



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

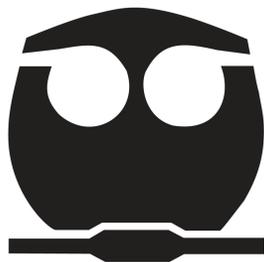
---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA ALTERNATIVA  
DE MANIPULACIÓN GENÉTICA  
POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN BACTERIAS**

**TRABAJO DE TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
PRESENTA**

**GABRIEL MORENO LOMELIN**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS

**VOCAL:** Profesor: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

**SECRETARIO:** Profesor: FÉLIX RECILLAS TARGA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

**2° SUPLENTE:** Profesor: AURORA LARA NUÑEZ

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Félix Recillas Targa

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Lic. Edgar Gonzáles Buendía

### **SUSTENTANTE:**

Gabriel Moreno Lomelín

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios por el regalo máspreciado que es la vida.

A mis padres, por su amor, valor, sacrificio, apoyo, consejos, guía y esfuerzo. Sepan que les debo absolutamente todo a ustedes.

A mis hermanos; Luisita y Ramiro, por sus cuidados, sacrificios, amistad y cariño; por esa marca de varicela que tengo en el cachete derecho (efectivamente me tuve que ver al espejo para saber de que lado era), por su sentido del humor, y por esa afición que tengo por la Guerra de las Galaxias, así como ser mí ejemplo de vida y siempre hacerme sentir orgulloso de ser su hermano menor.

Al Dr. Félix Recillas por haber creído en mí y haberme otorgado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio; por su paciencia, interés y apoyo.

Al supervisor técnico de ésta tesis y próximo Dr. Edgar Fernán González Buendía por su paciencia, esfuerzo, enseñanzas y sobre todo por su amistad y apoyo.

A Georgina Guerrero Avendaño, por su ayuda técnica, enseñanzas y el gran apoyo que es para todos los integrantes del laboratorio.

A mis abuelos, que en paz descansen; por su amor, sabiduría, apoyo, esfuerzo y trabajo que concluyeron en la hermosa familia a la que pertenezco. Espero ser digno de llevar sus apellidos y siempre los llevo en la memoria y en el corazón,

A mí querida familia, tíos y primos, por su cariño y ejemplo, así como siempre haber estado cerca de mí en todo momento.

A mis padrinos, Manolo y Leticia por su gran cariño, por estar siempre pendientes de mí, por sus consejos y por el gran apoyo que son para mí y mi familia.

A mi tía Orieta, mi tío Javier, mi prima Orieta, y a la familia Orueta por siempre haberme recibido a mí y a mi familia como a la propia.

Al padre Antonio Macedo y al padre Gualterio Hernández, por haber sido gran inspiración y guía espiritual, por predicar con el ejemplo y avivar mi fe e infundir en mí la vocación de servicio.

A Fina y Miguel por su amistad y el gran apoyo que me otorgaron durante mis estudios de educación.

Al Dr. Felipe Cruz García por ser un excelente profesor y amigo, por su apoyo, consejos, recomendaciones y sobre todo por su fe en mí.

A la Dra. Carolina Peña Montes por su amistad, consejos; y por que junto con mi hermana sembraron mí el interés y entusiasmo por la Ciencia y la Química.

A la Dra. Leticia Haydeé Ramírez y al Dr. Oscar Flores por ser excelentes tutores y amigos, y por haberme integrado al ambiente científico de la UNAM.

A mis queridos profesores:

Miss Toñeta, Miss Yolanda, Miss Alejandra, el profesor Guillermo y el profesor Miguel, la profesora Regina De La Mora, profesor José Oseguera “Cachú”, profesor José Kurt Groenewold, profesor Jorge Aceves o mejor conocido en el bajo mundo como “Pukas”, profesor Teodoro “Teo” Oriza; profesor Ramiro Gutiérrez, profesor Manuel Carrillo, profesores y prefectos Leonides Peña y Daniel Lerdo, profesor Mauricio Nigo, Dra. Adela Torres: la profesora Gabriela Chávez, profesor Margarito Clavellina, profesor Jesús “Chus” Palacios, profesor Juan Manuel, profesor Eduardo Chinchilla y por último pero no menos importante, al profesor José Luis Contreras “; quienes formaron en mi los valores y conocimientos que me han permitido desarrollarme a nivel académico y personal.

A mis entrenadores y amigos: Francisco Mercado, en paz descansa, Alfredo Méndez Conchillos, Lautaro Ponce y el profesor Gheorghe Gruia, sin duda el mejor jugador de Handball de toda la historia; por haber inculcado en mi la cultura deportiva y los valores que conlleva como la disciplina, trabajo en equipo, humildad, entre otros; así como por su amistad y apoyo.

A mis amigos de toda la vida; Rodrigo, Mariana, Fernando, Jorge, Erick Manuel, Isabel, por mantener la amistad y compañía a través del tiempo.

A mis inolvidables y estimadísimos, “Benjas”, “el Guarro”, Víctor “el Negro”, “Twinky”, Mario “Sarna” y Fernando Fontove, por haber hecho de mí un monstruo en la secundaria y haber presentado un reto junto conmigo a todo profesor.

A mi gran banda, Enrique, Julio Rocha, Contla, Polo, Pancho, “Farol”, Diego, “Borrego”, Gabriel, Francisco y Alex, así como a mis queridísimas integrantes del siempre kinder; Natalia, Vianey y Jocelin por compartir conmigo una de las mejores etapas de mi vida.

A mis queridísimos amigos y compañeros en Concierto y Rondalla Orquestal; Paola, Brenda, Renata, Héctor, Rubén, Abimelek, Alan, Ana, Charles y Raúl y claro especialmente a Israel, Vinicio, Leonardo y Lalo excelentes profesores y amigos que inculcaron en mi el amor por la música y el espectáculo además de por compartir ese entusiasmo por tocar en el escenario y por mantener la amistad que forjamos en tanto tiempo de convivencia.

Al gremio; Frank y Javier Díaz, a Christina y Lourdes, a Luis “Tostacho”, a Andrea, a Frank Piñeda, a Román y Emanuel, por esos divertidos momentos de metal.

A mis queridos amigos mayores; Omar, Ricardo y Roberto “nini” por haber aguantado al hermano menor del chamaco durante tanto tiempo e incluso por de vez en cuando tener que ir por mi a la escuela por que el otro vago no se donde andaba.

A mis amigos y compañeros de los equipos representativos de Handball de la UNAM a los que he tenido el orgullo de pertenecer, por darme el privilegio de participar junto con ustedes defendiendo los colores de nuestra Universidad. A Martín, Alex, Pollo, Facho, Marcos, Antar, Beto, Eligio, Tuts, Alexis, Chucky, Erich, Eder, Toño, Chícharo, Zorrillo, Vaca, Pablo, Agustín, Mark, Bruno, Zurdo, Román mexicano y Román Alemán, Chango, Emilio, Baloo, Lev, Hugo, Tablas, Adrián, Tagle, Eward, Mario, Pablito, Jorge, Efe, Josué, David, Noel y Javier.

A mis compañeros en el laboratorio 122Nte: Christian Arriaga, Cristian Valdés, Daniela, Meche, Estela, Mayra, Charis, Erandi, Andrea, Gianilli, Ricardo, Rodrigo, David y Ernesto por todo su apoyo y trabajo en equipo para que este proyecto se hiciese realidad, a todos les agradezco su amistad y apoyo.

De hecho para evitarles la dificultad para que se buscaran por mucho tiempo en estos agradecimientos los puse casi hasta el final; a mis queridísimos amigos con los que conviví, convivo y conviviré casi toda semana, que si no están algo falta y que hoy en día forman parte esencial de mi vida y a quien les debo mi “salud mental”; Alicia, Caro, Piffs, Deneb, Myrna, Gaby, Ana, Pily, María José, Carito, Romina, Karina, Susy, Laura, Rafa, Memo, Kory, Máquinas, Pianolas, Pipetas, Lalo, Gristian, Lucoke, Iván, Fernando T, Sergio, Emmanuel, Emiliano, Marco y Jacobo.

Por último, quiero agradecer a los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (IN209403 y IN203811) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT; 42653-Q y 128464).

A todos ustedes les dedico este esfuerzo y sacrificio con todo cariño y gratitud.

## **INDICE:**

### **I. Marco Teórico**

Contexto histórico, 1

Definiciones y Conceptos:

1. Ácidos Nucleicos, el DNA, 3
2. Genoma Eucarionte, 6
3. Cromatina, 9
  - Jerarquía en la estructuración de la cromatina, 13
  - Eucromatina y Heterocromatina, 16
  - Dominios Cromatínicos y Elementos Barrera, 19
  - El factor multifuncional CTCF, 22
4. Transcripción y regulación transcripcional, 27
  - Establecimiento de una estructura cromatínica permisiva para la transcripción, 29
  - Identificación del promotor, acoplamiento de la maquinaria de transcripción e inicio de la transcripción, 32
  - Elementos de Regulación y la dinámica nuclear, 33
  - Elongación y fin de la transcripción, 36
  - Regulación Epigenética, 39

### **II. INTRODUCCIÓN:**

1. Antecedentes, 41
  - La Hemoglobina y los genes globina, 42
  - El Dominio  $\alpha$ -globina de pollo y el Elemento Delimitador  $\alpha$ EHS1.4, 46
  - Ingeniería Recombinogénica y Cromosomas Artificiales de Levadura, 51
  - Cromosomas artificiales de bacteria e Ingeniería Recombinogénica en bacterias, 59
  - El Cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12, 62
2. Planteamiento del Problema, 64
3. Hipótesis, 65
4. Objetivos, 65

### **III. MATERIALES Y METODOLOGÍA:**

- Generación de cultivos de mantenimiento de bacterias a -70 °C en glicerol, 67
- Establecimiento de métodos de purificación de cromosomas artificiales de bacteria, 67
- Alineamientos de secuencias, 75
- Análisis de restricción bioinformático predictivo del BAC CH261-75C1, 75
- Análisis de los patrones de restricción del BAC CH261-75C12, 76
- Amplificación por PCR de regiones de interés del dominio  $\alpha$ -globina de pollo, 77

### **IV. RESULTADOS :**

- Establecimiento de protocolos de purificación de Cromosomas artificiales de bacteria, 80
- Caracterización de las secuencias genómicas correspondientes al dominio  $\alpha$ -globina de pollo contenidas en el BAC CH261-75C12, 86
  - a) Alineamientos de secuencias, 86
  - b) Amplificación por PCR de regiones genómicas correspondientes al dominio  $\alpha$ -globina de pollo, 89
  - c) Análisis de restricción, 90

### **V. DISCUSIÓN, 95**

### **VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS, 103**

### **VII. REFERENCIAS, 105**

## **INDICE DE TABLAS:**

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Cebadores para la amplificación de diversas regiones del dominio $\alpha$ -globina de pollo	78
2. Comparación de protocolos de purificación	85
3. Alineamientos de secuencias de pollo con la secuencia del BAC CH261-75C12	88
4. Comparación de los patrones de restricción del dominio $\alpha$ -globina de pollo y de la región genómica de pollo incluida en el BAC CH261-75C12 generado por la actividad de la endonucleasa de restricción Nhe I.	93

## **INDICE DE FIGURAS:**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Bases Nitrogenadas	3
2. “Esqueleto” de una cadena de DNA	4
3. Doble hélice de DNA	5
4. Gen eucarionte	7
5. Nucleosoma	10
6. Extremos amino terminal de las histonas	12
7. Fibra de 10 nm o “collar de perlas”	13
8. Formación del “solenioide”	14
9. Jerarquía en la estructuración de la cromatina	15
10. Eucromatina y heterocromatina	18
11. Delimitadores y dominios cromatínicos	21
12. El elemento delimitador 5’ HS4	22
13. CTCF	24
14. Transcripción	28
15. Modificación coordinada de la cromatina	31
16. Identificación del promotor, acoplamiento de la maquinaria de transcripción e inicio de la transcripción	33
17. Elementos de regulación	35
18. Elementos de regulación y la dinámica nuclear	37
19. Hemoglobina	43
20. Hemoglobina y los genes globina	45
21. Dominio $\alpha$ -globina de pollo y el patrón de la expresión de los genes $\alpha$ -globina durante el desarrollo y la diferenciación celular eritroide	48
22. El papel del elemento delimitador $\alpha$ EHS1.4 en el locus $\alpha$ -globina de pollo	50
23. Ingeniería transgénica clásica	52
24. Recombinación homóloga	54
25. Mecanismos de recombinación homóloga utilizados en recombinoingeniería	57
26. Vector pTARBAC2.1	63
27. Regiones del dominio $\alpha$ -globina de pollo que amplifica cada par de cebadores utilizados en la caracterización del BAC CH261-75C12	79
28. Resumen de los protocolos de purificación del BAC CH261-75C12	84
29. Alineamientos de secuencias genómicas de <i>Gallus gallus</i> con la secuencia genómica de pollo del BAC CH261-75C12	88
30. Amplificación por PCR de regiones de interés del dominio $\alpha$ -globina de pollo utilizando como templado el BAC CH261-75C12	90
31. Análisis de restricción de la región genómica de pollo del BAC CH261-75C12 con la endonucleasa de restricción Mlu I	92
32. Análisis de restricción de la región genómica de pollo del BAC CH261-75C12 con la endonucleasa de restricción Nhe I	94
33. Representación gráfica del BAC CH261-75C12	94
34. Fórmulas para la obtención de la diferencia porcentual.	97
35. Modificación del elemento delimitador $\alpha$ EHS1.4 por recombinación homóloga en bacterias.	99
36. Posibilidades experimentales para el análisis del elemento delimitador $\alpha$ EHS1.4 y la asociación de CTCF a dicha secuencia en el contexto del dominio $\alpha$ -globina de pollo.	101

## **I MARCO TEÓRICO:**

### CONTEXTO HISTÓRICO:

Desde tiempos remotos el ser humano observó que existían grandes similitudes entre los progenitores y su descendencia, sin embargo, poco se sabe de estudios en la antigüedad con el objetivo de explicar dicha cuestión. Es a partir del siglo XIX por los trabajos de Gregorio Mendel, en donde demostró que ciertos caracteres se transmiten de padres a hijos de manera predecible, que se estableció el estudio formal de la herencia y la variación biológica, es decir, la genética. En dichos estudios Mendel dedujo además que la información genética dirige la función celular y por lo tanto, determina en gran medida la apariencia externa de los organismos (1).

Tomando en cuenta estos preceptos, uno de los cuestionamientos que surgió fue determinar en donde se alojaba dicha información.

No fue sino hasta mediados del siglo XX que se definió al DNA como la molécula responsable de la contención, mantenimiento y transmisión de la información genética en los organismos (2). Estudios dedicados a la caracterización del DNA, su metabolismo y sus implicaciones celulares, concluyeron solo unos años después en el establecimiento del Dogma Central de la Biología que conllevó al desarrollo de cuantiosos avances en diversas ramas de la ciencia y la tecnología que definieron un cambio sustantivo en la sociedad hasta como la conocemos hoy en día (1-3).

A finales del siglo XX estaba claro que el idioma de la vida se basa en la secuencia y regulación del DNA (4); y gracias a la tecnología computacional disponible, así como los avances en la tecnología del DNA recombinante, los estudios sobre el ácido nucleico se tornaron de un enfoque aislado o individual

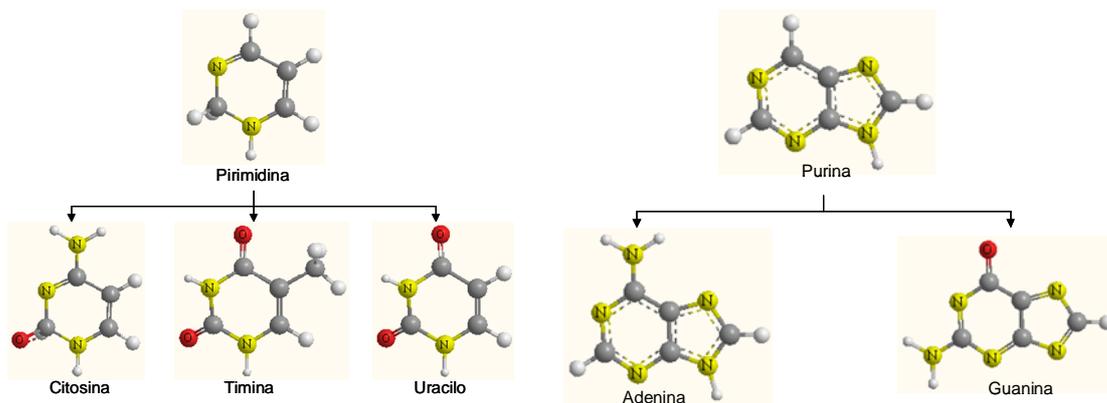
a una perspectiva global. Es así, que se dio pie al inicio de la era Genómica que precisa los esfuerzos para la caracterización de la secuencia de todo el material genético de diversos organismos entre ellos, principalmente el humano; el entendimiento de las implicaciones biológicas de la misma y sus aplicaciones. Un momento de clímax para dicha era ocurrió en Abril del año 2003 en el que dados diversos esfuerzos internacionales se publicó la secuencia completa del genoma humano lo que ha llevado a la secuenciación de otros genomas y abre una amplia gama de preguntas aún por contestar (2). A pesar de contar con la secuencia completa de diversos genomas eucariontes y procariontes, anteriormente se había observado que las implicaciones a nivel fenotípico no solo están definidas por la secuencia de DNA y los genes incluidos en la misma; desde este punto de vista, es imprescindible incluir en la era genómica a la era de la epigenética la cual se entiende dados los esfuerzos para identificar y definir los mecanismos moleculares independientes a la secuencia de DNA que juegan un papel en la regulación, organización y estructuración de un genoma y sus consecuencias a nivel celular.

En el presente trabajo se muestra la implementación de una nueva alternativa experimental que contribuirá al esfuerzo de nuestro grupo de investigación por resolver algunos de estos cuestionamientos.

## DEFINICIONES Y CONCEPTOS

### ***Ácidos nucleicos:***

La estructura de cualquier biomolécula o componente celular es producto de la programación de la información contenida dentro de la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos de una célula (2). Los nucleótidos son los componentes constitutivos de los ácidos nucleicos y tienen 3 elementos característicos: una base nitrogenada, un azúcar pentosa y de uno hasta 3 grupos fosfato. Las bases nitrogenadas se clasifican según la molécula parental de origen y son: guanina y adenina derivados de purina; y por otro lado, timina y citosina derivados de pirimidina así como el uracilo, base nitrogenada característica del RNA (2) (Figura 1).

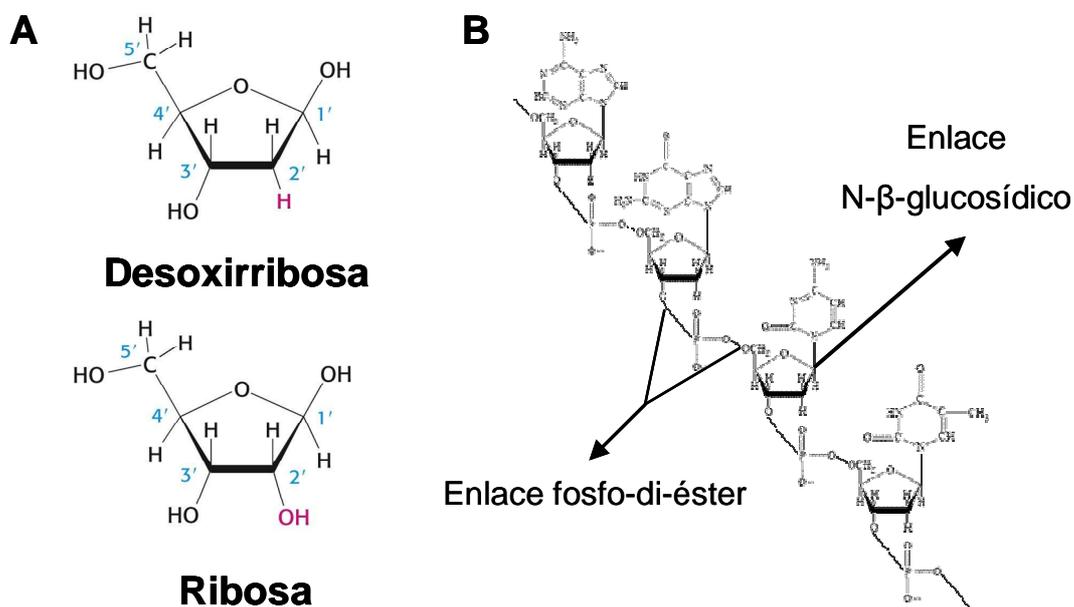


**Figura 1: Bases nitrogenadas.** Estructura molecular de cada base nitrogenada en la que se puede observar la relación con la molécula parental.

El azúcar se asocia a la base nitrogenada mediante un enlace N- $\beta$ -glucosídico al remover una molécula de agua entre el grupo amino de la base y el carbono 1' de la pentosa correspondiente (Figura 2 B). Es el tipo de azúcar el que define el tipo de ácido nucleico; la 2'-desoxi-D-ribosa corresponde a la estructura de los nucleótidos que forman el ácido desoxirribonucleico (DNA), mientras que

aquellos que son parte del ácido ribonucleico (RNA), se asocian a una D-ribosa (Figura 2 A).

La estructura primaria de un ácido nucleico por convención está dada por la secuencia de nucleótidos de la cadena en sentido 5' 3'. Los nucleótidos se asocian covalentemente entre si por un enlace fosfo-di-éster que se forma entre el grupo fosfato de la posición 5' de un nucleótido con el grupo hidroxilo 3' de la pentosa de otro nucleótido (Figura 2 B).

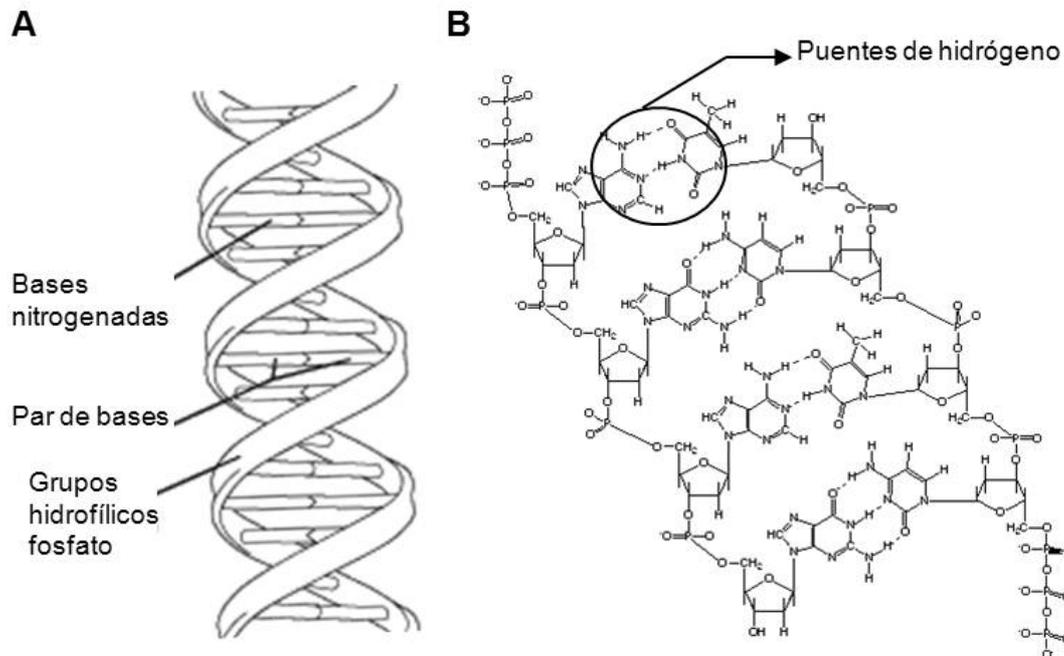


**Figura 2:** “Esqueleto” de una cadena de DNA. A) La 2'-desoxi-D-ribosa (desoxirribosa), difiere de la ribosa únicamente al carecer de un grupo hidroxilo en la posición 2. B) Estructura primaria de DNA ó “Columna vertebral” de una cadena de DNA.

La estructura tridimensional estable adoptada por todos los nucleótidos asociados, se conoce como la estructura secundaria de un ácido nucleico (2).

La estructura de doble hélice del DNA (Figura 3 A) fue descrita en 1953 por James D. Watson y Francis Crick basándose en el patrón de difracción de rayos X del ácido desoxirribonucleico determinados por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins y los preceptos o reglas de la composición del DNA de Erwin Chargaff traducida en la complementariedad de bases (2, 3) (Figura 3 B). Dicha

estructura está estabilizada por puentes de hidrógeno que se forman entre las bases complementarias (A=T y G≡C), en el interior de la hélice y las interacciones débiles de los grupos hidrofílicos expuestos con el medio circundante (Figura 3 B).



**Figura 3: Doble hélice de DNA.** A) Estructura secundaria del DNA. Se observa la estructura de doble hélice con los grupos hidrofílicos localizados en el exterior y los grupos hidrofóbicos (bases nitrogenadas), hacia el interior de ésta. B) Complementariedad de bases. Las bases complementarias pueden formar puentes de hidrógeno entre sí que participan en la formación y estabilidad de la estructura secundaria del DNA.

Por otra parte, el RNA no presenta una estructura secundaria regular a diferencia de la doble hélice de DNA. La estructura secundaria de un RNA dependerá en gran medida de su función e interacción con otras moléculas (5). La estructura y composición de los ácidos nucleicos les confieren ciertas características fisicoquímicas como son: polaridad y por lo tanto solubilidad en agua; absorción de radiación UV a una longitud de onda de 260 nm (adjudicada a las bases nitrogenadas), así como temperaturas de inestabilidad de interacciones propias de cada ácido nucleico entre otras; cuyo conocimiento ha

sido fundamental para el establecimiento de técnicas y desarrollo de tecnologías para su aislamiento y estudio lo que ha conllevado a la intensa investigación que continúa hoy en día en la dilucidación de su papel biológico y descripción de diversos procesos implicados en su función, estructuración y mantenimiento dentro de los organismos vivos (3).

En el presente trabajo se aprovechó la información de algunas de éstas características fisicoquímicas para establecer la metodología para el aislamiento y purificación de un cromosoma artificial de bacteria que se ha planteado como herramienta para implementar una alternativa de manipulación genética para el estudio y análisis de una región genómica.

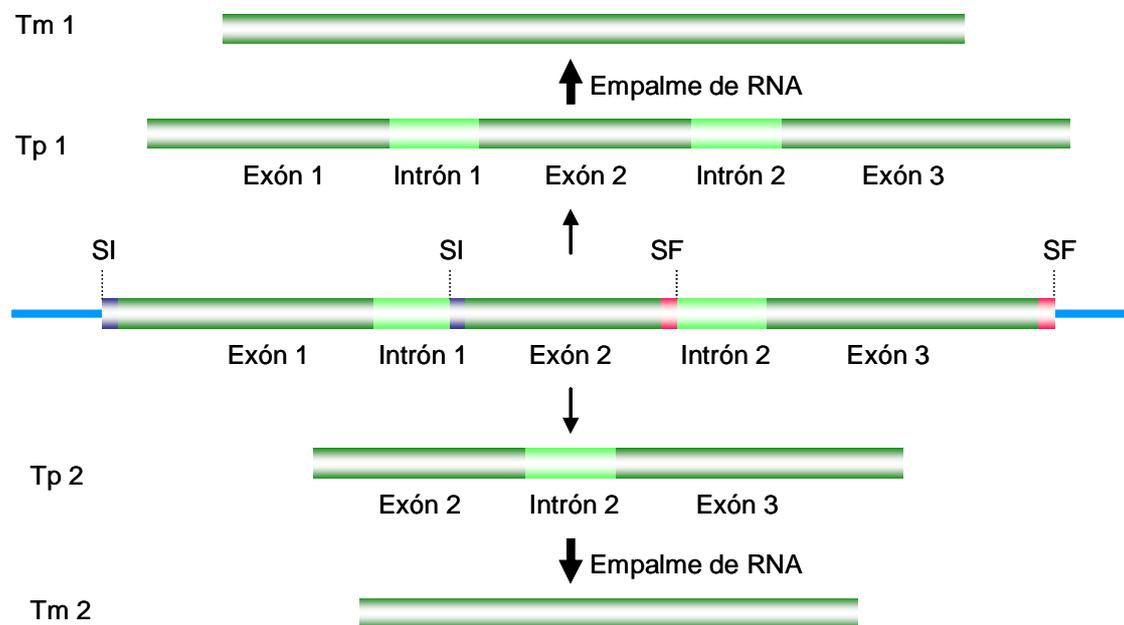
## ***II Genoma Eucariote:***

Un genoma se define como toda la secuencia de DNA de un organismo y por lo tanto la base hereditaria del mismo.

Funcionalmente un genoma se divide en genes. En general los genes eucariontes contienen secuencias que codifican para un transcrito (RNA), denominadas exones y secuencias adicionales intercaladas que no codifican un poli-ribonucleótido a las que nos referimos con el nombre de intrones, en las cuales pueden estar incluidos elementos de regulación de la transcripción que abarcaremos más adelante (Figura 4) (6).

Para la expresión de estos genes se requiere de procesos adicionales en el procesamiento del transcrito primario. Al conjunto de dichos procesos se le conoce como empalme de RNA (*RNA splicing*) (Figura 4) (7).

Asimismo, tras el estudio de una larga cantidad de genes eucariontes se pudo observar que debido a su estructura interrumpida (alternancia entre exones e intrones), dentro de un gen se pueden encontrar codificados diferentes transcritos los cuales son producto de alternar diversos sitios de inicio y término de la transcripción dispuestos según una fina regulación; lo que resulta en diversas combinaciones de secuencias procesadas y por lo cual pareciese que varios genes se encuentran sobrepuestos unos con otros tal como se muestra en la figura 4 (3).



**Figura 4: Gen eucarionte.** Presenta una estructura que se considera interrumpida. Al alternar los sitios de inicio de la transcripción (SI), y los sitios de fin de la transcripción (SF), se pueden obtener transcritos primarios (Tp), distintos a partir de un mismo gen. El transcritoprimario es procesado para la obtención del transcritomadura (Tm), mediante un conjunto de reacciones conocidas como empalme de RNA.

Es por dichas características que un gen eucarionte se puede definir mejor como una región genómica discreta o conjunto de regiones genómicas cuya transcripción es regulada por uno o más promotores y elementos regulatorios distales de los que se tratará posteriormente en este trabajo y que contiene la

información para la síntesis de un transcrito funcional. Sin embargo, esta definición no es absoluta y el debate sobre el concepto de gen se mantiene vigente hasta hoy en día (7-8).

Todos los genomas eucariontes físicamente se dividen en dos o más moléculas lineales de DNA denominadas cromosomas. Los genes eucariontes no se encuentran distribuidos al azar, cada gen reside en una localidad específica en un cromosoma a la que se denomina *locus* ó dominio génico.

Varios genes están relacionados unos con otros al codificar para transcritos similares o al encontrarse implicados en una función y forman lo que se conoce como una familia génica como es la familia de los genes globina en la que profundiza más adelante; y consecuentemente familias relacionadas forman superfamilias. Al implicarse dicha relación la distribución de éstas debe ir acorde a las necesidades celulares para la expresión de los mismos además del establecimiento de mecanismos de regulación para la correcta expresión en tiempo y cantidad (7).

La distribución génica y la regulación de su expresión están directamente relacionadas con que los genomas eucariontes presentan dos tipos de secuencias:

- DNA no repetitivo, que consiste en aquellas secuencias que son únicas y que solo existe una copia en el genoma y
- DNA repetitivo, que incluye a todas las secuencias que presentan más de una copia las cuales abarcan amplias regiones del genoma.

De tal manera que se ha observado que en general el DNA no repetitivo está asociado a secuencias génicas mientras que el DNA repetitivo a secuencias no codificantes. La distribución entre secuencias repetidas y no repetidas en un

genoma varía dependiendo la complejidad del organismo y va de menos del 20% de secuencias repetidas en organismos unicelulares, hasta el 80% en plantas y animales (10).

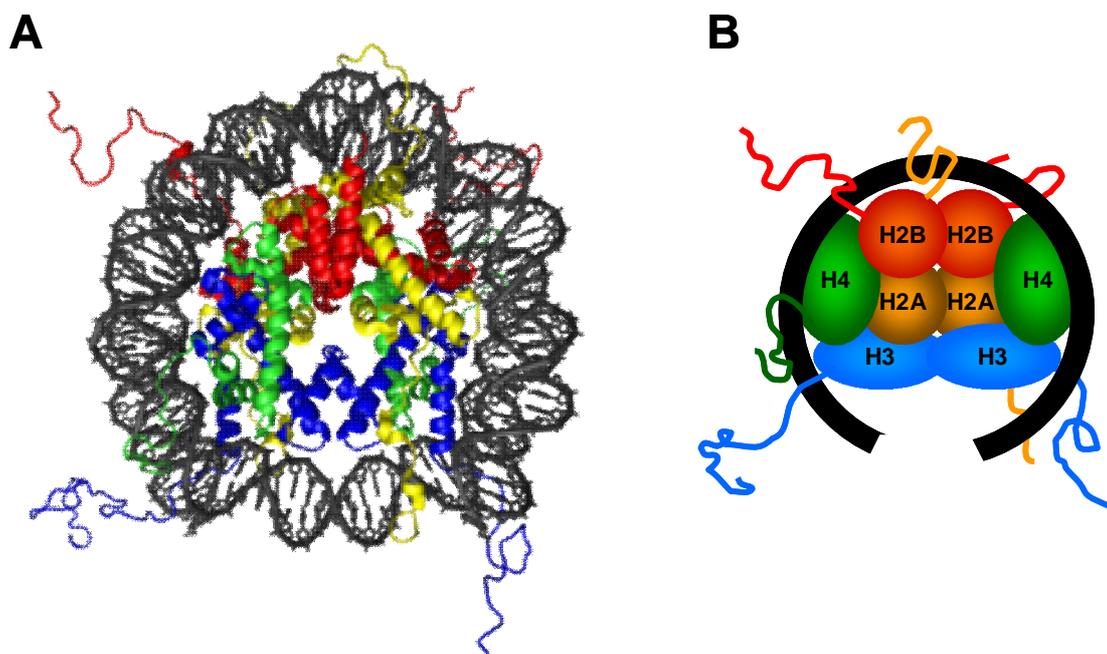
Asimismo, la proporcionalidad en la distribución de cada tipo de secuencia se encuentra involucrada tanto en la contención del genoma eucarionte dentro del núcleo celular en la formación de una molécula dinámica proteína-DNA, como en el procedimiento y regulación de la expresión del mismo; además de estar relacionada en la formación de estructuras y coordinación de dispositivos para el mantenimiento de la integridad del genoma eucarionte; procesos cuyos mecanismos no se han esclarecido totalmente y siguen bajo estudio por diversos grupos de investigación incluyendo al nuestro que se enfoca principalmente en los mecanismos de regulación, formación y mantenimiento estructural del dominio génico  $\alpha$  globina de pollo, entre otros temas.

### ***III Cromatina:***

Es casi imposible imaginar que un genoma eucarionte de millones de pares de bases, que en casos como el genoma humano que en su forma lineal mide hasta dos metros de longitud esté contenido en el núcleo de una célula de proporciones nanométricas. Cabe recordar que el DNA no se encuentra “desnudo” dentro del núcleo, sino que se asocia a un conjunto de proteínas especializadas que favorecen múltiples niveles de compactación que en su conjunto se conoce como cromatina. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma que se compone por un octámero de pequeñas proteínas básicas denominadas histonas a las cuales se asocian alrededor de 147 pb de

DNA por fuerzas electromagnéticas entre las cargas positivas de las histonas y las cargas negativas de los grupos fosfato expuestos del DNA (Figura 5) (11).

Se han descrito 5 tipos de histonas; H1, H2A, H2B, H3 y H4, a partir de su composición de aminoácidos. Las histonas que pertenecen a las últimas cuatro categorías poseen masas moleculares de entre 10 y 14 kDa y se conocen como histonas de núcleo debido a que el octámero del nucleosoma con el cual interactúa el DNA está formado por heterodímeros de dichas proteínas de la siguiente manera; un par de heterodímeros H3/H4 y un par H2A/H2B (Figura 5) (11-12).



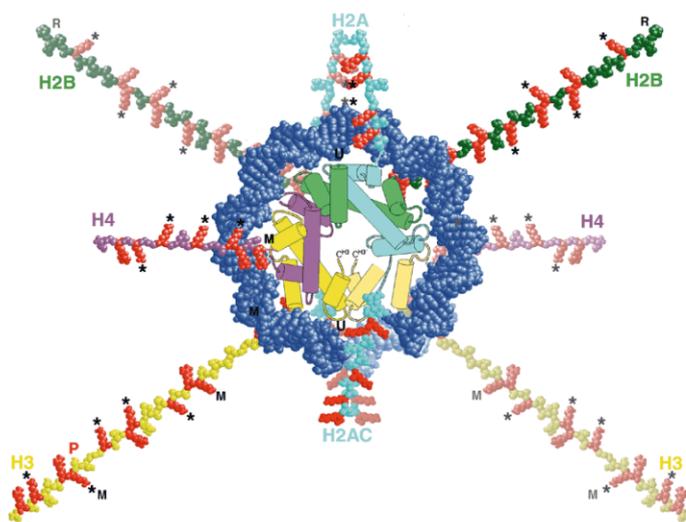
**Figura 5: Nucleosoma.** A) Modelo molecular de un nucleosoma a una escala de  $2.8\text{\AA}$  (*Nucleosome 1KX5 Colour coded.png*). B) Representación esquemática de la organización de las histonas en el octámero del nucleosoma rodeado por el DNA asociado (línea negra). Su formación consiste en primero el posicionamiento en el DNA de los dímeros de las histonas H3/H4 formando un tetrámero, al que le sigue la incorporación de los dos dímeros de histonas H2A/H2B formando así el octámero que conforma el núcleo del nucleosoma (11).

La presencia del juego completo de histonas del núcleo es necesaria para la viabilidad de la célula ya que poseen una relación estequiométrica equimolar entre ellas y sus secuencias están altamente conservadas a lo largo de la evolución, lo que refleja la necesidad del mantenimiento de la especificidad estérica de las interacciones con el DNA y su regulación. Dentro de los 4 tipos de histonas nucleares tres incluyen algunas variantes génicas o subtipos que presentan un pequeño cambio dentro de la secuencia de aminoácidos y por lo tanto presentan características particulares que afectan la interacción nucleosoma-DNA y consecuentemente están involucradas en diferentes funciones ya que su incorporación cambia la naturaleza de la cromatina. Por ejemplo, dentro de las histonas H3 podemos encontrar la variante centromérica CenpA que está implicada en la compactación y función de los centrómeros eucariontes, regiones que se asocian a diversas proteínas durante la división celular y son los responsables de una adecuada distribución de cromosomas a las células hijas.

Así mismo, podemos encontrar a la variante H3.3 la cual se asocia al ensamble de cromatina *de novo* posterior a la replicación del DNA y por lo tanto, también se observa su incorporación en los nucleosomas que se encuentran en regiones transcripcionalmente activas.

Las variantes de las histonas H2A son la familia más grande y diversa de histonas nucleares y se incluyen variantes como la histona H2A.X que está involucrada en la reparación del DNA; la histona H2A.Z que puede encontrarse en los sitios de inicio de transcripción o en regiones de frontera entre cromatina compacta y relajada o el caso de la histona macroH2A enriquecida en el cromosoma inactivo X (11-12).

Las histonas poseen regiones adicionales a los dominios globulares que sobresalen del nucleosoma y corresponden a los extremos amino-terminal. En dichos dominios las histonas presentan diversos aminoácidos específicos que son blancos de modificaciones post-traduccionales que incluyen metilación, acetilación, ubiquitinización, fosforilación, ADP-ribosilación, desamidación, isomerización de prolinas, entre otras, que modifican la interacción entre el DNA y el nucleosoma y cuyo patrón se correlaciona con una señal para una modificación en la función de la cromatina. A la combinatoria de dichas modificaciones se le denomina código de histonas (Figura 6) (11-12).

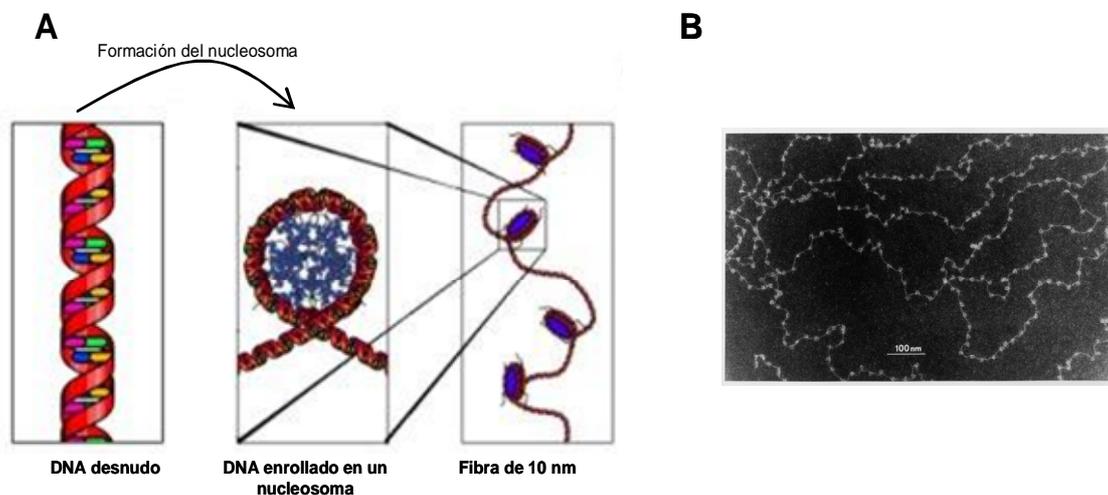


**Figura 6: Extremos amino terminal de las histonas.** En dichos dominios las histonas presentan diversos aminoácidos específicos que son blanco de modificaciones post-traduccionales :  
 Acetilación (\*),  
 metilación (M),  
 fosforilación (P),  
 ubiquitinización (U),  
 Ribosilación (R), entre otras. (13).

La función del código de histonas es proveer al polímero de DNA y nucleosomas la propiedad de ser una molécula dinámica al verse modulada la interacción nucleosoma-nucleosoma y nucleosoma-DNA; lo que le permite a la cromatina presentar diferentes niveles de condensación (Figura 9), que se resumen básicamente en una conformación “abierta” o “cerrada” denominadas “eucromatina” y “heterocromatina” respectivamente (Figura 10 A) (11).

- Jerarquía en la estructuración de la cromatina:

El nivel de menor condensación de la cromatina se refiere a una interfase desplegada en donde el DNA se encuentra periódicamente envuelto alrededor de unidades repetitivas de nucleosomas separadas por una porción de DNA de unión o inter-nucleosomal, que varía en longitud desde 40 pb hasta 60 pb formando una fibra de 10 nm de diámetro que por su aspecto al microscopio electrónico se denomina “collar de perlas” (Figura 7) (11). Tal estructura es la

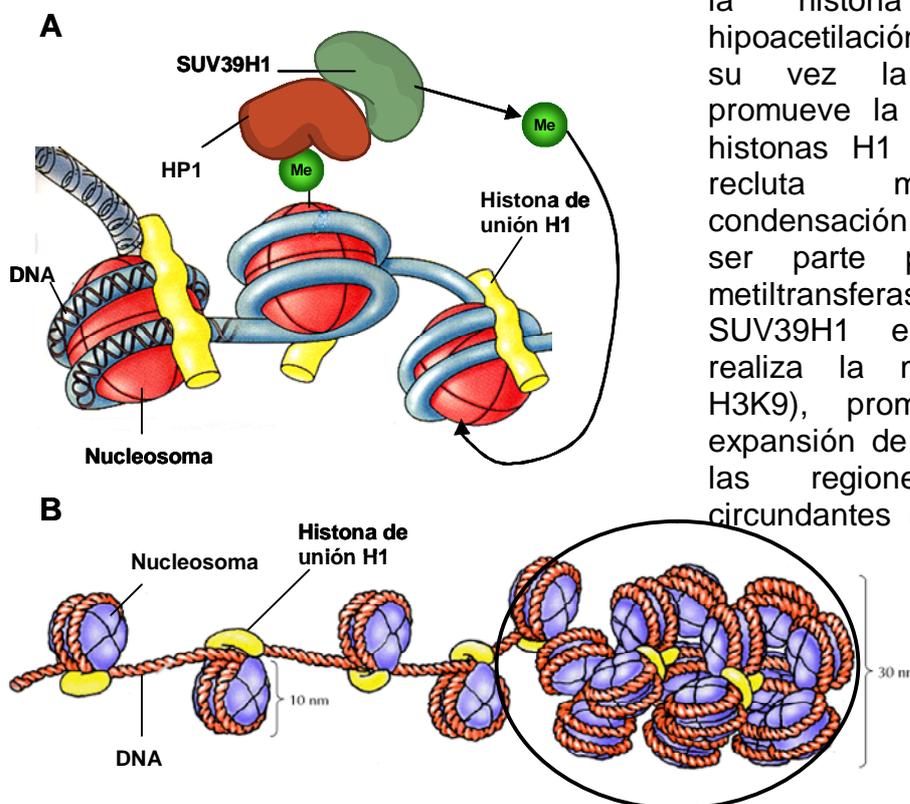


**Figura 7: Fibra de 10 nm o “collar de perlas”.** A) La fibra de 10 nm consiste en la interfase desplegada en la que el DNA se encuentra asociado periódicamente en unidades repetitivas de nucleosomas. B) Observación en microscopio electrónico de la fibra de 10 nm; por su apariencia se le denominó “collar de perlas” (14).

base a partir de la cual se suceden las configuraciones de mayor nivel de condensación que se presentan en diversas regiones del genoma dependiendo de la etapa de diferenciación y fase del ciclo celular mediante la alteración de las interacciones fisicoquímicas entre los nucleosomas y el DNA en donde participan modificaciones post-traduccionales de las histonas (efectos en *cis*), el reclutamiento de maquinarias de modulación de la cromatina y la interacción con algunos elementos del núcleo celular (efectos en *trans*) (Figura 9) (11).

Es así, que el siguiente nivel de condensación está definido por una estructura de 30 nm de diámetro conocida como “solenoide” que se forma al sobre enrollarse las fibras de 10 nm. En vertebrados, el proceso se caracteriza por modificaciones como la hipo-acetilación de histonas y la di- y tri-metilación de las lisinas 9 y 27 de la histona nuclear H3 (H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3), entre otras; además del reclutamiento de la proteína de heterocromatina 1 (HP1), que a su vez recluta diversas maquinarias de condensación de la cromatina; la incorporación de proteínas represivas del grupo Polycomb y la asociación de histonas de unión (H1) al nucleosoma, que a pesar de que se desconoce su función, se propone participan estabilizando las interacciones entre nucleosomas y DNA presentes en la formación de la fibra de 30 nm (Figuras 8 y 9) (15-16).

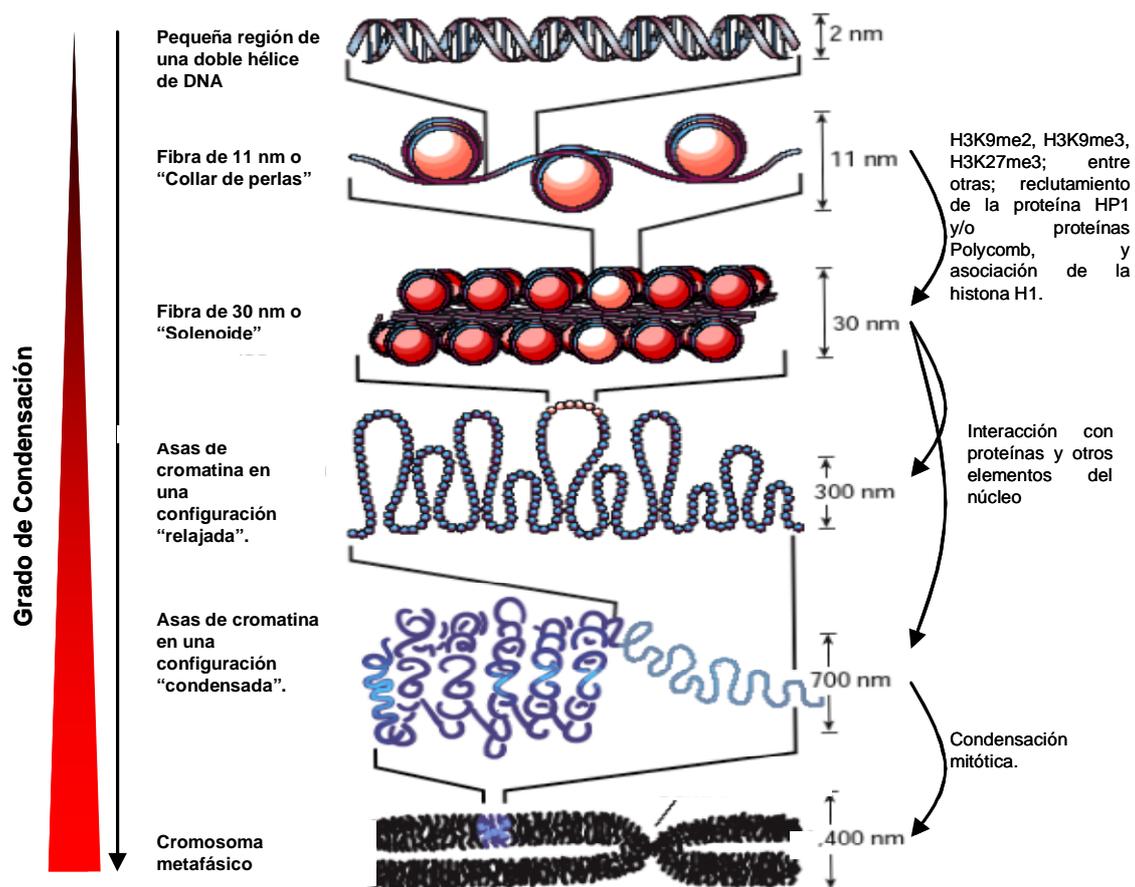
**Figura 8: Formación del “solenoide”**



A) La proteína HP1 es reclutada por la metilación de la lisina 9 de la histona H3 y la hipoacetilación de histonas. A su vez la proteína HP1 promueve la asociación de la histonas H1 al nucleosoma y recluta maquinaria de condensación (de la que puede ser parte por ejemplo, la metiltransferasa de histonas SUV39H1 en humano que realiza la metilación de la H3K9), promoviendo así la expansión de dichas señales a las regiones cromatínicas circundantes (17).

B) Esto provoca que la fibra de 10 nm se condense en una estructura compacta que forma una fibra de 30 nm de diámetro cuyas interacciones se cree son estabilizadas por la presencia de las histonas H1. (18)

Por otro lado, la cromatina interactúa con otros componentes nucleares como la lamina entre otros; jugando un papel importante en la organización y topología del genoma dentro del núcleo celular. Tales interacciones participan en la formación del siguiente nivel de condensación en donde la fibra de 30 nm forma asas de cromatina que se pueden llegar a observar al microscopio como fibras de 300 nm y 700 nm de diámetro (11) (Figura 9). Por último, los cromosomas metafásicos representan el mayor nivel de condensación del genoma, considerando al DNA aproximadamente 10 000 veces más condensado que en su estado “desnudo” y solo pueden observarse en etapas de mitosis y meiosis (Figura 9) (11, 15).



**Figura 9: Jerarquía en la estructuración de la cromatina.** El DNA se encuentra estructurado en una molécula dinámica finamente modulada lo que permite la presencia de diferentes niveles de condensación que van desde la fibra de 11 nm (“collar de perlas”), hasta el nivel de mayor condensación que es el cromosoma metafásico (19).

La identificación de todos los elementos que participan en la formación de cada nivel de condensación de la cromatina, la caracterización y descripción de cada proceso de ensamblaje y su regulación son cuestiones que se encuentran bajo un intenso estudio y análisis hasta hoy en día. Además, la observación de que en la etapa celular de interfase el genoma no se encuentra uniformemente distribuido en el núcleo celular, sino que existen regiones que contienen mayor concentración de DNA en las que predominan arreglos condensados como asas de cromatina y fibras de 30nm y zonas en las que se observa comúnmente la estructura de collar de perlas y una menor concentración del ácido desoxirribonucleico, ha llevado a la discusión, definición y estudio de los conceptos “eucromatina” y “heterocromatina” y su relación con el control de la expresión génica y el mantenimiento de la integridad genómica (11).

*- Eucromatina y Heterocromatina:*

La eucromatina o “cromatina activa”, consiste en una conformación que involucra la interacción entre ciertas maquinarias nucleares que al interactuar con la fibra de cromatina (nucleosomas-DNA), propician o permiten la expresión de regiones genómicas específicas por lo que en su mayor proporción se encuentra enriquecida de secuencias codificantes (menos del 4% del genoma), y se caracteriza por modificaciones post-traduccionales de histonas tales como la acetilación y metilación de la lisina 4 de la H3 en vertebrados entre otras, características de configuraciones de menor condensación de la cromatina. (Figura 10 A) (6,11-12,15-16).

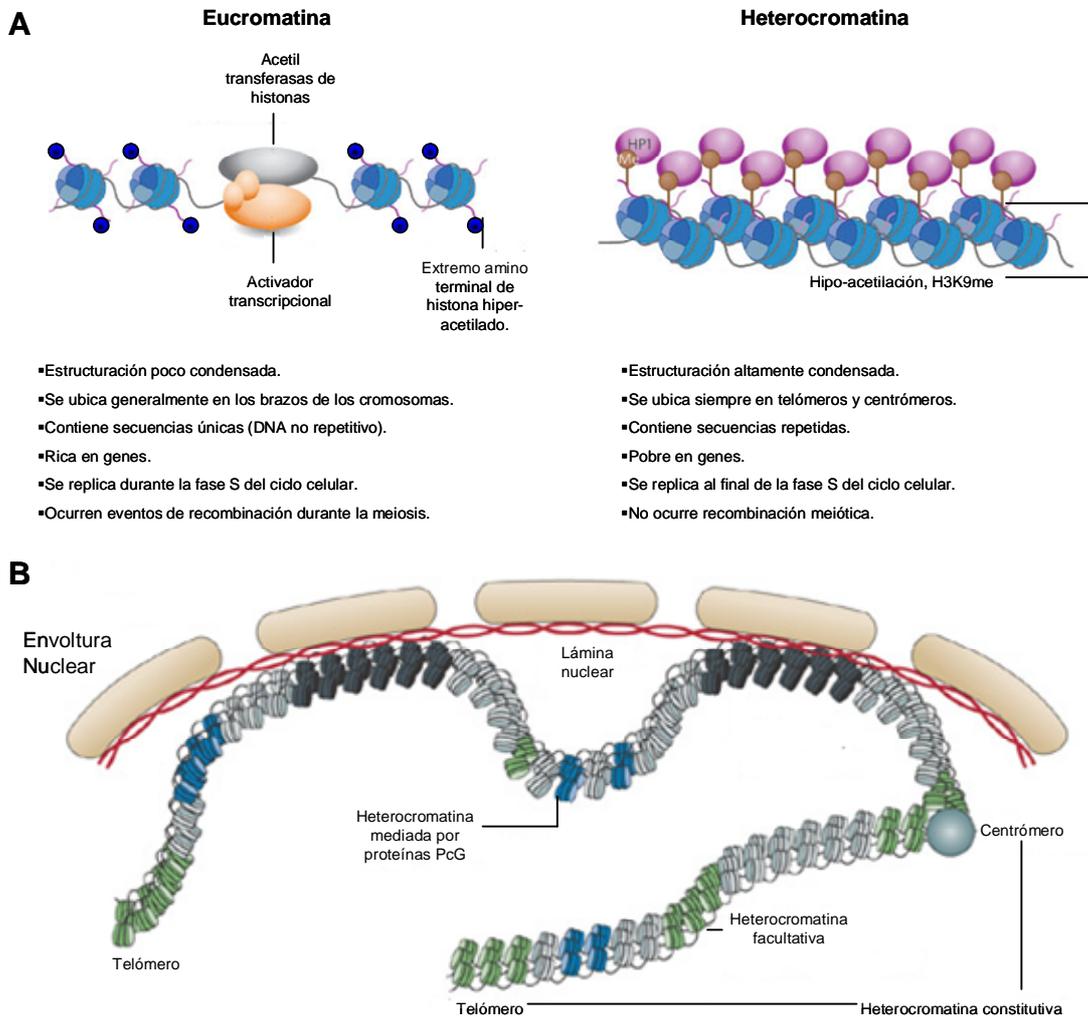
Por su parte, la heterocromatina o “cromatina silenciosa” se refiere a aquella porción de la cromatina que se encuentra en una conformación altamente

condensada y que molecularmente se caracteriza principalmente por la metilación del DNA en residuos de citosina, la presencia de HP1, así como por hipo-acetilación de histonas y la metilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 (Figura 10 A) (11-12,15-16). Inicialmente, se consideraba una conformación transcripcionalmente inactiva sin embargo, información reciente propone un cierto grado de transcripción requerido para el reclutamiento de maquinaria de estabilización de dicha conformación (20-21).

Además, se han definido dos subtipos de heterocromatina. Primeramente la heterocromatina constitutiva se refiere a aquella porción del genoma que se estructura en una conformación altamente condensada que se mantiene estable a través del ciclo celular. Dicha fracción genómica es rica en secuencias repetitivas que se encuentran en estructuras cromosómicas como centrómeros y telómeros. Así mismo, se sitúa en regiones genómicas que alojan transposones (secuencias presumiblemente de origen viral que poseen la capacidad de cambiar aleatoriamente su ubicación en el genoma a través de procesos de recombinación), para dificultar y prevenir su activación. Es por tanto, que la función principal de la heterocromatina constitutiva es la mantención de la estabilidad e integridad del genoma eucarionte (Figura 10 B) (11, 15).

Por otro lado, la heterocromatina facultativa es el subtipo que se forma en un ambiente “permisivo” en donde se requiere de la represión de la actividad transcripcional sobre ciertos genes y en el que proteínas de heterocromatina se utilizan para establecer y mantener dicha represión la cual, puede ser en algunos casos un evento reversible. Los ejemplos más estudiados de heterocromatina facultativa son la inactivación de un cromosoma sexual X en

organismos femeninos mamíferos y el silenciamiento específico de genes por proteínas del grupo Polycomb (Figura 10 B) (11).



**Figura 10: Eucromatina y heterocromatina.** A) Existen numerosas diferencias entre la eucromatina y la heterocromatina que se resumen en que la primera representa una estructuración “abierta” de la cromatina que facilita el acceso de factores nucleares (entre ellos factores de transcripción, la DNA polimerasa, etc), al DNA al exponer una mayor proporción de secuencias; por el contrario, la segunda corresponde a un estado “cerrado” o represivo de la cromatina en el que se expone una menor cantidad de DNA y por lo tanto dificulta el acceso a dichas secuencias, siendo así parte importante del control y mantenimiento del genoma eucarionte como se discutirá más adelante (23). B) Localización de heterocromatina facultativa y constitutiva. Se puede observar las regiones cromosomales en las que se puede encontrar la heterocromatina constitutiva y facultativa (verde), así como también un subtipo de la heterocromatina facultativa que es mediada por proteínas del grupo Polycomb (azul) (15).

Quizás la principal característica de la cromatina es la dinámica entre un estado condensado y el relajado lo que da lugar no solo a la contención del genoma eucarionte en el núcleo celular sino que también participa en la regulación de procesos tan importantes y vitales para la célula como la duplicación del DNA, la transcripción y reparación del genoma al variar la accesibilidad y localización nuclear del mismo (22). Es así, que podemos observar que el genoma eucarionte está compartimentalizado en regiones que se encuentran en una conformación “relajada” y otras que se estructuran en una conformación altamente condensada, es decir, en dominios cromatínicos.

*- Dominios Cromatínicos y Elementos Barrera:*

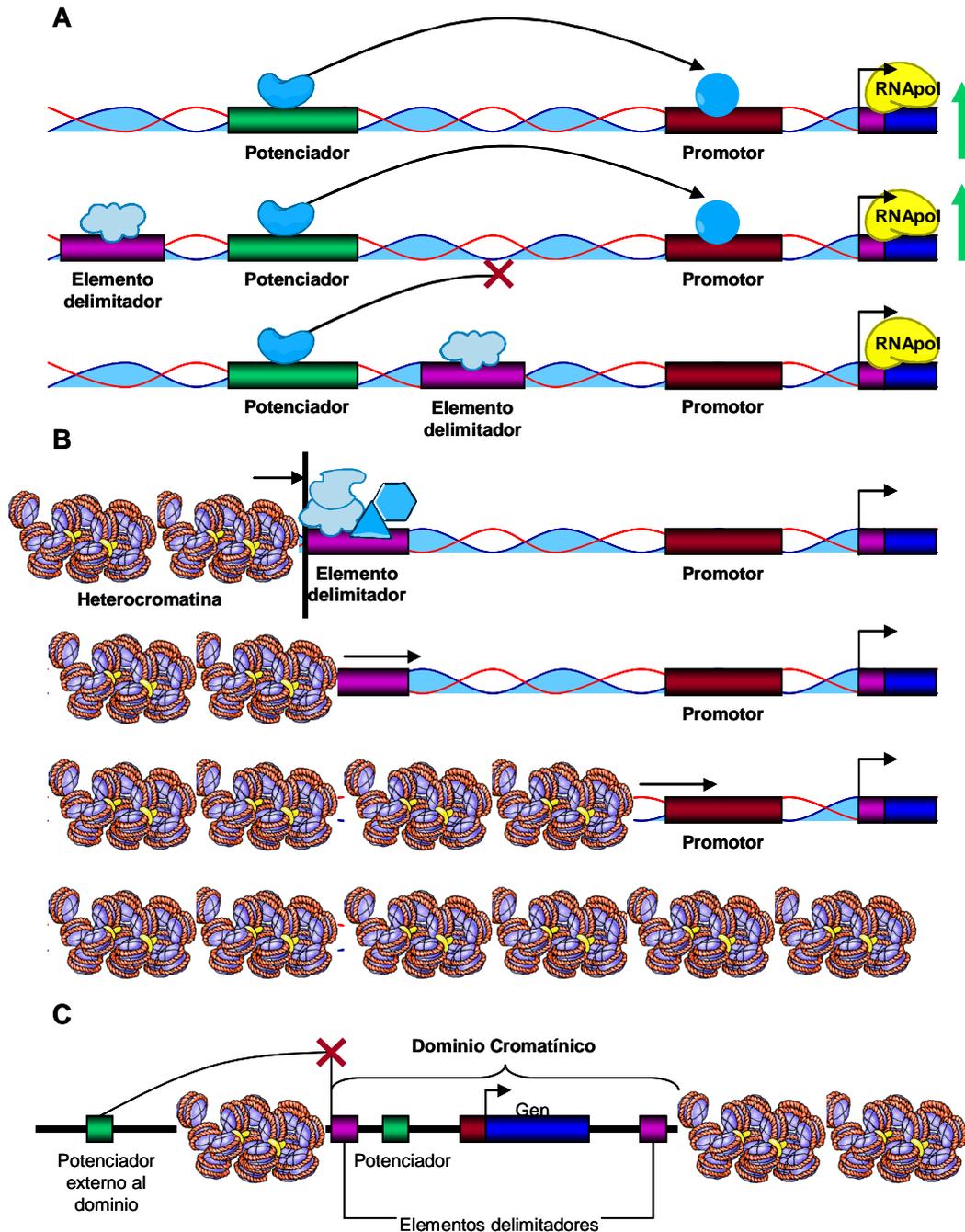
Un “dominio cromatínico” se puede definir como una región genómica cuyo estado de condensación y regulación es independiente de las regiones que la enmarcan. Un dominio de cromatina puede incluir uno o varios genes cuyo patrón de expresión dependerá de la estructura específica de dicho dominio, así como de su regulación (Figura 11 C) (22, 24).

Los límites de un dominio cromatínico están definidos por secuencias especializadas de DNA conocidas como elementos barrera, delimitadores o “insulators” que al interactuar con factores proteicos específicos protegen una región genómica de señales promiscuas provenientes del contexto genómico circundante o contienen las señales de los elementos de regulación que se encuentran dentro del dominio, contribuyendo así a la regulación de la expresión de los genes incluidos y a la organización global del genoma, características que se transmiten de una generación a otra (Figura 11 C) (24, 25, 26).

Un elemento delimitador se define por dos propiedades funcionales: la primera radica en interrumpir o bloquear la comunicación entre un elemento potenciador y el promotor que regula cuando el “insulator” se encuentra entre ambos elementos (Figura 11 A), y la segunda implica la contención contra la expansión de heterocromatina evitando el silenciamiento por este mecanismo de una región adyacente (Figura 11 B) (24-27).

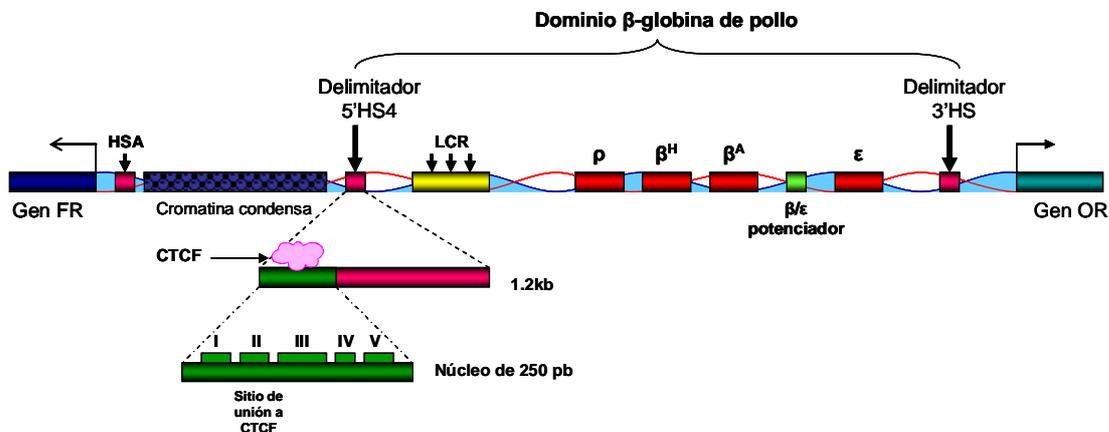
Algunos delimitadores solo presentan una de las dos propiedades que los definen, otros poseen ambas actividades como el elemento 5'HS4 del dominio  $\beta$ -globina de pollo, la primera secuencia barrera reportada en vertebrados y que sentó las bases para entender la localización de elementos “insulator” así como su función (Figura 12) (27).

Dicho elemento que consta de aproximadamente 250 pb es capaz de proteger contra efectos de posición, característica que se demostró tanto en líneas celulares de mamíferos así como en *Drosophila* y por otro lado, también se comprobó que posee la habilidad de bloqueo de potenciador en ensayos donde se colocaba entre el “enhancer” y un promotor (27) . El elemento se sitúa en el extremo 5' del dominio  $\beta$ -globina de pollo río debajo de una secuencia de 16 kb de heterocromatina del gen de receptor de folato, otro gen eritroide específico que se expresa en una etapa más temprana de la diferenciación al de los genes globina para ser posteriormente silenciado por heterocromatina (Figura 12) (Datos no publicados, González Buendía Edgar Fernán). Por lo tanto, el “insulator” constituye el borde de protección contra la expansión del estado compacto de la cromatina y señales del ambiente genómico circundante permitiendo la expresión regulada de los genes  $\beta$ -globina (Figura 12) (26-28).



**Figura 11: Delimitadores y dominios cromatínicos.** A) Bloqueo de potenciador. Únicamente ocurre cuando el elemento delimitador (rosa), se encuentra entre un potenciador (verde), y su promotor objetivo (rojo), suprimiendo así el efecto de trans-activación (flechas verdes). Se observa la asociación de la RNAPol (amarillo) y de factores nucleares a sus secuencias de reconocimiento (figuras en azul). B) Barrera. La asociación de diversos factores (figuras en azul), al elemento delimitador (rosa), generan un equilibrio entre los procesos de propagación de la heterocromatina y los procesos de apertura de la cromatina generando así un límite entre ambos estadios y evitar el silenciamiento por heterocromatinización de la región adyacente de eucromatina. C) Ambas características de las secuencias barrera permiten la existencia de regiones cuyo ambiente cromatínico es independiente de sus regiones adyacentes y en los que señales de otras regiones similares no tienen influencia. A dichas regiones se les denomina dominio cromatínico.

En *Drosophila melanogaster* se han caracterizado un número importante de secuencias tipo “insulador” definidas por los factores que se asocian a ellas, como son: la proteína supresora de alas velludas (“*Suppressor of Hairy Wing*” [Su(Hw)]); los factores asociados a elementos frontera (“*Boundary Element Associated Factors*” [BEAF-32<sup>a</sup> y BEAF-32B]); “*Zeste-white 5*” (Zw5); el factor de unión a GAGA (“*GAGA Binding Factor*” [GAF]), y el homólogo en *Drosophila* de CTCF (dCTCF). Por el contrario, en vertebrados la única proteína conocida hasta ahora es el factor nuclear CTCF (29).



**Figura 12: El elemento delimitador 5'HS4.** Se encuentra localizado en una hipersensibilidad constitutiva (HS4), de 1.2 kb de longitud que representa el límite 5' del dominio  $\beta$ -globina de pollo; río arriba de él se encuentra una región de 16 kb de longitud de cromatina condensada ubicada río abajo del gen del receptor de folatos (FR). El núcleo del delimitador 5'HS4 consta de 250 pb y posee las propiedades de bloqueo de potenciador y de barrera contra la expansión de heterocromatina o cromatina condensada. Mediante un análisis de dicho elemento, se ha demostrado que la asociación del factor nuclear CTCF al sitio FII es necesaria y suficiente para la actividad de bloqueo de potenciador; mientras que por otro lado, se requiere de la asociación de otros factores nucleares (sin definir todavía), a las otras cuatro regiones (FI, FIII, FIV y FV), las cuales interactúan entre sí para proveer al elemento de la actividad de barrera en la cual no participa la asociación de CTCF (27-28).

- *El factor multifuncional CTCF:*

CTCF se ha considerado como una proteína importante en secuencias tipo delimitador de vertebrados debido a que diversos grupos de investigación han

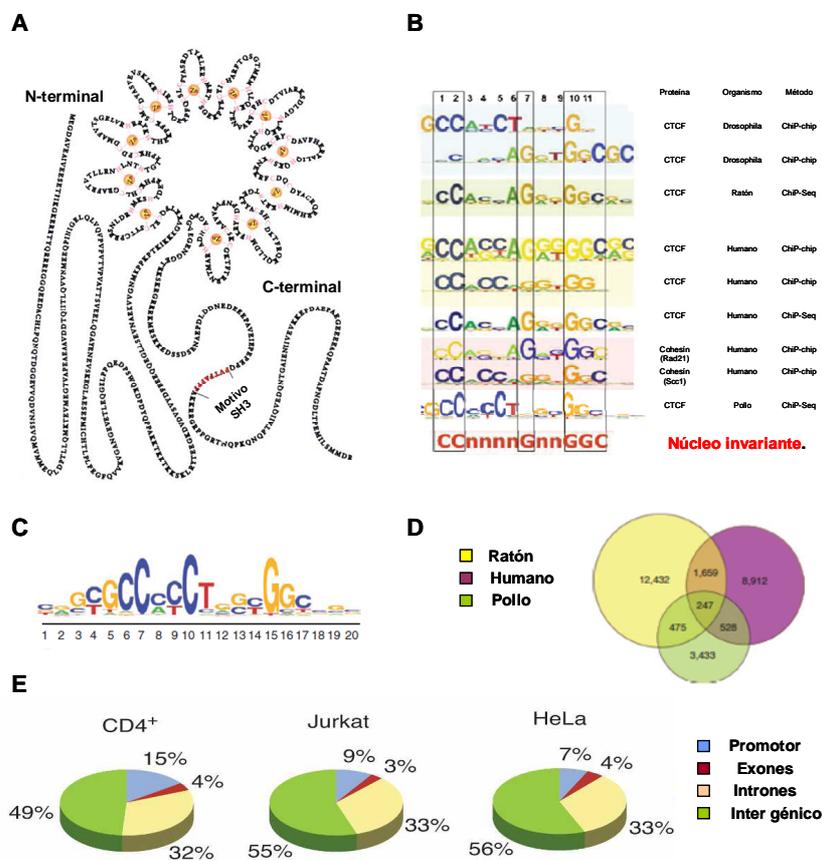
reportado diversas secuencias de DNA conservadas a las que se une CTCF que presentan actividad de bloqueo de potenciador y cuya actividad es dependiente de dicha asociación (29). Así mismo, aunque se ha observado que CTCF tiene la capacidad de crear límites entre marcas activas y represivas de cromatina, muy posiblemente en cooperación con remodeladores de esta; la actividad de contención contra heterocromatina no se encuentra asociada directamente al factor nuclear ya que en algunas secuencias que presentan dicha característica no se observa una dependencia a la unión de CTCF (27, 30-31).

El factor nuclear CTCF es una proteína nuclear que contiene un dominio central de unión a DNA compuesto por once dedos de zinc que presenta una homología al 100% entre los CTCF de ratón, pollo y humano; solo presentando algunas divergencias en las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal (29). Dicho dominio le confiere la capacidad de unirse a diferentes secuencias en el DNA y asociarse a otras proteínas co-reguladoras dependiendo de las diferentes combinatorias de dedos de zinc que puede utilizar, lo que representa la mayor dificultad para establecer una secuencia consenso de reconocimiento en el DNA (Figura 13 A y D) (29-30).

A pesar de las divergencias entre las secuencias consenso definidas por diversas técnicas, se ha establecido que el factor nuclear CTCF presenta una secuencia central de unión a DNA de alrededor de 11 y 15 pares de bases altamente conservada en la mayoría de los tipos celulares, en las que participan de 4 a 6 dedos de zinc (Figura 13 B y C), y dicha relación esta estabilizada por la interacción del resto de los dedos de zinc con otros nucleótidos que enmarcan el núcleo de la secuencia consenso y/o por la

interacción con otras proteínas (29). La especificidad de CTCF por su sitio de unión depende tanto de la combinatoria de los dedos de zinc, como de la secuencia primaria del sitio blanco de CTCF (CTS por sus siglas en inglés), así como de su contexto genómico (30).

Análisis *in vivo* han reportado alrededor de 20,000 CTS en linfocitos inactivos CD4+, aproximadamente 13,000 CTS en fibroblastos humanos IMR90 (29), y cerca de 40,000 sitios blanco de CTCF en células troncales de ratón (30).



**Figura 13: CTCF.** A) Representación esquemática de CTCF. Se puede observar el dominio de unión a DNA de 11 dedos de zinc y el motivo SH3 que en general es donde ocurren las modificaciones post-traduccionales que permiten su interacción con otras proteínas (20). B) Ejemplos característicos de motivos de reconocimiento de CTCF “consenso”. Los nucleótidos conservados entre los organismos se encuentran enmarcados y forman el núcleo invariante del motivo consenso de asociación a CTCF (“n” implica cualquier nucleótido) (30). C) Secuencia consenso de asociación a CTCF en *Gallus gallus* (31). D) Diagrama de Venn de conservación de sitios de asociación a CTCF inter-especies (31). E) Distribución de sitios de unión de CTCF obtenido por un análisis *in vivo* en dichas células (32).

En conjunto los análisis bioinformáticos de todo el genoma de diferentes células de vertebrados muestran que los sitios de unión a DNA de CTCF se encuentran en un 46% en regiones íter-génicas, 20% en regiones promotoras, 12% en exones y 22% en intrones (Figura 13 E) (30).

Tal información así como otras evidencias indican que la proteína está implicada en diversos papeles en la regulación génica como son la activación o represión transcripcional, el bloqueo de potenciador y/o actividad de contención contra heterocromatina, silenciamiento de genes sensible a ciertas hormonas, impronta genómica, interacciones cromatínicas a larga escala (29), el mantenimiento de dominios génicos y el establecimiento de la arquitectura del genoma dentro del núcleo lo que define la múltiple funcionalidad de CTCF.

Varios factores nucleares y proteínas se han reportado como potenciales “socios” o compañeros de CTCF, sin embargo, se desconoce si dichas interacciones ocurren a nivel global o son específicas del *locus* debido a las diversas funciones y sitios de unión de CTCF. Entre ellas se encuentran desde proteínas implicadas en la transcripción como la RNAPol II (RNA polimerasa II); factores de regulación transcripcional como Kaiso, Oct4 y YB1 entre otras; proteínas constitutivas de cromatina como la helicasa CHD8 (“SNF2-like chromodomain helicase proteína”), y la proteína Suz12 que pertenece a un complejo proteico tipo Polycomb; proteínas de integridad genómica como la Poli-ADP ribosil polimerasa 1 (PARP-1); hasta proteínas implicadas en la arquitectura nuclear como la nucleofosmina y cohesinas (30, 33).

La participación del factor nuclear CTCF al jugar un importante papel en el establecimiento y mantenimiento de la organización del genoma eucarionte, está altamente regulada y responde a señales provenientes del medio

ambiente y de los diferentes contextos genómicos por lo que los sitios de unión *in vivo* en el genoma, así como otras interacciones mediadas por CTCF pueden diferir dependiendo el tipo y el contexto celular (nivel de diferenciación, etapa de desarrollo, estado de estrés, etc.) (29).

La actividad de CTCF está regulada por diversos mecanismos, el mejor caracterizado es la metilación del DNA en las citocinas de dinucleótidos CpG localizados en los alrededores o en el núcleo del sitio de unión, la cual impide la interacción entre el ácido nucleico y la proteína (29). Las modificaciones post-traduccionales de CTCF como son la fosforilación o la poli(ADP-ribos)ilación son otros mecanismos que intervienen en la función del factor nuclear al alterar sus interacciones con otros factores proteicos, así mismo, otros factores nucleares pueden regular las funciones de CTCF ya sea interactuando con dicho factor o con su sitio de unión a DNA o sitios aledaños y por último, el contexto cromatínico de los sitios de unión es también un medio de regulación de la función de CTCF entre otros (30).

Por todas sus características y primordialmente su asociación a la función de los elementos delimitadores en vertebrados, el factor nuclear CTCF es una de las proteínas que se analizan concurrentemente en estudios enfocados al esclarecimiento de los procesos involucrados en la modificación y establecimiento de estructuras de cromatina.

Todavía se desconocen todos los factores y señales que participan en los procesos relacionados con la cromatina que concluyen en la regulación de la expresión y organización del genoma eucarionte según las necesidades celulares como se ha descrito en este capítulo, lo cual lo instituye como uno de los temas más complejos y vastos de la investigación de frontera (22).

La alternativa experimental propuesta en el presente trabajo representa una versátil y útil estrategia para el análisis de diversos factores nucleares (incluido CTCF), además del estudio de las características y funciones de los elementos delimitadores (entre otros elementos de regulación) (24), que influyen en la modificación de la dinámica molécula de cromatina para la formación y mantenimiento de estructuras específicas conocidas como dominios cromatínicos, procesos y mecanismos incluidos dentro de la compleja red de procesos y señales que forman parte de la regulación transcripcional.

#### ***IV Transcripción y regulación transcripcional:***

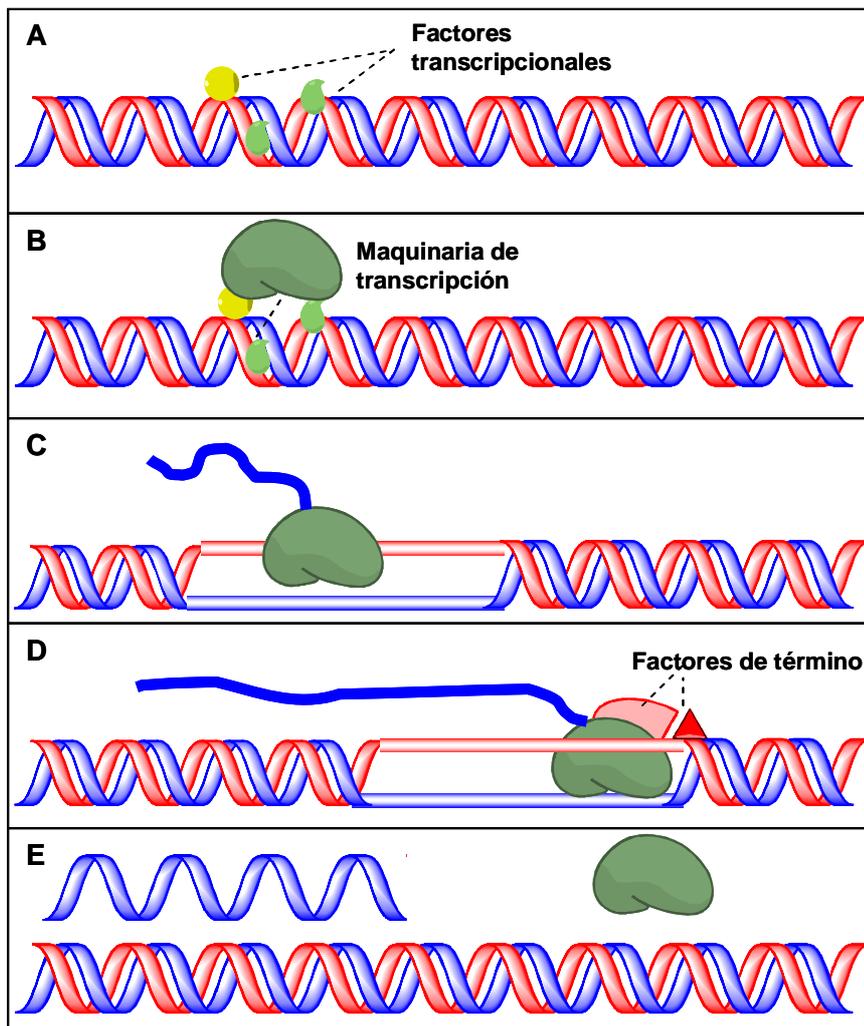
Todos los procesos metabólicos están regidos y mediados por diversas enzimas las cuales están codificadas en el DNA, por lo tanto, se requiere de la interpretación y ejecución de dicha información lo cual ocurre a través de los procesos de transcripción y traducción.

La transcripción es el primer paso en la expresión de un genoma y se puede definir brevemente como el proceso enzimático que se lleva a cabo para obtener una molécula de RNA utilizando como templado una molécula de DNA. La secuencia del RNA obtenido es complementaria a la secuencia de una de las cadenas del DNA utilizada como molde (Figura 14).

La transcripción es un proceso selectivo y regulado en el que solo se permite que se generen RNAs en cantidad suficiente para ejercer las funciones requeridas en un momento de la vida del organismo y en un tejido en particular (3). De esta manera, la regulación de la expresión génica puede ocurrir de manera inducible activando la expresión de un gen o incrementando la cantidad del producto, o represivamente disminuyendo la producción o evitando la

expresión de un gen, lo que ocurre en base a una compleja y sofisticada red de vías de transducción de señales (34).

La transcripción se puede resumir en las siguientes fases: Establecimiento de una estructura cromatínica permisiva para la transcripción; identificación del promotor; acoplamiento de la maquinaria de transcripción; inicio de la transcripción; alargamiento o elongación del RNA y fin de la transcripción.



**Figura 14: Transcripción.** A) Unión de factores de transcripción al promotor. B) Reclutamiento de la maquinaria de transcripción. C) Elongación. Las helicazas del complejo transcripcional desestabilizan la doble hélice de DNA y permiten la movilidad de la RNAPol quien va sintetizando una cadena de RNA. D) Asociación de factores de término de la transcripción. E) Disociación de la maquinaria de transcripción, finalización de la transcripción y liberación del transcrito primario para su procesamiento. El transcrito primario es complementario en secuencia a una de las cadenas de DNA utilizada como molde (cadena roja).

*- Establecimiento de una estructura cromatínica permisiva para la transcripción:*

Para que pueda ocurrir la transcripción es requerido contar con una conformación de la cromatina la cual permita la exposición y accesibilidad de secuencias de DNA que son reconocidas por los diversos factores proteicos, la comunicación entre elementos de regulación, el ensamblaje de la maquinaria de transcripción y los demás procesos involucrados en la síntesis del ácido ribonucleico producto. Es por tanto que se considera como el primer nivel de regulación transcripcional a aquellos procesos que se encuentran involucrados en el establecimiento y modificación de la conformación de la cromatina (35).

La primera vía de alteración de la cromatina está dada por la modificación post-traducciona de las histonas, como se ha mencionado anteriormente. Por ejemplo; la acetilación de histonas (como la acH3 y acH4), o la metilación de algunos residuos específicos (como las lisinas 4 y 79 de la H3), son modificaciones que generalmente se asocian a eucromatina y la activación de la transcripción (11, 36); mientras que aquellas modificaciones características de heterocromatina como la metilación de la lisina 9 de H3 (H3K9me) y la desacetilación de histonas se coligan al silenciamiento transcripcional, además de alteraciones como la metilación del DNA. También, las modificaciones post-traduccionales de las histonas participan en la regulación transcripcional como señales de reclutamiento para los demás mecanismos involucrados en la alteración de la conformación de la cromatina (Figura 15).

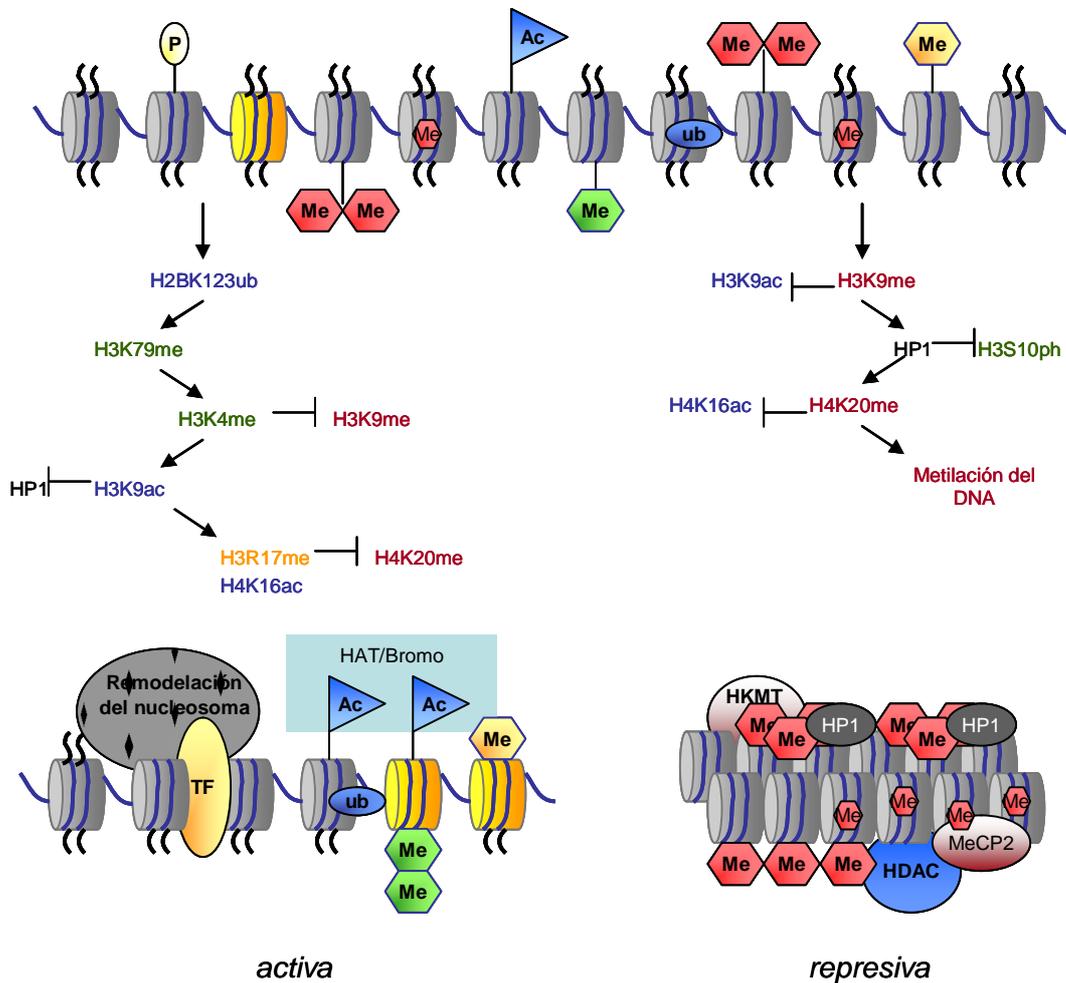
La segunda vía de alteración de la cromatina ocurre por el desplazamiento mecánico de nucleosomas o la sustitución por variantes de histonas mediadas por complejos proteicos que aprovechan la energía proveniente de la hidrólisis de ATP conocidos como complejos remodeladores de cromatina dependientes

de ATP. Tales complejos están catalogados en dos familias: la familia SNF2H/ISWI que participa en la movilización mecánica de nucleosomas a lo largo de la cadena de DNA y la familia Brahma/SWI/SNF que altera la estructura de la cromatina transitoriamente exponiendo contactos entre el DNA y el nucleosoma que generalmente se encuentran ocultos (Figura 15) (11).

Por otro lado, la tercera vía de alteración de la conformación de la cromatina implica a las 2 vías previamente descritas, pero con ocurrencia en regiones genómicas específicas y está mediada por proteínas de los grupos proteicos Polycomb (PcG), y Trithorax (TrxG), que son proteínas originalmente detalladas en *Drosophila melanogaster* cuya función es la transducción de señales y que forman parte de diversos complejos (que en ocasiones incluyen tanto proteínas de remodelación y/o proteínas de modificación de histonas como acetil transferasas o des-acetilasas de histonas entre otras), que son utilizados en establecer estructuras cromatínicas estables dentro de la regulación de la expresión de genes específicos durante el desarrollo de un organismo. Las proteínas de dichos grupos funcionan en su mayor parte de manera antagónica; aquellas que pertenecen al grupo PcG generalmente mantienen estable y de manera hereditaria la represión de varios genes; mientras que aquellas que pertenecen al grupo TrxG mantienen un estado activo (conformación permisiva), para la expresión de sus genes blanco y previenen su silenciamiento (11, 15).

Los tres procesos descritos coordinados por diversas señales entre las que participan los elementos de regulación en el DNA y la transcripción de ciertos ácidos ribonucleicos no codificantes entre otras, colaboran en la formación de

los dominios cromatínicos y en la regulación de su configuración cromatínica interna en donde se regula la expresión de los genes contenidos. (37).



**Figura 15: Modificación coordinada de la cromatina.** Transición de la cromatina a un estado activo eucromático (izquierda) o al establecimiento de un estado represivo o heterocromático. Se puede observar que la primera vía de modificación de la cromatina en ambos casos corresponde a la modificación postraducciona de histonas las cuales, también fungen como señales para otras modificaciones y el reclutamiento de otros complejos de modificación de la cromatina. En el caso de la activación transcripcional, se muestra la participación de los complejos de remodelación dependientes de ATP, la presencia y actividad de las acetilasas de histonas (HAT), el reclutamiento de factores de transcripción (TF), así como el remplazo de histonas convencionales con alguna variante correspondiente (nucleosomas amarillos en el caso de regiones transcripcionalmente activas se encuentra comunmente a la variante de histona H3.3).

En el caso de la inhibición transcripcional a nivel de cromatina, se observa la presencia y actividad de las deacetilasas de histonas (HDAC), de las metiltransferas de histonas (HKMT), así como la presencia de la proteína de heterocromatina 1 (HP1), y la metilación del DNA por la citosina metiltransferasa MeCP2.

Algunas de las modificaciones observadas pueden estar mediadas también por complejos proteicos de los grupos PcG y TrxG en regiones genómicas específicas en respuesta a otras señales no mostradas en la figura (11).

*- Identificación del promotor, acoplamiento de la maquinaria de transcripción e inicio de la transcripción:*

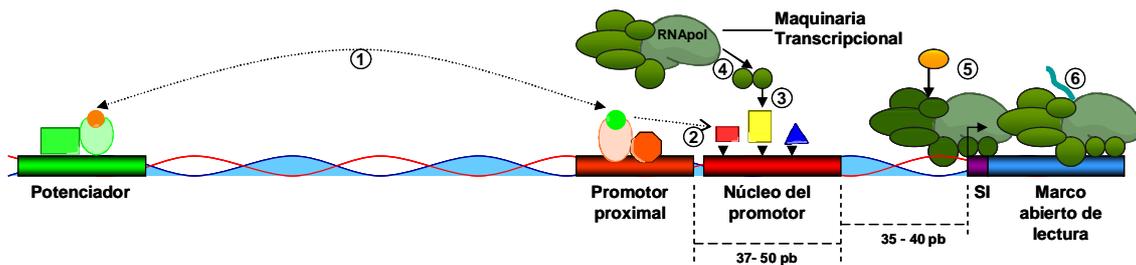
Un promotor se define como una secuencia específica de DNA que posee dentro de su secuencia motivos únicos que permiten la asociación de diversos factores proteicos que facilitan el acoplamiento de la maquinaria de transcripción; puede dividirse en el núcleo del promotor y el promotor proximal. El promotor proximal usualmente se encuentra inmediatamente entre 37 pb y 50 pb río arriba del núcleo del promotor y consiste de un conjunto de sitios de unión a factores de transcripción específicos que pueden permitir la interacción de dicho elemento con elementos de regulación dístales y por si mismo participa débilmente en la activación de la transcripción (Figura 16) (35).

El núcleo del promotor comúnmente se encuentra ubicado entre 35 pb y 40 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y está constituido de sitios de reconocimiento para factores que participan en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción y de su posicionamiento para el inicio de la misma (Figura 16) (35). En un marco muy general, en eucariontes el acoplamiento del complejo transcripcional inicia con la asociación de diversos factores al promotor. Esto permite el reclutamiento del complejo catalítico que incluye a la RNA polimerasa (RNAPol) quien es la proteína que se encarga de la síntesis del RNA producto.

En eucariontes existen 3 tipos de polimerasas de RNA: la RNAPol I se asocia principalmente a la transcripción de RNA ribosomal; la RNAPol II se asocia a la transcripción de la mayoría de los transcritos codificantes y otros tipos de RNA especializado y por último las RNAPol III se involucra en la transcripción de

RNA de transferencia así como de otros RNA no-codificantes con funciones variadas e incluso desconocidas (2).

Finalmente se pueden asociar factores de iniciación de la transcripción que estabilizan el complejo transcripcional y permiten iniciar con el proceso del RNA producto.



**Figura 16: Identificación del promotor, acoplamiento de la maquinaria de transcripción e inicio de la transcripción.** 1) Se unen factores nucleares específicos en el promotor proximal (naranja), y en el potenciador (verde), permitiendo la interacción entre ambos. La ausencia de un promotor proximal implica que no existe interacción entre el promotor y un potenciador. 2) Dicha interacción, permite modificaciones en la estructura cromatínica del núcleo del promotor (rojo), y promueve señales que facilitan el reclutamiento de factores de transcripción (Figuras multicolor). 3) La interacción de dichos factores con sus secuencias en el DNA del promotor son señal para atraer otros factores de transcripción que son parte de la misma maquinaria transcripcional. 4) Éstos últimos reclutan a los demás componentes de la maquinaria de transcripción y promueven su ensamblaje y estabilidad para su transporte al sitio de inicio de la transcripción (SI). 5) Una vez que se ubica la maquinaria transcripcional en el sitio de inicio de transcripción se unen también factores de inicio (ovoide amarillo), que aumentan la estabilidad de la interacción entre el DNA y el complejo de transcripción. 6) Tales eventos concluyen en el inicio de la síntesis del transcrito primario mientras el complejo transcripcional se desliza sobre el DNA. Los factores transcripcionales, los componentes del complejo transcripcional y el tipo de RNAPol varían dependiendo de la función del gen (2).

*- Elementos de regulación y la dinámica nuclear.*

Dentro de la compleja y sofisticada red de transducción de señales que regula la transcripción, se encuentra involucrada una enmarañada combinatoria de diversas secuencias especializadas de DNA conocidas como elementos de regulación que actúan como sitios de reconocimiento para diversos factores

nucleares y que pueden conllevar a la modificación de la cromatina o alterar al ensamblaje de la maquinaria de transcripción, lo que consecuentemente afecta la eficiencia de la misma. Algunos elementos pueden encontrarse en las vecindades del gen o pueden localizarse en regiones genómicas distantes participando de manera remota (35, 38-39).

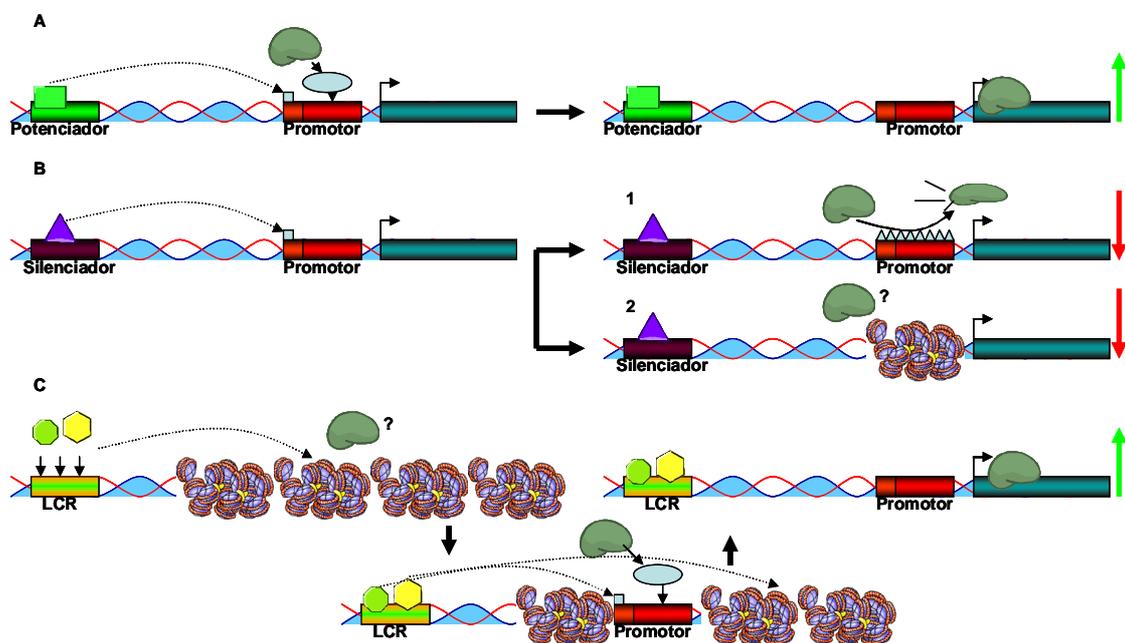
Dentro de los elementos de regulación definidos hasta el momento podemos encontrar potenciadores, silenciadores, regiones de control de locus y los elementos delimitadores (descritos previamente).

Los potenciadores son secuencias de DNA a las que se unen diferentes combinatorias de factores de activación específicos que al interactuar o comunicarse con el promotor de su gen blanco, facilitan el acoplamiento de la maquinaria de transcripción generando un aumento en la tasa transcripcional permitiendo la producción de mayor cantidad de transcrito. En dicho contexto, la presencia de un promotor proximal es necesaria para la interacción de un promotor con un potenciador distante (Figuras 16 y 17 A) (38).

Por el contrario, los silenciadores son elementos de regulación de DNA que incluyen combinatorias de diferentes secuencias de unión a factores proteicos que disminuyen la actividad transcripcional de su gen blanco, dificultando o impidiendo el acoplamiento de la maquinaria de transcripción o promoviendo su silenciamiento modificando el contexto cromatínico (Figura 17 B) (38).

Una región de control de *locus* (LCR), se define como un conjunto de elementos de regulación que por si mismo es suficiente para activar y potenciar la transcripción de un gen o grupo de genes asociados de manera temporal o tejido específico y dependiente del número de copias de transcrito, modulando la estructura de la cromatina mediante el establecimiento de dominios de

modificaciones post-traduccionales de histonas y la desmetilación del DNA, así como promoviendo el acoplamiento de la maquinaria de transcripción al promotor de su gen blanco. Además, se caracteriza por la habilidad de incrementar los niveles de RNA producto de un transgén a un grado equivalente de su contraparte endógena, sin importar el contexto genómico en el que se hubiese integrado éste y la posición del LCR con respecto al gen (Figura 17 C) (37).

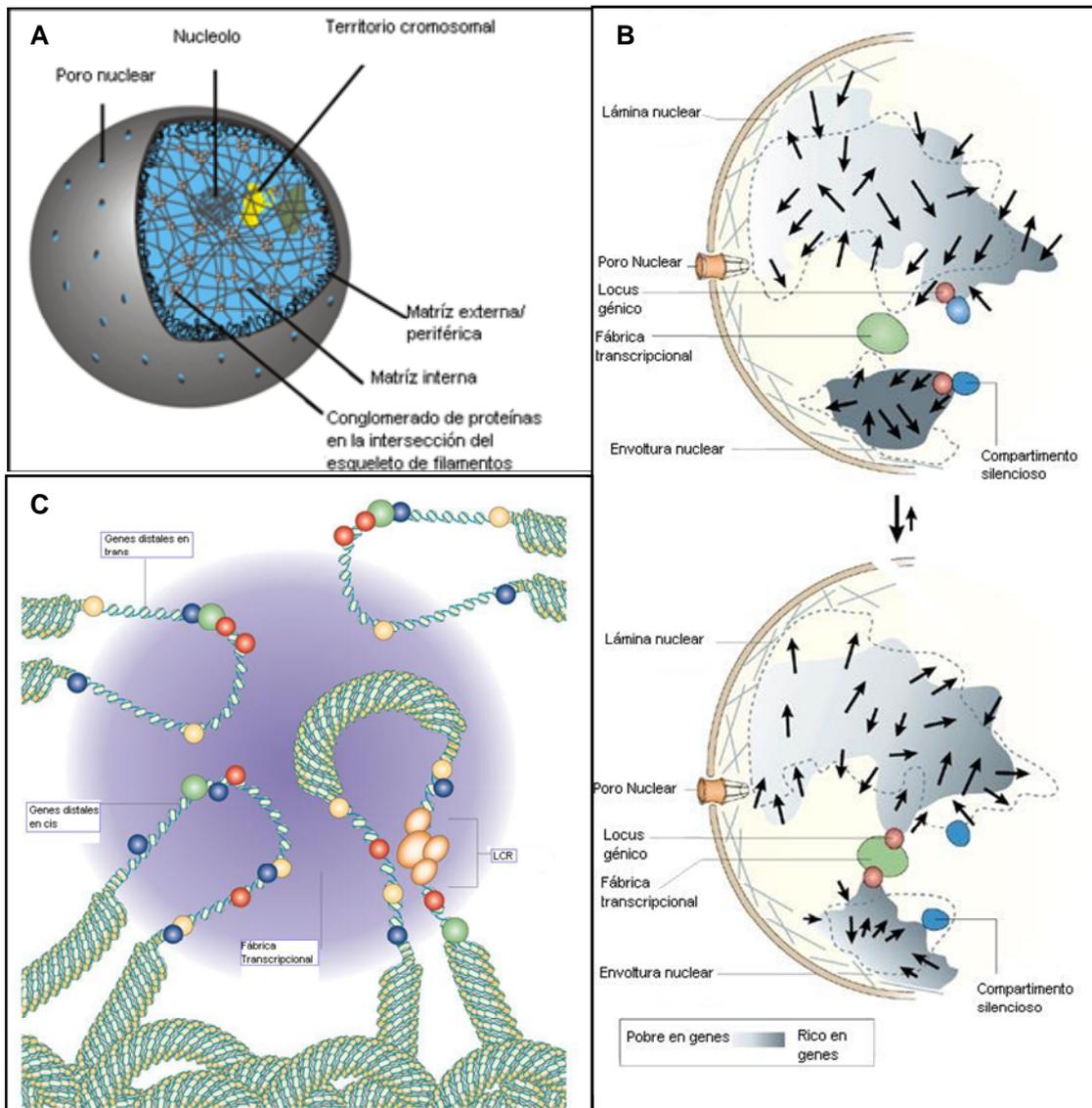


**Figura 17: Elementos de regulación.** A) Potenciadores. Uno de los probables modelos de su funcionamiento implica que la interacción de factores que se unen en el potenciador (verde), con factores que se unen al promotor proximal (naranja), promueve el reclutamiento de factores transcripcionales al núcleo del promotor para el reclutamiento del complejo transcripcional aumentando la transcripción del gen blanco. B) Silenciadores. 1) El primer modelo consiste en que la interacción de factores que se asocian al silenciador (morado), con factores asociados al promotor proximal promueven el reclutamiento de factores que evitan o retrasan el reclutamiento de la maquinaria de transcripción disminuyendo así la actividad transcripcional del gen blanco. 2) El segundo modelo implica que los factores asociados al silenciador promueven el silenciamiento por condensación de la cromatina del promotor evitando así la accesibilidad a factores que pudiesen reclutar al complejo transcripcional. C) LCR. Un LCR usualmente se describe como un conjunto de hipersensibilidades a la DNasa I (  $\downarrow\downarrow\downarrow$  ). La asociación de factores a dicha región promueve un cambio en el ambiente cromatínico del promotor y del gen blanco hacia un estado permisivo para el reclutamiento de factores transcripcionales y de la maquinaria de transcripción, aumentando así la actividad transcripcional.

Adicionalmente existen evidencias de que los diversos elementos de regulación son partícipes a otro nivel de regulación definido por la dinámica nuclear fungiendo como regiones de asociación a otros elementos del núcleo celular como a matriz nuclear (MAR), entre otros. La dinámica nuclear participa en la regulación transcripcional puesto que se ha observado que las regiones genómicas destinadas a la transcripción requieren de ser posicionadas en zonas del núcleo conocidas como “fábricas transcripcionales”, en donde se concentran los factores proteicos y la maquinaria de transcripción de tal manera que varias regiones genómicas transcripcionalmente activas pueden ser procesadas simultáneamente (Figura 18) (39-47).

*- Elongación y fin de la transcripción:*

Una vez que la maquinaria de transcripción se ha situado en el sitio de inicio de la transcripción, ésta comienza a sintetizar el RNA y se desplaza a través de una región en la cadena de DNA molde que se denomina marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés), en la cual se encuentra la información de la secuencia del RNA producto indispensable para la función de éste (Figura 14 C) (2-3). Durante la elongación del ácido ribonucleico, el complejo transcripcional puede interactuar con factores de elongación que incrementan la capacidad catalítica. Una vez que la elongación llega a su fin, el complejo transcripcional se disocia principalmente por su interacción con el complejo de término que modifica y desestabiliza las interacciones de la maquinaria transcripcional y libera al RNA producto para su consiguiente procesamiento dependiendo su clase (Figura 14 D) (3).



**Figura 18: Elementos de regulación y la dinámica nuclear.** A) Matriz nuclear. La matriz nuclear se define como una red dinámica de fibras proteicas dentro del núcleo celular que en cierto sentido es análoga al citoesqueleto celular, pero cuya función sigue bajo estudio y se cree participa en la dinámica nuclear y se divide en matriz nuclear periférica e interna. La primera esta compuesta por proteínas de la lamina nuclear y los complejos de los poros nucleares. Por otro lado, la matriz nuclear interna se compone de cientos de diferentes tipos de proteínas (40-43). B) Dinámica nuclear. Durante los procesos de diferenciación y desarrollo celular se observa el movimiento de los genomas en diversas organizaciones dentro del núcleo celular de forma que, regiones genómicas que se requieren mantener transcripcionalmente inactivas se mantienen en compartimentos silenciosos (regiones azules), y las regiones que se requieren expresar se ubican en zonas del núcleo conocidas como “fábricas transcripcionales” (regiones verdes), a través de diversos procesos que siguen bajo estudio (46-47). C) Fábricas transcripcionales. Son regiones dentro del núcleo celular en donde se encuentran concentrados factores transcripcionales y los componentes de la maquinaria de transcripción para el procesamiento de manera simultanea de diversas secuencias transcripcionalmente activas

El ácido ribonucleico se puede interpretar como la molécula mensajera de la información contenida en el DNA. Según su clase o tipo esta podrá ser efectora por si misma o servirá como intermediario para la síntesis de proteínas quienes serán las moléculas efectoras (6).

En el proceso de transcripción se pueden obtener dos grupos de RNA: el primero se refiere al RNA que posee o codifica la información para la síntesis de un péptido o de una proteína por lo que se denomina RNA codificante o mensajero (mRNA), y cuya participación se ve reflejada en el proceso de traducción.

El segundo grupo y más extenso, incluye al RNA que no contiene la información para sintetizar una proteína por lo que se denomina RNA no codificante (ncRNA), pero que cumple con diversas funciones de las cuales no se han definido todas. En dicho grupo se incluyen diferentes clases de RNA como el RNA de transferencia (tRNA), el RNA ribosomal (rRNA), los microRNA, los RNA pequeños nucleolares (snoRNA), entre otros (5).

La existencia de diferentes clases de RNA y las diversas funciones celulares en las que participan representan la importancia de la fina regulación que se requiere para una exitosa transcripción, la cual se define como la obtención de un ácido ribonucleico funcional (lo que implica toda su secuencia), en tiempo y espacio específico. Tal objetivo depende en parte de la secuencia de DNA (promotores, elementos de regulación, ORFs), y su mantenimiento pero además, como se puede observar existen otros eventos los cuales son independientes de ésta (como son la regulación de la cromatina, metilación del DNA, entre otros). Tales eventos se ven conjuntados en lo que se conoce como regulación epigenética.

*- Regulación epigenética:*

El fenotipo de un organismo no solo depende de la información codificada en el DNA de su genoma sino que también, es el efecto de diversos eventos que controlan la expresión de éste los cuales, de la misma manera requieren transmitirse de progenitores a descendientes y evolucionan conforme a la evolución de los genomas mismos.

La epigenética estudia toda aquella modificación heredable que altera la expresión de un genoma y que no involucra un cambio en la secuencia del DNA (11). En general, la regulación epigenética depende de cinco grandes procesos que están ínter-relacionados e incluso son ínter-dependientes y que tienen que ver con el establecimiento de diferentes estadios de cromatina y la dinámica nuclear, entre los que se encuentran: la metilación del DNA, los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, los ácidos ribonucleicos no codificantes, los complejos represores tipo Polycomb y activadores Trithorax así como las modificaciones post-traduccionales de histonas (11). En conjunto dichos mecanismos contribuyen junto con la información genética a establecer los diferentes patrones de expresión necesarios durante la diferenciación celular y el desarrollo de un organismo, además de que puedan ser segregados post-mitóticamente lo que permite que dos células a pesar de poseer exactamente el mismo genoma, difieran marcadamente en estructura y función (48).

Es así, que la regulación epigenética forma una parte imprescindible de la regulación transcripcional, de la que se requiere obtener mayor información acerca de sus procesos y su relación con los demás mecanismos involucrados con el mantenimiento y expresión del genoma eucarionte (49).

La transcripción y su regulación al conjuntar una gran diversidad de factores y eventos es quizás uno de los retos más complejos en la búsqueda del entendimiento de la relación entre el genoma y las actividades celulares. La técnica propuesta en el presente trabajo presenta diversas ventajas que pueden ser aprovechadas para obtener resultados que ayuden a descifrar dichas cuestiones.

## **II INTRODUCCIÓN:**

### ***I ANTECEDENTES:***

La regulación transcripcional conjunta diversos procesos y mecanismos que concluyen en la correcta expresión génica durante el desarrollo de un organismo y la diferenciación celular. Cada día se obtienen múltiples evidencias de que los mecanismos epigenéticos y aquellos que involucran a la cromatina juegan un papel crítico dentro de dicha regulación, conjuntando la participación de diversos elementos y factores regulatorios. (50)

A pesar de haber sido caracterizada su organización hace más de una década, la complejidad de los mecanismos que participan en la programación de la expresión de los genes globina de pollo que permite la activación selectiva durante la diferenciación celular eritroide y concluye en la transición del polipéptido de hemoglobina tipo embrionario al adulto, además de su importancia en el funcionamiento de la hemoglobina ha establecido a los dominios génicos globina de pollo como sistemas biológicos modelo ampliamente utilizados para estudiar la regulación transcripcional en eucariontes avanzados (51, 52).

Varios elementos de regulación del ambiente cromatínico local de dichos dominios se han identificado y caracterizado, entre ellos, un interesante elemento delimitador denominado  $\alpha$ EHS1.4 cuyas características sugieren un importante papel en la regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo (36, 53); sin embargo, las metodologías clásicas utilizadas para el estudio de elementos regulatorios y su relación con los demás mecanismos de regulación transcripcional presentan algunos límites, entre otras cosas, al análisis

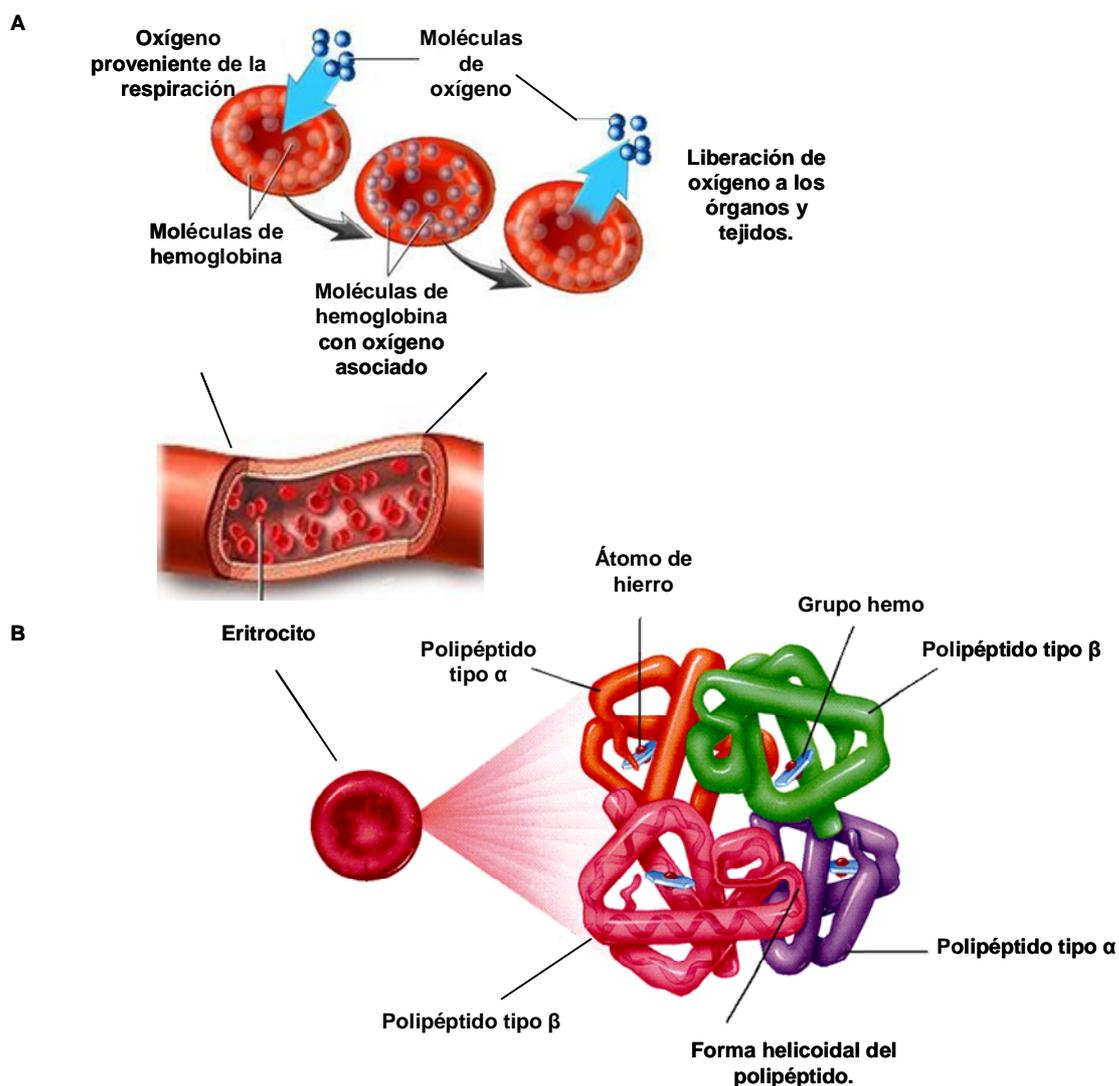
individual de cada elemento de regulación dificultando el análisis funcional en contexto del dominio completo (50).

Es por tanto, que hoy en día se ha planteado el diseño, desarrollo e implementación de nuevas técnicas entre las que encontramos aquellas que conforman a la ingeniería recombinogénica que permitan estudiar simultáneamente diversas secuencias de regulación y los procesos conectados a ellas, analizando su efecto en el control de la expresión del gen o conjunto de genes incluidos en un dominio cromatínico acercándose a un contexto similar al nativo; además de conocer las implicaciones sobre la regulación génica de dichos eventos. La comprensión de las bases moleculares de tal fenómeno podrá proveer nuevos acercamientos para el tratamiento de las patologías asociadas a las alteraciones en el mismo (51).

- *La hemoglobina y los genes globina:*

En metazoos, la hemoglobina es la proteína globular cuya función principal es el transporte de oxígeno de los órganos respiratorios a los tejidos periféricos a través de la sangre (Figura 19 A) (54), además, realiza el transporte de dióxido de carbono y puede interaccionar con monóxido de carbono y óxido de nitrógeno. Dicha proteína se encuentra disuelta en grandes cantidades en el citosol de células sanguíneas denominadas eritrocitos cuya función principal es la contención y transporte de la misma. Los eritrocitos derivan de células troncales denominadas hemocitoblastos que durante el proceso de maduración, producen grandes cantidades de hemoglobina (2). La estructura oligomérica tridimensional de la hemoglobina es semiesférica con un diámetro cercano a 5.5 nm y está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas

helicoidales asociadas por fuerzas no covalentes a cuatro grupos prostéticos hemo (una molécula de protoporfirina de hierro  $2^+$ ), a los que se asocian los gases de manera reversible. La porción proteica consiste en la organización simétrica de dos dímeros constituidos por una cadena tipo  $\alpha$  y una tipo  $\beta$  (55). Es así que la hemoglobina también se puede describir como un tetrámero o como un dímero de protómeros  $\alpha$ - $\beta$  (Figura 19 B) (2).



**Figura 19: Hemoglobina.** A) La función principal de la hemoglobina es el transporte de oxígeno de los órganos respiratorios a los tejidos periféricos a través de los vasos sanguíneos (©2008 Nucleus Medical Art, Inc.). B) La hemoglobina se encuentra dentro de las células sanguíneas conocidas como eritrocitos; su estructura está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas helicoidales (2 tipo  $\alpha$  y 2 tipo  $\beta$ ), que están asociadas a 4 grupos prostéticos hemo que contienen un átomo de hierro ( $Fe^{2+}$ ), por cada uno (Mader S.S., (1997); *Inquiry into Life* (8va ed.); McGraw-Hill).

Los genes globina engloban a los miembros de una familia génica que codifica para las cadenas polipeptídicas de las globinas tipo  $\alpha$  y tipo  $\beta$  que conforman la hemoglobina (51).

Los diferentes requerimientos celulares de oxígeno durante las diferentes etapas de desarrollo; embrionaria, fetal y adulta, se ven reflejados en el acoplamiento de diferentes hemoglobinas que difieren entre sí por las cadenas tipo  $\alpha$  y tipo  $\beta$  (56), lo que se debe a que en todos los vertebrados, los genes globina cumplen con una programación de expresión diferencial (Figura 20).

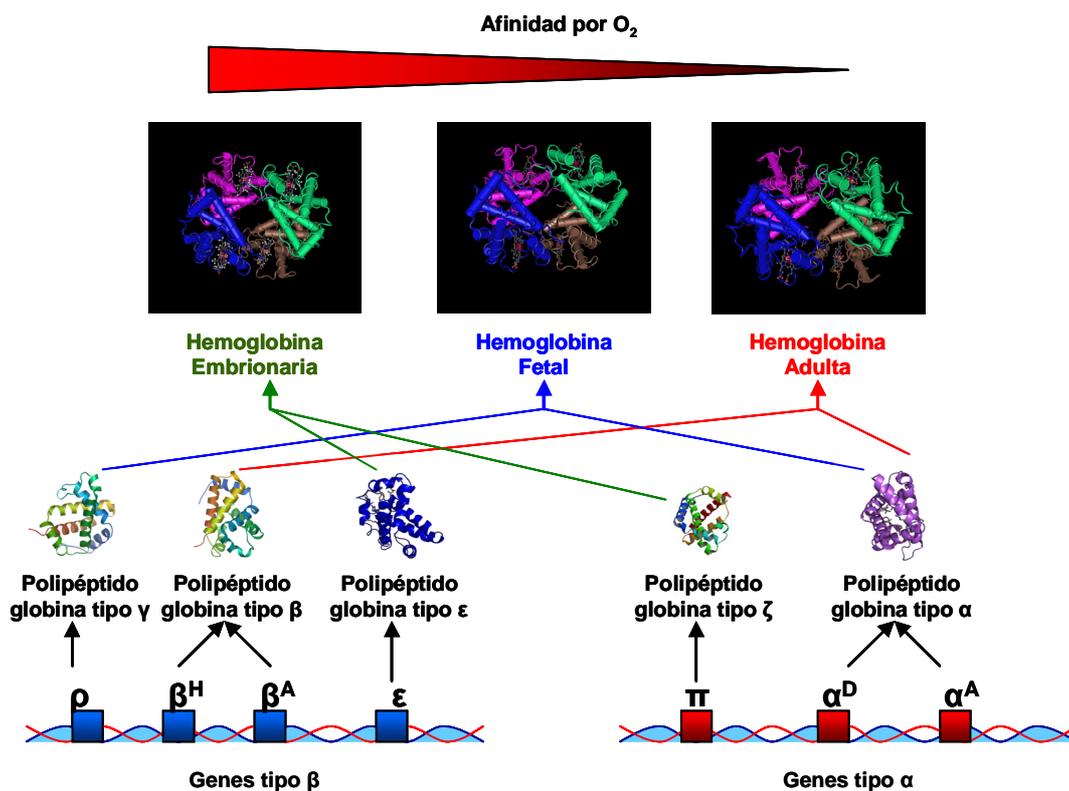
Éstos, se organizan en conjuntos génicos en el que cada uno incluye a los genes que codifican para un tipo de globina. En mamíferos y aves cada conjunto se encuentra estructurado en dominios cromatínicos separados incluidos en cromosomas distintos (54), y cada uno presenta un patrón de regulación diferente.

El dominio  $\beta$ -globina contiene al conjunto génico que codifica para los polipéptidos adultos  $\beta$ -globina, el embrionario  $\epsilon$ -globina y fetal  $\gamma$ -globina y en general se encuentra en un estado cromatínico condensado (heterocromatina), excepto en las células eritroides en los que se expresan los genes que incluye (Figura 20) (51,54-56).

Por el contrario, el dominio  $\alpha$ -globina que contiene a los miembros que codifican para los polipéptidos adultos  $\alpha$ -globina y el embrionario  $\zeta$ -globina, permanece en una configuración cromatínica relajada (eucromatina), tanto en células eritroides como no eritroides probablemente a consecuencia de la presencia en el dominio de un gen de mantenimiento (Figura 20) (51-56). Sin embargo, los genes globina contenidos en dicho dominio solo se expresan en las células eritroides.

A pesar de que se han logrado grandes avances en la definición y caracterización de los mecanismos moleculares que participan en el control de la expresión de los genes  $\beta$ -globina, aquellos que participan en la regulación de la expresión coordinada y programada de los genes  $\alpha$ -globina en el transcurso del desarrollo y diferenciación eritroide, así como en el mantenimiento del dominio en una configuración abierta y sus límites, hasta el momento no se han caracterizado e identificado en su totalidad (52,57).

Es por tales motivos y otros en los que ahondaremos en el siguiente apartado, que el dominio  $\alpha$ -globina de pollo es uno de los dominios genómicos mejor estudiados en eucariontes avanzados (57), y desde hace más de 10 años ha representado el sistema modelo adoptado por nuestro laboratorio.



**Figura 20: Hemoglobina y los genes globina.** Los genes globina se encuentran finamente regulados de manera que en respuesta a las necesidades de oxígeno en las diferentes etapas de desarrollo (embrionaria, fetal y adulta), ocurre una conmutación en la expresión de las cadenas polipeptídicas tipo  $\alpha$  y  $\beta$  que concluye en el ensamblaje de diferentes tipos de hemoglobina, cuya principal diferencia es la afinidad por las moléculas de oxígeno.

- El dominio  $\alpha$ -globina de pollo y el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4:

El dominio  $\alpha$ -globina de pollo es una región genómica cuyos límites no han sido definidos que se localiza en el mini cromosoma 14 de *Gallus gallus* e incluye a los genes  $\alpha$ -globina: el gen embrionario  $\pi$  el primero de dichos genes en sentido 5'-3' de la secuencia de DNA y los genes adultos  $\alpha^D$  y  $\alpha^A$  (Figura 21 A). La expresión de tales genes se encuentra finamente regulada durante la diferenciación de las células eritroides (eritropoyesis), de *Gallus gallus* por una compleja interrelación entre los promotores de los genes, diversos elementos de regulación remotos y el medio epigenético del dominio, lo que permite establecer un patrón de expresión que implica una conmutación entre los polipéptidos de hemoglobina tipo  $\alpha$  en respuesta a los diferentes requerimientos de oxígeno durante el desarrollo del organismo (Figura 21 B) (52).

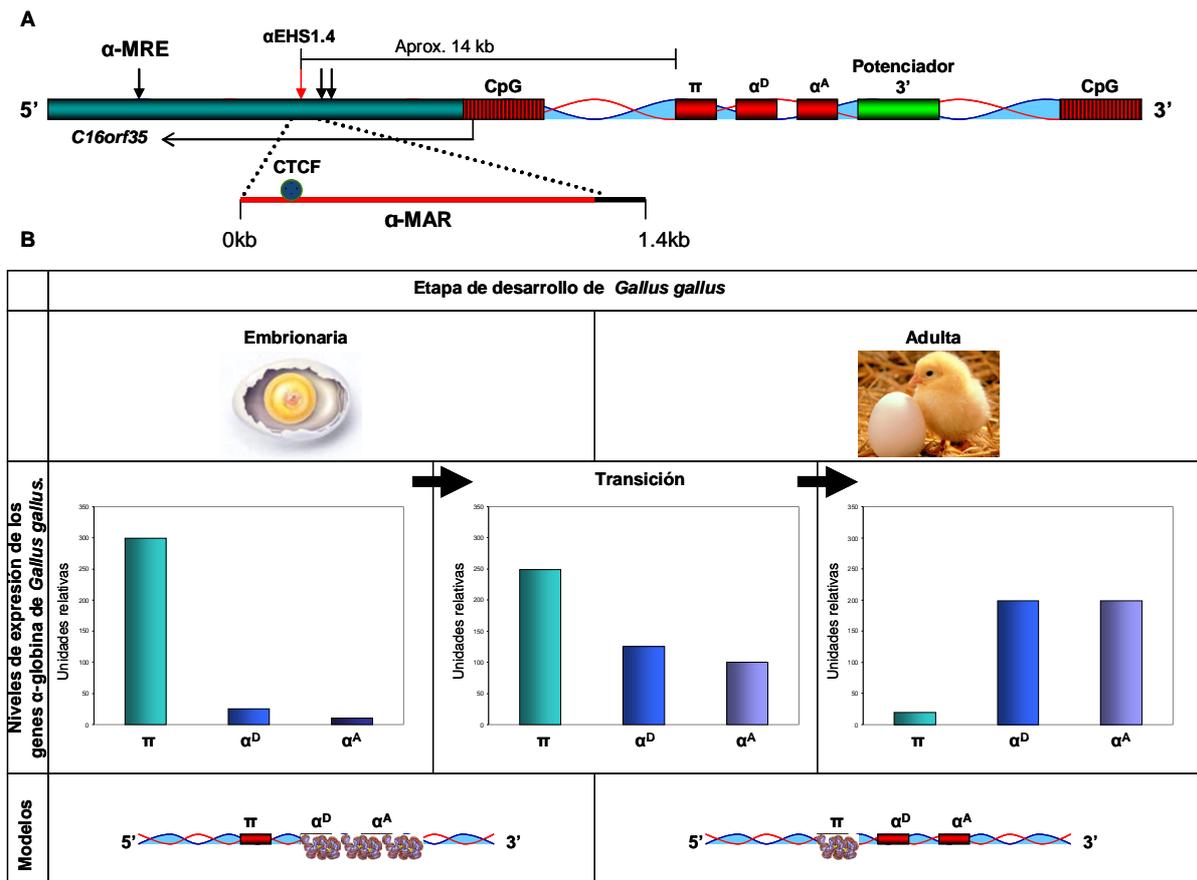
Es así, que dentro de las primeras etapas del desarrollo del *Gallus gallus* y diferenciación celular eritroide, se observa la expresión constitutiva de los 3 genes  $\alpha$ -globina con una clara dominancia del gen embrionario  $\pi$ , mientras que los genes adultos se mantienen en niveles basales de expresión. Conforme continúan los procesos de desarrollo y diferenciación ocurre un silenciamiento gradual del gen embrionario  $\pi$  hasta su silenciamiento total en la eritropoyesis definitiva, contrario a la trans-activación de los genes adultos  $\alpha^D$  y  $\alpha^A$  (Figura 21 B) (52).

Los eventos moleculares involucrados en la compleja red de señalización que participa en el establecimiento de éste patrón de expresión, así como en el establecimiento y mantenimiento de la configuración cromatínica del dominio  $\alpha$ -globina, no han sido definidos o caracterizados en su totalidad. El

esclarecimiento de tales cuestionamientos representaría un importante avance, en particular, para el desarrollo de modelos del funcionamiento de ciertos tipos de elementos de regulación en el contexto de un dominio cromatínico, en el entendimiento del proceso de formación y mantenimiento de tal estructura y por tanto, en general, acercarse a la idea de la importancia y papel que juega un dominio de cromatina en la regulación y función de los genomas eucariontes, por lo que diversos grupos de investigación incluyendo el nuestro se han dado a la tarea de estudiar al dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

Es por tanto, que se ha revelado la presencia de diversas secuencias con características de elementos de regulación a lo largo del dominio (Figura 21 A). Uno de éstos, correspondiente a una secuencia de 1.4 kb de extensión fue identificado por nuestro grupo de investigación en un sitio de hipersensibilidad al corte de la desoxirribonucleasa I (DNasa-1), eritroide específico, por lo que se denominó “el elemento  $\alpha$ EHS1.4” el cual está ubicado en un conjunto de hipersensibilidades que posee propiedades similares a las de un sitio de acoplamiento a matriz nuclear ( $\alpha$ -MAR) (53). Dicho conjunto, se localiza río debajo de una secuencia encontrada dentro del intrón de un gen de mantenimiento (“housekeeping gene”), denominado *C16orf35* (*ggPRX*), definida como el Elemento Mayor de Regulación del dominio  $\alpha$  globina ( $\alpha$ -MRE), el cual presenta características similares a una Región de Control de Locus (LCR), y río arriba de los genes globina a una distancia de entre aproximadamente 11 kb y 15 kb. (Figura 21 A) (53).

Análisis funcionales y ensayos de caracterización demostraron que el elemento  $\alpha$ EHS1.4 posee las características de bloqueo de potenciador y protección...



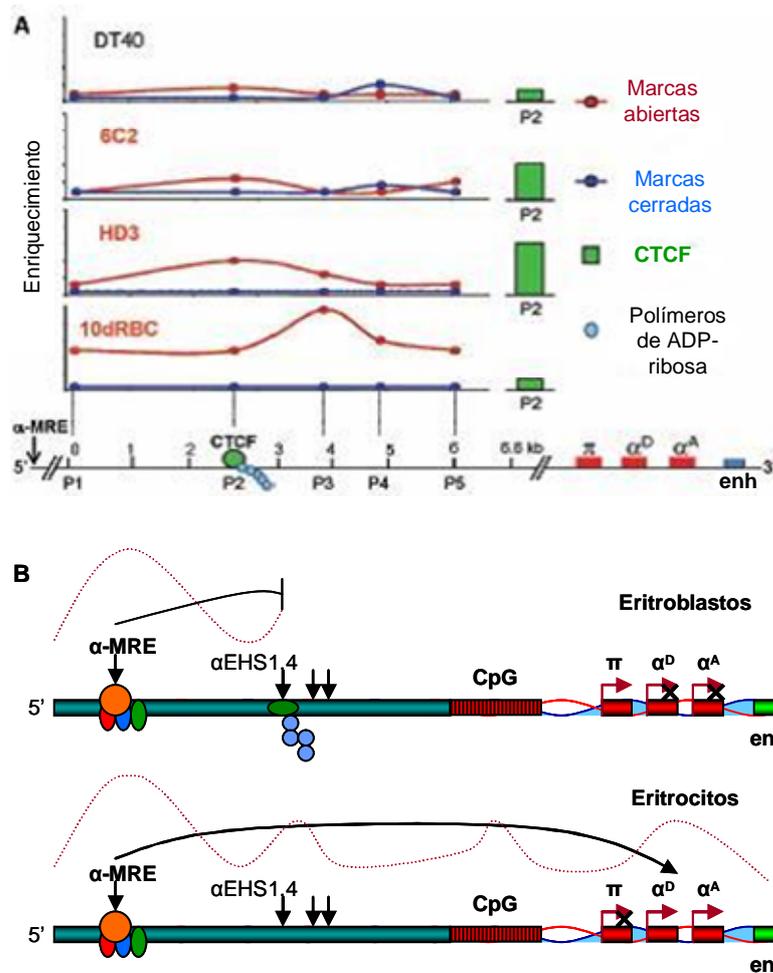
**Figura 21: Dominio  $\alpha$ -globina de pollo y el patrón de la expresión de los genes  $\alpha$ -globina durante el desarrollo y la diferenciación celular eritroide.** A) Esquema del dominio  $\alpha$ -globina de pollo. En la región 5' se encuentran: el elemento putativo LCR del dominio conocido como  $\alpha$ -MRE; tres sitios de hipersensibilidad a la DNasa I (flechas verticales), la primera de éstas (ubicada entre aproximadamente 14 kb), corresponde al elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 que se localiza en una secuencia de 1.4 kb que co-localiza con una región de acoplamiento a matriz nuclear ( $\alpha$ -MAR), a la que se une *in vivo* el factor nuclear CTCF y una isla CpG que se ha propuesto corresponde a la región de inicio de la transcripción del altamente conservado gen de mantenimiento en antisentido *C16orf35*. Posteriormente, río abajo se ubican los 3 genes  $\alpha$ -globina; a 450 pb río abajo del gen adulto  $\alpha^A$  se localiza un potenciador (potenciador 3'), que se ha propuesto participa en la regulación de los genes  $\alpha$ -globina (36, 52-53). B) Los genes  $\alpha$ -globina de pollo presentan un patrón de expresión durante el desarrollo y la eritropoyesis en donde dentro de las primeras etapas se expresan los 3 genes con una clara dominancia del gen embrionario  $\pi$ . Conforme procede el desarrollo del organismo y la diferenciación celular eritroide, ocurre gradualmente el silenciamiento del gen embrionario  $\pi$  hasta su silenciamiento total en la eritropoyesis definitiva, contrario a la transactivación de los genes adultos. Dicha conmutación se ha propuesto es causa de la modificación del ambiente cromatínico de los promotores de los genes (52).

... de un transgén contra los efectos de posición cromosomal (protección contra la expansión de la heterocromatina), lo que lo define claramente como un elemento delimitador o "insulator". Además, ambas características son dependientes a la asociación *in vivo* del factor nuclear CTCF y de su modificación postraducciona por poli-ADP-ribosilación (Como se ha observado en otros elementos delimitadores) (36, 53, 58). Por tal razón, se abren diversas posibilidades en la función de dicho elemento ya que CTCF se ha visto involucrado en diversas funciones en la organización de los genomas eucariontes, a partir de la asociación de él mismo con otros factores nucleares, complejos proteicos y elementos del núcleo a partir de una plataforma de interacción generada por su poli-ADP-ribosilación (58).

Su localización descarta la posibilidad de que el elemento  $\alpha$ EHS1.4 funcione como el límite 5' del dominio (53).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha obtenido evidencia de su posible participación en la regulación diferencial de la expresión de los genes  $\alpha$ -globina mediante la modulación de la conformación de cromatina de la región 5' no-codificante a partir de la asociación y disociación de CTCF (Figura 22) (36), sin embargo, todavía se requiere de mayor información para poder establecer el modelo completo de la participación de éste elemento y los factores nucleares que se asocian a él dentro del contexto de la regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

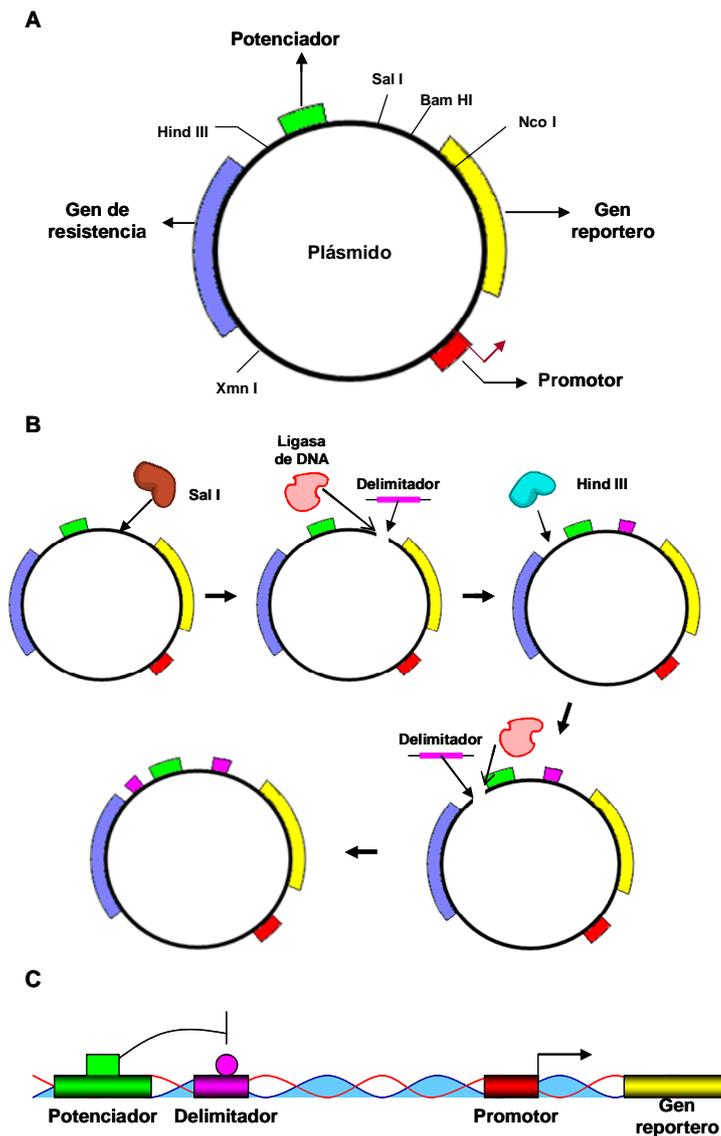
En búsqueda de tal evidencia, existe la posibilidad de utilizar a la ingeniería recombinogénica en bacterias como una útil herramienta ya que permite la modificación y estudio de diversas regiones regulatorias en un contexto muy cercano al natural.



**Figura 22: El papel del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 en el *locus*  $\alpha$ -globina de pollo.** (Furlan-Magaril M., et al (2010)) A) Resumen de un análisis de las modificaciones post-traduccionales de histonas y del enriquecimiento *in vivo* de CTCF en una región genómica de 6.6 kb que incluye al elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 y su sitio de unión a CTCF (P2). Mientras procede la diferenciación eritroide se observa un incremento de marcas de histonas correspondientes a un ambiente cromatínico permisivo (línea roja), sobre el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 que se expande posteriormente por toda la región genómica en eritrocitos de 10 días de desarrollo (10dRBC), en donde los genes adultos se expresan. CTCF se encuentra presente durante la diferenciación con un enriquecimiento en la etapa celular de eritroblasto (HD3), para su posterior liberación en la fase de eritrocito (gráfica de barras, barra verde). Los sitios P1-P5 representan las regiones en donde se evaluaron las marcas de histonas mediante inmunoprecipitación de cromatina (CHIP). El sitio P2 corresponde al sitio de asociación a CTCF. B) Tal información llevó al planteamiento del siguiente modelo de funcionamiento del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 con respecto a la estructura cromatínica y la expresión de los genes  $\alpha$ -globina de pollo. El factor nuclear CTCF se encuentra asociado durante la etapa eritroblástica bloqueando las señales provenientes del  $\alpha$ -MRE previniendo la transactivación de los genes globina adultos. En la fase eritroide, CTCF se disocia y ocurre el establecimiento de un ambiente cromatínico abierto (línea punteada roja), que concluye con la trans-activación de los genes adultos  $\alpha^D$  y  $\alpha^A$  (36).

- *Ingeniería recombinogénica y cromosomas artificiales de levadura:*

Una importante cantidad de información de los elementos de regulación y de factores nucleares que participan en el control de la expresión de los genes del dominio  $\alpha$ -globina y otros durante el desarrollo de un organismo y la diferenciación celular, ha surgido a partir del uso de la tecnología transgénica clásica. Ésta requiere de la manipulación del DNA a partir de la unión de materiales genéticos de origen diferente recurriendo al uso de endonucleasas de restricción, enzimas de origen bacteriano que “rompen” los enlaces fosfo-diéster internos del esqueleto de DNA por hidrólisis en secuencias únicas. De ésta manera, secuencias genómicas pueden ser aisladas en vectores de origen viral (fagos), o bacteriano (plásmidos), y además pueden “construirse” secuencias que incluyan diversos elementos genómicos como promotores, elementos de regulación, etcétera (Figura 23); que posteriormente pueden integrarse a organismos hospederos para su mantenimiento en un estado inerte durante un lapso prolongado y producción en cantidad suficiente para los diversos estudios y técnicas en los que serán utilizadas, entre los que se incluyen los ensayos de transfección que implican la integración transitoria o estable de las secuencias de “una construcción” al genoma de células, líneas celulares y algunos organismos multicelulares eucariontes a través de su línea germinal en los que se denominan transgén; ésto, para el análisis de la expresión de los genes, el efecto de sus mutaciones en el fenotipo, la función específica de los elementos de regulación, así como la influencia de estructuras cromatínicas en dichos fenómenos en un microambiente que se asemeje al nativo (figura 23) (59-63).



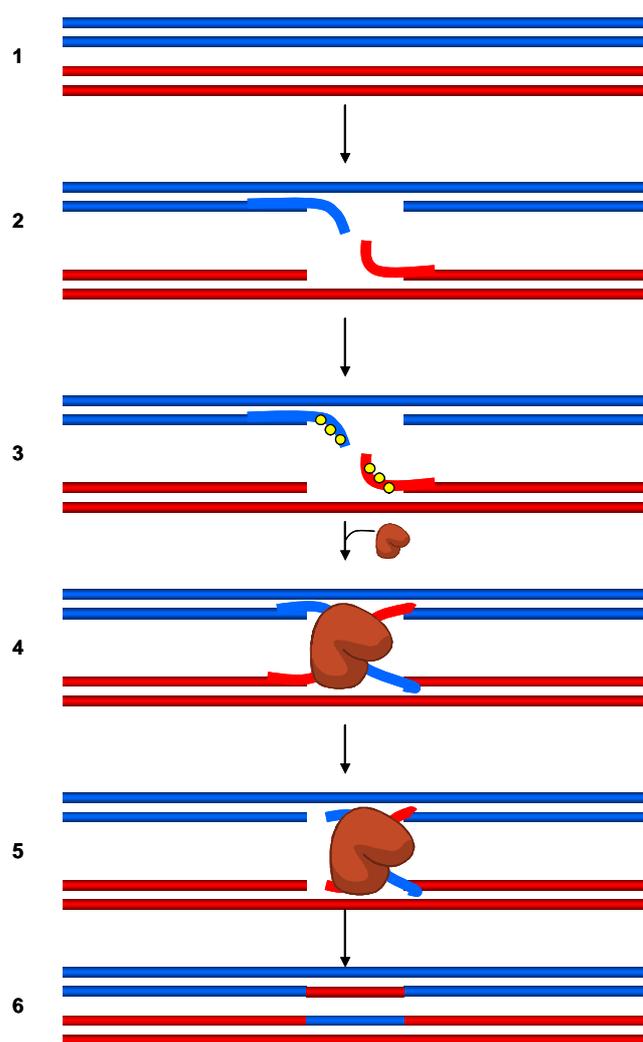
**Figura 23: Ingeniería transgénica clásica.** A) Vector. Se muestra un plásmido que posee características de un vector utilizado para la construcción de una secuencia para el estudio de la actividad de bloqueo de potenciador de una secuencia que se sugiere como delimitador. B) Para generar dicha construcción, primero se “corta” el DNA en un sitio específico mediante el uso de una endonucleasa de restricción (En este caso Sal I y Hind III), posteriormente se incluye una secuencia que se desea “clonar” o incluir en el vector que al poseer secuencias terminales compatibles con aquellas generadas por la enzima de restricción en el vector, pueden unirse mediante un enlace fosfo-di-éster generado por una ligasa de DNA. En este caso, la secuencia clonada corresponde a un sospechoso elemento delimitador que se ha clonado de manera que un potenciador queda enmarcado de forma 5’-3’ por la secuencia a analizar. C) En términos lineales dicha construcción simula la condición en que un elemento delimitador al localizarse entre un potenciador y su promotor blanco puede bloquear la interacción entre éstos. Dicha actividad se prueba a partir de ensayos de transfección, en una célula con un ambiente nuclear similar al nativo de la secuencia analizada en el que se busca la presencia o ausencia de la trans-activación del gen reportero.

A pesar de la enorme importancia de la tecnología transgénica clásica en los estudios de tales procesos, éstos se observan complicados en su interpretación debido a algunas limitaciones que implican éstas técnicas entre las que destacan principalmente: la limitada información genética que puede incluirse (clonarse), establemente en las construcciones recombinantes generadas para ser purificadas sin su degradación, la restringida accesibilidad de sitios únicos de restricción apropiados tanto en vectores de clonación como en el DNA genómico y la diferencia de las estructuras cromatínicas y complejos proteicos formados en comparación a aquellos que se presentan en las secuencias genómicas nativas. (60, 61). Por tanto, genes que incluyen intrones de varios cientos de kilobases de longitud o un *loci* que contiene múltiples genes, al no poder ser utilizados como transgenes, concluían en la exclusión de secuencias regulatorias que pudiesen haber sido descartadas ya sea por no haber sido identificadas o por que potencialmente no se consideraban importantes, lo que conlleva a descartar así mismo su influencia sobre los fenómenos que participan en la regulación de los genes o *loci* estudiados (61).

Con el objetivo de evitar dichas restricciones, es que se fueron desarrollando e implementando técnicas que permitiesen transferir y manipular fragmentos largos de DNA y unidades funcionales completas dentro de las células para realizar un análisis completo dentro de un contexto genómico más cercano al natural (64). Entre ellas, encontramos a la ingeniería recombinogénica la cual se basa en el fenómeno de recombinación homóloga altamente estudiado y descrito en levaduras principalmente en *Saccharomyces cerevisiae* (59).

El proceso de recombinación homóloga permite el intercambio de información genética entre dos moléculas de DNA en una manera precisa y específica al

ocurrir a través y entre regiones homólogas (secuencias de DNA que comparten una gran similitud), a partir del rompimiento de la cadena de DNA (Figura 24) (59). Éste fenómeno resulta muy eficiente actuando en algunas levaduras como *S. cerevisiae* en donde es utilizado por dichos organismos para la reparación de su genoma, lo que los establece como útiles medios para la creación de DNA recombinante (59, 60).



**Figura 24: Recombinación homóloga.**

1) En azul se representa el DNA exógeno y en rojo el DNA del genoma del hospedero. 2) El DNA se fractura por la acción de una endonucleasa, por actividad de una helicasa se desplaza la cadena mutilada de su complementaria. 3) Se asocian a las terminales proteínas de unión a cadena sencilla (SBB, círculos amarillos). 4) Una recombinasa cataliza y estabiliza el apareamiento entre cadenas homólogas de origen distinto formando un entrecruzamiento. 5) Una nucleasa que puede formar parte del complejo de recombinación, escinde el extremo que no se puede aparear de las cadenas de DNA. 6) Una ligasa cataliza el enlace fosfodiéster para estabilizar las cadenas. A ocurrido un intercambio de material genético entre el DNA exógeno y el DNA del hospedero

Además, tal proceso presenta la ventaja de que puede ocurrir en secuencias homólogas de pocos pares de bases permitiendo generar DNA recombinante *in vivo* con el mínimo uso de enzimas de restricción y ligasas de DNA de tal manera, que se puede aislar y modificar cualquier molécula de DNA por éste...

...mecanismo de una forma tan fiel que en ocasiones se puede obtener la molécula recombinante deseada desde el primer evento de recombinación, mientras que, por los mecanismos clásicos se puede llegar a obtener productos no deseados (59, 60).

Adicionalmente, la ingeniería recombinogénica se logró establecer a partir del desarrollo del cromosoma artificial de levadura (YAC por sus siglas en inglés "Yeast Artificial Chromosome"), el cual consiste en una secuencia de DNA que posee secuencias cromosómicas esenciales para el mantenimiento del vector tales como centrómero y dos regiones teloméricas, así como una secuencia de replicación autónoma. Dichos elementos enmarcan una secuencia con un sitio único de restricción para la clonación de una inserción genómica. Además, para la selección del vector recombinante se utilizan secuencias de resistencia, generalmente TRP1 (necesaria para la síntesis de triptófano), y URA3 (requerida para la síntesis de uracilo) (Figura 25 A) (61).

Un cromosoma artificial de levadura es capaz de mantener una secuencia genómica de una longitud de megabases lo que revolucionó los ensayos transgénicos para el análisis de la expresión génica al poder estudiar genes completos intactos y dominios génicos enteros usados como transgén, incluyendo elementos de regulación dístales lo que ha podido ayudar a validar diversos estudios durante el desarrollo y diferenciación celular además de proteger al transgén de los efectos de posición (61).

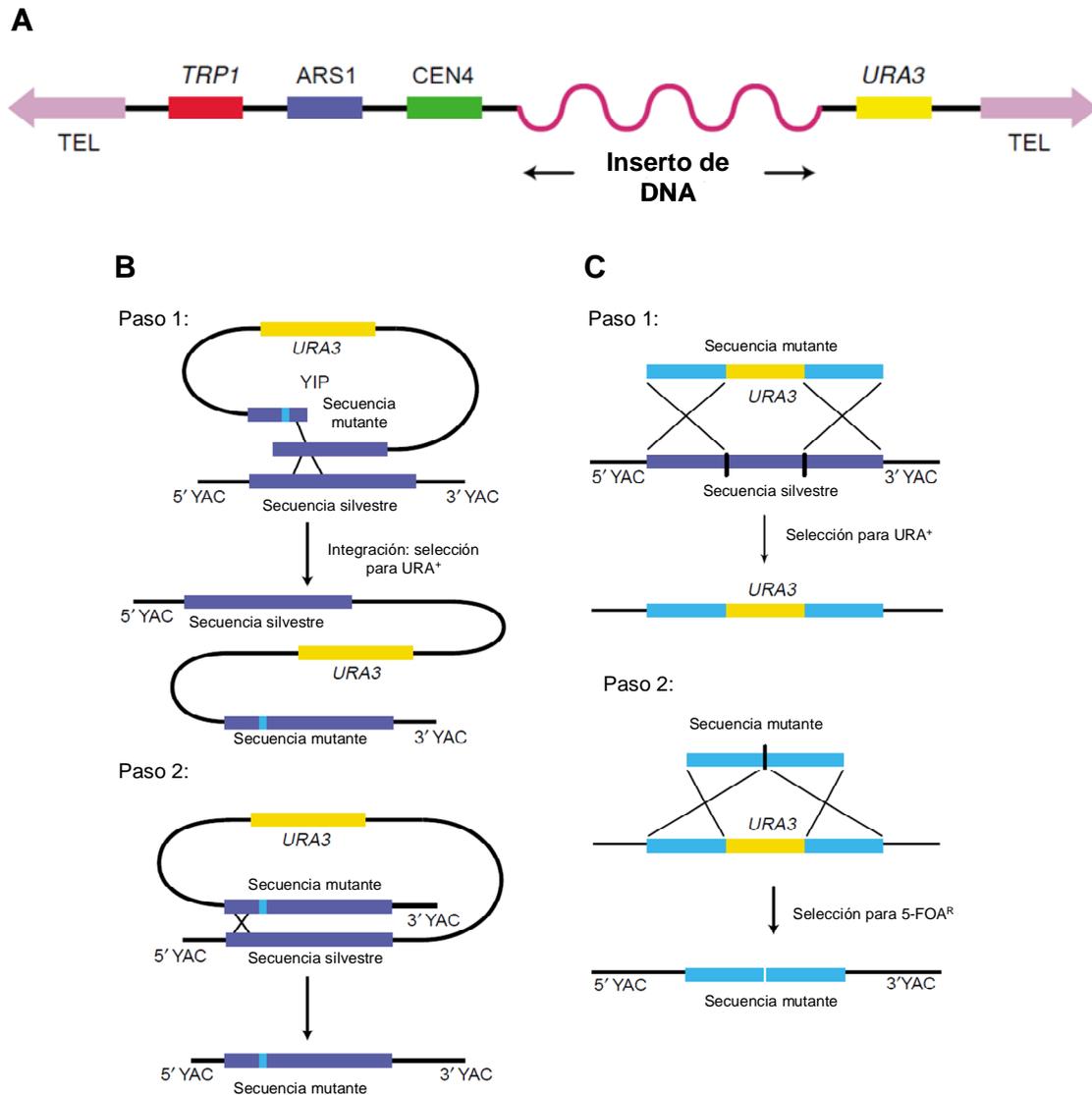
Para la obtención de cromosomas artificiales de levadura recombinantes se han aprovechado los mecanismos de recombinación homóloga de levadura generalmente utilizando dos sistemas y que se han aplicado para otros procesos de ingeniería recombinogénica. El primero de ellos, el sistema de

“pop-in, pop-out” se ha utilizado de manera extensa y requiere de la producción de una construcción en un plásmido que contiene la secuencia que se desea introducir en el vector enmarcada por secuencias que presentan gran homología con la secuencia blanco. Tal construcción se introduce en la levadura hospedero del cromosoma artificial de bacteria. Éste sistema requiere de un solo evento de entrecruzamiento y la escisión de la secuencia inalterada (Figura 25 B) (61).

Por otro lado, el sistema de remplazo de secuencia es un método que presenta la ventaja de introducir deleciones largas sin embargo, también se puede aplicar para la introducción de mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones. Su desventaja es la necesidad de dos construcciones en plásmidos (Figura 25 C) (61).

La recombinoingeniería en levaduras como *S. cerevisiae* es directa puesto que el DNA enmarcado por regiones homólogas cortas, incluido en un vector como un plásmido o un cromosoma artificial de levadura, puede ser insertado dentro de objetivos endógenos. Incluso, el material que puede ser utilizado para la mutagénesis puede ser DNA lineal puesto que la presencia de terminales de DNA expuestos induce la recombinación en levaduras (59).

A pesar de las ventajas y avances que se han podido obtener de estas tecnologías, se presentan algunas restricciones. Primero observamos el requerimiento de la producción de construcciones complejas que requieren de elementos de selección y especificación dados que la recombinación homóloga es un evento singular y espontáneo, por lo que necesita de mecanismos de selección para la identificación de aquellas células que transportan la información modificada (59-61).



**Figura 25: Mecanismos de recombinación homóloga utilizados en recombinogenic engineering.** (Peterson K., (2003); *Expert Reviews in Molecular Medicine*). A) Representación esquemática de un YAC. El tamaño de inserto puede variar de entre 23 kb hasta 2Mb. El centrómero (CEN4), el telómero (TEL) y el origen de replicación (ARS1) son las secuencias mínimas que se requieren para formar un YAC funcional; además, requiere de elementos de selección para su aislamiento y purificación (TRP1 y URA 3). B) Método de “pop-in, pop-out”. En el primer paso, un plásmido de integración a levadura (YIP), se lineariza por la acción de una endonucleasa de restricción; se transforma en una levadura donde ocurre el proceso de recombinación con el YAC y las regiones terminales del YIP, formando una construcción intermedia que contiene una duplicación de la secuencia objetivo, una mutante y una tipo silvestre. En el segundo paso, ocurre un evento de recombinación entre las secuencias duplicadas resultando tanto en la obtención de la secuencia silvestre como también de la mutante. C) El método de sustitución de secuencia. En el primer paso, se introduce por recombinación la secuencia con la mutación interrumpida con el cassette de URA3. En el segundo paso se incluye la secuencia mutante para eliminar el cassette de URA3, recreando la secuencia mutante sin interrupción en el YAC. La secuencia mutante incluida es el cassette de resistencia para 5-FOA.

Por otro lado, los cromosomas artificiales de levadura no son replicados y meioticamente segregados en una estricta concordancia con los cromosomas nativos de la levadura, lo cual genera que en las células hijas se pueden transportar una o varias copias de un cromosoma artificial de levadura permitiendo la presencia tanto del vector mutante como el vector nativo en la misma levadura debido a que durante la mutagénesis, el vector objetivo necesita integrarse solo en un cromosoma artificial de levadura para establecer la selección mediante el marcador dificultando su selección y purificación (61).

Asimismo, los sistemas de recombinación homóloga en levaduras siempre se encuentran activos por lo que pueden ocurrir modificaciones no deseadas, por lo que, la manipulación de los cromosomas artificiales de levadura recombinantes generados en dichos organismos es laboriosa y generalmente requiere de la transferencia de los YACs a una bacteria para su subsecuente manipulación (59-61).

Por tales motivos, continuó el desarrollo de otros vectores de alta capacidad entre los que encontramos a los cromosomas artificiales de bacteria (BAC por su siglas en ingles "bacterial artificial chromosome), los cuales adoptaron mayor relevancia debido a los avances en la ingeniería recombinogénica en bacterias a partir del descubrimiento y desarrollo de sistemas de recombinación homóloga en dichos organismos, los cuales abordaremos en la siguiente sección.

- *Cromosomas artificiales de bacteria e ingeniería recombinogénica en bacterias:*

Los cromosomas artificiales de bacterias son vectores diseñados para clonar segmentos de longitud considerable de DNA de entre 200 kb y 300 kb. Su diseño derivó de una copia individual de un plásmido “conjugativo” que contiene el factor de fertilidad F de *Escherichia coli*, llevando a cabo los sistemas de replicación y partición de este plásmido adjudicados a la presencia de los genes *parA* y *parB*, que aseguran un número bajo de copias y una segregación segura del plásmido en las células bacterianas hijas. Además, incluyen un origen de replicación autónomo y marcadores de selección (59, 65, 66).

Las células bacterianas utilizadas como hospederos de dichos vectores sufren mutaciones en su genoma que comprometen la estructura de su pared celular permitiendo la adquisición de éstos a pesar de su gran tamaño (59).

En un principio, los cromosomas artificiales de bacteria tomaron su mayor relevancia en la construcción de bibliotecas genómicas, sin embargo, a partir del descubrimiento y desarrollo de sistemas de recombinación homóloga en bacterias han tomado un importante papel dentro de la ingeniería recombinogénica.

A diferencia de las levaduras, el DNA de doble hebra lineal es inestable en organismos bacterianos debido a la presencia de una exonucleasa (enzima que degrada la estructura del DNA a partir de grupos fosfato terminales expuestos), dependiente de ATP denominada RecBCD. Sin embargo, observaciones posteriores revelaron que existían bacterias que poseían una serie de mutaciones (*rsbcB* y *sbcC*), en los genes de dicha proteína en las cuales podía

encontrarse de manera estable el DNA lineal y además se llevaban a cabo eventos de recombinación homóloga. Tales bacterias son consideradas como uno de los primeros sistemas de clonación *in vivo* utilizados para varias aplicaciones incluyendo: la recombinación de dsDNA lineal con DNA cromosomal circular introduciendo marcadores de selección en el cromosoma de dichas bacterias, la mutación de diversos genes clonados en vectores bacterianos y la subclonación de diversos productos generados a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (65,66).

Sin embargo, la principal desventaja de éste sistema se refiere a la constante actividad del mismo que pueden desencadenar re-arreglos y deleciones no deseados.

Por tal motivo, se han desarrollado diversas alternativas de recombinación homóloga en bacterias que puedan ocurrir de manera inducida entre los que destacan aquellos generados a partir de los sistemas encontrados en algunos fagos como los sistemas Red y RecET, que simplificaron la tarea de generación de construcciones transgénicas haciendo posible la ingeniería de largos segmentos genómicos de DNA incluidos en los cromosomas artificiales de bacterias (60, 65-67).

Los cromosomas artificiales de levadura y de bacteria fueron desarrollados para la clonación y manipulación de largos fragmentos genómicos, cada tipo de vector tiene sus propias ventajas y desventajas lo cual, permite poder elegir el más conveniente dependiendo principalmente de la secuencia genómica que se quiere estudiar (60).

Nosotros hemos elegido trabajar con un cromosoma artificial de bacteria por diversas ventajas que presentan sobre los cromosomas artificiales de levadura las cuales se enumeran a continuación:

1. Los BACs son más fáciles de purificar de manera intacta y en cantidad suficiente para diversos ensayos, puesto que una sola célula bacteriana incluye una copia del vector y éste es segregado de manera uniforme en las células hijas a diferencia de cómo se ha mencionado antes la alta dificultad para purificar a los YACs.
2. El cromosoma artificial de bacteria recombinante es más fácil de seleccionar y purificar puesto que una sola célula bacteriana incluye una sola copia del vector modificado, mientras que en una célula de levadura coexisten tanto el vector nativo o sin modificar como el recombinante.
3. Los YACs son generalmente quiméricos, es decir, un solo vector puede contener insertos de diversas regiones genómicas, mientras que los BACs raramente presentan dicho fenómeno por lo que es más probable que solo encontremos la región genómica que nos interesa estudiar que es el dominio  $\alpha$ -globina de pollo y las regiones que lo enmarcan.
4. La manipulación de los cromosomas artificiales de levadura recombinantes que son generados en la levadura, son laboriosos y generalmente requieren de su transferencia a una célula bacteriana para su subsecuente manipulación, mientras que los cromosomas artificiales de bacteria pueden ser manipulados directamente en la bacteria eliminando la etapa de transferencia.
5. Los mecanismos de recombinación en la levadura siempre se encuentran activos por lo que pueden ocurrir modificaciones no

deseadas, mientras que en bacterias existen sistemas de recombinación homóloga que pueden ocurrir de manera inducida reduciendo la posibilidad de dichas modificaciones (60).

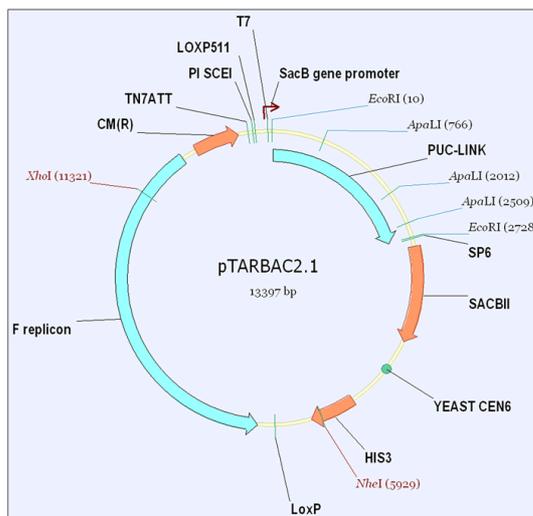
Además, la extensión genómica en donde se encuentran las secuencias definidas y de interés del dominio  $\alpha$ -globina de *Gallus gallus* es de entre aproximadamente 90 y 100 kb que no superan los 300 kb que pueden incluirse en un cromosoma artificial de bacteria (36, 51-53, 68).

Por otro lado, en la literatura pudimos encontrar un cromosoma artificial de bacteria que incluye al dominio  $\alpha$ -globina de pollo, el BAC CH261-75C12 en el que nos centraremos en la siguiente sección y el cual ha sido utilizado en estudios estructurales del dominio (68), lo cual lo hace candidato como materia prima para la implementación de técnicas de manipulación genética utilizando a la ingeniería recombinogénica y estudios transgénicos para el análisis completo de secuencias específicas de interés de nuestro grupo de investigación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

#### - *El Cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12*

El BAC CH261-75C12 corresponde a una clona de aproximadamente 240 kb generada para la construcción de una librería genómica para la secuenciación del genoma de *Gallus gallus*. Una librería genómica se considera una población de bacterias en las cuales cada una contiene una molécula recombinante y que en conjunto todas ellas representan el genoma completo, como en este caso el del pollo.

La preparación de la librería de cromosomas artificiales de bacteria CHORI-261 de pollo a la que pertenece el BAC261-75C12, fue construida por Michael Nefedov en el laboratorio de Pieter de Jong del Instituto de Investigación del Hospital Infantil de Oakland a partir de una muestra de sangre completa de una gallina de raza “junglefowl” de la que se aisló el DNA genómico el cual fue parcialmente digerido con una mezcla de la enzima de restricción EcoRI y la EcoRI metiltransferasa. Los fragmentos de DNA genómico obtenidos fueron separados por tamaño en una electroforesis de pulsos en agarosa de bajo punto de fusión; aquellos de tamaños apropiados fueron purificados y clonados en el vector pTARBAC2.1 en sitios EcoRI (Figura 26). Dichas ligaciones o



**Figura 26: Vector pTARBAC2.1.** Representación esquemática del vector en el que fue construida la librería genómica de *Gallus gallus* CHORI-261. La secuencia del replicón F, contiene la información requerida para la generación de un bajo número de copias y el sitio de replicación autónomo que requiere un cromosoma artificial de bacteria. Los insertos fueron integrados en el sitio de integración EcoRI (67).

moléculas recombinantes fueron transformadas por electroporación en células de *Escherichia coli* cepa DH10B. La caracterización de cada clona fue realizada por Teresa Ren, Quing Cao y Kazutoyo Osoegawa por micro-arreglos (69).

Ésta información y la que encontramos en la literatura como se ha mencionado, proponen al BAC CH261-75C12 como un importante candidato para la implementación de las técnicas de manipulación genética que requerimos, sin embargo, se requiere de la obtención de más datos específicos entre los que

se encuentran el tamaño del BAC y que secuencias del dominio  $\alpha$ -globina de pollo incluye (los cuales no se encuentran publicados), para establecer si dicho material es útil para nuestros propósitos o requerimos de la generación de otro cromosoma artificial de bacteria recombinante.

## ***II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:***

Después de completar los proyectos de secuenciación de una larga cantidad de genomas, el mayor reto que existe para las ciencias biológicas dedicadas al estudio del material genético y las bases moleculares de los procesos asociados a éste, es la investigación sobre los componentes que participan en la funcionalidad del genoma que se conoce como genómica funcional (59).

Nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de la regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo, una de las regiones genómicas mejor estudiadas para entender diversas secuencias de DNA y procesos moleculares que participan en la regulación de la expresión de genes eucariontes.

A pesar de los importantes avances que hemos obtenido en la identificación y caracterización de diversos elementos de regulación y otros procesos que ocurren dentro del dominio  $\alpha$ -globina de pollo que sugieren ciertos modelos funcionales, todavía existen diversos cuestionamientos en los que requerimos profundizar para dilucidar completamente tales modelos. Para esto, buscamos el establecimiento de nuevas técnicas y estrategias en nuestro laboratorio que se acomoden a nuestras necesidades y recursos.

Una de éstas alternativas es la implementación de la manipulación genética de secuencias de interés del dominio  $\alpha$ -globina de pollo contenidas en un cromosoma artificial de bacteria, que incluye al dominio completo y secuencias

aledañas por medio de la ingeniería recombinogénica bacteriana y ensayos transgénicos como una aproximación para analizar tales elementos de regulación, los procesos moleculares adscritos a ellos y su influencia en la regulación de la expresión de los genes  $\alpha$ -globina de pollo. Por ejemplo, dentro de los elementos de regulación en los que hemos obtenido valiosa información y que nos llama ampliamente la atención es el “insulator” o elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4, el cual creemos podremos entender mejor a partir del establecimiento de dicha alternativa experimental así como, ampliar la información que poseemos sobre la participación del factor nuclear CTCF en el funcionamiento de tal elemento y de otras secuencias del dominio  $\alpha$ -globina de pollo a las que se asocia.

### **III HIPÓTESIS:**

La manipulación por ingeniería recombinogénica de un cromosoma artificial de bacteria que contenga al dominio  $\alpha$ -globina de pollo completo y regiones genómicas adyacentes, permitirá estudiar los elementos de regulación contenidos en él, los fenómenos moleculares relacionados, su efecto en la expresión de los genes  $\alpha$ -globina y en la estructura del dominio en un contexto similar al nativo en sistemas *in vivo* de linaje eritroide y no eritroide.

### **IV OBJETIVOS:**

Objetivo General: Implementar una alternativa experimental que permita estudiar las funciones y características del delimitador  $\alpha$ EHS1.4 y otros elementos de regulación así como, el papel que juega la asociación de uno o varios factores nucleares a dichos elementos reguladores en la regulación

transcripcional y mantenimiento del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en un sistema endógeno.

Objetivos Particulares:

- Establecer e implementar los protocolos de purificación y mantenimiento del BAC CH261-75C12.
- Caracterizar las secuencias genómicas correspondientes al dominio  $\alpha$ -globina de pollo contenidas en el BAC CH261-75C12.
- Implementar las técnicas de ingeniería recombinogénica en bacterias para la manipulación genética de las secuencias genómicas de interés del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.
- Establecer los ensayos requeridos para el análisis e interpretación de las modificaciones realizadas en los elementos de DNA previamente mencionados.

### III MATERIALES Y METODOLOGÍA:

- *Generación de cultivos de mantenimiento de bacterias a -70 °C en glicerol.*

Se generó un cultivo de *Escherichia coli* cepa DH10B que incluye el BAC CH261-75C12 (provisto por el grupo de investigación del Doctor Lluís Montoliu, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Campus Cantoblanco, Madrid, España), en placa de con medio Agar Luria-Bertoni (LB) (Becton, Dickinson and Company), suplementado con cloranfenicol (SIGMA), a una concentración de 12.5 µg/mL a partir del cual se aislaron 15 colonias, cada una en 5 mL de medio LB suplementado con cloranfenicol a una concentración de 12.5 µg/mL a partir de los cuales, se realizaron cultivos de mantenimiento a largo plazo 15% (V/V), de glicerol (99% SIGMA), como se describe en (70). A partir de dicho cultivo de mantenimiento se obtienen los cultivos primarios como se describe posteriormente en este mismo trabajo.

- *Establecimiento de métodos de purificación de cromosomas artificiales de bacteria.*

Se establecieron los siguientes tres protocolos de purificación del BAC CH261-75C12:

Primera fase: Cultivo primario.

- 1- En condiciones de esterilidad se inoculan con un asa microbiológica 5 mL de medio LB suplementado con cloranfenicol a una concentración de 30 µg/mL, una asada de cultivo de mantenimiento con glicerol de bacterias *E. coli* cepa DH10B que contienen al cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12.

- 2- Incubar con agitación a 300 rpm y a 37°C por 12 horas.
- 3- En condiciones de esterilidad sembrar por agotamiento una placa Petri con medio agar LB suplementado con cloranfenicol a una concentración de 30 µg/mL.
- 4- Incubar a 37°C por 12 horas.

#### Segunda Fase: Precultivo.

- 1- En condiciones de esterilidad adicionar 4 mL de medio LB suplementado con cloranfenicol a una concentración de 30 µg/mL a un tubo de ensayo estéril para purificación en pequeña escala. En el caso de purificación a mediana escala adicionar a un matríz Erlenmeyer de 250 mL estéril, 100 mL de medio LB suplementado con cloranfenicol a 30 µg/mL y para la purificación a gran escala a un matríz Erlenmeyer de 1 L estéril adicionar 500 mL de medio LB suplementado con cloranfenicol a 30 µg/µL.
- 2- Inocular con asa microbiológica una colonia aislada del cultivo primario.
- 3- Incubar con agitación a 300 rpm y a 37°C por 12 horas.

Resulta importante precisar que las posteriores 2 fases de la purificación, a pesar de corresponder a los mismo principios, varían en reactivos y proporciones entre los tres protocolos por lo que se describe cada protocolo individualmente a continuación.

- a) Protocolo de purificación de Cromosomas artificiales de bacteria a pequeña escala.

#### Tercera fase: Lisis celular en medio alcalino

- 1- Preparación de soluciones reactivas.

- Solución de resuspensión: Se puede generar un volumen de provisión de esta solución ya que se mantiene estable a 4°C. Composición: 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCL (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0). Requiere esterilización por autoclave a 120°C y 760 mmHg por 20 minutos.
  - Solución de lisis: Esta solución debe prepararse en “fresco”. El volumen a preparar dependerá del número de purificaciones que se lleven a cabo. Composición: 0.2 N NaOH y 1% SDS.
  - Solución de neutralización de lisis: Al igual que la solución de resuspensión, se puede preparar un volumen de provisión que se mantiene estable a 4°C. Composición: 5 M acetato de potasio y 11.5% (V/V) ácido acético glacial
- 2- Colocar en un baño de hielo la solución de neutralización de lisis.
  - 3- En condiciones de esterilidad transferir 1.4 mL del precultivo a un micro tubo estéril.
  - 4- En una centrífuga de mesa de alta velocidad para micro tubos centrifugar a 13,200 rpm por 1 minuto.
  - 5- Decantar el sobrenadante (medio de cultivo); la pastilla (bacterias agregadas), tiene gran adherencia. Con el sobrante del precultivo se puede repetir los pasos 3, 4 y 5 en el mismo micro tubo utilizado anteriormente para mejorar la eficiencia de la extracción.
  - 6- Adicionar 100 µL de la solución de resuspensión, mezclar por agitación hasta resuspensión total de la pastilla e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
  - 7- Sembrar por estría una placa Petri con medio Agar LB suplementado con cloranfenicol a 30 µg/mL. Incubar a 37°C por 12 horas. El objetivo

de éste paso es amplificar y mantener las bacterias de la colonia aislada en un cultivo sólido en caso de requerirse purificaciones adicionales.

8- Adicionar 200  $\mu$ L de la solución de lisis. Mezclar con cuidado por agitación vigorosa exactamente 10 segundos. Incubar en hielo exactamente por 5 minutos. Este paso debe de realizarse con cuidado y en los tiempos indicados puesto que el resultado depende plenamente de él.

9- Finalizados los 5 minutos de incubación adicionar inmediatamente 150  $\mu$ L de la solución de neutralización de lisis fría. Mezclar gentilmente de 3 a 6 veces por inversión. Incubar en hielo por 10 minutos.

10-Centrifugar por 5 minutos a 13,200 rpm.

11-Transferir con precaución el sobrenadante por micro pipeta a un micro tubo estéril limpio. Generalmente se obtienen 500  $\mu$ L.

#### Cuarta fase: Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo

1- Añadir un volumen (500  $\mu$ L), de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), por agitación vigorosa hasta observar una sola fase. Centrifugar en una centrífuga de mesa para micro tubos, a 13,200 rpm por 10 minutos.

2- Recuperar la fase acuosa (DNA soluble), que al ser menos densa se encuentra por encima de la fase orgánica y transferir a un micro tubo estéril limpio.

3- Adicionar 1.4 mL de etanol absoluto y mezclar con cuidado por agitación vigorosa e incubar de 20 minutos a temperatura ambiente. En una centrífuga de mesa para micro tubos, centrifugar a 13,200 rpm por 15 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante con cuidado para no perder la pastilla que tiene poca adherencia.

4- Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Centrifugar de la misma forma que el paso anterior a 13,200 rpm por 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante con cuidado para no perder la pastilla y retirar el residuo de sobrenadante con precaución por micro pipeta.

5- Secar la pastilla a temperatura ambiente.

6- Adicionar 100 µl de agua desionizada estéril e incubar a temperatura ambiente hasta la resuspensión de la pastilla.

7- Adicionar 2 µL de RNasa e incubar a 37°C por una hora.

b) Protocolo de purificación de Cromosomas artificiales de bacteria a mediana escala.

Tercera fase: Lisis celular en medio alcalino. Protocolo acoplado al uso de soluciones provistas en el "kit" comercial "Qiagen Plasmid Midi kit 100".

1- Colocar la solución de neutralización P3 en baño de hielo.

2- En condiciones de esterilidad trasvasar el precultivo a un vaso para centrífuga de 500 mL estéril y en una centrífuga de piso refrigerada centrifugar a 6,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

3- Decantar el sobrenadante (Medio de cultivo), y resuspender la pastilla en 4 mL de solución amortiguadora de resuspensión P1 suplementada con RNasa A y mezclar con pipeta suavemente hasta su total resuspensión.

4- Transferir la resuspensión a un tubo para centrífuga de 25 mL estéril y adicionar 4 mL de solución de lisis P2. Mezclar cuidadosamente por inversión 6 veces e incubar exactamente 5 minutos. La solución de lisis incluye un indicador pH que en caso de virar a un color azul permite establecer que la reacción se llevó a cabo satisfactoriamente.

- 5- Inmediatamente adicionar 4 mL de solución de neutralización P3 fría y mezclar con cuidado por inversión 6 veces. Incubar en hielo por 10 minutos. En una centrífuga de piso refrigerada, centrifugar a 13,000 rpm durante una hora a 4°C.
- 6- Transferir el sobrenadante cuidadosamente con pipeta a un vaso para centrífuga de 25 mL estéril limpio. En una centrífuga similar a la anterior centrifugar a 13,000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Cuarta Fase: Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo.

- 1- Transferir suavemente con pipeta el sobrenadante a un vaso para centrífuga de 25 mL estéril limpio. Adicionar un volumen (16 mL), de de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Mezclar con cuidado por agitación vigorosa hasta observar una sola fase. Centrifugar en una centrífuga de piso refrigerada, a 13,200 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- 2- Con profuso cuidado recuperar la fase acuosa y transferir una mitad de volumen a un tubo para centrífuga de 25 mL y la otra mitad al otro. Adicionar 5 mL de acetato de amonio y 7 mL de isopropanol a temperatura ambiente a cada tubo. Incubar a -20°C por 12 horas.
- 3- Centrifugar a 11,000 rpm durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga de piso refrigerada.
- 4- Decantar el sobrenadante con precaución de no perder la pastilla. Lavar la pastilla con 2 mL de etanol al 70% frío. Centrifugar por 10 minutos a 4°C. Repetir una vez.
- 5- Decantar con precaución el sobrenadante y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.

6- Adicionar 100  $\mu$ L de agua desionizada estéril e incubar a temperatura ambiente. En caso de no observar una resuspensión total de la pastilla adicionar fracciones de 50  $\mu$ L de agua desionizada estéril y 1  $\mu$ L de RNasa hasta la total resuspensión.

c) Protocolo de purificación de Cromosomas artificiales de bacteria a gran escala.

Tercera fase: Lisis celular en medio alcalino. Protocolo acoplado al uso de soluciones provistas en el "kit" comercial "Qiagen Plasmid Maxi kit 25".

1- Colocar la solución de neutralización P3 en baño de hielo.

2- En condiciones de esterilidad transferir 250 mL del precultivo a un vaso para centrífuga de 500 mL y los 250 mL de precultivo restante a otro. Centrifugar en una centrífuga de piso refrigerada a 6,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

3- Decantar el sobrenadante y resuspender suavemente con pipeta cada pastilla en 20 mL de solución amortiguadora de resuspensión P1 suplementada con RNasa A hasta su total homogenización.

4- Adicionar a cada vaso 20 mL de solución de lisis P2, mezclar suavemente por inversión 6 veces e incubar exactamente 5 minutos a temperatura ambiente.

5- Inmediatamente añadir 20 mL de solución de neutralización P3 fría, mezclar gentilmente por inversión 6 veces e incubar en baño de hielo por 10 minutos.

6- En una centrífuga de piso refrigerada centrifugar a 13000rpm durante 30 minutos a 4°C.

#### Cuarta fase: Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo

1- Transferir cada sobrenadante a un vaso para centrífuga de 500 mL estéril y adicionar 1 volumen (60 mL) de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Mezclar con cuidado vigorosamente hasta observar solo una fase. Centrifugar a 13,200 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga de piso refrigerada.

2- Precisando cuidado utilizando una pipeta recuperar la fase acuosa y trasladar la mitad a un tubo para centrífuga de 25 mL estéril y la otra mitad a otro. En total se obtienen 4 tubos.

3- Adicionar a cada tubo 5 mL de acetato de amonio y 7 mL de isopropanol. Incubar a -20°C por 12 horas.

4- En una centrífuga de piso refrigerada, centrifugar a 11,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante con precaución de no perder la pastilla.

5- Lavar la pastilla con 5 mL de etanol al 70% frío. Centrifugar en la misma centrífuga a 11,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Repetir este paso una vez más para la remoción total de las sales.

6- Decantar el sobrenadante con cuidado y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.

7- Añadir 500 µL de agua desionizada estéril e incubar a temperatura ambiente. En caso de no observar una completa resuspensión de la pastilla, adicionar fracciones de 100 µL de agua desionizada estéril y 2 µL de RNasa hasta resuspensión total.

Los métodos de purificación están basados en los protocolos descritos en (70), y en la información descrita en los manuales incluidos en los kits de purificación

“Plasmid Midi Kit 100” (QIAGEN no. Catálogo 12145), y “Plasmid Maxi Kit 25” (QIAGEN no. Catálogo 12163).

La cuantificación del DNA extraído se realizó por triplicado mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

*- Alineamientos de secuencias.*

Se utilizaron: la secuencia de DNA completa de las regiones genómicas de pollo incluidas en el BAC clona CH261-75C12 del mini cromosoma 14 de *Gallus gallus* (71), la secuencia completa del conjunto de genes  $\alpha$ -globina de *Gallus gallus* (72), correspondiente al dominio  $\alpha$ -globina de pollo y las secuencias de referencia de genoma de *Gallus gallus* publicadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, así como las secuencias de los transcritos de los genes TMEM8 (73) y AXIN I (74). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa bioinformático de “Nucleotide Blast” del NCBI (74).

*- Análisis de restricción bioinformático predictivo del BAC CH261-75C12*

Se utilizó, la secuencia de DNA completa de las regiones genómicas de pollo incluidas en el BAC clona CH261-75C12 del minicromosoma 14 de *Gallus gallus* (71), y la secuencia completa del conjunto de genes  $\alpha$ -globina de *Gallus gallus* (72), correspondiente al dominio  $\alpha$ -globina de pollo. Los análisis de restricción se realizaron en el programa DNAMAN versión 3.0 de Lynnon BioSoft, 1994-1997 utilizando su banco de enzimas de restricción. Se eligió la endonucleasa de restricción Mlu I limitando el análisis a endonucleasas comerciales que realizaran menos de 10 cortes en la secuencia del BAC

CH261-75C12 (71), y la endonucleasa de restricción Nhe I fue elegida por los sitios de restricción presentados en el dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

*- Análisis de los patrones de restricción del BAC CH261-75C12.*

Para corroborar experimentalmente los resultados obtenidos por el análisis de restricción predictivo, se realizó en un volumen total de 50  $\mu$ L la digestión enzimática del BAC CH261-75C12 utilizando un volumen de 2.5  $\mu$ L de la endonucleasa de restricción Mlu I (10 U/mL NEB), un volumen de 6  $\mu$ L de la fracción purificada (mediana escala), un volumen de 5  $\mu$ L de solución amortiguadora 3 (NEB) y un volumen de 36.5  $\mu$ L de agua desionizada.

Se realizó en un volumen total de 50  $\mu$ L la digestión enzimática del BAC CH261-75C12 utilizando un volumen de 2.5  $\mu$ L de la endonucleasa de restricción Nhe I (10 U/mL NEB), un volumen de 6  $\mu$ L de la fracción purificada (mediana escala), un volumen de 5  $\mu$ L de solución amortiguadora 2 (NEB), un volumen de 5  $\mu$ L de solución al 10% de albúmina de suero bovino (BSA NEB), y un volumen de 31.5  $\mu$ L de agua desionizada. Se preparó un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (BrEt) con pozos de 30  $\mu$ L para electroforesis en gel de agarosa alcalina como se describe (70), se cargó un volumen de 25  $\mu$ L de la digestión con Mlu I, 25  $\mu$ L de la digestión con Nhe I, un volumen de 2.5  $\mu$ L de la fracción purificada BAC CH261-75C12 1 obtenida por el protocolo de purificación a pequeña escala como control y 3  $\mu$ L de marcador molecular de fago  $\lambda$ /Hind III rango 23130-120 pb (FERMENTAS). Se corrió el gel a 100 V durante 20 minutos como se describe (69), utilizando una fuente de poder PowerPack 1000 (BIORAD). El resultado se reveló en un transiluminador Universal Hood II (BIORAD).

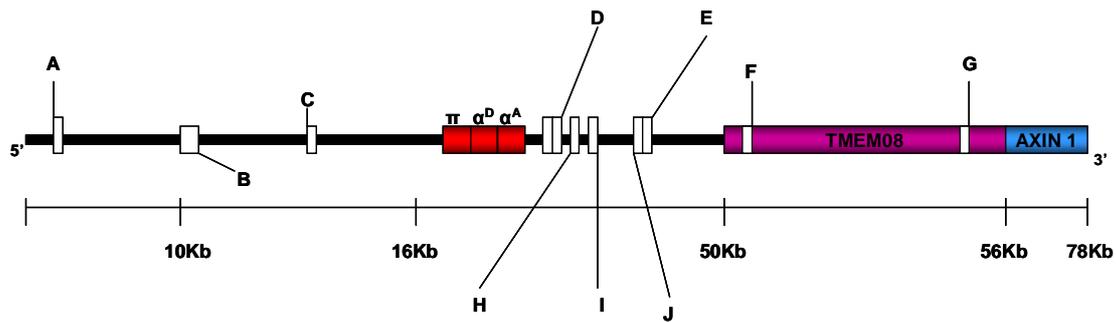
- *Amplificación por PCR de regiones de interés del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.*

Se utilizó como templado un volumen de 0,5  $\mu$ L de la fracción BAC CH261-75C12 Midi, obtenida por el método de purificación a mediana escala. Se adicionaron 1  $\mu$ L de cada par de oligonucleótidos, se utilizó 1  $\mu$ L de Taq Polimerasa y todo se ajustó a condiciones de reacción para un volumen total de 20  $\mu$ L. Los oligonucleótidos utilizados, su  $T_m$  y concentración de magnesio, se enlistan en la Tabla 1 (página 71). Las regiones del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en las que se alinean para su amplificación se pueden observar en la Figura 27.

**Tabla 1:** Cebadores para la amplificación de diversas regiones del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

Región Amplificada del dominio $\alpha$ -globina de pollo.	Par de oligonucleótidos.	Tm (°C)	Concentración de Mg <sup>2+</sup> (mM)	Tamaño aprox. del Amplicón (pb)
A) Región 5' río arriba del elemento $\alpha$ -MRE	24_5'	57.8	3.0	450
B) Elemento $\alpha$ -MRE	LCR5' $\alpha$ MRE	58.0	4.0	400
C) Elemento $\alpha$ EHS1.4	$\alpha$ EHS1.4Xba	58.0	3.0	1400
D) Potenciador 3'	GEO 04	63.0	1.5	1500
E) Sitio de unión a CTCF río abajo de la isla CpG 3'.	CTCF 22678	58.0	2.0	200
F) Región 5' del gen TMEM 8	TMEM 8	62.0	1.5	900
G) Región 3' del gen TMEM 8	TMEM422	61.0	3.0	422
H) Región genómica ubicada entre el potenciador 3' y la región LCR 3'.	2046125'	61.8	3.0	200
I) Sitio de unión a CTCF dentro del LCR 3'	CTCF55377LCR 3'	61.8	2.0	350
J) Isla CpG río abajo del potenciador 3'	CpG659650	60.5	4.0	400

Ver figura 27 a continuación...



**Figura 27: Regiones del dominio  $\alpha$ -globina de pollo que amplifica cada par de cebadores utilizados en la caracterización del BAC CH261-75C12.** Algunas secuencias que se buscan amplificar mediante PCR utilizando como templado el BAC CH261-75C12, representan regiones que pudiesen estar involucradas en la regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y que se encuentran bajo estudio por nuestro grupo de investigación. Entre ellas, encontramos al elemento LCR putativo del dominio ( $\alpha$ -MRE, B), el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 (C), el elemento potenciador 3' ubicado río debajo del conjunto de genes  $\alpha$ -globina (D), un sitio de unión al factor nuclear CTCF que se encuentra dentro de un conjunto de hipersensibilidades localizado río debajo del elemento potenciador 3' que presenta características similares a las de un LCR (I), y otro sitio de unión al factor nuclear CTCF (E), ubicado río debajo de una isla CpG (J), que se encuentra entre el gen adulto  $\alpha^A$  y el gen *TMEM 8*. Éste gen altamente conservado codifica para una proteína transmembranal (en humanos dicha proteína se a propuesto como marcador de linfocitos inactivos), y se encuentra localizado dentro del dominio  $\alpha$ -globina en *Gallus gallus* a consecuencia de una inversión en su genoma de un fragmento de aproximadamente 170 kb (que incluye también a los genes *AXIN 1*, *RGS11*, *MRPL28* y *LUC7L*), presentando una organización contraria a la que se observa en los genomas de otros vertebrados como *Homo sapiens* (76). Es por tanto, que dentro de la caracterización de la integridad del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en la secuencia del cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12 nos interesa conocer la entereza del gen *TMEM 8* que representa una de las regiones del extremo 3' del dominio, por lo que se propone la amplificación de una región 5' de su marco abierto de lectura (F), y de una región cercana a su extremo 3' (G). Además con el mismo objetivo de comprobar la integridad del dominio  $\alpha$ -globina se buscará la amplificación de una región ubicada dentro del marco abierto de lectura del gen *C16orf35* que representa una secuencia ubicada en la región t5' del dominio (A), y una secuencia que se localice en la zona central de locus  $\alpha$ -globina de pollo (H).

#### IV RESULTADOS:

- *Establecimiento de protocolos de purificación de cromosomas artificiales de bacteria.*

La implementación de los procedimientos de purificación del cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12, representa el punto de partida en este proyecto siendo una etapa fundamental ya que se precisa evitar la presencia de otras biomoléculas provenientes del organismo hospedero como proteínas, RNA, DNA genómico y membranas, así como sustancias derivadas de los consecuentes pasos de purificación como sales y disolventes para evitar cualquier interferencia en los estudios a realizar.

Es así, que se establecieron los tres protocolos de purificación del BAC CH261-75C12 descritos a detalle previamente en el presente trabajo. En resumen (Figura 28), éstos constan de 4 fases:

1. Cultivo Primario. Comprende la generación de colonias aisladas de la bacteria hospedero del BAC CH261-75C12, *Escherichia coli* cepa DH10B mediante siembra por estría por agotamiento en placa.

Este método permite la producción de colonias bacterianas separadas cada una, originada a partir de una bacteria inicial de manera que todos los individuos que forman dicha colonia poseen la misma composición genética (clona bacteriana), permitiendo la generación de un cultivo puro (axénico), al posteriormente transferir una colonia aislada a un medio líquido para su amplificación. Es así, que en posteriores ensayos en donde ocurra la manipulación genética del BAC CH261-75C12, se puede aislar una variante específica del vector para su identificación y posterior estudio.

2. Pre cultivo. Radica en el aislamiento de una colonia del organismo hospedero proveniente del cultivo primario y su amplificación (reproducción), en un cultivo en medio líquido a partir de la cual se realizará la purificación del BAC CH261-75C12.
3. Lisis celular en medio alcalino. Ésta etapa, comprende principalmente la ruptura de las membranas celulares (lisis celular), del organismo hospedero para la liberación del BAC CH261-75C12.

El primer paso de este método consiste en crear un ambiente osmótico hostil para la bacteria y provocar así su lisis lo cual, se logra mediante el contacto de las bacterias con una alta concentración de sales, un detergente aniónico (SDS) y un medio altamente alcalino ( $\text{pH} \approx 11$ ).

Este proceso es una etapa crítica para la purificación puesto que el medio alcalino y la presencia del detergente provocan además de la desnaturalización de las membranas y proteínas celulares, la fragmentación del DNA por lo que el tiempo de exposición (5 minutos), a dicho medio se encuentra estandarizado para evitar la degradación del BAC CH261-75C12.

Una vez transcurrido dicho tiempo, la alcalinidad del medio se neutraliza y mediante la adición de acetato de potasio, se promueve la formación de agregados entre el dodecilsulfato sódico (SDS), proteínas celulares, membranas y DNA genómico; residuos de alto peso molecular e insolubles en medio polar que son retirados por centrifugación y la posterior decantación del medio (Figura 28).

4. Eliminación de trazas y sales. Esta última fase del protocolo de purificación del BAC CH261-75C12 se subdivide en 3 procedimientos:

a) Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo. Dicho procedimiento se basa en una extracción por par de disolventes en donde se aprovecha la diferencia en la polaridad de las moléculas presentes en la fracción de purificación proveniente de la fase anterior para la eliminación de trazas de residuos celulares no polares. Consta de la adición y mezcla de un medio no polar (Fenol:cloroformo:isoamílico), en el cual moléculas de bajo peso molecular no polares y poco polares se solubilizan mientras que en el medio polar (H<sub>2</sub>O), queda disuelto el BAC CH261-75C12 junto con otras moléculas polares. Además, en dicho procedimiento se promueve la desnaturalización, degradación y eliminación de diversas proteínas que soportaron el tratamiento en el medio alcalino.

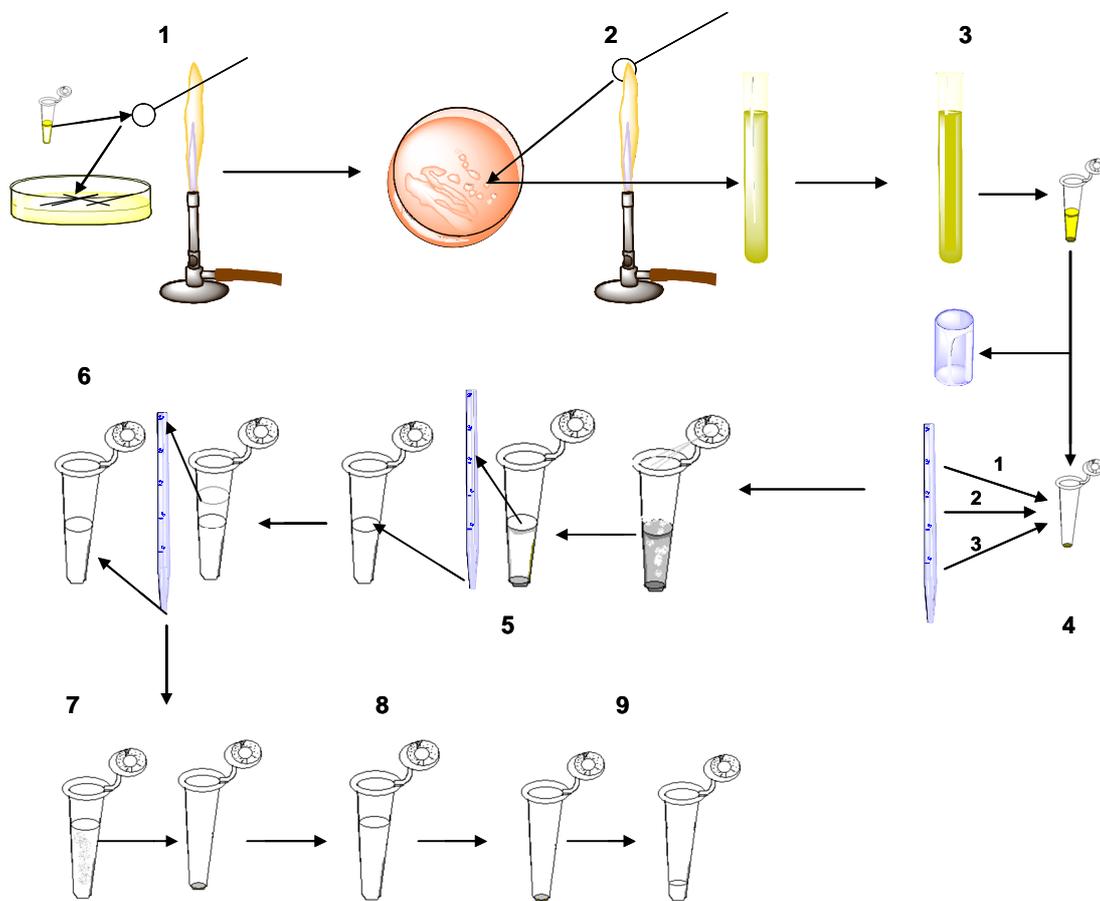
Consecutivamente, se provoca la separación de los medios en 2 fases por centrifugación tomando ventaja de la diferencia de densidad entre ellos, lo que posteriormente nos lleva a desechar el medio no polar junto con las trazas solubilizadas en él (Figura 28).

b) Precipitación de DNA con isopropanol y etanol absoluto. Con el objetivo de precipitar al BAC CH261-75C12 y las sales provenientes de los pasos anteriores para su posterior separación, se adiciona en exceso ya sea isopropanol o etanol absoluto. Dichos compuestos al encontrarse en una concentración saturada interaccionan con las cargas parciales positivas del agua con las que antes interaccionaban las cargas

parciales negativas del DNA y las sales presentes disminuyendo así, su solubilidad lo que promueve su precipitación por centrifugación (Figura 28).

- c) Eliminación de residuos salinos y remanentes de otros ácidos nucleicos. La pastilla generada se somete a lavado con etanol al 70% para separar los residuos salinos del DNA. Por último, la pastilla se resuspende en medio acuoso en donde los residuos de RNA se eliminan mediante la adición de una RNasa (ribonucleasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de RNA), y residuos de fragmentos de DNA por la acción de una exonucleasa (nucleasa que cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster de DNA lineal), obteniendo así al cromosoma artificial de bacteria puro (Figura 28).

En la Tabla 2 se muestra una comparación entre la cantidad de DNA obtenida utilizando los protocolos de purificación implementados para la purificación del BAC CH261-75C12, con los protocolos de purificación establecidos convencionalmente en el laboratorio para la extracción de plásmidos de menor tamaño, así como con los límites inferiores de extracción suministrados en los marbetes de los productos comerciales utilizados para la extracción de DNA a mediana y gran escala, cuya diferencia se muestra expresada de manera porcentual indicando la obtención de una mayor cantidad de DNA purificado.



**Figura 28: Resumen de los protocolos de purificación del BAC CH261-75C12.** 1) Cultivo Primario. Generación de colonias bacterianas hospederas para su aislamiento. 2) Precultivo. Aislamiento y reproducción de colonias del organismo hospedero. 3) Cosecha de Bacterias. Eliminación del medio de cultivo y concentración del organismo hospedero. 4) Lisis celular en medio alcalino. Rompimiento de membranas celulares y liberación del contenido celular. 5) Eliminación de residuos celulares de alto peso molecular. 6) Extracción por par de disolventes. Eliminación de moléculas de bajo peso molecular no polares y poco polares. 7) Precipitación de moléculas polares de bajo peso molecular por isopropanol o etanol absoluto. 8) Lavados con Etanol al 70%. Eliminación de residuos salinos de las soluciones utilizadas en los pasos anteriores. 9) Secado de pastilla y resuspensión. Resuspensión de DNA en medio acuoso, eliminación de residuos de RNA mediante la adición de RNasa y de fragmentos de DNA por la acción de una exonucleasa.

**Tabla 2:** Comparación de protocolos de purificación

<b>Protocolo de purificación</b>	<b>Cantidad extraída de BAC CH261-75C12 con los protocolos a establecer (µg)</b>	<b>Cantidad extraída de DNA con protocolos establecidos previamente en el laboratorio. (µg)</b>	<b>Cantidad esperada de extracción de DNA de productos comerciales. (µg)</b>	<b>Diferencia porcentual de la cantidad de DNA extraído por los protocolos establecidos.</b>
Pequeña escala	97.92	67.66	No se ocupó un Kit de extracción comercial.	+44.72%
Mediana escala	451.8	299.32	100	+50.94%
Gran escala	2883.6	1500	500	+92.24%

Las fracciones purificadas se deben de mantener a 4 °C preferentemente durante su uso como mantenimiento a corto plazo. Para su mantenimiento a mediano plazo la fracciones purificadas se pueden congelar a -20 °C sin embargo, se debe de evitar en la medida de lo posible la descongelación y congelación recurrente puesto que la formación de cristales de agua puede llegar a fragmentar el cromosoma artificial de bacteria.

En el caso del mantenimiento del BAC CH261-75C12 a largo plazo es preferible la introducción del BAC a su hospedero y realizar los cultivos de mantenimiento en glicerol como se muestra en la metodología de éste mismo trabajo (70).

- *Caracterización de las secuencias genómicas correspondientes al dominio  $\alpha$ -globina de pollo contenidas en el BAC CH261-75C12.*

Se llevó a cabo la caracterización del BAC CH261-75C12 con el objeto de obtener mayor detalle sobre la secuencia genómica de pollo incluida en este cromosoma artificial de bacteria; principalmente, para comprobar la presencia de las regiones genómicas del dominio  $\alpha$ -globina de pollo de interés como el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 y los genes  $\alpha$ -globina, además de revelar la identidad del DNA purificado a través de los protocolos de purificación establecidos en el presente trabajo.

a) Alineamientos de secuencias.

El primer acercamiento hacia la caracterización resultó producto de los alineamientos de la secuencia publicada del BAC CH261-75C12 (71), con las secuencias genómicas de referencia de *Gallus gallus* publicadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, la secuencia publicada del dominio  $\alpha$ -globina de pollo (72), y las secuencias publicadas de algunos elementos del dominio (Figura 29).

El primer alineamiento fue realizado entre la secuencia publicada del BAC CH261-75C12 y las secuencias genómicas de referencia de pollo, obteniéndose un 100% de identidad entre el cromosoma artificial de bacteria y una región del mini-cromosoma 14 de pollo correspondiente a 227 kb (Un porcentaje de identidad del 100% implica que las secuencias alineadas son idénticas).

El segundo alineamiento se ejecutó entre la secuencia publicada del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y la secuencia publicada del BAC CH261-75C12 en donde

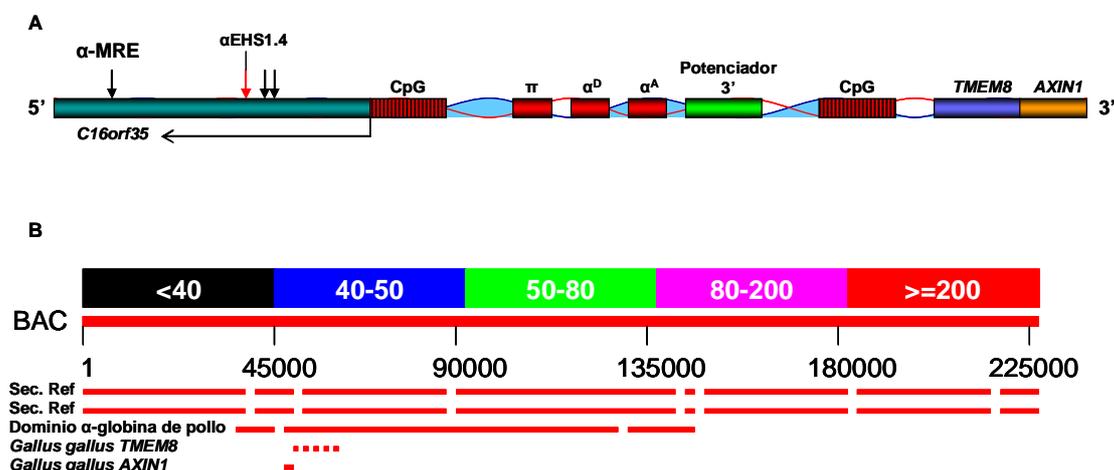
se puede observar una discrepancia responsable de la disminución del porcentaje de identidad en una unidad (99%). Cabe precisar que dicha discrepancia entre ambas secuencias en la región 5' (aproximadamente 15 kb), del dominio  $\alpha$ -globina, se puede atribuir a que cada secuencia publicada proviene de diferentes técnicas de secuenciación que poseen distintos grados de sensibilidad y de resolución, lo que hace despreciable dicha diferencia para efectos de que este resultado nos indica de manera bioinformática que el dominio  $\alpha$ -globina de pollo se encuentra contenido íntegro en el cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12.

Posteriormente, se realizaron los alineamientos entre la secuencia publicada del BAC CH261-75C12 con la secuencia publicada del gen TMEM8, el cual codifica para una proteína transmembranal y la secuencia publicada del RNA mensajero del gen AXIN 1, que codifica para la Axina1 de pollo; ambos considerados parte del dominio  $\alpha$ -globina de pollo ubicados en su región 3' (Figura 29). Dichos alineamientos resultaron en un 100% de identidad (Tabla 3), lo que confirma los datos de la integridad del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en el BAC CH261-75C12.

Tomando en cuenta tales datos, proseguimos con su corroboración experimental.

**Tabla 3:** Alineamientos de secuencias de pollo con la secuencia del BAC CH261-75C12

# de Acceso	Descripción	% de cobertura del BAC	Identidad Máxima
NW 001471457.1	Gallus gallus chromosome 14 genomic contig, reference assembly (based on Gallus_gallus-2.1)	97%	100%
NC 006101.2	Gallus gallus chromosome 14, reference assembly, (based on Gallus_gallus-2.1) >gb CM000106.2	97%	100%
AY016020	Gallus gallus alpha globin gene cluster, complete sequence	45%	99%
XM_425255.2	Gallus gallus TMEM 8	1%	100%
NM_204944	Gallus gallus axin 1, mRNA	0.5%	100%

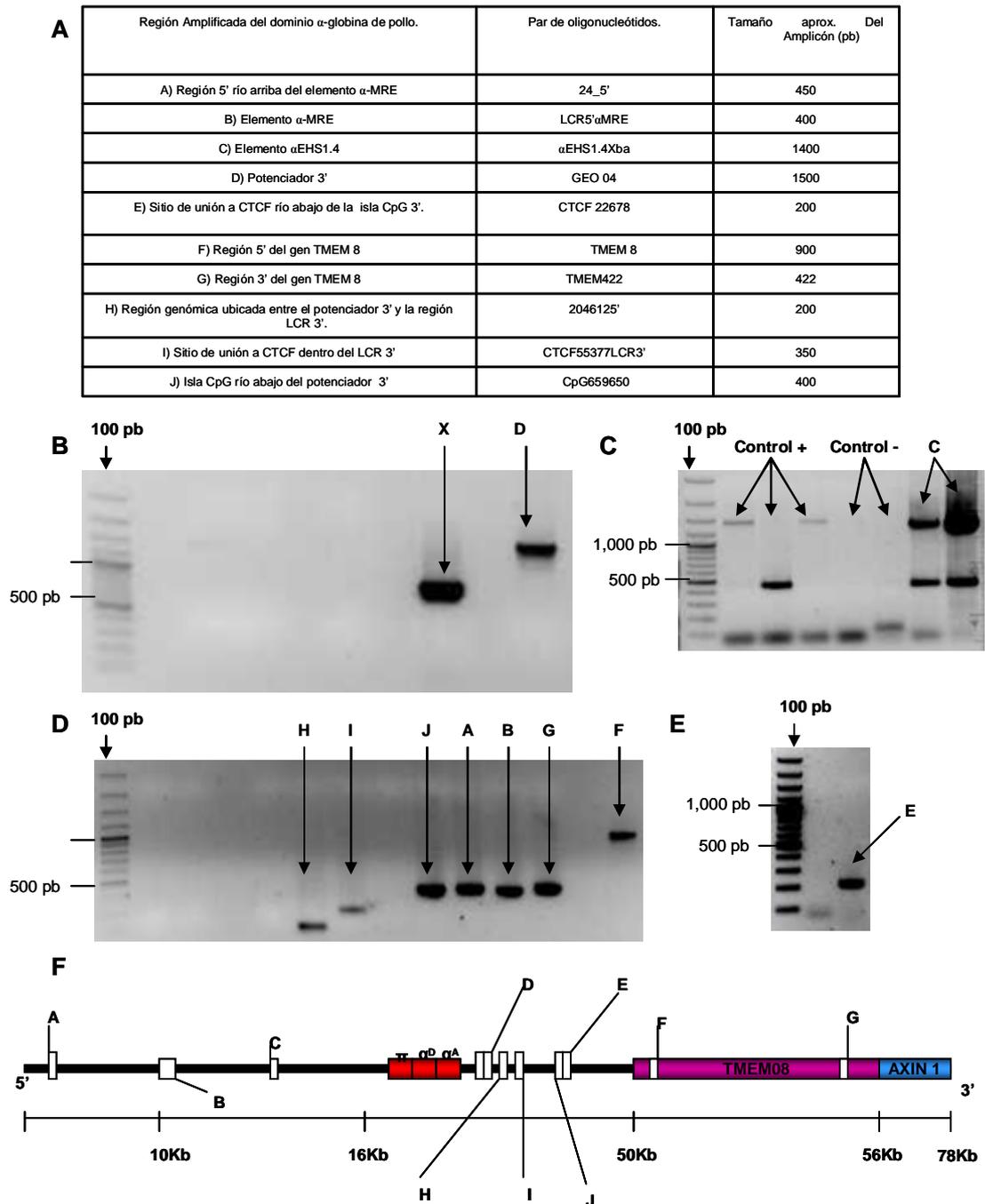


**Figura 29:** Alineamientos de secuencias genómicas de *Gallus gallus* con la secuencia genómica de pollo del BAC CH261-75C12. A) Representación esquemática del dominio α-globina de pollo, incluyendo en la región 3' a los genes *TMEM8* y *AXIN 1*. B) Representación gráfica del resultado de los alineamientos de las secuencias genómicas de *Gallus gallus* con la secuencia genómica de pollo del BAC CH261-75C12. La escala de color representa el número de “hits”, es decir de similitudes entre una secuencia y otra. Todas las secuencias al presentar una línea de color rojo, obtuvieron  $\geq 200$  “hits”, lo cual se ve reflejado en el porcentaje de identidad máxima que se presentan en la Tabla 3.

b) Amplificación por PCR de regiones genómicas correspondientes al dominio  $\alpha$ -globina de pollo.

Se realizó la amplificación por PCR de diversos elementos de regulación identificados y estudiados por nuestro grupo de investigación ubicados tanto río arriba y debajo de los genes  $\alpha$ -globina de pollo como el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4; además, se amplificaron secuencias correspondientes a los 3 promotores de los genes  $\alpha$ -globina ( $\pi$ ,  $\alpha^D$ ,  $\alpha^A$ ), una secuencia ubicada en la región 5' del dominio y una secuencia que se encuentra en el extremo 3' del marco abierto de lectura (ORF) del gen TMEM8 para corroborar de manera experimental su presencia dentro de la secuencia del BAC CH261-75C12 así como la integridad del dominio  $\alpha$ -globina de pollo contenido en dicho cromosoma artificial de bacteria. La amplificación se llevó a cabo a diferentes condiciones dependiendo del par de cebadores, cada uno correspondiente a una región del dominio (Figura 30), como se observan en la Tabla de la figura 30, utilizando como templado DNA de una fracción purificada.

La observación de bandas de tamaño esperado correspondiente al amplicón de cada una de las diversas secuencias de interés amplificadas (Figura 30), representan la primera evidencia experimental de la contención del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en el BAC CH261-75C12.



**Figura 30: Amplificación por PCR de regiones de interés del dominio  $\alpha$ -globina de pollo utilizando como templado el BAC CH261-75C12.** A) Tabla que incluye los pares de cebadores utilizados, la región del dominio  $\alpha$ -globina a los que corresponden y el tamaño del amplicón. B) Amplificación del elemento potenciador 3'. La primera banda corresponde a un error en la preparación de una dilución de pares de cebadores. C) Amplificación del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4; como control positivo se realizó la amplificación del delimitador a partir de un plásmido en el que fue clonado previamente; como control negativo en lugar de templado se utilizó agua desionizada. D) Amplificación de diferentes regiones ubicadas a lo largo del dominio  $\alpha$ -globina de pollo (F). E) Amplificación del sitio de unión a CTCF río abajo de la isla CpG 3'. F) Representación esquemática en donde se muestra la ubicación de cada región amplificada.

### c) Análisis de Restricción.

1- Análisis bioinformático y ensayos de restricción del BAC CH261-75C12 con la endonucleasa de restricción Mlu I.

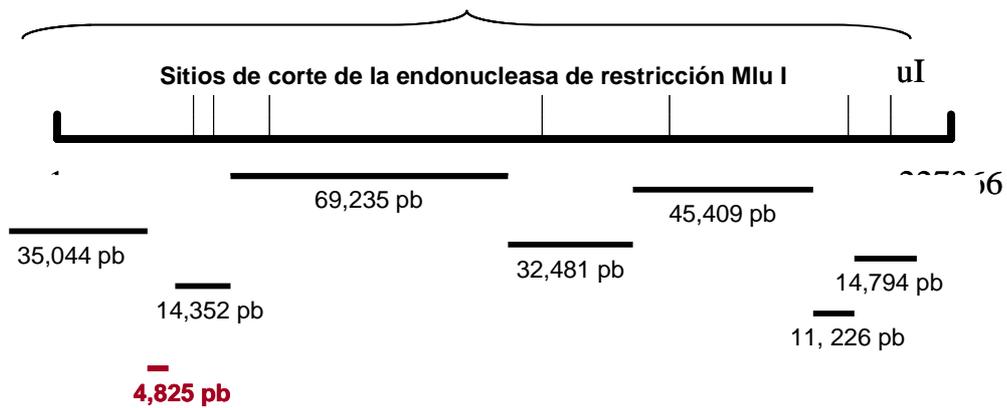
Este ensayo se realizó con el objetivo de revelar la identidad del DNA purificado mediante el uso de los protocolos de purificación implementados y descritos en el presente trabajo.

Primero, en la Figura 31 A se presenta el patrón de restricción del BAC CH261-75C12 y los tamaños de los fragmentos de DNA generados por la actividad de la endonucleasa de restricción Mlu I obtenidos a partir de un análisis bioinformático utilizando la secuencia publicada de dicho cromosoma artificial de bacteria. Tal enzima, fue elegida sobre otras puesto que en dicho análisis se predice la generación de un fragmento mínimo de 4,825 pb; es decir, el fragmento más pequeño generado a partir de la digestión del BAC CH261-75C12 con dicha endonucleasa. De manera experimental, la presencia por triplicado de una banda correspondiente a dicho fragmento nos sugiere que la identidad del DNA de la fracción purificada corresponde al cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12 (Figura 31 B).

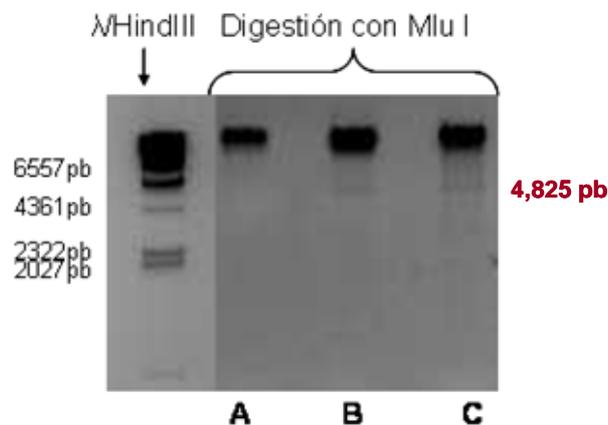
2- Análisis bioinformático y ensayos de restricción del BAC CH261-75C12 con la endonucleasa Nhe I.

Mediante este acercamiento, además de buscar corroborar la identidad del DNA purificado, se puede obtener evidencia experimental adicional de la presencia e integridad del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en la secuencia del cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12.

### A Región genómica de pollo incluida en el BAC CH261-75C12



### B



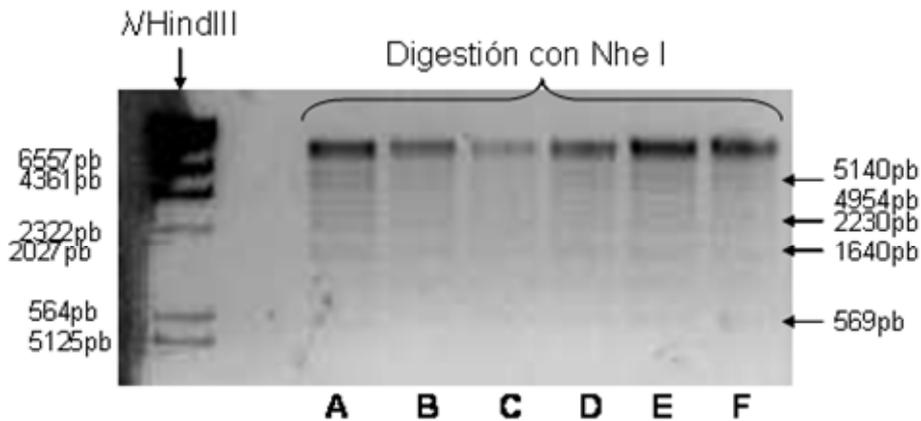
**Figura 31: Análisis de restricción de la región genómica de pollo del BAC CH261-75C12 con la endonucleasa de restricción Mlu I.** A) Patrón de restricción de la región genómica de pollo incluida en el cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12, generado por la digestión de la enzima de restricción Mlu I. B) Digestión enzimática por triplicado de una fracción purificada. Se observa la presencia de una banda de aproximadamente de 4,800 pb que corresponde al fragmento de menor tamaño generado.

En primer lugar, en la tabla 4 se presenta la comparación del patrón de restricción bioinformático del BAC CH261-75C12 con el patrón de restricción bioinformático del dominio  $\alpha$ -globina de pollo, ambos generados por la actividad de la endonucleasa de restricción Nhe I en los que se puede resaltar que diversos fragmentos de DNA generados por la actividad de dicha enzima, tanto en la secuencia del cromosoma artificial de bacteria, como en la secuencia dominio, son de tamaños muy similares como era de esperarse, tomando en

cuenta que el dominio  $\alpha$ -globina de pollo se encuentra contenido en la secuencia genómica de *Gallus gallus* incluida en el BAC CH261-75C12. La endonucleasa Nhe I fue elegida sobre otras de manera similar al caso anterior puesto que por el tamaño de diversos fragmentos de DNA generados por la actividad de tal enzima de restricción, estos se pueden visualizar y diferenciar mediante su separación por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 32). Para esto se realizó por triplicado la digestión del DNA de una fracción purificada con la enzima de restricción Nhe I. La presencia en el gel de las bandas de tamaño correspondiente a los fragmentos compartidos entre ambos patrones de restricción, conforman la prueba tanto de que el DNA de la fracción purificada es identificado como el BAC CH261-75C12; así como la contención del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en dicho cromosoma artificial de bacteria.

**Tabla 4:** Comparación de los patrones de restricción del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y de la región genómica de pollo incluida en el BAC CH261-75C12 generado por la actividad de la endonucleasa de restricción Nhe I.

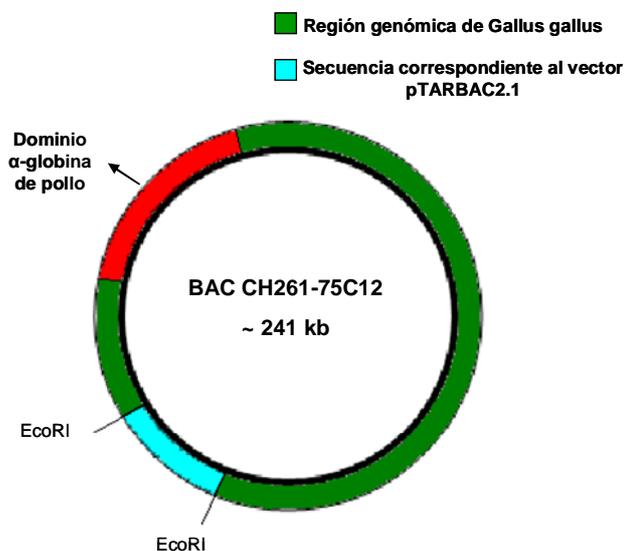
<b>Patrón de restricción generado por la actividad de Nhe I sobre la secuencia del BAC CH261-75C12</b>	<b>Patrón de restricción generado por la actividad de Nhe I sobre la secuencia del dominio <math>\alpha</math> globina de pollo</b>
208	208
327	327
569	569
1639	1640
2229	2230
2238	2234
4954	4982
5140	5134



**Figura 32: Análisis de restricción de la región genómica de pollo del BAC CH261-75C12 con la endonucleasa de restricción Nhe I.** Se observa la presencia de diversas bandas que corresponden según su peso molecular a fragmentos del dominio  $\alpha$ -globina que se encuentra incluido en la región genómica de *Gallus gallus* contenida en el cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12.

En conjunto, estos resultados son evidencia suficiente para confirmar que el DNA purificado a partir de los tres protocolos de purificación implementados y descritos en el presente trabajo, corresponde al cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12 y que incluye en su secuencia aproximadamente 227 kb (que representan el 95% de la secuencia total del BAC), que corresponden a una región del mini-cromosoma 14 de pollo (de 15,200 kb de extensión total), en el cual se encuentra contenido el dominio  $\alpha$ -globina de pollo completo

(Figura 33).



**Figura 33: Representación gráfica del BAC CH261-75C12.** La región genómica de pollo corresponde al mini cromosoma 14 de *Gallus gallus* en donde se ubica el dominio  $\alpha$ -globina de pollo. En la secuencia correspondiente al vector pTARBAC 2.1 se incluye el origen de replicación autónomo (replicón F), y el gen de resistencia a cloranfenicol.

## **V DISCUSIÓN:**

La ingeniería recombinogénica se presenta hoy en día como una alternativa experimental que soporta y complementa los estudios sobre la expresión de los genes eucariontes y su regulación, puesto que se pueden mantener en un estado inerte en clonas de cromosomas artificiales de levaduras o en cromosomas artificiales de bacteria, extensas regiones codificantes y las regiones genómicas que las enmarcan incluyendo así todas las secuencias que poseen una relevancia de regulación potencial, así como las distancias entre genes y elementos de control permitiendo su uso como transgén para su estudio en un contexto que se acerca más al natural. Además, permite la mutagénesis en sitios específicos de manera rápida y eficiente mediante la recombinación homóloga como mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o reemplazos disminuyendo la producción de alteraciones indeseadas (60).

En el presente trabajo, se muestran el planteamiento y los primeros avances para establecer e implementar las técnicas de la ingeniería recombinogénica en nuestro laboratorio como una alternativa de manipulación genética para estudiar desde las perspectivas que permiten dichas herramientas, el mantenimiento y regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo, así como la función y características de los factores genéticos y epigenéticos que participan en dichos fenómenos y en la expresión de los genes  $\alpha$ -globina. Dentro de éstos, particularmente nos interesa esclarecer la participación del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 y la asociación del factor nuclear CTCF y otras proteínas a dicha secuencia, entre otras propiedades (36, 53).

Es por tanto y también por las características de los cromosomas artificiales de bacteria, así como basándonos en la información publicada acerca de la

biblioteca genómica de pollo CHORI-261 (69), y un estudio sobre la formación de asas de cromatina en el dominio  $\alpha$ -globina de pollo en el que se utilizó como herramienta el cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12 (68), que hemos elegido implementar dicha alternativa de manipulación genética utilizando tal cromosoma artificial de bacteria, el cual incluye diversas secuencias que corresponden al dominio  $\alpha$ -globina de pollo y regiones genómicas de *Gallus gallus*; información que hemos obtenido y demostrado en el presente trabajo.

La primera etapa dentro de este proyecto, consistió en el diseño e implementación de las metodologías de purificación y el establecimiento de las condiciones de manutención del BAC CH261-75C12 a partir de los cultivos bacterianos hospederos de dicho vector. Los protocolos de purificación descritos en el presente trabajo fueron diseñados como una adaptación de los utilizados por otros grupos de investigación (77-79), y aquellos ya previamente establecidos en nuestro laboratorio para la purificación de plásmidos de hasta 150 kb (80), de tal modo que, los tres protocolos establecidos cumplen con el principio de lisis celular en medio alcalino. La principal discrepancia entre los protocolos establecidos y sus predecesores a mediana y gran escala es el uso del procedimiento de extracción de DNA a partir de la separación de fases utilizando fenol:cloroformo:isoamílico en lugar de la extracción de DNA por cromatografía de intercambio aniónico en columna, debido a que vectores de tamaños mayores a 50 kb presentan una mayor dificultad de elución por su afinidad a la fase estacionaria de la columna cromatográfica y el BAC CH261-75C12 es un vector circular de DNA de aproximadamente 240 kb de magnitud (Figura 33) (80).

Esta modificación resultó en la obtención de una mayor cantidad de DNA purificado en comparación con los valores promedio de DNA extraído por los protocolos predecesores, así como en confrontación con los límites inferiores de extracción de DNA suministrados en los marbetes de los productos comerciales utilizados en los protocolos de extracción a mediana y gran escala (78), lo cual se puede observar en la tabla 4 en donde se presentan las diferencias porcentuales de cada protocolo. La diferencia porcentual (Figura 34), representa que tanto DNA fue extraído de más en los protocolos implementados en el presente trabajo de tal manera que se obtuvo un 44.72%, 50.94% y 92.24% más de DNA purificado al utilizar los protocolos de purificación diseñados e implementados en el presente trabajo tanto para pequeña, como para mediana y gran escala respectivamente; indicando una mayor eficiencia de extracción en términos de cantidad de DNA purificado de la metodología implementada para la purificación del BAC CH261-75C12.

$$\frac{(A2 - A1) \times 100}{A1} = +\%$$

$$\frac{A2}{A1} - 100 = +\%$$

**Figura 34: Fórmulas para la obtención de la diferencia porcentual.** Donde A2, es la cantidad de DNA extraído mediante el nuevo protocolo establecido y A1 es la cantidad de DNA extraído mediante los protocolos previamente establecidos, o la cantidad esperada en el marbete de los productos comerciales.

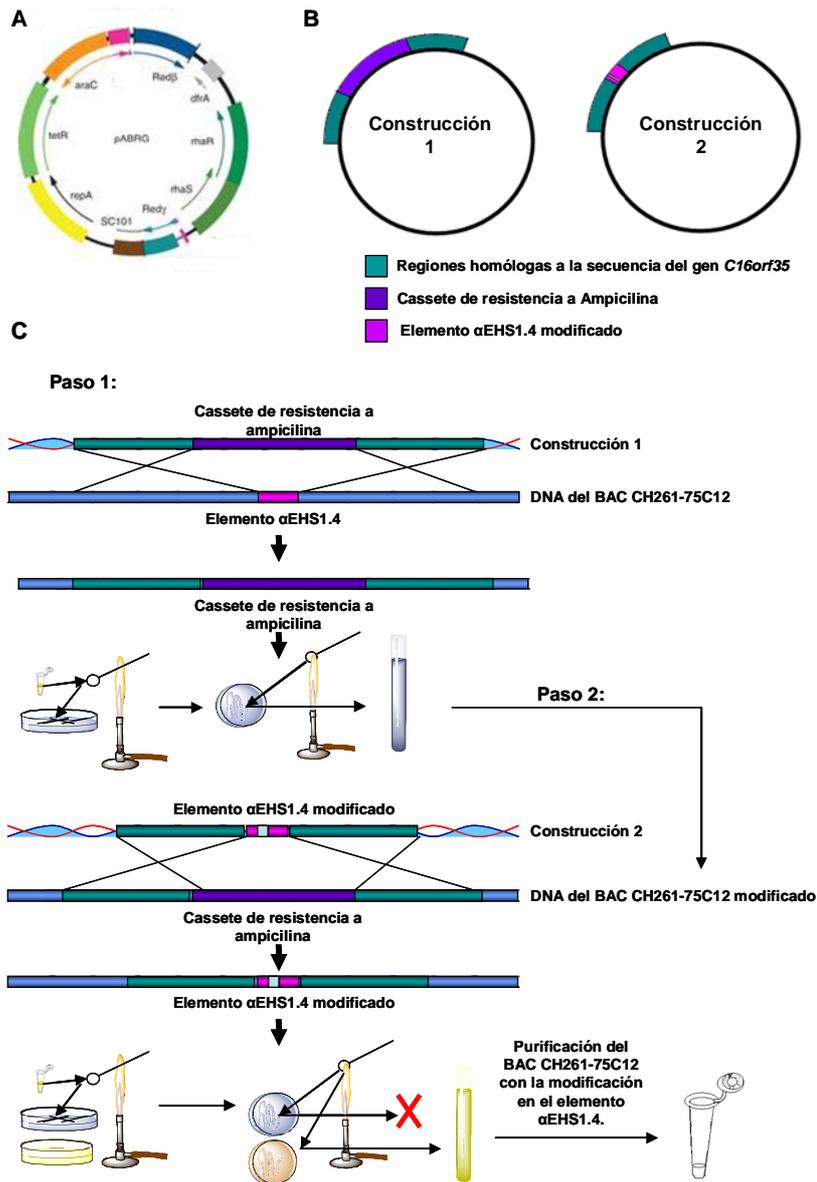
En la siguiente fase, confirmamos de manera experimental que el DNA purificado mediante éstas técnicas es el cromosoma artificial de bacteria CH261-75C12 y la contención íntegra del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en su secuencia. Estos resultados adquieren gran importancia como la base de la implementación de las técnicas de ingeniería recombinogénica, ya que apoyan y permiten la posibilidad de utilizar al BAC CH261-75C12 para la manipulación por recombinación homóloga de secuencias correspondientes al dominio  $\alpha$ -

globina de pollo para su estudio y el análisis del efecto que éstos tienen sobre la expresión de los genes  $\alpha$ -globina de pollo, la formación y mantenimiento de la estructura del dominio y los fenómenos epigenéticos participantes en el contexto del dominio  $\alpha$ -globina de pollo mismo y en un contexto muy parecido al natural a partir de ensayos de transfección en células y líneas celulares de pollo.

De manera particular, dichas técnicas nos permitirán profundizar nuestro análisis del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4, corroborando y ampliando la información obtenida en estudios previos (36, 53), y permitiendo así obtener evidencia que nos lleve a entender mejor los mecanismos mediante los cuales funcionan secuencias de regulación de características similares y además, que nos permita apoyar o corregir el modelo que hemos propuesto para la función del delimitador  $\alpha$ EHS1.4 dentro del dominio  $\alpha$ -globina de pollo (Figura 22 B).

Por ejemplo; las tecnologías de recombinación homóloga en bacterias como los sistemas inducibles RecET y Red (Figura 35 A), que se basan en la mutación *sbca* la cual activa la expresión de los genes *recE* y *recT* codificados en el genoma del profago críptico RAC de cepas *E. coli* K12, nos abren múltiples opciones de modificación en el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4, al permitir la modificación de DNA directamente a partir de pequeños cassettes específicos de dsDNA generados por PCR sin la necesidad de contener grandes homologías (50, 59, 61-67).

Dentro de dichas modificaciones, tenemos concebidas la delección de la secuencia completa del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4, la mutación o delección puntual de su sitio de unión al factor nuclear CTCF y delecciones controladas acortando gradualmente la secuencia de dicho elemento (Figura 35 B y C).



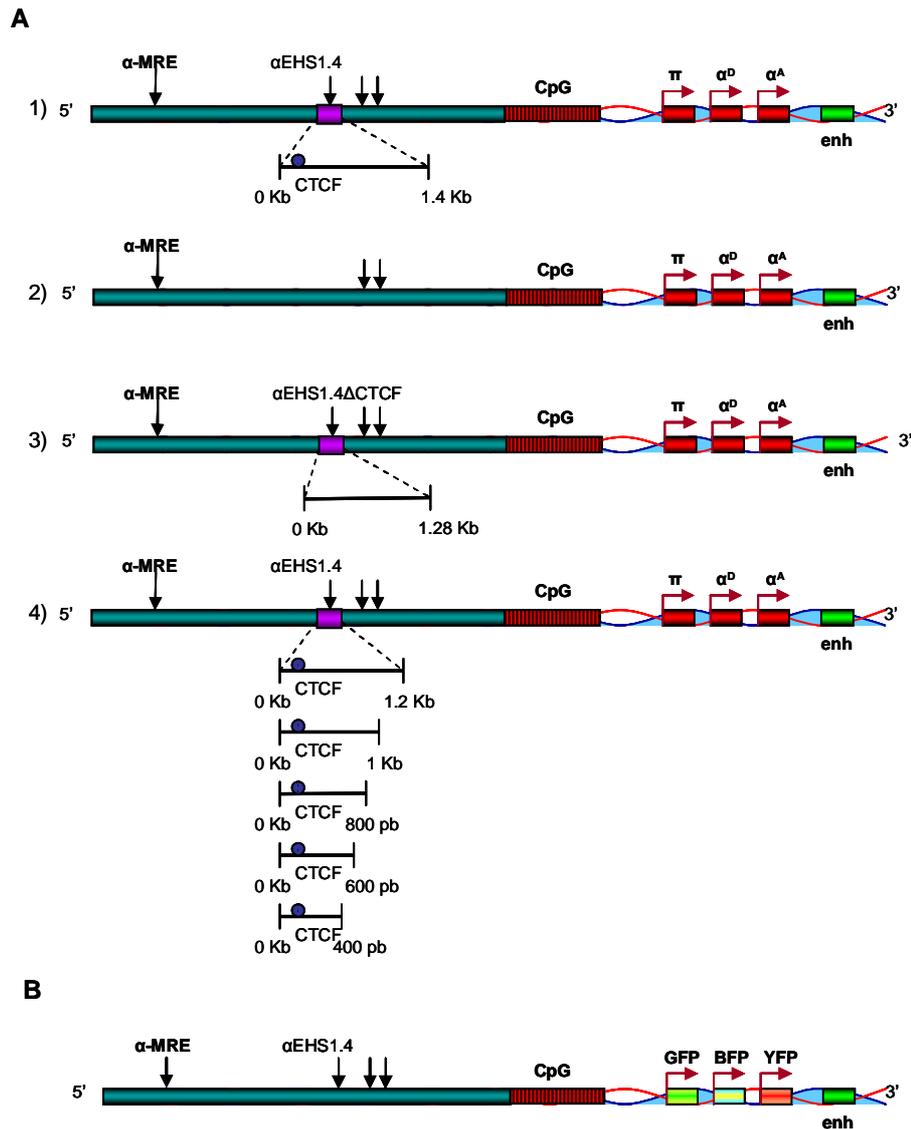
**Figura 35: Modificación del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 por recombinación homóloga en bacterias.** A) El plásmido pABRG posee a los genes del sistema de recombinación homóloga en bacteria Red- $\gamma$  y Red- $\beta$  que son controlados por promotores inducidos por L-rhamnosa y L-arabinosa respectivamente lo que permite controlar el sistema (81). B) Construcciones generadas para la modificación del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 del dominio  $\alpha$ -alobina

C) Paso 1: La construcción 1 en forma lineal se transforma en la bacteria hospedera (deficiente de la exonucleasa RecBCD), del BAC CH261-75C12 junto con el plásmido que contiene el sistema de recombinación regulado por promotores inducibles. Se adicionan los reactivos inductores para que ocurran los eventos de recombinación deseados. Posteriormente se realiza la selección de bacterias que contengan al BAC CH261-75C12 modificado por la resistencia a un antibiótico conferida por la integración de un cassette de resistencia en sustitución del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 nativo. Se aíslan y reproducen las bacterias resistentes y se transforma en ellas la construcción 2 linealizada. Paso 2: Nuevamente se adicionan los reactivos inductores para que tenga lugar un segundo evento de recombinación homóloga de tal manera que así se integra el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 modificado. Por último se realiza una selección doble en donde si se observan bacterias resistentes al antibiótico del paso anterior dichas bacterias se descartan y se repite el paso 2 hasta que solo se presente resistencia a cloranfenicol conferida por un gen de resistencia del BAC CH261-75C12, lo que implica que se ha substituido el cassette de resistencia integrado en el paso 1 con el elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 modificado.

La primera de estas modificaciones, se realizará con la intención de revelar la función del delimitador dentro del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y el efecto sobre la expresión de los genes  $\alpha$ -globina y en búsqueda también de corroborar y apoyar evidencia previa que hemos obtenido (36, 53); la segunda, se efectuará con el objetivo de analizar algunas características del factor nuclear CTCF y el papel que juega la asociación de dicho elemento nuclear en el funcionamiento del delimitador  $\alpha$ EHS1.4 y por último, la modificación gradual de la secuencia del delimitador  $\alpha$ EHS1.4 podría ser una alternativa para revelar al elemento mínimo o secuencia mínima que provee a la hipersensibilidad eritroide específica de 1.4 kilobases las dos propiedades de un elemento delimitador (36, 53), contando con la ventaja, sobre otras alternativas experimentales, de que dicho estudio se realizaría en un contexto mucho más parecido al natural a partir de ensayos de transfección en células o líneas celulares eritroides (Figura 36 A).

Por otro lado, también nos hemos planteado la posibilidad de modificar los marcos abiertos de lectura (ORF) de los genes  $\alpha$ -globina, introduciendo algún marcador exógeno por cada uno que nos permita posteriormente analizar el efecto de las alteraciones que generemos sobre los elementos de regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo a partir de ensayos de transfección, de manera que podamos diferenciar entre la expresión de los genes contenidos en el cromosoma artificial de bacteria y los endógenos (Figura 36 B).

Además, también se han publicado algunos trabajos en donde presentan la posibilidad de incluso estudiar la estructura cromatínica del dominio, puesto que mencionan que al integrar establemente una región genómica contenida en un cromosoma artificial de bacteria en el genoma de una célula...



**Figura 36: Posibilidades experimentales para el análisis del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 y la asociación de CTCF a dicha secuencia en el contexto del dominio  $\alpha$ -globina de pollo.** A) Manipulación genética del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 para su estudio en el contexto del dominio  $\alpha$ -globina de *Gallus gallus*. 1) Representación esquemática del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4. 2) Delección del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 para el análisis del papel de dicha secuencia en la regulación de la estructura del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y en el control de la expresión de los genes  $\alpha$ -globina. 3) Delección del sitio de unión a CTCF del elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 para la exploración de la participación de dicho factor nuclear en el funcionamiento del elemento delimitador. 4) Delección gradual de secuencias pertenecientes al elemento delimitador  $\alpha$ EHS1.4 para la definición del núcleo funcional de dicho elemento de regulación en el contexto del dominio  $\alpha$ -globina de pollo. B) Integración de secuencias marcadoras dentro de los marcos abiertos de lectura de los genes  $\alpha$ -Globina de pollo que permitirán distinguir entre la expresión de los genes contenidos en el BAC CH261-75C12 de los genes  $\alpha$ -globina endógenos, en análisis realizados al utilizar la secuencia del cromosoma artificial de bacteria en ensayos transgénicos en células o líneas celulares de estirpe eritroide.

...o línea celular, ésta adopta una configuración cromatínica muy similar a la nativa e incluso, en algunos casos prácticamente la misma configuración (50, 59).

Es así, que la ingeniería recombinogénica ofrece vastas posibilidades experimentales que podemos idear, plantear, desarrollar y aprovechar para el estudio de la regulación del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y el control sobre la expresión de los polipéptidos tipo  $\alpha$  que forman parte de la hemoglobina relacionando tal información con algunas hemoglobinopatías que pueden ser resultado de modificaciones en dichos procesos moleculares. Es ahí en donde recae la importancia de la implementación de dichas técnicas así como de otras alternativas.

## **VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:**

Hemos establecido los protocolos de purificación para la obtención de cromosomas artificiales de bacteria a partir de un cultivo de su organismo hospedero, además de comprobar la presencia e integridad del dominio  $\alpha$ -globina de pollo en un cromosoma artificial de bacteria; el BAC CH261-75C12, lo que implica su candidatura para utilizarlo como herramienta para la implementación de técnicas de ingeniería recombinogénica en nuestro laboratorio, lo cual representa una importante alternativa que creemos nos dará acceso a múltiples posibilidades experimentales para el estudio y entendimiento del dominio  $\alpha$ -globina de pollo y los fenómenos que participan en la regulación de dicha estructura cromatínica así como, aquellos que tienen efecto sobre la expresión de los genes  $\alpha$ -globina de pollo.

Además, el aprovechamiento de la recombinación homóloga en bacterias se podrá utilizar como una vía alterna de manipulación genética para la obtención de construcciones recombinantes que por vías clásicas se ve complicada su formación. Para esto, todavía se requiere de mucho trabajo.

La siguiente etapa en este proyecto, consistirá en el establecimiento de los protocolos de integración y manipulación por recombinación homóloga inducible en bacteria de cromosomas artificiales de bacterias utilizando al BAC CH261-75C12 para la obtención de modificaciones y construcciones recombinantes (Figuras 35 y 36).

Posteriormente, se requerirá de la implementación de las tecnologías y condiciones experimentales para la integración del vector modificado como transgén en el genoma de células y líneas celulares eritroides (ensayos de transfección), además de las técnicas requeridas para el análisis e

interpretación de las modificaciones realizadas, así como de aquellas que permitan explorar la integridad del transgén, el número de copias del mismo en el genoma del organismo transgénico, y las regiones genómicas en los que se ha integrado, lo que constituye la última fase de éste proyecto.

## VII REFERENCIAS:

1. Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A. (2006); *Conceptos de Genética* (8va ed.); Madrid; Pearson.; pp 1-15.
2. Nelson D.L., Cox M.M., (2008); *Lehninger: Principles of Biochemistry* (5a ed.); Nueva York; Freeman; pp. 271-298, 303-319, 947-960, 1003-1014
3. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T., (2011); *Lewin's: GENES X*; Ontario Canada; Jones and Bartlett Publishers; pp 1-26, 220, 79-98.
4. Kay L.E., (2000); *Who wrote the book of life?*; Stanford, California; Writing Science; pp. 1-37.
5. Prasanth K.V., Spector D.L. (2009); Eukaryotic regulatory RNA's: an answer to the genome complexity conundrum? ; *Genes & Development*; 21, 11-42.
6. Weake V.M., Workman J.L. (2010); Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms; *Nature Reviews/Genetics*; 11, 426-427.
7. Pesole Graziano (2008); What is a gene? An updated operational definition; *Gene*; 317, 1-4.
8. Dinger M.E., Pang K.C., Mercer T.R., Mattick J.S. (2008); Differentiating Protein-Coding and Noncoding RNA: Challenges and Ambiguities; *PLoS Computational Biology*; 4 (11); 1-5.
9. Brown T.A., (1999); *Genomes*; Nueva York; Wiley-Liss; pp. 1-12.
10. Campbell A.M., Heyer L.J., (2003); *Discovering: Genomics, Proteomics & Bioinformatics*; Nueva York; Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHPress); pp.1-15.
11. Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D., (2007); *EPIGENETICS*; Nueva York; Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHPress); pp.25-39

12. Campos E.I, Reinberg D., (2009); Histones: Annotating Chromatin; *The Annual Review of Genetics*; 43, 559-599.
13. Wolffe A.P., Hayes J.J., (1999); Chromatin disruption and modification; *Nucleic Acids Research*; 27(3), 711-720.
14. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., (2007); *Biochemistry (6a ed.)*; Nueva York; W.H. Freeman & Company; Figura 31-19.
15. Beisel C., Paro R., (2011); Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms; *Nature Reviews Genetics*; 12, 123-135.
16. Fussner E., Ching R.W., Bazett-Jones D.P., (2011); Living without 30 nm chromatin fibers; *Trends in Biochemical Sciences*; 36 (1), 1-6
17. Purves W.K., Sadava D., Orians G.H., Heller H.C., (1997); Life: *The Science of biology (5a ed.)*; Nueva York; Sinauer Associates, Sunderland, MA, and W.H. Freeman. Figura 8.
18. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997); Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution; *Nature*; 389 (6648), 251-60.
19. Felsenfeld G., Groudine M., (2003); Controlling the double helix; *Nature*; 421(6921) 448-53.
20. Zofall M., Grewal S.I.S., (2006); Swi6/HP1 Recruits a JmjC Domain Protein to Facilitate Transcription of Heterochromatic Repeats; *Molecular Cell*; 22, 681-692.
21. Harrison B.R., Yazgan O., Krebs J.E., (2009); Life without RNAi: noncoding RNAs and their functions in *Saccharomyces cerevisiae*; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 87,767-779.

22. Razin S.V., Iarovaia O.V., Sjakste N., Sjakste T., Bagdoniene L., Ryndithc A.V., Eivazova E.R., (*et al*) (2007); Chromatin Domains and Regulation of Transcription; *Journal of Molecular Biology*; 369, 597-607.
23. Grewal S.I.S., Elgin S.C.R., (2007); Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin; *Nature*; 44, 399-406.
24. West A.G., Gaszner M., Felsenfeld G. (2002); Insulators: many functions, many mechanisms; *Genes & Development*; 16, 271-288.
25. Bushey A.M., Dorman E.R., Corces V.G. (2009); Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance; *Molecular Cell*; 31(1), 1-9.
26. Moltó E., Fernández A., Montoliu L. (2009); Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains; *Briefings in functional genomics and proteomics*; 8(4), 283-296.
27. Recillas-Targa F., Pikaart M. J., Burgess-Beusse B., Bell A.C., Litt M.D., West A.G., Gaszner M., Felsenfeld G., (2002); Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken  $\beta$ -globin insulator are separable activities; *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*; 99 (10), 6883-6888.
28. Burgess-Beusse B., Farrell C., Gaszner M., Litt M., Mutskov V., Recillas-Targa F., Simpson M., West A., Felsenfeld G., (2002); The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin; *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*; 99 (4), 16433-16437.
29. Phillips J.E., Corces V.G., (2009); CTCF: Master Weaver of the Genome; *Cell*; 137, 1194-1211.
30. Ohlsson R., Lobanenkov V., Klenova E., (2010); Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression?; *BioEssays*; 32, 37-50.

31. Martin D., Pantoja C., Fernández-Miñán A., Valdes-Quezada C., Moltó E., Matesanz F., Bogdanovic O., de la Calle-Mustienes E., Domínguez O., Taher L., Furlan-Magaril M., Alcina A., Cañón S., Fedetz M., Blasco M.A., Pereira P.S., Ovcharenko I., Recillas-Targa F., Montoliu L., Manzanares M., Guigó R., Serrano M., Casares F., Gómez-Skarmeta J.L., (2011); Genome-wide CTCF distribution in vertebrates defines equivalent sites that aid the identification of disease-associated genes; *Nature Structural & Molecular Biology*; 18 (6), 708-714.
32. Cuddapah S., Jothi R., Schones D.E., (et al), (2008); Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains; *Genome Research*; 19, 24-32.
33. Feeney K.M., Wasson C.W., Parish J.L.; Cohesin: a regulator of genome integrity and gene expression; *Journal of Biochemistry*; 428, 147-161.
34. Arzate-Mejía R.G., Valle-García D., Recillas-Targa F., (2011); Signaling epigenetics\_ Novel insights on cell signaling and epigenetic regulation; *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*; 63(10), 907-921.
35. Carey M.F., Peterson C.L., Smale S.T., (2009) ; *Transcriptional Regulation in Eukaryotes(2nda ed.)*; Nueva York; Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHPress); pp. 1-41.
36. Furlan-Magaril M., Reboollar E., Guerrero G., Fernández A., Moltó E., González-Buendía E., Cantero M., Montoliu L., Recillas-Targa F., (2010); An insulator embedded in the chicken  $\alpha$ -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression; *Nucleic Acids Research*; 2010, 1-15.

37. Dean A., (2006); On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression; *Trends in Genetics*; 22(1), 43-45.
38. West A.G., Fraser P. (2005); Remote Control of Gene Expression; *Human Molecular Genetics*; 14, R101-R111.
39. Long X., Miano J.M.(2007); Remote Control of Gene Expression; *The Journal of Biological Chemistry*; 22, 15941-15945
40. Oh S.J., Jeong J.S., Kim E.H., Yi N.R., Yi S.I., Jang I.C., Kim Y.S., (et al) (2005); Matrix attachment region of the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number dependence in transgenic rice plants; *Plant Cell Rep.*; 24, 145-154.
41. Linnemann A.K., Krawetz S.A., (2009); Maintenance of a functional higher order chromatin structure: The role of the nuclear matrix in normal and disease states; *Gene therapy & Molecular Biology*; 13, 231-243.
42. Köhler A., Hurt E., (2010); Gene Regulation by Nucleoporins and Links to Cancer; *Molecular Cell*; 38, 6-15.
43. Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S.W.M., Solovei I, Brugman W., Gräf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L., van Steensel B., (2010); Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina interactions during Differentiation; *Molecular Cell*; 38, 603-613.
44. Naumova N., Dekker J., (2010); Integratin one-dimensional and three-dimensional maps of genomes; *Journal of Cell Science*; 123, 1979-1988.
45. Fraser P., Bickmore W., (2007); Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation; Nature Publishing Group; 447, 413-417.

46. Hager G.L., McNally J.G., Misteli T., (2009); Transcription Dynamics; *Molecular Cell*; 35, 741-753.
47. Lanctôt C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer., (2007); Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation or gene expression in three dimensions; *Nature Reviews Genetics*; 8, 104-115.
48. Jablonka E., Lamb M.J., (2002); The changing Concept of Epigenetics; *Annals New York Academy of Sciences*; 981, 82-96.
49. Choudhuri S., Cui Y., Klaassen C.D., (2010); Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences; *Toxicology and Applied Pharmacology*; 245, 378-393.
50. Wang S., Zhao Y., Leiby M.A., Zhu j., (2009); Studying human telomerase gene transcription by a chromatinized reporter generated by recombinase-mediated targeting of a bacterial artificial chromosome; *Nucleic Acids Research*; 37(17), e111 1-10.
51. Orkin S. H. (1995); Regulation of globin gene expression in erythroid cells; *European Journal of Biochemistry*; 231, 271-281.
52. Rincón.Arano H., Guerrero G., Valdes-Quezada., Recillas-Targa F., (2009); Chicken  $\alpha$ -Globin Switching Depends on Autonomous Silencing of the Embryonic  $\pi$  Globin Gene by Epigenetics Mechanisms; *Journal of Cellular Biochemistry*; 108, 675-687.
53. Valadez-Graham V., Razin S.V., Recillas-Targa F., (2004); CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain; *Nucleic Acids Research*; 32(4), 1354-1362.
54. Hardison R.C. (2008); Globin genes on the move; *Journal of Biology*; 7, 35.1-35.5.

55. Schechter A.N. (2008); Hemoglobin research and the origins of molecular medicine; *Blood*; 112, 3927-3938.
56. Higgs D.R., Weatherall D.J. (2009); The Alpha Thalassaemias; *Cellular and Molecular Life Sciences*; 66, 1154-1162.
57. Loudinkova E.S., Iarovaia O.V., Scherrer K., Razin S.V. (2001); Regulation of globin genes expression: New Findings made with the chicken domain of  $\alpha$  globin genes; *Gene Therapy and Molecular Biology*; 6, 149-157.
58. Farrar D., Rai S., Chernukhin I., Jagodic M., Ito Y., Yammine S., Ohlsson R., Murrell A., Klenova E., (2009); Mutational Analysis of the Poly(ADP-ribosylation) Sites of the Transcription factor CTCF Provides an Insight into the Mechanisms of its Regulation by Poly(ADP-ribosylation); *Molecular Cell Biology*; doi:10.1128/MCB.00/209
59. Muyrers J.P.P., Zhang Y., Stewart A.F., (2001); Techniques: Recombinogenic engineering – new options for cloning and manipulating DNA; *Trends in Biochemical Sciences*; 26 (5), 325-331.
60. Copeland N.G., Jenkins N.A., Court D.L., (2001); Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics; *Nature Reviews Genetics*; 2, 769-779.
61. Peterson K.R., (2003); Transgenic mice carrying yeast artificial chromosomes; *Expert reviews in molecular medicine*; 5, 1-25.
62. Kreuzer H., Massey A., (2001); *Recombinant DNA and Biotechnology (2nda ed.)*; Washington E.U.A; ASM Press; pp.1-115, 275-301.
63. Madigan M.T., Martinko J.M, Parker J., (2006); *Brock: Biología de los Microorganismos (10ma ed.)*; Madrid; pp. 265-266 y 276-297.

64. Askautrud H.A., Gjernes E., Storvold G.L., Lindeberg M.M., Thorsen J., Prydz H., Frengen E., (2009); Regulated expression of a transgene introduced on an oriP/EBNA-I PAC shuttle vector into human cells; *BMC Biotechnology*; 9:88.
65. Yu D., Ellis H.M., Lee E., Jenkins N.A., Copeland N.G., Court D.L., (2000); An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*; *PNAS*; 97(11), 5978-5983.
66. Liu P., Jenkins N.A., Copeland N.G., (2003); A Highly Efficient Recombineering-Based Method for Generating Conditional Knockout Mutations; *Genome Research*; 13, 476-484.
67. Lin-Yu L., Huen M.S.Y., Chi-Pang Tai A., De-Pei L., Cheah K.S.E., Jian-Dong H., (2008); Highly efficient deletion method for the engineering of plasmid DNA with single-stranded oligonucleotides; *BioTechniques*; 44, 217-224.
68. Gavrilov A.A., Razin S.V., (2009); Study of Spatial Organization of Chicken  $\alpha$ -globin Gene Domain by 3C Technique; *Biochemistry (Moscow)*; 73(11), 1486-1494.
69. Instituto de Investigación del Hospital Infantil de Oakland (CHORI); CHORI-261: Chicken BAC Library; obtenida el 14 de Febrero de 2010, de <http://bacpac.chori.org/library.php?id=120>.
70. Sambrook J., Russel D. (2001); *MOLECULAR CLONING A laboratory Manual* (3ra ed.); Nueva York, E.U.A.; Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSHL Press); Vol. 1 y 2 pp. 5.36-5.38, 13.90, 1.32-1.38 (Glicerol).
71. Gobierno de E.U.A., Librería Nacional de Medicina, Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); *Gallus gallus Bac clone CH261-75C12 from chromosome ul, complete sequence*; GenBank No. de acceso AC172304.2;

Obtenida el 12 de Mayo de 2010, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/85861463>; a partir de Delgado B., Lewis S.; *The sequence of Gallus gallus BAC clone CH261-75C12*; Wilson R.K; Admisión directa (2005) ; Genetics, Genome Sequencing Center, 4444 Forest Park Parkway, San Louis, Mo 63108; E.U.A.; y Wilson R.K; Admisión Directa (2006); Genetics, Genome Sequencing Center, 4444 Fores Park Parkway, San Luis, E.U.A.

72. Gobierno de E.U.A., Librería Nacional de Medicina, Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); *Gallus gallus alpha globina gene cluster, complete sequence*; GenBank No. de acceso AY016020.1; Obtenida 12 de Mayo 2010, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY016020>; a partir de Higgs D.R., Flint J., Tufarelli C., Peden J., Clark K., Daniels R.J., (et al), (2001); Comparative genome análisis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the alpha globina cluster; *Human Molecular Genetics* 10 (4), pp. 371-382.

73. Gobierno de E.U.A., Librería Nacional de Medicina, Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); *PREDICTED: Gallus gallus transmembrane proteína 8 (five membrane-spanning domains) (TMEM8), mRNA*; GenBank No. de acceso XM\_425255.2; Obtenida 12 de Mayo 2010, de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM\\_425255.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_425255.2).

74. Gobierno de E.U.A., Librería Nacional de Medicina, Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); *Gallus gallus axin 1 (AXIN1), mRNA*; GenBank No. de acceso NM\_204944; Obtenida 12 de Mayo 2010, de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_204944](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_204944); a partir de Dai F., Yusuf F., Farjah G.H., Brand-Saberi B., (2005); RNAi-induced targeted silencing of

developmental control genes Turing Chicken embriogénesis; *Developmental Biology*; 285(1), 80-90 y Zeng L., Fagotto F., Zhang T., Hsu W., Vasicek T.J., Perry W.L. III, Lee J.J., (*et al*), (1997); The Mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation; *Cell*; 90(1), 181-192

75. NCBI, *Nucleotide Blast*, Obtenida el 15 de Mayo 2010, de [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

76. Philonenko E.S., Klochkov D.B., Borunova V.V., Gavrilov A.A., Razin S.V., Iarovaia O.V., (2009); TMEM8- a non-globin gene entrapped in the globina web; *Nucleic Acids Research*; 37(22), 7394-7406.

77. Mata-González M.T., (2002); Preparación de BACs (Cromosomas artificiales de bacteria) a gran escala; Laboratorio 11, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Campus Cantoblanco, Madrid, España; 1,2.

78. Pfeffer P., (1999); BAC Purification; Institute of Molecular Phatology, Vienna, Austria; 1,2.

79. Regales L., (2001); Preparación de BACs (Cromosomas artificiales de bacteria) a pequeña escala; Laboratorio 11, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Campus Cantoblanco, Madrid, España; 1,2.

80. (2005); QIAGEN® Plasmid Purification Handbook (3era ed.); QIAGEN Group; 1-52.

81. Bird A.W., Erlel A., Fu J., Hériché J.K., Maresca M., Zhang Y., Hyman A.A., Stewart A.F., (2012); High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes; *Nature Methods*; 9, 103-109.