salida de la división celular (Krebs et al. 2000).

Tabla 1. Complejos BAF y PBAF conservados desde levadura hasta mamíferos. Se enlistan las proteínas que se han descrito en cada complejo por diversos autores, las columnas negras son complejos homólogos SWI/SNF/Brahma/BAF, las columnas en gris RSC/PBAP/PBAF (tabla modificada de Martens y Winston 2003; Roberts y Orkin 2004; Mohrmann y Verrijzer 2005).

<u>LEVADURA</u>		<u>MOSCA</u>		<u>HUMANO</u>		
<i>SWI/SNF</i>	<i>RSC</i>	<i>Brahma</i>	<i>PBAP</i>	<i>BAF</i>	<i>PBAF</i>	
Swi2/Snf2	Sth1	BRM	BRM	BRG1 o BRM	BRG1	ATPasa
Snf5	Sth1	SNR1	SNR1	SNF5/INI1	SNF5/INI1	
Swi3	Rsc8	BAP155/Moira	BAP155/Moira	BAF155/Srg3	BAF155/Srg3	
Swp73/Snf12	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a BAF60b	BAF60a	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polibromo		Polibromo BAF180	Exclusiva del complejo PBAF
Swi1		OSA		BAF250/ p270 y hELD/ OSA1		Proteína exclusiva del complejo BAF
	Rsc9				BAP170	
Snf1						
Snf6						
Arp9	Arp9	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53	
Arp7	Arp7	BAP47/ ACT1/2	BAP47/ ACT1/2	β -Actina	β -Actina	
Swp82						
		BAP111	BAP111	BAF57		
		BAP74				

Los complejos BAF y PBAF tienen subunidades homólogas que se observan en la tabla 1, pero existen subunidades exclusivas para cada complejo que los definen, desde levadura hasta mamífero. Por ejemplo, en levadura existen dos ATPasas, la *swi2/snf2* para el complejo BAF y la ATPasa *Sth1* para el complejo PBAF; en mosca solo existe *brahma* (*brm*) como subunidad catalítica para ambos complejos (Mohrmann et al. 2004); en mamífero se sabe que las ATPasas hBRM y BRG1, que pueden interactuar con el complejo BAF. En cambio, la ATPasa para el complejo PBAF solo puede interaccionar la ATPasa BRG1 (Klochendler-Yeivin et al. 2002; Martens y Winston 2003; Mohrmann et al. 2004; Mohrmann y Verrijzer 2005). Por otra parte como se muestra en la tabla 1, el complejo BAF adquiere su identidad por la presencia de la proteína SWI1/OSA/BAF250 – p270 desde levadura hasta mamífero y es la proteína que nos ocupa en este trabajo (Fig. 3b).

Las subunidades del complejo BAF de ratón

Aunque el complejo BAF fue identificado como activador transcripcional, se ha demostrado que también está involucrado en eventos de represión, ya que al mutarse algunas de sus subunidades en ratón, como SNF5 y BRG1 generan fenotipos que inducen susceptibilidad a cáncer, puesto que se desreprimen genes del ciclo celular (anteriormente se mencionó el papel del complejo SWI/SNF – BAF –, en la represión de genes de progresión del ciclo celular; Muchardt y Yaniv 1999a; Muchardt y Yaniv 1999b; Martens y Winston 2003; Roberts y Orkin 2004). En los últimos años muchos investigadores se han dedicado a estudiar el papel de las subunidades que forman parte del complejo BAF utilizando principalmente inactivación de los genes por medio del “gene targeting”. A continuación se describen sus fenotipos.

El ratón mutante de la ATPasa BRG1 es letal en estado de preimplantación y los heterocigotos presentan susceptibilidad a cáncer, desarrollando tumores epiteliales, además el 15% de éstos muestran excencefalia (Bultman et al. 2000). Se sabe que su expresión durante el desarrollo embrionario es generalizada durante etapas tempranas, pero conforme avanza el desarrollo se observa una expresión fuerte en la médula espinal, cerebro, columna vertebral y retina (Randazzo et al. 1994). La mutante nula del gene *mBRM* es viable, la expresión de este gene es entre 20 y 30 veces menor durante el desarrollo temprano que la expresión de *brg1*, por tanto el ratón *brm*^{-/-} vive gracias a la complementación de función por *brg1*. El fenotipo observable de *brm*^{-/-} se presenta en adulto como un incremento en la proliferación celular de algunos órganos como hígado, corazón, y bazo, sugiriendo que este gen interviene en la regulación del ciclo celular (Reyes et al. 1998). La mutación de *BAF155/Srg3* (*moira* de mosca), muestra letalidad en ratones homocigotos en estadios de preimplantación y en forma

heteróciga 20% de los ratones muestran defectos en la formación del cerebro, el patrón de expresión de este gene sobrelapa con el patrón de BRG1, pero esta distribuido más ubicuamente (Kim et al. 2001).

Los ratones *SNF5/INI1*^{-/-} son letales en el desarrollo temprano; entre el 15 – 30% de los ratones heterocigotos desarrollan tumores en sistema nervioso y sarcomas epiteliales con características de tejido rabdoide¹⁰. Se ha visto que este tipo de tumores se pueden encontrar en riñón, hígado, intestino y sistema nervioso central, además de intervenir en leucemias mieloides crónicas. SNF5/INI1 se expresa principalmente en el sistema nervioso y en los arcos braquiales, con un muy baja expresión en el corazón (Klochendler-Yeivin et al. 2000; Roberts et al. 2000). Recientemente se definió el papel de BAF60c (otro componente de los complejo BAF y PBAF) en el desarrollo del corazón, describiendo su expresión en este órgano, y demostrando que interviene en la interacción entre factores cardíacos de transcripción y el complejo remodelador durante la activación genética (Lickert et al. 2004). Hasta el momento, las subunidades mencionadas son las que se han caracterizado del complejo BAF en ratón, pero un miembro importante del complejo es la subunidad OSA, que como se mencionó se encuentra exclusivamente en los complejos BAF y ha recibido distintos nombres dependiendo del organismo (Tabla 2). Osa no ha sido caracterizada funcionalmente en ratón, pero si en mosca y el líneas celulares tumorales de humano.

¹⁰ Es una neoplasia altamente agresiva, con células semejanado rbdomioblastos, ovoides o redondas, con un núcleo excéntrico y un citoplasma eosinófilo que en ultraestructura muestra filamentos intermedios dispuestos en forma enrollada (Beckwith y Palmer 1978).

osa es un gen *trxG* de *D. melanogaster*

osa fue identificada en *D. melanogaster* como un gen *trxG*, ya que puede suprimir fenotipos *PcG* (Kennison y Tamkun 1988). Posteriormente se caracterizó como *eyelid* (*osa/eyelid* para mosca) por Treisman y col. como un factor de transcripción que puede antagonizar la vía de señalización de *wingless* (*wg*), puesto que los fenotipos mutantes de *osa/eyelid* son opuestos a los causados por las mutantes en *wg* (Treisman et al. 1997). Ahora se sabe que *osa/eyelid* antagoniza la vía de señalización de *wg* interaccionando genéticamente con *brm* y reprimiendo los genes blanco de *wg* (Collins y Treisman 2000). Vázquez y col. reportaron que *osa/eyelid* puede interactuar con *brm* en la regulación de la expresión del promotor 2 de *Antennapedia*, además de que podría regular otros genes (no homeóticos), porque el fenotipo nulo y sin contribución maternal es letal y causa severos defectos en la segmentación (Vazquez et al. 1999). Es importante mencionar que *osa/eyelid* es parte del complejo BAF de mosca, pero no de manera constitutiva, ya que se puede localizar este complejo sin que esté presente *osa/eyelid*, por tanto se sugiere que este gene es una subunidad accesoria que modula la función del SWI/SNF de mosca (Collins et al. 1999). Recientemente se reportó que *osa/eyelid* interviene en la regulación génica durante el desarrollo de los peines sensoriales en *D. melanogaster*, regulando negativamente genes que ayudan en la diferenciación de estos órganos (Heitzler et al. 2003), por tanto este gene como muchos otros del complejo BAF no solo regulan el patrón de expresión de los genes homeóticos, sino que también puede regular otros genes durante el desarrollo de la mosca.

Estructura molecular de osa/eyelid

El cDNA de *osa/eyelid* de mosca mide 10Kb y codifica para una proteína de 2715 aminoácidos (aa). Es rica en residuos de prolina que constituye alrededor del 17% de los aa totales (Treisman et al. 1997). En esta proteína y en sus homólogos desde levadura hasta mamífero se presentan motivos LXXLL, que se han involucrado en la interacción con receptores nucleares de hormonas (Fig. 4; (Treisman et al. 1997; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003).

La comparación de la secuencia proteica en humano y ratón mostró dos regiones de homología: una cerca del extremo C – Terminal, que se divide en dos dominios llamados C1 y C2 (o OHD1 y OHD2 respectivamente), presentes en todos los homólogos de *osa/eyelid* (desde levadura hasta mamífero), y que están implicados en la interacción con proteínas como Brg1 o receptores nucleares de hormonas; la otra región de homología corresponde a un dominio llamado ARID que interacciona con el DNA en zonas ricas en adenina – timina (Fig. 4; Treisman et al. 1997; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003).

El dominio ARID (AT – Rich Interactive Domain), se ha identificado en una gran diversidad de proteínas que pueden unirse al DNA *in vitro* (Iwahara y Clubb 1999; Iwahara et al. 2002; Kim et al. 2004), se ha sugerido que estas proteínas dependen del dominio ARID para poder unirse al DNA (Kortschak et al. 2000). La estructura del dominio ARID es de ocho hélices α y dos hojas β antiparalelas, aunque parece ser que el dominio puede ser funcional con solo 6 de las 8 hélices α . La forma

en que ARID interactúa con el DNA es por medio de un motivo hélice – vuelta – hélice en el surco mayor y con las estructuras β antiparalelas en el surco menor del DNA (Iwahara y Clubb 1999; Kim et al. 2004). La presencia de ARID en *osa/eyelid*, sugiere que este gene dentro del complejo BAF podría funcionar como anclaje entre el complejo y el DNA (Collins et al. 1999; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002).

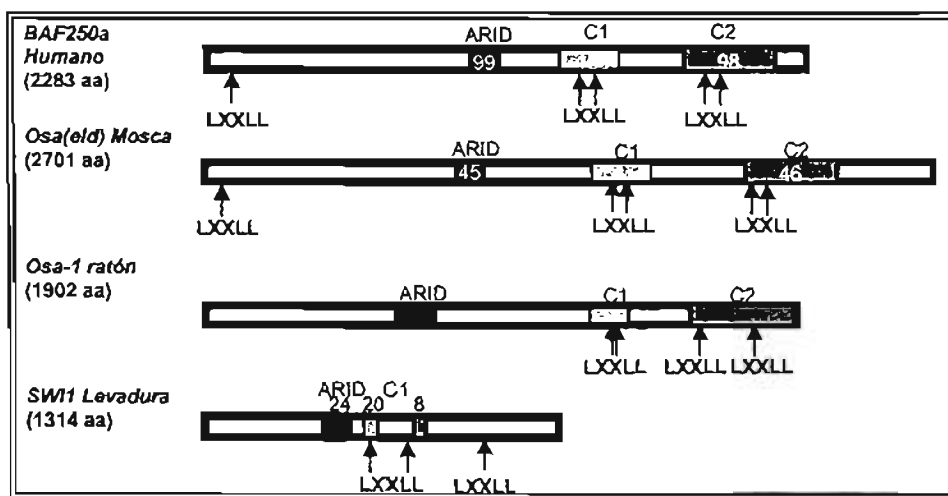


Fig. 4. Alineamiento de los genes *osas* desde levadura (*Swi1*), hasta humano (*OSA-1*), se muestran los dominios ARID, C1 (OHD1) y C2 (OHD2), así como los motivos LXXLL. Se puede ver que la similitud en la organización y conservación de todos los dominios es muy alta, los números dentro de los dominios, representan el porcentaje de similitud de cada proteína con respecto a *osa-1* de ratón. (modificada de Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001).

ANTECEDENTES

En mamífero se han identificado dos genes homólogos a *osa/eyelid* (Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002). En la tabla 2 se presentan los distintos homólogos de *osa/eyelid* desde levadura hasta humano, así como los diferentes nombres dados para los mismos genes en mamífero, en este trabajo nos referiremos a los genes *osa* de ratón como *osa-1* (al equivalente de *osa/eyelid*) y como *osa-2* a la duplicación del gene identificada en mamífero (de la que se habla adelante).

en que ARID interactúa con el DNA es por medio de un motivo hélice – vuelta – hélice en el surco mayor y con las estructuras β antiparalelas en el surco menor del DNA (Iwahara y Clubb 1999; Kim et al. 2004). La presencia de ARID en *osa/eyelid*, sugiere que este gene dentro del complejo BAF podría funcionar como anclaje entre el complejo y el DNA (Collins et al. 1999; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002).

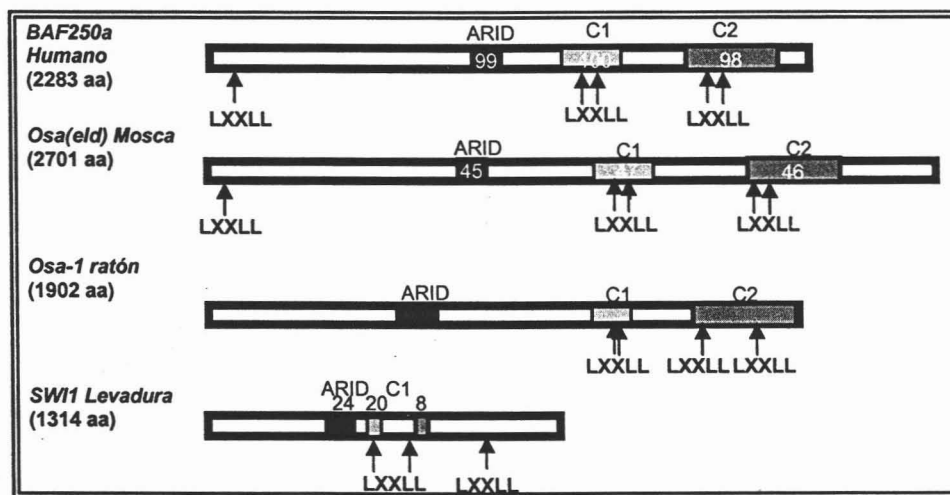


Fig. 4. Alineamiento de los genes *osas* desde levadura (*Swi1*), hasta humano (*OSA-1*), se muestran los dominios ARID, C1 (OHD1) y C2 (OHD2), así como los motivos LXXLL. Se puede ver que la similitud en la organización y conservación de todos los dominios es muy alta, los números dentro de los dominios, representan el porcentaje de similitud de cada proteína con respecto a *osa-1* de ratón. (modificada de Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001).

ANTECEDENTES

En mamífero se han identificado dos genes homólogos a *osa/eyelid* (Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002). En la tabla 2 se presentan los distintos homólogos de *osa/eyelid* desde levadura hasta humano, así como los diferentes nombres dados para los mismos genes en mamífero, en este trabajo nos referiremos a los genes *osa* de ratón como *osa-1* (al equivalente de *osa/eyelid*) y como *osa-2* a la duplicación del gene identificada en mamífero (de la que se habla adelante).

Tabla 2. Genes homólogos de *osa/eyelid*, donde se destacan los nombres utilizados en este trabajo.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Mus musculus</i>	Homo Sapiens
Gene conservado	Swi1	Osa/eyelid	<i>osa-1</i> , BAF250 A, ARID1A	p270, BAF250a, hOsa1, ARID1A
Duplicación en mamífero			<i>osa-2</i> , BAF250 B, ARID1B	hELD/OSA1, BAF250b, hOsa2, ARID1B

Funciones y estructura molecular de osa-1 y osa-2 en humano

Como se observa en la tabla 2, *osa-1* se ha descrito con diferentes nombres (p270, hOsa1, BAF250a, ARID1A); en humano tiene un marco abierto de lectura (ORF) de 2,285 residuos de aa, pesa alrededor de 250 kDa y presenta los mismos dominios funcionales que su homólogo en mosca (Fig. 4; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000). En ensayos hechos *in vitro* se demostró que *OSA-1* interacciona con BRG1 y BRM. Más específicamente se demostró que los dominios del extremo C – terminal (C1 y C2) intervienen en la interacción con las ATPasas y durante la activación transcripcional de receptores nucleares de hormonas, como el receptor de glucocorticoides, andrógenos y estrógenos (Nie et al. 2000; Inoue et al. 2002; Wang et al. 2004). Así mismo, se determinó que los dominios ARID, C1 y C2 son necesarios durante la activación de los receptores hormonales, puesto que en experimentos donde se deletan dichos dominios no hay activación de receptores (Nie et al. 2000; Inoue et al. 2002). También se describió que el dominio ARID de *osa-1*, interacciona con el DNA en secuencias ricas en AT sin una secuencia consenso de unión, a diferencia de otras proteínas como DRI, cuyo dominio ARID se pega en el consenso AATTAA. Por ello se considera que *osa-1* podría actuar como un co- activador o co- represor en combinación con otras proteínas, por ejemplo con los receptores nucleares de hormonas debido a la presencia de dominios LXXLL que posee *osa-1* (Dallas et al. 2000). Recientemente se reportó que la expresión de *osa-1* esta alterada en líneas celulares tumorales de riñón y mama, sugiriendo que este gene dentro del complejo

BAF podría tener un papel importante en las vías de señalización que restringen la proliferación y la diferenciación de estos tipos celulares (Wang et al. 2004).

En mamífero, existe una segunda copia del gene *osa/eyelid* de mosca, *osa-2* al que también se le ha llamado: hOsa2, hELD/OSA1, BAF250b y ARID1B. Presenta un ORF de 1957 aa, pesa 230 kDa, su identidad con respecto a *osa-1* es del 56%, pero es mayor en los dominios funcionales, y ambas conservan los motivos LXXLL (Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003; Wang et al. 2004). *osa-2* también puede estimular a los receptores nucleares de hormonas (glucocorticoides, andrógenos y estrógenos) y puede interactuar con las ATPasas BRM y BRG1 (Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002). Recientemente se describió que *osa-2* es parte de un nuevo complejo llamado EBAFb (ENL – Associated BAF – containing BAF250b; Nie et al. 2003). Este complejo además de presentar como subunidad específica a *osa-2*, tiene como ATPasa exclusiva a BRG1, presenta algunas proteínas exclusivas a las que se llamo EBAF's, una de ellas es ENL, la cual interactúa con MLL (trx de mosca) y el complejo BAF durante la activación de la transcripción del promotor de *HoxA7* (Nie et al. 2003). Estos datos indican que existe una gran heterogeneidad dentro de los complejos BAF en mamífero. Es importante mencionar que *osa-1* se expresa 3.5 veces más que *osa-2* en células de humano y que BRG1 interactúa con ambas proteínas (Wang et al. 2004).

Osa-1 y osa-2 en ratón

Se clono el cDNA de *osa-1* de ratón a partir de una biblioteca de cDNA de embrión de ratón, siendo similar a su homólogo de humano, su tamaño es de 7040

pb¹¹, con un ORF de 1902 aa; también se reportó un splicing alternativo de un fragmento de 217 aa entre los nucleótidos 2967 y 3618, generando dos isoformas *osa-1a* (206 KDa) y *osa1b* (182KDa). La proteína es rica en residuos de prolina, serina y glutamina que representan el 33% de los residuos de aa totales. De acuerdo a lo esperado se vio que *osa-1* interacciona con el complejo BAF, además está localizado en el cromosoma 4. Kozmik y col. analizaron la expresión de *osa-1* en embriones utilizando ensayos de hibridación “in situ” con una sonda dirigida al dominio C2. A los 9.5 y 10.5 dpc (después del coito), encontraron una expresión generalizada, y a los 11.5 y 12.5 dpc encontraron una mayor presencia del transcrito, aunque restringida a los interdígitos, mesodermo dorsal, metencéfalo, neocorteza y tubo neural (Kozmik et al. 2001).

Con respecto a *osa-2* de ratón, se ha reportado que interacciona con BRG1, BAF190 y BAF60a en cerebro de ratón adulto (Hurlstone et al. 2002), y por hibridación “in situ” se reportó que se expresa en cerebro y células de la retina a los 16.5 dpc; en estos ensayos se utilizó una ribosonda dirigida a la región del dominio C2 de humano (entre 5518 – 6022 pb; Nie et al. 2003). En este trabajo se describirán los patrones de expresión de los mRNA's de *osa-1* y de *osa-2* a lo largo del desarrollo embrionario temprano, así como la construcción de un vector de recombinación homóloga para *osa-1* y la caracterización de algunas líneas de células ES con alelos mutados de *osa-1* y *osa-2*, para contar con la posibilidad de producir nuestras propias líneas de ratones mutantes para *osa-1* y *osa-2*.

¹¹ Incluyendo fragmentos de Regiones no traducidas (UTR)

OBJETIVO GENERAL

Hasta el momento, no se ha reportado ningún trabajo en donde se analice el fenotipo de la ausencia de la función de *osa-1* y *osa-2* en ratón. En el laboratorio de la Dra. Lomelí, hemos trabajado en la identificación y caracterización de los genes *osa* de ratón. Por tanto, nuestro objetivo es determinar la importancia funcional de *osa-1* y *osa-2 in vivo* utilizando ratones mutantes nulos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Crear un vector de recombinación homóloga por sustitución (VRH) dirigido al gene *osa-1*, para poder generar células pluripotenciales de ratón que contengan al alelo inactivo de este gene.
- Clonar fragmentos de los genes *osa-1* y *osa-2* a partir de mRNA, con la finalidad de utilizarlos como sonda en ensayos de hibridación *in situ*.
- Establecer y comparar los patrones de expresión de los mRNA's de *osa-1* y *osa-2* en los estadios embrionarios 7.5, 8.5, 9.5 y 10.5 dpc.
- Corroborar que diferentes líneas celulares de ES de ratón contengan a los alelos *osa-1* u *osa-2* mutados.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Previo a este proyecto, habíamos realizado avances en sobre la caracterización de los genes *osa*. Inicialmente, obtuvimos clonas genómicas de *osa-1* que mapeamos y subclonamos con la finalidad de generar herramientas para hacer recombinación homóloga e inactivar el alelo *osa-1* en células embrionarias troncales (ES) de ratón. Por otra parte, habíamos trabajado en la obtención de clonas de cDNA para utilizarlos

en experimentos de hibridación “in situ”, así como para la obtención de anticuerpos específicos de ambos genes *osa*.

Por otra parte, conocer la expresión de un mRNA por hibridación “in situ” en el desarrollo embrionario permite especular sobre el papel del gene en las etapas analizadas. Aunque como se mencionó ya se han hecho algunas determinaciones del patrón de expresión para los genes *osa* de ratón, estos son resultados preliminares, además de que se hicieron en diferentes periodos de gestación (siendo 9.5 dpc el periodo más temprano; Kozmik et al., 2001). Para el caso de *osa-2*, se utilizó como ribosonda una región muy conservada del gene por lo que es probable que no funcione de manera totalmente específica (Nie et al. 2003). Por su parte, los patrones reportados para *osa-1* muestran un alto grado de ruido de fondo, especialmente en los estadios tardíos, además de que no se determinó el patrón de expresión de las formas de splicing alternativo de *osa-1* (Kozmik et al., 2001). Por ello, nos pareció necesario obtener los patrones de expresión específicos para *osa-1a*, *osa-1b* y *osa-2* durante el desarrollo temprano de ratón a partir del día 7.5, para dilucidar un posible patrón diferencial entre ambos genes, tal como se observa para BRM y BRG1 (Reyes et al. 1998; Bultman et al. 2000). Si los patrones de expresión de *osa-1* y *osa-2* fueran excluyentes en algunas etapas del desarrollo y a su vez sobrelaparan con subunidades específicas de los complejos BAF, o bien con las ATPasas (*Brg1* y *Brm*), de este análisis se podrá sugerir un modelo hipotético de la composición del complejo en regiones y etapas particulares y se podrá explorar si *osa-1* y *osa-2* tienen preferencia en su interacción con *Brg1* y *Brm*; además podría dar una idea de que tan esenciales son estos genes durante el desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

*Selección de clonas que contuvieran el inicio de *osa-1* (PCR en colonia).*

A partir de un “screening” hecho por Sergei Kuzlov del CDBL en Maryland USA, en un banco de Cromosoma Artificiales de Bacteria (BAC; Mouse BAC Clone, Research Genetics), obtuvimos 15 clonas de BAC¹² que contienen el gen *osa-1*.

Con estas clonas se realizaron ensayos de PCR utilizando los “primers” de la tabla 3. Las condiciones con las que se realizó el ensayo fueron: 1x 94°C – 3’; 20x 94°C – 30’’, 55°C – 30’’, 72°C – 1’30’’; 1x 94°C – 30’’, 55°C – 30’’, 72°C – 5’. Condiciones de reacción: “Buffer” de reacción 1x, dNTP’s 0.2 mM, MgSO₄ 2mM, *Taq* Polimerasa 1U (Invitrogen), oligonucleótidos 0.2mM y una fracción de cada colonia bacteriana.

Tabla. 3. Oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR en colonia para amplificar el exón I de *osa-1*.

Nombre	Oligonucleótido
IniI (1-21 pb)	5’ ATG GAT CAG ATG GGC AAG ATG 3’
Iniv2 (318-304 pb)	5’ TTG TTG CTG GGC GTA AGG TGG 3’

*Construcción del vector de recombinación homóloga dirigido a *osa-1**

La construcción del vector de recombinación homóloga dirigido al inicio del gene *osa-1* se llevo a cabo en las tres fases que se describen a continuación.

*1. Obtención de los brazos de recombinación de *osa-1* (brazo 5’ y brazo 3’), utilizando ensayos de PCR y clonación en el vector pCR[®] 2.1-TOPO[®].*

En la tabla 4 se muestran los oligonucleótidos diseñados para amplificar dos fragmentos de DNA de alrededor de 3.5 kb cada uno de acuerdo a la secuencia

¹² Las clonas que nos proporcionaron son: 6 N21; 197 I15; 233 D11; 271J15; 298 G18; 339 P12; 372 C16; 375 H1; 416 H22; 417 L16; 485 H15; 490 C1; 490 E1; 492 A3 y 516 P6.

genómica del gene *osa-1* de ratón. El DNA templado para la obtención de los fragmentos fue la clona de BAC 416 H22, que incluye a los exones del inicio de la traducción de *osa-1*.

Tabla. 4. Se muestran los oligonucleótidos que se utilizaron en ensayos de PCR para amplificar los brazos de recombinación homóloga

Nombre	Oligonucleótido	Fragmento
5iniumb	GCA CGT CAG CAA CCA CAG GCA GAG TCT CC	Brazo 5'
ini3umb	TTG CGG CCG CCT CCC GAC AC TACA GCA ACA	Brazo 5'
ini5osa	CCA AGC TTC ACA GCA GCC CTC GGT CTT C	Brazo 3'
Osa3ini	GCA CTG CAG CGC TGG GGA TGA GGA CTT TGC TGG	Brazo 3'

Los ensayos de PCR fueron hechos con la *Taq* Polimerasa high fidelity (Invitrogen), que disminuye la tasa de mutaciones y deja extremos rasurados en los fragmentos amplificados. Las condiciones del ensayo son: 1x 94°C – 1'; 20x 94°C – 30'', 51°C – 30'', 68°C – 3'30'' + 5'c/ciclo; 1x 94°C – 30'', 51°C – 30'', 68°C – 5'. Las condiciones de reacción son: "Buffer" de reacción 1x, dNTP's 0.2 mM, MgSO₄ 2mM, DNA templado 200ng, *Taq* high fidelity 1U (Invitrogen), oligonucleótidos 0.2mM. Se agregaron adeninas en los extremos 5' de estos fragmentos con el siguiente tratamiento: 15' a 72°C, ATP 2.5 mM, *Taq* Pol. 1U (Invitrogen), MgSO₄ 2mM y "Buffer" de reacción 1x.

La clonación se llevó a cabo con el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen). La inserción de los fragmentos ocurre debido a que el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (3.9 Kb) contiene una T saliente en sus extremos 3', que le permite aparearse con una A de los extremos 5' de los productos de PCR. La ligación se lleva a cabo con ayuda de la Topoisomerasa I que se encuentra anclada en los extremos del vector. Por tanto, el fragmento se inserto, pero no tiene una dirección definida.

La cepa bacteriana *E. coli* XL1 – Blue fue utilizada en todas las transformaciones. La selección de clonas fue por resistencia a ampicilina (100 µg/ml) y por discriminación de colonias bacterianas blancas/azules, resultado de la inducción de gene β-Gal con XGal/IPTG.

Un método de selección de clonas positivas fue con ensayos de restricción, utilizando las enzimas: *Not* I (New England), *Pst* I (Invitrogen) y *Hind* III (Invitrogen). Las condiciones en que se hicieron todos los ensayos de restricción en este trabajo fueron las estándar para las endonucleasas, es decir: DNA 1 µg, “Buffer” 1x, Enzima 1U y BSA 1x en algunos casos, a 37°C por 2 h. Se realizaron ensayos de doble digestión simultáneas si las enzimas comparten el “Buffer” de reacción ó dobles digestiones secuenciales si el “Buffer” de reacción no era compatible. Las reacciones fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa 1% (90V durante 25’ – 30’). El DNA se purificó con extracciones estándar de Fenol – cloroformo y resuspendió en agua (Sambrook y Russell 2001).

2. Unión de los brazos de recombinación. Ligación del brazo 3’ en pKS – brazo 5’.

Se digirió la construcción que contenía al *brazo 5’* con las enzimas *Pst* I/ *Hind* III de forma secuencial; el fragmento *brazo – 5’* fue purificado por extracción de DNA de geles de agarosa con el Kit QUIAEX II (Gel Extraction Kit, QIAGEN). De igual forma se cortó y purificó al plásmido pKS – BlueScript, además fue defosforilado con el siguiente tratamiento: DNA 1µg, “Buffer” 1x, 2U de Fosfatasa alcalina (Roche), por 1h a 37°C. Posteriormente se ligaron ambos fragmentos de DNA utilizando una relación molar 1(pKS):4 (Brazo -5’). En este trabajo se realizaron múltiples ligaciones,

todas con el mismo tratamiento: “Buffer” 1x, T4 DNA ligasa 1U (New England), solo variaron las relaciones molares; estos tratamientos se realizaron a temperatura ambiente por 20’. La selección de clonas fue mediante la interrupción del gene *Lac Z* y por patrones de restricción con las enzimas *Hind* III (Invitrogen) y *Pst* I (Invitrogen), cuyas condiciones ya se mencionaron (mapa de pKS- Bluescript Apéndice 2 pag. 79).

Una vez obtenido el pKS – brazo – 5’, se digirió con *Not* I junto con el *pCR*[®]2.1-*TOPO*[®] –brazo–3’. La construcción pKS – brazo – 5’ fue defosforilada y se ligó al brazo – 3’. La selección de clonas fue con patrones de restricción de las enzimas *Not* I (Invitrogen) y *Pst* I (Invitrogen; Esquema 8a, pag.41).

3. Inserción del Marcador de Selección Positiva en la construcción pKS – brazos 5’ – 3’

Se hicieron dobles digestiones secuéciales en la construcción pKS – brazos 5’ – 3’, con las enzimas *Eco* RV (New England) y *Sma* I (New England). El marcador de selección positiva Stop IRES Lac Z-Flox Neo (SILZFN), se obtuvo con una doble digestión secuencial con las endonucleasas *Xho* I (New England) y *Sac* II (New England) a partir del plásmido pSILZFN (Esquema 9a, pag.43).

SILZFN se rasuró con el siguiente tratamiento: “Buffer” 1x, dNTP’s 0.5 mM, DNA 1µg, enzima *Klenow* 1U (Invitrogen), por 20’ a T ambiente. La construcción *pCR*[®]2.1-*TOPO*[®] – brazos 5’ – 3’ linearizada se defosforiló. La ligación se realizó con distintas relaciones molares de *pCR*[®]2.1-*TOPO*[®] – brazos 5’ – 3’: MSP, 1: 5, 1:10, 1:15 y 1:20 respectivamente (ver Resultados). La selección de clonas positivas se realizó con ensayos de restricción con las endonucleasas *Xba* I (New England) y *Hind* III (Invitrogen).

La secuenciación de las construcciones de este trabajo, se llevaron a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM.

Hibridación in situ de osa-1 y osa-2 en embriones de ratón.

La técnica de hibridación “in situ” puede detectar secuencias de ácidos nucleicos (DNA o RNA) por complementación de bases nucleotídicas, ya sea en células, cromosomas o tejidos preservados. Esta detección provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas que ayudan a dilucidar la organización, por tanto esta técnica es una herramienta importante en diversos campos de investigación, incluyendo diagnóstico de rearrreglos cromosomales, detección de infecciones virales, etc. En este trabajo se utiliza la hibridación “in situ” con el objetivo de analizar la expresión de los genes *osa-1* y *osa-2* durante el desarrollo embrionario.

Obtención y preparación de la sonda

De acuerdo con las secuencias de cDNA de *osa-1* y *osa-2*, se diseñaron los “primers” (ver tabla 5) para amplificar fragmentos de DNA de entre 500-600 pb, para utilizarlas como templado, para sintetizar ribosondas específicas en ensayos de hibridación “in situ” en embrión completo de ratón de 7.5 a 10.5 dpc.

Tabla. 5. Se muestran los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de pequeños fragmentos de *osa-1* y *osa-2* empleados como sondas en ensayos de hibridación in situ (en el Apéndice 1 se esquematiza las regiones donde se encuentra cada oligonucleótido y la Fig. 10 (pág. 44), la región donde cae cada sonda).

Nombre	Oligonucleótido (5'→3')	Fragmento
Uosa1AA	GGA CTA ACC CAT ACT CGC AAC AA	Osa-1A
Uosa1AB	TGT GAG GAG AAA AGG GAG ACT GA	Osa-1A
OsaI21	CCT GCC TCC GCC ACC GCT GCT AC	Osa-1B
OsaI22	CAG GAA TGG AGA CTT GCT AGG AG	Osa-1B
UosaII11	GAT GGT AAA GAA GAA GGC GTG TC	Osa-2.1
Losa212	GTG GCT GGG AGT GGG GGT GAG TA	Osa-2.1
Uosa21A	GCA GCC AGC AGC AGG AGA TGT AT	Osa-2.2
Uosa21B	ATC TTT TGA GGT AAT CTT TCG CC	Osa-2.2

Los fragmentos se obtuvieron por ensayos de RT-PCR con las siguientes condiciones: : 1x 94°C – 2'; 35x 94°C – 30'', 59°C – 30'', 72°C – 1'30''; 1x 94°C – 30'', 51°C – 30'', 72°C – 5', las condiciones de reacción fueron: "Buffer" de reacción 1x, dNTP's 0.2 mM, MgSO₄ 1.5mM, DNA templado 200ng, Taq Platinum 2U (Invitrogen), oligonucleótidos 0.2mM. Los fragmentos se clonaron con el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen).

La preparación de la sonda para hibridación se llevó a cabo con la siguiente reacción de transcripción *in vitro*: "Buffer" de transcripción 10X (Roche), Mezcla de NTP's, UTP marcado con Digoxigenina (Roche), Plásmido linearizado (1 µg/µl), Inhibidor RNAsa, SP6 o T7 RNA Polimerasa (10 U/µl), esta reacción se incubaba a 37°C por 2 h. Se procedió a la purificación de la sonda con el kit Quick Spin Columns (Roche). Se almacena a -70 °C, cada alícuota se utiliza como la ribosonda en la hibridación "in situ".

Preparación de los embriones

En este estudio se usaron ratones de la cepa CD-1 que se mantuvieron con un fotoperíodo de 10 h de luz y 14 h de oscuridad. Para las cruces se usó una hembra y un macho por caja durante toda la noche, revisando al siguiente día la presencia del tapón vaginal indicativo de la cópula. Este día se consideró como el 0.5 día post coitum (dpc).

Una vez que los embriones llegan a los días de desarrollo requeridos en este trabajo, se disectan en PBS 1X DEPC. Posteriormente se fijan en paraformaldehído al 4% de 4 h a toda la noche a 4°C. Una vez fijados, se lavan y deshidratan con el siguiente tratamiento: 2X PBT (PBS/0.1%Tween) 5', 1x 25% MeOH/PBT 5', 1x 50%

MeOH/PBT 5, 1x 75% MeOH/PBT 5', 2x 100% MeOH 5' y se guardan en 100% MeOH a -20°C .

Protocolo de hibridación in situ

Este protocolo se lleva a cabo en cuatro días, se debe tener extremo cuidado para que el mRNA no se degrade durante el tratamiento, por tanto el lugar donde se realiza el experimento debe estar libre de RNAsas.

Día 1

1. Los embriones son rehidratados por medio de los siguientes tratamientos:

75% MeOH/PBT	5'
50% MeOH/PBT	5'
25% MeOH/PBT	5'
PBT 2X	5'

2. Los embriones son aclarados de eritrocitos, con 2% H_2O_2 /PBT por 1 h a T ambiente.

3. Se lavan con PBT 3 veces.

4. Los embriones se permeabilizan con proteinasa K 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a TA. El tiempo depende del estadio embrionario:

E7.5	3'	E9.5	10'
E8.5	5'	E10.5	15'

5. Se lavan con 2mg/ml Glicina/PBT por 10'.

6. Se lavan 2 veces con PBT (lavados rápidos).

8. Se fijan en 4% paraformaldehído / 0.2% glutaraldehído / PBT, 15' a T ambiente.

9. Se lavan 4 veces con PBT.

10. Hay que prehibridar con solución de hibridación (50% formamida, 5X SSC pH = 4.5, 1% SDS, 50 µg/ml tRNA, 50 µg/ml heparina) a 68-70°C por al menos 1 h.

11. Se reemplaza con solución de hibridación fresca y con la sonda de RNA marcada (250 ng – 1 µg/ml, es importante mencionar que se puede calentar la sonda en 100 µl de sol. de hibridación a 95°C por 5'. Antes de colocarla con los embriones) y se deja hibridando toda la noche a 68-70°C en agitación suave.

Día 2

1. Los embriones son lavados con solución de hibridación 3 veces por 10 min. c/u a 69°C en agitación suave.
2. Se lavan con solución 1 (50% formamida, 5X SSC pH = 4.5, 1% SDS) 3 veces por 30' a 69°C en agitación suave.
3. Se lavan con solución 2 (50% formamida, 2X SSC), 3 veces por 30' a 69°C en agitación suave.
4. Posteriormente, se lavan con TBST (para 100 ml: 2.5 ml Tris 1M pH = 7.5, 0.8ml NaCl 5 M, 0.02 gr KCl, 0.1% Tween) 3 veces por 5' a TA.
5. Los embriones son incubados con solución de bloqueo (1% Blocking Reagent, Roche y 10% suero de oveja inactivado en PBT) de 1 a 2.5 hr a TA, con agitación suave.
6. Los embriones son expuestos al anticuerpo anti-DIG (Roche) preabsorbido con polvo de embrión toda la noche a 4°C con agitación suave.

La preabsorción del anticuerpo se lleva a cabo de la siguiente manera:

Se disuelve 3 mg de polvo de embrión en 500 µl de TBST por 30 min. a 69 °C, con agitación, posteriormente se pone en hielo y se deja enfriar. Se agrega 5 µl

de suero de oveja (inactivado) y 1 μ l de anti-DIG (Roche), se agita suavemente por 1 h, se centrifuga por algunos segundos, se toma el sobrenadante en un tubo limpio y se diluye a 2 ml con TBST y 1% de suero de oveja (almacenar a 4°C).

Día 3

Los embriones son lavados con TBST adicionado con levamisol (0.48 mg/ml, SIGMA):

3 veces por 10' a T ambiente.

5 veces por 1.5 h a T ambiente.

Se dejan en TBST/levamisol toda la noche a 4°C con agitación suave.

Día 4

1. Los embriones son lavados con NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris pH = 9.5, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20, 2 mM levamisol) 3 veces por 10 min. a TA.
2. Los embriones son incubados con NTMT + NBT (3.5 μ l/ml) + BCIP (3.5 μ l/ml) en oscuridad, observar periódicamente hasta que se vea la señal.
3. Lavar con PBT 2 veces por 5'
4. Fijar con 4% paraformaldehído por 1 h y guardar a 4°C

Procedimiento Histológico

Inclusión y cortes de embriones en parafina

Embriones de 8.5, 9.5 y 10.5 dpc se fijaron con formaldehído al 4% (en PBT) por toda la noche, después de la fijación se lavaron con PBS 1X, se deshidrataron gradualmente con etanol al 30, 50, 70, 90 y 100%, xilol:etanol (1:1 y 2:1) por 20 min.

cada uno, se trató con xilol por 45'. Posteriormente se impregnaron con parafina a 60° C con xilol: parafina (1:1) y se hicieron dos cambios con parafina de una hora cada cambio antes de su inclusión. Se hicieron cortes de 10 micras y se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina.

Los cortes son desparafinados e hidratados en las laminillas con: xilol por 10' dos veces, etanol 100% dos veces por 5' cada uno, etanol 90% por 4', etanol 70% por 4', posteriormente se realiza un tratamiento con eosina por 8' (este paso es variable dependiendo del tiempo que tarde en teñirse el tejido). Los cortes se vuelven a deshidratar con tratamientos de etanol al 70%, 90% y 100% por 3' cada uno, xilol por 3' y se montan con resina (Entellan) evitando dejar burbujas y dejando secar a temperatura ambiente.

RESULTADOS

Los genes osa están conservados en diferentes organismos

El complejo protéico BAF se ha conservado desde levadura hasta mamífero. Se sabe que los genes *osa* de mamífero conservan cierta homología con la subunidad SWI1 del complejo de levadura, por lo que se buscaron secuencias protéicas similares a *osa-1* y *osa-2* de ratón en distintos organismos con la finalidad de compararlas entre ellas. Muchos genes se duplicaron durante la aparición de los vertebrados (por ejemplo los genes PcG, *trxG* y HOX), y tomando en cuenta que el gene *osa* de mosca esta duplicado en los genomas de mamífero, queremos establecer si esta duplicación es exclusivo de mamífero o se observa en todos los vertebrados. Desafortunadamente se conoce el genoma de muy pocos organismos, por lo que sólo se incluyeron secuencias protéicas de Levadura (*S. cerevisiae*), mosca de la fruta (*D. melanogaster*), mosquito (*A. gambiae*), nemátodo (*C. elegans*), pollo (*G. gallus*), , ratón (*M. musculus*), humano (*H. sapiens*) y secuencias parciales de los peces *D. rerio* y *Tetraodon nigroviridis*, así como del orangután (*P. troglodites*), para generar un cladograma.

Un cladograma, es un árbol filogenético hecho con los caracteres derivados compartidos entre especies (en este caso proteínas) cuyas apariciones son recientes, el punto de partida (antepasado común) de una rama es un nodo, y las líneas entre nodos, son los internodos. El cladograma aquí presentado nos proporciona la relación entre las proteínas *osa* de ratón de acuerdo a su similitud, por tanto los datos obtenidos con este árbol sugieren que al igual que otras proteínas *trxG* (como los genes tipo *brm*), el gene *osa* parece que sufrió un proceso de duplicación entre insectos (mosca y mosquito) y vertebrados (peces, aves y mamíferos), debido a la bifurcación del nodo entre estos organismos generándose dos distintos grupos. Uno en el que se encuentran las *osa-1* de

peces, aves y mamíferos, y otro que corresponde a las proteínas *osa-2* de todos los vertebrados utilizados.

Como se mencionó anteriormente para algunas de las especies utilizadas (peces y orangután) no logramos obtener secuencias completas de ellas. Por ejemplo para el caso de peces, solo logramos obtener secuencias de alguno de los genes *osa* lo que no quiere decir que en estos organismos no exista la duplicación sino que no se han reportado los homólogos ya sea de *osa-1* u *osa-2*, ya que para *D. rerio* se identificó a *osa-2* y para *T. nigroviridis* se identificó a *osa-1* (ver el cladograma, Fig. 5), lo que sugiere que en peces ambos genes *osa* están presentes.

Por otro lado, la proteína *osa-2* del orangután dentro del cladograma esta menos relacionada a su homóloga en humano, sugiriendo que la secuencia utilizada para el alineamiento podría estar incompleta, reduciendo la similitud con OSA-2 de humano.

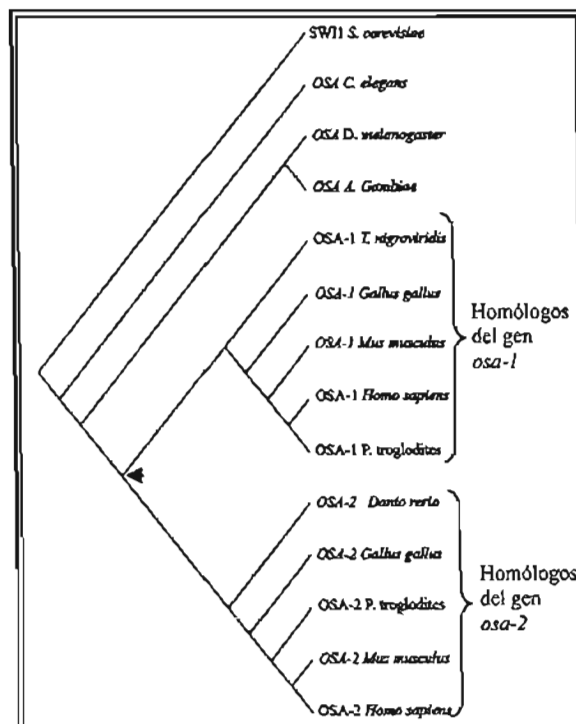


Fig. 5. Cladograma de las proteínas OSA. La flecha indica el evento de duplicación por el cual en vertebrados existen dos genes *osa*. Levadura (*S. cerevisiae*), mosca de la fruta (*D. melanogaster*), mosquito (*A. gambiae*), nematodo (*C. elegans*), pollo (*G. gallus*), ratón (*M. musculus*), humano (*H. sapiens*), orangután (*P. troglodites*). Pez cebra (*D. rerio*) y pez "puffer" (*Tetraodon nigroviridis*).

Vector de recombinación homóloga para *osa-1*

Un vector de recombinación homóloga (VRH) es una herramienta utilizada para introducir modificaciones sitio específicas dentro del genoma por medio de la recombinación homóloga, ya que se reemplazan secuencias génicas por un transgene que modifica la expresión del gen blanco (ver Fig. 6a). Cuando el objetivo es eliminar la función de un gene, se recomienda que el VRH se dirija la región del inicio de la traducción, asegurando que no se generen versiones truncadas que mimeticen la función del gene y no permitan ver el fenotipo real de su ausencia *in vivo*. Otra posibilidad es eliminar una región crítica para la función del gen (dominios funcionales; Muller 1999).

Este tipo de construcciones contienen distintos componentes génicos, es decir dos fragmentos genómicos del gene blanco cuyo tamaño estándar es de 3.5 kb que se utilizan como brazos de recombinación. Otro elemento importante es el marcador de selección positiva (MSP), generalmente contiene genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo a neomicina) y/o algún gene reportero (por ejemplo *Lac z* o *GFP*, ver Fig. 6b). El gene de resistencia se utiliza durante la selección de colonias celulares para identificar a las células que integraron el VRH. El gen reportero permite ver la expresión endógena del gene mutado en el organismo. El MSP es insertado en medio de los brazos de recombinación y debe quedar incluido dentro de un exón, para asegurar que el gene sea silenciado y evitar que el MSP se elimine durante procesos post – transcripcionales del mRNA.

En este trabajo se utilizó un MSP llamado SILZFN, que consta de 3 codones de término en su región 5' seguida de un sitio aceptor de ribosoma (IRES), *Lac Z* y PoliA, *PGKNeo* flanqueado por dos sitios *LoxP* (ver Fig. 6b).

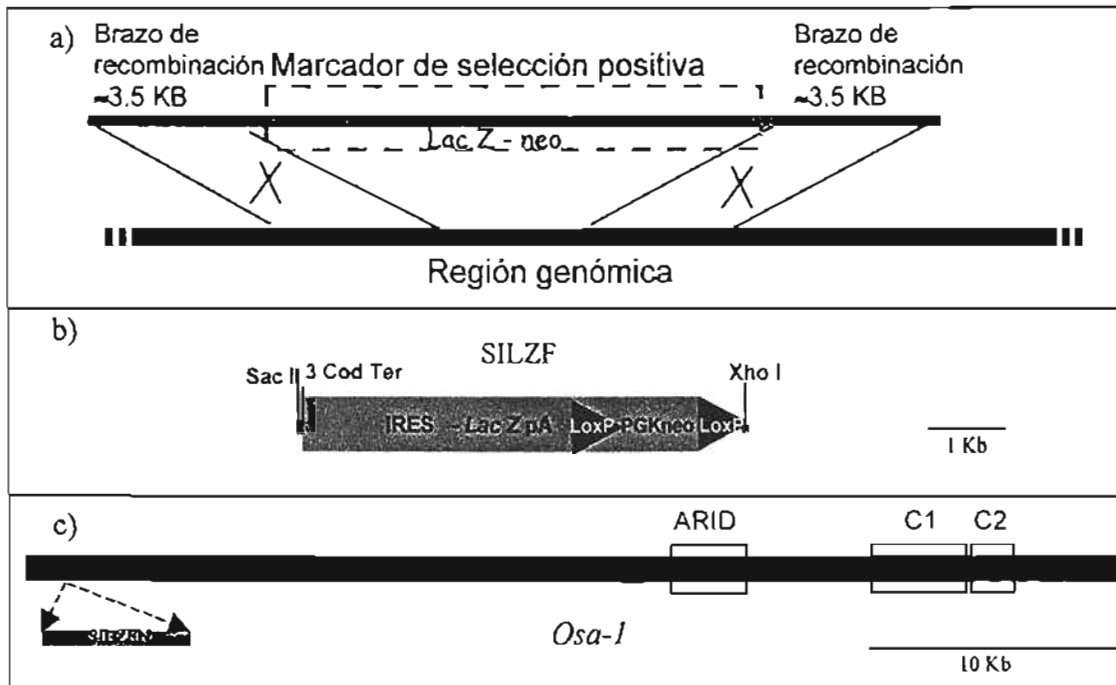


Fig. 6. a) Se esquematiza al vector de recombinación (arriba), en rojo los brazos de homología y en verde el MSP, la parte de abajo representa el gene silvestre. La región de homología entre el VRH y el genoma se reconoce y recombinan para reemplazar al secuencia normal por el transgene. b) Marcador de selección positiva utilizado en la construcción del VRH de *osa-1*, se señalan los codones de termino, así como la resistencia a neomicina y el marcador *Lac Z*. c) Se esquematiza el gene *osa-1*; en azul los exones, en gris los intrones, después del exón III hay un intrón de más de 20 Kb; en verde se esquematiza SILZFN, las flechas punteadas indican el lugar donde se pretende interrumpir a *osa-1* con el VRH.

Obtención de los brazos de recombinación

A partir de la secuencia reportada del cDNA de *osa-1* (Kozmik, Machon et al. 2001), se obtuvo la secuencia genómica en la base de datos http://www.ensembl.org/Mus_musculus. *osa-1* se ubica en el cromosoma 4 de ratón como lo había reportado Kozmik y col., el gen mide 44,325 pb del inicio al final de la traducción, consta de 22 exones y de 21 intrones (Fig.6c), el tamaño promedio de los intrones es de 2,421 pb, exceptuando un intrón que mide aprox. 24,314 pb, que separa a tres exones correspondientes a 775 pb del inicio del cDNA, los dominios funcionales ARID, C1 y C2 se encuentran distribuidos en dos o más exones.

En el laboratorio contábamos con 15 clonas genómicas de *osa-1* contenidas en BAC's (6 N21; 197 I15; 233 D11; 271J15; 298 G18; 339 P12; 372 C16; 375 H1; 416

H22; 417 L16; 485 H15; 490 C1; 490 E1; 492 A3 y 516 P6), identificadas con sondas dirigidas a los dominios funcionales ARID y C1. Como los BAC's pueden hospedar de 100-150 Kb de DNA exógeno, se buscaron clonas que incluyeran los exones del inicio de la traducción de *osa-1*, por tanto se realizaron ensayos de PCR en colonia bacterianas de las 15 clonas con BAC's, amplificando un fragmento de alrededor de 200 pb correspondientes al exón 1 (Fig. 6c). En la figura 7a se muestra el PCR de las clonas de BAC's 416 H22 (B1), 375 H1 (B2) y 516 P6 (B3), que fueron positivas para el exón 1 de la traducción de *osa-1*. Por análisis de Southern Blot¹² se confirmó que dos de las tres clonas seleccionadas contenían el inicio de la traducción de *osa-1* y al menos 10 Kb corriente arriba del exón que contiene el ATG (Fig. 7b).

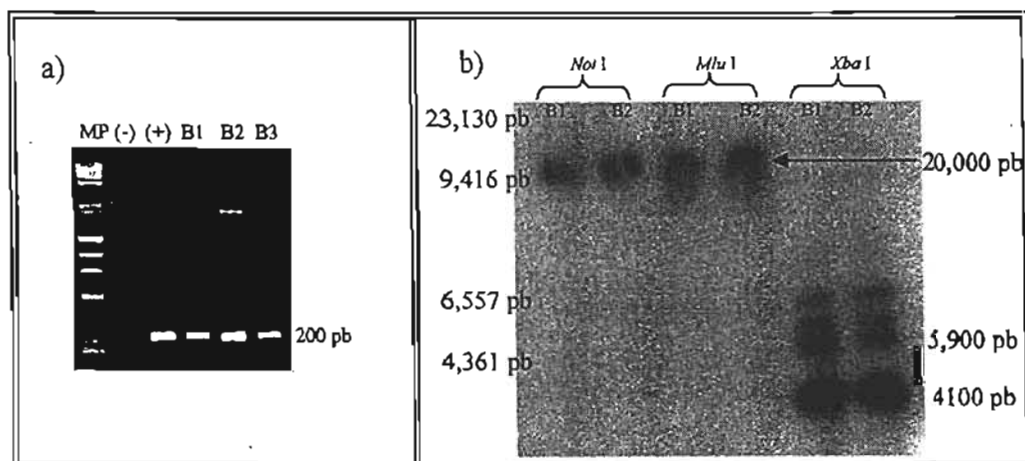


Fig. 7. a) Se muestra el PCR hecho para comprobar que clonas de BAC contienen el inicio de la traducción de *osa-1*, (-) control negativo (prime's sin cDNA y DNA de BAC), (+) Control positivo - cDNA de embrión de ratón, clonas B1 - 416 H22 B1, B2 - 375 H1 y B3 - 516 P6. b) Southern Blot de restricciones con las endonucleasas Not I, Mlu I y Xba I, de las clonas 416 H22 (B1) y 375 H1 (B2), que demuestra que ambas clonas de BAC utilizadas contienen el inicio de *osa-1*; los patrones de digestión de las enzimas Not I, Mlu I generaban una banda de alrededor de 20 Kb y para Xba I se esperaban dos fragmentos de 5,900pb y 4,100pb.

Clonación de los brazos de recombinación de *osa-1* (brazo 5' y brazo 3'), utilizando ensayos de PCR, en un vector de clonación (pCR[®]2.1-TOPO[®]).

Con base a los análisis anteriores y a la secuencia genómica de *osa-1*, se diseñaron oligonucleótidos que sirvieran como "primers" en ensayos de PCR para

¹² La sonda utilizada fue un fragmento correspondiente al exón I. la cual fue marcada radiactivamente con ³²P-CTP.

amplificar dos fragmentos de alrededor de 3.5 Kb en la región del inicio del gene *osa-1* contenido en el BAC, para utilizarlos como brazos de recombinación en el vector de recombinación homóloga (Fig. 8a). Estos fragmentos se nombraron *Brazo – 5'* (de 3.7 Kb) y *Brazo – 3'* (de 3.4 Kb) tomando como referencia su futura ubicación en el VRH con respecto al MSP (izquierda – 5'– o derecha – 3'–, ver Fig. 10c).

La región involucrada en la recombinación homóloga incluyen a los tres primeros exones del mRNA de *osa-1*, es decir el brazo – 5' contiene al exón 1 y termina a la mitad del exón 2 y el brazo – 3' inicia a la mitad del exón 2 y contiene el exón 3 (ver Fig. 6c y 8a). También contienen sitios de restricción para facilitar la construcción del VRH; en el brazo – 5' se incluyeron los sitios *Hind* III (extremo 5') y el sitio *Pst* I (extremo 3'), además se agregó el sitio de restricción *Eco* 47III antes del sitio *Pst* I, para poder insertar al MSP. En el brazo – 3' se agregaron los sitios *Pst* I (extremo 5') y el sitio *Not* I (extremo 3', Fig. 8a). Los sitios *Pst* I se agregaron con la finalidad de unir los brazos de recombinación de forma correcta¹³ (Fig. 8a), para después insertar a SILZFN en el sitio *Eco* 47III, quedando en medio de los brazos de recombinación (ver mas adelante). Estos sitios de restricción fueron seleccionados, porque presuntamente no estaban presentes en las regiones amplificadas, de acuerdo a la información disponible en la base de datos. Sin embargo el brazo-3' no se pudo clonar en el vector pKS – Bluescript utilizando los sitios de restricción insertados puesto que presentaba un sitio interno de restricción para la enzima *Pst* I, mismo que no era predecible con la secuencia originalmente obtenida en la base de datos, ya que se encontraba en una región donde la calidad de la secuencia no era buena. Posteriormente, en una versión más actualizada de la secuencia genómica de *osa-1*,

¹³ Para unir el extremo 3' del brazo – 5' al extremo 5' del brazo – 3'.

corroboramos que en el brazo - 3' se localiza un sitio de *Pst* I que nos genera fragmentos en ensayos de restricción (fragmentos de 1,887pb y 1606pb; Fig. 8b). Como el sitio de *Pst* I nos evitaba clonar completo al brazo - 3' en el plásmido pKS-Bluescript, decidimos clonar ambos fragmentos en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Apéndice 2; Pág. 88), tomando en cuenta que este vector nos permitía clonar al brazo -3' completo y que los sitios de restricción que posee el vector posteriormente nos servirían. Como la inserción de los fragmentos en este plásmido tienen dirección aleatoria, hicimos análisis de restricción que nos permitieron seleccionar las clonas que tenían los fragmentos insertados en la dirección que nos convenía para la construcción del VRH (Fig. 8c). Una vez que los brazos de recombinación se clonaron en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] se confirmó que se contaba con las regiones deseadas por medio de ensayos de secuenciación.

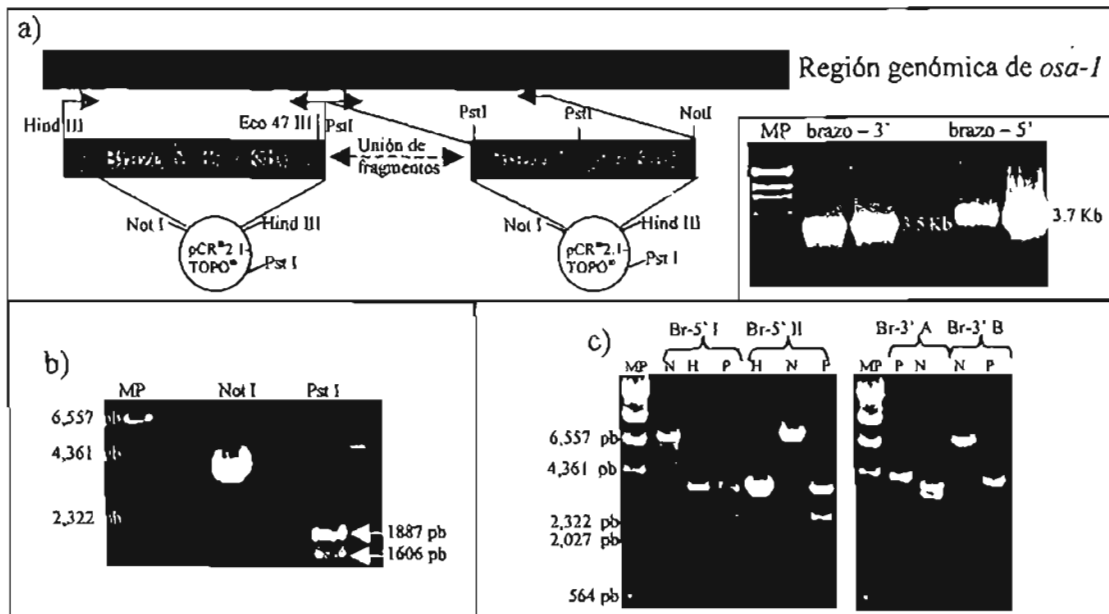


Fig. 8. a) Esquema que ilustra la región clonada del inicio de traducción de *osa-1*, el brazo - 5' incluye al exón I y parte del II; el brazo - 3' incluye parte del exón II y el exón III. En la parte derecha de la figura, se muestra el ensayo de PCR donde se amplificaron los brazos de recombinación. b) Restricción del brazo - 3' con *Not I* y *Pst I* por separado. c) Ensayos de restricción que corroboran la inserción de los brazos de recombinación en el plásmido; izquierda brazo - 5', derecha brazo - 3': P - *Pst I*, N - *Not I*, H - *Hind III*.

Unión de los brazos de recombinación

Puesto que los brazos de recombinación se encontraban clonados por separado, se unieron en una sola construcción tomando en cuenta su dirección (5' - 3') que es necesaria para que la recombinación homóloga se lleve a cabo correctamente. Se utilizaron sitios de restricción que nos permitían liberar los fragmentos del vector pCR[®]2.1-TOPO[®] e introducirlos en el vector pKS-Bluescript, ambos en dirección 5' a 3' (Fig. 9a). La unión de brazos se realizó por partes, es decir primero se transfirió el brazo - 5' en sitios *Hind III*/*Pst I* en el vector pKS-Bluescript (Fig. 9a y b) y posteriormente se inserto el brazo - 3' en el sitio *Not I* del plásmido (Fig. 9a), como la ligación del brazo - 3' dentro de la construcción pKS-brazo - 5' puede ser al azar, se seleccionaron clonas que al digerirse con la enzima *Pst I* nos dieran una banda de 8.1 Kb y otra de 1.8 Kb, las cuales reflejan una inserción del brazo - 3' en la dirección 5' - 3' con respecto al brazo - 5' (Fig. 9c).

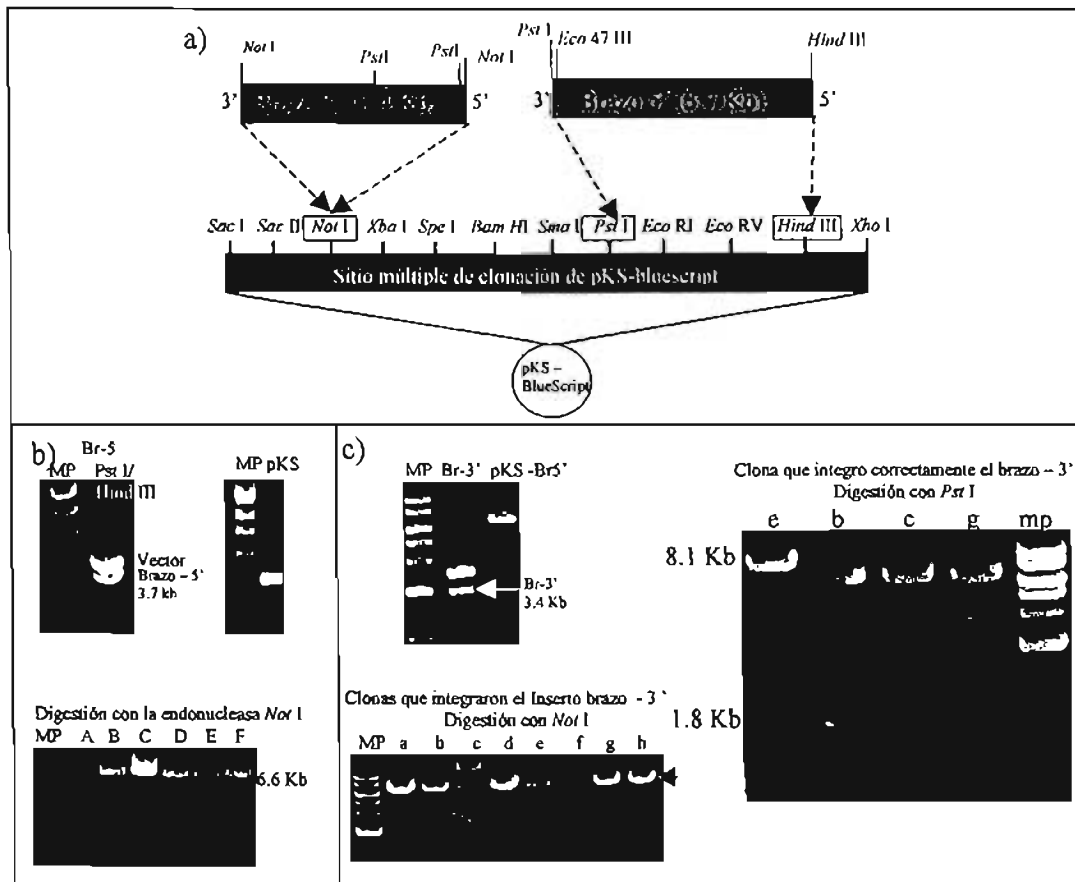


Fig. 9. a) Esquema donde se ilustra el sitio múltiple de clonación del vector pKS - BlueScript y los sitios donde se insertaron brazos de recombinación. b) Arriba se muestra al brazo - 5' y al vector pKS - BlueScript, abajo se muestran las clonas que incorporaron al vector. c) A la izquierda arriba se muestra el DNA lineal pKS-brazo - 5' y el brazo - 3', ambos digeridos con *Not* I, izquierda abajo se muestra las clonas que integraron el brazo - 3', a la derecha se muestra el gel donde se selecciono a la clona que integró correctamente el brazo - 3' (La clona e). Flecha verde señala al brazo - 3', flecha naranja a pKS - brazo 5'+pKS BlueScript.

Inserción del Marcador de Selección Positiva (*SILZFN*) en la construcción pKS- brazos 5' - 3'.

La última parte de la construcción del VRH consistió en la inserción del marcador de selección positiva en medio de los brazos de recombinación. Como se mencionó anteriormente el marcador de selección positiva utilizado es *SILZFN* (Fig. 6b), este transgene se liberó con la restricción *Sac* II/*Xho* I, posteriormente fue rasurado para integrarlo en la construcción (Fig. 10a).

Por otra parte, entre ambos brazos de recombinación se ganaron sitios de restricción tanto del vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (*Bst*X I, *Eco* RV y *Eco* RI) como del sitio múltiple de clonación de pKS-BlueScript (*Xba* I, *Spe* I, *Bam* HI y *Sma* I; Fig. 10a).

Ninguno de estos sitios es compatible con los sitios para insertar SILZFN y tampoco son útiles para otros fines de la construcción, por tanto se eliminaron para evitar futuras complicaciones durante la selección de células que hayan integrado el VRH. Como se muestra en la figura 10a, se utilizaron los sitios *Eco* RV y *Sma* I para eliminar a los demás además de que estos sitios, al dejar extremos rasurados fueron utilizados para integrar a SILZFN (Fig. 10a).

La construcción final del vector de recombinación homóloga dirigido al inicio de *osa-1* se presenta en la figura 10c, una vez que se purificó el VRH fue secuenciado tanto en los extremos de los brazos de recombinación como en extremos del transgene, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos incluidos en los brazos de recombinación (Fig. 10c); se compararon las secuencias corroborando que la inserción estaba en dirección correcta.

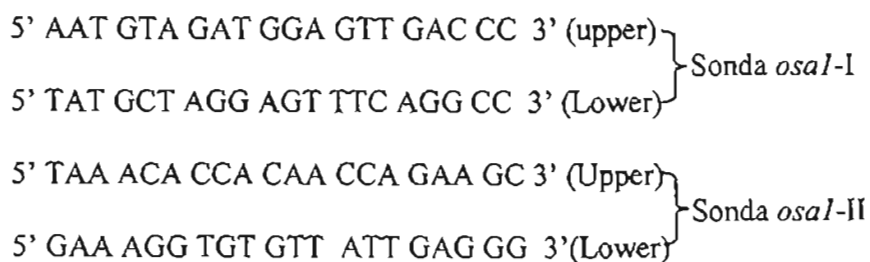
Este vector de recombinación homóloga se puede linearizar con la enzima *Not* I para electroporar células ES y generar la línea celular mutada de *osa-1*, aunque la eficiencia en la recuperación de clonas es relativamente baja. Para aumentar la eficiencia en la obtención de clonas con el VRH en el locus de *osa-1*, proponemos agregarle un marcador de selección negativa (el gen *tk*). Este gen elimina las colonias que insertaron el transgene al azar, puesto que como no se lleva a cabo la recombinación homóloga, no se elimina este gene y su expresión es letal en presencia de glanciclovir, y solo se conservan las colonias de ES que realizaron la recombinación homóloga en el locus de *osa-1*, puesto que el gen *tk* es eliminado durante el intercambio del vector con el DNA genómico.

Las colonias celulares que se obtengan por la electroporación del VRH de *osa-1*, serán genotipificadas con un ensayo de Southern Blot, para identificar colonias

celulares que contengan el alelo *osa-1* alterado y establecer la línea celular que haya recombinado correctamente, además también servirá para genotipificar a los ratones mutantes en un futuro.

Este ensayo nos permitirá diferenciar el alelo *osa-1* silvestre del que fue interrumpido por la presencia del casete SILZFN, por medio de restricción con la enzima *Bam* HI, ya que al digerir el DNA genómico con esta enzima cambia el patrón de restricción en la zona de la inserción (Fig. 10c). En condiciones silvestres esta región contiene dos sitios de restricción de *Bam* HI que flanquean a los exones 1,2 y 3 los cuales están a 15,250 pb de distancia (Fig. 10c inferior). Cuando el transgene es insertado este patrón cambia, puesto que SILZFN lleva un sitio interno de *Bam* HI y se generan dos bandas (8,848 pb y 12,402 pb; Fig. 10c arriba). Se amplificaran dos fragmentos de DNA genómico (alrededor de 800 pb) adyacentes a los brazos de homología, por medio de ensayos de PCR¹⁴, para utilizarlos como sondas en el Southern blot y detectar el cambio en patrón de restricción donde se ubica SILZNF.

La sonda *osal-I* mide 889 pb, y esta ubicada “upstream” del brazo - 5’, la sonda *osal-II*, mide 759 pb y esta ubicada “downstream” del brazo - 3’, ambas en las regiones genómicas de *osa-1*, dentro de los sitio de corte de *Bam* HI. Los oligonucleótidos que servirán como “primers” son (ver esquema Fig. 10c):



¹⁴ Utilizando como templado el DNA de BAC de la clona 416 H22, que contiene la región 5' de *osa-1* (ver Fig. 7 Pág. 42).

Tomando en cuenta que tenemos una construcción con brazos de homología y un marcador de selección positiva, podemos hacer ensayos de recombinación homóloga para obtener nuestra línea de ES con *osa-1* eliminado y corroborar la inserción de nuestro VRH con el ensayo de Southern blot mencionado anteriormente.

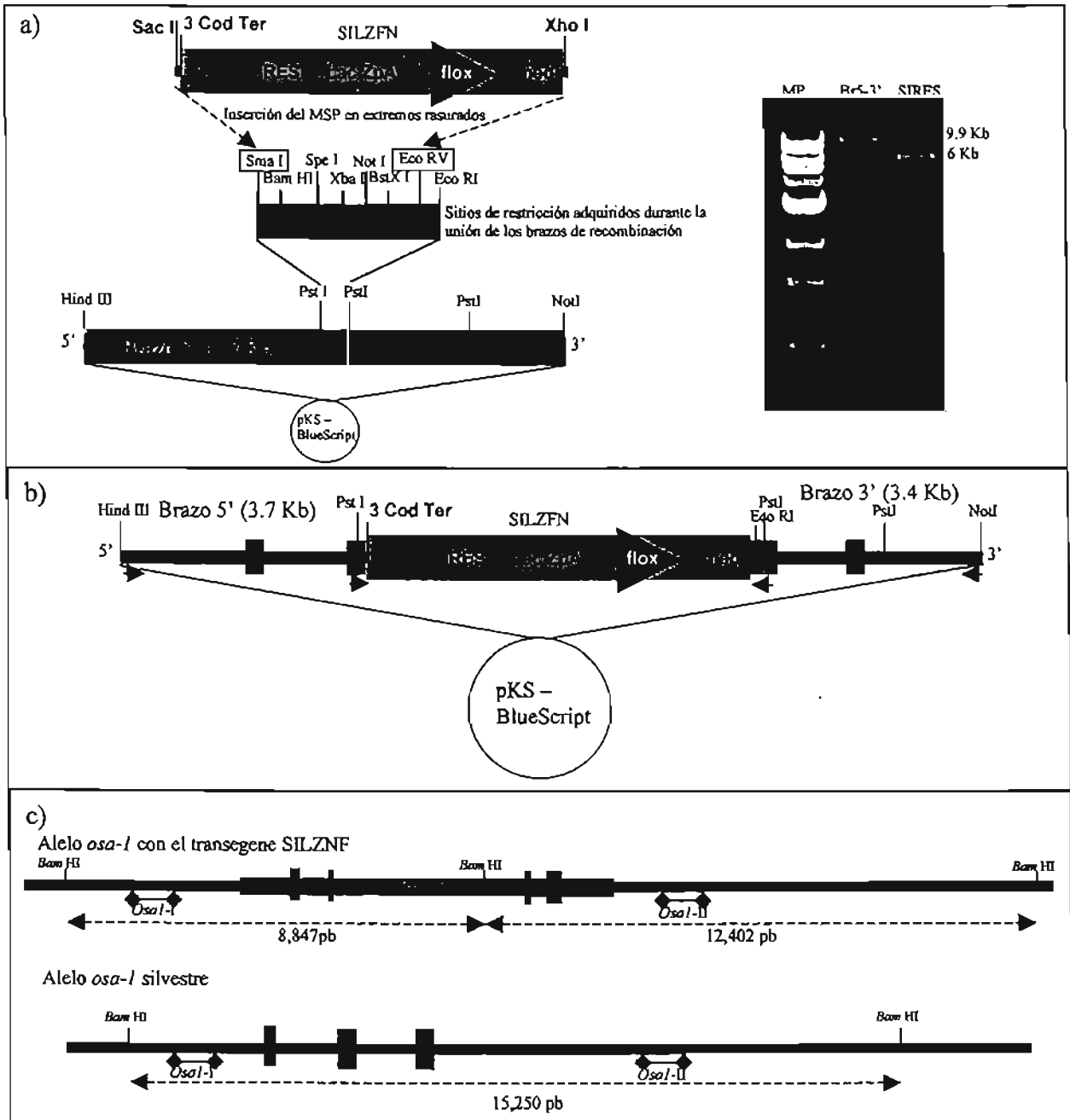


Fig. 10. a) A la izquierda se ilustra la forma de inserción de SILZFN dentro de los brazos de recombinación. A la derecha se muestra el DNA lineal de pKS brazo 5' - 3' y SIRE5. b) Modelo final del vector de recombinación homóloga de *osa-1*. c) Se esquematiza un alelo de *osa-1* alterado con el vector de recombinación homóloga y un alelo silvestre, donde se resaltan los sitios de *Bam* HI que serán utilizados para el Southern blot, para genotipificar la interrupción del *osa-1*. Las flechas punteadas muestran el tamaño de los fragmentos generados con la enzima *Bam* HI. Recuadros azules - exones contenidos en los brazos de recombinación; verde oscuro - SILZFN; las flechas ilustran las regiones secuenciadas de la construcción.

Caracterización de líneas celulares de ES mutadas para los alelos *osa-1*, *osa-2*

Para abordar el estudio funcional de los genes *osa* de ratón, es imprescindible generar líneas celulares con los alelos de *osa* inactivados. Una alternativa adicional al uso de nuestro vector de recombinación homóloga para hacer “gene targeting”, es utilizar líneas celulares con alteraciones genéticas en estos genes, las cuales se encontraban disponibles comercialmente.

Estas líneas son producidas por “Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC), establecido en NIH's National Center for Research Resources (NCRR, USA), y en ellas se utiliza una estrategia de mutagénesis generalizada que consiste en introducir un vector llamado “gene trap”, que al insertarse azarosamente en genes particulares obstruyen su expresión e induce la expresión de genes reporteros contenidos en el vector (Fig. 11a). Posteriormente, se aíslan colonias que contienen el “gene trap” para secuenciarlas a partir de uno de los extremos del vector, obteniéndose así la información sobre el sitio de inserción; dicha información se guarda en bases de datos públicas. De esta manera, pudimos identificar clonas independientes que tienen insertos en los “loci” de los genes *osa-1* y *osa-2* y que deben tener un alelo inactivo de estos genes (ver Esquemas apéndice 4).

Las líneas celulares adquiridas para *osa-2* se llaman XC389 y RRE043, para *osa-1* se cuenta con la línea celular XB677. La cepa de ratón de donde fueron obtenidas las células es 129ola (subcepa de la cepa 129). Otra peculiaridad de los “gene trap” es que en su inicio tienen una región aceptora de splicing, que evita que el marcador de selección positiva (β -Geo, Fig. 11a) sea eliminado durante la maduración del RNA, puesto que este tipo de transgenes generalmente se insertan en intrones.

Posterior a esta región se encuentra la fusión β -Geo seguida de la señal de poli-adenilación. Estas construcciones están hechas en el vector pUC (Fig. 11a).

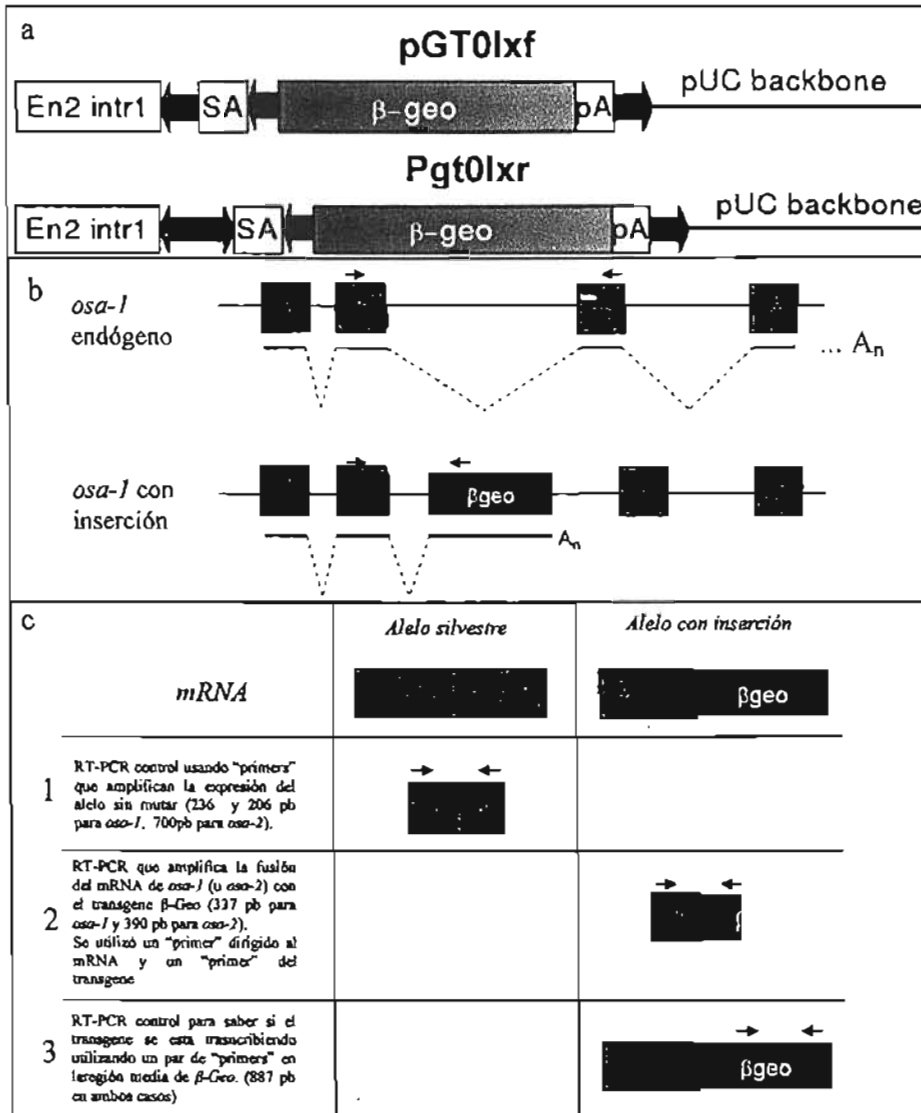


Fig. 11. (a) Esquemas de los "gene traps" incluidos en los genes *osa-1* y *osa-2*. En2 intrón 1 (Intrón: 1.5 kb de ratón); SA (Sitio aceptor de splicing parte del exón 2 de En2); β -geo (fusión de *Lac Z* y el gene de neomicina); pA (Señal de poli-adenilación de SV40); pUC (vector que contiene al transgene); Flecha verde - sitio *Lox71*, Flecha azul - sitio *Lox P*; Flecha roja - sitio *FRT*. (b) Esquema que muestra la inserción del transgene β -Geo en el mRNA de los genes *osa-1* y *osa-2*, el cual posteriormente interrumpirá la traducción de las proteínas silvestres. (c) Esquema del RT-PCR donde se comprobó la inserción del transgene dentro del mRNA de *osa-1* y *osa-2*.

Las líneas celulares que integraron un "gene trap", no lo eliminan durante procesos transcripcionales gracias a las regiones aceptoras de splicing, es decir el MSP (β -Geo) queda incluido dentro del mRNA, por tanto al momento de la traducción de

proteínas solo se traduce el transgene y se interrumpe la producción de la proteína silvestre (Fig. 11b). Basándonos en este antecedente y en que conocemos el sitio donde se insertó el “gene trap” en cada línea celular, se pudieron diseñar oligonucleótidos que servirían como “primers” en ensayos de RT – PCR, para comprobar que el transgene se estaba transcribiendo dentro del mRNA de los genes *osa-1* u *osa-2*, dependiendo de la línea celular examinada (Fig. 11c). Por otra parte, también era necesario expandir las líneas y comprobar que crecían adecuadamente, que presentaban resistencia a neomicina y tenían actividad de β -galactosidasa.

La línea celular XB677 pudo expandirse en presencia de neomicina. Esta línea tiene insertado al “gene trap” entre el exón 3 y 4 de *osa-1* (ver apéndice 4), por tanto los oligonucleótidos diseñados para el control de la transcripción de *osa-1* están flanqueando a estos exones amplificando un fragmento de 236 pb, además de que se contaba con otro par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 206 pb. Con ambos pares de oligonucleótidos se detecta *osa-1* endógeno (Fig. 11c1 y 12a). Los oligonucleótidos que amplifican al mRNA de *osa-1* fusionado con β -Geo, amplifican un fragmento de 337pb (Fig. 12a). Este fragmento comprueba que el transgene se está transcribiendo y está insertado dentro de *osa-1*(Fig. 11c2 y 12a). También se empleó otro control tomando un par de “primers” dentro de β -Geo que amplifica un fragmento de 887 pb para corroborar que se transcribe este gene (Fig. 11c3 y 12a); como control interno se utilizaron un par de “primers” que amplifican un fragmento de alrededor de 250 pb correspondiente al gene de β -actina (Fig. 12a). En la figura 12a se muestra el RT – PCR donde se amplificaron todos los fragmentos descritos, además se realizó la tinción de las células para la expresión de Lac Z, obteniendo señal positiva en esta línea celular (datos no mostrados).

De acuerdo a las secuencia de la base de datos correspondiente, la línea celular XC389 tiene el inserto entre los exones 8 y 9 del locus *osa-2*; la línea RRE043 presenta la inserción entre los exones 9 y 10 (ver apéndice 4); por tanto los oligonucleótidos para el RT – PCR se diseñaron para poder utilizarlos en las dos líneas de *osa-2*, es decir se ubican en el exón 8 y el exón 10 amplificando un fragmento de 700 pb que identifica al transcrito de *osa-2* silvestre en ambas líneas celulares (ver esquema Fig. 11c1). En el caso de la línea XC389 el fragmento quimérico que incluye al transcrito endógeno y al transgene tiene un tamaño de 390 pb, mientras que para la línea RRE043 el tamaño del fragmento es de 718 pb. Los controles de transcripción de *-Geo* y *-act* son los mismos que los utilizados en la línea celular de *osa-1*.

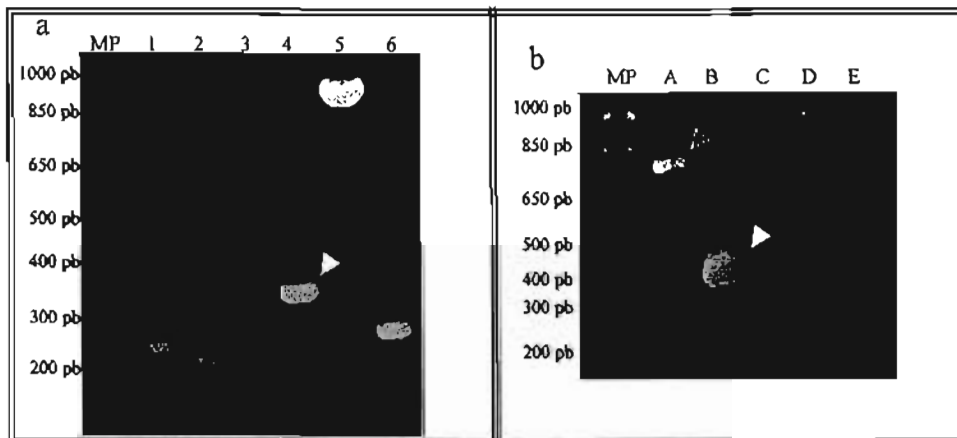


Fig. 12. (a) RT – PCR de la línea celular de *osa-1* XB677 donde se comprueba que el transgene se está transcribiendo y está insertado dentro del mRNA de *osa-1* (flecha blanca), así como la transcripción endógena de uno de los dos alelos del gene *osa-1* (Flechas azules); MP marcador de peso Molecular; (1 y 2) *osa-1* endógeno (236 pb y 206 pb, respectivamente); (3) Control Negativo; (4) fusión *osa-1* con *-Geo* (337 pb); (5) Fragmento de *-Geo* (887 pb); (6) control de *-act* (250 pb). (b) RT – PCR de la línea celular mutada en *osa-2* XC 389, donde se comprueba que el transgene se está transcribiendo y está insertado en el mRNA de *osa-2* (Flecha blanca), así como la transcripción endógena de *osa-2* (Flecha naranja); MP Marcador de peso molecular; (A) *osa-2* endógeno (700 pb); (B) fusión *osa-2* con *-Geo* (390 pb); (C) Fragmento de *-Geo* (887 pb); (D); control de *-act* (250 pb); (E) Control Negativo. Los controles negativos en ambos ensayos consistieron en poner los oligonucleótidos problema en una reacción normal de PCR, sin agregar cDNA, para descartar que los productos amplificados surgieran de una contaminación de DNA en los reactivos utilizados.

Fue muy difícil expandir la línea celular XC389 aun en ausencia de antibiótico. A partir de las células obtenidas, logramos amplificar los transcritos correspondientes a la presencia del inserto (Fig. 12b). Sin embargo, estas células no presentaron actividad positiva del reportero *Lac Z*. En el caso de las células de la línea RRE043, parece que

se diferenciaron al crecer ya que no proliferaron adecuadamente, por lo que no se probó el análisis de RT-PCR en ellas. Distintas explicaciones posibles de porque estas líneas no funcionan adecuadamente se presentan en la discusión.

Patrones de expresión de los genes *osa-1* y *osa-2* durante el desarrollo embrionario de ratón

Se ha reportado que existen dos copias del gene *osa* de mosca en humano, *osa-1* (BAF250 /p270 /ARID1A /hOsa1) y *osa-2* (hELD/OSA1 /BAF250b/ ARID1B/ hOsa2; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003; Wang et al. 2004). Nosotros tomamos la secuencia completa del gene *osa-2* de humano y buscamos en el sitio de Internet http://www.ensembl.org/Mus_musculus, para saber si en ratón también existía una segunda copia de este gene. Ubicamos a *osa-2* en el cromosoma 17 mientras que *osa-1* está ubicado en el cromosoma 4 (Fig. 13; Kozmik et al. 2001). El gene *osa-2* cuenta con 22 exones y mide 316,106 pb del ATG al codón de término, en esta misma base de datos obtuvimos el cDNA predicho para este gene que mide 5421 pb. Se comparó este cDNA con el de *osa-1* para ver el índice de similitud entre ellas, observando alrededor del 48.6% de identidad global a nivel nucleotídico, a nivel protéico muestra una identidad del 56.3% (ver tabla de similitud en apéndice 3).

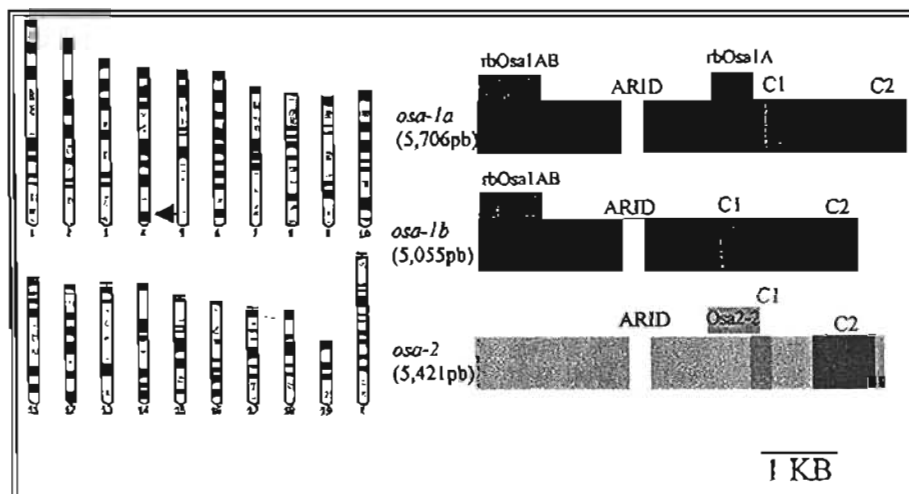


Fig. 13. A la derecha se muestra el cariotipo de ratón se resalta los lugares donde se ubica *osa-1* (Flecha azul) y *osa-2* (flecha color mostaza). A la izquierda se representa tanto las isoformas de *osa-1* como *osa-2* y las regiones clonadas para utilizarlas como ribosondas en ensayo de hibridación *in situ*, el alineamiento esta en el apéndice 5. En verde se representa la sonda *rbOsa-1AB* y en morado *rbOsa-1A*.

Patrón de expresión de osa-1 en el desarrollo temprano de ratón.

Como ya se mencionó, el RNA mensajero de *osa-1* sufre un splicing alternativo de 651 pb entre los nucleótidos 2967 y 3618, generando dos mRNA's alternativos, *osa-1a* y *osa1b* (Fig. 13, ver alineamiento en apéndice 5; Kozmik et al. 2001). Para evaluar el patrón de expresión de estos variantes de RNA's mensajeros, se generaron ribosondas por RT – PCR clonadas en el vector pCR[®]II-TOPO[®] (Fig. 14). Una de ellas contiene 860 pb a la que llamamos rbOsa1AB, corresponde al inicio de la región codificante y reconoce a las a las dos formas de splicing alternativo *osa-1a* y *osa-1b* (ver esquema Fig. 13). Otra es un fragmento de 516 pb llamada rbOsa1A y se ubica en la región involucrada en el splicing alternativo. Esta sonda solo reconoce al transcrito *osa-1A* (ver esquema Fig. 13 y alineamiento en apéndice 5). Las regiones a las que se dirigen estas ribosondas son significativamente diferentes al cDNA de *osa-2*, por lo que es improbable que reconozcan a este mensajero en el ensayo. La ribosonda fue generada a partir de plásmido líneal¹⁴ y ensayos de transcripción *in vitro*, utilizando la RNA polimerasa T7 para obtener la sonda anti-sentido, y la RNA polimerasa Sp6 para obtener la sonda sentido de los fragmentos (Fig. 14). Se utilizaron embriones de 7.5, 8.5, 9.5 y 10.5 de desarrollo para realizar los ensayos de hibridación “in situ”.

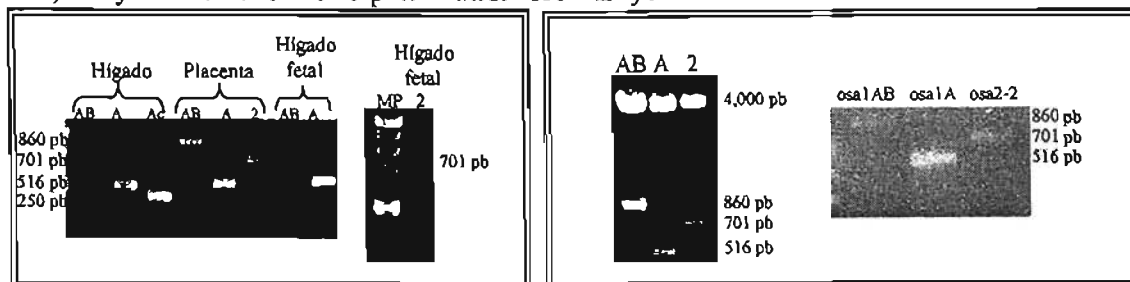


Fig. 14. En el recuadro de la izquierda se muestra el RT-PCR donde se detectaron los dos fragmentos *osa-1* y el fragmento *osa2-2* en distintos tipos celulares (hígado, placenta e hígado fetal). Se puso un control de reacción con oligonucleótidos de β -actina (Solo se muestra para hígado); MP – marcador de peso molecular 1Kb plus. Estos fragmentos fueron utilizados como ribosondas en ensayos de hibridación “in situ”. Panel derecho, se muestran los fragmentos de cDNA clonados en el vector pCR[®]II-TOPO[®], a la izquierda se muestra la ribosonda antisentido para los tres fragmentos.

¹⁴ Para la ribosonda anti-sentido se linearizó con Bam HI y para la sentido con Not I.

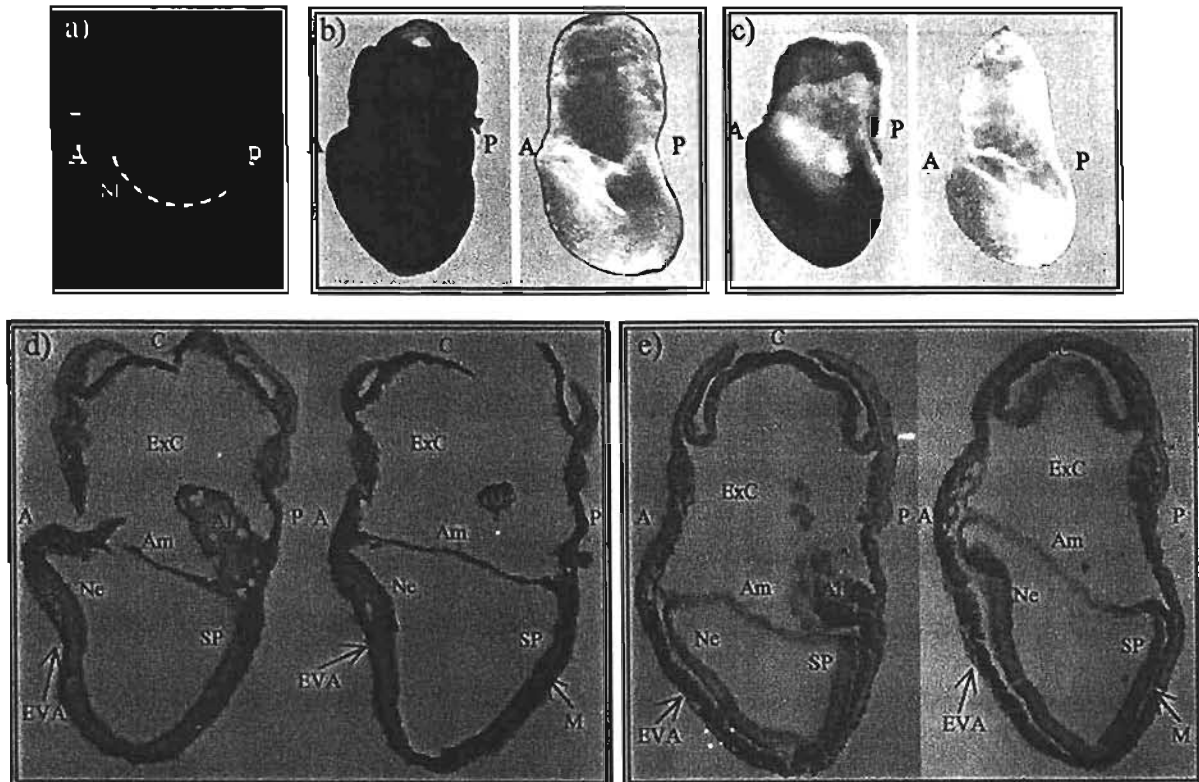


Fig. 15. Embriones de 7.5 dpc. (a) Se denotan las partes que conforman un embrión de este estadio. Por arriba de la línea punteada se encuentra la región extraembrionaria, que incluye al alantoides (rosa), el amnios (naranja), corión (azul) y endodermo viceral extraembrionario (amarillo), por debajo de la línea punteada se muestra la región embrionaria formada por el epiblasto (verde), mesodermo embrionario (azul claro), surco primitivo (rojo), Endodermo viceral embrionario (amarillo). A – región anterior, P – región posterior, NE Neuroectodermo. (b) Se muestra el patrón de expresión con la sonda rbOsa-1AB. (c) Se muestra el patrón de expresión obtenido con la sonda rbOsa-1A. (A la derecha de b y c se muestran los embriones hibridados con la sonda sentido). d) Cortes sagitales de embriones que muestran la señal de rbOsa1AB. e) Cortes sagitales de embriones que muestran la señal de rbOsa1A. C – corión; ExC – exoceloma; Al – Alantoides; Am – Amonios; Ne – Neuroectodermo; EV – Endodermo viceral; M – Mesodermo. A – Anterior; P – Posterior.

El patrón de expresión en embriones de 7.5 dpc se hizo tres veces y para cada ensayo se utilizaron 6 embriones, es decir en un total de 18 embriones para cada sonda (rbOsa-1AB y rbOsa-1A), con la finalidad de corroborar que nuestros patrones de expresión son constantes (Fig. 15).

Las condiciones experimentales utilizadas para los patrones de expresión de ambas ribosondas fueron las mismas, excepto el tiempo de revelado, es decir la ribosonda rbOsa-1AB se expuso a revelado por alrededor de 6 h, después de las cuales se obtenía un patrón de expresión fuerte y generalizado tanto en regiones embrionarias como extraembrionarias (Fig. 15b). En cambio, la sonda rbOsa-1A se expuso

aproximadamente 24 h al revelado¹⁵ obteniendo una ligera tinción en regiones extraembrionarias (alantoides, corion y endodermo visceral extraembrionario) y una expresión un poco mayor dentro del epiblasto en los pliegues neurales y surco primitivo (Fig.15c). Con la finalidad de corroborar que la señal de las ribosondas en ambas hibridaciones realmente fuera generalizada, se realizaron cortes en parafina de los embriones mostrados en las figura 15d y 15e. Aunque la señal para la sonda rbOsa1AB es generalizada, se muestra más intensa en el endodermo visceral anterior (EVA) que en el epiblasto y otras regiones extraembrionarias (Fig.15d). En cambio en los cortes sagitales de las hibridaciones para la ribosonda rbOsa1A, se observó que la señal aunque también es generalizada, es menos intensa, en comparación con la sonda rbOsa1AB. Además esta la sonda rbosa-1A presenta mayor señal en el mesodermo que el resto del embrión (Fig. 15d). Por lo anterior, podemos sugerir que las isoformas de *osa-1*, se expresan en forma generalizada teniendo preferencia por distintos tipos celulares a los 7.5 días de desarrollo. Aunque el ensayo no es cuantitativo, la enorme diferencia en la señal que se observa con las ribosondas descritas sugiere que el transcrito predominante en esta etapa del desarrollo probablemente es *osa-1b*, es decir la forma más corta, que carece del exón 17.

Las hibridaciones “in situ” con ambas ribosondas en embriones de 8.5 dpc. tuvieron el mismo tratamiento, se hicieron por triplicado, con 6 embriones por repetición al igual que en el estadio anterior. En este ensayo la señal producida por la ribosonda rbOsa-1AB aparecía después de 6 h de revelado, mientras que para ver la señal con la ribosonda rbOsa-1A se requería una incubación de alrededor de 16 h. El

¹⁵ Se dejó este tiempo porque ya no se veía aumento en la expresión, entre este tiempo y el anterior (22 h)

patrón de expresión de la sonda rbOsa-1AB es muy intenso al igual que los embriones de 7.5 dpc, pero a los 8.5 dpc *osa-1* queda excluido visiblemente del corazón y de la región anterior de la línea media. Las regiones donde si se esta expresando esta sonda es en el tejido neural (crestas y neuroepitelio dorsal), somitas, arcos branquiales y en el mesodermo presomítico (Fig. 16 b). El patrón de expresión definido para la sonda rbOsa-1A es el mismo que para la sonda descrita anteriormente, solo difiere en intensidad, pero gracias a esta menor señal se definen mejor los lugares donde *osa-1* queda excluido, es decir el corazón y la región anterior de la línea media (Fig. 16c). Se hicieron cortes sagitales de embriones positivos para la ribosonda rbOsa-1AB, para ver si la señal se presentaba tanto en epitelios como en tejido mesenquimales, observando la expresión en ambos tipos celulares, pero con diferentes niveles de expresión siendo más fuerte la señal de rbOsa-1AB, además de que se confirmó que la señal queda excluida del corazón (Fig. 16d y e).

Aunque se sigue viendo menos expresión de la sonda rbOsa-1A, al comparar con los embriones de 7.5 dpc (Fig. 15c), en el estadio de 8.5 dpc. (Fig. 16c) el nivel de la señal es mayor que en el anterior, por lo que podríamos sugerir que el nivel de mensajero *osa-1a* aumenta conforme avanza el desarrollo embrionario de 7.5 a 8.5 dpc en ratón.



Fig. 16. (a) Imagen que muestra las principales regiones de un embrión de 8.5 dpc, corazón (café), intestino (azul), notocorda (verde claro), somitas (verde oscuro), neuroepitelio (amarillo). A – región Anterior, P – región Posterior, D – región Dorsal, V región Ventral. (b) embrión hibridado con la sonda sentido. (c) Se muestra el patrón de expresión la sonda *rbOsa-1AB*, (d) Patrón de expresión obtenido con la sonda *rbOsa-1A*, la señal es menos intensa que en (c), ambas se extienden a lo largo del embrión exceptuando al corazón. (c y d) Derecha – región ventral; Medio– región lateral; Izquierda – región dorsal de embriones de 8.5 dpc. (e) cortes sagitales de un embrión de 8.5 dpc expuesto a la sonda *rbOsa-1AB*. (f) cortes sagitales de un embrión de 8.5 dpc que muestra la señal de la sonda *rbOsa-1A*. CA – cerebro anterior, NE – Neuroepitelio; S – somitas; MP – mesodermo presomítico; C – corazón.

La hibridación “in situ” en embriones de 9.5 dpc se repitió 5 veces y en cada ensayo se utilizaron 5 embriones. Los tiempos de revelado para *rbOsa-1AB* fueron los

mismos que el de los ensayos anteriores, en cambio para la sonda rbOsa-1A se necesitó alrededor de 12 h para obtener la señal mostrada en la figura 17c. El patrón de hibridación obtenido con rbOsa-1AB es muy fuerte a lo largo del embrión, se puede apreciar tanto en el embrión completo (Fig. 17b) como en cortes sagitales (Fig. 17d) y al igual que en los estadios anteriores, no se ve expresión en el corazón. Un patrón de expresión similar ocurre para rbOsa1A pero en menor intensidad a lo largo de todo el embrión, notándose más en el cerebro medio y en el neuroepitelio ventricular (Fig. 17c). Basándonos en los niveles de intensidad de la sonda rbOsa1A y en que los tiempos de revelado disminuyen considerablemente en cada ensayo de un estadio a otro, podríamos sugerir que hay un aumento en la expresión del mensajero a través del desarrollo.

El patrón de expresión de los embriones de 10.5 dpc se hizo por duplicado con 5 embriones por ensayo, los tiempos de revelado fueron los mismos que para los embriones de 9.5 dpc. A diferencia de éstos, en los embriones de 10.5 dpc parece que la expresión de *osa-1* no es tan generalizada, ya que se excluye del cerebro medio, de la parte posterior del tubo neural (cerca de la cola) y de la parte dorsal del embrión (es decir, el lomo: Fig. 18a y b). A diferencia de lo que se observó en los estadios 8.5 y 9.5 dpc, en este estadio *osa-1* se expresa levemente en corazón. Al hacer cortes sagitales de estos embriones, observamos que la tinción se concentraba prioritariamente en los epitelios; en el mesénquima neural también se presentaba señal aunque en menor cantidad. Ambas sondas mostraron un patrón de expresión similar, la única diferencia fue el tiempo de revelado (el mismo que a los 9.5 dpc).

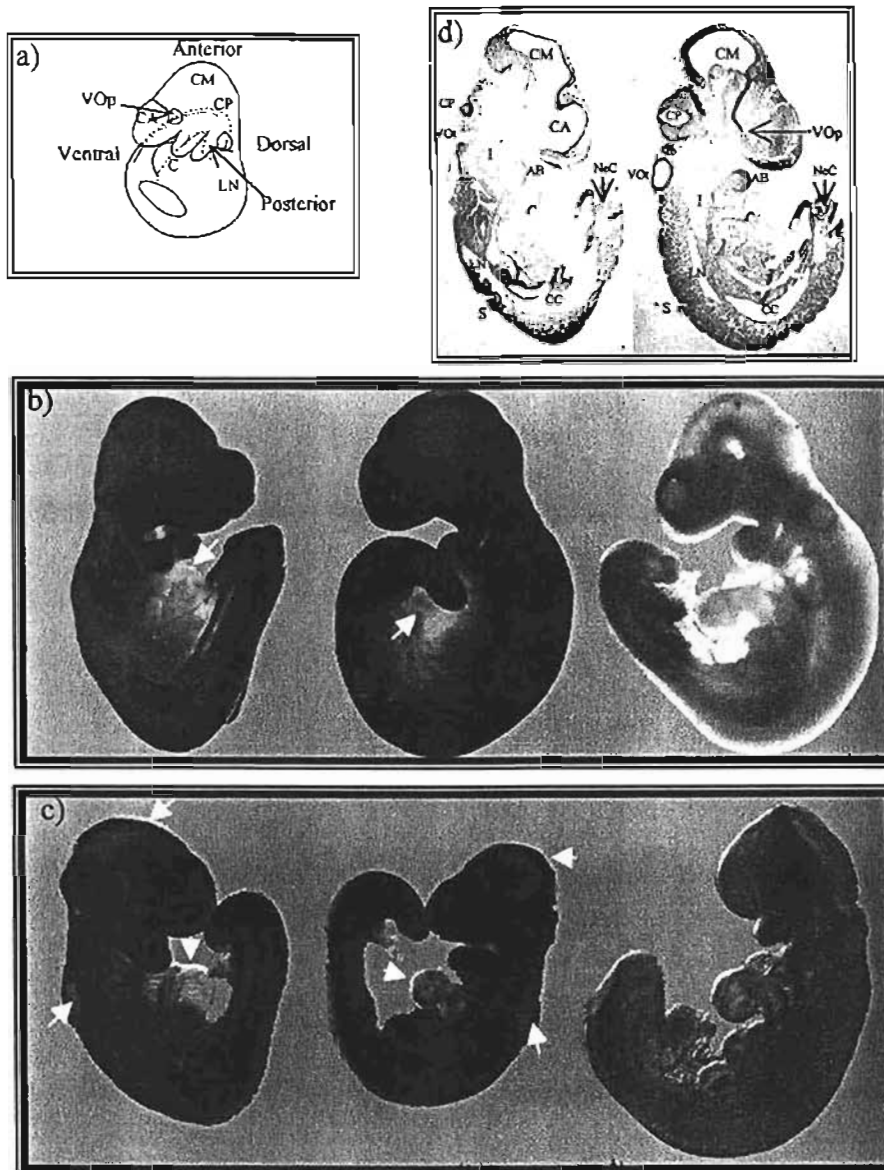


Fig. 17. (a) Esquema que muestra las partes visibles de un embrión completo de ratón de 9.5 dpc. (b) Hibridación in situ con la ribosonda *rbOsa-1AB* (izquierda y centro); derecha, se muestra la hibridación con la sonda sentido, el único lugar donde no se ve tinción es en el corazón. (c) Patrón de expresión obtenido con la *rbOsa-1A*. La expresión se ve generalizada pero en menor intensidad que en la figura (b), se excluye del corazón y del cerebro medio. (d) Cortes sagitales. Imagen izquierda: embrión hibridado con *rbOsa-1AB*; derecha, corte de un embrión hibridado con *rbOsa-1A*. CA - cerebro anterior, CM cerebro medio, CP - cerebro posterior, VOp - vesícula óptica; VOt - vesícula ótica; AB - Arcos braquiales; C- Corazón; I - Región Intestinal; CC - cavidad celómica; S - región de somitas; LN - lumen Neural; NcC - Neuroepitelio Caudal (las flechas blancas señalan los lugares donde disminuye o no hay señal en las hibridaciones - corazón, cerebro medio y lumen neural-).

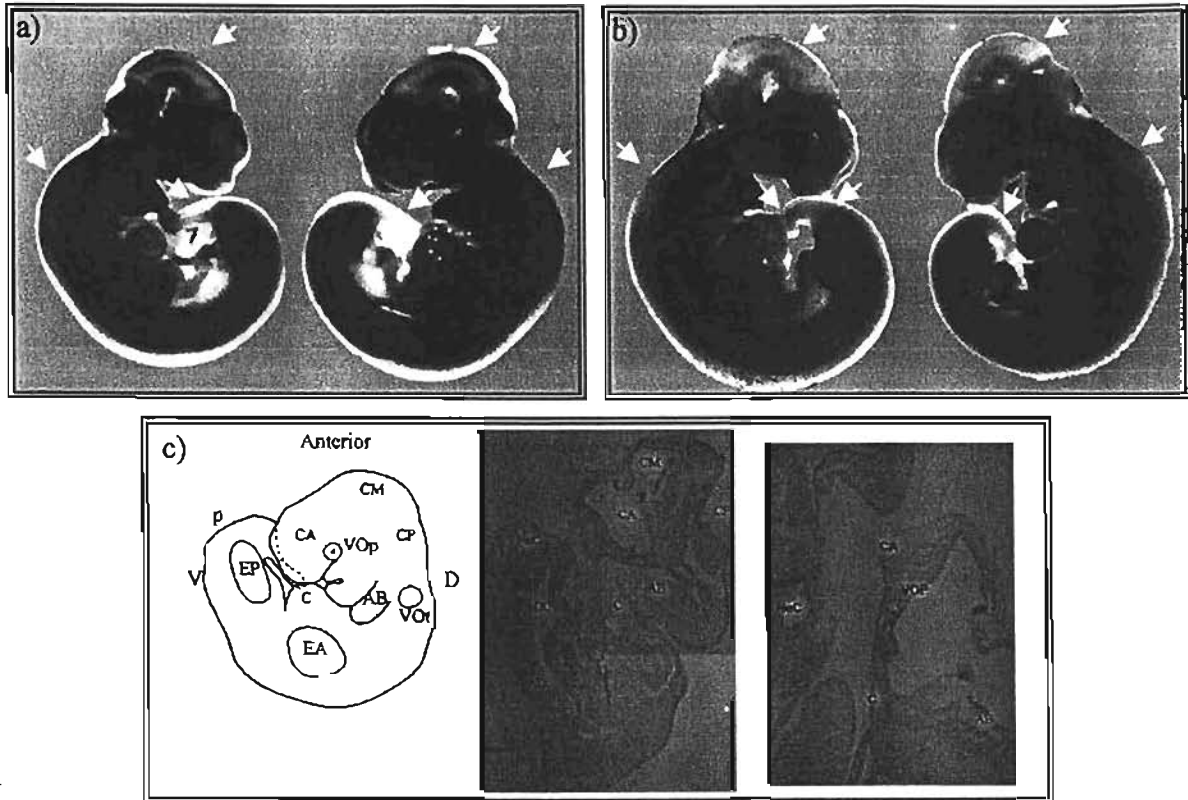


Fig.18. (a) Patrón de expresión de la *rbOsa1AB* en embriones de 10.5 dpc. La expresión se ve muy fuerte a lo largo del embrión. En el corazón la expresión se ve muy levemente, a diferencia de los otros estadios, en otras regiones la expresión disminuye (cerebro medio, en la punta de la cola y región dorsal del embrión). (b) Expresión de la sonda *rbOsa1A* en 10.5 dpc. La expresión se excluye del cerebro medio, región dorsal del embrión y en la punta de la cola. c) Cortes de embriones hibridados con la sonda *rbOsa1AB*, la expresión se observa principalmente en las regiones epiteliales del embrión. P - Posterior, V - Ventral; D - Dorsal; CA - cerebro anterior; CM cerebro medio, CP - cerebro posterior; VOp - vesícula óptica; VOt - vesícula ótica; AB - Arcos braquiales; C - Corazón; I - Región Intestinal; CC - cavidad celómica; S - región de somitas; NeC - Neuroepitelio Caudal; F - Faringe; AD - aorta dorsal; EA - extremidad anterior; EP - extremidad posterior (las flechas blancas señalan los lugares donde disminuye o no hay señal en las hibridaciones (corazón, cerebro medio y lumen neural)).

Patrón de expresión de osa-2 durante el desarrollo temprano de ratón.

En base a la comparación entre la secuencia de *osa-1* y *osa-2*, se seleccionó un fragmento de 701 pb, al que se llamó *osa2-2*, para utilizarlo como ribosonda en ensayos de hibridación in situ en embriones completos de ratón (Figs. 13, 14; pág. 56, 57, ver alineamiento en apéndice 6). Este fragmento se amplificó por RT – PCR y se clonó en el vector pCR[®]II-TOPO[®], al igual que las ribosondas de *osa-1*, el RNA antisentido se transcribió con la polimerasa T7 y el sentido con la polimerasa Sp6 (Fig. 14). Las condiciones que se utilizaron en el ensayo son las mencionadas en el protocolo de material y métodos. Los tiempos de revelado de esta sonda fueron alrededor de 40 h, lo que nos podría sugerir una baja expresión de *osa-2*. El patrón de expresión en embriones de 7.5 dpc se hizo por triplicado y en cada ensayo se utilizaron 6 embriones (Fig. 19).

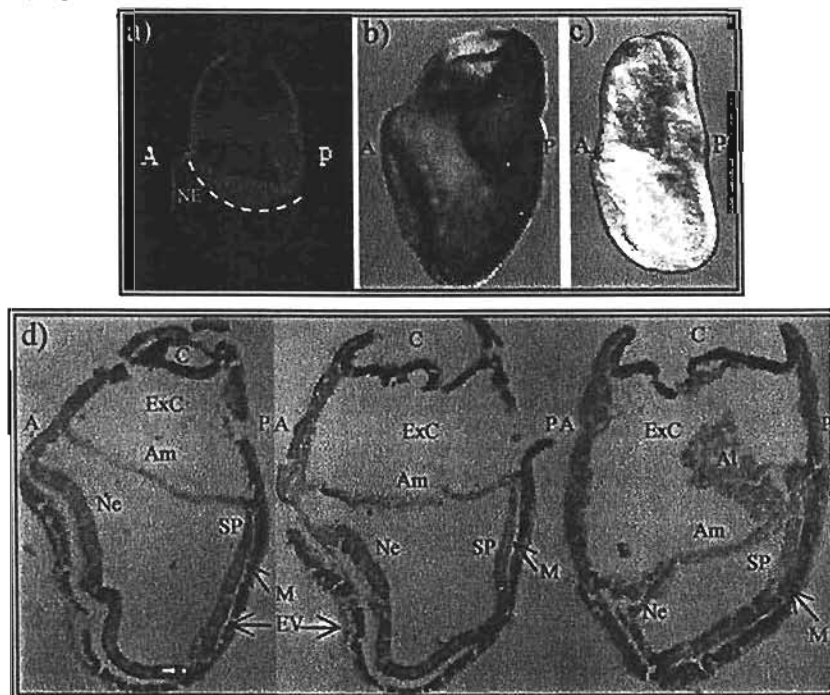


Fig. 19. Embriones de 7.5 dpc. (a) Se denotan las partes que conforman un embrión de este estadio. Por arriba de la línea punteada se encuentra la región extraembrionaria, que incluye al alantoides (rosa), el amnios (naranja), corión (azul) y endodermio visceral extraembrionario (amarillo), por debajo de la línea punteada se muestra la región embrionaria formada por el epiblasto (verde), mesodermio embrionario (azul claro), surco primitivo (rojo), Endodermio visceral embrionario (amarillo). A – región anterior, P – región posterior, NE Neuroectodermio. (b) Patrón de *osa-2* (c) Embrión Hibridado con la ribosonda sentido. (d) cortes sagitales de embriones hibridados con la sonda *rtOsa2-2*. C – corión; ExC – exocoeloma; Al – Alantoides; Am – Amionios; Ne – Neuroectodermio; M – Mesodermio; EV – Endodermio visceral; A – Anterior; P – Posterior.

En embriones de 7.5 se observa una expresión débil de *osa-2*. Que se presenta principalmente en el neuroepitelio, en la región del surco primitivo, endodermo visceral extraembrionario (Fig. 19). Aunque no hay un patrón excluyente en embriones de 7.5 dpc entre *osa-1* y *osa-2*, si hay diferencia en la intensidad de expresión de señal, sugiriendo que *osa-2* se podría expresar débilmente y en zonas mas definidas, mientras que *osa-1* se expresa fuertemente en este estadio del desarrollo tanto en regiones embrionarias como extraembrionarias. El patrón de expresión de *osa-1* incluye las regiones donde se expresa *osa-2*.

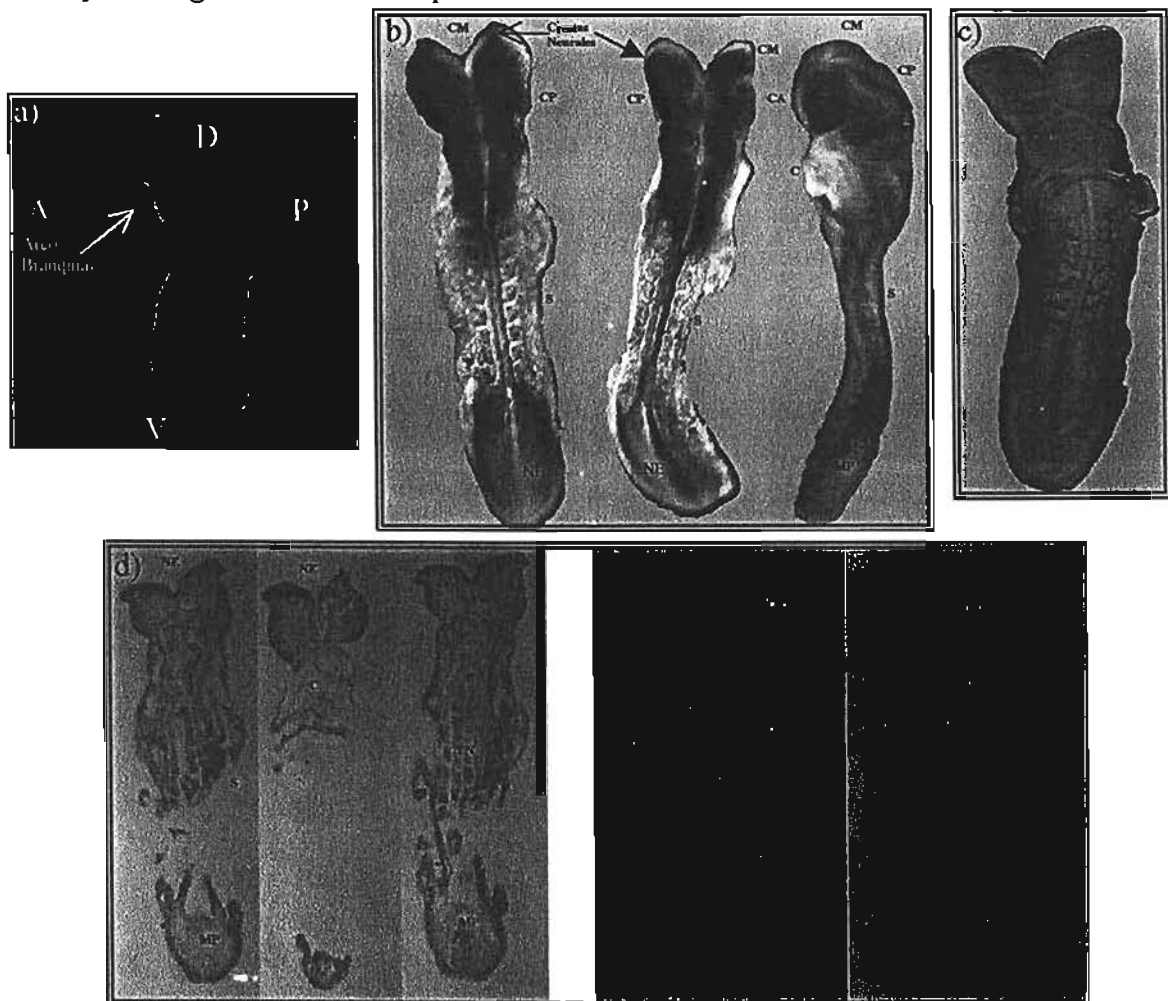


Fig. 20. (a) Imagen que muestra las principales regiones de un embrión de 8.5 dpc, corazón (café), intestino (azul), notocorda (verde claro), somitas (verde oscuro), Neuroepitelio (amarrillo). A – región Anterior, P – región Posterior, D – región Dorsal, V región Ventral. (b) Se muestra el patrón de expresión de *osa-2* en embriones de 8.5 dpc; izquierda y centro vista dorsal, derecha vista lateral. (c) Embrión hibridado con la sonda sentido. (d) A la izquierda se muestran cortes transversales y derecha cortes sagitales de los embriones hibridados con la sonda *rbOsa2-2*. CA – cerebro anterior; CM – cerebro medio; CP – cerebro posterior; NE – Neuroepitelio; S – somitas; MP – mesodermo presomítico; C – corazón; TN – tubo neural; I – intestino.

El ensayo en embriones de 8.5 dpc se hizo por triplicado, con 5 embriones por ensayo; el tiempo de revelado fue de 48 h, a pesar de ese tiempo se observa una expresión muy tenue y se restringe al neuroepitelio, mostrando mayor expresión en las crestas neurales (Fig. 20b). Esta continuidad entre el estadio anterior y 8.5 dpc, nos hace sugerir que *osa-2* se expresa muy débilmente en el desarrollo temprano de ratón y se restringe al tejido neural, a diferencia de *osa-1* que en este estadio se expresa fuertemente en casi todos los tejidos, excepto en el corazón. Con este antecedente se procedió a establecer los patrones de expresión de *osa-2* en embriones de 9.5 y 10.5 dpc. Las hibridaciones hechas en ambos casos fueron por triplicado utilizando 5 embriones por ensayo. Los patrones fueron constantes con un tiempo de revelado de alrededor de 48 h. Como se muestra en la figura 21a, a los 9.5 dpc, el nivel de expresión de *osa-2* aumenta en relación al estadio anterior, expresándose en la parte ventral del embrión, esta región incluye al intestino, cavidad celómica, cerebro anterior, primer arco branquial, la aorta dorsal y el neuroepitelio de la región caudal. El nivel máximo de expresión se encuentra en los arcos branquiales y en la región del mesénquima cefálico, pero no es tan abundante y extendido como el de *osa-1*.

A los 10.5 dpc la expresión de *osa-2* vuelve a disminuir, aunque se expresa en los mismos lugares que en los embriones de 9.5 dpc, la intensidad es menor. En cortes sagitales hechos para estos embriones observamos que la expresión se localiza con mayor intensidad en epitelios (neurales, intestinales), y es muy tenue en el mesénquima (Fig. 21c y d).

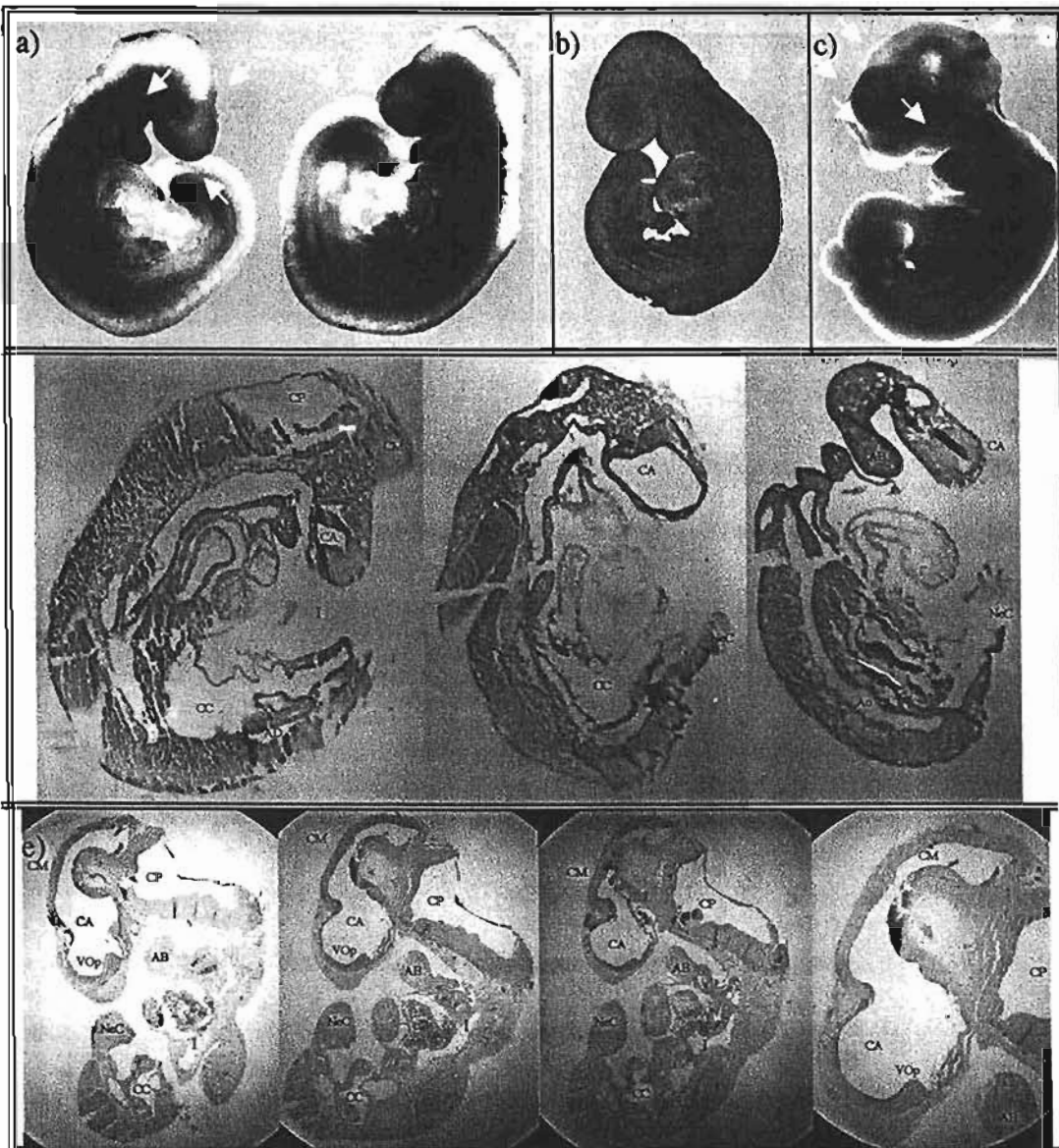


Fig. 21. (a) Patrón de expresión de *osa-2* en embriones de 9.5 dpc, la expresión es mas fuerte que en los estadios anteriores observándose en el cerebro anterior y en toda la región ventral del embrión. (b) Hibridación con la sonda sentido. (c) Patrón de expresión de *osa-2* a los 10.5 dpc. La expresión es muy tenue se observa en el cerebro anterior y en la parte ventral del embrión; d) Cortes sagitales de hibridaciones en embriones de 9.5 dpc con *rbOsa2-2*. e) Cortes seriados de un embrión de 10.5 dpc hibridado para *osa-2*, donde se denota una señal muy débil, principalmente en los epitelios del neuroectodermo. CA – cerebro anterior; CM cerebro medio, CP – cerebro posterior; VOP – vesícula óptica; VOT – vesícula ótica; AB – Arcos braquiales; C- Corazón; I – Región Intestinal; CC – cavidad celómica; S – región de somitas; LN – lumen Neural; NeC – Neuroepitelio Caudal; Ao - Aorta.

Con base en los resultados presentados anteriormente podemos decir que *osa - 1*

(con sus isoformas a y b) se expresan muy fuertemente durante el desarrollo embrionario temprano a diferencia de *osa - 2*, cuya expresión es débil en estas etapas. Aunado a lo anterior no hay un patrón de expresión diferencial entre ambos genes, ya

que *osa-1* esta presente en las regiones donde se expresa *osa-2*. Al amplificar los fragmentos de cDNA para las ribosondas se utilizaron tejidos adultos y fetales. En ambos casos se pudieron amplificar los fragmentos de ambos genes, este resultado es similar a lo reportado en humano, ya que se conocen ensayos de northern blot, donde se observa que tanto el mRNA de *osa-1*, como el de *osa-2* están expresados al mismo tiempo independientemente del órgano analizado (Nie et al. 2000; Nie et al. 2003, Wang et al. 2004), por lo que nuestros datos son consistentes con estas observaciones.

DISCUSIÓN

Patrones de expresión de los genes osa-1 y osa-2

En este trabajo se establece el patrón de expresión de los genes *osa-1* y *osa-2*, así como de los mRNA's alternativos de *osa-1* (*osa-1a* y *osa-1b*), con la finalidad de explorar si existía un patrón diferencial y/o excluyente entre dichos transcritos.

Los patrones de expresión de las isoformas *osa-1a* y *osa-1b* tienen una expresión fuerte y aparentemente ubicua en los estadios analizados, pero es importante mencionar que no hay señal de estas isoformas durante el desarrollo del corazón. Sin embargo, logramos observar diferencias claras en los patrones de expresión de ambas isoformas en el estadio de 7.5 dpc, donde observamos que *osa-1a* presenta mayor señal en la región del mesodermo (Fig. 15e), en el caso de *osa-1b* el nivel de expresión mayor se localizó en el endodermo visceral anterior. Esto sugiere en primer término que las distintas isoformas de *osa-1* podrían llevar a cabo funciones similares en durante el desarrollo temprano, porque ambas isoformas tienen patrones de expresión aparentemente sobrelapados. La diferencia en la señal entre las isoformas en el EVA y mesodermo podría reflejar un papel más específico en donde se determina el eje antero – posterior, tomando en cuenta que el EVA es un centro de señalización importante en la embriogénesis. (revisado en Gilbert S, 2003).

De forma general, sugerimos que la isoforma mayor de *osa-1* (*osa-1a*) muestra una expresión débil en estadios tempranos pero parece aumentar conforme avanza el desarrollo embrionario. Por otra parte, nuestros datos sugieren que la isoforma *osa-1b* se expresa fuertemente durante los estadios embrionarios analizados.

A diferencia de *osa-1*, la expresión de *osa-2* se presenta muy débilmente durante el desarrollo temprano y a partir de 9.5 dpc se restringe a ciertas regiones

embrionarias; se observa más específicamente en el cerebro anterior, vesícula óptica y otros tejidos de la parte ventral del embrión (intestino, arco branquial, venas del sistema circulatorio), y también parece estar excluido del corazón. De manera similar, en ensayos semicuantitativos de RT-PCR hechos a partir de hígado de adulto y placenta, se observa que *osa-1* se expresa más que *osa-2* (Fig. 14). Recientemente se reportó que *osa-1* se expresa 3.5 veces más que *osa-2* en varias líneas celulares tumorales de humano (Wang et al. 2004), tales como las líneas HeLa, SW-13, Pc-3, SAOS-2, OHS-50 y MCF-7¹⁶ (Decristofaro et al. 2001). En todas estas líneas *osa-1* presenta el mismo nivel de expresión, por lo que se sugiere que la relación de mRNA 3.5:1 (*osa-1*: *osa-2*) reportada por Wang X. y col. corresponde al nivel endógeno de células normales. Los patrones aquí mostrados, presentan un bajo nivel para *osa-2* y mucho más alto para *osa-1* (Figs. 19-21), análogos a los reportados para líneas celulares de humano, reafirmando que el gene *osa-1* se expresa en mayor proporción y en más tejidos que el gene *osa-2* tanto en el desarrollo embrionario como en etapas adultas.

Ambos genes *osa* son capaces de estimular la transcripción de receptores nucleares hormonales en humano (Nie et al. 2000; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002), Wang y col. realizaron ensayos con cultivos de líneas celulares humanas, donde suprimen al dominio ARID tanto de *osa-1* como de *osa-2* observando una disminución similar en la activación de receptor de glucocorticoides (Wang et al. 2004), por lo que se sugiere que los genes *osa-1* y *osa-2* tienen blancos similares, además de que dependen del dominio ARID (involucrado en la interacción con el DNA) para activar

¹⁶ Líneas tumorales de cervix (HeLa), adenocarcinoma (SW-13), próstata (Pc-3), osteocarcinoma (SAOS-2), OHS-50 es de osteosarcoma y la línea MCF-7 es de cáncer de mama.

al menos al receptor nuclear de glucocorticoides (Wang et al. 2004). Otra evidencia sobre las posibles convergencias funcionales de *osa-1* y *osa-2* es que ambas proteínas pueden interaccionar con el complejo BAF de forma independiente, puesto que en líneas tumorales de humano ambos genes *osa* se localizan en el complejo BAF en la misma línea celular, pero no co-inmunoprecipitan en un mismo complejo (Wang et al. 2004). Basándonos en lo anterior y en que el patrón de expresión de *osa-1* es muy fuerte y sobrelapa con las regiones de expresión de *osa-2* en el período medio de gestación, es probable que *osa-1* pueda suplir la función de *osa-2* si éste último se muta, tal como sucede con la complementación de función entre las ATPasas *BRG1* y *BRM* (Reyes et al. 1998; Bultman et al. 2000).

Como ya se mencionó con los ensayos de hibridación “in situ” observamos que la expresión de *osa-1* y *osa-2*, se excluye del corazón durante el desarrollo temprano. Recientemente se reportó que el ratón “knockout” de la subunidad exclusiva del complejo PBAF¹⁷ llamada Polibromo (BAF180) es letal, presentando deficiencias en el desarrollo del corazón lugar donde se expresa fuertemente dicha subunidad (Wang Z, et al. 2004). Por tanto, basándonos en que desde levadura hasta mamífero los complejos BAF (donde están presentes *osa-1* y *osa-2*) y PBAF regulan diferentes genes y procesos (ver Introducción), la ausencia de expresión de los genes *osa-1* y *osa-2* en el corazón, corroboraría que también en ratón existe regulación diferencial entre los complejos BAF y PBAF, ya que el desarrollo del corazón depende de la acción del complejo PBAF (Wang Z, et al.2004), en el cual ninguno de los genes *osa* interactúan.

¹⁷ Donde no están presentes ni *osa-1* ni *osa-2*.

Comparación de los patrones de expresión de osa-1 y osa-2 con otras subunidades del complejo BAF.

Se conocen los patrones de expresión de *Brg1* (Brm de mosca; Fig. 21a; Randazzo et al. 1994), *BAF155/Srg3* (MOIRA; Fig. 22b y Tabla 6; Kim et al. 2001), *SNF5/INI1* (SNR1; Fig. 22c y Tabla 6; Klochendler-Yeivin et al. 2000) y *BAF60c* (BAP60, Fig. 22d y Tabla 6; Lickert, Takeuchi et al. 2004), durante el desarrollo de ratón. Además se han reportado experimentos de western blot donde se muestra que la ATPasa BRM se transcribe y traduce pobremente durante el desarrollo embrionario, pero no se ha determinado su patrón de expresión “in situ”. También se sabe que en ratones mutantes nulos para el gen BRM, la otra ATPasa (*Brg1*) puede complementar la función de Brm (Reyes et al. 1998). El transcrito *Brg1* se presenta en forma ubicua y muy intensamente a lo largo de la embriogénesis, por tanto su patrón de expresión debe sobrelapar con el de todos los genes del complejo. *BAF155/Srg3* y *SNF5/INI1* están presentes en cerebro, médula espinal, retina y arcos branquiales (Fig. 22b y c). *BAF60c* se expresa muy fuerte y específicamente en el corazón, y se ha determinado que es necesario para el desarrollo de este órgano (Fig. 22d; Lickert et al. 2004). Los patrones de expresión de los genes *osa-1* y *osa-2* sobrelapan con los de *Brg1*, *BAF155/Srg3* y *SNF5/INI1*, pero como ya se mencionó, ninguno de los genes *osa* sobrelapa con el patrón de *BAF60c* en el corazón. Lo que sugiere que existen una variedad de complejos tipo BAF que podrían definirse de acuerdo al órgano.

Tabla 6. Resumen de los fenotipos y patrones de expresión de las subunidades del complejo BAF que se han caracterizado hasta el momento. (* - En este reporte realizan el silenciamiento del gene utilizando RNA de interferencia específicos para BAF60c).

Subunidad	Fenotipo -/-	Fenotipo +/-	Expresión en el desarrollo embrionario	
mBm (ATPasa)	Viable	Aumento en proliferación celular	Mínima	Reyes et al. 1998
Brg1 (ATPasa)	Letal	Excencefalia Susceptibilidad al cáncer.	Ubicua y fuerte durante toda la embriogénesis.	Bultman et al. 2000
SNF5/ini1	Letal	Susceptibilidad al cáncer.	Fuerte en el desarrollo temprano y se restringe al sistema nervioso a partir de los 8.5 dpc.	Klochender-Yevin, et al. 2000 Roberts C, et al. 2000
BAF155/Srg3	Letal	Excencefalia	Ubicua y fuerte durante toda la embriogénesis.	Kim et al. 2001
BAF60c	Letal*	Defectos en desarrollo del corazón.	Se expresa principalmente en el corazón y en menor expresión en las somitas.	Lickert et al. 2005
<i>osa-1</i>	¿?	¿?	Fuerte y generalizada a los 7.5dpc. De los 8.5 a los 10.5 dpc la expresión es fuerte y a lo largo de los embriones exceptuando al corazón y la región posterior del tubo neural	
<i>osa-2</i>	¿?	¿?	A los 7.5 dpc parece la expresión es débil y en regiones embrionarias. De los 8.5 a 10.5 dpc la expresión es débil y parece estar restringida a regiones del sistema nervioso y parte ventral del embrión.	
Polybromo (BAF 180)	Letal	Defectos en desarrollo del corazón	Se expresa principalmente en el corazón y en menor expresión en las somitas y en extremidades.	Wang et al. 2004

Por los patrones de expresión sabemos que *osa-1*, se esta co-expresando con *Brg1* y *BAF155/Srg3* en casi todo el embrión, por tanto podríamos sugerir una interacción entre estos genes formando un complejo BAF como se conoce en *D. melanogaster*. En el caso de *SNF5/INI1* *osa-1* se co-expresa en los arcos branquiales, cerebro anterior y en la medula espinal y probablemente puedan interaccionar en dichas regiones para formar otra variedad del complejo BAF interaccionando con *Brg1* y *BAF155/Srg3*.

En mamífero se conocen al menos tres genes homólogos de BAF60 (a, b, c), aunque no se han caracterizado *BAF60a* y *BAF60b* en ratón, en células de humanos ambas proteínas co-inmunofraccionan tanto con *osa-1* como con *osa-2*, pero no se conoce reporte donde detecten a *BAF60c* con alguna de las proteínas OSA (Nie et al.

2000; Hurlstone et al. 2002; Nie et al. 2003), por tanto podríamos sugerir que durante el desarrollo de ratón *BAF60c* y los genes *osa-1* y *osa-2*, no se co-expresan porque el complejo BAF que contiene a los genes *osa* de ratón está preferentemente unido a *BAF60a* y/o *BAF60b*, y el producto del gene *BAF60c* forma parte de otro complejo tipo BAF donde ni *osa-1* y *osa-2* están incluidos, por ejemplo el complejo PBAF.

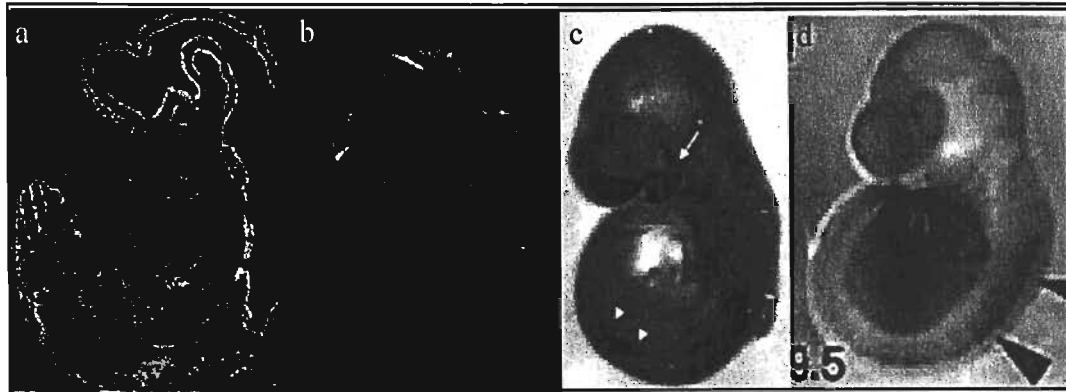


Fig. 22. (a) Corte sagital de un embrión de 9.5 que muestra la expresión de *Brg1*. (b) Corte sagital de un embrión de 12.5 dpc que muestra la expresión de *BAF155/Srg3*. (c) embrión de 9.5 dpc que muestra la expresión de *SNF5/INI1*. (d) Embrión de 9.5 dpc que muestra la expresión de *BAF60c* (imágenes tomadas de: (Randazzo et al. 1994; Roberts et al. 2000; Kim et al. 2001; Lickert et al. 2004).

Como se mencionó en la introducción, se han caracterizado las pérdidas de función de los genes *Brg1*, *BAF155/Srg3* y *SNF5/INI1*, obteniéndose que los mutantes homocigotos nulos de los tres genes son letales y los ratones heterocigotos muestran fenotipos parecidos, es decir son susceptibles a tumorigenesis y por otro lado muestran defectos en el desarrollo del cerebro; como excencefalia (Bultman et al. 2000; Klochendler-Yeivin et al. 2000; Roberts et al. 2000; Kim et al. 2001).

Tomando en cuenta que no se han reportado estudios funcionales para ninguno de los genes *osa*, basándonos en los fenotipos mencionados anteriormente, sugerimos que el fenotipo del mutante nulo para *osa-1* podría ser letal durante el desarrollo temprano, debido a la gran abundancia de su mRNA, además se expresa con mayor intensidad en regiones fundamentales para el desarrollo del embrión como en el

EVA, otra dato que sustenta nuestra hipótesis es que la mutante nula de *osa* en *D. melanogaster* es letal durante el desarrollo temprano (Vazquez et al. 1999).

Por otra parte, podría esperarse que el fenotipo heterocigo de *osa-1* resulte susceptible a la tumorigénesis como en el caso de los mutantes *Brg1* y *SNF5/INI1*, tomando en cuenta que al menos dos líneas celulares tumorigénicas de humano (C33A de cáncer cervical y T47D de cáncer de mama) tienen reducida la expresión de *osa-1* (Wang et al. 2004), por tanto el bajar el nivel de expresión de *osa-1* en el ratón probablemente genere tumores, ya que la expresión de *osa-2* no será suficiente para complementar la función de *osa-1*, tal como sucede con las ATPasas del complejo BAF de mamífero.

En cambio como la expresión de *osa-2* durante el desarrollo temprano de ratón es débil, posiblemente el mutante nulo para este gene no presente letalidad en la embriogénesis, porque adicionalmente *osa-1* podría complementar la función de *osa-2*. En el ratón adulto se podría observar algún fenotipo débil, como sucede con la mutante de *BRM* que solo se presenta un aumento en la proliferación celular de algunos órganos (Reyes et al. 1998).

Perspectivas para la obtención de ratones mutantes para los genes osa.

Para determinar de manera contundente si *osa-1* tiene un papel esencial durante el desarrollo temprano será necesario inactivarlo *in vivo*. Por tanto, como parte de este trabajo se generaron distintas herramientas que nos ayudarán en este propósito. Una de ellas es la construcción del vector de recombinación homóloga dirigido al inicio de la traducción que será de utilidad en la obtención de células ES con un alelo mutado de *osa-1* en su región 5'. Además, contamos con la línea celular XB677,

mutada para *osa-1*, la cual tiene insertado al transgen β -Geo en el nucleótido 775 del mRNA por lo que se interrumpe la traducción a partir de ahí, generándose un péptido de 258 aa correspondientes a la región N – terminal de *osa-1*. Esta región no se ha implicado en la función de la proteína, por tanto esta línea celular podría servir para la obtención de ratones quiméricos que nos permitan obtener el ratón homócigo nulo para *osa-1* y de esta forma caracterizar su función. Asimismo, dado que varios antecedentes comentados anteriormente sugieren que la mutación heteróciga de *osa-1* podrá presentar un fenotipo, en la línea celular XB677, se podrá explorar si hay diferencia en la proliferación, diferenciación y/o muerte celular, con respecto a células normales. Así mismo se podrá estudiar el fenotipo resultante de eliminar el alelo *osa-1* en esta línea celular realizando ensayos con RNA de interferencia (RNAi).

Por su parte las líneas celulares RRE043 y XC389 que tienen modificado el gene *osa-2*, presentaron problemas tanto para crecer, como para expresar los marcadores. En el caso de la línea RRE043 suponemos que las células estaban diferenciadas, ya que su morfología no es clásica de ES. Esta diferenciación pudo haber ocurrido durante el crecimiento previo al envío del vial original, o bien debido a que hubieran sufrido descongelación durante el viaje. Al respecto de estas líneas, es probable que pudiéramos obtener un nuevo lote.

En el caso de la línea XC389, se creció con dificultad, aun cuando las condiciones de crecimiento no eran selectivas (sin antibiótico). De los ensayos aplicados para corroborar la inserción (por RT – PCR) y la expresión del reportero β -Gal, solo fué positivo el concerniente a la verificación del transcrito, lo que nos sugiere que aunque se está transcribiendo el mRNA de *osa-2* con la inserción, éste no es traducido. El transgene se encuentra entre los exones 8 y 9 (alrededor del nucleótido

1287 del mRNA, ver apéndice 4), entonces es probable que el mensajero sea inestable siendo degradado rápidamente antes de que se pueda traducir la fusión proteica β -Geo, y por lo tanto no se produzca actividad de *Lac Z*, a diferencia de la línea celular para *osa-1* (XB677), la cual tiene a β -Geo entre el exón 3 y 4 (alrededor del nucleótido 775, ver apéndice 4) y que como se mencionó en resultados pudo expandirse y mostró actividad de *Lac Z*, así como resistencia a neomicina.

Tomando como antecedente que la línea celular de *osa-1* tiene el inserto cerca del inicio de la traducción, decidimos buscar nuevas líneas celulares mutadas para *osa-2* en la base de datos¹⁸, con la finalidad de encontrar líneas que tuvieran la inserción del “gene trap” cerca del inicio de la traducción. Encontramos líneas celulares que tienen el alelo *osa-2* mutado entre el exón 4 y 5 (alrededor del nucleótido 510 del mRNA), por tanto estamos en el proceso de adquisición de al menos una de estas líneas celulares, que muy probablemente puedan traducir el transgene y con ello nos ayude en la obtención de ratones mutantes para *osa-2*.

En paralelo al uso de la línea celular XB677, intentaremos la generación de otra línea celular a partir del VRH diseñado en este trabajo, puesto que podría ser una alternativa para inactivar al gene *osa-1*, en caso de que la línea celular que tenemos no funciona en la obtención del mutante, o en caso de que se disminuya el fenotipo de la mutación, debido a que esta línea puede generar un fragmento de OSA-1, que podría funcionar como un alelo hipomórfico.

¹⁸ La cual actualizan periódicamente con las nuevas líneas celulares mutadas que generan.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo temprano de ratón, los genes *osa-1* y *osa-2* tienen niveles de expresión diferentes, siendo mayor la expresión del gene *osa-1*.

Los mRNA's generados por splicing alternativo del gene *osa-1* (a y b), no muestran patrón diferencial entre ellos. Sin embargo, durante el desarrollo temprano parece que la isoforma pequeña (*osa-1b*) es mas abundante (ver fig. 15b y c); no podemos asegurar que la diferencia en la intensidad sea la misma durante todo el desarrollo embrionario, ya que la sonda utilizada no puede diferenciar entre ambas isoformas.

Durante la etapa de 7.5 dpc la isoforma *osa-1a* parece ser más abundante en el endodermo visceral anterior y la isoforma *osa-1b* en la región del mesodermo, podría reflejar distintos genes blancos en estos sitios.

La expresión de *osa-1* abarca muchos tipos celulares, incluyendo sistema nervioso, arcos branquiales, intestino, faringe y mesénquima. No obstante a través del desarrollo temprano *osa-1* no se expresa en el corazón.

El patrón de expresión de *osa-2* durante el desarrollo temprano de ratón predomina en las regiones donde se desarrolla el sistema nervioso. Sin embargo, conforme avanza el desarrollo embrionario, *osa-2* se expresa en otras regiones, como en los arcos branquiales (en estadios de 9.5 y 10.5 dpc) y al igual que *osa-1*, el gene *osa-2* parece no expresarse en el corazón.

La generación del vector de recombinación homóloga para *osa-1* se puede utilizar en la generación de una línea celular de ES donde se inactive la expresión del gen *osa-1* por completo debido a que esta dirigido al inicio de la traducción.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las líneas celulares que tienen mutado el alelo de *osa-1* pueden servir para generar un ratón mutante nulo de este gen, ya que el transgene insertado se está transcribiendo y traduciendo correctamente dentro del mRNA.

Sugerimos que el ratón mutante de *osa-1* será letal durante el desarrollo temprano debido a la gran abundancia de su mRNA. Tomando en cuenta que durante el desarrollo temprano este gene presenta mayor expresión en el endodermo visceral anterior y mesodermo, sugerimos que los defectos de el ratón homócigo nulo podrían ser durante en inicio de la gastrulación y en el establecimiento del eje antero-posterior, y en la vascularización extraembrionaria del embrión donde el mesodermo extraembrionario es necesario.

El ratón heterócigo para *osa-1* probablemente será susceptible a tumorigénesis debido a que algunas líneas tumorales de humano presentan menor expresión del este gen.

Por su parte, el ratón mutante de *osa-2* probablemente será viable por complementación funcional de *osa-1*, tal como se lleva a cabo con Brg1 sobre mBRM (Reyes et al. 1998). En este sentido será interesante estudiar el fenotipo de dobles mutantes para *osa-1* y *osa-2*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baetz, K. K., Krogan, N. J., Emili, A., Greenblatt, J. and Hieter, P. (2004). The ctf13-30/CTF13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex RSC, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol* 24, 1232-44.
2. Beckwith JB, Palmer NF (1978). Histopathology and prognosis of Wilms' tumor. Results From the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 41, 1937-48.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Brock, H. W. and Fisher, C. L. (2005). Maintenance of gene expression patterns. *Dev Dyn* 232, 633-55.
7. 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.
8. Cavalli, G. (2002). Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. *Curr Opin Cell Biol* 14, 269-78.
9. Cavalli, G. and Paro, R. (1998). The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* 93, 505-18.
10. Cavalli, G. and Paro, R. (1999). Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science* 286, 955-8.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. De Robertis, E. M., Morita, E. A. and Cho, K. W. (1991). Gradient fields and homeobox genes. *Development* 112, 669-78.
16. De Robertis, E. M., Oliver, G. and Wright, C. V. (1990). Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Sci Am* 263, 46-52.
17. Decristofaro, M. F., Betz, B. L., Rorie, C. J., Reisman, D. N., Wang, W. and Weissman, B. E. (2001). Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J Cell Physiol* 186, 136-45.

18. Duboule, D. and Dolle, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *Embo J* 8, 1497-505.
19. Duboule, D. and Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 10, 358-64.
20. 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.
21. Elgin, S. C. and Grewal, S. I. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol* 13, R895-8.
22. Faucheux, M., Roignant, J. Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. and Theodore, L. (2003). *batman* Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* 23, 1181-95.
23. Favier, B. and Dolle, P. (1997). Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod* 3, 115-31.
24. Fry, C. J. and Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* 11, R185-97.
25. Garcia-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* 0, 161-82.
26. Gebuhr, 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.
27. Gould, A. (1997). Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes. *Curr Opin Genet Dev* 7, 488-94.
28. Grant, P. A. and Berger, S. L. (1999). Histone acetyltransferase complexes. *Semin Cell Dev Biol* 10, 169-77.
29. Grewal, S. I. and Elgin, S. C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* 12, 178-87.
30. Grewal, S. I. and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
31. Heitzler, P., Vanolst, L., Biryukova, I. and Ramain, P. (2003). Enhancer-promoter communication mediated by Chip during Pannier-driven proneural patterning is regulated by *Osa*. *Genes Dev* 17, 591-6.
32. Holliday, R. and Ho, T. (2002). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods* 27, 179-83.
33. Huang, J., Hsu, J. M. and Laurent, B. C. (2004). The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol Cell* 13, 739-50.
34. 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.
35. Ingham, P. W. (1985). Genetic control of the spatial pattern of selector gene expression in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 201-8.
36. Inoue, H., Furukawa, T., Giannakopoulos, S., Zhou, S., King, D. S. and Tanese, N. (2002). Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 277, 41674-85.

37. 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.
38. 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.
39. Jackson, D. A. (2003). The principles of nuclear structure. *Chromosome Res* 11, 387-401.
40. Jacobs, J. J. and van Lohuizen, M. (1999). Cellular memory of transcriptional states by Polycomb-group proteins. *Semin Cell Dev Biol* 10, 227-35.
41. 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.
42. Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet* 29, 289-303.
43. 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.
44. Kim, J. K., Huh, S. O., Choi, H., Lee, K. S., Shin, D., Lee, C., Nam, J. S., Kim, H., Chung, H., Lee, H. W. et al. (2001). Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development. *Mol Cell Biol* 21, 7787-95.
45. Kim, S., Zhang, Z., Upchurch, S., Isern, N. and Chen, Y. (2004). Structure and DNA-binding sites of the SWI1 AT-rich interaction domain (ARID) suggest determinants for sequence-specific DNA recognition. *J Biol Chem* 279, 16670-6.
46. Klochendler-Yeivin, A., Fiette, L., Barra, J., Muchardt, C., Babinet, C. and Yaniv, M. (2000). The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep* 1, 500-6.
47. Klochendler-Yeivin, A., Muchardt, C. and Yaniv, M. (2002). SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 73-9.
48. Kortschak, R. D., Tucker, P. W. and Saint, R. (2000). ARID proteins come in from the desert. *Trends Biochem Sci* 25, 294-9.
49. 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.
50. Krebs, J. E., Fry, C. J., Samuels, M. L. and Peterson, C. L. (2000). Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* 102, 587-98.
51. Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-72.
52. Lee, D., Kim, J. W., Seo, T., Hwang, S. G., Choi, E. J. and Choe, J. (2002). SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* 277, 22330-7.
53. Lickert, H., Takeuchi, J. K., Von Both, I., Walls, J. R., McAuliffe, F., Adamson, S. L., Henkelman, R. M., Wrana, J. L., Rossant, J. and Bruneau, B. G. (2004). Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 432, 107-12.
54. Lusser, A. and Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 25, 1192-200.

55. Mahmoudi, T. and Verrijzer, C. P. (2001). Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* 20, 3055-66.
56. Marmorstein, R. (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 422-32.
57. Martens, J. A. and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 136-42.
58. McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
59. Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T. et al. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-70.
60. Mohrmann, L., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Kal, A. J., Heck, A. J. and Verrijzer, C. P. (2004). Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 24, 3077-88.
61. Mohrmann, L. and Verrijzer, C. P. (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* 1681, 59-73.
62. Muchardt, C. and Yaniv, M. (1999). The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol* 10, 189-95.
63. Muchardt, C. and Yaniv, M. (1999). ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J Mol Biol* 293, 187-98.
64. Muller, U. (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82, 3-21.
65. Narlikar, G. J., Fan, H. Y. and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-87.
66. 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.
67. Nie, Z., Yan, Z., Chen, E. H., Sechi, S., Ling, C., Zhou, S., Xue, Y., Yang, D., Murray, D., Kanakubo, E. et al. (2003). Novel SWI/SNF chromatin-remodeling complexes contain a mixed-lineage leukemia chromosomal translocation partner. *Mol Cell Biol* 23, 2942-52.
68. Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-9.
69. 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.
70. Pattatuci A. M. y T. C. Kaufman. 1991. The homeotic gene *Sex combs reduce* of *Drosophila melanogaster* is diferentially regulated in the embryonic and imaginal stage of development. *Genetics* 129, 443-61.
71. Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M. and Mazo, A. (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 294, 1331-4.
72. Phelan, M. L., Sif, S., Narlikar, G. J. and Kingston, R. E. (1999). Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* 3, 247-53.
73. Randazzo, F. M., Khavari, P., Crabtree, G., Tamkun, J. and Rossant, J. (1994). *brg1*: a putative murine homologue of the *Drosophila* *brahma* gene, a homeotic gene regulator. *Dev Biol* 161, 229-42.

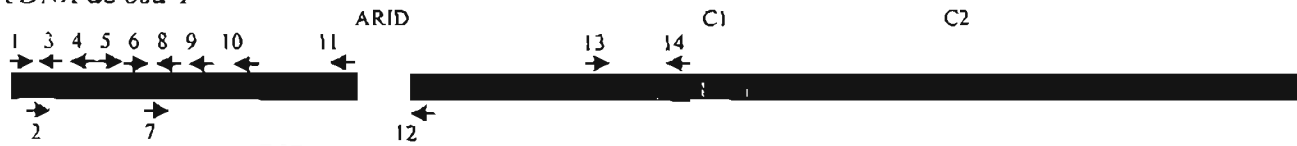
74. Reyes, J. C., Barra, J., Muchardt, C., Camus, A., Babinet, C. and Yaniv, M. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J* 17, 6979-91.
75. Ringrose, L. and Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38, 413-43.
76. Roberts, C. W., Galusha, S. A., McMenamin, M. E., Fletcher, C. D. and Orkin, S. H. (2000). Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13796-800.
77. Roberts, C. W. and Orkin, S. H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 133-42.
78. Schumacher, A. and Magnuson, T. (1997). Murine Polycomb- and trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends Genet* 13, 167-70.
79. 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.
80. Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. and Kennison, J. A. (1992). brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68, 561-72.
81. 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.
82. Trouche, D., Le Chalony, C., Muchardt, C., Yaniv, M. and Kouzarides, T. (1997). RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11268-73.
83. Tse, C., Georgieva, E. I., Ruiz-Garcia, A. B., Sendra, R. and Hansen, J. C. (1998). Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J Biol Chem* 273, 32388-92.
84. Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-91.
85. van Lohuizen, M. (1999). The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev* 9, 355-61.
86. 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.
87. Wang, X., Nagl, N. G., Jr., Flowers, S., Zweitzig, D., Dallas, P. B. and Moran, E. (2004). Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *Int J Cancer* 112, 636.
88. Wang, X., Nagl, N. G., Wilsker, D., Van Scoy, M., Pacchione, S., Yaciuk, P., Dallas, P. B. and Moran, E. (2004). Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J* 383, 319-25.
89. Wong, M. C., Scott-Drew, S. R., Hayes, M. J., Howard, P. J. and Murray, J. A. (2002). RSC2, encoding a component of the RSC nucleosome remodeling complex, is essential for 2 microm plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 4218-29.
90. Wu, C. and Morris, J. R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293, 1103-5.
91. Xu, W., Edmondson, D. G. and Roth, S. Y. (1998). Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* 18, 5659-69.

92. Xue, Y., Canman, J. C., Lee, C. S., Nie, Z., Yang, D., Moreno, G. T., Young, M. K., Salmon, E. D. and Wang, W. (2000). The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13015-20.
93. Zeltser, L., Desplan, C. and Heintz, N. (1996). Hoxb-13: a new Hox gene in a distant region of the HOXB cluster maintains colinearity. *Development* 122, 2475-84.

APENDICE I

Oligonucleótidos diseñados en el trabajo, en *osa-1*, *osa-2* y gene traps.

cDNA de osa-1



	Nombre	Oligonucleótido	Posición en cDNA (pb)
1	Ini1	5' ATG GAT CAG ATG GGC AAG ATG 3'	1 - 21
2	Uosa1AA	5' GGA CTA ACC CAT ACT CGC ACC AA 3'	47 - 70
3	ini3umb	5' TTG CGG CCG CCT CCC GAC AC TACA GCA ACA 3'	273 - 292
4	Iniv	5' TTG TTG CTG GGC GTA AGG TGG 3'	318 - 304
5	iniSosa	5' CCA AGC TTC ACA GCA GCC CTC GGT CTT C 3'	511 - 530
6	E3osa1	5' CCA GTA AGG GAG GGC AAG AA 3'	712 - 772
7	Hex1	5' TGA TCT GTC TGG TTC AAT CGC 3'	767 - 788
8	Uosa1AB	5' TGT GAG GAG AAA AGG GAG ACT GA 3'	885 - 980
9	E4osa1	5' CAG GTG AGG GGA GGT GTG AG 3'	902 - 921
10	Hex2V	5' ACT GCA GCA GGC GAG AGT 3'	993 - 1010
11	Marid1	5' TGT CTT GGG TGT CCC 3'	1812 - 1827
12	mARID2	5' CAA GAT CGA GCG TGG 3'	2168 - 2183
13	Osa121	CCT GCC TCC GCC ACC GCT GCT AC	3172 - 3194
14	Osa122	CAG GAA TGG AGA CTT GCT AGG AG	3664 - 3688

cDNA de osa-2



	Nombre	Oligonucleótido	Posición en cDNA (pb)
1	Losa212	5' GTG GCT GGG AGT GGG GGT GAG TA 3'	99 - 122
2	1144osa2	5' GTA CGG ACC TCA GCA GAC AG 3'	1144 - 1164
3	1720osa2	5' TTG TGG GCG TCA TGC TGC AG 3'	1720 - 1740
4	Uosa111	5' GAT GGT AAA GAA GAA GGC GTG TC 3'	1822 - 1844
5	Uosa21A	5' GCA GCC AGC AGC AGG AGA TGT AT 3'	3061 - 3084
6	Uosa21B	5' ATC TTT TGA GGT AAT CTT TCG CC 3'	3780 - 3803

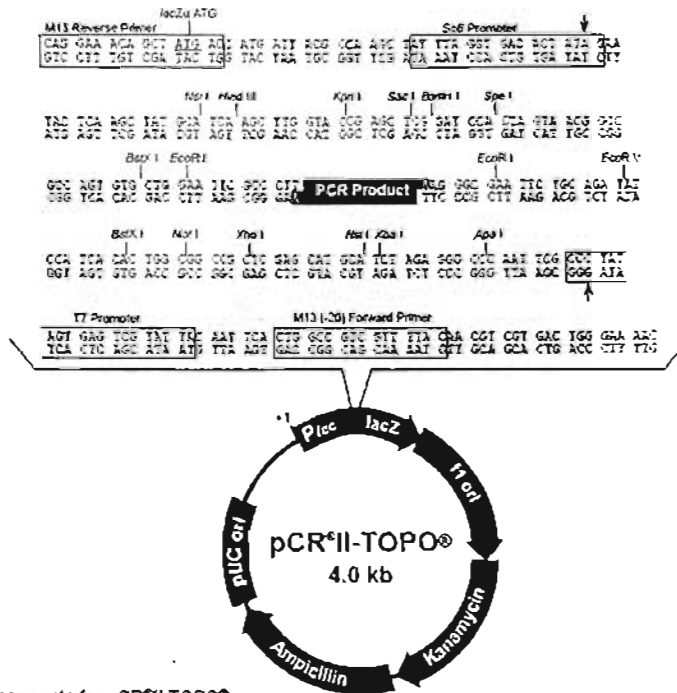
Gene traps



	Nombre	Oligonucleótido
1	1stPCR	5' AGT ATC GGC CTC AGG AAG ATC G 3'
2	2ndPCR	5' ATT CAG GCT GCG CAA CTG TTG GG 3'
3	Ubgeo	5' CGG AAT TCT TGA AAA TGG TCT GCT GCT GCT GAA 3'
4	Lbgeo	5' AAA GCG GCC GCG GAT AAA CGG AAC TGG AAA AAC TGC 3'

APENDICE 2

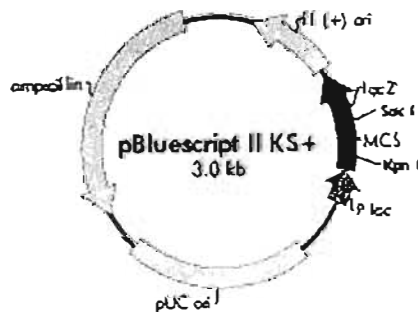
Mapas de los vectores de clonación utilizados en este trabajo



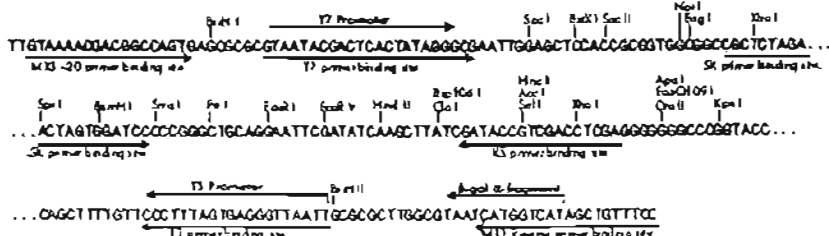
Comments for pCR®II-TOPO®
3973 nucleotides

LacZ gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp8 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 590-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1381-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851

f1 (+) origin 135-441
 β -galactosidase α -fragment 460-814
multiple cloning site 653-760
lac promoter 817-938
pUC origin 1158-1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598-826)



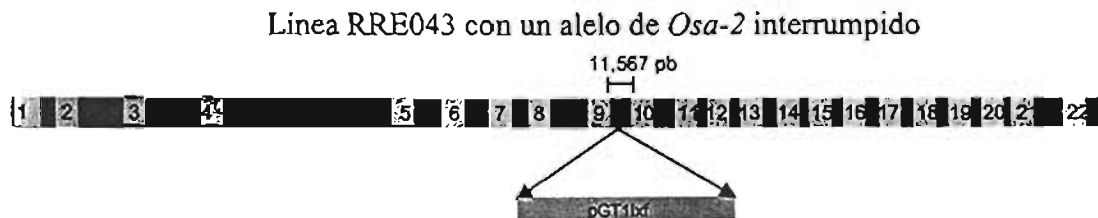
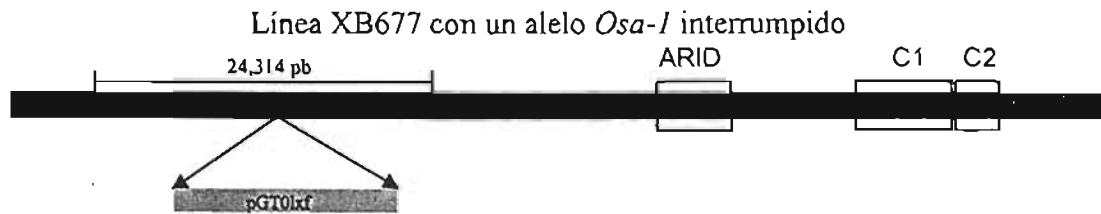
APENDICE 3

Similitudes entre las proteínas OSA de distintos organismos. En el recuadro se muestra la similitud entre OSA-1 y OSA-2 de ratón.

SecA	Nombre	Long(aa)	SecB	Nombre	Long(aa)	Simil. (%)
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	2	OSA_C_elegans	1724	9
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	3	OSA_D_melanogaster	2715	12
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	4	OSA_A_gambiae	838	7
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	5	OSA-1_G_gallus	2129	9
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	6	OSA-2_G_gallus	1424	6
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	7	OSA-1_M_musculus	1902	10
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	8	OSA-2_M_musculus	1806	8
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	9	OSA-1_H_sapiens	2285	12
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	10	OSA-2_H_sapiens	1957	9
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	11
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	7
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	13	osa-2_D_rerio	1840	10
1	SWI1_S_cerevisiae	1314	14	osal_T_nigroviridis	2157	9
2	OSA_C_elegans	1724	3	OSA_D_melanogaster	2715	22
2	OSA_C_elegans	1724	4	OSA_A_gambiae	838	16
2	OSA_C_elegans	1724	5	OSA-1_G_gallus	2129	19
2	OSA_C_elegans	1724	6	OSA-2_G_gallus	1424	9
2	OSA_C_elegans	1724	7	OSA-1_M_musculus	1902	9
2	OSA_C_elegans	1724	8	OSA-2_M_musculus	1806	17
2	OSA_C_elegans	1724	9	OSA-1_H_sapiens	2285	19
2	OSA_C_elegans	1724	10	OSA-2_H_sapiens	1957	17
2	OSA_C_elegans	1724	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	16
2	OSA_C_elegans	1724	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	16
2	OSA_C_elegans	1724	13	osa-2_D_rerio	1840	18
2	OSA_C_elegans	1724	14	osal_T_nigroviridis	2157	17
3	OSA_D_melanogaster	2715	4	OSA_A_gambiae	838	24
3	OSA_D_melanogaster	2715	5	OSA-1_G_gallus	2129	21
3	OSA_D_melanogaster	2715	6	OSA-2_G_gallus	1424	17
3	OSA_D_melanogaster	2715	7	OSA-1_M_musculus	1902	27
3	OSA_D_melanogaster	2715	8	OSA-2_M_musculus	1806	26
3	OSA_D_melanogaster	2715	9	OSA-1_H_sapiens	2285	24
3	OSA_D_melanogaster	2715	10	OSA-2_H_sapiens	1957	26
3	OSA_D_melanogaster	2715	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	27
3	OSA_D_melanogaster	2715	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	26
3	OSA_D_melanogaster	2715	13	osa-2_D_rerio	1840	25
3	OSA_D_melanogaster	2715	14	osal_T_nigroviridis	2157	24
4	OSA_A_gambiae	838	5	OSA-1_G_gallus	2129	17
4	OSA_A_gambiae	838	6	OSA-2_G_gallus	1424	13
4	OSA_A_gambiae	838	7	OSA-1_M_musculus	1902	15
4	OSA_A_gambiae	838	8	OSA-2_M_musculus	1806	17
4	OSA_A_gambiae	838	9	OSA-1_H_sapiens	2285	17
4	OSA_A_gambiae	838	10	OSA-2_H_sapiens	1957	18
4	OSA_A_gambiae	838	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	17
4	OSA_A_gambiae	838	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	15
4	OSA_A_gambiae	838	13	osa-2_D_rerio	1840	18
4	OSA_A_gambiae	838	14	osal_T_nigroviridis	2157	19
5	OSA-1_G_gallus	2129	6	OSA-2_G_gallus	1424	28
5	OSA-1_G_gallus	2129	7	OSA-1_M_musculus	1902	76
5	OSA-1_G_gallus	2129	8	OSA-2_M_musculus	1806	51
5	OSA-1_G_gallus	2129	9	OSA-1_H_sapiens	2285	70
5	OSA-1_G_gallus	2129	10	OSA-2_H_sapiens	1957	49
5	OSA-1_G_gallus	2129	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	68
5	OSA-1_G_gallus	2129	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	49
5	OSA-1_G_gallus	2129	13	osa-2_D_rerio	1840	42
5	OSA-1_G_gallus	2129	14	osal_T_nigroviridis	2157	43
6	OSA-2_G_gallus	1424	7	OSA-1_M_musculus	1902	32
6	OSA-2_G_gallus	1424	8	OSA-2_M_musculus	1806	54
6	OSA-2_G_gallus	1424	9	OSA-1_H_sapiens	2285	35
6	OSA-2_G_gallus	1424	10	OSA-2_H_sapiens	1957	52
6	OSA-2_G_gallus	1424	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	36
6	OSA-2_G_gallus	1424	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	37
6	OSA-2_G_gallus	1424	13	osa-2_D_rerio	1840	36
6	OSA-2_G_gallus	1424	14	osal_T_nigroviridis	2157	30
7	OSA-1_M_musculus	1902	8	OSA-2_M_musculus	1806	56
7	OSA-1_M_musculus	1902	9	OSA-1_H_sapiens	2285	95
7	OSA-1_M_musculus	1902	10	OSA-2_H_sapiens	1957	54
7	OSA-1_M_musculus	1902	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	85
7	OSA-1_M_musculus	1902	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	50
7	OSA-1_M_musculus	1902	13	osa-2_D_rerio	1840	46
7	OSA-1_M_musculus	1902	14	osal_T_nigroviridis	2157	55
8	OSA-2_M_musculus	1806	9	OSA-1_H_sapiens	2285	57
8	OSA-2_M_musculus	1806	10	OSA-2_H_sapiens	1957	86
8	OSA-2_M_musculus	1806	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	76
8	OSA-2_M_musculus	1806	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	76
8	OSA-2_M_musculus	1806	13	osa-2_D_rerio	1840	55
8	OSA-2_M_musculus	1806	14	osal_T_nigroviridis	2157	43
9	OSA-1_H_sapiens	2285	10	OSA-2_H_sapiens	1957	56
9	OSA-1_H_sapiens	2285	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	98
9	OSA-1_H_sapiens	2285	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	51
9	OSA-1_H_sapiens	2285	13	osa-2_D_rerio	1840	47
9	OSA-1_H_sapiens	2285	14	osal_T_nigroviridis	2157	56
10	OSA-2_H_sapiens	1957	11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	51
10	OSA-2_H_sapiens	1957	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	80
10	OSA-2_H_sapiens	1957	13	osa-2_D_rerio	1840	56
10	OSA-2_H_sapiens	1957	14	osal_T_nigroviridis	2157	45
11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	46
11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	13	osa-2_D_rerio	1840	44
11	OSA-1_Pan_troglodytes	1959	14	osal_T_nigroviridis	2157	57
12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	13	osa-2_D_rerio	1840	47
12	OSA-2_Pan_troglodytes	1763	14	osal_T_nigroviridis	2157	38
13	osa-2_D_rerio	1840	14	osal_T_nigroviridis	2157	41

APENDICE 4

Esquemas de las inserciones de los gene-traps dentro de los locus de *osa-1* y *osa-2* en líneas de células ES de ratón.



APENDICE 5

Alineamiento de los mRNA's *osala*, *osalb* con las sondas *osal AB* y *osal A*.

```

        |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
        5          15        25        35        45        55        65        75        85        95
osala      ATGGATCAGA TGGGCAAGAT GAGACCTAG CGGTATGGTG GGACTAAGG ATATTCG AA  AATAGGGAT CTCTTTAGG AATGAA AA GGA ATGGGT
Osal A
osal AB
osalb      ATGGATCAGA TGGGCAAGAT GAGACCTAG CGGTATGGTG GGAATAAGG ATATTCG AA  AATAGGGAT CTCTTTAGG AATGAA AA GGA ATGGGT

        |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
        105       115       125       135       145       155       165       175       185       195
osala      AATAGGGGA GATATATGG TCCAGAT TACAGCGTA CCGATGAG ATGAGGGG GGGTAGAG TGTATGGG AGTTT ATG AAG A
Osal A
osal AB      GGA GATATATGG TCCAGAT TACAGCGTA CCGATGAG ATGAGGGG GGGTAGAG TGTATGGG AGTTT ATG AAG A
osalb      AATAGGGGA GATATATGG TCCAGAT TACAGCGTA CCGATGAG ATGAGGGG GGGTAGAG TGTATGGG AGTTT ATG AAG A

        |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
        205       215       225       235       245       255       265       275       285       295
osala      GATTAACT TATGGTAG AAGGCTAG TGCTATGG TAGAGGG AGATTATA TATAA AGAAAGT TATAGAGAG AAT
Osal A
osal AB
osalb      GATTAACT TATGGTAG AAGGCTAG TGCTATGG TAGAGGG AGATTATA TATAA AGAAAGT TATAGAGAG AAT

        |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
        305       315       325       335       345       355       365       375       385       395
osala      TAGGCGAG AATAAAT CAGACTT CATGCGAG CTTGTATTA GAGAGAG AGAATAG AAATAAGTTT AGTTT AGTTAT
Osal A
osal AB
osalb      TAGGCGAG AATAAAT CAGACTT CATGCGAG CTTGTATTA GAGAGAG AGAATAG AAATAAGTTT AGTTT AGTTAT

        |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
        405       415       425       435       445       455       465       475       485       495
osala      ATTCAGCA GATATCCAG CTTCCATC AGCAGTCCC AACTCCATAT TTAGAG AGTCAAA AATAAGAT AGAG AG TA
Osal A
osal AB
osalb      ATTCAGCA GATATCCAG CTTCCATC AGCAGTCCC AACTCCATAT TTAGAG AGTCAAA AATAAGAT AGAG AG TA

        |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
        505       515       525       535       545       555       565       575       585       595
osala      CTTAACAA CAGGACAGT CTCTTAACA GAGAGAA CTTAGAGG CAGATAT GTGCTT CAGAGGGG CATAT T A G AG T
Osal A
osal AB
osalb      CTTAACAA CAGGACAGT CTCTTAACA GAGAGAA CTTAGAGG CAGATAT GTGCTT CAGAGGGG CATAT T A G AG T

```


	605 615 625 635 645 655 665 675 685 695
osala	CAGCAGTTCG AGCAAACTGG CTATTCCGAG CAGCGTTT CTCAACACA GGAGTTTCT CAAGATTGAT TTGGGTCTA GGATCTA G T AA
Osai A	
osai AB	CAGCAGTTCG AGCAAACTGG CTATTCCGAG CAGCGTTT CTCAACACA GGAGTTTCT CAAGATTGAT TTGGGTCTA GGATCTA G T AA
osai b	CAGCAGTTCG AGCAAACTGG CTATTCCGAG CAGCGTTT CTCAACACA GGAGTTTCT CAAGATTGAT TTGGGTCTA GGATCTA G T AA

	705 715 725 735 745 755 765 775 785 795
osala	TGACCTCAG TAAGGGAGGG CAAGAAGATA TGAAGCTGAG TCTTCAGTCA AGGCTTCCA GTTGGCTGA TCTGTGGT T AAT GATG AT T AT
Osai A	
osai AB	TGACCTCAG TAAGGGAGGG CAAGAAGATA TGAAGCTGAG TCTTCAGTCA AGGCTTCCA GTTGGCTGA TCTGTGGT T AAT GATG AT T AT
osai b	TGACCTCAG TAAGGGAGGG CAAGAAGATA TGAAGCTGAG TCTTCAGTCA AGGCTTCCA GTTGGCTGA TCTGTGGT T AAT GATG AT T AT

	805 815 825 835 845 855 865 875 885 895
osala	GGGGACAGAA GGAGCTTGA GTCTGGGT GAGCAATCA GGGATTTCA GAGCAAGG AGAGCAGAG AATCAGT AGT T TT TT T A
Osai A	
osai AB	GGGGACAGAA GGAGCTTGA GTCTGGGT GAGCAATCA GGGATTTCA GAGCAAGG AGAGCAGAG AATCAGT AGT T TT TT T A
osai b	GGGGACAGAA GGAGCTTGA GTCTGGGT GAGCAATCA GGGATTTCA GAGCAAGG AGAGCAGAG AATCAGT AGT T TT TT T A

	905 915 925 935 945 955 965 975 985 995
osala	AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT
Osai A	
osai AB	AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT
osai b	AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT AATCTCTT AATGCTGG CATCGAGG CAGTTCTGT

	1005 1015 1025 1035 1045 1055 1065 1075 1085 1095
osala	CAGTGCAGG CAACAGATG CAGCTGGG CAGCAGTGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG
Osai A	
osai AB	CAGTGCAGG CAACAGATG CAGCTGGG CAGCAGTGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG
osai b	CAGTGCAGG CAACAGATG CAGCTGGG CAGCAGTGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG CAGTGCAGG

	1105 1115 1125 1135 1145 1155 1165 1175 1185 1195
osala	TTATATGAG AGGAACTGG AGATGAGCA GTAACTTTC GTTACAGT G TGGCTT ATCTCA GT CAGCTGT TG GAGGA AGAT G A T GGG
Osai A	
osai AB	TTATATGAG AGGAACTGG AGATGAGCA GTAACTTTC GTTACAGT G TGGCTT ATCTCA GT CAGCTGT TG GAGGA AGAT G A T GGG
osai b	TTATATGAG AGGAACTGG AGATGAGCA GTAACTTTC GTTACAGT G TGGCTT ATCTCA GT CAGCTGT TG GAGGA AGAT G A T GGG

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1205      1215      1225      1235      1245      1255      1265      1275      1285      1295
osala    GTGGGTTCTT ACUAGUAGAA ATTCATGGGG AGUTAGGGG CCAAGGGGAG TTAGTATGGG CCAUAAAGGAG GATATATAG GAGTAA TATAATG T
Osal A
osal AB  GTGGGTTCTT ACUAGUAGAA ATTCATGGGG AGUTAGGGG CCAAGGGGAG TTAGTATGGG CCAUAAAGGAG GATATATAG GAGTAA TATAATG T
osalb

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1305      1315      1325      1335      1345      1355      1365      1375      1385      1395
osala    TGGCCAAAGG CAAATAGGGA AATGACGGGA TGGCCGGAAG TATAAACTT ATGGGTGTG GAGGTAGAT GATGGGAG TGGAAAT A TTA GG
Osal A
osal AB  TGGCCAAAGG CAAATAGGGA AATGACGGGA TGGCCGGAAG TATAAACTT ATGGGTGTG GAGGTAGAT GATGGGAG TGGAAAT A TTA GG
osalb

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1405      1415      1425      1435      1445      1455      1465      1475      1485      1495
osala    TAAATCTT CCAAGGAGAA TGGTTCATG GTTATGGG AAAGGCTT ATGGCTTAA TATGGCAAT ATGCAAT AGGTTGGGT AGGGATGTG
Osal A
osal AB  TAAATCTT CCAAGGAGAA TGGTTCATG GTTATGGG AAAGGCTT ATGGCTTAA TATGGCAAT ATGCAAT AGGTTGGGT AGGGATGTG
osalb

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1505      1515      1525      1535      1545      1555      1565      1575      1585      1595
osala    CTTCATAG GGGGAATGAA CAGGAAAACT CAAGAGTTC TGTTTCAT GATGTTGT GCAATTA TCAAAA AGGA AGGTA AAATA
Osal A
osal AB  CTTCATAG GGGGAATGAA CAGGAAAACT CAAGAGTTC TGTTTCAT GATGTTGT GCAATTA TCAAAA AGGA AGGTA AAATA
osalb

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1605      1615      1625      1635      1645      1655      1665      1675      1685      1695
osala    TGAATCAAGG GGGATGATG GGAATGGATCTTCTATGG ACAGGGGAT AATAGTATGG TGGATGATG AAATAG GGAATAT AT TATGGG
Osal A
osal AB  TGAATCAAGG GGGATGATG GGAATGGATCTTCTATGG ACAGGGGAT AATAGTATGG TGGATGATG AAATAG GGAATAT AT TATGGG
osalb

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1705      1715      1725      1735      1745      1755      1765      1775      1785      1795
osala    CCGGAACCATG GCCAACAATT CAGCAGGGAT GGCAGCAGG CACAGAGATGA TGGGCTTGG GGATGTTAAG TTAATCTG CCAAAAAAT GAAAA AAG
Osal A
osal AB  CCGGAACCATG GCCAACAATT CAGCAGGGAT GGCAGCAGG CACAGAGATGA TGGGCTTGG GGATGTTAAG TTAATCTG CCAAAAAAT GAAAA AAG
osalb

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1805      1815      1825      1835      1845      1855      1865      1875      1885      1895
osala    GATGATGGGA CACCAAGAAG AGAATCAAAA TCTAAGAAT CAGTCTTT TATCAAAA AATGAGAAGA TCACTCAATT GTATGACTTG GGTGGTGAG
Osal A
osal AB  GATGATGGGA CACCAAGAAG AGAATCAAAA TCTAAGAAT CAGTCTTT TATCAAAA AATGAGAAGA TCACTCAATT GTATGACTTG GGTGGTGAG
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1905      1915      1925      1935      1945      1955      1965      1975      1985      1995
osala    CAGAGAGGAA GATGTGGGTG GAGGGGTAAG TGGGTTTAA AGAGGAGAAG GATATGGG A TGA AAAT T G TG TGTG GGGAGGAAG T TGGG T
Osala A
osal AB
osalb    CAGAGAGGAA GATGTGGGTG GAGGGGTAAG TGGGTTTAA AGAGGAGAAG GATATGGG A TGA AAAT T G TG TGTG GGGAGGAAG T TGGG T

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2005      2015      2025      2035      2045      2055      2065      2075      2085      2095
osala    ATATG T TATGTGTG TGAAGGAGAT TGGTGGGTTG A TTAGGT A A AAGAA AA AAAATGG GG GAA TTG AA AA T AA TGTGGGTA A
Osala A
osal AB
osalb    ATATG G T TATGTGTG TGAAGGAGAT TGGTGGGTTG A TTAGGT A A AAGAA AA AAAATGG GG GAA TTG AA AA T AA TGTGGGTA A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2105      2115      2125      2135      2145      2155      2165      2175      2185      2195
osala    T AAGACTG CTGACTG A TGA AAAAG A GATATAT AATGT T TA TG TTTGAG TG AAGAT G AG GTGGAGA AGA T GATAT T
Osala A
osal AB
osalb    T AAGACTG CTGACTG A TGA AAAAG A GATATAT AATGT T TA TG TTTGAG TG AAGAT G AG GTGGAGA AGA T GATAT T

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2205      2215      2225      2235      2245      2255      2265      2275      2285      2295
osala    TGGCAGTGTG TGAATGAAAG AAGTCTAA AAGATCA GGGGTTT TGTGGGAT AAGGTTAT G AGGGG A AAA T AT AGT AA AG
Osala A
osal AB
osalb    TGGCAGTGTG TGAATGAAAG AAGTCTAA AAGATCA GGGGTTT TGTGGGAT AAGGTTAT G AGGGG A AAA T AT AGT AA AG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2305      2315      2325      2335      2345      2355      2365      2375      2385      2395
osala    CAGTT TATG GAGAAGGAG GAGAGTGAA GAGAAAT TAGATCA A A ATAG T AAATT TTA AG G ATGGGGAG AA T AGT
Osala A
osal AB
osalb    CAGTT TATG GAGAAGGAG GAGAGTGAA GAGAAAT TAGATCA A A ATAG T AAATT TTA AG G ATGGGGAG AA T AGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2405      2415      2425      2435      2445      2455      2465      2475      2485      2495
osala    GGAATCAGG ATGTTTTC TGATGGAAGT GAGGAAAT TTAGAAG G GAATTCATG A TAAA TGGGTA A G AGTATG AATA T TG
Osala A
osal AB
osalb    GGAATCAGG ATGTTTTC TGATGGAAGT GAGGAAAT TTAGAAG G GAATTCATG A TAAA TGGGTA A G AGTATG AATA T TG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2505      2515      2525      2535      2545      2555      2565      2575      2585      2595
osala    AATGATGGG GGTATGTT TATGAGCAA ATAAGGAT TTATGGAG ATGAGGAAAG G AGGAAG TGAT TT ATGT T AG GG AGGG
Osala A
osal AB
osalb    AATGATGGG GGTATGTT TATGAGCAA ATAAGGAT TTATGGAG ATGAGGAAAG G AGGAAG TGAT TT ATGT T AG GG AGGG

```



```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2605      2615      2625      2635      2645      2655      2665      2675      2685      2695
osala CAATGGGGG ATGGGTGATG CCTACAGGCG TGCTGTGGG CTTGGGCTGG GAAGTGTGGG GATGGGAATA GGGAGAAAT ATCTATATGG AGGT TTA
Osai A
osal AB
osalb CAATGGGGG ATGGGTGATG CCTACAGGCG TGCTGTGGG CTTGGGCTGG GAAGTGTGGG GATGGGAATA GGGAGAAAT ATCTATATGG AGGT TTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2705      2715      2725      2735      2745      2755      2765      2775      2785      2795
osala GACAGAGTGA GGACGGAGGC TGGAAATGGG CTTGAAGGAA ATATGGGAAAT TGGAGAAAT TTAGAAATAT TATGCTT CAAGAGAT TGGGGATGT
Osai A
osal AB
osalb GACAGAGTGA GGACGGAGGC TGGAAATGGG CTTGAAGGAA ATATGGGAAAT TGGAGAAAT TTAGAAATAT TATGCTT CAAGAGAT TGGGGATGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2805      2815      2825      2835      2845      2855      2865      2875      2885      2895
osala ATTCTCTAG CCGGTATGCT CCGGAGGAGC AGCAGCAATA GCAGCAATAG CAGCAATAG CAAGATGA TTCTATGG AATTAATT TTA AAGG
Osai A
osal AB
osalb ATTCTCTAG CCGGTATGCT CCGGAGGAGC AGCAGCAATA GCAGCAATAG CAGCAATAG CAAGATGA TTCTATGG AATTAATT TTA AAGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2905      2915      2925      2935      2945      2955      2965      2975      2985      2995
osala CAGCTTTT AGAGCTTT TCTTACGATA GCAGCAATA ATGTATAGT AGAGAG A GAATTATAAG AGGCAATGG ATGGAATA TGG T
Osai A
osal AB
osalb CAGCTTTT AGAGCTTT TCTTACGATA GCAGCAATA ATGTATAGT AGAGAG A GAATTATAAG AGGCAATGG ATGGAATA TGG T

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3005      3015      3025      3035      3045      3055      3065      3075      3085      3095
osala GCGAAGGGG ATGAAGGGGA GATGTACAGT GTGGGTATA GGGCTGGG AAGGAGGCT AAAGAG AGTTG TGAGTAGT AGTGA
Osai A
osal AB
osalb GCGAAGGGG ATGAAGGGGA GATGTACAGT GTGGGTATA GGGCTGGG AAGGAGGCT AAAGAG AGTTG TGAGTAGT AGTGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3105      3115      3125      3135      3145      3155      3165      3175      3185      3195
osala GCGAGATA AGTGGAGAG CTTCTT T AGAGGAGT GTAAACAG TAAGCAATG TATA TGT TGA GGTGTA TGATGGA
Osai A
osal AB
osalb GCGAGATA AGTGGAGAG CTTCTT T AGAGGAGT GTAAACAG TAAGCAATG TATA TGT TGA GGTGTA TGATGGA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3205      3215      3225      3235      3245      3255      3265      3275      3285      3295
osal     AG:AGG:GGG:GCT:AGAA:G: AATTT:ATT:G:AGTTTGG:GAGA:GAG:T:T:G:A:T:TGGTT:AGTG:AG:AGAA:ATG:A:A:AAATG
Osai A   AG:AGG:GGG:GCT:AGAA:G: AATTT:ATT:G:AGTTTGG:GAGA:GAG:T:T:G:A:T:TGGTT:AGTG:AG:AGAA:ATG:A:A:AAATG
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3305      3315      3325      3335      3345      3355      3365      3375      3385      3395
osala    ATGGGTGGG:GCATACAGG:ATCAGCTGAG:GTTGCTCAG:AGGGCAG:AT:GTGG:AGGGG:CGAAATGAA:TGA:TA:AA:TTATG:AA:AGG:AGAA:A
Osai A   ATGGGTGGG:GCATACAGG:ATCAGCTGAG:GTTGCTCAG:AGGGCAG:AT:GTGG:AGGGG:CGAAATGAA:TGA:TA:AA:TTATG:AA:AGG:AGAA:A
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3405      3415      3425      3435      3445      3455      3465      3475      3485      3495
osala    CAGG:CTCG:CACT:AGGG:CTTG:GTAT:ATGGTGTGAA:CGGAACAGAT:GAAATG:TA:ACA:AGAT:GAAGG:AA:ATGAAGG:ATGG:TT
Osai A   CAGG:CTCG:CACT:AGGG:CTTG:GTAT:ATGGTGTGAA:CGGAACAGAT:GAAATG:TA:ACA:AGAT:GAAGG:AA:ATGAAGG:ATGG:TT
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3505      3515      3525      3535      3545      3555      3565      3575      3585      3595
osala    CCATGGCA:AGCCAGGCT:CGTATGGTCC:TTAGCCCTGTT:CCCCCA:TGA:AAAGG:CTT:AT:AA:TA:AG:CTTAA:AG:ATG:GAAT
Osai A   CCATGGCA:AGCCAGGCT:CGTATGGTCC:TTAGCCCTGTT:CCCCCA:TGA:AAAGG:CTT:AT:AA:TA:AG:CTTAA:AG:ATG:GAAT
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3605      3615      3625      3635      3645      3655      3665      3675      3685      3695
osala    CACATTCG:AGGTAT:AG:CGAGCTCC:CTCCCGGG:CATGGAGAA:CGTA:TT:T:TAG:AAGT:T:ATT:T:GA:T:TGGG:ATGAAAATG
Osai A   CACATTCG:AGGTAT:AG:CGAGCTCC:CTCCCGGG:CATGGAGAA:CGTA:TT:T:TAG:AAGT:T:ATT:T:GA:T:TGGG:ATGAAAATG
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3705      3715      3725      3735      3745      3755      3765      3775      3785      3795
osala    AAAAGG:GGG:T:TA:GGTG:CTG:TT:G:ATATAG:G:TA:CTG:AG:G:TA:TAATT:GG:G:GGATAT:A:TT:A:TG:G:T:TGTAGA
Osai A   AAAAGG:GGG:T:TA:GGTG:CTG:TT:G:ATATAG:G:TA:CTG:AG:G:TA:TAATT:GG:G:GGATAT:A:TT:A:TG:G:T:TGTAGA
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3805      3815      3825      3835      3845      3855      3865      3875      3885      3895
osala    GGG:ACT:TAG:CTGTGTTGA:AG:AGAGAAG:G:GG:TA:ATGAAAGA:A:TTGGAA:GGAGG:ATGG:GGGTAATGA:TGT:T:AA:GT:GGG:T
Osai A   GGG:ACT:TAG:CTGTGTTGA:AG:AGAGAAG:G:GG:TA:ATGAAAGA:A:TTGGAA:GGAGG:ATGG:GGGTAATGA:TGT:T:AA:GT:GGG:T
osal AB
osalb

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3905      3915      3925      3935      3945      3955      3965      3975      3985      3995
osala    CTGGTAGAGA GCAAGTGGGC GTTAGACACC ATTAACATTC TACTGTATGA TGATAAAGAG ATTATGAACT TAAACTTAG AGCT...A GG TTG TAG
Osai A
osal AB
osalb    CTGGTAGAGA GCAAGTGGGC GTTAGACACC ATTAACATTC TACTGTATGA TGATAAAGAG ATTATGAACT TAAACTTAG AGCT...A GG TTG TAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
4005      4015      4025      4035      4045      4055      4065      4075      4085      4095
osala    AGCTGCTTGT GGAATATTTG CGTAGATGCC TAATTGAAAT CTTTGGCATT TTAAGGAGT ATGAGGTAGG GGAAGGAGGA TAGAGAA AT TA TAGA
Osai A
osal AB
osalb    AGCTGCTTGT GGAATATTTG CGTAGATGCC TAATTGAAAT CTTTGGCATT TTAAGGAGT ATGAGGTAGG GGAAGGAGGA TAGAGAA AT TA TAGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
4105      4115      4125      4135      4145      4155      4165      4175      4185      4195
osala    TGGGAGATT AACAAGGTGT CTAGTCCAGC CCATACAGAG GAAGAAGAGG AAGAAAT T TGATCTAAA CTGGAGGAGG AAGAGGAAGA AGGGGTTGGA
Osai A
osal AB
osalb    TGGGAGATT AACAAGGTGT CTAGTCCAGC CCATACAGAG GAAGAAGAGG AAGAAAT T TGATCTAAA CTGGAGGAGG AAGAGGAAGA AGGGGTTGGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
4205      4215      4225      4235      4245      4255      4265      4275      4285      4295
osala    AATGATGAGG AGATGGCTTT TTTGGGCAAG GACAAGCAAT CTTAGAGAA TAGTGAGGAG AAGTAGTGA GTAAGTTTGA AAGTTTG GTAAAGATG
Osai A
osal AB
osalb    AATGATGAGG AGATGGCTTT TTTGGGCAAG GACAAGCAAT CTTAGAGAA TAGTGAGGAG AAGTAGTGA GTAAGTTTGA AAGTTTG GTAAAGATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
4305      4315      4325      4335      4345      4355      4365      4375      4385      4395
osala    TGCAGAGGAA TGACCCATTT GTGGTGGACT GCTTAGATAA GCTTGGGGCT GTGAGGAGT TTGAAGTGG CTGTATAA TGGGGATTG GTGCTGGGA
Osai A
osal AB
osalb    TGCAGAGGAA TGACCCATTT GTGGTGGACT GCTTAGATAA GCTTGGGGCT GTGAGGAGT TTGAAGTGG CTGTATAA TGGGGATTG GTGCTGGGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
4405      4415      4425      4435      4445      4455      4465      4475      4485      4495
osala    TACCACTGAG CATATCCAGA CCCACTTTGA GAGCAAGATA GAGCTGCTG CTTTGGGGCT TTATGTGCTG TGGCAAGG CTTTGGGAA AATAA
Osai A
osal AB
osalb    TACCACTGAG CATATCCAGA CCCACTTTGA GAGCAAGATA GAGCTGCTG CTTTGGGGCT TTATGTGCTG TGGCAAGG CTTTGGGAA AATAA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 4505   4515   4525   4535   4545   4555   4565   4575   4585   4595
osala  A AGTAGAGG G T A A AGG G A A A G G A G A G G A G G G G T G T G A T G G T T A G A G A A A A A G G A T A A G A A A T G G A T G A A T G T T G T T A
Osai A
osal AB
osalb  A C A G T A G A G G G T A A A G G G A C A A A G G G G G G A G A G G G G T G A T G G G T T T A A G A G A A A A A G G A T A A G A A A A T G G A T G A A T G T T G T T A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 4605   4615   4625   4635   4645   4655   4665   4675   4685   4695
osala  C C C G G T T A G C A C A T T G A C T G A T G A G G G G G C A A A G A G T G C A G A G G T C A A A A A G G A A C A G A A A G T T T A G T T T G G C A T T A G A G A A A G A G A A G
Osai A
osal AB
osalb  C C C G G T T A G C A C A T T G A C T G A T G A G G G G G C A A A G A G T G C A G A G G T C A A A A A G G A A C A G A A A G T T T A G T T T G G C A T T A G A G A A A G A G A A G

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 4705   4715   4725   4735   4745   4755   4765   4775   4785   4795
osala  G A A C A T A A A A T T T T A G A G G A T G A C A C C C C A T A G T A A G G A T G A G A C C C A T T G T G T A T T T T G G A T G G A G G A T T T G T A A G G T G T G T T G T
Osai A
osal AB
osalb  G A A C A T A A A A T T T T A G A G G A T G A C A C C C C A T A G T A A G G A T G A G A C C C A T T G T G T A T T T T G G A T G G A G G A T T T G T A A G G T G T G T T G T

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 4805   4815   4825   4835   4845   4855   4865   4875   4885   4895
osala  G T T C A A T A C C A T C G G A G C C T G T C T T T G T G C A G G C A A G A G A T T T G A G A T G T C A A A C A C C A G G T G T G T T A T T G G G A A G T G A T T G
Osai A
osal AB
osalb  G T T C A A T A C C A T C G G A G C C T G T C T T T G T G C A G G C A A G A G A G A T T T G A G A T G T C A A A C A C C A G G T G T G T T A T T G G G A A G T G A T T G

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 4905   4915   4925   4935   4945   4955   4965   4975   4985   4995
osala  T G A C C A C A A G A C C A G A G C C G A A G A G G C A C C A A C T A A C T T A T G A G A A G G A G A G A G G A A A G G A A G G C G T G A A A A G T G G A G T G G T G
Osai A
osal AB
osalb  T G A C C A C A A G A C C A G A G C C G A A G A G G C A C C A A C T A A C T T A T G A G A A G G A G A G A G G A A A G G A A G G C G T G A A A A G T G G A G T G G T G

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 5005   5015   5025   5035   5045   5055   5065   5075   5085   5095
osala  G G A C T G C T T G G A G A T G C T C G A G A A A A C C G T C G T A A C C T G C A A A T T C G G G G A A A T T G G A C T A T C C C A T A T C T G A G A G A T T G T G T
Osai A
osal AB
osalb  G G A C T G C T T G G A G A T G C T C G A G A A A A C C G T C G T A A C C T G C A A A T T C G G G G A A A T T G G A C T A T C C C A T A T C T G A G A G A T T G T G T

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
5105      5115      5125      5135      5145      5155      5165      5175      5185      5195
osala    GT TTGGA G GA T TTA A TGGG AGTT TG TT AG TGAAG A GGA TT T AA TAG G AATG GT T T AGAGAT
Osai A
osai AB
osai b

GTCTTGGAGC GAATCCTACA CTGGGCAGTT TGCCTTTAG CTGAAGCCCA GGACCCCTTC TCAACCTAG GATTA AATG GTTATTT TTAGAGAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
5205      5215      5225      5235      5245      5255      5265      5275      5285      5295
osala    TGGT TTGGA AACTTCAGC AACTCAGCA TCCAGGACAA CAATGTGGAC CTGATCTGG CCACTTCAGC TTTTAGAGC TGGAGAAGT TGTATAGTA
Osai A
osai AB
osai b

TGGT TTGGA AACTTCAGC AACTCAGCA TCCAGGACAA CAATGTGGAC CTGATCTGG CCACTTCAGC TTTTAGAGC TGGAGAAGT TGTATAGTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
5305      5315      5325      5335      5345      5355      5365      5375      5385      5395
osala    CATGGTGGC GTTCTTACTG ACC GAAAGAA CTTAGTGTGC TGGGAGATGG C CTGGTACT G TGGTAAAT TGGGTAAGG GGGATAG T CG AG GG
Osai A
osai AB
osai b

CATGGTGGC GTTCTTACTG ACC GAAAGAA CTTAGTGTGC TGGGAGATGG C CTGGTACT G TGGTAAAT TGGGTAAGG GGGATAG T CG AG GG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
5405      5415      5425      5435      5445      5455      5465      5475      5485      5495
osala    GCTATTGAG TGTAGAAGGG CAGATCGGC AACTCTTGG GTTTCTTGGG GGACAGCTT GTTGGTAAAC AGTTTACAGT GAGTAGGTA AG T TG
Osai A
osai AB
osai b

GCTATTGAG TGTAGAAGGG CAGATCGGC AACTCTTGG GTTTCTTGGG GGACAGCTT GTTGGTAAAC AGTTTACAGT GAGTAGGTA AG T TG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
5505      5515      5525      5535      5545      5555      5565      5575      5585      5595
osala    ATATGCAGAA TCCACCTTT GAACCAATA GTGTGGATAT GATGCTGGG GATGCTGAG CACTGTTG CACTGGTAAAG GTGGATGAGA A A T AGA
Osai A
osai AB
osai b

ATATGCAGAA TCCACCTTT GAACCAATA GTGTGGATAT GATGCTGGG GATGCTGAG CACTGTTG CACTGGTAAAG GTGGATGAGA A A T AGA

```


	5605	5615	5625	5635	5645	5655	5665	5675	5685	5695
osala	GTT A T TG TATGAGTCA GGTGTGTGGA CATCTCGTG TCAACTGA TGAATTATT GGTTCAAA GT ATTGTG ATGTA TGTT TTTGATTGG									
Osai A										
osai AB										
osaib	GTTCAATGTG TATGAGTCA GGTGTGTGGA CATCTCGTG TCAACTGA TGAATTATT GGTTCAAA GT ATTGTG ATGTA TGTT TTTGATTGG									

	5705
osala	CAGTCATGA
Osai A	
osai AB	
osala	CAGTCATGA

APÉNDICE 6

Alineamiento de la sonda *osa2-2* con el cDNA de *osa-2*.

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
osa2-raton atggggcgtt caggctcctgt gctccagatc ctgogcaggg atttggggcag cccgatggac ccaatgggtga tgaagagacc tcagttgtat gggatgggta
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
osa2-raton ctccccccca ctcccagcca cagcagagca gcccatacco aggaggctco tacggctccc caggtgcaca gcggtatccc cttggcatgc agggccgggc
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     205     215     225     235     245     255     265     275     285     295
osa2-raton tccagggggc ctgggaggct tgcagtacco gcagcagcag atgccaccgc agtaoggaca gcaagctgtg agtggctact gccagcaagg ccagcagcca
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     305     315     325     335     345     355     365     375     385     395
osa2-raton tactacaacc agcagccgca gccctcgcac ctcccccccc aggcacagta cctgcagccg gcggcggcgc agtcccagca gaggtaccag ccacagcagg
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     405     415     425     435     445     455     465     475     485     495
osa2-raton acatgtctca agaaggetat ggaactagat ctccagctcc tctggccctt ggaaatcca accatgaaga cttgaattta attcaacagg aaagaccatc
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     505     515     525     535     545     555     565     575     585     595
osa2-raton gagtctacca gacctgtctg gctccatcga tgacctcccc acgggaacag aagcaactct gagctcagca gtcagtgcac ccgggtctac aagcagccag
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     605     615     625     635     645     655     665     675     685     695
osa2-raton ggagatcaga gcaaccoagc gcagctctct ttctccccac atgcataccc tcacctctcc agcatccctg gaggggcgtc acctctctct gttggctctc
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     705     715     725     735     745     755     765     775     785     795
osa2-raton ctgtgggaag caaccaatcg aggtctggtc cgatctcccc tgcgagtatt ccagccgtgc acgcagcagc atactgcctc tgtggactgt caccactyca
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
```

805 815 825 835 845 855 865 875 885 895
 osa2-raton gccgtgcacg cagcagcata ctgcctotgt ggactgtcac cgctgcagcc gtgcacgcag cagcatactg cctctgtgga ctgtcaccgc tgcagccgtg
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 905 915 925 935 945 955 965 975 985 995
 osa2-raton cacgcagcag catactgcct ctgtggactg tcacgcctgc agccgtgcac gcagcagcat actgcctctg tggaaagggg ggoattgacc tgctgtactg
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1005 1015 1025 1035 1045 1055 1065 1075 1085 1095
 osa2-raton aggactcgag acgtagccag atgocctcgc aaccacctgg aagccagtca gaatccagtt cccatcctgc cttgagcagc tcaccaatgc cacaggaag
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1105 1115 1125 1135 1145 1155 1165 1175 1185 1195
 osa2-raton aggttttatg acagggcactc agagaaaccc tcagatgtct cagtaaggac ctcagcagac aggaccatcc atgtcgcctc acccatctcc tgggggcccag
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1205 1215 1225 1235 1245 1255 1265 1275 1285 1295
 osa2-raton atgcacctcg ggatcagtaa ctttcagcag agtaactcaa gtggcacgta cggcccacag atgagccagt atggaccaca aggcaactac tccagaaccc
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1305 1315 1325 1335 1345 1355 1365 1375 1385 1395
 osa2-raton caacatatag cgggggtacc agtgcaagct acagcggccc agggcccggg atgggcatca atgccaaca ccagatgcat ggacaagggc cagcccagcc
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1405 1415 1425 1435 1445 1455 1465 1475 1485 1495
 osa2-raton atgtggtgct atgcccctgg gacgaatgcc ttcagctggg atgcagaaca gacatttcc tggaaacctg agcagcgtca ccccagttc tcttggcatg
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1505 1515 1525 1535 1545 1555 1565 1575 1585 1595
 osa2-raton tctcaacagg gagggccagg aatgggccc ccaatgccc ctgtgaaccg gaaggcccag gaagctgccg cagctgtgat gcaggctgct gcaaacctcag
 osa2-2

|....||....||....||....||....||....||....||....|
 1605 1615 1625 1635 1645 1655 1665 1675 1685 1695
 osa2-raton cacaaagcag gcaaggcagt tttcctggca tgaaccagag tggcctggtg goctccagct ctcctacag ccagtocatg aacaacaact ccagcctgat

osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
1705 1715 1725 1735 1745 1755 1765 1775 1785 1795
osa2-raton gagcaccag gccagccct acagcatgac gccacaatg gtgaacagct ccacagcacc tatgggtctt gcagatatga tgtctcccag tgagtccaaa
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
1805 1815 1825 1835 1845 1855 1865 1875 1885 1895
osa2-raton ttgtctgtgc ctotaaagc agatggtaaa gaagaaggcg tgtcccagcc tgagagcaag tcaaaggaca gctatggctc tcagggcatt tcccagcctc
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
1905 1915 1925 1935 1945 1955 1965 1975 1985 1995
osa2-raton caacccagg caacctgctt gtcccttccc caatgtctcc cagctctgcc agcatctcct cctttcatgg agatgagagt gacagcatta gcagcccagg
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
2005 2015 2025 2035 2045 2055 2065 2075 2085 2095
osa2-raton ctggoccaa acaccatcaa gccctaagtc cagctcttcc tccaccactg gggagaagat cacgaaggtc tatgagctgg ggaatgagcc ggagaggag
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
2105 2115 2125 2135 2145 2155 2165 2175 2185 2195
osa2-raton ctgtgggtcg accgttacct aacgttcatg gaagagaggg gctccccggt gtccagctcg ccagcagtg gcaagaagcc cctggacctg ttccgactgt
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
2205 2215 2225 2235 2245 2255 2265 2275 2285 2295
osa2-raton atgtctcgt caaggagatt ggaggtttgg cgcaggtaa taaaaacaag aagtggcgtg agctggcaac caacctgaac gttggcactt ccagcagcgc
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
2305 2315 2325 2335 2345 2355 2365 2375 2385 2395
osa2-raton agccagctct ctgaaaaagc agtatattca gtacctgttc goctttgagt gcaaaactga gcgcggggag gagccccac ctgaagtctt cagcaccggg
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
2405 2415 2425 2435 2445 2455 2465 2475 2485 2495
osa2-raton gattcgaaga agcagccaaa gctccagccg coactctctg ctaactcagc atccttaca ggcaccacaga ctccacagtc aactgggagc aattcgatgg
osa2-2

....|....||....||....||....||....||....||....||....|
2505 2515 2525 2535 2545 2555 2565 2575 2585 2595
osa2-raton cagaggttcc aggtgacctg aagccaccaa ccccagcctc taccctcat ggacagatga ctccatgca aagcgaaga agcagtacag tcagtgtgca
osa2-2

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2605      2615      2625      2635      2645      2655      2665      2675      2685      2695
osa2-raton tgaccogttc toagacgtga gtgactcagc gtaocccaaaa cggaactcoa tgaotccaaa ogccccatao oagcagggca tgggcatgcc agacatgatg
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2705      2715      2725      2735      2745      2755      2765      2775      2785      2795
osa2-raton ggcagggatgc cctatgaacc caacaaggac cctttcagtg gaatgagaaa agtgectgga agtagtgagc cctttatgac acaaggacag gtgcccaca
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2805      2815      2825      2835      2845      2855      2865      2875      2885      2895
osa2-raton gcggcatgca ggacatgtac aaccagagcc cctcaggggc catgtccaat ctgygcatgg gacagoggca gcagtttccc tatggaacca gttatgaccg
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 2905      2915      2925      2935      2945      2955      2965      2975      2985      2995
osa2-raton aaggcatgag gcttacggac agcagtaacc aggccaaaggc cctcccacag gacagcccacc gtatggagga caccagcctg gctgttacc acagcagccg
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 3005      3015      3025      3035      3045      3055      3065      3075      3085      3095
osa2-raton aattacaaac gtcatatgga tggcatgtac gggcctccag ccaagcggca cgaggggagac atgtacaaca tgcagtatgg cagccagcag caggagatgt
osa2-2
                                     CAGCAG CAGGAGATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 3105      3115      3125      3135      3145      3155      3165      3175      3185      3195
osa2-raton ataaccagta tggaggctcc tactctggcc cggacagaag gcccatccag ggacaatatc cctaccctca caacagagaa aggatgcagg gcccaaggca
osa2-2
TTAACCAGTA TGGAGGCTCC TACTCTGGCC CGGACAGAAG GCCCATCCAG GGACAATATC CCTACCCCTA CAACAGAGAA AGGATGCAGG GCCCAGGCCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 3205      3215      3225      3235      3245      3255      3265      3275      3285      3295
osa2-raton gatgoagcca cbcggaatcc cacctcagat gatggggggc cccatgcagt catcctccag cgaggggctt cagcagaaca tgtgggctac acgcaacgat
osa2-2
GATGCAGCCA CACGGAATCC CACCTCAGAT GATGGGGGGC CCCATGCAGT CATCCTCCAG CGAGGGGCTT CAGCAGAACA TGTGGGCTAC ACGCAACGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 3305      3315      3325      3335      3345      3355      3365      3375      3385      3395
osa2-raton atgccttatc cctaccagag caggcaaggc ccggggcgcc ctgcacaggc ccccccttac ccaggcatga accgcacaga tgatatgatg gtacctgagc
osa2-2
ATGCCTTATC CCTACCAGAG CAGGCAAGGC CCGGGCGGCC CTGCACAGGC CCCCCCTTAC CCAGGCATGA ACCGCACAGA TGATATGATG GTACCTGAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
 3405      3415      3425      3435      3445      3455      3465      3475      3485      3495

```

```

osa2-raton agaggatcaa toacgagagc cagtggcctt ctcacgtcag ccagcgcoag cottacatgt oatctctggc ctocatgcag cccatcacgc gccacctca
osa2-2 AGAGGATCAA TCACGAGAGC CAGTGGCCTT CTCACGTCAG CCAGCACCAG CCTTACATGT CATCTTCGGC CTCCATGCAG CCCATCACGC GCCACCTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
3505 3515 3525 3535 3545 3555 3565 3575 3585 3595
osa2-raton gtoatcctao cagacgcgc cgtcaactgcc aaaccacatc toaggggcac ccagcccccgc ctccctccag cgtccctgg agagtgcac gtctccaagc
osa2-2 GTATCCTTAC CAGACGCCGC CGTCACTGCC AAACCACATC TCCAGGGCAC CCAGCCCCGC CTCCCTCCAG CGCTCCCTGG AGAGTGCAT GTCTCCAAGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
3605 3615 3625 3635 3645 3655 3665 3675 3685 3695
osa2-raton aagtctocct tcctgcccac catgaagatg oagaaggtea tgcccacagt cccacatcc caggtcaccg ggccccccc acagcctcca ccaatcagaa
osa2-2 AAGTCTCCCT TCCTGCCAC CATGAAGATG CAGAAGGTCA TGCCCACAGT CCCACATCC CAGGTACCCG GGCCCCCCC ACAGCCTCCA CCAATCAGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
3705 3715 3725 3735 3745 3755 3765 3775 3785 3795
osa2-raton gggagattac ctttcctcct ggotccgtag aagcatcaca gccaatcctg aaacaaaggc gaaagattac ctcaaaagat attgttaact ccgaggcgtg
osa2-2 GGGAGATTAC CTTTCCTCCT GGCTCCGTAG AAGCATCACA GCCAATCCTG AAACAAAGGC GAAAGATTAC CTCAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
3805 3815 3825 3835 3845 3855 3865 3875 3885 3895
osa2-raton gcggtgatg atgtccctta aatcggtct gttggtgag agoacgtgg ctctggacac catcaatatt ctccctatg atgacagcac cgtogccacc
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
3905 3915 3925 3935 3945 3955 3965 3975 3985 3995
osa2-raton ttcaatcttt cccagctgtc tggattcctg gaactattag tagagtactt togaaaatgc ctaattgaca ttttoggat tcttatggaa tatgaagaga
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
4005 4015 4025 4035 4045 4055 4065 4075 4085 4095
osa2-raton cgccaaagca ggccagtaag tttgacaagc tgcccataaa gattgtcaaa aagaacaagc tgtttgtggt ggaccgggtcc gacaagctgg gccgagtca
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
4105 4115 4125 4135 4145 4155 4165 4175 4185 4195
osa2-raton ggagttcagc agcgggctcc tccactggca gctgggtggt ggcgacacta ccagacacat ccagactcac ttcgagagca agatggagat cctcctcgc
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
4205 4215 4225 4235 4245 4255 4265 4275 4285 4295
osa2-raton aggcgtccac ctccgcctct aagctccacg ggtaagaaga aagagctgga aggcaaaagt gattctgaag agcagccaga gaaaagtatc atgcccacca
osa2-2

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
4305 4315 4325 4335 4345 4355 4365 4375 4385 4395

```

osa2-raton togatgacgt cttgtctgcc cggccagggg ctctgcctga agacaccaac ocaggacccc agaccgacag cggcaagttt ccctttgaa tccagcaggc
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 4405 4415 4425 4435 4445 4455 4465 4475 4485 4495
 osa2-raton caaagccac oggaacatca ggcctctgga agacgagccc aggagccgag acgagacgcc gctgtgcacc atcgcgcact ggcaggactc actggccaag
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 4505 4515 4525 4535 4545 4555 4565 4575 4585 4595
 osa2-raton cgctgcattc gtgtgtcgaa catcgtgcgg agcttgtctt tcgtgcctgg caacgaogca gagatgtcca aacaccggg cttggtgctg atcctgggaa
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 4605 4615 4625 4635 4645 4655 4665 4675 4685 4695
 osa2-raton agctgattct gctgcatcac gacgatccgg agagaaagcg ggccacacag acctatgaga aggaggagga cgaggacaag ggggtggcct gcagcaaga
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 4705 4715 4725 4735 4745 4755 4765 4775 4785 4795
 osa2-raton tgagtgtggtg tgggactgcc togaggctt ggggataac accctgttca cgttggcgaa cattccggg cagctagact tgtctgctta cacagagagc
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 4805 4815 4825 4835 4845 4855 4865 4875 4885 4895
 osa2-raton atctgcttgc cgatcctgga cggtctgcta cactggatgg tgtgcccgtc cgcagagggt caggaccctt tcccactgt ggggcccac taagtctctg
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 4905 4915 4925 4935 4945 4955 4965 4975 4985 4995
 osa2-raton cgccgcagag acttgtgctg gagaccctgt gtaaacctag tatccaggac aacaactgtg acctgatctt ggccacgctt ccatttagtc gtcaggagaa
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 5005 5015 5025 5035 5045 5055 5065 5075 5085 5095
 osa2-raton attttatgct acattagta ggtacgttgg ggatcgcaaa aatccagtct gtogagaaat gtccatggcg cttttatcga acctgcccac gggggacaca
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 5105 5115 5125 5135 5145 5155 5165 5175 5185 5195
 osa2-raton ctggcggcga gggcaatagc tgtgcagaaa ggaagcattg gtaacttgat aagcttccca gaggacgggg tgacgatggc gcagtaccag cagagccagc
 osa2-2
|....||....||....||....||....||....||....||....||....|
 5205 5215 5225 5235 5245 5255 5265 5275 5285 5295
 osa2-raton ataaccttat gcacatgcag ccccacctc tggaaacccc tagtgtagac atgatgtgcc gggcggccaa agctctgctg gcoatggcca gagtggacga

osa2-2

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   5305       5315       5325       5335       5345       5355       5365       5375       5385       5395
osa2-xaton gaaccgctcg gagttccttt tgcacgaggg tcggttgctg gatatactca tctcagctgt cctgaactct ctggttgcac ctgtcactcg tcatgtactg
osa2-2
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   5405       5415
osa2-xaton ttccagattg gccagttatg a
osa2-2
```