



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

*Expresión del factor inhibitorio de
leucemia (LIF) por células COS7*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO
P R E S E N T A :
HÉCTOR MAURICIO SUÁREZ GÓMEZ



Tutor: Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

2006



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Expresión del factor inhibitorio de leucemia (LIF) por
células COS7

realizado por Héctor Mauricio Suárez Gómez

con número de cuenta 07736526-2 quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Propietario Dra. María Luisa Fanjul Peña

Propietario M en IBB Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Suplente Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés

Suplente Dr. Víctor Manuel Valdés López

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las siguientes personas su ayuda durante la realización de este trabajo:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, por su atención y sus indicaciones para lograr la consecución de este proyecto y por permitirme usar su laboratorio para llevar a cabo todos y cada uno de los experimentos necesarios.

Dr. Juan Francisco Velásquez Vadillo, por la aportación de su experiencia para obtener las condiciones de clonación del gen LIF y por sus consejos para la subclonación en los diferentes vectores de expresión.

Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés, por las largas discusiones sostenidas sobre los problemas que se presentaron durante la realización de este trabajo y las mil y un propuestas que surgieron de estas discusiones.

Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo, por su valiosa guía en la realización de las transfecciones por el método de fosfato de calcio y también por sus inigualables comentarios y sugerencias.

M. en C. Juana Narváez, por sus propuestas alternativas sobre subclonación, las cuales arrojaron luz cuando se veía muy oscuro el panorama.

M. en C. Carlos Cruz Cruz, por su ayuda y guía para llevar a cabo las imágenes del microscopio de fluorescencia y por su colaboración en los ensayos de secuenciación.

Julio César Ramírez Gómez por la ayuda técnica y por tener siempre el material de laboratorio limpio y estéril.

Jaime Ramírez Estudillo por su colaboración para mantener el material limpio y estéril.

PENSAMIENTOS

A mi amada esposa, sin tu persistencia y ejemplo creo que nunca lo hubiera conseguido. No siempre es necesario dar impulso con la voz, en muchas ocasiones las acciones y la presencia son motivo suficiente.

A mi preciosa hija Ariadna, este logro también es debido a ti y tu simpática presencia. Alegras la vida de cualquier persona con tu continua charla y abres nuevos caminos de pensamiento con tus interesantes preguntas.

A mi gran amigo Miguel Angel, charlas como las que hemos tenido dan sentido a las cosas cuando todo parece negro y sin solución.

A todos los que de alguna forma tuvieron que ver en el desarrollo de este trabajo, les pido disculpas si no me acuerdo de ustedes en estos momentos pero va un sincero y muy profundo agradecimiento a todos.

A mis compañeros de laboratorio en Biomedicina Molecular: Miguel, Carmen, Julio, Juana, Norma, Sandra, Jaime, Francisco. Y también por supuesto a Carlos.

Finalmente un agradecimiento especial a Marco, Dr. Marco, por su ayuda, paciencia, estímulo, consejo y amistad. Muchas gracias “Doc”.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
PENSAMIENTOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
INDICE	1
RESUMEN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
INTRODUCCION	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
¿QUÉ ES UNA CITOCINA?	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
CITOCINAS FRENTE A HORMONAS.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FUNCIÓN DE LAS CITOCINAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
PLEIOTROPÍA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIA (LIF)	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ANTECEDENTES DIRECTOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
JUSTIFICACIÓN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
HIPÓTESIS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
OBJETIVOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
OBJETIVO GENERAL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
OBJETIVOS PARTICULARES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
RESULTADOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<i>Foto 1. Gel de agarosa de la extracción de RNA de fibroblastos embrionarios de rata.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 2. Gel de RT-PCR usando oligo DT y oligo RLIF3 (a); amplificado para obtener mayor cantidad de fragmento(b).</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 3. Diferentes temperaturas y número de ciclos de reacción 3a-62°C, 3b-64°C y 3c-66 y 68°C.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 4. Gel preparativo (a) de LIF y (b) después de extraída la banda y purificada por columna.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 5. PCR de 5 colonias candidatas de la ligación pGEM-T easy – LIF, la colonia C14 no fue tomada en cuenta porque su corrimiento no fue el esperado.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 6. Restricción de 2 de las clonas (C11 y C12) candidatas con Eco RI, se aprecia que las dos colonias liberan un fragmento de aproximadamente 630pb, ya que la enzima flanquea al fragmento.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 7. Restricción de pcDNA3 y de pGTELI FRAT-C12 (LIF) con Eco RI</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 8. Gel de agarosa para confirmar que la reacción de ligación pcDNA3-LIF fue correcta, se observa en el carril 4 las diferentes bandas que dio la ligación.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 9. Restricción con Eco RI, de las colonias candidatas para comprobar que tuvieran el fragmento ligado.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 10. Gel de restricción de 10 colonias candidato con Xmn I para liberar tres fragmentos y saber así la orientación del fragmento ligado.</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 11. Transfección de células 293T con pCL-GFPN (plásmido con proteína verde fluorescente) donde se aprecia la eficiencia de transfección tanto en contraste de fase como en epifluorescencia (a y b); y de células 293T sin DNA donde se puede observar que no hay autofluorescencia (c y d)</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Foto 12. Western-Blot de la transfección de células 293T (carril 1 Mock, carril 2 BFA- y carril 3 BFA+) y COS7 (carril 5 Mock, carril 6 BFA- y carril 7 BFA+), donde se observa una banda de aproximadamente 43kDa que es el peso de la proteína LIF; marcador de peso molecular (carril 4); células de hígado de rata búfalo sin transfectar (carril 8) sirvieron como control.</i>	Error! Bookmark not defined.
ANÁLISIS DE RESULTADOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
CONCLUSIONES	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
EXPECTATIVAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
METODOLOGIA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<i>Reacciones y ensayos.....</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Cuadro I. Colocar en un tubo de pared delgada de 0.2ml:</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Cuadro II Condiciones para realizar la PCR con 5 colonias elegidas al azar para confirmar si tenían el inserto.</i>	Error! Bookmark not defined.

Cuadro III. Para linearizar el vector de expresión eucariótico pcDNA3 y extraer el fragmento del vector procariótico pGEM-Teasy realizamos las siguientes restricciones con Eco RI	Error! Bookmark not defined.
Cuadro IV. Reacción de ligación en el vector pcDNA3, se dejó 2hr a temperatura ambiente.	Error! Bookmark not defined.
Cuadro V. Restricción del DNA obtenido de las minipreps con Eco RI para confirmar que las colonias seleccionadas tienen el inserto.	Error! Bookmark not defined.
Cuadro VI. Restricción con Xmn I para liberar varias bandas y saber cuales clonas tienen el inserto en el sentido 5' → 3'	Error! Bookmark not defined.
Cuadro VII. Ensayo de transfección realizado en células 293T para probar la eficiencia de transfección por el método de fosfato de calcio y con un tratamiento de Brefeldin A (BFA).	Error! Bookmark not defined.
Cuadro VIII. Condiciones de transfección:	Error! Bookmark not defined.
Cuadro IX. Transfección por el método de fosfato de calcio llevado a cabo en células 293T y COS7.	Error! Bookmark not defined.
Protocolos	Error! Bookmark not defined.
Preparación de células competentes.	Error! Bookmark not defined.
Extracción de RNA total a partir de fibroblastos embrionarios por el método de trizol	Error! Bookmark not defined.
Condiciones para llevar a cabo la reacción de Reverso Transcriptasa (RT) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	Error! Bookmark not defined.
Purificación de la banda.	Error! Bookmark not defined.
Ligación en un vector de expresión procariótico.	Error! Bookmark not defined.
Transformación de células competentes DH5α (CC-DH5α) por el método de choque térmico.	Error! Bookmark not defined.
Chequeo de la reacción de ligación.	Error! Bookmark not defined.
Purificación de DNA plasmídico (maxiprep).	Error! Bookmark not defined.
Ligación a un vector de expresión eucariótico pcDNA3	Error! Bookmark not defined.
Extracción de DNA por el método de la lisis alcalina (miniprep)	Error! Bookmark not defined.
Reacción de secuencia	Error! Bookmark not defined.
Purificación de la reacción de secuencia	Error! Bookmark not defined.
Transfección por el método de fosfato de calcio.	Error! Bookmark not defined.
Geles de poliacrilamida.	Error! Bookmark not defined.
Inmunotransferencia.	Error! Bookmark not defined.
Revelado con ECL	Error! Bookmark not defined.

A P E N D I C E S.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

Montaje de vidrios y cámara para realizar SDS-PAGE	Error! Bookmark not defined.
Mapa del plásmido pGEMT-easy (vector de expresión procariótico)	Error! Bookmark not defined.
Mapa del plásmido pcDNA3 (vector de expresión eucariótico)	Error! Bookmark not defined.
Electroferograma de la clona pGTE-LIFrat-C12-1	Error! Bookmark not defined.
Electroferograma de la clona pcDNA3-C9	Error! Bookmark not defined.

M A T E R I A L E S Y R E A C T I V O S.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

R E F E R E N C I A S C I T A D A S.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

RESUMEN

El Factor Inhibitorio de Leucemia (LIF) es una citocina redundante y pleiotrópica como otras citocinas. Su importancia radica en el hecho de que ayuda en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre o troncales. Ha sido difícil ubicarlo dentro de algún grupo debido a que tiene muy diversas funciones y se le llamado con diversos nombres.

Debido a que es especialmente importante en el mantenimiento de las células troncales y a que el LIF de rata no se comporta igual con células de rata, un modelo muy estudiado en neurobiología y farmacología, es fundamental generar líneas celulares totipotenciales de rata para poder generar animales quiméricos y al mismo tiempo poder tener modelos knock-out o knock-in.

Clonamos el gen de LIF y lo subclonamos primero en un vector de expresión procariótico pGEM T-easy, posteriormente lo subclonamos en el vector de expresión eucariótico pcDNA3 y obtuvimos clonas con el inserto en sentido 5' → 3', confirmado por análisis de restricción, una de las cuales fue secuenciada resultando positiva. Con esta clona se hicieron ensayos de transfección en células COS7 y posteriormente se realizó un inmunoblot con anticuerpos específicos para la proteína y demostrar su expresión en estas células.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible producir LIF en células diferentes a fibroblastos, lo cual puede ser de gran ayuda para el mantenimiento de las células troncales en estado indiferenciado.

INTRODUCCION

¿Qué es una citocina?

Las citocinas son un grupo de moléculas efectoras polipeptídicas que son producidas por células externas al sistema endócrino, principalmente por células del sistema inmune. Siendo muy importantes en la respuesta inmune innata mediante la activación de macrófagos y de células NK induciendo procesos inflamatorios, así mismo en la respuesta adquirida tanto humoral como celular, y han sido descubiertas durante las últimas décadas. Al principio, el término describía a cualquier sustancia soluble producida por células linfoides o no linfoides. Actualmente se considera citocinas a los siguientes grupos: interleucinas, interferones, factores estimulantes hematopoiéticos, factores de necrosis tumoral y polipéptidos relacionados, diversos factores de crecimiento celular y las quimiocinas.

Actúan fundamentalmente tanto sobre la misma célula que las produce (actividad autócrina) como sobre las células vecinas (actividad parácrina) más que sobre células y tejidos distantes al sitio de su producción (actividad endócrina).



Esquema representando las diversas actividades que tienen las citocinas
Tomado de <http://www.sanidadanimal.info/inmuno/sextol.htm>

Citocinas frente a hormonas

Muchas citocinas, en contraste con las hormonas, demuestran redundancia bioquímica y hay evidencia que sugiere que las citocinas actúan primariamente sobre las células en la vecindad de sus células secretoras.

Citocinas	Hormonas clásicas
Proteínas o glicoproteínas.	Polipéptidos, proteínas, esteroides y derivados de amino ácidos aromáticos.
Producidas por células especializadas o no especializadas (mayormente fuera del sistema endócrino) de muchos tejidos y órganos para actuar localmente (acción parácrina o autócrina), pero pueden actuar a distancia si son liberadas en el sistema circulatorio.	Producidas por células especializadas de glándulas endócrinas que actúan a distancia (acción endócrina) sobre células blanco y órganos.
Los receptores se encuentran en diversos tipos celulares diferentes a las células blanco.	Receptores restringidos a una o pocas células blanco.
Muchas, pero no todas, son directamente mitogénicas <i>in vitro</i> (y probablemente) <i>in vivo</i> también).	Raramente mitogénicas directamente <i>in vitro</i> , con excepción de la insulina.
Frecuentemente sobrelapan sus actividades biológicas	Poco sobrelape de actividades biológicas.

Tomado de "The Molecular Biology of Cytokines"

Función de las citocinas

Las citocinas funcionan únicamente como moléculas mensajeras intercelulares y no parece que tengan alguna otra función, por ejemplo como enzimas o como acarreadores de proteínas. Disparan respuestas celulares solamente por la interacción con receptores de superficie celular específicos, los que posteriormente a su activación generan procesos intercelulares que conducen a cambios en el metabolismo. Estos cambios en las características y crecimiento celular son observables y medibles.

Pleiotropía

Debido a que los receptores de citocinas están ampliamente distribuidos entre diferentes tipos celulares, una citocina individual puede actuar potencialmente en todas las células que comparten este receptor. Por esta razón se dice que las citocinas son mediadores pleiotrópicos. Esta actividad en diferentes tipos celulares estará dirigida por variables medio ambientales y por parámetros celulares, incluyendo:

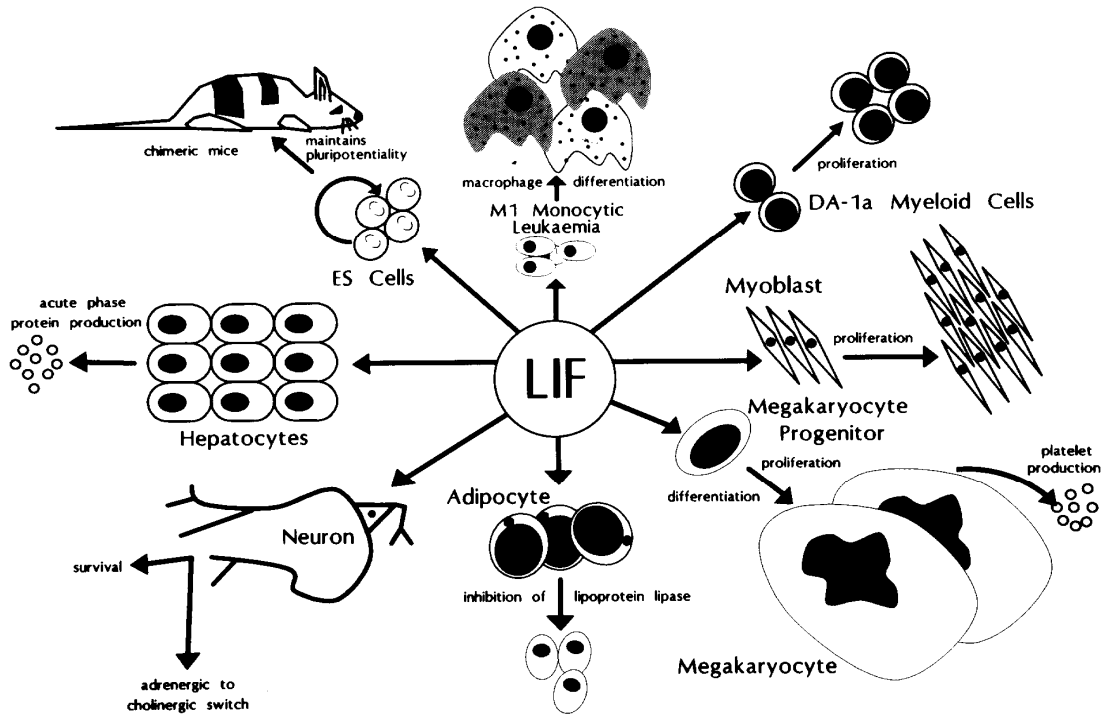
Concentración de la citocina.

Presencia de otras citocinas, otros mediadores solubles y antagonistas de citocinas –y receptores de citocinas-.

Número y eficacia de transducción de señal de los receptores de las citocinas.

Respuesta y funcionamiento de rutas de señalización intracelular.

Acción de factores de transcripción nuclear e inducción de expresión de genes; síntesis de proteínas y secreción.



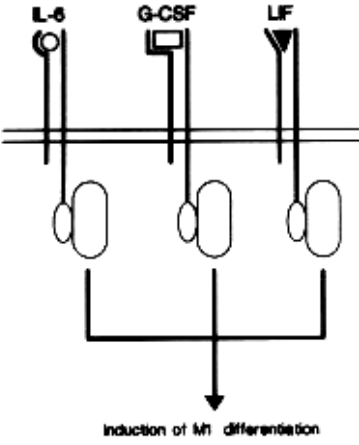
Esquema representativo de la pleiotropía de una citocina (en este caso LIF). (Tomado de Milton, 1992).

Este grupo de moléculas se han agrupado en familias relacionadas tanto estructuralmente como por sus receptores de membrana, lo cual ha conducido a la división en familias y grupos dentro de otros grupos. Dentro del grupo de la Interleucina-6 (IL-6) se hallan comprendidos la oncostatina M (OSM), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), IL-11 y el factor inhibitorio de leucemia (LIF).

Factor Inhibitorio de Leucemia (LIF)

Esta citocina en especial y como ya se ha mencionado tiene al igual que otras citocinas pleiotropía y redundancia. Entendiendo por redundancia el que varias citocinas que comparten el mismo receptor puedan actuar sobre las mismas células blanco. Otras citocinas que comparten el mismo receptor son IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, G-CSF, GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocito macrófago), EPO (eritropoietina), CNTF, OSM y la hormona del crecimiento (GH).

Esquema representativo la redundancia de una citosina.



JUSTIFICACIÓN

El LIF es una citocina muy importante para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células troncales embrionarias. Tiene propiedades de señalización celular que mantiene a estas células con toda su pluripotencialidad. Poco se sabe de las propiedades especie-especificidad de esta molécula, ya que el LIF de ratón parece no tener la misma actividad inhibidora de diferenciación en células de rata aún a pesar de ser especies muy cercanas. El modelo animal de rata es muy importante en estudios de neurobiología y farmacología, sin embargo, hasta la fecha no existe la metodología necesaria para poder crecer células troncales embrionarias totipotenciales de esta especie, fundamentalmente porque no ha sido posible inhibir el proceso de diferenciación. Lograr generar líneas embrionarias totipotenciales de rata puede contribuir a la generación de una línea de animales quiméricos y éstos a su vez pueden dar origen a ratas knock-out o knock-in con los cuales se pueden hacer otros avances en la biología y la patología de enfermedades particulares en el hombre, siendo una estrategia atractiva por ejemplo en las enfermedades neurológicas (enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, etc.). Es por esto que como etapa inicial en la generación de líneas de células troncales se cuenta con una línea celular que exprese o sobre exprese el LIF de rata para poder mantener indiferenciadas a las células troncales embrionarias de rata.

OBJETIVOS

Objetivo General

Generar líneas celulares fibroblásticas que expresen suficiente cantidad de LIF de rata para ser usadas como células alimentadoras de líneas de células TRONCALES embrionarias de rata.

Objetivos particulares

1. Aislar el cDNA que codifica para la proteína LIF a partir de RNA de fibroblastos embrionarios de rata por la técnica de RT-PCR.
2. Clonar el cDNA de LIF de rata en un vector de expresión procariótico (pGEM-T easy).
3. Obtener clonas con el inserto y demostrar que está en el sentido 5' → 3'.
4. Secuenciar las clonas positivas para comprobar que se trata del gen de LIF.
5. Subclonar el cDNA de LIF en un vector de expresión eucariótico (pcDNA3).
6. Obtener clonas con el inserto y demostrar que está en el sentido 5' → 3' mediante digestión con enzimas de restricción.
7. Secuenciar las clonas positivas para comprobar que no existen mutaciones en el gen de LIF.
8. Transfectar células COS7 con el cDNA de LIF y generar líneas transfectantes estables mediante el uso del antibiótico Geneticina (G418) como agente de selección.
9. Demostrar la expresión de la proteína recombinante (LIFr), en células transfectadas.

RESULTADOS

Se extrajo el RNA de un cultivo de fibroblastos embrionarios de rata y se determinó la concentración leyendo en el espectrofotómetro (Foto 1).

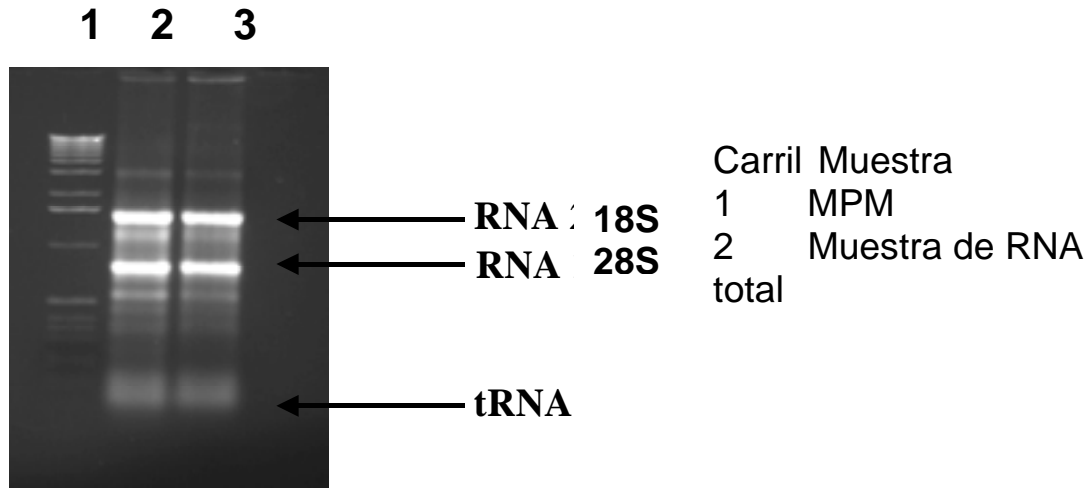


Foto 1. Gel de agarosa de la extracción de RNA de fibroblastos embrionarios de rata.

Una vez obtenido el RNA, se usó éste para generar por medio de la reacción de la transcriptasa reversa (RT) el DNA con los oligos Oligo dT y RLIF3 (Foto 2); posteriormente se usaron los oligos RLIF4 y RLIF5 para obtener la cadena complementaria de DNA (cDNA) con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniendo bandas bien definidas con un peso aproximado de 600pb (Foto 2). Las condiciones de reacción de cada paso se dan en la sección de Metodología.

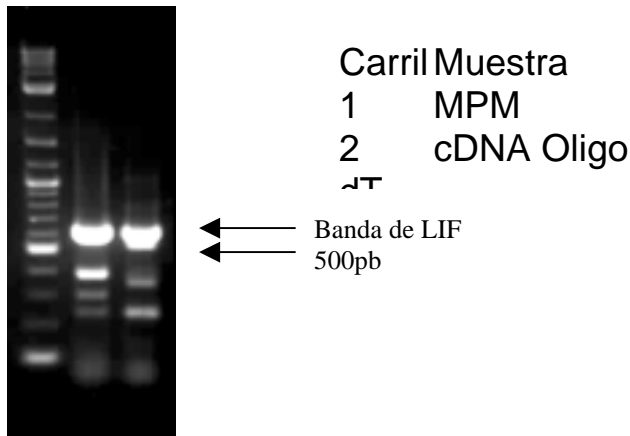


Foto 2. Gel de RT-PCR usando oligo DT y oligo RLIF3 (a); amplificado para obtener mayor cantidad de fragmento(b).

Se llevaron a cabo varios PCR's con diferentes temperaturas y número de ciclos para obtener las mejores condiciones de amplificación del producto (62, 64, 66 y 68°C y desde 27 a 35 ciclos) (Fotos 3a, 3b y 3c).

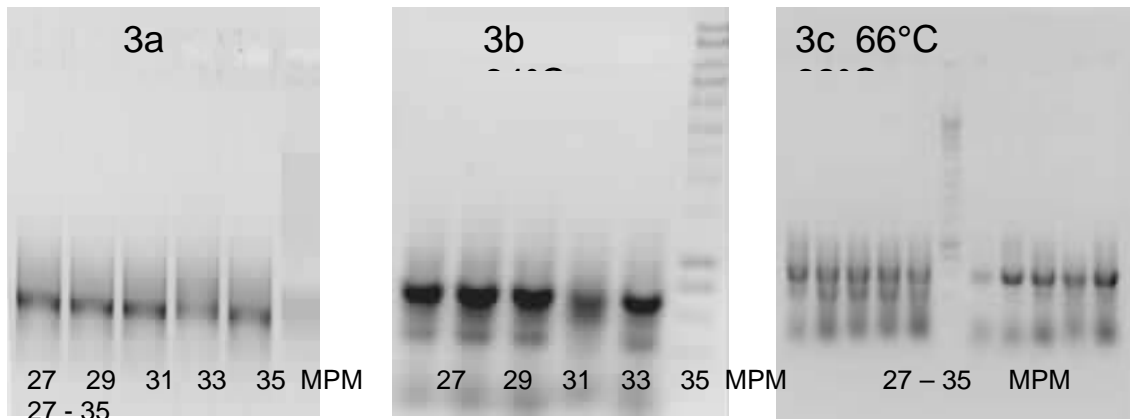


Foto 3. Diferentes temperaturas y número de ciclos de reacción 3a-62°C, 3b-64°C y 3c-66 y 68°C,

Ya que la mejor amplificación que se obtuvo fue con 68°C y 35 ciclos posteriormente se corrió otro PCR con las mismas condiciones y un volumen final de 100µl y con este producto se corrió un gel preparativo en un gel de agarosa a 1%, del cual se extrajo la banda perteneciente al gen del LIF (Foto 4a).

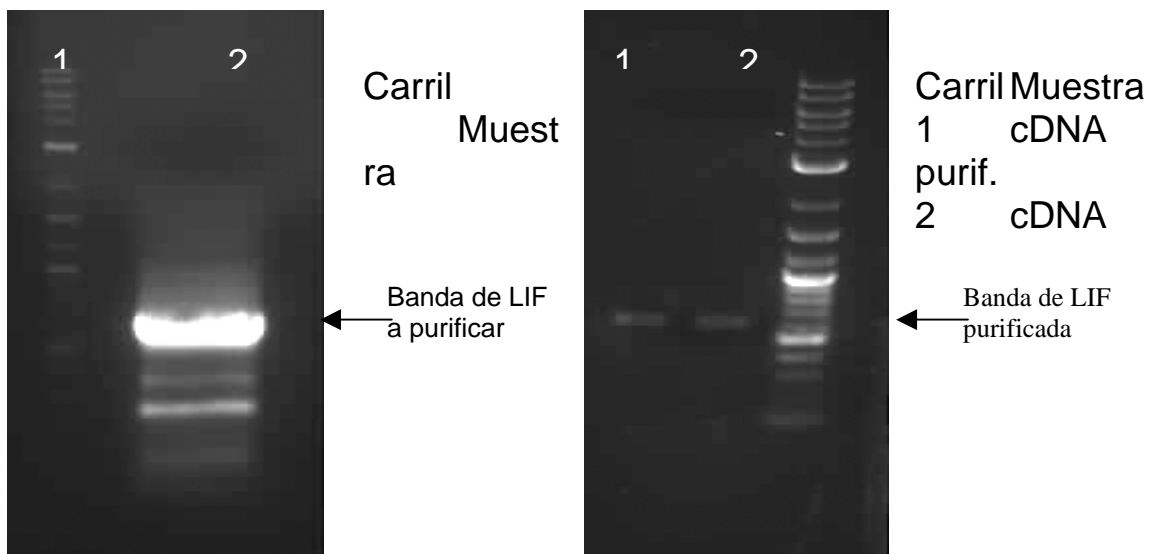


Foto 4. Gel preparativo (a) de LIF y (b) después de extraída la banda y purificada por columna,

La banda fue purificada y se corrió en un gel de agarosa al 1% (Foto 4b). Se realizó la ligación del producto al vector de expresión p-GEM-T easy (Fig. 8 del apéndice) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Con el producto de ligación se llevó a cabo una transformación de células competentes DH10β (CC-DH10β). Se incubó toda la noche a 37°C y posteriormente se realizó un PCR con 5 colonias elegidas al azar (Foto 5), de estas colonias se obtuvieron 4 candidatas positivas, y de éstas se tomaron 2 clonas: la clona 1 (C11) y la clona 2 (C12), y se incubaron en 400 ml

de medio líquido LB-amp toda la noche a 37°C en agitación, para realizar una extracción de DNA (maxiprep).

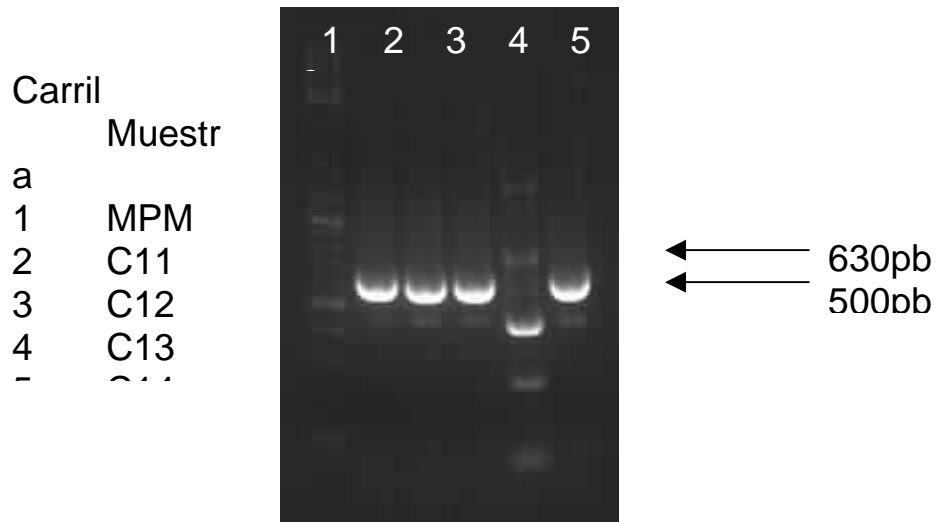


Foto 5. PCR de 5 colonias candidatas de la ligación pGEM-T easy – LIF, la colonia C14 no fue tomada en cuenta porque su corrimiento no fue le esperado.

Esta maxiprep fue purificada con Qiagen de acuerdo a las instrucciones del proveedor, al finalizar la purificación se tomaron 2µl y se leyó la DO en el espectrofotómetro a 260nm y con esto se calculó la concentración. Se tomaron 4µl más de cada una y se corrió una digestión con la enzima Eco RI (Foto 6).

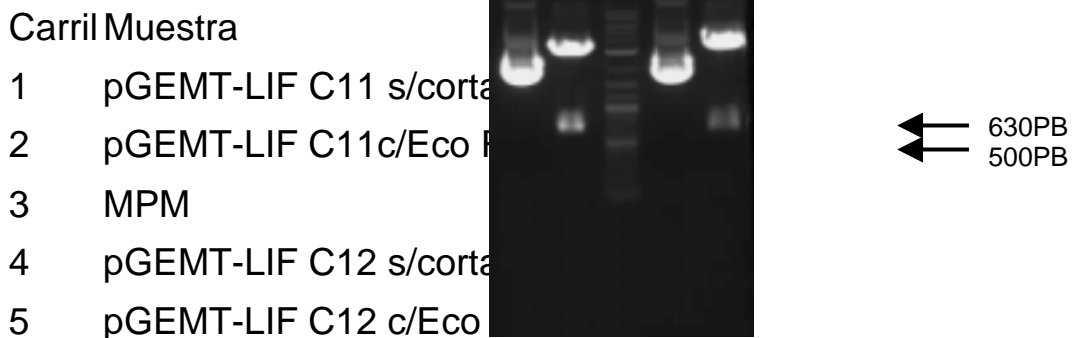


Foto 6. Restricción de 2 de las clonas (C11 y C12) candidatas con Eco RI, se aprecia que las dos colonias liberan un fragmento de aproximadamente 630pb, ya que la enzima flanquea al fragmento.

Posteriormente se llevó a cabo la reacción de secuencia y este producto fue secuenciado (Fig. 10 del apéndice).

Ya que se tuvo la seguridad de que la secuencia fue la correcta, entonces se procedió a linearizar el vector de expresión eucariótico pcDNA3, con una enzima de restricción (Fig. 9 del apéndice) y a

extraer el fragmento clonado en el vector pGEM-T easy, todo esto se realizó cortando con la enzima de restricción Eco RI (Foto 7).

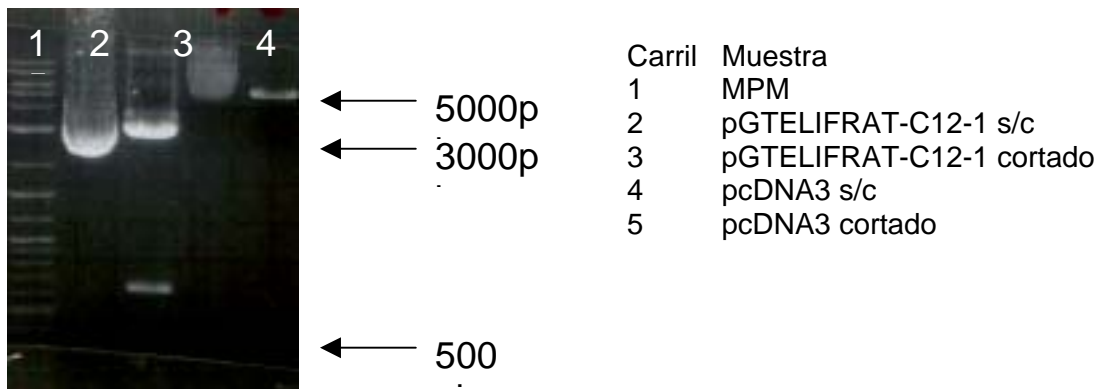


Foto 7. Restricción de pcDNA3 y de pGTIELIFRAT-C12 (LIF) con Eco RI

Se realizó la reacción de ligación del fragmento con el vector. Se corrió un gel al 0.7% para confirmar que la reacción de ligación hubiese sido correcta (Foto 8).

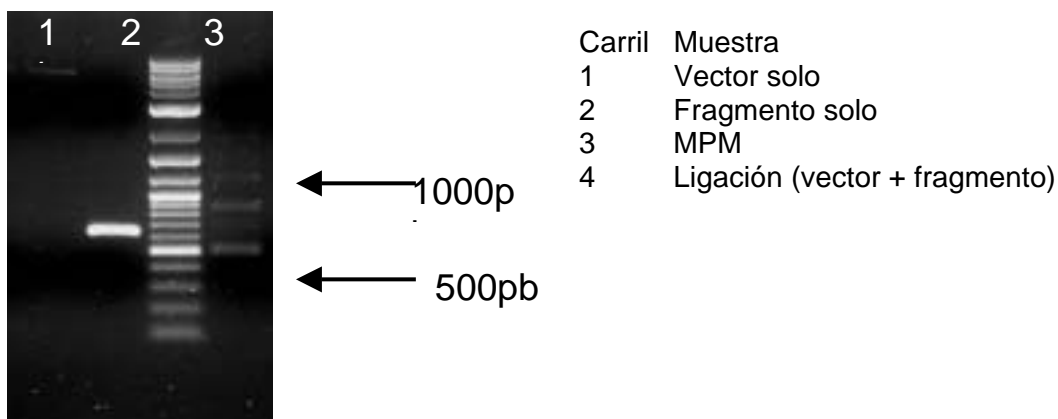


Foto 8. Gel de agarosa para confirmar que la reacción de ligación pcDNA3-LIF fue correcta, se observa en el carril 4 las diferentes bandas que dio la ligación.

Con el restante volumen de la ligación se hicieron transformaciones en CC DH10 β .

Al día siguiente se tomaron 10 colonias transformantes y se incubaron en medio líquido para realizar una purificación de DNA (miniprep). Con este DNA se realizaron dos restricciones, primero con Eco RI para liberar el fragmento y comprobar que lo que se ligó era lo correcto (Foto 9). En un volumen final de 20 μ l.

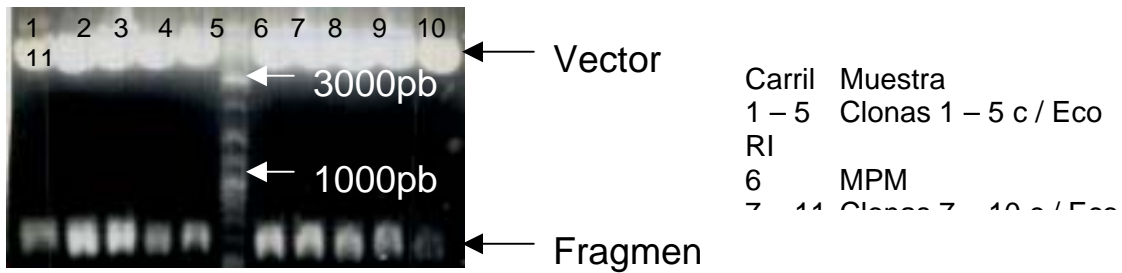


Foto 9. Restricción con Eco RI, de las colonias candidatos para comprobar que tuvieran el fragmento ligado.

Posteriormente se llevó a cabo una restricción con Xmn I, para ver la orientación del fragmento ligado, durante 2hrs. a 37°C (Foto 10).

Si estaba en el sentido 5' → 3' se esperaban tres bandas de los siguientes tamaños:

1266 1450 3384

siendo este el sentido que nosotros esperábamos obtener.

Si estaba en el sentido 3' → 5' se esperaban tres bandas de los siguientes tamaños:

1003 1623 3384

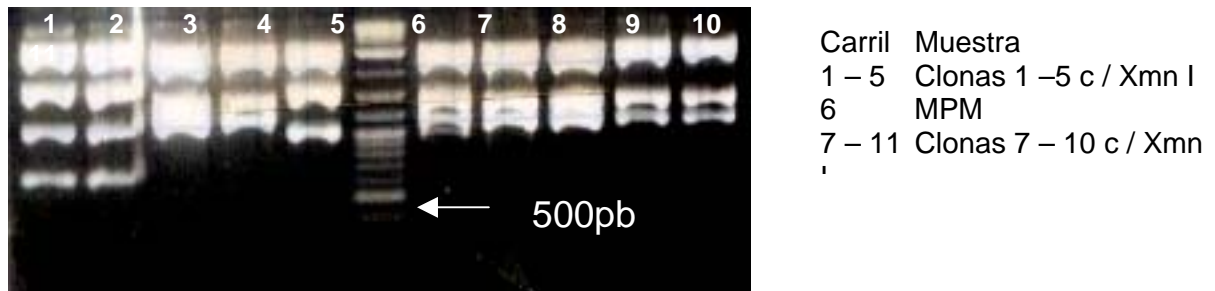


Foto 10. Gel de restricción de 10 colonias candidato con Xmn I para liberar tres fragmentos y saber así la orientación del fragmento ligado.

De las clonas con la orientación correcta se eligieron dos al azar (C9 y C10) y se llevó a cabo la reacción de secuencia para su secuenciación posterior.

Resultando la colonia C9 con la secuencia completa y la orientación correcta, es decir con orientación 5' → 3'. Se realizó una transformación con esta clona para poder llevar a cabo una amplificación de DNA por maxiprep.

Con este DNA purificado por columna de Qiagen se procedió a realizar un ensayo de transfección en células 293T (riñón humano fetal) (Foto 11) para ver la eficiencia de transfección. Se realizaron 5 transfecciones por el método de fosfato de calcio como se indica en el Cuadro IX (Metodología)

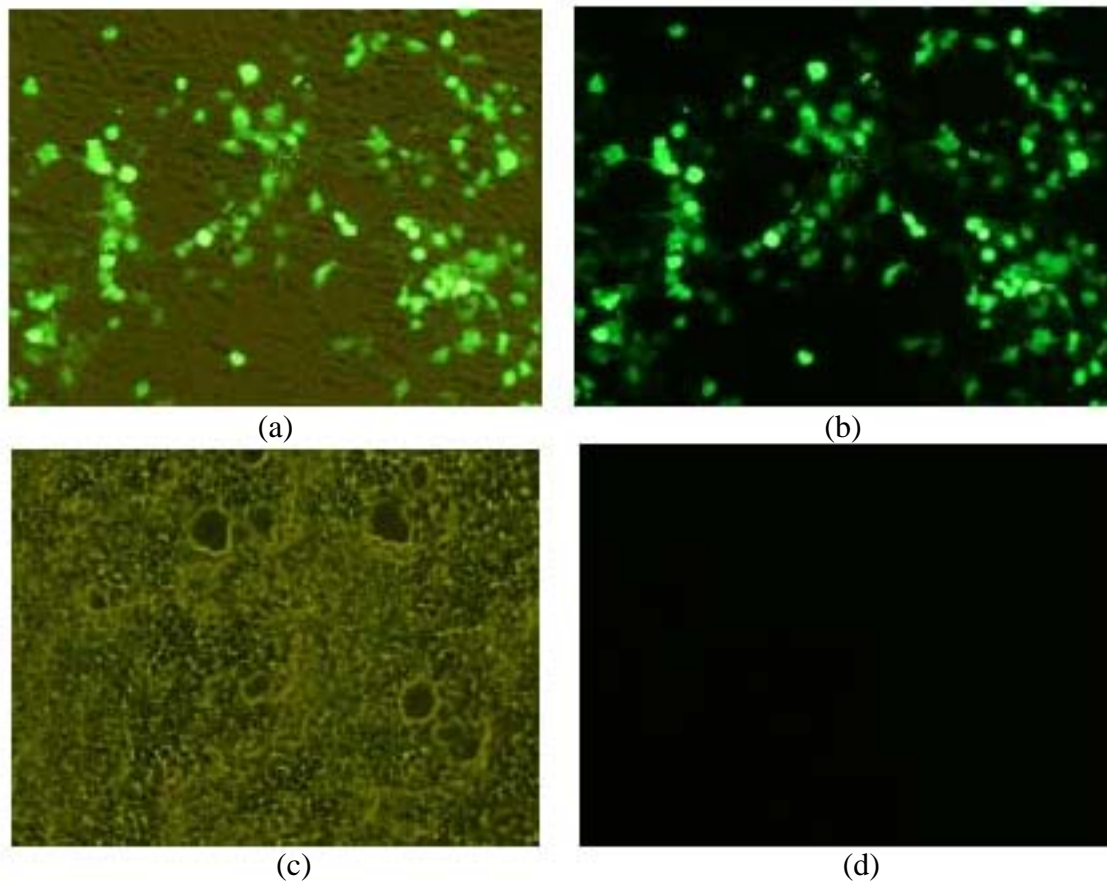


Foto 11. Transfección de células 293T con pCL-GFPN (plásmido con proteína verde fluorescente) donde se aprecia la eficiencia de transfección tanto en contraste de fase como en epifluorescencia (a y b); y de células 293T sin DNA donde se puede observar que no hay autofluorescencia (c y d)

Las cajas 3 y 6 sirvieron como controles negativos, ya que el plásmido con el que fueron transfectadas las células estaba vacío. Las cajas 1 y 4 recibieron un tratamiento de Brefeldin A, que es un inhibidor de secreción de proteínas. Las cajas 2 y 5 no recibieron el tratamiento.

Posteriormente se realizó una transfección, y en esta ocasión con dos tipos celulares: 293T y COS7, estas últimas de riñón de mono verde y también hubo células con tratamiento de Brefeldin A:

Posteriormente se realizó una extracción de proteínas de cada una de las cajas tratadas ya sea con transfección o con el plásmido MOCK y se llevó a cabo un Westernblot para detectar la presencia de la proteína (Foto 12).

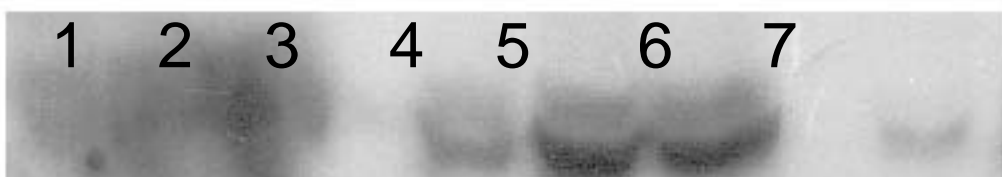


Foto 12. Western-Blot de la transfección de células 293T (carril 1 Mock, carril 2 BFA- y carril 3 BFA+) y COS7 (carril 5 Mock, carril 6 BFA- y carril 7 BFA+), donde se observa una banda de aproximadamente 43kDa que es el peso de la proteína LIF; marcador de peso molecular (carril 4); células de hígado de rata búfalo sin transfectar (carril 8) sirvieron como control.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este trabajo fue realizado con el objetivo de tener una línea celular que estuviera expresando o sobre-expresando constitutivamente el gen de LIF para que sirvieran como capa de células alimentadoras a células madre. Una vez obtenida la línea celular es posible cultivar células madre sin la necesidad de fibroblastos, que producen LIF

A diferencia del grupo de Takahama (Takahama *et al.*, 1998), nosotros obtuvimos el RNA total a partir de fibroblastos embrionarios de rata y ellos a partir de tejidos de rata neonata y de úteros de rata en diferentes estados de embarazo. Otra diferencia es que nosotros usamos el método del Trizol para llevar a cabo la extracción y ellos usaron el tiocianato de guanidina, dando un buen rendimiento en la obtención de RNA.

Para llevar a cabo la RT nosotros usamos un primer designado como RLIF3 y ellos usaron un oligo (dT)-celulosa, además la secuencia de los primers que usaron es completamente diferente de los que nosotros usamos, tanto para llevar a cabo la RT como para realizar la PCR, así como las condiciones de corrida fueron totalmente diferentes. Aunque también usamos el oligo (dT)-celulosa, el producto que obtuvimos presentaba algunas bandas de amplificación inespecífica, las cuales con el oligo RLIF3 fueron de menor intensidad o no se veían.

Nuestros oligos fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia ya reportada en la red por Takahama *et al.* (1998) para amplificar el gen exactamente y se diferencian de los del grupo de Takahama en que ellos fueron los pioneros en el estudio de la secuencia.

Tuvimos bastantes problemas para poder clonar el gen y para poder hacer esto llevamos a cabo PCR's variando el número de ciclos y los grados, hasta que encontramos las condiciones óptimas para su amplificación siendo estos 35 ciclos y a 68°C, teniendo con esto condiciones más astringentes y evitando entonces cualquier amplificación inespecífica.

Una vez que obtuvimos el gen clonado, éste fue subclonado en un vector de expresión procariótico (pGEMT-easy) y posteriormente en uno eucariótico (pcDNA3). De las dos subclonaciones se hicieron reacciones de secuencia para estar seguros de que teníamos el gen y las dos secuencias fueron correctas.

La transfección la llevamos a cabo en células 293T, las cuales tienen un origen fibroblastoide y son de riñón humano embrionario; y en células COS7 cuyo origen es de mono verde; en el westernblot que llevamos a cabo con cada línea celular obtuvimos bandas que tiene un peso aproximado de 43kDa, que es el aproximadamente el peso reportado para la proteína de LIF, por lo cual creemos que logramos sobreexpresar este gen. También transfectamos en células COS7, estas son de riñón de mono verde y son

epitelioides, en el westernblot pudimos apreciar que aparentemente también están secretando constitutivamente LIF y cuando son transfectadas sobreexpresan el gen.

A pesar de que los niveles de expresión de LIF que se observan (Foto 13) en las células 293T puede ser debido a la técnica de transfección que usamos, aunque también probablemente necesitemos llevar a cabo una curva de titulación para saber la concentración óptima de DNA a transfectar ya que las transfecciones que llevamos a cabo fue con 10 μ g de DNA. Aunque usamos la misma cantidad de DNA para las células COS7 al parecer el resultado fue mejor ya que logramos una mejor expresión del LIF.

En la literatura está reportado que para evaluar el LIF humano llevaron a cabo un ensayo de ELISA en fluidos biológicos y sobrenadantes de cultivo (De Groote *et al.*, 1993), aunque el grupo de Kim *et al.* (1992) habían detectado LIF usando 4 anticuerpos producidos contra LIF, demostraron tener una alta afinidad contra el LIF humano y tres de ellos contra el LIF murino (Kim *et al.*, 1992). Nosotros lo evaluamos por medio de un Westernblot con un anticuerpo específico contra LIF, como mencionamos antes, aunque la desventaja de este método es que es cualitativa y no cuantitativa, para realizar un ELISA lo que tendríamos que hacer es realizar transfecciones estables y a partir de el medio condicionado realizar el ensayo.

CONCLUSIONES

1. Es muy importante determinar las condiciones de reacción para poder clonar algún gen por el método de RT-PCR ya que de otro modo se obtendrán amplificadores inespecíficos.
2. Es posible clonar un gen por el método de RT-PCR y posteriormente subclonarlo en un vector de expresión para su posterior expresión en células diferentes a las de su origen.
3. Las células 293T que según los resultados del inmunoblot expresan la proteína LIF, cuando son transfectadas con el gen de LIF lo sobreexpresan. Al igual que las células COS7. Lo cual nos permite usar a ambos tipos celulares como capa de células alimentadoras para mantener las células madre indiferenciadas.

ESPECTATIVAS

1. Llevar a cabo una transfección con el fin de obtener clonas transfectantes estables, tanto con células 293T como con fibroblastos embrionarios de rata.
4. Realizar un ELISA con el fin de cuantificar la producción de la citocina por las células 293T en comparación con fibroblastos embrionarios de rata.

M E T O D O L O G I A

Condiciones para llevar a cabo todas las reacciones y ensayos.

Se diseñaron 3 oligonucleótidos para amplificar específicamente el fragmento correspondiente al gen de LIF, la secuencia de cada uno es la siguiente:

RLIF3 5'→CTAGAAGGCCTGG→3'
 RLIF4 5'→ATGAAGGTCTTGGCCACAGGGATTG→3'
 RLIF5 5'→CTAGAAGGCCTGGACCACCGCAC→3'

Para llevar a cabo la reacción de ligación se realizó el siguiente protocolo:

Cuadro I. Colocar en un tubo de pared delgada de 0.2ml:

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer 2x	5.0
Vector 25ng	0.5
Fragmento	3.5
T4 DNA Ligasa (3U/μl)	1.0
Volumen total (μl)	10.0

Dejar la reacción a temperatura ambiente durante 2hr.

Cuadro II Condiciones para realizar la PCR con 5 colonias elegidas al azar para confirmar si tenían el inserto.

Reactivo	Volumen (μl)	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Buffer 10x	5	94	5'	1
dNTP's	1	94	30''	35
Oligo RLIF4	1	68	45''	35
Oligo RLIF5	1	68	2'	1
Enzima	1	4	α	
H ₂ O MQ	41			
Total	50			

Cuadro III. Para linearizar el vector de expresión eucariótico pcDNA3 y extraer el fragmento del vector procariótico pGEM-Teasy realizamos las siguientes restricciones con Eco RI

Muestra	DNA (μl/μg)	Buffer Eco RI (μl)	Enzima Eco RI (μl)	H ₂ O (μl)	Volumen total (μl)
---------	----------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

pcDNA3	15/15	5	5	25	50
C12-1	16/35	10	10	64	100

Cuadro IV. Reacción de ligación en el vector pcDNA3, se dejó 2hr a temperatura ambiente.

Tubo	H2O (μl)	Buffer 10x (μl)	Vector (μl)	Fragmento (μl)	Enzima T4 DNA Ligasa (μl)	Volumen total (μl)
1	5	2	12	0	1	20
2	2	2	12	3	1	20

Cuadro V. Restricción del DNA obtenido de las minipreps con Eco RI para confirmar que las colonias seleccionadas tienen el inserto.

Muestra	DNA (μl)	Buffer Eco RI (μl)	Enzima Eco RI (μl)	H ₂ O (μl)	Volumen total (μl)
C1	15	2	2	1	20
C2	15	2	2	1	20
C3	15	2	2	1	20
C4	15	2	2	1	20
C5	15	2	2	1	20
C6	15	2	2	1	20
C7	15	2	2	1	20
C8	15	2	2	1	20
C9	15	2	2	1	20
C10	15	2	2	1	20

Cuadro VI. Restricción con Xmn I para liberar varias bandas y saber cuales clonas tienen el inserto en el sentido 5' → 3'.

Muestra	DNA (μl)	Buffer (μl)	Enzima Xmn I (μl)	H ₂ O (μl)	Volumen total (μl)
C1	5	1	1	3	10
C2	5	1	1	3	10
C3	5	1	1	3	10
C4	5	1	1	3	10
C5	5	1	1	3	10
C6	5	1	1	3	10
C7	5	1	1	3	10
C8	5	1	1	3	10
C9	5	1	1	3	10
C10	5	1	1	3	10

Cuadro VII. Ensayo de transfección realizado en células 293T para probar la eficiencia de transfección por el método de fosfato de calcio y con un tratamiento de Brefeldin A (BFA).

Caja No.	Cels. 293T	DNA	Tratamiento BFA
1	Sí	pcDNA3-C9	Sí
2	Sí	pcDNA3-C9	No
3	Sí	pcDNA3	No
4	Sí	pCL-GFP	No
5	Sí	No	No

Cuadro VIII. Condiciones de transfección:

Caja	1	2	3	4	5
DNA	8.4	8.4	10.0	26.14	0.0
CaCl ₂	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
H ₂ O	79.1	79.1	77.5	61.36	87.5
Total	100	100	100	100	100

Cuadro IX. Transfección por el método de fosfato de calcio llevado a cabo en células 293T y COS7.

No.	Células	DNA	Tratamiento BFA
1	293T	pcDNA3	Sí
2	293T	pcDNA3	No
3	293T	MOCK	No
4	COS7	pcDNA3	Sí
5	COS7	pcDNA3	No
6	COS7	MOCK	No

Preparación de células competentes

Inocular un cultivo de 20ml de LB (Gibo BRL, cat. 12780-029) con una colonia bacteriana. Dejarlo incubando toda la noche en agitación a 37°C.

Inocular 1lt de medio SOB con 10ml del cultivo anterior y crecer a 37°C hasta una DO de ≈ 1 (alrededor de 1hr).

Enfriar las células en hielo durante 15-30'.

Transferir el cultivo a botellas para centrífuga de 250 ml (PGC Scientifics, cat. 06-1943-12) y centrifugar en una centrífuga Sorvall (modelo RC5G; rotor GSA) a 2500rpm x 15' a 4°C.

Desechar el sobrenadante y resuspender MUY SUAVEMENTE (este paso es muy importante, NUNCA VORTEXEAR) en 20ml de Buffer I.

Incubar las células en hielo durante 30'.

Centrifugar a 2500rpm x 15' a 4°C.

Desechar el sobrenadante y resuspender MUY SUAVEMENTE en 40-80ml de Buffer II.

Alicuotar en tubos Eppendorf de 1.5ml la solución anterior. Hacerlo todo en hielo.

Congelar rápidamente en nitrógeno líquido y almacenar a -70°C .

Extracción de RNA total a partir de fibroblastos embrionarios por el método de trizol

Colectar las células y colocarlas en un tubo Eppendorf de 1.5ml (o los que sean necesarios).

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a 12,000rpm de 3-5'.

Desechar el sobrenadante.

Agregar 1ml de Trizol (Gibco BRL, cat. 15596-018) por cada $5-10 \times 10^6$ o 1×10^7 células, resuspendiendo muy bien. Dejar a temperatura ambiente (TA) 5' para permitir la completa disociación de los complejos núcleo proteicos (se puede quedar toda la noche a 4°C).

Agregar 0.2ml de cloroformo (J. T. Baker, cat. 9180-03) (1/5 del volumen), se agita vigorosamente con la mano durante 15'' y se incuba 7-8' en hielo o 2-3' a TA.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a 12,000rpm x 15' a 4°C. Se obtendrá una fase inferior de color rojo (fase de fenol-cloroformo-DNA-proteínas), una interfase y una fase superior incolora (acuosa-RNA) que comprende aproximadamente el 60% del volumen inicial de trizol.

Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf limpio y agregar 600µl de alcohol isopropílico (PQF, cat. 1036V), agitando suavemente e incubando en hielo 2' a 10' a TA (1hr a -20°C).

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) el RNA a no más de 12,000rpm x 20' a 4°C.

Desechar el sobrenadante y la pastilla se lava con 1ml de etanol absoluto (Química Meyer, AI1365) al 75%, con agua tratada con dietil pirocarbonato H₂O-DEPC (Sigma, cat. D-5798).

Vortexear la pastilla y centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a 7,500rpm x 10' a 4°C.

Secar al aire durante 5-10' y resuspender en 30-50µl de H₂O-DEPC (Sigma, cat. D-5798) (según la cantidad de muestra que se haya obtenido de los pasos anteriores) o en una solución de sodio dodecil sulfato (SDS, Merck, cat. 8.17037.1000) al 0.5%. Si la disolución se dificulta se puede calentar la muestra a 55-60°C x 10'.

Medir la concentración del RNA en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU650), tomando unos 2-5µl de la muestra y diluyendo en H₂O-DEPC (Sigma, cat. D-5798), leer a 260nm. Con esta lectura calcular la concentración por microlitro.

Desnaturalizar el RNA a 60°C x 10'.

Condiciones para llevar a cabo la reacción de Reverso Transcriptasa (RT) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

RT: En un tubo de pared delgada de 0.2ml preparar la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen (μ l)
RNA total	2.0
H ₂ O MQ	10.5
Oligo RLIF3 [20 pmol/ μ l]	1.0
Volumen total (μ l)	13.5

Ponerlos en un termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400) a 70°C x 2' y luego a 4°C. En un tubo separado preparar la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen (μ l)
Buffer 5x	4.0
dNTP's	1.0
RNAsin	0.5
Enzima MMULV	1.0
Volumen total (μ l)	6.5

MMULV (NEB, cat. M0253L), RNAsin (Gibco BRL, cat. 15518-012).

Agregar al tubo anterior para un volumen total de 20 μ l. Correr la reacción de RT con las siguientes condiciones de reacción:

Temperatura (°C)	Tiempo
42	60'
94	5'
4	α

Preparar la siguiente mezcla de reacción para llevar a cabo la PCR con el kit Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech, cat. K1910-y) (son dos mezclas, una de 25 μ l y la otra de 100 μ l totales), el cDNA es de la reacción anterior RT, esto se hace con el objeto de tener la mayor cantidad de amplificado:

Reactivo	Volumen (μ l)	Volumen (μ l)
Buffer 10x	2.5	10.0
dNTP's	0.5	1.0
cDNA	2.5	2.5
Enzima Advantage 2	0.5	1.5
Oligo RLIF4 [100pmol/ μ l]	0.5	1.0
Oligo RLIF5 [100pmol/ μ l]	0.5	1.0
H ₂ O MQ	18.0	83.0
Volumen total (μ l)	25.0	100.0

Correr la reacción de PCR con las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5'	0
94	30''	35
68	45''	
68	2'	0
4	α	

Correr un gel de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE) al 1%.

Purificación de la banda

Seguir el siguiente de GenElute Agarose Spin Columns (Sigma, cat. 5-6500), realizando todos los pasos a temperatura ambiente:

Colocar una GenElute Agarose Spin Column en un tubo de colección.

Prelavar la columna añadiendo 100µl de H₂O.

Cerrar la columna y centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a máxima velocidad por 5-10". (Esta columna no se debe secar. Evitar prelavarla mucho tiempo antes de usarla. No centrifugar por más de 10").

Desechar el eluido y colocar la columna en un tubo de colección nuevo.

Extraer la banda de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE) y cargarla en la columna (Para resultados óptimos, cortar la banda de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE) lo más cerca del DNA posible, esto elimina el procesamiento de un exceso de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE) y mantiene el DNA concentrado).

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) la columna a máxima velocidad durante 10'. El DNA purificado en el tubo de colección está listo para usarse y puede ser almacenado a 2-8°C o a -20°C.

Ligación en un vector de expresión procariótico

Para la reacción de ligación se uso el p-GEM-T Easy Vector System I (Promega, cat. A1360). Este kit ya trae su propia ligasa así como todos los reactivos necesarios.

Colocar en un tubo de pared delgada de 0.2ml:

Reactivo	Volumen (μ l)
Buffer 2x	5.0
Vector 25ng	0.5
Fragmento	3.5
T4 DNA Ligasa (3U/ μ l)	1.0
Volumen total (μ l)	10.0

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) brevemente cada tubo conteniendo el vector pGEM-T easy y el fragmento.

Vortexear el buffer 2x antes de usarlo.

Preparar la mezcla de reacción.

Incubar durante 60' a TA.

Realizar la transformación de células competentes (CC).

Se puede incubar toda la noche a 4°C si se requiere un número máximo de transformantes.

Transformación de células competentes DH5 α (CC-DH5 α) por el método de choque térmico.

Descongelar las CC en hielo y homogeneizar suavemente.

Añadirles el producto de ligación, 10 o 20 μ l, agitar suavemente para homogeneizar e incubar en hielo 20'. En otro caso se agregan 3 μ l del plásmido de interés.

Colocar en un baño de agua por 90'' a 37°C.

Colocar inmediatamente en hielo 2'.

Agregar 950ml de LB sin ampicilina.

Incubar en agitación durante 45' a 37°C.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) 5' a 5000rpm.

Desechar el sobrenadante.

Resuspender en 70-100 μ l de LB.

Plaquear en LB-agar-ampicilina y dejar toda la noche a 37°C.

Chequeo de la reacción de ligación

Realizar una PCR (Perkin Elmer, Geneamp PCR System 2400) con 5 colonias tomadas al azar, el DNA es la colonia misma que se coloca en el tubo de reacción. Siguiendo el siguiente:

Reactivo	Volumen (μ l)
Buffer 10x	5
dNTP's	1
Oligo RLIF4	1
Oligo RLIF5	1
Enzima Advantage 2	1
H ₂ O MQ	41
Volumen total (μ l)	50

Corriendo la PCR con las siguientes condiciones de reacción:

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
94	5'	0
94	30''	35
68	45''	
68	2'	0
4	α	

Incubar la placa a 37 $^{\circ}$ C para que sigan en crecimiento las bacterias del lugar de donde se tomaron las colonias, de ahí mismo tomar una muestra para poner a crecer en otra placa LB-agar-ampicilina dejándola a 37 $^{\circ}$ C toda la noche.

Al día siguiente inocular un cultivo de 400ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, cat. 12100-046) líquido LB-ampicilina para llevar a cabo una maxiprep.

Purificación de DNA plasmídico (maxiprep)

Para este se usó el QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, cat. 12162).

Poner una colonia de una placa e inocular 500ml de medio LB líquido con antibiótico (regularmente es ampicilina a 100mg/ml) (si el plásmido es de bajo número de copias). Colocarlo a 37°C en agitación y dejarlo crecer durante la noche.

Cosechar las células bacteriales centrifugando (Sorvall, modelo RC5B; rotor GSA) a 5000rpm x 15' a 4°C.

Desechar el sobrenadante y resuspender en 10ml de buffer P1 (primero se añaden 5ml y posteriormente los otros 5ml), se puede vortexear para resuspender, pasar todo a un tubo Falcon de 50ml.

Añadir igual cantidad de buffer P2, es importante no vortexear, se mezcla suavemente por inversión del tubo unas 5-6 veces y después dejar reposar a TA por 5'.

Añadir igual cantidad de buffer P3, mezclar por inversión unas 5-6 veces e incubar en hielo o a 4°C por 15-20'.

Centrifugar a 4500rpm x 12'. Tirar la interfase superior con una punta azul.

Equilibrar una columna QIAGEN aplicando 10ml de buffer QBT (de equilibrio) y dejar que la columna se vacíe por gravedad.

Aplicar el sobrenadante de la centrifugación y permitir que entre en la resina por gravedad.

Lavar la columna con 2 x 30ml de buffer QC (de lavado) y dejar que fluya por gravedad.

Eluir el DNA con 15ml de buffer QF (de elución), coleccionar el eluido en otro tubo (Falcon o Corex o de otro tipo que no sea de policarbonato ya que no es resistente al alcohol que se va a usar en los pasos siguientes).

Añadir 0.7 volúmenes de alcohol isopropílico (PQF, cat. 1036V) para precipitar.

Se puede detener aquí el proceso y guardar el eluido a -20°C. No se recomienda almacenar por más de una noche.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a 5000rpm x 15' en centrífuga Sorvall (rotor SS34), marcar el lado en que debe quedar la pastilla.

Desechar el sobrenadante con mucho cuidado. Resuspender la pastilla en 200µl de H₂O MQ y poner en un tubo Eppendorf, repetir dos veces más esta operación, al final agregarle 200µl de acetato de amonio 5M (USB, cat. 11251) y llenar el tubo con alcohol isopropílico (PQF, cat. 1036V), dejar precipitar durante una hora aproximadamente.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a 5000rpm x 15'.

Desechar el sobrenadante. Lavar la pastilla tres veces en etanol (Química Meyer, cat. AI 1365) al 70% (etanol 70% - agua 30%).

Resuspender en 100µl de H₂O MQ y tomar 2µl para leer la DO a 260nm.

Llevar a cabo un análisis con enzimas de restricción.

Medir la concentración del DNA.

Ligación a un vector de expresión eucariótico pcDNA3

Linearizar el plásmido (vector) pcDNA3 con la enzima de restricción Eco RI (NEB, cat. R0101S), que es de corte único y se encuentra en el sitio de clonación múltiple (MCS).

Obtener el fragmento a ligar extrayéndolo del vector en el que se encuentra con enzimas de restricción o por medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, cat. 12100-046) de PCR. En este caso cortar el vector pGEM-T easy con la enzima Eco RI.

Llevar a cabo la reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (NEB, cat. M0202S), en un volumen final de 20µl; de la siguiente forma:

Colocar en un tubo Eppendorf de 0.6ml:

Un décimo del volumen total de reacción del buffer 10x.

H₂O MQ.

Vector.

Fragmento.

Ligasa (1µl).

Mezclar bien con la pipeta.

Dejar incubando por 2hrs a TA.

Se pueden poner diferentes relaciones entre el vector y el fragmento para asegurar al menos una ligación, así mismo se puede poner una reacción con solo vector sin fragmento y una de fragmento sin vector, etc.

Correr un gel de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE) al 0.7% para confirmar la reacción de ligación.

A continuación realizar la transformación por medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, cat. 12100-046) de choque térmico en CC DH10α. Poner controles tanto de CC (vector sin cortar en CC) y un control negativo (CC con H₂O en lugar de DNA).

Extracción de DNA por el método de la lisis alcalina (miniprep)

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a 4000rpm x 5'.

Desechar el sobrenadante y escurrir el líquido sobrante.

Añadir 150µl de solución I. Resuspender bien, se puede vortexear.

Pasar a un tubo Eppendorf de 1.5ml nuevo.

Añadir 150µl de solución II. Agitar por inversión 4-6 veces.

Incubar a TA x 5'.

Añadir 150µl de solución III. Mezclar por inversión 4-6 veces.

Incubar en hielo x 15'.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a máxima velocidad x 5'.

Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 300µl de cloroformo. Mezclar muy bien (vortexear).

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a máxima velocidad x 5'.

Recuperar la fase acuosa (superior).

Agregar 300µl de acetato de amonio 5M.

Agregar 600µl de alcohol isopropílico.

Dejar precipitar a -20°C x 30'.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a máxima velocidad x 5'.

Lavar 3x con etanol (Química Meyer, cat. AI 1365) al 70%.

Centrifugar (Hettich, modelo Mikro 20) a máxima velocidad x 5'.

Retirar el sobrenadante con mucho cuidado usando una punta amarilla y dejar secar la pastilla 5' a TA.

Resuspender en 100µl de H₂O.

Analizar con enzimas de restricción.

Medir la concentración del DNA.

Solución I

Tris 500mM – 50mM
500/50 = 10 1:10
Tris 10ml
EDTA 500mM – 10mM
500/10 = 50 1:50
EDTA 2ml
Tris 10ml
EDTA 2ml
H₂O 88ml
Total 100ml

Solución II

SDS 10% - 1%
10 / 1 = 10 1:10
1%
NaOH 1M / 0.2M
1:5
SDS 10ml
NaOH 20ml
H₂O 70ml
Total 100ml

Solución III

Acetato de K 60ml
Ac. acético 11.5ml
H₂O 28.5ml

Restricción para confirmar la orientación del fragmento ligado

En esta restricción usar la enzima Xmn I (NEB, cat. R0194S) que corta dentro del fragmento en un sitio (274) y en el vector en dos sitios (1787 y 5171).

Dejar la restricción durante 1-2 hrs a 37°C.

Correr un gel de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE) al 1.5%.

Analizar el patrón de restricción en busca de alguna clona candidata.

Reacción de secuencia

Usar el DNA Sequencing kit (PE Applied Biosystem, cat. 4303152).

Seguir el siguiente:

Reactivo	Volumen (μ l)
Big Dye	2
Primer	1
H ₂ O MQ	2
DNA	1
Volumen final (μ l)	6

Donde el primer puede ser cualquiera de los universales o los del plásmido, que en este caso fueron T7 y SP6

Mezclar muy bien cada reactivo con la pipeta y correr el PCR con las siguientes condiciones de reacción:

T° C	Tiempo	Ciclos
96	5'	
96	30''	30
50	15''	
60	4'	
4	2'	
4	α	

Agregar 14 μ l más de H₂O MQ y mezclar bien, almacenar a resguardo de la luz hasta que se vaya a usar para su posterior purificación.

Purificación de la reacción de secuencia

Para purificar la reacción de secuencia se usan Centri-sep Columns (Princeton Separations, cat. CS-901).

Destapar suavemente la columna.

Hidratar el gel agregando 800µl de H₂O MQ.

Tapar la columna y remover las burbujas formadas agitándola e invirtiéndola.

Dejarla reposar al menos 30' a TA antes de usarla. Reconstituida puede ser almacenada a 4°C por algunos días. Si sucede esto, cuando se vaya usar se debe dejar a TA por lo menos 30' antes de continuar con el procedimiento.

Ya sin burbujas dejar que se asiente el gel en el fondo de la columna.

Quitar la tapa suavemente y posteriormente la parte inferior de la columna.

Colocarla en un tubo de lavado (2ml) para que el agua salga por gravedad, desechar el fluido.

Centrifugar (Eppendorf, modelo 5415C) la columna a 3000rpm x 2'.

Colocar la columna en un tubo de colección (1.5ml).

Con mucho cuidado se coloca la reacción de secuencia en el centro del gel sin tocar ni el gel ni las paredes del tubo.

Centrifugar (Eppendorf, modelo 5415C) la columna a 3000rpm x 2'.

Secar la muestra en un desecador a vacío (Speedvac).

Transfección por el método de fosfato de calcio

Poner en cajas de Petri de 60 x 15mm (SM Laboratorios) 1×10^6 células. Dejar que lleguen a confluencia durante 24hrs.

Cambiar el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, cat. 12100-046) antes de empezar.

En un tubo Eppendorf de 1.5ml preparar la siguiente mezcla (vortexear todo antes de empezar):

10 μ g	DNA	el volumen necesario
2M	CaCl ₂ (Sigma, cat. C-3306)	125 μ l
H ₂ O	MQ	el volumen necesario

En un volumen final de 100 μ l.

Incubar 10' a TA.

Agregar al tubo 100 μ l de 2x HBS (ver apéndice), pH 7.1 y agitar suavemente.

Incubar 2' a 37°C en una incubadora de CO₂ (muy importante el tiempo).

Mezclar perfectamente con la pipeta y agregar esta mezcla a la caja con células, gota a gota y en diferentes puntos.

Cambiar el DMEM (Gibco BRL, cat. 12100-046) a las 17hrs:

Retirar el medio con una pipeta y desecharlo.

Agregar 2-3ml de medio nuevo, con mucho cuidado por las paredes de la caja y lavar las células inclinándola hacia diferentes lados, 2 veces.

Retirar el medio con una pipeta y desecharlo.

Agregar 4ml de medio nuevo con mucho cuidado por las paredes de la caja.

Colocar la caja en un incubador de CO₂ a 37°C.

Si se va a tratar con Brefeldin A (BFA, Sigma, cat. B-6542) alguna caja, agregar en este momento y dejar incubando durante 4-5hrs.

Cambiar el DMEM (Gibco BRL, cat. 12100-046) de las cajas tratadas y seguir con el periodo de incubación sin ella.

Después de 4-5hrs. Con BFA, hay que retirar el medio con BFA:

Retirar el medio con una pipeta y desecharlo.

Agregar 2-3ml de medio nuevo, con mucho cuidado por las paredes de la caja y lavar las células inclinándola hacia diferentes lados, 2 veces.

Retirar el medio con una pipeta y desecharlo.

Agregar 4ml de medio nuevo con mucho cuidado por las paredes de la caja.

Colocar la caja en un incubador de CO₂ a 37°C.

Evaluar la expresión a las 48 – 72 hrs.

2x HBS:	CaCl ₂ 2M
1.6g NaCl	2.22 10ml
0.074g KCl	
0.04g Na ₂ HPO ₄	
0.2g dextrosa	
1g HEPES	

Esterilizar por filtración ajustar pH a 7.05 con NaOH aforar a 100ml y alicuotar, almacenar a -20°C, el CaCl₂ esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

Geles de poliacrilamida.

Lavar implementos de la cámara con agua y alcohol.

Montar los vidrios como se muestra en la Fig. 1.

Prueba de agua.

Preparar primer gel, agitarlo suavemente para mezclar y ponerlo inmediatamente (5-10ml); prepararlo de la siguiente forma:

Reactivo	10ml	15ml
H ₂ O MQ	4.0	5.9
Acrilamida 30%	3.3	5.0
Tris (pH 8.8) 1.5M	2.5	3.5
SDS 10%	0.1	0.15
APS 10%	0.1	0.15
TEMED	0.004	0.006

Tomado de Schreiber Lab. Experimental Protocols. Washington University School of Medicine

Poner etanol (Química Meyer, cat. AI 1365) para emparejar el gel.

Preparar segundo gel, no agregar ni persulfato de amonio (Gibco BRL, cat. 15523-012) ni TEMED (Bio-Rad, cat. G-7126), éste puede ser diluído al 12.5%. Estos se agregan cuando el primer gel esté gelificado y prepararlo de la siguiente forma:

Reactivo	4ml	5ml
H ₂ O MQ	2.7	3.4
Acrilamida 30%	0.67	0.83
Tris (pH 6.8) 1.0M	0.5	0.63
SDS 10%	0.04	0.05
APS 10%	0.04	0.05
TEMED	0.004	0.005

Tomado de Schreiber Lab. Experimental Protocols. Washington University School of Medicine

Cuando gelifique el primer gel, remover el etanol (Química Meyer, cat. AI 1365) y lavar con agua bidestilada, secar el exceso de agua.

Acabar de preparar el segundo gel, agitarlo suavemente para mezclar y colocarlo de inmediato.

Poner el peine y esperar a que gelifique.

Ya gelificado retirar el peine.

Colocarlo en el portavidrios y éste a su vez colocarlo en la cámara (Bio-Rad, cat. 165-3301).

Llenar la cámara con buffer de corrida 1x (Tris-glicina) y correrlo a 90 – 100V entre 1 – 2 hrs.

Hervir las muestras y el marcador de proteínas (Bio-Rad, cat. 161-0372) durante 5', si se necesitan condiciones desnaturizantes agregar 2-β-mercaptoetanol (Bio-Rad, cat. 161-0710) al 5%.

En los pozos colocar el marcador de proteínas (Bio-Rad, cat. 161-0372) y las muestras. Si se va a hacer una transferencia seguir el siguiente, si no continuar.

Teñir con azul de Coomassie (Sigma, cat. B-0149) 0.5 – 1hr.

Ponerlo en solución desteñidora con 1 o 2 cambios durante aproximadamente 1 – 1.5hrs.

Inmunotransferencia.

Poner hielo en el contenedor y colocarlo en el congelador con anticipación, si puede ser el día anterior sería mejor.

Preparar el buffer de transferencia 5x a 1x agregando etanol (Química Meyer, cat. AI 1365) al 20%.

Cortar un rectángulo de la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, cat. 162-0115) de 8 x 6 cm y ponerla a incubar en buffer de transferencia frío en agitación lenta.

Cortar dos rectángulos de papel 3MM (Whatman, cat. 3030-917) de 9 x 7cm.

Cuando salga el gel, incubarlo 20min en buffer de transferencia frío, con agitación lenta.

Colocar el gel con mucho cuidado en el sandwich como sigue: Poner sobre la parte gris una esponja, luego un papel 3MM (Whatman, cat. 3030-917), luego el gel, luego la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, cat. 162-0115) (presionando para sacar cualquier burbuja que pudiera estar entre el gel y la membrana), luego otro papel 3MM (Whatman, cat. 3030-917), luego la otra esponja y finalmente se cierra el sandwich (todo esto debe ser hecho en buffer de transferencia frío) (ver Fig.).

Colocarlo en la cámara de transferencia (Bio-Rad, cat. 170-3930) y correrlo a voltaje constante de 96V durante 1 ¼hrs (ver Fig.).

Después de correr la transferencia teñir la membrana con rojo de Ponceau (Sigma, cat. P-7170) para visualizar las bandas, marcar de que lado están las bandas.

Si se efectuó correctamente la transferencia, debe observarse un patrón de bandeo, lavar la membrana con PBS-Tween 20 (Research Organics, cat. 3061T) al 0.05% hasta que se destiña totalmente.

Bloquear con PBS – leche al 6%. Se puede bloquear durante 1hr a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Incubar con el 1er anticuerpo (Santa Cruz, cat. Sc-1336) usando diferentes diluciones desde 1:2000 a 1:5000 en PBS-leche, durante 2hrs a 37°C o durante toda la noche a 4°C en agitación constante.

Lavar la membrana 8 x 5min en PBS-Tween 20 (Research Organics, cat. 3061T) al 0.05%.

Incubar con un 2º anticuerpo; que en este caso es HRP-rabbit anti goat IgG (H+L) conjugate (Zymed, cat. 81-1620) 1hr a 37°C en agitación constante.

Lavar la membrana 8 x 5min en PBS-Tween 20 (Research Organics, cat. 3061T) al 0.05%.

Es importante no tocar la membrana con los dedos, usar guantes todo el tiempo y para manipular la membrana usar unos fórceps de punta plana (PGC Scientific, cat. 36-6200-00).

Revelado con ECL

Poner 1ml de cada solución ECL (Amersham, cat. RPN2106) en una cajita y colocar la membrana durante 1min.

Colocar la membrana con los forceps en una mica para evitar el contacto de ésta con la película.

Colocar sobre la mica con la membrana, la película (Kodak, X-Omat, cat. 603-187) en el hipercassette (Daigger, cat. NX 7941B) con su pantalla intensificadora (Daigger, cat. NX7939B).

Exponer durante 1'.

Retirar la película y revelarla (Kodak, cat. 190-0984) hasta que se empiecen a ver las bandas.

Fijar (Kodak, cat. 190-2485) durante 5'.

Lavar la película.

Comparar la impresión contra el marcador de proteínas.

APÉNDICES

Montaje de vidrios y cámara para realizar SDS-PAGE

Agregar primero el antibiótico (resuspendiendo bien), después el SFB, luego el piruvato de sodio y por último la glutamina (resuspendiendo bien).

Forma de montar los vidrios y la cámara para correr el gel de poliacrilamida



Fig. 1. Colocar los vidrios como se muestra en la figura colocando los espaciadores entre ellos.

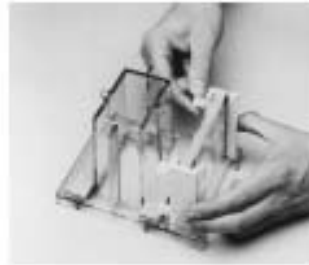
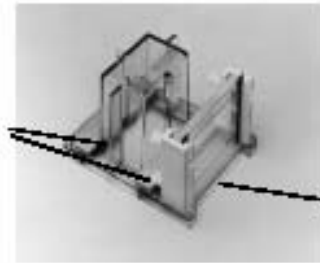


Fig. 2. Los vidrios se montan en el portavidrios, como se muestra en la figura.

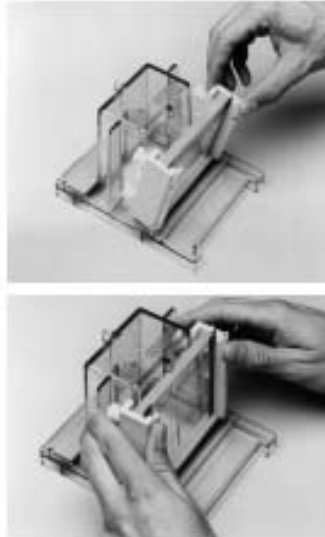


Fig. 3. Este a su vez se coloca en su base y se le hace la prueba de agua para confirmar que no tenga ninguna fuga

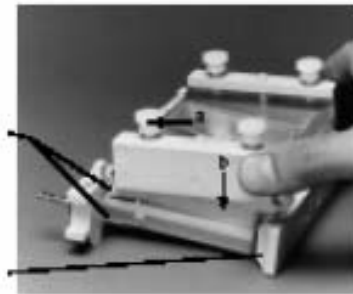


Fig. 4. Cuando este polimerizado el gel se quita de la base y se pone monta como se indica en la base que tiene los electrodos.

Por último se agrega el buffer de corrida 1x y se corre a 90-100W de voltaje, en cuanto las muestras hayan pasado al segundo gel (resolvidor) aumentar el voltaje a 110-120W.

Montaje de la membrana para realizar la transferencia

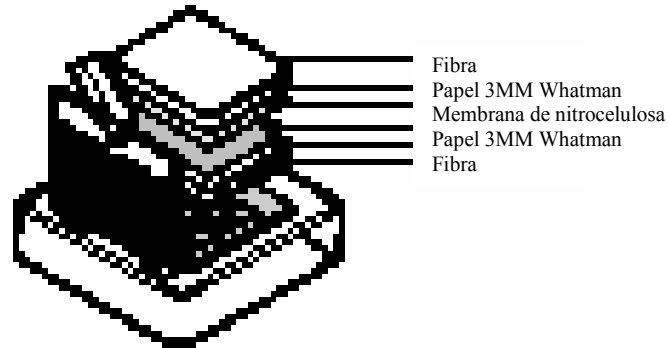


Fig. 1. Preparar el sandwich como se indica, hacerlo todo en buffer de corrida frío.

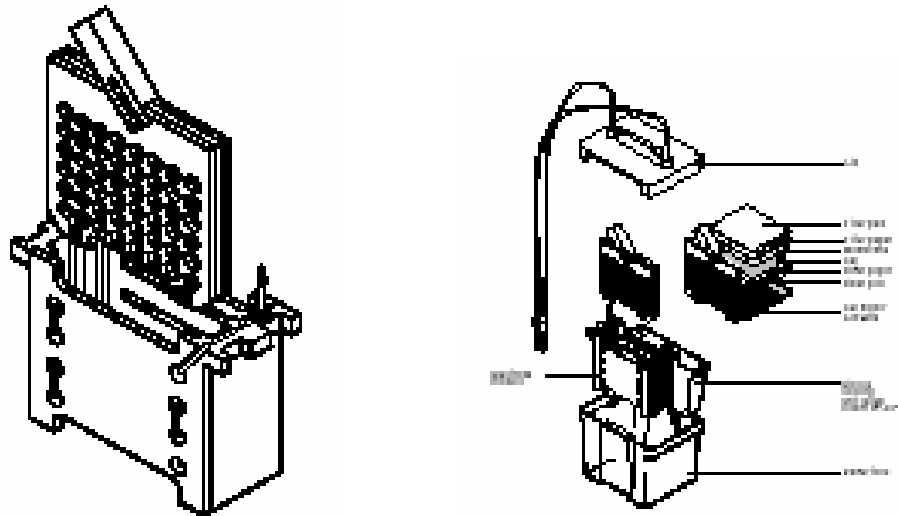


Fig. 2. Una vez que esté preparado el sándwich, se procede a colocarlo dentro de la base de los electrodos, procurando que la parte gris del sándwich quede hacia dentro. Y a su vez colocarlo dentro de la cámara de transferencia.

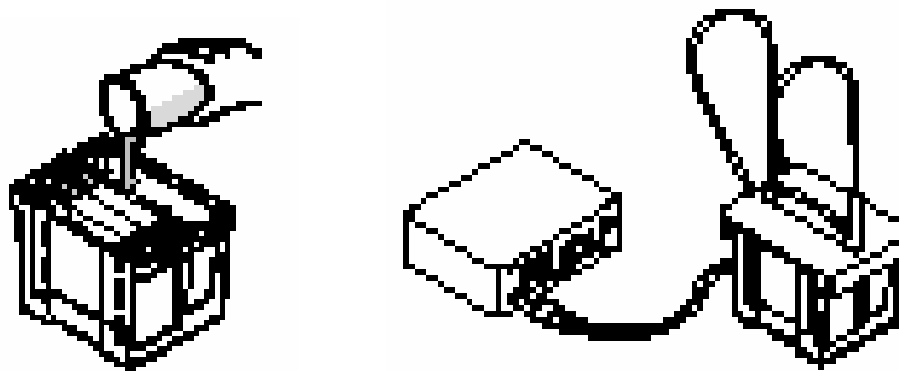
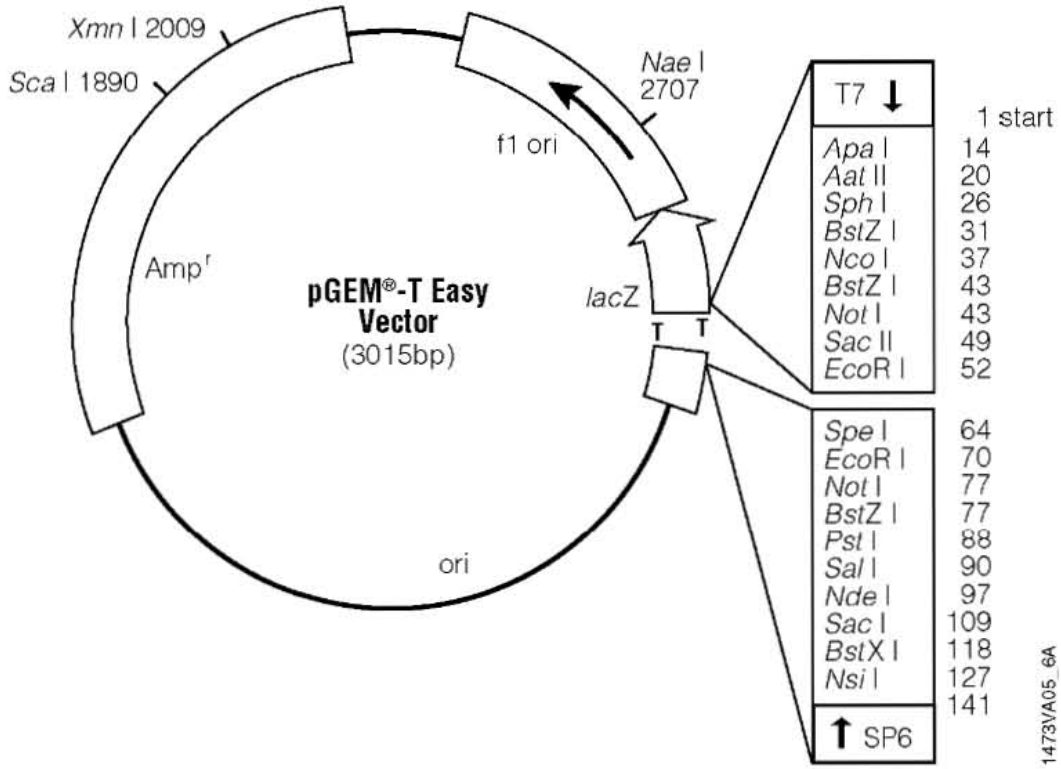


Fig. 3. Por último agregar buffer de transferencia para llenar la cámara y correrlo a voltaje constante de 96W durante 1 hora.

Mapa del plásmido pGEMT-easy (vector de expresión procariótico)



Electroferograma de la clona pGTE-LIFrat-C12-

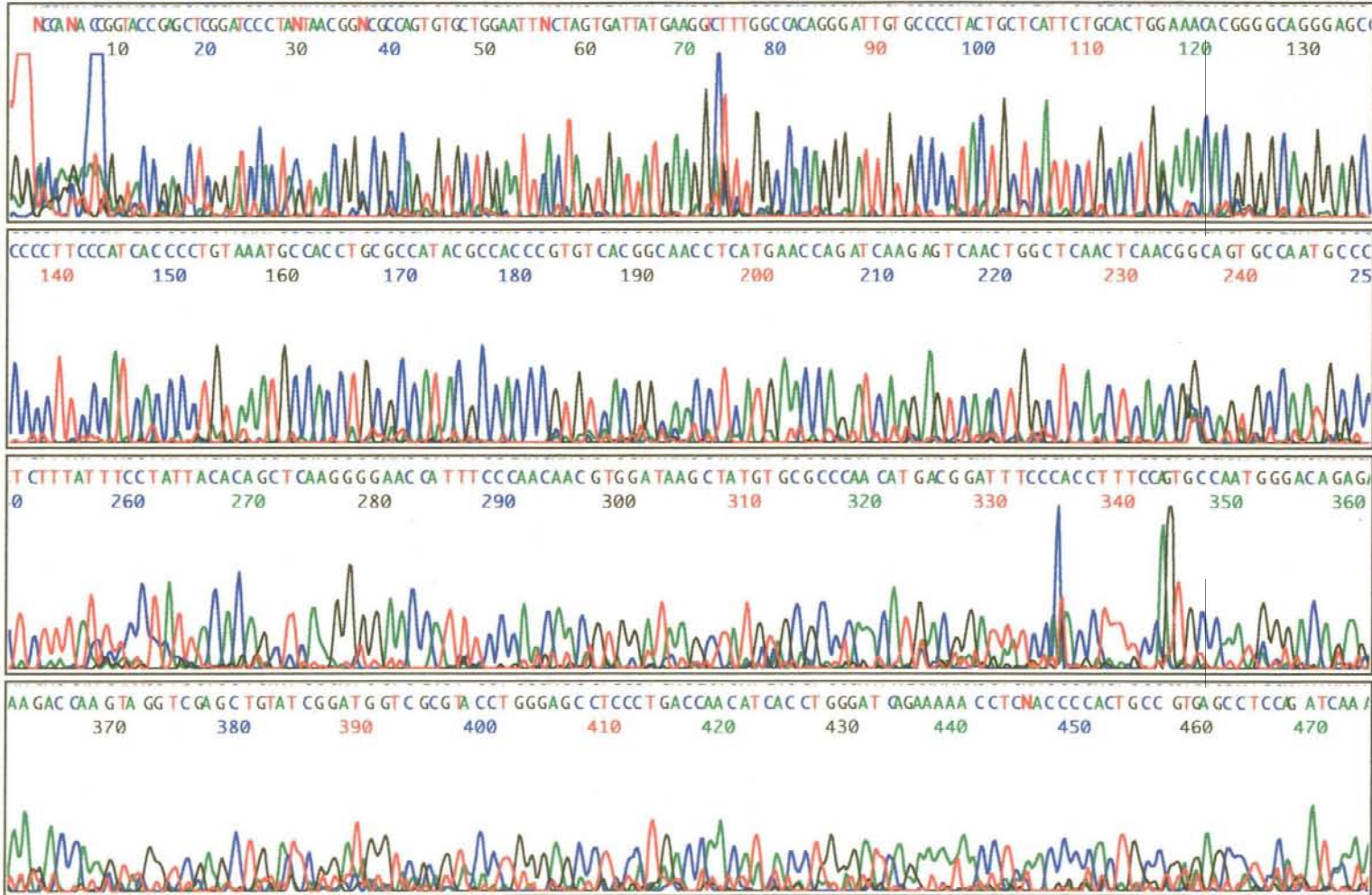


Model 310
Version 3.4.1
ABI-CE1
Version 3.2

9T7Sample1
9T7
Lane 1

Signal G:40 A:31 T:26 C:44
DT POP6(BD Set-AnyPrimer)
bigdye2
Points 903 to 8480 Pk 1 Loc: 903

Page 1 of 2
Thu, Oct 3, 2002 5:45 PM
Thu, Oct 3, 2002 3:19 PM
Spacing: 10.67{10.67}



Electroferograma de la clona pcDNA3-C

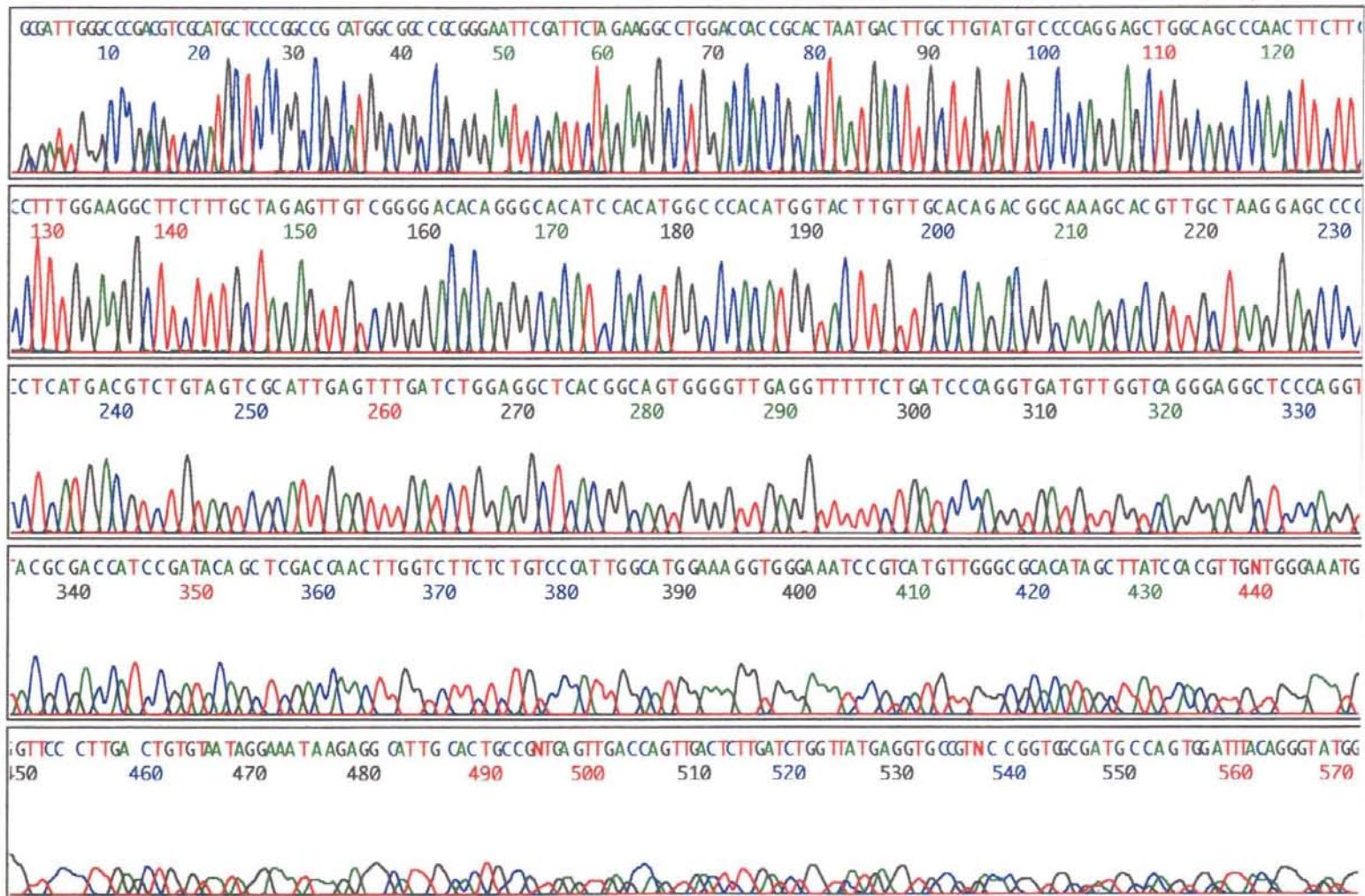


Model 310
Version 3.0
ABI-CE1
Version 3.0

Sample6
HECTOR
DOCE
Lane 6

Signal G:1011 A:516 T:575 C:771
DT POP6{BD Set-AnyPrimer}
dRhod4
Points 1003 to 7080 Base 1: 1003

Page 1 of 2
Mon, May 13, 2002 8:19 AM
Thu, May 9, 2002 10:13 PM
Spacing: 11.63(11.63)



MATERIALES y REACTIVOS

Para preparar células competentes:

Medio SOB:

20gr bactotripton (Oxoid, cat. L42)
5gr extracto de levadura (Bioxón, cat. 155)
10ml NaCl 1M (Gibco BRL, cat. 3625-01)
2.5ml KCl 1M (USB, cat. 20598)
pH 7.0, filtrar y esterilizar. Después agregar:
10ml MgCl₂ 1M (Research Organics, cat. 0090-M)
10ml MgSO₄ 1M (J. T. Baker, cat. 2506-01)

Buffer I:

KCl 100mM (USB, cat. 20598)
MnCl 50mM (Sigma, cat. M-3634)
KC₂H₃O₂ 30mM (Sigma, cat. P-1147)
CaCl₂ 10mM (Sigma, cat. C-3306)
Glicerol 15% (Merck, cat. 10494.1000)
pH 5.8 con ácido acético (Merck, cat. 1.00063.2500), esterilizar por filtración.

Buffer II:

MOPS 10mM (Research Organics, cat. 0195-M)
KCl 10mM (USB, cat. 20598)
CaCl₂ 75mM (Sigma, cat. C-3306)
Glicerol 15% (Merck, cat. 10494.1000)
pH 6.8 con ácido acético (Merck, cat. 1.00063.2500), esterilizar por filtración.

Preparación de:

H₂O DEPC:

(Sigma, cat. D-5798)

Agregar al 0.1% a H₂O MQ, colocar en agitación 2-3hrs, incubar a 37°C por 12hrs y esterilizar por autoclave 100°C x 15'.

LB

(Gibco BRL, cat. 12780-029)

20gr x 1lt de H₂O.

En caso de que no se cuente con este reactivo se puede preparar de la siguiente manera:

Para 1lt, disolver en agua, aforar y esterilizar inmediatamente.

Bactotripton 10gr (DIFCO, cat. 211705)
Extracto de levadura 5gr (Bioxon, cat. 230900)
NaCl 10gr (J. T. Baker, cat. 1309)

LB-agar

(Bioxón, cat. 150-1).

20gr x 1lt de H₂O + 15gr de agar bacteriológico

TAE 50x:

Antes de usar prepararlo a una concentración de 1x.

242gr Tris base (Bio-Rad, cat. 161-0719)
57.1ml Ac. Acético (Merck, cat. 1.00063.2500)
100ml EDTA 0.5M pH 8.0 (Gibco BRL, cat. 15576-028)

Ampicilina

(Sigma, cat. 27188-8):

Disolver 50mg/ml de H₂O, filtrar para esterilizar. Se agrega 1µl por cada 1ml de medio.

Buffer de carga 6x (para correr geles de agarosa):

0.25% azul de bromofenol (Sigma, cat. B-6896)
0.25% xilen cianol (Research Organics, cat. 7113X)
30% glicerol en agua (Merck, cat. 10494.1000)

Agregar 1µl por cada 5µl de muestra.

Bromuro de etidio (para geles de agarosa) (Sigma, cat. E-2515)

Disolver una pastilla de 1g en 10ml de H₂O para una concentración final de 100µg/µl y agregar 5µl por 100ml de agarosa, para una concentración final de 0.5µg/ml.

Geles de agarosa (Agarmex, Básica D1 LE):

0.7% Disolver 0.7g en 100ml de TAE 1x

1.0% Disolver 1.0g en 100ml de TAE 1x

1.5% Disolver 1.5g en 100ml de TAE 1x

Marcador 2-Log DNA Ladder (NEB, cat. N3200)

Tomar 1µl del marcador y agregar 1µl del buffer de carga 6x y 4µl de H₂O.

Acrilamida – Bis acrilamida 30% (para geles de poliacrilamida)

29g Acrilamida (J. T. Baker, cat. 15512-023)

1g Bis-acrilamida (Research Organics, cat. 0120M)

Diluir en 60ml, calentar para disolver y aforar a 100ml.

Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 (para geles de poliacrilamida)

18.15gr Tris base (Bio-Rad, cat. 161-0719)

70ml H₂O MQ

Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100ml.

Tris-HCl 1.0M, pH 6.8 (para geles de poliacrilamida)

6gr Tris base (Bio-Rad, cat. 161-0719)

70ml H₂O MQ

Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100ml.

Persulfato de amonio 10% (Gibco BRL, cat. 1552-3-012)

Disolver 1gr de persulfato de amonio (APS) en 10ml de H₂O MQ

TEMED (Gibco BRL, cat. 76320)

Buffer de corrida 10x. para geles de poliacrilamida:

216gr Glicina (Bio-Rad, cat. G-7126)

15gr SDS (Merck, cat. 8.17037.1000)

45gr Tris (Bio-Rad, cat. 161-0719)

Llevar a 3lt con H₂O. Esterilizar. Prepararlo 1x antes de usar.

Buffer de transferencia 5x, para geles de poliacrilamida:

15gr Tris base (Bio-Rad, cat. 161-0719)

72.1gr Glicina (Bio-Rad, cat. G-7126)

Aforar a 1000ml.

Tinción con azul de Coomasie para geles de poliacrilamida:

0.5gr Azul brillante de Coomasie (Sigma, cat. B-0149)
200ml Metanol (Merck, cat.
50ml Ac. acético (Merck, cat. 1.00063.2500)
250ml H₂O MQ

Solución Coomasie para desteñir geles de poliacrilamida:

40% Metanol (Merck, cat.
10% Ac. Acético (Merck, cat. 1.00063.2500)
50% H₂O MQ

Rojo de Ponceau

(Sigma, cat. P-7170)
Disolver 0.5gr en ac. Acético glacial (Merck, cat. 1.0006302500)

PBS 10x:

65gr NaCl (Gibco BRL, cat. 3625-01)
28gr K₂HPO₄ (J. T. Baker, cat. 3252-20)
5GR KH₂ HPO₄ (J. T. Baker, cat. 3246-20)
Disolver en 800ml y aforar a 1000ml. Esterilizar por autoclave.

PBS–Tween 20

(Research Organics, 3061T)
Agregar 500µl a 1lt de PBS, concentración final 0.05%.

PBS-leche

(Svelty descremada)
Disolver 6gr de leche en 100ml de PBS 1x y llevarlo a 1000ml, concentración final 0.6%.

Marcador de proteínas preteñido.

(NEB, cat. P7708S)

2x HBS (para transfección)

NaCl (Gibco BRL, cat. 3625-01)
HEPES (Gibco BRL, cat. 11344-033)
Na₂HPO₄ (J. T. Baker, cat. 3828-20-0)
Medio Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, cat. 12100-046)
Suero Fetal de Bovino (SFB) (Hy-clone, cat. SH30071.03)

El medio DMEM se complementa de la siguiente manera:

SFB 8-10% (Hy-clone, cat. SH30071.03)
L-Glutamina 1-2% (Gibco BRL, cat. 25060-081)
Piruvato de sodio 1% (Hy-clone, cat. SH30239.01)
Penicilina – streptomycin 1% (Invitrogen, cat. 10378-016)

REFERENCIAS CITADAS

- Abbondanzo, S. J., Gadi, I., Stewart, C. L. (1981), Derivation of embryonic stem cells lines. *Methods in Enzymology* 225: 803-823.
- Abe, E., Tanaka, H., Ishimi, Y., Miyaura, C., Hayashi, T., Nagasawa, H., Tomida, M., Yamaguchi, Y., Hozumi, M., Suda, T. (1986), Differentiation-inducing factor from conditioned medium of mitogen-treated cell cultures stimulates bone resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(16):5958-5962.
- Allan, E. H., Hilton, D. J., Brown, M. A., Evely, R. S., Yumita, S., Metcalf, D., Gough, N. M., Ng, K. W., Nicola, N. A., Martin, T. J. (1990), Osteoblasts display receptors for and responses to leukemia-inhibitory factor. *Journal of Cellular Physiology* 145(1): 110-119.
- Aloisi, F., Rosa, S., Testa, U., Bonsi, P., Russo, G., Peschle, C., Levi G. (1994), Regulation of leukemia inhibitory factor synthesis in cultured human astrocytes. *Journal of Immunology* 152(10):5022-5031.
- Austin, L., Bower, J., Kurek, J., Vakakis, N. (1992), Effects of leukemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *Journal of Neurological Sciences* 112:185-191.
- Azari, M. F., Lopes, E. C., Stubna, C., Turner, B. J., Zang, D., Nicola, N. A., Kurek, J. B., Cheema, S. S. (2003), Behavioural and anatomical effects of systematically administered leukemia inhibitory factor in the SODI(G93AGIH) mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research* 982(1):92-97.
- Banner, L. R. and Patterson, P. (1994), Major changes in the expression of the mRNAs for cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor and its receptor after injury to adult peripheral nerves and ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 91: 11408-11412.
- Baumann, H., Schendel, P. (1991), Interleukin—11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry* 266(30): 20424-20427.
- Bazan, J. F. (1990), Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 87: 6934-6938.
- Bhatt, H., Brunet, L. J., Stewart, C. L. (1991), Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 88: 11408-11412.
- Brown, M. A., Metcalf, D., Gough, N. M. (1994), Leukemia inhibitory factor interleukin-6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse are induced by inflammation. *Cytokine* 6(3):300-309.
- Campbell, I. K., Waring, P., Novak, U., Hamilton, J. A. (1993), Production of leukemia inhibitory factor by human articular chondrocytes cartilage in response to interleukin-1 tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheumatoid* 36(6):790-794.
- Capecchi, M. R. (1989), The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics* 5(3):70-76.
- Carpenter, M. K., Cui, X., Hu, Z.-Yi, Jackson, J., Sherman, S., Seiger, A., Wahlberg, L. U. (1999), *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Experimental Neurology* 158(2): 265-278.

- Cui, S., Hope, R. M., Rathjen, J., Voyle, R. B., Rathjen, P. D. (2001), Structure, sequence and function of a marsupial LIF gene: Conservation of IL-6 family cytokines. *Cytogenetics and Cell Genetics* 92(3-4): 271-278.
- Cullinan, E. B., Abbondanzo, S. J., Anderson, P. A., Pollard, J. W., Lessey, B. A., Stewart, C. L. (1996), Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93:3115-3120.
- Curtis, R., Scherer, S. S., Somogyi, R., Adryan, K. M., Ip, N. Y., Zhu, Y., Lindsay, R. M., DiStefano, P. S. (1994), Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron* 12(1): 191-204.
- De Groote, D., Fauchet, F., Jadoul, M., Dehart, I., Raheer, S., Gevaert, Y., Lopez, M., Gathy, R., Franssen, J. D., Radoux, D., Franchimont, P., Soulillou, J. P., Jacques, Y., Godard, A. (1994), An ELISA for the measurement of human leukemia inhibitory factor in biological fluids and culture supernatants. *Journal of Immunological Methods* 167: 253-261.
- Dick, J. E., Kamel-Reid, S., Murdoch, B., Doedens, M., (1991), Gene transfer into normal human hematopoietic cells using *in vitro* and *in vivo* assays. *Blood* 78(3): 624-634.
- Escary, J.-L., Perreau, J., Duménil, D., Ezine, S., Brûlet, P. (1993), Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363(6427): 361-364.
- Fletcher, F. A., Williams, D. E., Maliszewski, C., Anderson, D., Rives, M., Belmont, J. W. (1990), Murine leukemia inhibitory factor enhances retroviral-vector infection efficiency of hematopoietic progenitors. *Blood* 76(6): 1098-1103.
- Fukada, K. (1985), Purification and partial characterization of a cholinergic neuronal differentiation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 82(24): 8795-8799.
- Gascan, H., Godard, A., Ferenz, C., Naulet, J., Praloran, V., Peyra, M. A., Hewick, R., Jacques, Y., Moreau, J. F., Soulillou, J. P. (1989), Characterization and NH₂-terminal amino acid sequence of natural human interleukin for DA cells: Leukemia inhibitory factor. *Journal of Biochemical Chemistry* 264(36): 21509-21515.
- Gascan, H., Lemetayer, J. (1991), Induction of leukemia inhibitory factor secretion by interleukin-1 in a human T lymphoma cell line. *Lymphocyte Cytokine Research* 10(1-2):115-118.
- Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. A. (1987), Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukemia inhibitory factor (LIF). *EMBO Journal* 6(13):3995-4002.
- Gearing, D. P., King, J. A., Gough, N. M. (1988), Complete sequence of murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Nucleic Acid Research* 16(20):9857.
- Gearing, D. P., Nicola, N. A., Metcalf, D., Foote, S., Willson, T. A., Gough, N. M., Williams, R. L. (1989), Production of leukemia inhibitory factor in *Escherichia coli* by a novel procedure and its use in maintaining embryonic stem cells in culture. *Biotechnology* 7: 1151-1161.

- Gearing, D. P., Thut, C. J., VandenBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., Price, V., Cosman, D., Beckmann, P. (1991), Leukemia inhibitory receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO Journal* 10(10): 2839-2848.
- Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., Ziegler, S. F., Cosman, D. (1992), The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255:1434-1437.
- Giovannini, M., Djabali, M., McElligot, D. M., Selleri, L., Evans, G. A. (1993), Tandem linkage of genes coding for leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) in human chromosome 22. *Cytogenetic and Cell Genetic* 64: 240-244.
- Godard, A., Gascan, H., Naulet, J., Peyrat, M. A., Jacques, Y., Soullillou, J. P., Moreau, J. F. (1988), Biochemical characterization and purification of HILDA, a human lymphokine active on eosinophils and bone marrow cells. *Blood* 71(6):1618-1623.
- Gough, N. M., Gearing, D. P., King, J. A., Willson, T. A., Hilton, D. J., Nicola, N. M., Metcalf, D. (1987), Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85:2623-2627.
- Gough, N. M., Gearing, D. P., King, J. A., Willson, T. A., Hilton, D. J., Nicola, N. M., Metcalf, D. (1988a), Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85: 2623-2627.
- Gough, N. M., Hilton, D. J., Gearing, D. P. (1988b), Biochemical characterization of murine leukemia inhibitory factor produced by Krebs ascites and Yeast cells. *Blood Cells* 14:431-442.
- Gough, N. M., Wilson, T. A., Stahl, J., Brown, M. A. (1992), Molecular biology of the leukemia inhibitory factor gene. *Ciba. Foundation Symposium* 167:24-38.
- Hambartsoumian E. (1998), Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility multiple failures of implantation. *American Journal of Reproductive Immunology* 39(2):137-143.
- Heymann, D., Godard, A., Rahe, S., Bentouimou, N., Blanchard, F., Chérel, M., Hallet, M.- M., Jacques, Y. (1996), Leukaemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) high affinity binding require additional receptor subunits besides gp130 and gp190. *Cytokine* 8(3):197-205.
- Hilton, D. J., Nicola, N. A., Gough, N. M., Metcalf, D. (1988a), Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *Journal of Biochemical Chemistry* 263(19): 9238-9243.
- Hilton, D. J., Nicola, N. A., Metcalf, D. (1988b), Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 85: 5971-5975.
- Hilton, D. J., Nicola, N. A., Metcalf, D. (1988c), Purification of a murine leukemia inhibitory factor from krebs ascites cells. *Analytical Biochemistry* 173: 359-367.
- Hilton, D. J., Gough, N. M. (1991), Leukemia inhibitory factor: A biological perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* 46: 21-26.

- Hilton, D. J. (1992), LIF: lots of interesting functions. *Trends in Biochemical Sciences* 17(2): 72-76.
- Hilton, D. J., Nicola, N. A., Metcalf, D. (1992), Distribution and binding properties of receptors for leukemia inhibitory factor. *Ciba Foundation Symposium* 167:227-239
- Hinds, M. G., Maurer, T., Zhang, J.-G., Norton, R. S. (1998), Solution structure of leukemia inhibitory factor. *Journal of Biological Chemistry* 273(22):13738-13745.
- Hirano, T., Matsuda, T., Nakajima, K. (1994), Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin-6 cytokine subfamily. *Stem Cells* 12(3):262-277.
- Iannaccone, P. M., Taborn, G. U., Garton, R. L., Caplice, M. D., Brenin, D. R. (1994), Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Developmental Biology* 163(1):288-292.
- Ibelgaufts, H. (1995), Dictionary of cytokines.
- Ishimi, Y., Abe, E., Jin, C. H., Miyaura, C., Hong, M. H., Oshida, M., Kurosawa, H., Yamaguchi, Y., Tomida, M., Hozumi, M., Suda, T. (1992), Leukemia inhibitory factor/Differentiation-stimulating factor (LIF/D-Factor): regulation of its production and possible roles in bone metabolism. *Journal of Cellular Physiology* 152: 71-78.
- Kerr, D. A., Llado, J., Shambloott, M. J., Maragakis, N. J., Irani, D. N., Crawford, T. O., Krishnan, C., Dike, S., Gearhart, J. D., Rothstein, J. D. (2003), Human embryonic germ cells derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *Journal of Neuroscience* 23(12):5131-5140.
- Kim, K. J., Alphonso, M., Schmelzer, C. H., Lowe, D. (1992), Detection of human leukemia inhibitory factor by monoclonal antibody based ELISA. *Journal of Immunological Methods* 156:9-17.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T. (1995), Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86(4):1243-1254.
- Knight, D., McKay, K., Wiggs, B., Schellenberg R. R., Bai, T. (1997), Localization of leukemia inhibitory factor to airway epithelium and its amplification of contractile responses to tachykinins. *British Journal of Pharmacology* 120(5): 883-891.
- Knight, D. A., Lydell, C. P., Zhou, D., Weir, T. D., Schellenberg, L. L. (1999), Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor in human lung, distribution and regulation of LIF release. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology* 20(4): 834-841
- Kojima, K., Kanzaki, H., Iwai, M., Hatayama, H., Fujimoto, M., Inoue, T., Horie, K., Nakayama, H., Fujita, J., Mori, T. (1994), Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biology of Reproduction* 50: 882-887.
- Kola, I., Davey, A., Gough, N. M. (1990), Localization of the murine leukemia inhibitory factor near the centromere on chromosome 11. *Growth Factors* 2(2-3):235-240.
- Kreisberg, R., Detrick, M. S., Moore, R. N. (1993), Opposing effects of tumor necrosis factor alpha and leukemia inhibitory factor in lipopolysaccharide-stimulated myelopoiesis. *Infection and Immunity* 61(2):418-422.

- Kurek, J. B., Austin, L., Cheema, S. S., Bartlett, P. F., Murphy, M. (1996), Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscular Disorders* 6(2):105-114.
- Layton, M. J., Lock, P., Metcalf, D., Nicola, M. A. (1994), Cross-species receptor binding of human and mouse leukemia inhibitory factor suggest a complex binding interaction. *Journal of Biochemical Chemistry* 269(25): 17048-17055.
- Leary, A. G., Wong, G. G., Clark S. C., Smith, A. G., Ogawa, M. (1990), Leukemia inhibitory factor differentiation-inhibiting activity/human interleukin for DA cells augments proliferation of human hematopoietic stem cells. *Blood* 75(10): 1960-1964.
- Lotz M., Moats T. Villiger P.M. (1992) Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 1992 90(3):888-896.
- Maekawa, T., Metcalf, D., Gearing, D. P. (1990), Enhanced suppression of human myeloid leukemic cell lines by combination of IL-6, LIF, GM-CSF AND G-CSF. *International Journal of Cancer* 45(2): 353-358.
- Meager, T. (1998), *Molecular biology of the cytokines*, John Wiley & sons eds., Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 416 pp.
- Metcalf, D., Gearing, D. P. (1989), Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86: 5948-5952.
- Metcalf, D., Nicola, N. A., Gearing, D. P. (1990), Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood* 76(1): 50-56.
- Metcalf, D., Hilton, D., Nicola, N. A. (1991), Leukemia inhibitory factor can potentiate murine megakaryocyte production *in vitro*. *Blood* 77(10): 2150-2153.
- Mezzasoma, L. Biondi, R., Benedetti, C., Floridi, C., Ciurnelli, R., Falcinelli, F., Onorato, M., Scaringi, L., Marconi, P., Rossi, R. (1993), *In vitro* production of leukemia inhibitory factor (LIF) by Hep G2 hepatoblastoma cells. *Journal of Biol Regul Homeost Agents* 7(4):126-132.
- Moreau, J.-F., Donaldson, D. D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J. A., Clark, S. C., Wong, G. G. (1988), Leukemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 336: 690-692.
- Mori, M., Yamaguchi, K., Abe, K. (1989), Purification of a lipoprotein lipase-inhibiting protein produced by a melanoma cell line associated with cancer cachexia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 160(3): 1085-1092.
- Murphy, M., Reid, K., Hilton, D. J., Bartlett, P. (1991), Generation of sensory neuron is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 88: 3498-3501.
- Murphy, M., Reid, K., Brown, M. A., Bartlett, P. F. (1993), Involvement of leukemia inhibitory factor and nerve growth factor in the development of dorsal root ganglion neurons. *Development* 117(3): 1173-1182.
- Nawa, H., Nakanishi, S., Patterson, P. H. (1991), Recombinant cholinergic differentiation factor (leukemia inhibitory factor) regulates sympathetic neuron phenotype by alterations in the size and amounts of neuropeptide mRNAs. *Journal of Neurochemistry* 56(6): 2147-2150.

- Nichols, J., Evans, E. P., Smith, A. G. (1990), Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110(3): 1341-1348.
- Nicola, N. A., Bronwyn, C., Simpson, R. J. (1993), The disulfide bond arrangement of leukemia inhibitory factor: homology to oncostatin M and structural implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190(1):20-26.
- Patterson, B. K., Behbahani, H., Kabat, W. J., Sullivan, Y., O’Gorman, M. R. G., Landay, A., Flener, Z., Khan, N., Yogeve, R., Anderson, J. (2001), Leukemia inhibitory factor inhibits HIV-1 replication and is upregulated in placenta from nontransmitting women. *Journal of Clinical Investigation* 107(3): 287-294.
- Piedrahita, J. A., Weaks, R., Petrescu, A., Shrode, T. W., Derr, J. N., Womack, J. E. (1997), Genetic characterization of the bovine leukaemia inhibitory factor (LIF) gene: isolation and sequencing, chromosome assignment and microsatellite analysis. *Animal Genetic* 28(1):14-20.
- Piquet-Pellorce, C., Grey, L., Mereau, A., Heath, J. K. (1994), Are LIF and related cytokines functionally equivalent? *Experimental Cell Research* 213: 340-347.
- Purvis, D. H., Mabbutt, B. C. (1997), Solution dynamics and secondary structure of murine leukemia inhibitory factor: A four-helix cytokine with a rigid cd loop. *Biochemistry* 36: 10146-10154.
- Robertson, E. J. (1987), *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach*. IRL Press, Oxford and Washington D.C. 249pp.
- Robertson, T. A., Maley, M. A., Grounds, M. D., Papadimitriou, J. M. (1993), The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp. Cell. Res.* 207(2):321-331.
- Robinson, R. C., Grey, L. M., Staunton, D., Vankelecom, H., Vernallis, A. B., Moreau, J.-F., Stuart, D. I, Heath, J. K., Jones, E. Y. (1994), The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: Implications for receptor binding. *Cell* 77: 1101-1116.
- Shih, C.-C., Hu, M. C.-T., Hu, J., Weng, Y., Yazaki, P. J., Medeiros, J., Forman, S. J. (2000), A secreted and LIF-mediated cell-derived activity that promotes *ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 95(6): 1957-1966.
- Smith, A. G. and Hooper, M. L. (1987), Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Developmental Biology* 121(1):1-9.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. (1988), Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688-690.
- Smith, T. A. and Hooper, M. L. (1983), Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 145(2):458-462.
- Stahl, J., Gearing, D. P., Willson, T. A., Brown, M. A., King, J. A., Gough, N. M (1990), Structural organization of the genes for the murine and human leukemia inhibitory factor. Evolutionary conservation of coding and non-coding regions. *Journal of Biological Biochemistry* 265(15): 8833-8841.

- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., Abbondanzo, S. J. (1992), Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359: 77-79.
- Sutherland, G. R., Baker, E., Hyland, V. J., Callen, D. F., Stahl, J., Gough, N. M. (1989), The gene for human leukemia inhibitory factor (LIF) maps to 22q12. *Leukemia* 3(1):39-13.
- Taga, T. (1997), Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual Review of Immunology* 15:797-819.
- Takahama, Y., Ochiya, T., Baba-Toriyama, H., Konishi, H., Nakano, H., Terada, M. (1998), Molecular cloning and functional analysis of cDNA encoding a rat leukemia inhibitory factor: towards generation of pluripotent rat embryonic stem cell. *Oncogene* 16(24): 3189-3196.
- Tomida, M., Yamamoto, Y. Y., Hozumi, M. (1984), Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *Journal of Biological Chemistry* 259(17): 10978-10982.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H., Weissman, I. L. (2000), Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 97(26): 14720-14725.
- Verfaillie, C., McGlave, P. (1991), Leukemia inhibitory factor/human interleukin for DA cells: a growth factor that stimulates the *in vitro* development of multipotential human hematopoietic progenitors. *Blood* 77(2): 263-270.
- Ware, C. B., Horowitz, M. C., Renshaw, B. R., Hunt, J. S., Liggitt, D., Koblar, S. A., Gliniak, B. C., McKenna, H. J., Papayannopoulou, T., Thoma, B., Cheng, L., Donovan P. J., Peschon, J. J., Bartlett, P. F., Willis, C. R., Wright, B. D., Carpenter, M. K., Davison, B. L., Gearing, D. P. (1995) Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects results in perinatal death. *Development* 121: 1283-1299.
- Waring, P., Wycherley, K., Cary, D., Nicola, N., Metcalf, D. (1992), Leukemia inhibitory factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids. *Journal of Clinical Investigation* 90(5):2031-2037.
- Waring, P. M., Carroll, G. J., Kandish, D. A., Buiraki, G., Metcalf, D. (1993), Increased levels of leukemia inhibitory factor in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis. Rheum.* 36(7):911-915.
- Wetzler, M., Taipaz, M., Lowe, D. G., Baiocchi, G., Gutterman J.U., Kurzzrock R. (1991), Constitutive expression of leukemia inhibitory factor RNA by human bone marrow stromal cells and modulation by IL-1, TNF alpha TGF beta. *Exp. Hematol.* 19(5):347-351.
- Willson, T. A., Metcalf, D., Gough, N. M. (1992), Cross-species comparison of the sequence of the leukemia inhibitory factor gene and its protein. *European Journal of Biochemistry* 204: 21-30.
- Wurst, W., Joyner, A. L. (1993), Production of targeted embryonic stem cells clones, in *Gene targeting: A practical approach*. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, pp. 33-60.

Yamamori, T., Fukada, K., Aebersold, R., Korsching, S., Fann, M.- J., Patterson, P. H. (1989), The cholinergic neural differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246: 1412-1416.

Yamamoto-Yamaguchi, Y., Tomida, M., Hozumi, M. (1986), Specific binding of a factor inducing differentiation to mouse myeloid leukemic M1 cells. *Experimental Cell Research* 164(1): 97-102.