



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Implementación de un ensayo de bioluminiscencia en células individuales que determine cuantitativamente la dinámica transcripcional de dos promotores

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L. C. G. DANIEL ALBERTO FUENTES JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. CHRISTOPHER DAVID WOOD  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. LUIS CÁRDENAS TORRES  
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS

Agosto del 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

GRACIAS...

Al Dr. Christopher David Wood, por aceptarme como su alumno y por su apoyo en la realización de este proyecto, tanto en su asesoría como en la disposición de los recursos necesarios.

Al Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por su asesoría en la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Luis Cárdenas Torres y al Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, por formar parte de mi comité tutorial y asesorarme mediante comentarios y evaluaciones en el trayecto de la realización de esta tesis.

A mi comité de sinodales: Dra. Leonor Pérez Martínez, Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, Dra. Susana Castro Obregón, Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza y Dra. Denhí Schnabel Peraza, por su tiempo, atención y comentarios para mejorar esta tesis.

A mis compañeros y excompañeros de laboratorio, por sus comentarios y sugerencias, así como por los buenos momentos vividos como grupo: Aimeé, María, Saúl, Gilda, Raúl, Jorge, Omar, Francisco Leyva, Ana, Wendy, Carolina, Victor, Ángel, Dulce, Celina, Conchita, David y Álvaro.

A mis amigos, de cuya compañía he disfrutado a lo largo de este trayecto y de quienes he obtenido los ánimos para seguir desarrollándome: Willebaldo, Jerónimo, Enrique, Roberto, Jazmín, Sol, Emma y Francisco Castillo.

A mis padres, Luz María y Javier, y a mis hermanos Rodrigo y Emilio, cuyo apoyo es invaluable y merecen lo mejor de mí. Siempre lo tendré en mente.

# Índice

Índice.....	I
Abreviaturas.....	III
Abstract.....	1
Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Variación en la actividad transcripcional.....	3
1.2 Medición de la dinámica transcripcional.....	5
1.2.1 Métodos directos.....	6
1.2.2 Métodos indirectos.....	8
1.3 Las luciferasas de insecto y su actividad bioluminiscente.....	10
1.3.1 Reacciones oscuras de la luciferasa e inhibidores.....	11
1.3.2 Modulación del color.....	12
2. Antecedentes.....	12
2.1 Las luciferasas de insecto como reporteros transcripcionales.....	12
2.1.2 Las luciferasas de insecto en ensayos de bioluminiscencia dual.....	12
2.1.3 Uso de luciferasas desestabilizadas.....	14
2.1 El ciclo celular como modelo para evaluar la actividad reportera de luciferasas.....	15
3. Hipótesis.....	20
4. Objetivos.....	20
4.1 Objetivo General.....	20
4.2 Objetivos Particulares.....	20
5. Materiales y métodos:.....	21
5.1 Biología molecular.....	21
5.1.1 Extracción de ADN genómico humano.....	21
5.1.2 Amplificación de fragmentos por reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR).....	22
5.1.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	24
5.1.4 Extracción de ADN de geles de agarosa.....	25
5.1.5 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción.....	25
5.1.6 Cuantificación de la concentración de ADN en solución.....	25
5.1.7 Defosfatación de ADN.....	26
5.1.8 Ligación de ADN.....	26
5.1.9 Preparación de cajas bacteriológicas.....	27
5.1.10 Transformación de bacterias por choque térmico.....	28
5.1.11 Ensayo de selección azul y blanco.....	29
5.1.12 Minipreps.....	29
5.1.13 Maxipreps.....	30
5.1.14 Construcción de vectores.....	32
5.2 Cultivo celular.....	35
5.2.1 Líneas celulares.....	35
5.2.2 Soluciones y Medios:.....	35
5.2.3 Subcultivo celular.....	38
5.2.4 Congelación y descongelación de células.....	39
5.2.5 Transfección de células de mamífero mediante polietilenimina (PEI) lineal.....	39

5.2.6 Preparación de muestras en el ensayo de bioluminiscencia de dinámica transcripcional.....	40
5.2.7 Preparación de muestras en el ensayo de bioluminiscencia para detección de actividad.....	41
5.2.8 Ensayo de curva de letalidad.....	41
5.2.9 Establecimiento de líneas celulares con transfección estable.....	41
5.3 Microscopía y análisis de imágenes.....	44
5.3.1 Sistema de captura de bioluminiscencia en microscopio óptico.....	44
5.3.2 Análisis de las imágenes obtenidas en los ensayos de expresión dinámica.....	45
5.3.3 Captura de imágenes en el ensayo de curva de letalidad.....	52
5.3.4 Monitoreo de la señal de bioluminiscencia en colonias de 3T3.....	52
6. Resultados.....	54
6.1 Construcción de plásmidos para ensayos de bioluminiscencia.....	54
6.2 Dinámica transcripcional de los promotores de c-Fos y Ciclina A2 durante el reinicio del ciclo celular.....	62
6.2.1 Detección de actividad bioluminiscente de los plásmidos construidos para ensayos de dinámica transcripcional.....	62
6.2.2 Establecimiento de líneas celulares a partir de fibroblastos 3T3 con transfección estable..	63
6.2.3 Monitoreo de la actividad bioluminiscente en fibroblastos 3T3 con transfección estable...	67
7. Discusión de los resultados.....	79
8. Conclusiones.....	90
9. Perspectivas.....	90
9. Bibliografía.....	91

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
AMP	Adenosin monofosfato.
AP-1	Proteina activadora 1.
c-Fos	Homologo del oncogen viral de osteosarcoma de Finkel-Biskis-Jinkins murino.
c-Jun	Homologo del oncogen 17 ("ju-nana" en japonés) del virus de sarcoma aviar.
c-Myc	Homologo del oncogen viral de mielocitomatosis aviar.
CaCRE	Elemento sensible a calcio y a AMP ciclico.
CBG99	Luciferasa verde de elaterido con 99% de identidad nucleotidica con respecto a CBR.
CBR	Luciferasa roja de elaterido.
CCD	Dispositivo de carga acoplada.
CDE	Elemento dependiente de ciclo celular.
CFP	Proteina cyan fluorescente.
CHR	Region de homologia de genes del ciclo celular.
CMV	Citomegalovirus.
CREB	Proteina de union a CRE (ahora CaCRE).
Crz1	Factor de transcripcion de dedos de zinc sensible a calcineurina.
CV	Coefficiente de variacion.
D-LH <sub>2</sub> -AMP	D-luciferil-adenilato.
d2EGFP	Proteina verde fluorescente potenciada desestabilizada, de vida media de 2 horas.
DFHBI	3,5-difluoro-4-hidroxibencilideno imidazolinona.
DMSO	Dimetilsulfido.
DRE	Elemento regulador rio-abajo.
DREAM	Modulador antagonista de DRE.
(en <i>c-Fos</i> )	
DREAM	Complejo de DP, proteinas similares a pRB, E2F y MuvB.
(en <i>Ciclina A2</i> )	
DP	Proteina companera de dimerizacion de E2F.
E1A	Region inicial de adenovirus 1A.
E2F	Homologo del factor de transcripcion para el promotor viral E2.
EGFP	Proteina verde fluorescente potenciada.
ELuc	Luciferasa esmeralda.
GFP	Proteina verde fluorescente.
HSF1/2	Factor de transcripcion de choque termico 1 y 2.
IκB	Inhibidor de κ B.
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
L-AMP	Dehidroluciferil-adenilato.
L-CoA	Dehidroluciferil-coenzima A.
L-LH <sub>2</sub> -AMP	L-luciferil-adenilato.

L-LH <sub>2</sub> -CoA	L-luciferil-coenzima A.
Luc2	Luciferasa de luciérnaga optimizada.
MuvB	Factor multivulval clase B.
NF-Y	Factor nuclear Y.
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas.
NF-1	Factor nuclear 1.
NTPs	Nucleótidos trifosfatados.
PCR	Reacción en cadena de polimerización de ADN.
PEI	Polietilenimina lineal.
PEST	Secuencia rica en prolina, glutamato, serina y treonina.
RSR	Relación Señal-Ruido.
SIE	Elemento inducible a <i>v-sis</i> .
SPZ1	Proteína de cremallera de leucina espermatogénica.
SP1	Proteína de especificidad 1.
SRE	Elemento sensible a suero.
SRF	Factor sensible a suero.
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción.
SV40	Virus vacuolar de simio #40.
TCF	Factor de complejo ternario.
TK	Timidina cinasa.
<i>v-sis</i>	Oncogen del sarcoma viral de simio.
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranósido.
YFP	Proteína amarillo fluorescente.

## Abstract

One approach used in the study of transcriptional dynamics is the quantification of the transcriptional activity by the activity of the luciferase from the firefly *Photinus pyralis*, which has high sensitivity, dynamic range (the interval between the minimal and maximal measurable concentration) and low toxicity. The luciferases CBG99 y CBR from *Pyrophorus plagiophthalmus*, employed in dual bioluminescence assays in cell lysates, share the same bioluminescence mechanism as the luciferase from *P. pyralis*. These luciferases could be used in assays of transcriptional dynamics in single cells.

In this thesis, the implementation of an assay that can be used to assess the dynamic activity of CBG99 and CBR in single cells is presented. As a testing model, the cell cycle control in response of serum was used, and the expression of both luciferases was regulated by the cell-cycle gene promoter of human *c-Fos* and *Cyclin A2*. However, it could not be confirmed that the signal obtained in these assays reported the transcriptional activity of the corresponding genes, because of the low synchronization efficiency and the unexpected behaviour of the bioluminescent activity under the employed *c-Fos* promoter. Moreover, translational fusions of CBG99 and CBR with a four non-hydrolyzable ubiquitin concatemer were built to reduce the half-life of both reporters and to increase their temporal resolution. In the implemented assay, they had a weak signal, so their utility was low.

Also, plasmids with the coding sequence of the genes CBG99, CBR and the already characterized Luc2 and ELuc, under the transcriptional control of the thymidine kinase promoter were built. These four plasmids are expected to use in assays to measure the half-life time of these reporters.

## Resumen

Un enfoque usado en el estudio de la dinámica transcripcional es la cuantificación de la actividad transcripcional a través de la actividad de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*, la cual posee alta sensibilidad, rango dinámico (el intervalo entre la concentración mínima y la máxima medibles), y toxicidad baja. Las luciferasas CBG99 y CBR de *Pyrophorus plagiophtalamus*, utilizadas en ensayos de bioluminiscencia dual en lisados de células, comparten el mismo mecanismo de bioluminiscencia que la luciferasa de *P. pyralis*. Estas luciferasas podrían utilizarse en ensayos de dinámica transcripcional en células individuales.

En esta tesis, se presenta la implementación de un ensayo que permita evaluar la actividad dinámica de CBG99 y CBR en células individuales. Se utilizó el control del ciclo celular en respuesta a suero como modelo de prueba y la expresión de ambas luciferasas se reguló bajo los promotores de los genes del ciclo celular *c-Fos* y *Ciclina A2* humanas. Sin embargo, no se logró confirmar que la señal obtenida en estos ensayos reportara la actividad transcripcional de los genes correspondientes, debido a la baja eficiencia de sincronización y al comportamiento inesperado de la actividad bioluminiscente bajo el promotor de *c-Fos* utilizado. Además, se construyeron fusiones traduccionales de CBG99 y CBR con concatmeros de cuatro ubiquitinas no hidrolizables para reducir la vida media de ambos reporteros y aumentar su resolución temporal. En los ensayos implementados tuvieron una señal débil, por lo que su utilidad fue baja.

También se construyeron plásmidos que contienen a la secuencia codificante de los genes de CBG99, de CBR, y de las luciferasas ya caracterizadas Luc2 y ELuc, bajo el control transcripcional del promotor de Timidina Cinasa. Estos cuatro plásmidos se planean utilizar en ensayos para medir el tiempo de vida media de estos reporteros.

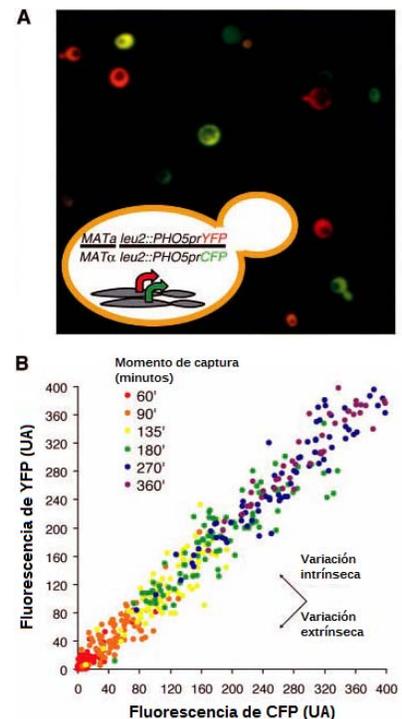
# 1. Introducción.

## 1.1 Variación en la actividad transcripcional.

La regulación de la expresión génica es un proceso importante para los seres vivos. Esta responde a factores provenientes tanto del exterior como del interior de la célula. A través de ella, la célula puede adaptarse a cambios en las condiciones ambientales, o bien especializarse para cumplir funciones específicas dentro de un organismo multicelular. La regulación de la transcripción se considera el punto de control principal de la expresión génica, pues permite el control espacio-temporal de su expresión y evita la síntesis de productos innecesarios [Alberts et al, 2014]. Debido a lo anterior, el control de la transcripción es un área de estudio de sumo interés.

Al estudiar la transcripción se debe tomar en cuenta que, al igual que otros procesos biológicos, es inherentemente dinámico e inestable. La disponibilidad de las moléculas involucradas en la transcripción (el promotor, los factores de transcripción, la polimerasa de ARN, entre otros) varía entre células de una misma comunidad isogénica [Elowitz et al, 2002] [Swain et al, 2002]. Además, la interacción entre las moléculas involucradas tiene una naturaleza estocástica, la cual ocurre en ventanas de tiempo de segundos a minutos [Hager et al, 2009] [Coulon et al, 2013]. Estos factores interfieren en la frecuencia de eventos de transcripción, y en consecuencia, producen la variabilidad natural en la expresión génica de células de una comunidad isogénica [Blake et al, 2003] [Raser y O'Shea, 2004] (Figura 1).

Figura 1: Ejemplo de un modelo de variación natural en la expresión génica. (Panel A) Se presenta una imagen de fluorescencia de células de una cepa diploide de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan a los genes reporteros YFP y CFP. Ambos genes son regulados por promotores idénticos de *PHO5* y se localizan en loci homólogos, como aparece en el inserto dentro de la imagen. (Panel B) Se presenta una gráfica con los resultados de la medición de la señal de fluorescencia de células individuales tras inducir la expresión de *PHO5* por privación de fosfatos. La intensidad de señal de los dos reporteros está en unidades arbitrarias (UA). Cada punto representa una célula individual, y el color indica el momento posterior a la inducción cuando se capturó la señal. La contribución de la variación en la actividad fluorescente observada se manifiesta como la dispersión de las señales capturadas en un mismo momento con respecto a la diagonal. La variación producto de la estocasticidad en las interacciones intermoleculares (intrínseca) produce la dispersión de la señal en dirección paralela a la diagonal, pues afecta de manera diferente la señal de cada reportero. La variación producto de la disponibilidad de las moléculas en la célula (extrínseca) produce la dispersión en perpendicular a la diagonal, ya que afecta de igual modo a la señal de cada reportero. Modificado de Raser y O'Shea, 2004.



Además de la variabilidad natural, algunos mecanismos de activación y represión de la transcripción pueden producir variación en la expresión génica entre células. Esto es debido a que los mecanismos de respuesta a estímulos son frecuentemente complejos, y en algunos casos se producen oscilaciones en la actividad transcripcional [Hager et al, 2009]. La oscilación en la actividad transcripcional puede ser producto de la oscilación de la presencia del estímulo, del factor de transcripción que actúa como efector o en la disponibilidad de la secuencia del promotor para reclutar a la polimerasa (ciclo transcripcional). Como ejemplo de estos sistemas oscilatorios se encuentran la señalización por calcio [Dolmetsch et al, 1997], la transcripción del gen de prolactina (Figura 2) [Harper et al, 2011], los ciclos transcripcionales mediados por el receptor de estrógeno alfa [Métivier et al, 2003] y el receptor transmembranal Notch [Shimojo et al, 2008], la localización del factor de transcripción CRZ1 [Cai et al, 2008], y la interacción factor-inhibidor de NFκB-IκB [Nelson et al, 2004] [Bosisio et al, 2006]. Además, la regulación de procesos tales como el ciclo celular [Tyson y Novak, 2008], la segmentación [Pourquié, 2003] y los ritmos circadianos [Liu et al, 2007] sigue un comportamiento oscilatorio. Los sistemas oscilatorios tienen ciclos de tiempo variable, el cual puede durar de segundos a minutos como en la señalización por calcio y en la localización de CRZ1, hasta

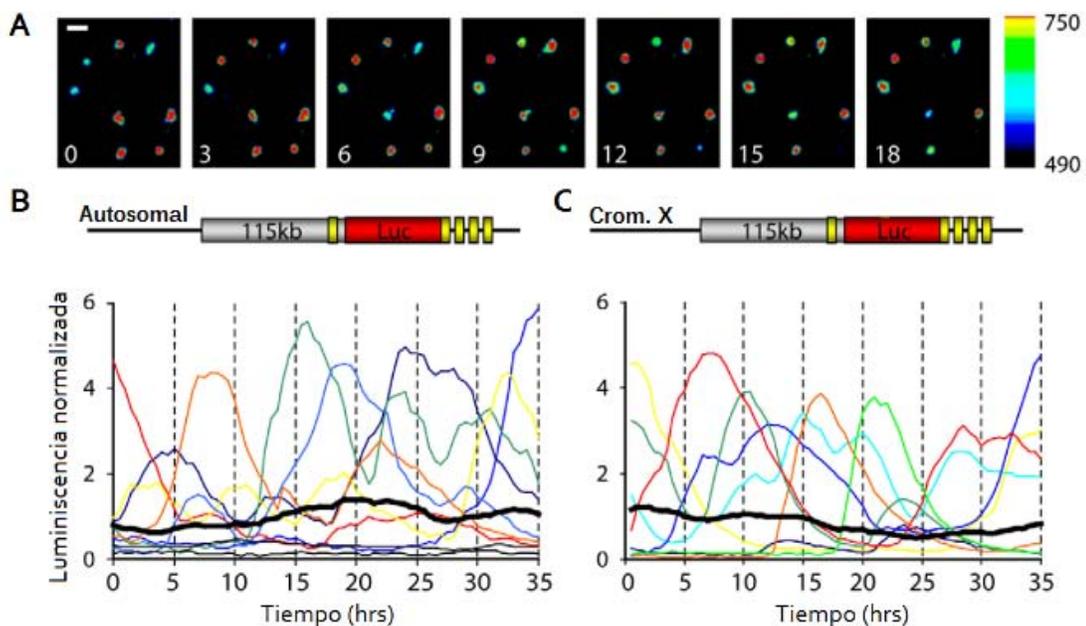


Figura 2: Oscilación en la actividad bioluminiscente regulada por el promotor de prolactina humana en cultivos primarios de células de pituitaria de rata. (Panel A) Se presentan imágenes de bioluminiscencia de células de pituitaria de rata que contienen al gen de luciferasa de *Photinus pyralis*, expresada bajo el control de una secuencia de 115kb correspondiente al promotor de prolactina. El gen reportero se integró en un cromosoma artificial. Cada imagen representa la señal capturada a distintos momentos del ensayo, el número colocado en la esquina inferior izquierda indica la hora de captura. La intensidad de la señal bioluminiscente se representa en falso color, y el rango de colores corresponde a valores de intensidad en unidades arbitrarias como aparece en la barra en la extrema derecha. La barra de escala es de 50 μm. (Panel B y C) Se muestra en dos gráficos la intensidad de la señal de bioluminiscencia con respecto al tiempo obtenida de células individuales, las cuales contienen al gen reportero integrado a un cromosoma autosomal (Panel B) o al cromosoma X (Panel C). Cada línea de color representa la actividad de células individuales, la línea negra y gruesa representa el promedio de actividad de las células analizadas. Los elementos en el esquema del fragmento que contiene al transgen representan lo siguiente: en gris la secuencia que contiene al promotor de prolactina humana, en rojo el gen de luciferasa y en amarillo los exones 1a y 2-5 del gen de prolactina humana. El número de células revisadas es de 22 en Panel B y de 20 en Panel C. Modificado de Harper et al, 2011.

cerca de 24 horas como en el ciclo celular y en ritmos circadianos, y en algunos casos pueden estar sincronizados entre células vecinas [Spiller et al, 2010].

La variabilidad natural y la producida por sistemas oscilatorios en la transcripción, como ya se explicó, son evidencia de que la transcripción es un proceso dinámico. El estudio de la dinámica transcriptional puede ofrecer información valiosa acerca de posibles funciones biológicas en las que influyan estos fenómenos. Por ejemplo, podría servir en la adaptación de poblaciones de células a nuevos ambientes y en la respuesta a estrés [Fraser y Kærn, 2009] [Harper et al, 2011]. En organismos multicelulares, podría influir en el destino celular (proliferación, diferenciación, muerte) de las células del organismo [Shimojo et al, 2008] [Hager et al, 2009] [Imayoshi et al, 2013]. La obtención de dicha información es de nuestro particular interés. El estudio de la dinámica transcripcional de estos fenómenos utiliza una serie de estrategias particulares, las cuales se presentan en la siguiente sección.

## **1.2 Medición de la dinámica transcripcional.**

El estudio de la dinámica transcripcional sigue una serie de reglas básicas. La medición de la actividad transcripcional debe llevarse a cabo a nivel de células individuales. Si se llevara a cabo en poblaciones, la medición resultante sería el promedio de la actividad de cada célula. Esto último no permitiría recuperar información correspondiente a la variabilidad, tales como la actividad transcripcional de genes individuales o la presencia de células con diferentes perfiles de transcripción (por ejemplo, durante un proceso de diferenciación). Se tiene preferencia a utilizar células vivas y llevar a cabo ensayos en tiempo real. La información obtenida de los ensayos en tiempo real puede contribuir al armado de modelos matemáticos robustos que representen al modelo transcripcional a estudiar [Spiller et al, 2010]. Se deben de utilizar herramientas moleculares con actividad cuantificable, donde la intensidad de su actividad sea representativa de la actividad transcripcional.

Para llevar a cabo la medición de la expresión génica, se capturan imágenes de las células o tejido de interés vistas por microscopía usando una cámara-CCD (Charge-Coupled Device, dispositivo de carga acoplada). Estas imágenes se analizan para recuperar la señal proveniente de las células y el fondo. La señal es la parte de la imagen que contiene información de la actividad generada por la herramienta molecular utilizada para la medición. La intensidad de la señal se mide a partir del valor de los pixeles que forman parte de esta. El fondo se refiere a la parte de la imagen que no contiene señales. El valor de los pixeles del fondo es resultado de la actividad de moléculas o partículas diferentes a la herramienta molecular utilizada (artefactos).

Tanto la señal como el fondo pueden verse afectadas por fuentes de ruido generadas durante el ensayo de medición. Existen tres fuentes principales e independientes de ruido: el ruido de lectura, el ruido termal y el ruido de disparo fotonico. El ruido de lectura es producto de variaciones en la lectura de la muestra por la cámara-CCD. El ruido termal es producto de corrientes eléctricas débiles que se

generan espontáneamente en el sensor de la cámara, llamadas corriente oscura. La corriente oscura aumenta el valor de la intensidad de los píxeles de una imagen capturada, y este efecto se incrementa con la temperatura. El ruido de disparo fotónico es una propiedad inherente de la emisión de fotones. Mientras más baja sea la intensidad de la señal a capturar, la lectura de su señal tendrá un mayor componente de ruido. Esta fuente de ruido es consecuencia de que los fotones capturados por la cámara-CCD siguen una distribución tipo Poisson y que la lectura de la señal es en números enteros (debido a la naturaleza partícula-onda del fotón).

Debido a lo anterior, la intensidad de la señal obtenida contiene ruido producto de las distintas fuentes ya mencionadas. El ruido de disparo fotónico es descartable si la actividad de la herramienta molecular es fuerte. Para retirar el ruido producido por la cámara-CCD (de lectura y termal), se debe de restar la intensidad de los valores de pixel proveniente del fondo a la señal obtenida; el valor resultante se denomina intensidad neta. A partir de la intensidad neta se pueden evaluar distintos elementos del ensayo de medición y de la señal obtenida. Para validar que la señal obtenida no sea producto del ruido del ensayo, se debe calcular la Relación Señal-Ruido (RSR, la intensidad neta de la señal dividida entre la desviación estandar de la intensidad de los píxeles del fondo). Si la RSR es igual o mayor a 3, la medición obtenida es confiable, pero si es menor a 3 significa que la señal es indistinguible del fondo [Holmes y Mergen, 2007]. Para comparar las mediciones entre células o en distintos tiempos de captura, se puede relativizar la medición con respecto a una de las mediciones: por ejemplo, para medir el cambio en la actividad transcripcional de cada célula tras su inducción, estas mediciones deben de dividirse entre una de las mediciones previas a la inducción. La heterogeneidad de las mediciones obtenidas de la imagen se calcula con el coeficiente de variación (CV, desviación estándar de las mediciones dividida entre el promedio de las mismas).

Los métodos de medición utilizados se clasifican de acuerdo al tipo de herramienta molecular utilizada. Los métodos directos utilizan el marcaje de transcritos, mientras que los métodos indirectos utilizan proteínas reporteras cuya actividad refleja a la actividad transcripcional [Spiller et al, 2010].

### **1.2.1 Métodos directos.**

El primero de estos métodos es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de ARNs. Utiliza sondas fluorescentes, que son fragmentos de ARN marcados con moléculas fluorescentes. La secuencia de nucleótidos de estas sondas es complementaria al del ARN blanco, lo que permite su hibridación y marcado [Raj et al, 2006] [Zenklusen et al, 2008]. Las células a observar se fijan y permeabilizan en la superficie de un portaobjetos o un cubreobjetos. El conteo de transcritos se lleva a cabo mediante la detección de moléculas individuales por medio de las sondas. La cantidad de sondas hibridadas a una sola molécula, y la intensidad de la señal correspondiente a esta, se determina por comparación con una serie de diluciones de oligonucleótidos estandarizada. Sin embargo, con FISH no se puede dar seguimiento a la actividad transcripcional de una misma población a lo largo del tiempo. Otra

desventaja es que la medición depende del supuesto de que todos los transcritos a contar estén hibridados. La cuantificación de la señal está limitada por la precisión que ofrezca la deconvolución de la imagen y su ajuste en imagen 3D [Chubb y Liverpool, 2010].

Un segundo método utiliza proteínas fluorescentes fusionadas con la proteína de la cápside del bacteriófago MS2, que reconoce una estructura de tallo-asa específica presente en el genoma de ARN del fago [Janicki et al, 2004]. Al transcrito a cuantificar se le añaden copias de esta estructura tallo-asa y se expresa la proteína fusionada en las células a revisar. En bacteria, esta cuantificación se puede dar en tiempo real bajo ciertas condiciones: un número reducido de transcritos a seguir, un elevado número de copias de la estructura tallo-asa en los transcritos y un número lo suficientemente elevado de proteínas fluorescentes para saturar sus blancos pero sin aumentar demasiado el ruido de fondo [Golding et al, 2005]. La cuantificación de transcritos ofrece dificultades similares a la FISH de ARNs: se debe estimar el número de proteínas fluorescentes que se asocian en las estructuras tallo-asa y se requiere de un estándar de fluorescencia para compararse con los resultados obtenidos de ensayos [Chubb y Liverpool, 2010]. No es posible contar el número de transcritos producidos en eucariotes con este método [Chubb et al, 2006], pero se puede monitorear la dinámica de activación transcripcional en el sitio de la transcripción [Tsukamoto et al, 2000] [Janicki et al, 2004]. Otro sistema similar al de MS2, utiliza a la proteína de la cápside del bacteriófago PP7 y a su estructura tallo-asa blanco para medir la iniciación y elongación de la transcripción en levadura [Larson et al, 2011]. Ambos sistemas, MS2 y PP7, pueden utilizarse en conjunto sin efecto de interferencia entre ellos [Hocine et al, 2013].

Un método novedoso para el marcado de transcritos hace uso del sistema aptámero-fluoróforo llamado Spinach. Este sistema consiste en un aptámero de ARN de alrededor de 100 pares de bases, el cual se asocia específicamente a un fluoróforo llamado DFHBI (3,5-difluoro-4-hidroxibencilideno imidazolinona). Este fluoróforo tiene actividad fluorescente sólo al asociarse al aptámero [Paige et al, 2011], por lo que el este método tiene poco ruido de fondo. Además, el recambio de moléculas del fluoróforo en el sistema Spinach hace al método tolerante al fotoblanqueo. El DFHBI puede pasar a través de la membrana y no es tóxica bajo la concentración utilizada en los ensayos (10  $\mu$ M) [Paige et al, 2011]. La cuantificación del transcrito consiste en la medición de la señal proveniente del fluoróforo asociado a aptámeros fusionados al transcrito de interés. Por otro lado, el aptámero de ARN de Spinach es inestable cuando está unido covalentemente al transcrito a cuantificar, pues este último le impide formar una estructura secundaria estable. Existen dos soluciones a este problema: utilizando una ribozima autocortante para separar al transcrito y al aptámero después de su síntesis [Höfer et al, 2013], y aumentando la estabilidad del aptámero [Strack et al, 2013]. No se conoce la eficiencia de medición de transcritos mediante Spinach o sus variantes a nivel de molécula única.

### 1.2.2 Métodos indirectos.

A partir de la actividad de proteínas reporteras, es posible estimar indirectamente la tasa de transcripción producida bajo el control de un promotor de interés condiciones basales o en respuesta a un estímulo. Al ser reporteros sintentizados por la célula, no se requiere permear su membrana celular (como en FISH), pero es necesario transfectar el material genético que contiene al gen del reportero. Dos reporteros utilizados frecuentemente para medir dinámica transcripcional son la proteína verde fluorescente desestabilizada o d2EGFP [Li et al, 1998] y la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* [White et al, 1995]. Su actividad es cuantificable, debido a que consiste en la emisión de fotones. Su tiempo de vida media reportado es similar en condiciones de cultivo y dentro de la célula, cercano a 2 horas para d2EGFP [Li et al, 1998] y la luciferasa [Ignowski y Schaffer, 2004], aunque puede variar entre líneas celulares. La estabilidad baja de estos reporteros hace de su actividad sensible a cambios sutiles en la tasa de síntesis del reportero, lo cual es importante si se considera que la actividad transcripcional ocurren en ventanas de tiempo de minutos a horas. Comparado con estos reporteros, las luciferasas de los crustáceos *Gaussia princeps* y *Cypridina noctiluca*, ó la proteína verde fluorescente (GFP), tienen tiempos de vida media elevados de 6 días, 53 horas y 26 horas, respectivamente [Thorne et al, 2010]. La d2EGFP y la luciferasa de *P. pyralis* pueden utilizarse en conjunto sin observarse interferencia entre ellos [Harper et al, 2010] [Harper et al, 2011]. Los ensayos con estos reporteros son en tiempo real, por lo que es posible reconstruir la tasa de transcripción de los mismos en células

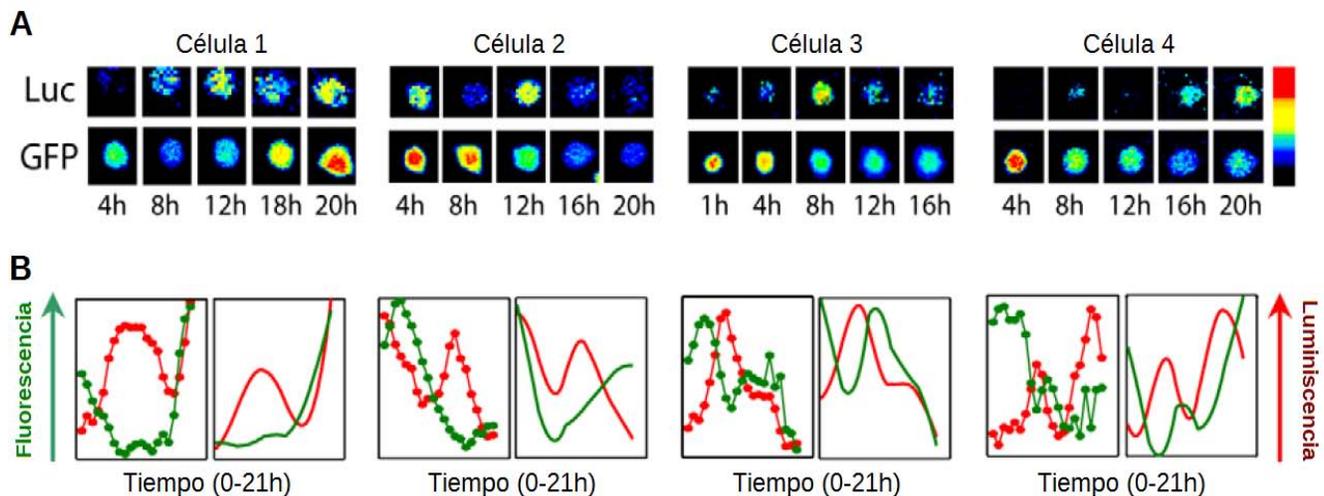


Figura 3: Reconstrucción de la actividad transcripcional de dos genes reporteros bajo el promotor de prolactina humana en células individuales. (Panel A) Se muestran series de imágenes de luminiscencia (Luc) y fluorescencia (GFP) de cuatro células diferentes, tomadas cada 4 horas durante un mismo ensayo. Las células analizadas expresan tanto a la luciferasa de *Photinus pyralis*, como a la proteína fluorescente d2EGFP, ambas bajo el control transcripcional del promotor del gen de prolactina humana. La intensidad de la señal se representa mediante una regla de colores localizada en el extremo derecho. (Panel B) Se presentan cuatro pares de gráficas, correspondientes a los resultados de la medición de las cuatro células mostradas en el Panel A. La gráfica de la izquierda indica la intensidad de la señal de fluorescencia (línea verde) y luminiscencia (línea roja) de la célula correspondiente a lo largo de 21 horas del ensayo. La gráfica de la derecha presenta una reconstrucción de la tasa de transcripción de los genes de luciferasa y d2EGFP, generada a partir de la actividad de los reporteros. La señal de luminiscencia aparentemente se acerca más a la tasa de transcripción a reportar, comparado con la señal de fluorescencia. Modificado de Harper et al, 2011.

individuales a partir de las mediciones de actividad obtenidas y con ayuda de modelos matemáticos basados en tasas de síntesis, degradación y activación de los transcritos y proteínas [Harper et al, 2011] (Figura 3).

Con respecto a sus características particulares, la d2EGFP es una variante desestabilizada de la GFP que conserva su actividad fluorescente [Cormack et al, 1996] [Yang et al, 1996]. Contiene en su extremo carboxilo un fragmento de la secuencia de degradación PEST de la decarboxilasa de ornitina de ratón, la cual reduce su vida media de 26 a 2 horas [Rogers et al, 1986] [Ghoda et al, 1989]. Al igual que otras proteínas derivadas de la GFP, la d2EGFP pasa por un proceso de maduración en donde la proteína cataliza la formación de su cromóforo [Tsien, 1998]. Su actividad es lo suficientemente brillante para capturar su señal en cámara usando tiempos de exposición cortos (< 1 segundo), lo cual favorece a la resolución temporal del ensayo de dinámica transcripcional. Esta propiedad también favorece la resolución espacial del ensayo, pues la intensidad es suficiente para resolver la localización del reportero a nivel subcelular. La d2EGFP es compatible con microscopía confocal y multifotónica [Harper et al, 2010]. Una desventaja importante de usar d2EGFP como reportero es que la muestra a estudiar debe irradiarse con luz excitatoria, lo cual resulta dañino para la muestra en ensayos de larga duración. Por otro lado, la sensibilidad a concentraciones bajas de este reportero está limitada por la autofluorescencia de los sistemas biológicos, que impide distinguir la señal del reportero del fondo. Sólo es posible obtener una correlación lineal entre concentración de enzima y señal bioluminiscente a lo largo de 2 órdenes de magnitud [Niswender et al, 1995].

La luciferasa de *Photinus pyralis* es una enzima cuya función es catalizar la oxidación de un sustrato específico llamado D-luciferina, reacción que puede producir la emisión de un fotón (ver sección 1.3 para información más detallada). Su actividad no requiere de un proceso de maduración, por lo que es casi inmediata al liberarse del ribosoma [Wood, 1998]. La principal ventaja de la luciferasa con respecto a las proteínas fluorescentes es la baja actividad de fondo. La luciferasa sólo puede catalizar la emisión de fotones a partir de su interacción con la D-luciferina [Marques y Esteves da Silva, 2009] y este sustrato no puede emitir fotones espontáneamente ni por interacción con moléculas endógenas [Viviani, 2002]. Además, la muestra a analizar carece de reacciones de bioluminiscencia endógenas. Esto permite que la lectura de la señal de bioluminiscencia sea sensible a concentraciones relativamente bajas del reportero. Tiene una correlación lineal entre concentración de enzima y señal bioluminiscente a lo largo de 7 órdenes de magnitud, lo cual le permite un elevado rango dinámico en la medición de actividad [Martin et al, 1996]. Los ensayos con luciferasa de *P. pyralis* pueden llevarse a cabo de manera continua durante lapsos de tiempo extensos (hasta por 6 semanas [Leise et al, 2012]) sin que se reporten problemas en la viabilidad de la muestra ocasionados por la luciferasa o el sustrato. La principal limitante de la luciferasa de *P. pyralis* es su tasa de emisión de fotones relativamente baja, pues a diferencia de la d2EGFP, se requieren tiempos de exposición largos (> 5 minutos) para obtener una señal confiable por parte del reportero. Por lo anterior, su actividad de bioluminiscencia es insuficiente para resolver la localización del reportero en

compartimentos subcelulares [Nakajima et al, 2010].

Los ensayos con la luciferasa de *P. pyralis* tienen una baja señal de fondo y una elevada sensibilidad a cambios en la actividad transcripcional. Además, la actividad casi inmediata del reportero facilita la reconstrucción de la tasa de transcripción regulada por el promotor a estudiar (Figura 3). Por lo tanto, la luciferasa de *P. pyralis* es un buen reportero para medir la dinámica transcripcional, y mejor reportero que la d2EGFP para este tipo de ensayos [Harper et al, 2011]. Otras luciferasas, homólogas de la de *P. pyralis* también se utilizan como reporteros, y comparten el mismo mecanismo de bioluminiscencia que se presenta en la siguiente sección.

### 1.3 Las luciferasas de insecto y su actividad bioluminiscente.

La luciferasa de *P. pyralis* forma parte de un conjunto de proteínas homólogas, monoméricas, de tamaño similar (~550 aminoácidos), denominados luciferasas de insecto [Ugarova y Brovko, 2002]. Las luciferasas de insecto tienen similitud estructural con las acil-CoA ligasas, por lo que se considera que tienen su origen en este grupo de enzimas [Viviani, 2002]. A pesar de que se denominan luciferasas de insecto, este grupo solo incluye a luciferasas provenientes de coleópteros de las familias Lampyridae (luciérnagas), Elateridae (elatéricos) y Phengodidae (gusanos ferrocarrileros) [Viviani, 2002]. Todos los miembros de este grupo generan luz por medio de la oxidación de un mismo sustrato, la D-luciferina de insecto [(S)-4,5-dihidro-2-(6-hidroxi-2-benzotiazolil)-4-ácido tiazolecarboxílico] (D-LH<sub>2</sub>), a través de la hidrólisis de ATP y el consumo de O<sub>2</sub>, con Mg<sup>2+</sup> como cofactor [Ugarova et al, 1993]. Cada luciferasa utiliza los mismos sustratos para emitir fotones bajo un rango específico de longitudes de onda, y el conjunto de luciferasas nativas presenta picos en su espectro de emisión que van desde ~530nm (verde) hasta ~620nm (naranja-rojo) [Viviani, 2002] [Ugarova y Brovko, 2002]. La eficiencia cuántica, la tasa de emisión de fotones por cada molécula de D-luciferina oxidada, de *P. pyralis* es de ~0.41 [Ando et al, 2008], pero este valor es diferente para cada luciferasa.

Para toda luciferasa de insecto, la emisión de fotones sigue una misma serie de reacciones. Primero, la enzima forma un complejo ternario con una molécula de D-luciferina (D-LH<sub>2</sub>) y una de ATP, y utiliza el residuo carboxílico del anillo tiazol de la D-luciferina para catalizar la formación de D-luciferil-adenilato (D-LH<sub>2</sub>-AMP) y pirofosfato. Entonces, el anhídrido ácido que une a los dos sustratos originales es oxidado, lo que consume una molécula de O<sub>2</sub> y produce al intermediario dioxetanona; el recién formado peróxido cíclico de la dioxetanona se decarboxila espontáneamente y produce oxiluciferina en estado de singlete electrónicamente excitado (Figura 4) [Ugarova y Brovko, 2002]. Esta molécula tiene una vida media de 10ns [Hirano et al, 2009] y al relajarse se emite un fotón.

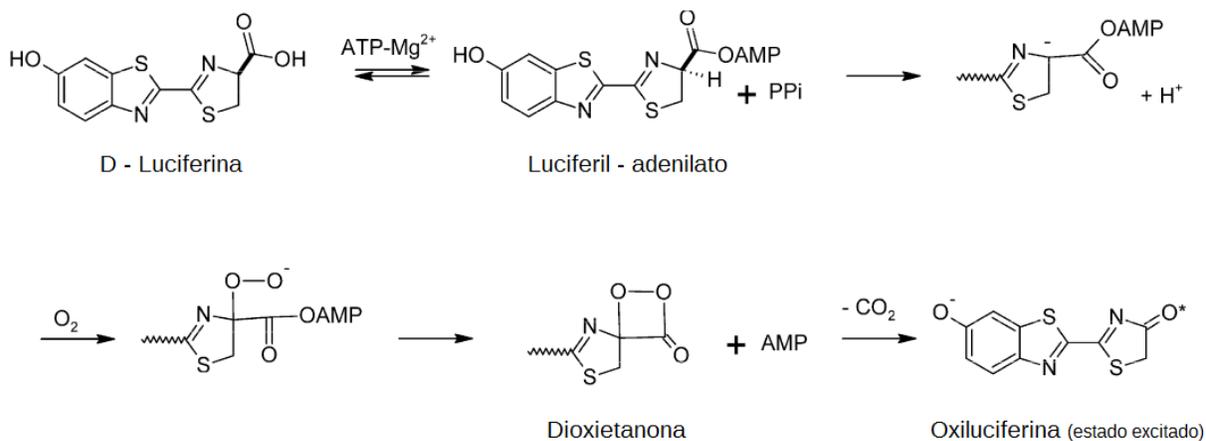


Figura 4: Actividad de la luciferasa de insecto. Se presentan las moléculas involucradas. Modificado de Navizet et al, 2010.

El proceso de relajación y emisión del fotón es similar al observado en fluorescencia. La oxiluciferina contiene un sistema conjugado, que es un conjunto de enlaces simples y dobles ó triples intercalados, en donde los orbitales  $\pi$  de estos enlaces actúan como puentes por los cuales los electrones pueden moverse libremente a lo largo del sistema. Al movimiento libre de electrones a lo largo del sistema conjugado se le denomina deslocalización de carga. Durante la excitación electrónica de una molécula, por fluorescencia o como producto de una reacción (como la luciferina de insecto), el electrón excitado circula por el sistema conjugado de la molécula, y a mayor número de enlaces involucrados en el sistema, mayor será la pérdida de energía durante la relajación, y mayor será la longitud de onda del fotón emitido.

Los ensayos que hacen uso de la expresión de la luciferasa para reportar actividad transcripcional no afectan significativamente la concentración de sus sustratos de origen celular, ATP y O<sub>2</sub> [Rutter et al, 1998] [Ignowski y Schaffer, 2004]. Por otro lado, la actividad de la luciferasa es sensible a cambios en la concentración de sus sustratos y cofactores [Wood, 1999] [Thorne et al, 2010]. Por ejemplo, en condiciones de hipoxia, la baja concentración de O<sub>2</sub> disminuye directamente la actividad de la luciferasa [Lambrechts et al, 2014] e indirectamente al disminuir la tasa de síntesis de ATP [Moriyama et al, 2008].

### 1.3.1 Reacciones oscuras de la luciferasa e inhibidores.

Además de las reacción de bioluminiscencia, la luciferasa puede catalizar otro tipo de reacciones químicas, denominadas oscuras por carecer de emisión de fotones. Alrededor del 80% del D-LH<sub>2</sub>-AMP que produce la luciferasa como intermediario es convertido en oxiluciferina, pero el resto es oxidado en una reacción alternativa que produce dehidroluciferil-adenilato (L-AMP) y peróxido de hidrógeno [Marques y Esteves da Silva, 2009]. A su vez, la luciferasa cataliza otra reacción con el L-

AMP y una molécula de pirofosfato para producir dehidroluciferina y ATP [Marques y Esteves da Silva, 2009]. La L-AMP, la dehidroluciferina y la oxiluciferina se consideran los principales inhibidores de la luciferasa [Ribeiro y Esteves da Silva, 2008] [da Silva y da Silva, 2011]. Sin embargo, en presencia de coenzima A, la luciferasa cataliza otra reacción que transforma al L-AMP en dehidroluciferil-CoA (L-CoA), que es un inhibidor débil que no afecta significativamente a la actividad bioluminiscente [da Silva y da Silva, 2011] [Marques y Esteves da Silva, 2009]. La producción de peróxido de hidrógeno durante la primera reacción oscura puede causar estrés oxidativo si esta alcanza altas concentraciones. En cultivos celulares, la acumulación de estrés oxidativo afectaría la viabilidad celular o podría alterar la dinámica de expresión celular. Se debe de considerar este efecto al momento de utilizar luciferasa en altas concentraciones durante ensayos de tiempo real. El uso de antioxidantes en el medio de cultivo podría ser una opción para disminuir el efecto oxidante de la actividad de la luciferasa.

La luciferasa puede catalizar reacciones de acil-CoA ligasa en ácidos grasos, los cuales actúan como inhibidores de la bioluminiscencia *in vitro*, pero no *in vivo* [Matsuki et al, 1999] [Oba et al, 2003] [Niwa y Ohmiya, 2004]. A pesar del uso de la Coenzima A como sustrato de las reacciones oscuras, la expresión de luciferasa no parece alterar significativamente metabolismo de las células en donde se expresa, al menos en líneas cancerosas [Johnson et al, 2014]. Por otro lado, la luciferasa es sensible a la presencia de anestésicos, alcoholes y a análogos de benzotiazol y sus derivados, los cuales actúan como inhibidores [Thorne et al, 2010] [Leitão y Esteves da Silva, 2010] o potenciadores [Auld et al, 2008]. De ser necesario tener que utilizar estos productos, se debe considerar el grado de interferencia que tendrán en la medición de dinámica transcripcional.

### ***1.3.2 Modulación del color.***

La actividad bioluminiscente de la luciferasa nativa de *P. pyralis* y de otras luciérnagas presenta dos picos de emisión de fotones con respecto a su longitud de onda: un pico de emisión mayor cerca de longitudes de onda cercanos al color verde y otro pico de emisión menor cercano al color rojo [Viviani, 2002] [Hosseinkhani, 2011]. El pico de emisión verde es sensible a pH, y mientras más ácido es el ambiente intracelular, menor es la emisión de fotones bajo el rango observado del pico de emisión verde; el pico de emisión roja es insensible a pH [Naumov et al, 2009] [Hosseinkhani, 2011]. Las luciferasas provenientes de otros organismos pueden tener un sólo pico de emisión, y en el caso de las luciferasas con un sólo pico de emisión orientado al color rojo, son insensible a pH [Ando et al, 2008]. La emisión de fotones a picos de emisión con diferente longitud de onda por parte de las luciferasas es un fenómeno sorprendente. Implica que las luciferasas modulan la estructura de la oxiluciferina excitada para la emisión de fotones a distintos rangos de longitud de onda.

El mecanismo por el cual las luciferasas de insecto pueden modular la longitud de onda de los fotones emitidos no se ha definido completamente. El estudio de este fenómeno en diferentes

luciferasas de insecto, tanto nativas como mutantes en sitios específicos (en el sitio activo o con función estructural) ha ayudado a conocer elementos que son parte de este mecanismo. [Hosseinkhani, 2011]. Sólo se requiere una conformación química de la oxiluciferina, la cual contiene un grupo ceto en el carbono 4 del anillo tiazol y un grupo fenolato en el carbono 6 del benzotiazol [Branchini et al, 2004]. Sin intervención de la luciferasa, la conformación ceto-fenolato emitiría fotones con una longitud de onda cercana al rojo [Naumov et al, 2009]. Mediante el control de la polaridad del microambiente del sitio activo y la inmovilización de la oxiluciferina, la luciferasa puede mover el rango de color hacia el verde [Branchini et al, 2003] [Branchini et al, 2004] [Hirano et al, 2009] [Navizet et al, 2010]. Este control de la polaridad lo consigue con ayuda de los residuos localizados en el sitio activo de la enzima, y su interacción con la oxiluciferina y el solvente (agua) es sensible a pH.

## **2. Antecedentes.**

### **2.1 Las luciferasas de insecto como reporteros transcripcionales**

Actualmente existe una amplia variedad de luciferasas de insecto disponibles como reporteros, tanto variantes modificadas de la de *P. pyralis* como ortólogas [Almond et al, 2003] [Paguio et al, 2005] [Branchini et al, 2005] [Masamizu et al, 2006] [Li et al, 2010] [Nakajima et al, 2010] [Niwa et al, 2010]. Estas luciferasas pasaron por un proceso de optimización con el propósito de aumentar su tasa de síntesis y evitar posibles interferencias en su expresión [Wood, 1998]. Para ello, se retiraron los intrones del gen y se redujo al mínimo el número de secuencias de regulación transcripcional internas, lo que aumenta su tasa de transcripción y evita la activación no deseada de su transcripción. Se eliminó la secuencia peptídica de localización a peroxisoma (presente en algunas luciferasas). Se añadieron secuencias de poliadenilación suficiente (por ejemplo la de SV40) para aumentar la estabilidad de los transcritos. Se añadió una secuencia consenso Kozak y se cambió el uso de codones para favorecer su síntesis en células de mamífero.

La ventaja de utilizar estas luciferasas de insecto radica en sus características particulares, las cuales pueden ser de utilidad para fines específicos. Por ejemplo, las luciferasas de elatéridos y gusanos ferrocarrileros, así como algunas variantes modificadas de las luciferasa de *P. pyralis* son insensibles a pH [Seliger y McElroy, 1964] [Viviani, 2002]. Estas luciferasas son adecuadas para ensayos donde la muestra se encuentra en condiciones de acidez. Si en cambio se necesitara de una señal fuerte, se puede utilizar la luciferasa de elatérico ELuc, cuya actividad bioluminiscente es tres órdenes de magnitud mayor a la de *P. pyralis* [Nakajima et al, 2010]. A continuación se presentan dos ensayos de nuestro particular interés que utilizan estas luciferasas: los ensayos de bioluminiscencia dual y los ensayos con luciferasas desestabilizadas.

#### ***2.1.2 Las luciferasas de insecto en ensayos de bioluminiscencia dual.***

Los ensayos duales consisten en la medición secuencial de dos reporteros, con lo cual es posible medir dos parámetros asociados a un mismo proceso celular (por ejemplo, la respuesta transcripcional de dos genes diferentes) [Almond et al, 2003]. Al ser los dos parámetros medidos en el mismo ensayo y en las mismas muestras, es posible establecer una relación directa entre ambos durante un mismo evento celular, lo cual no sería posible si se midieran estos parámetros por separado. Estos ensayos también se utilizan para la normalización de la actividad reportera de un reportero, mediante la comparación de su actividad con la de un co-reportero expresado constitutivamente. La normalización ayuda a retirar el efecto de variación producto del ensayo, por diferencias en la eficiencia de transfección, densidad celular, u otros factores. Los ensayos duales también se utilizan para el estudio

de la variabilidad natural en la expresión génica de células individuales, mediante el uso de la misma secuencia de regulación transcripcional para la expresión de los dos reporteros [Thorne et al, 2010] [Harper et al, 2011].

Los reporteros que se emplean en ensayos duales normalmente tienen mecanismos y cinéticas de actividad diferentes: la luciferasa de *P. pyralis* o variantes modificadas como primer reportero, y la luciferasa de *Renilla reniformis* (no es homóloga a las de insecto, usa coelenterazina en lugar de luciferina como sustrato), la  $\beta$ -galactosidasa o proteínas fluorescentes como segundo reportero [Martin et al, 1996] [Thorne et al, 2010] [Harper et al, 2011]. Es posible reconstruir la actividad transcripcional de los genes reportados mediante modelos matemáticos que consideren la tasa de síntesis y degradación de los transcritos y proteínas producidas [Thorne et al, 2010] [Harper et al, 2011].

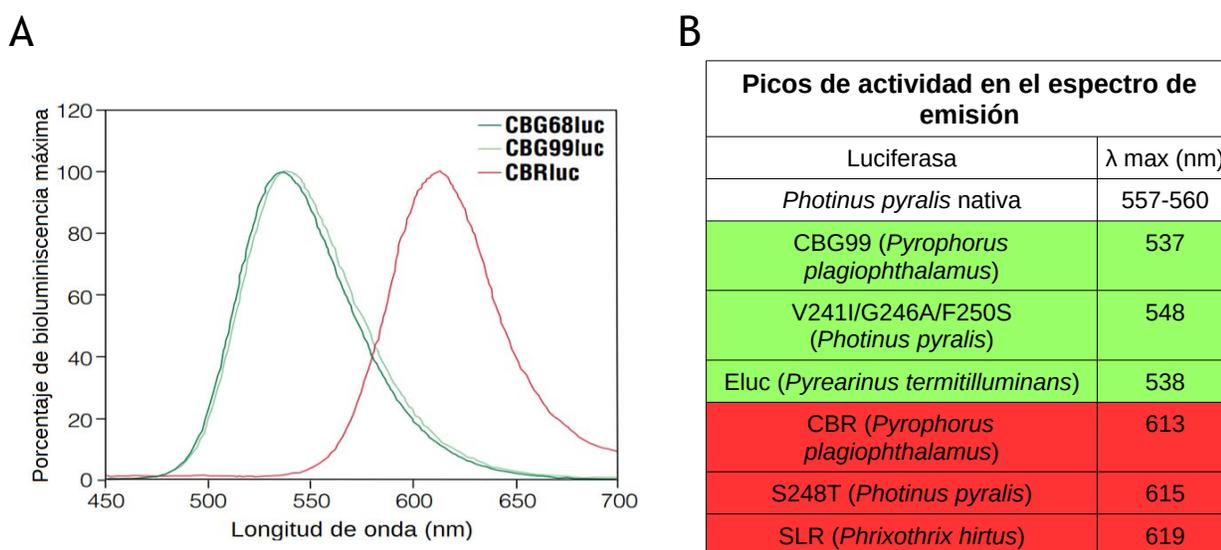


Figura 5: Picos de emisión de luciferasas utilizadas en ensayos de bioluminiscencia dual. (Panel A) Actividad bioluminiscente relativa al máximo de tres luciferasas: CBG99, CBG68 y CBR, con respecto a su longitud de onda. Modificado de Almond et al, 2003. (Panel B) Picos de actividad bioluminiscente con respecto al espectro de emisión, de la luciferasa de la luciérnaga nativa de *Photinus pyralis* y de luciferasas utilizadas en ensayos de bioluminiscencia. Se presenta entre paréntesis el organismo de origen de la luciferasa nativa a partir de la cual se modificó su secuencia. el color de fondo corresponde al tipo de fotones emitidos por las luciferasas (a longitudes de onda cercanas a verde o rojo). Datos obtenidos de Almond et al, 2003, Branchini et al, 2005, Li et al, 2010 y Niwa et al, 2010.

Una alternativa al uso de reporteros con cinéticas de actividad diferente, la cual permita hacer comparaciones confiables en la actividad de ambos reporteros, es el uso de luciferasas de insecto con picos de emisión diferentes. Lo anterior debido a que simplificaría la comparación de la actividad de los dos reporteros, al poseer cinéticas de actividad similares, al utilizar los mismos sustratos y a que se evitan posibles interferencias por parte de sustratos usados por enzimas diferentes [Thorne et al, 2010] [Harper et al, 2011]. Si estas luciferasas emiten fotones en rangos lo suficientemente separados, la señal de cada enzima se puede extraer por medio de filtros durante el ensayo dual. Existen parejas de luciferasas de insecto modificadas específicamente para ensayos duales de bioluminiscencia (Figura 5) [Almond et al, 2003] [Kwon et al, 2010] [Mezzanotte et al, 2011]. De estas luciferasas, sobresale la

pareja de reporteros CBG99 y CBR, modificadas de una misma luciferasa obtenida del elatérico *Pyrophorus plagiophthalmus* (Figura 5). Estos reporteros tienen una elevada identidad nucleotídica (99%) [Almond et al, 2003]. Por su elevada identidad se considera que ambos reporteros poseen tasas de síntesis similar. Las diferencias en su secuencia nucleotídica están relacionadas con el rango de emisión de fotones de cada luciferasa, de acuerdo a la longitud de onda: 537nm para CBG99 (emisión verde) y 613 para CBR (emisión roja) [Almond et al, 2003]. La distancia entre sus picos de emisión es adecuada para separar la señal de cada luciferasa con ayuda de filtros, y estas luciferasas se utilizan comúnmente en ensayos de bioluminiscencia dual en cultivos celulares [Almond et al, 2003]. Su uso en ensayos para células individuales podría servir para la medición de la dinámica transcripcional regulada por dos promotores relacionados a un mismo proceso, o bien, para el estudio de la variabilidad natural de un promotor, retirando la contribución del ensayo en la variabilidad por parte del co-reportero de normalización.

### 2.1.3 Uso de luciferasas desestabilizadas.

La luciferasa de *P. pyralis* es una luciferasa con un tiempo de vida media relativamente bajo, cercano a las 2 horas [Ignowski y Schaffer, 2004], característica que le permite reportar cambios en la actividad transcripcional. Sin embargo, este reportero es incapaz de reportar cambios ocurridos en rangos de minutos. Para la medición de la actividad transcripcional de estos eventos se pueden utilizar reporteros desestabilizados por medio de fusiones traduccionales (Figura 6).

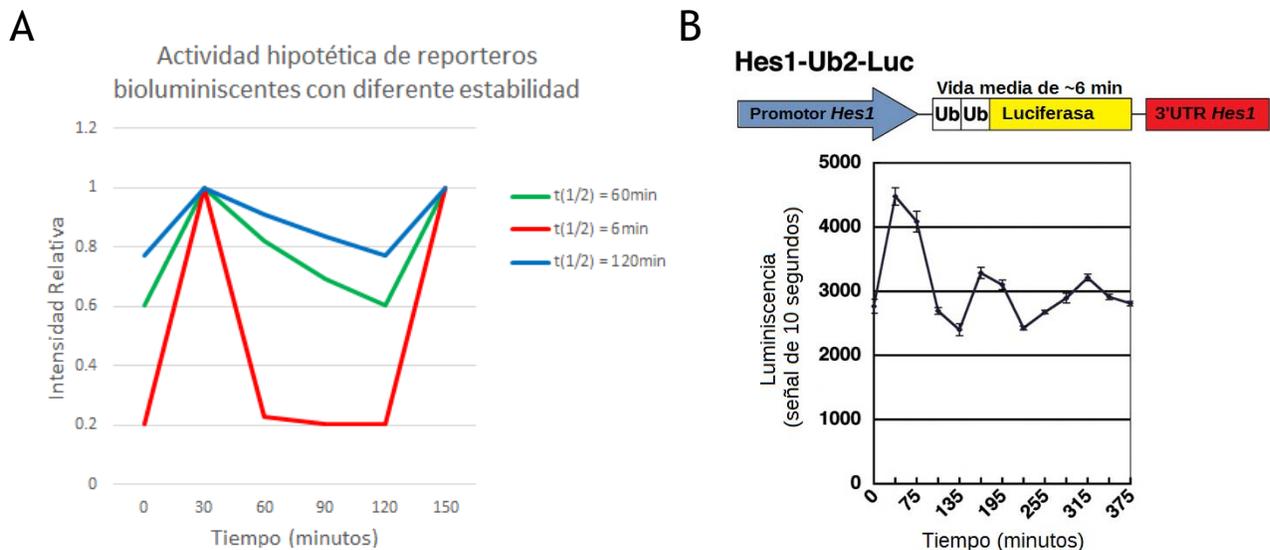


Figura 6: Papel de la estabilidad de las luciferasas en ensayos de dinámica transcripcional. (Panel A) Gráfica que muestra la actividad hipotética de reporteros bioluminiscentes, los cuales reportan ciclos transcripcionales de 2 horas con 30 minutos de transcripción activa por ciclo. Cada línea representa la actividad de luciferasas con vida media de 6 (roja), 60 (verde) y 120 minutos (azul). El valor de cambio por inducción de cada luciferasa es de 4.87, 1.65 y 1.29, respectivamente. La tasa de transcripción activa es 5 veces la basal (Panel B) Esquema de una luciferasa fusionada a dos concatenados de ubiquitina G76V (Ub), regulada bajo el promotor y la región no codificante 3' (3'UTR) de *Hes1*. Debajo del esquema, una gráfica que muestra la actividad bioluminiscente promedio de esta luciferasa con respecto al tiempo, tras la inducción de *Hes1* por suero. Modificado de Masamizu et al, 2006.

Una estrategia utilizada para desestabilizar reporteros consiste en la introducción de fragmentos de la secuencia de degradación PEST de la decarboxilasa de ornitina de ratón al reportero. La secuencia PEST promueve el marcado de poliubiquitinas de la proteína fusionada y reduce su estabilidad [Rogers et al, 1986] [Ghoda et al, 1989]. La proteína fluorescente desestabilizada d2EGFP contiene esta secuencia [Cormack et al, 1996] [Yang et al, 1996], aunque la estabilidad del reportero depende considerablemente de la línea celular, alcanzando tiempos de vida media de hasta 8 horas [Corish y Tyler-Smith, 1999]. Otra estrategia, de particular interés, consiste en la inserción de ubiquitinas modificadas. La sustitución de la glicina 76 por valina (G76V) en esta proteína impide que las hidrolasas de ubiquitinas actúen sobre ella, lo que aumenta la tasa de degradación de la proteína fusionada a esta ubiquitina [Stack et al, 2000] [Luker et al, 2003]. El efecto desestabilizador de las ubiquitinas G76V es dependiente del número de copias utilizadas [Stack et al, 2000] [Masamizu et al, 2006], lo que permite modular la estabilidad del reportero fusionado. Esta estrategia se utilizó para aumentar la sensibilidad de la luciferasa de *P. pyralis* (Figura 6b) [Masamizu et al, 2006] y podría utilizarse en otras luciferasas, como por ejemplo las utilizadas en ensayos duales, para aumentar su sensibilidad.

El uso de luciferasas desestabilizadas tiene por desventaja la disminución de su actividad bioluminiscente, debido a la baja concentración de moléculas durante los ensayos. Estos reporteros serán confiables siempre que la actividad reportada tenga valores de Relación Señal-Ruido aceptables.

## **2.1 El ciclo celular como modelo para evaluar la actividad reportera de luciferasas.**

La utilidad de las diferentes luciferasas de insecto suele demostrarse en ensayos de bioluminiscencia en donde la expresión de los reporteros esté controlada por sistemas de regulación transcripcional bien estudiados. Los ritmos circadianos, la actividad oscilatoria de *Hes1* y el ciclo celular son ejemplos de sistemas utilizados para la evaluación de luciferasas [Wood, 1999] [Masamizu et al, 2006] [Kwon et al, 2010]. De los sistemas presentados, el ciclo celular es un sistema que podría ser de utilidad para evaluar la actividad reportera de diferentes luciferasas por razones que se exponen a continuación.

En células somáticas competentes (no diferenciadas, no senescentes y no apoptóticas), la iniciación del ciclo celular requiere de la presencia de ciertos factores de crecimiento polipeptídicos, denominados mitógenos [Baserga, 1984]. En ausencia de mitógenos, las células se retiran del ciclo celular y entran en fase quiescente  $G_0$  [Zetterberg y Larsson, 1985] [Pardee, 1989]. El punto de control que evalúa la información proveniente del ambiente y decide si continúa o no el ciclo celular se denomina punto de restricción, localizado en la fase  $G_1$  [Pardee, 1974] (Figura 7). Durante el paso por el punto de restricción, la progresión del ciclo celular se regula transcripcionalmente [Winkles, 1998].

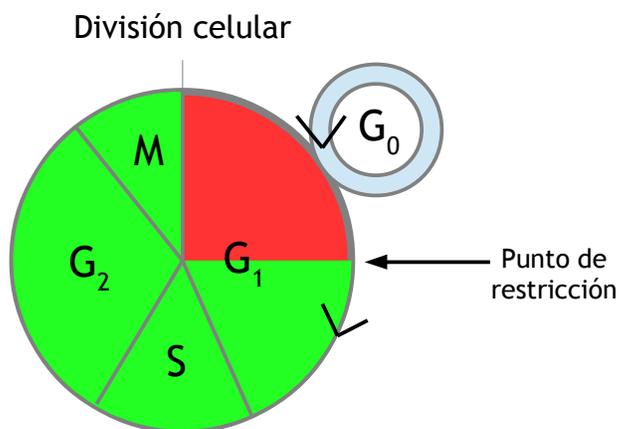


Figura 7: Punto de restricción del ciclo celular. Se muestra un esquema del ciclo celular, mostrando los periodos en los cuales su progresión es sensible a mitógenos (rojo) o no lo es (verde). Se muestra la fase de quiescencia G<sub>0</sub> iniciada en células privadas de mitógenos (azul claro).

Los genes regulados en el punto de restricción se pueden clasificar en dos grupos, de acuerdo a la temporalidad de su expresión: de expresión temprana y de expresión tardía. Los genes de expresión temprana se caracterizan por responder directamente a la inducción por mitógenos e inducir su expresión a las 0.5-2 horas después de la adición de mitógenos [Winkles, 1998]. Los genes de expresión tardía se expresan horas después de la adición de mitógenos, pues dependen de la expresión de los genes de respuesta temprana-inmediata [Winkles, 1998]. El momento de la expresión de estos genes depende del conjunto de elementos de unión a factores de transcripción localizados en la región del promotor de cada gen. Por ejemplo, el promotor del gen de expresión temprana *c-Fos* contiene elementos de unión a factores de transcripción que en respuesta a suero actúan como activadores: el elemento sensible a suero (SRE), el elemento sensible a calcio y a AMP cíclico (CaCRE), el sitio de unión al factor nuclear 1 (NF-1) y el elemento inducible a *v-sis* (SIE) [Hipskind y Nordheim, 1991] [Runkel et al, 1991] [Sadowski et al, 1993]. Este promotor también contiene un sitio de unión a la proteína activadora 1 (AP-1), la cual reprime la transcripción de *c-Fos* por medio de una retroalimentación negativa, pues la proteína c-Fos forma parte del factor AP-1 [Schönthal et al, 1989] [König et al, 1989]. En cambio, el promotor del gen de expresión tardía *ciclina A2* contiene elementos de unión a factores de transcripción que responden al paso de la fase G<sub>1</sub> a S: el elemento dependiente del ciclo celular (CDE), la región de homología de genes del ciclo celular (CHR), el sitio de unión al factor nuclear Y (NF-Y) y a CaCRE [Henglein et al, 1994] [Schulze et al, 1995] [Zwicker et al, 1995] [Krämer et al, 1996] [Huet et al, 1996]. Ambos promotores contienen un sitio de unión a la proteína de especificidad 1 (Sp-1), cuya función en estos promotores no está estudiada, pero podría actuar como coactivador de la transcripción [Li y Davie, 2010]. En la Figura 8 se presentan los dos promotores mencionados y los sitios de unión a factores de transcripción identificados dentro de ellas. Queda destacar que el promotor de *c-Fos* contiene un elemento regulador río-abajo (DRE), pero cuya función no se relaciona con el control del ciclo celular en células somáticas [Carrión et al, 1999].

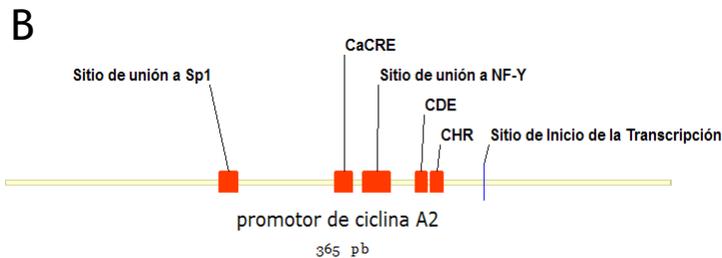
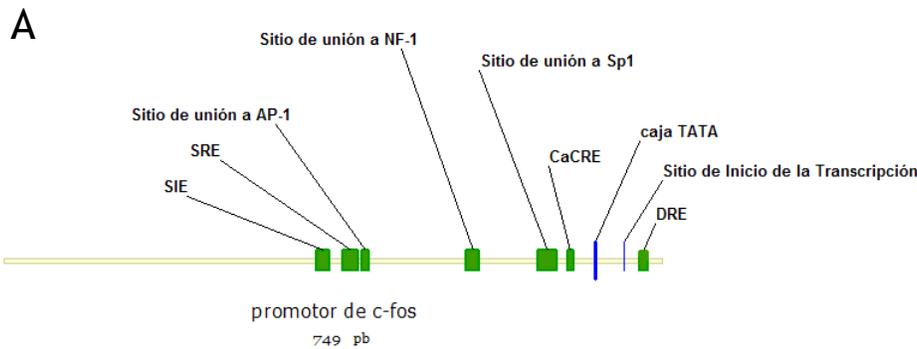


Figura 8: Elementos regulatorios caracterizados en los promotores de *c-Fos* (Panel A) y *Ciclina A2* humanos (Panel B). Los elementos aparecen como cuadros de color sobre la línea amarilla y gruesa que representa a la secuencia de los promotores. Las abreviaturas corresponden a: el elemento sensible a suero (SRE), el elemento sensible a calcio y a AMP cíclico (CaCRE), el elemento inducible a *v-sis* (SIE), el elemento regulador río-abajo (DRE), el elemento dependiente del ciclo celular (CDE) y la región de homología de genes del ciclo celular (CHR).

Es posible controlar la expresión de genes regulados por el punto de restricción mediante la privación y adición de suero, un reactivo relativamente barato [Runkel et al, 1991] [Henglein et al, 1994] [Wood, 1999]. Es posible sincronizar el ciclo celular de células 3T3 (una línea celular no transformada) mediante privación de suero por 24 horas, alcanzando una eficiencia de sincronización mayor al 90% [Wood, 1999]. Existen ejemplos de ensayos de bioluminiscencia para dinámica transcripcional utilizando a la luciferasa de *P. pyralis*, y a los promotores de los genes de expresión temprana *c-Fos* y *c-Myc* humanos, y los de expresión tardía *Ciclina A2*, *CDC2*, *E2F* y *Ciclina B* humanos (Figura 9).

La respuesta bioluminiscente a la adición de suero en estos ensayos fue reproducible y robusta, es decir, la mayoría de las células en todos los ensayos aumentaron su actividad bioluminiscente de manera significativa y casi sincronizada [Wood, 1999]. Como ejemplo, la expresión de luciferasa bajo el promotor de *c-Fos* humano se mantuvo reprimida en ausencia de suero, pero tras la adición de suero se observó un cambio por inducción robusto, con un máximo de  $5.8 \pm 0.8$  veces la señal basal a las 5 horas post-suero (Figura 9b). En el caso del promotor de *Ciclina A2* humano, la expresión de luciferasa aumentó a partir de las 12 horas post-suero y alcanzó un cambio por inducción máximo de  $20.6 \pm 4.6$  veces la señal basal a las 23 horas post-suero (Figura 9c). Debido a lo económico, robusto y reproducible de este ensayo, el modelo de regulación transcripcional durante el paso por el punto de restricción es conveniente para probar la actividad dinámica de reporteros bioluminiscentes.

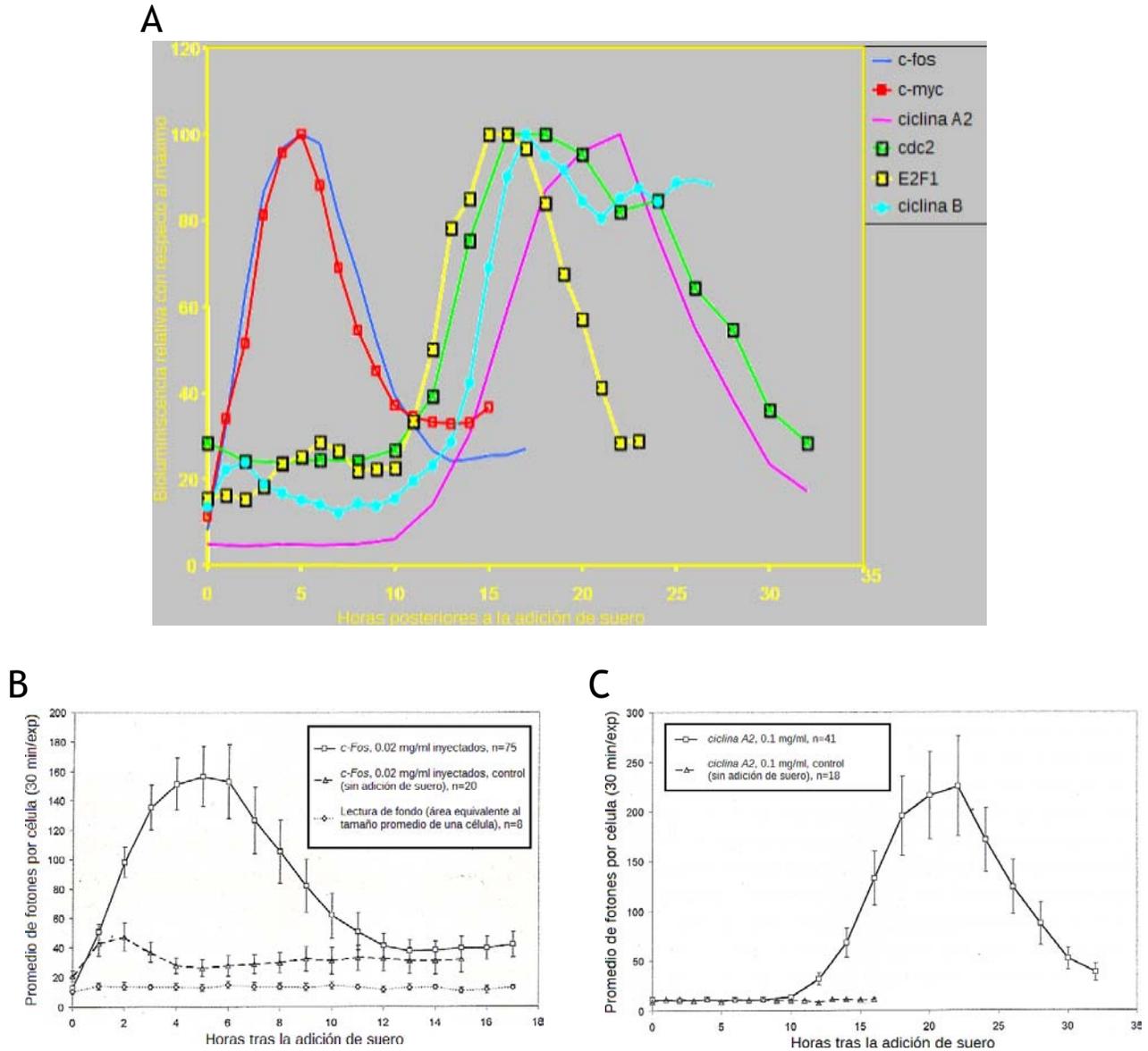


Figura 9: Actividad bioluminiscente promedio de células 3T3 sincronizadas, tras la adición de suero al medio. (Panel A) Gráfica que indica la señal promedio obtenida de células individuales microinyectadas con diferentes plásmidos de expresión de luciferasa de *P. pyralis*. Cada plásmido contiene al gen reportero regulado por los promotores de los genes humanos del ciclo celular *c-Fos*, *c-Myc*, *ciclina A2*, *CDC2*, *E2F1* y *ciclina B*. Cada línea representa la señal promedio de células microinyectadas con el mismo plásmido. El gen del promotor utilizado en cada plásmido y el color asociado a este se muestra en la esquina superior derecha. Para comparar la respuesta de cada plásmido, la señal presentada es relativa al pico de actividad observada para cada plásmido. (Paneles B y C) Gráficas que indican la señal promedio y desviación estándar obtenida de células individuales microinyectadas con plásmidos de expresión de luciferasa, regulada por los promotores de los genes de *c-Fos* y *ciclina A2*, respectivamente. Cada línea representa la señal promedio de células microinyectadas bajo las condiciones indicadas en el recuadro, durante la adición de suero o en ausencia de este como control negativo. Cada medición requirió de 30 minutos de exposición. Modificado de Wood, 1999.

El proyecto presentado en esta tesis consistió en la implementación de un ensayo de dinámica transcripcional en células individuales que permita evaluar la actividad dinámica de dos luciferasas de insecto utilizadas en ensayo duales: CBG99 y CBR. Con el ensayo en células individuales se desea obtener una herramienta que permita estudiar el papel de la dinámica transcripcional de genes cuyos productos estén involucrados en un proceso de interés. Como se comentó en la introducción, la actividad transcripcional de un gen en células individuales varía a través del tiempo y de célula a célula. Esta variación es capaz de influir en el desarrollo de los procesos biológicos, por lo que es conveniente medir la dinámica transcripcional de genes involucrados en un proceso a estudiar.

Para considerar que las luciferasas a usar son adecuadas para medir dinámica transcripcional, su actividad bioluminiscente debe generar valores de Relación Señal-Ruido aceptables durante el ensayo y debe responder a cambios en su tasa de síntesis. De obtenerse resultados positivos, se considerará la posibilidad de implementar un ensayo dual de bioluminiscencia. Este tipo de ensayo permitirá medir de manera consecutiva dos parámetros de interés, por ejemplo la dinámica transcripcional de dos genes involucrados en un mismo proceso biológico.

Se utilizó al control del ciclo celular durante el punto de restricción como modelo de regulación transcripcional. Para la expresión de ambas luciferasas se seleccionaron los promotores de dos genes de expresión temprana y de expresión tardía del ciclo celular: *c-Fos* y *Ciclina A2* humanos. Ambos promotores ofrecieron una respuesta fuerte y robusta a la adición de suero en los ensayos de referencia [Wood, 1999], razón por la cual se eligieron para evaluar a los reporteros. Además de evaluar la actividad reportera de CBG99 y CBR, se construyeron fusiones traduccionales entre ambas luciferasas y un concatenado de 4 ubiquitinas G76V, con el fin de reducir la vida media de estos reporteros. Estas fusiones se utilizaron también en los ensayos de dinámica transcripcional, para comparar su actividad con la obtenida de las luciferasas sin modificar.

También en este proyecto, se construyeron vectores con el propósito de utilizarlos posteriormente en ensayos de vida media. Los genes de luciferasa contenidas en estos plásmidos fueron CBG99 y CBR, además de Luc2 y ELuc cuya vida media es conocida [Ignowski y Schaffer, 2004] [Nakajima et al, 2010]. En estos vectores se colocó al promotor constitutivo de timidina cinasa (TK) del virus de herpes simple [Jones et al, 1985], que a pesar de la baja tasa de síntesis de transcritos que ofrece, se evitan los problemas de utilizar promotores más fuertes. Estos promotores pueden reprimir la expresión de genes en plásmidos por medio del acaparamiento de factores de transcripción generales [Reddy et al, 1995]. Además, la expresión de los genes regulados por promotores fuertes es sensible a la progresión del ciclo celular [Banik et al, 1996] [Brightwell et al, 1997], y varía entre líneas celulares [Qin et al, 2010]. Conocer el tiempo de vida media de las luciferasas CBG99 y CBR permitirá corroborar el potencial que tienen como reporteros dinámicos; si su vida media es demasiado elevada, no reportarán eficientemente cambios sutiles en la expresión.

### **3. Hipótesis**

Las luciferasas de insecto CBG99 y CBR son reporteros adecuados para llevar a cabo ensayos de monitoreo de la dinámica transcripcional de un promotor en células individuales, por lo que podrían ser utilizados simultáneamente en ensayos duales de bioluminiscencia por microscopía.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo General**

Implementar un ensayo de dinámica transcripcional en células individuales, basado en el ciclo celular, que permita caracterizar la dinámica de la actividad de las luciferasas CBG99 y CBR.

#### **4.2 Objetivos Particulares**

1. Construir plásmidos vectores que contengan la región codificante de los genes de luciferasa de elatérico CBG99 y CBR, bajo el control transcripcional de la secuencia promotora de los genes *c-Fos* y *Ciclina A2* (4 vectores en total).
2. Llevar a cabo ensayos de bioluminiscencia en células transfectadas con plásmidos que expresen CBG99 ó CBR bajo los promotores de *c-Fos* y *Ciclina A2*.
3. Modificar la estabilidad de CBG99 y CBR a través de fusiones traduccionales con concatenados de la ubiquitina no hidrolizable G76V.
4. Construir plásmidos vectores que contengan la región codificante de los genes de luciferasa CBG99, CBR, ELuc y Luc2, bajo el control transcripcional de la secuencia promotora del gen de timidina cinasa del virus de herpes simple.

## 5. Materiales y métodos:

### 5.1 Biología molecular

#### 5.1.1 Extracción de ADN genómico humano.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución amortiguadora de lisis.  
Para preparar 10mL: 58mg de NaCl  
190µL de Tris-HCl a 1.5M, pH 8.0  
50µL de EDTA a 500mM, pH 8.0  
500µL de SDS a 10%  
Completar con agua Milli-Q (Merck-Millipore)
- Proteinasa K. Guardado en alícuotas de 10mg/mL a -20°C.
- Acetato de potasio a 5M.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se colocaron ~50 cabellos humanos con raíz en un tubo Eppendorf de 1.5mL.
2. Se añadieron 200µL de solución amortiguadora de lisis y se incubó a 98°C por 20 minutos.
3. Se dejó enfriar por 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 5µL de proteinasa K a 10mg/mL y se incubó a 55°C por 4 horas a 450 rpm.
5. Se añadieron 200µL de acetato de potasio a 5M. Se mezcló por pipeteo.
6. Se añadieron 500µL de cloroformo. Se mezcló con ayuda de un agitador por vórtex a máxima velocidad por 5 minutos.
7. Se centrifugó por 8 minutos a 12000 rpm.
8. La muestra se separó en dos fases después de la centrifugación. Se tomó la fase superior de la solución y se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.5mL.
9. Se añadieron dos volúmenes de etanol al 100% y se mezcló por inversión.
10. Se centrifugó por 20 minutos a 12000 rpm.
11. El sobrenadante en el tubo se retiró por decantación, dejando sólo la pastilla de ADN y residuos. El etanol restante se dejó evaporar: ya sea a temperatura ambiente o calentando el tubo con ayuda de una placa incubadora.
12. Se disolvió la pastilla en 150µL de agua Milli-Q o de alguna solución amortiguadora de elusión para ADN mediante agitación por vórtex.

### 5.1.2 Amplificación de fragmentos por reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR).

Las amplificaciones requirieron de los siguientes cebadores:

c-fos For\_out : CCA CTT TCT GCT TCC AAA CGC

c-fos Rev\_out : CGT GGC GGT TAG GCA AAG C

c-fos For : CCC GAG GGC TGG AGG TTA G

c-fos Rev : CGG CTC AGT CTT GGC TTC TC

ciclinaA2\_For : CCT CGC TCA CTA GGT GGC T

ciclinaA2\_Rev : CAG CTC GAG ACC ACG CA

El protocolo para el promotor de *c-Fos* humano fue el siguiente:

1. Se preparó una solución de 25µL con lo siguiente:
  - 13.65µL de agua Milli-Q
  - 2.5µL de amortiguador para DreamTaq™ (# Cat. EP0702, Fermentas)
  - 1.25µL de dimetilsulfóxido (DMSO) \*
  - 0.5µL de solución de dNTPs a 10mM
  - 0.5µL de oligo c-fos For\_out a 80pmol/µL
  - 0.5µL de oligo c-fos Rev\_out a 80pmol/µL
  - 0.1µL de polimerasa de ADN DreamTaq™
  - 5µL de solución de templado de ADN
2. Se colocó en termociclador, bajo los siguientes parámetros:
  - 95°C por 4 minutos
  - 94°C por 1 minuto
  - 55°C por 1 minuto
  - 74°C por 1 minuto
  - 74°C por 10 minutos
  - 15°C al terminar

} 34 ciclos
3. El producto de amplificación sirvió de templado para un segundo PCR. Se preparó una solución de 25µL con lo siguiente:
  - 21.3µL de agua Milli-Q
  - 2.5µL de amortiguador para DreamTaq™
  - 0.5µL de solución de dNTPs a 10mM
  - 0.05µL de oligo c-fos For a 80pmol/µL
  - 0.05µL de oligo c-fos Rev a 80pmol/µL
  - 0.1µL de polimerasa de ADN DreamTaq™
  - 0.5µL de templado de ADN
4. Se colocó en termociclador, bajo los siguientes parámetros:

95°C por 4 minutos  
94°C por 1 minuto } 28 ciclos  
55°C por 1 minuto }  
74°C por 1 minuto }  
74°C por 10 minutos  
15°C al terminar

El protocolo para el promotor de *Ciclina A2* humano fue el siguiente:

1. Se preparó una solución de 25µL con lo siguiente:
  - 13.4µL de agua Milli-Q
  - 2.5µL de amortiguador para DreamTaq™
  - 2.5µL de DMSO \*
  - 0.5µL de solución de dNTPs a 10mM
  - 0.5µL de oligo ciclinaA2\_For a 80pmol/µL
  - 0.5µL de oligo ciclinaA2\_Rev a 80pmol/µL
  - 0.1µL de polimerasa de ADN DreamTaq™
  - 5µL de solución de templado de ADN
2. Se colocó en termociclador, bajo los siguientes parámetros:
  - 95°C por 4 minutos
  - 94°C por 1 minuto } 34 ciclos
  - 65°C por 1 minuto }  
74°C por 1 minuto }  
74°C por 10 minutos
  - 15°C al terminar

\* El dimetilsulfóxido, DMSO, es un compuesto orgánico que inhibe la formación de estructuras secundarias en el ADN. Se utiliza para facilitar la interacción entre templado de ADN y cebador, especialmente en secuencias que contienen un porcentaje elevado de guaninas y citocinas. Se recomienda que la cantidad de DMSO utilizada en la solución de amplificación no debe de ser mayor a 5% del volumen total, para evitar que interfiera con la actividad de la polimerasa.

### 5.1.3 Electroforesis en gel de agarosa.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución amortiguadora TAE 10X  
Para preparar 1L: 48.4g de Tris-base  
11.4mL de solución de ácido acético glacial a 1.14%  
20mL de EDTA a 500mM, pH 8.0  
Completar con agua destilada.
- Solución amortiguadora SB 20X  
Para preparar 1L: 8g de NaOH  
45g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
Completar con agua destilada.
- Solución de carga 6X  
Para preparar 2mL: 2.5μL de azul de bromofenol  
600μL de glicerol  
1397.5μL de agua Milli-Q

Se utilizaron los marcadores moleculares 1kb DNA Ladder (# Cat. GC-015-003-050, GeneCraft), GeneRuler™ DNA Ladder Mix (# Cat. SM0332, Fermentas), VersaLadder™ 100-10,000bp (# Cat. D012, GoldBiotechnology), KAPA Universal Ladder (# Cat. KK6303, KAPA).

El protocolo de electroforesis fue el siguientes:

1. Se mezcló agarosa en una solución amortiguadora a 1X: si el fragmento a obtener es menor a 1kb, se utilizó la solución SB a 1X y agarosa a valores de 1-2%; caso contrario, se utilizó la solución TAE a 1X y agarosa a valores de 0.6-1% (un gel a 1% de agarosa contiene 100mg de agarosa por cada 10mL de solución amortiguadora a 1X).
2. La solución se calentó mediante microondas hasta punto de ebullición y se agitó suavemente. Este paso se repitió hasta conseguir una solución uniforme. Se vertió la solución en el molde, se colocó el peine para pozos y se dejó enfriar.
3. Una vez solidificado, el gel se colocó en la caja de electroforesis. Se llenó la caja con la misma solución amortiguadora a 1X hasta cubrir el gel.
4. Cada muestra a analizar se mezcló con la solución de carga 6X a proporción 1:5. Una vez mezclado, cada muestra se cargó en un pozo correspondiente del gel de agarosa. Se colocó en otro pozo el marcador de peso molecular.
5. Se encendió la cámara de electroforesis, con un voltaje inicial de 25V; una vez que la solución de carga se observó completamente fuera del pozo, el voltaje aumentó a 50-100V hasta que la solución de carga haya recorrido la mitad del gel.
6. Se apagó la cámara de electroforesis. El gel se colocó en un recipiente con 20mL de

agua destilada y 10-20 $\mu$ L de bromuro de etidio a 1mg/mL, y se dejó teñir durante 20-30 minutos.

7. El gel se colocó en un transiluminador y se irradió con luz ultravioleta, para visualizar las bandas de ADN:bromuro de etidio.

#### ***5.1.4 Extracción de ADN de geles de agarosa.***

Se colocó un plástico transparente limpio encima del transiluminador para evitar la contaminación del gel. Para evitar la degradación del ADN, la radiación con luz ultravioleta se utilizó el menor tiempo posible. La sección del gel que contiene la banda de ADN de interés se separó del resto con ayuda de una navaja limpia y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Se utilizó el equipo GeneJET™ Gel Extraction Kit (# Cat. K0692, Fermentas) para extraer el ADN de la sección del gel.

#### ***5.1.5 Digestión de ADN mediante endonucleasas de restricción.***

En general, la solución de digestión siguió el protocolo siguiente:

1. Se mezcló en una solución de 20 $\mu$ L \* :
  - 2 $\mu$ L de la solución amortiguadora 10X adecuada
  - 0.5 $\mu$ L de cada endonucleasa de restricción a utilizar
  - ~1 $\mu$ g del plásmido a seleccionar \*\*
  - Completar con agua Milli-Q.
2. Se incubó a 37°C por al menos dos horas (Se puede incubar durante toda una noche).
3. En los casos en los que se procedió a la defosfatación de los productos de digestión, antes de eso las endonucleasas se inactivaron por incubación a 80°C por 20 minutos y después se colocaron en hielo por 5 minutos.
4. Se comprobó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa.

\* En los casos donde se llevó a cabo una triple digestión, la solución final aumentó su volumen a 30 $\mu$ L y la solución amortiguadora 10X sube a 3 $\mu$ L.

\*\* Se recomienda aumentar la cantidad del plásmido si la banda esperada es de tamaño corto.

#### ***5.1.6 Cuantificación de la concentración de ADN en solución.***

Se siguieron dos estrategias. La primera requirió de la electroforesis y tinción de una muestra de 1-5 $\mu$ L en un gel de agarosa junto con un marcador de peso molecular. Se aprovechó el conocimiento de la masa de ADN en las bandas del marcador para estimar la masa del ADN en la banda muestra, y a partir de esta, la concentración de ADN en solución.

La segunda estrategia, de mayor precisión, aprovechó la capacidad de los ácidos nucleicos para absorber la luz ultravioleta. Con ayuda de un espectrofotómetro, la muestra se expuso a un haz de luz ultravioleta de 260nm de longitud de onda, a la vez que se cuantificó el número de fotones que atravesaron la muestra sin ser absorbidos. La concentración de ADN se cuantificó siguiendo la ley de Lambert-Beer, con la cual se obtuvo una relación entre la absorbancia de la muestra medida y la concentración de ácidos nucleicos en esta. Se utilizaron los equipos NanoDrop™ 1000 V3.7 (Thermo Scientific) y NanoPhotometer™ Pearl (IMPLEN).

### ***5.1.7 Defosfatación de ADN.***

Se utilizó la fosfatasa de camarón del ártico, SAP, (# Cat. EF0511, Thermo Scientific) para retirar los grupos fosfato en los extremos del fragmento. Al carecer de grupos fosfatos, no pueden recircularizarse durante la ligación. Se defosfataron preferentemente los vectores recipiente con extremos romos o cohesivos complementarios entre sí.

El protocolo de defosfatación fue el siguiente:

1. Se añadió 1µL de SAP a la solución con el fragmento a defosforilar.
2. Se incubó a 37°C por 1 hora.
3. Se incubó a 65°C por 15 minutos para desactivar la SAP.
4. Si la solución sólo contiene el fragmento de interés, se purificó utilizando el equipo de purificación de geles, usando los µL de solución como si fueran mg de gel. Si se trató de una solución con varios fragmentos de ADN, pero sólo uno es de interés, la muestra pasó primero por electroforesis en gel de agarosa y se purificó la banda de interés.

### ***5.1.8 Ligación de ADN.***

El protocolo de ligación fue el siguiente:

1. Se preparó la siguiente solución en 16-20 µL:
  - 50 ng de vector abierto
  - el fragmento a insertar a una proporción estequiométrica de 1:3 a 1:5 \*
  - 1.6-2 µL de amortiguador para ligasa T4 10X
  - 1 µL de ligasa T4 \*\*
  - Completar con agua Milli-Q
2. Se incubó 30-60 minutos a temperatura ambiente.

Para ligaciones con fragmentos con extremos a rellenar/rasurar, el protocolo fue el siguiente:

1. Se preparó la siguiente solución en 19  $\mu\text{L}$ :
  - 50ng de vector abierto
  - el fragmento a insertar a una proporción estequiométrica de 1:3 a 1:5 \*
  - 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador para ligasa T4 10X
  - 0.5  $\mu\text{L}$  de solución de dNTPs a 10mM
  - 0.1  $\mu\text{L}$  de polimerasa de ADN Pfu (# Cat. EP0501, Thermo Scientific)
  - Completar con agua Milli-Q
2. La solución se incubó 10-20 minutos a 70°C.
3. Se enfrió en hielo durante 5 minutos.
4. Se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de ligasa T4 \*\* y se incubó 30-60 minutos a temperatura ambiente.

\* Para calcular la cantidad de inserto necesario, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{(\text{ng de vector}) \times (\text{pb de vector}) \times (\text{proporción inserto:vector})}{\text{pb del inserto}}$$

\*\* La ligasa T4 a concentración 1 Weiss (Weiss = u / $\mu\text{L}$ ) (# Cat. EL0016, Fermentas) se utilizó si la ligación involucra ADN con extremos cohesivos; para extremos romos ó rasurados se utilizó a concentración 30 Weiss (# Cat. EL0013, Fermentas).

### 5.1.9 Preparación de cajas bacteriológicas.

Se prepararon los siguientes medios:

- Medio Luria Bertani (LB).  
 Contiene: 10g/L de triptona BactoTM (# Cat. 211705, BD Difco)  
 10g/L de NaCl  
 5g/L de extracto de levadura BactoTM (# Cat. 212750, BD Difco)
  1. Se disolvió cada ingrediente perfectamente antes de añadir el siguiente.
  2. Se ajustó el pH a 7, con aproximadamente 300 $\mu\text{L}$  de NaOH 10N.
  3. Se colocó en alícuotas de 50mL.
  4. Se esterilizó por autoclave.
  5. Se almacenó a temperatura ambiente.
- Medio LB sólido.
  1. A 1L de medio LB, se agregaron 15g de agar BactoTM (# Cat. 214010, BD Difco).
  2. Se colocó en alícuotas de 250mL.
  3. Se esterilizó por autoclave.
  4. Se almacenó a temperatura ambiente.

Se prepararon los siguientes antibióticos:

- Ampicilina 1000X: 2g de ampicilina sódica en 10mL de agua Milli-Q (200mg/mL).
- Kanamicina 1000X: 500mg de kanamicina sulfato en 10mL de agua Milli-Q (50mg/mL).

Estas soluciones se almacenaron en alícuotas de 500µL a -20°C.

Se calentó una alícuota de medio LB sólido por medio de horno de microondas a baja intensidad hasta su licuefacción. Después, se esperó a que la temperatura fuese tolerable al tacto. Para las cajas que se utilizarán en selección por antibiótico, se añadió y mezcló este a proporción 1:1000 (para una concentración final de 200µg/mL de ampicilina o de 50µg/mL de kanamicina). Se vertió el medio en las cajas bacteriológicas bajo la esterilidad producida por el fuego de un mechero Bunsen.

### ***5.1.10 Transformación de bacterias por choque térmico.***

Este método consiste en la generación de poros en la membrana celular de bacterias competentes, mediante un aumento repentino y breve en la temperatura. A través de estos poros se introducen los plásmidos a clonar. Se utilizaron células de la cepa DH5-α de la bacteria *Escherichia coli* como células competentes.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se colocó una alícuota de células competentes en hielo, para descongelarla lentamente.
2. Se vertieron 10µL del producto de ligación ó al menos 1ng de plásmido cerrado en un tubo Eppendorf de 1.5mL, 1 tubo por muestra, y se colocaron en hielo.
3. Para cada tubo se adicionaron 50-100µL de la alícuota de células competentes y se mezcló suavemente.
4. Se dejaron los tubos 5 minutos en hielo.
5. Se colocaron los tubos a 42°C por 45 segundos.
6. Se dejaron los tubos 5 minutos en hielo.
7. Se encendió un mechero Bunsen para esterilizar el área de trabajo. A cada tubo se añadieron 900µL de medio LB.
8. Se incubó por 45-60 minutos a 37°C en agitación a 900-1000 rpm.
9. Se centrifugaron los tubos a 12000 rpm por 10-15 segundos. Se retiró el excedente de medio por decantación. Quedaron 100-200µL de medio y la pastilla de células.
10. Se agitó por vórtex ligeramente hasta resuspender las células competentes en el medio.
11. Las células suspendidas se sembraron en las cajas bacteriológicas correspondientes.
12. Se incubó por 12-14 horas a 37°C.
13. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se selló con Parafilm y se guardó a 4°C.

### 5.1.11 Ensayo de selección azul y blanco.

Para este ensayo se distribuyó de manera uniforme 100 $\mu$ L de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a 100mM y 20 $\mu$ L de X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) a 40mg/mL sobre la superficie del medio sólido de cada caja bacteriológica a utilizar. Las cajas se dejaron secar en incubadora hasta evaporarse el DMSO de la solución de X-gal. Las clonas a revisar se sembraron en estas cajas.

Las clonas que tuvieron actividad de  $\beta$ -gal crecieron en colonias con coloración azul, y las que no, crecieron en colonias blancas. Esto se debe a que  $\beta$ -gal toma como sustrato a X-gal en una reacción cuyo producto final es un compuesto insoluble de color azul. El IPTG es un inductor de la expresión de  $\beta$ -gal.

### 5.1.12 Minipreps.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución P1.

Contiene: 50mM de glucosa  
25mM de Tris-HCl, pH 8.0  
10mM de EDTA

Se almacenó en alícuotas de 50mL a temperatura ambiente.

- Solución (de lisis) P2.

Contiene: 200mM de NaOH  
1% de SDS

Se preparó al momento, no se puede guardar.

- Solución (de neutralización) P3.

Para preparar 1L: 600mL de acetato de potasio a 5M, pH 5.5  
115mL de solución de ácido acético glacial a 1.14%  
285mL de agua Milli-Q

Se almacenó en alícuotas de 50mL a -4°C.

El protocolo siguiente se utilizó para recuperar plásmidos que se utilizaron para digestiones o transformación de células competentes:

1. Se prepararon cajas bacteriológicas con medio sólido LB y el antibiótico requerido para selección. Estas cajas se utilizaron para generar un banco de colonias.
2. Por cada colonia a picar, se prepararon 3-5mL de medio LB con antibiótico a 1X en tubos de ensayo. Cada tubo se etiquetó y se inoculó el medio con ayuda de un asa, la cual se usó para picar una colonia de células transformadas. También se inoculó una

sección de la caja del banco de colonias, la cual fue etiquetada con la misma marca que el tubo correspondiente. Entre colonia y colonia, el asa se esterilizó con ayuda de etanol y el fuego del mechero.

3. Los tubos se incubaron con movimiento a 37°C durante 14-16 horas, mientras que el banco de colonias se incubó sin movimiento a 37° durante 12-14 horas.
4. Se centrifugó por partes las bacterias de los tubos de ensayo en tubos Eppendorf de 1.5mL a 12000 rpm durante 15-20 segundos. Se retiró el sobrenadante mediante decantación y micropipeta.
5. A cada tubo se añadió 100µL de solución P1 y 10µL de RNAsa A. Se resuspendieron las células mediante agitación por vórtex hasta no quedar agregados de células.
6. Se adicionaron 100µL de solución P2 a cada tubo. Se mezcló por inversión hasta que la solución quede traslúcida. Se incubó a temperatura ambiente a no más de 5 minutos.
7. Se adicionaron 120µL de solución P3 a cada tubo. Se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos.
9. Para cada tubo se tomó el sobrenadante utilizando micropipeta, y se pasó a un tubo nuevo. Se evitó traer contenido de la pastilla.
10. Se agregó al sobrenadante 200µL de isopropanol. Se mezcló por inversión e incubó 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el isopropanol por decantación.
12. Se agregaron 500µL de etanol al 70% y se mezcló por inversión.
13. Se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto.
14. Se retiró el etanol por decantación. El etanol restante se dejó evaporar a temperatura ambiente o por calor con ayuda de una placa para tubos.
15. La pastilla de ADN se disolvió mediante agitación por vórtex en 35µL de agua Milli-Q ó de alguna solución amortiguadora para elusión de ADN.

Para recuperar plásmidos para secuenciación o transfección se siguió el procedimiento arriba mencionado para crecer la población de colonias. Los pasos de lisis alcalina y purificación se llevaron a cabo con el equipo de purificación por columna QIAprep® Spin Miniprep Kit (# Cat. 27106, QIAGEN), siguiendo el protocolo para microcentrifuga indicado en el manual.

### ***5.1.13 Maxipreps.***

Para crecer las colonias seleccionadas se utilizaron 100 ó 250mL de medio LB con el antibiótico de selección a 1X. El medio se inoculó con una punta esteril de micropipeta, con la cual se picó la colonia de interés. Se incubó con movimiento a 37°C durante 14-16 horas. Para la obtención de plásmido se utilizó el equipo de purificación por columna Plasmid Maxi Kit (Cat. No. 12165, QIAGEN), siguiendo

el protocolo del manual.

Además del protocolo del equipo de purificación, también se utilizó el protocolo siguiente:

1. Los 250mL de medio LB con bacterias se transfirieron a una botella para centrifugación.
2. Se centrifugó a 3500 rpm a 4°C por 10 minutos.
3. Se retiró el sobrenadante por decantación y micropipeta.
4. La pastilla de células se resuspendió en 4mL de la solución P1 utilizada en Minipreps.
5. Se agregaron 8mL de la solución P2, se mezcló por inmersión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
6. Se agregaron 5mL de la solución P3, se mezcló por inmersión y se incubó a 4°C por 10 minutos.
7. Se centrifugó a ~15000 rpm a 4°C por 10 minutos.
8. Se retiró el émbolo de una jeringa de 20mL. Se colocaron 2 paños Kimwipes® en su interior y estos se mojan con 1mL de agua Milli-Q.
9. El sobrenadante de la centrifugación se colocó dentro de la jeringa. Se presionó con el émbolo el interior de la jeringa para filtrar el sobrenadante. Este se transfirió a un tubo Falcon de 50mL.
10. Se agregó un volumen (igual al del sobrenadante) de isopropanol y se mezcló por inmersión. Se transfirió la solución a una botella para centrifugación.
11. Se centrifugó a ~5000 rpm a 4°C por 30 minutos.
12. Se retiró el sobrenadante por decantación y micropipeta. La pastilla se resuspendió en 500µL de agua Milli-Q.
13. Se transfirió la solución obtenida a un tubo Eppendorf de 1.5mL.
14. Se agregaron 10µL de RNAsa A a 10mg/mL. Se incubó a 37°C por 30 minutos.
15. Se agregaron 500µL de cloroformo y se agitó por vórtex 2 minutos.
16. Se centrifugó a máxima velocidad en microcentrífuga por 5 minutos.
17. Se tomó la fase superior acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo.
18. Se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló por inmersión. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
19. Se centrifugó a máxima velocidad en microcentrífuga por 5 minutos.
20. Se retiró el isopropanol por decantación.
21. Se agregaron 500µL de etanol al 70% y se mezcló por inmersión.
22. Se retiró el etanol por decantación. El etanol restante se dejó evaporar a temperatura ambiente o por calor con ayuda de una placa para tubos.
23. Se disolvió en 100-500µL de agua Milli-Q mediante agitación ligera por vórtex.

### 5.1.14 Construcción de vectores.

#### Construcción de los vectores de clonación pcFos-Drive y pCycA-Drive.

Se amplificaron los promotores de *c-Fos* y *Ciclina A2* humanos a partir de ADN genómico. Los cebadores y las condiciones de PCR utilizadas aparecen en la sección 5.1.2 de esta tesis. La migración aparente de estos productos en electroforesis fue conforme a la longitud esperada: de 749pb para *c-Fos* y de 365pb para *Ciclina A2*. Para corroborar que se amplificaron los promotores, los productos de PCR se evaluaron por digestión con endonucleasas de restricción. Las moléculas de ADN digeridas, las enzimas utilizadas y el tamaño de los productos, tanto de esta digestión como de evaluaciones posteriores a plásmidos se presentan en la Tabla 1.

Cada promotor se integró a un vector de clonación pDrive, siguiendo el protocolo de ligación del equipo PCR Cloning Kit (# Cat. 231124, QIAGEN). La integración de los promotores a pDrive es facilitada debido a que los primeros tienen una adenina no apareada en sus extremos 5' (producida por la polimerasa Taq), los cuales se pueden aparear con el uracilo no apareado en cada extremo 5' del plásmido abierto de pDrive. La detección de clonas con integración exitosa se llevó a cabo por medio de un ensayo de selección azul y blanco. La orientación de los promotores en los plásmidos de las clonas se evaluó con endonucleasas de restricción. Se seleccionaron dos plásmidos con el promotor de *c-Fos* integrado (pcFos-Drive 1 y pcFos-Drive 2) y dos plásmidos con el promotor de *Ciclina A2* integrado (pCycA-Drive 3 y pCycA-Drive 5) en la orientación deseada. Los plásmidos de las clonas seleccionadas se secuenciaron en la región que contiene al promotor correspondiente, se utilizó el cebador M13 pUC reverse.

#### Construcción de pCBG99-cfos, pCBR-cfos, pCBG99-cycA2 y pCBR-cycA2.

Se extrajeron los promotores correspondientes de pcFos-Drive 2 y pCycA-Drive 5 por doble digestión con *Hind* III y *Bam*H I. Los vectores recipientes pCBG99basic y pCBRbasic (# Cat. E1451 y E1411, Promega) se abrieron mediante una doble digestión con *Hind* III y *Bgl* II. Se construyeron 4 vectores a partir de la ligación de los dos promotores en los dos vectores abiertos. Dado a que los extremos cohesivos generados por *Hind* III se aparean preferentemente entre sí, y los de *Bgl* II hacen lo mismo con los de *Bam*H I, se evitó la ligación de vectores consigo mismos y el inserto se integró direccionalmente. Se evaluaron los plásmidos de las clonas obtenidas con endonucleasas de restricción.

<b>Tabla 1: Evaluación de moléculas de ADN por enzimas de restricción.</b>		
Molécula revisada (tamaño)	Característica a evaluar	Endonucleasas utilizadas (tamaño de los productos esperados)
Amplificación, promotor de <i>c-Fos</i> (749pb)	Secuencia	<i>Pau</i> I (143 y 606pb)
Amplificación, promotor de <i>Ciclina A2</i> (365pb)	Secuencia	<i>Aat</i> II (178 y 187pb) <i>Bgl</i> I (104 y 261pb)
pcFos-Drive (4602pb)	Orientación del promotor	<i>BstX</i> I (185 y 4417pb) <i>Not</i> I (238 y 4364pb)
pcycA-Drive (4218pb)	Orientación del promotor	<i>Bgl</i> I (366, 1267 y 2585pb)
pCBG99-cfos (5561pb)	Integración del inserto	<i>BstX</i> I (388 y 5173pb)
pCBR-cfos (5564pb)	Integración del inserto	<i>BstX</i> I (388 y 5176pb)
pCBG99-cycA2 (5177pb)	Integración del inserto	<i>Aat</i> II (457 y 4720pb)
pCBR-cycA2 (5180pb)	Integración del inserto	<i>Aat</i> II (457 y 4723pb)
pCBG99-Ubx4-cfos (6554pb)	Número de insertos	<i>Mlu</i> I (2499 y 4055pb)
	Orientación del inserto	<i>Sac</i> I y <i>Bgl</i> II (243, 876 y 4949pb)
pCBR-Ubx4-cycA2 (6173pb)	Número de insertos	<i>Aat</i> II (1450 y 4723pb)
	Orientación del inserto	<i>Not</i> I y <i>Bgl</i> II (243, 670 y 4774pb)
pSV40-Ubx4-ELuc (6224pb)	Número de insertos	<i>Hind</i> III y <i>Nar</i> I (2484 y 3740pb)
	Orientación del inserto	<i>Sac</i> I y <i>Bgl</i> II (243, 442 y 5053pb)
pSV40-Luc2 (4712pb)	Integración del inserto	<i>Sca</i> I 547pb (1083 y 3629pb)
pTK-CBG99 (4508pb)	Integración del inserto	<i>Sca</i> I, 812pb y 3696pb
pTK-CBR (4511pb)	Integración del inserto	<i>Sca</i> I, 815pb y 3696pb
pTK-ELuc (4754pb)	Integración del inserto	<i>Bbs</i> I, 1151pb y 3603pb
pTK-Luc2 (4782pb)	Integración del inserto	<i>Bbs</i> I, 847pb y 3935pb

### Construcción de pCBG99-Ubx4-cfos, pCBR-Ubx4-cycA2 y pSV40-Ubx4-Eluc.

Para la construcción de las luciferasas desestabilizadas, se utilizaron los plásmidos pCBG99-cfos, pCBR-cycA2 y pSV40-ELuc (cortesía del Dr. Yoshihiro Ohmiya) como vectores recipientes. Ambos plásmidos se abrieron mediante una digestión con *Nco* I, la cual corta antes del codón de inicio de ambos genes. El inserto que contiene la secuencia codificante del concatenado de cuatro ubiquitinas G76V se extrajo del plásmido CMV-Ubx4-FLuc (cortesía del Dr. David Piwnica-Worms) por medio de una doble digestión con *Spe* I y *BstX* I. La ligación del inserto en los vectores recipientes se hizo siguiendo el protocolo de ligación con fragmentos con extremos a rellenar/rasurar. Se evaluó que sólo una copia del inserto se insertara y que esta tuviera la orientación deseada en los vectores por medio de endonucleasas de restricción.

### Construcción de pSV40-Luc2.

El gen de Luc2 se extrajo del plásmido pLuc2\_cDNA, por doble digestión con *Hind* III y *BamH* I. Se retiró al gen de ELuc del plásmido pSV40-ELuc, también con *Hind* III y *BamH* I, y en su lugar se integró al gen de Luc2 por ligación. Se evaluó la ligación con endonucleasas de restricción.

### Construcción de pTK-CBG99, pTK-CBR, pTK-ELuc y pTK-Luc2.

Para la construcción de los plásmidos con expresión estable de luciferasas, se extrajeron los genes de las luciferasas CBG99, CBR, ELuc y Luc2, de los plásmidos pCBG99-cfos, pCBR-cfos, pSV40-ELuc y pSV40-Luc2 respectivamente. Estos plásmidos se cortaron con *Hind* III y *BamH* I. Se retiró al gen de la luciferasa de *Renilla* en el plásmido pRL-TK (# Cat. E2241, Promega) mediante una doble digestión con *Hind* III y *BamH* I, y a este se le integraron los genes de las luciferasas ya mencionadas. Se evaluó la integración de cada luciferasa en el vector recipiente con endonucleasas de restricción.

## 5.2 Cultivo celular.

### 5.2.1 Líneas celulares

La línea celular COS-7, proveniente del laboratorio del Dr. Luis Covarrubias se usó para transfecciones transitorias, entre los pases 4 y 25. La línea celular 3T3, donada por el Dr. Tomás López (Instituto de Biotecnología, UNAM), se usó para transfecciones estables, en el pase 4 después de descongelar. Las células utilizadas para los ensayos de bioluminiscencia se sembraron en cajas petri de 35mm de diámetro con fondo de vidrio de 23mm (# Cat. FD35-100, WPI).

### 5.2.2 Soluciones y Medios:

Se utilizaron las siguientes soluciones:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

Contiene: DMEM en polvo (high glucose, # Cat. 12100-046, GIBCO)

NaHCO<sub>3</sub>

H<sub>2</sub>O grado de cultivo

Para preparar 1 litro:

1. Se vertieron 800mL de H<sub>2</sub>O grado de cultivo en un vaso de precipitados de 1L.
2. El contenido del sobre con DMEM en polvo se disolvió en el H<sub>2</sub>O. Para recuperar todo el contenido se añadió un poco de H<sub>2</sub>O en el sobre, se mezcló y se vertió en el vaso de precipitados. Se agitó hasta disolver.
3. Una vez disuelto el medio, se añadieron 3.7g de NaHCO<sub>3</sub> y se agitó hasta disolver.
4. El pH de la solución se ajustó a 6.8, usando una solución de HCl a 10M.
5. La solución resultante se aforó a 1L. En campana, la solución se filtró por membrana de 0.22µm.
6. Se almacenó el medio a 4°C, el cual se utilizó hasta por 2 meses después de preparado.

- Suero Fetal Bovino (SFB, # Cat. 16000-044, GIBCO).

El suero se inactivó a 56°C durante 30 minutos. Se almacenó en alícuotas de 40mL a -20°C. La alícuota a usar se mantuvo a 4°C y se utilizó hasta por 1 mes.

- GPS 100x (Glutamina/Penicilina/Estreptomicina).

Contiene: Gluta-Max 200mM (# Cat. 35050-061, GIBCO)

Penicilina

Estreptomicina

Para preparar 100mL, en campana:

1. Se mezclaron 500mg de penicilina, 300mg de estreptomicina y 10mL de Gluta-Max.
  2. Se filtró por membrana de 0.22µm.
  3. Se agregaron 90mL de Gluta-Max y se mezcló por micropipeta.
  4. En campana, se almacenaron en alícuotas de 5mL. Las alícuotas se guardaron a -20°C.
  5. La alícuota a usar se mantuvo a 4°C.
- Azul de tripano a 0.4% (# Cat. 15250-061, GIBCO).
  - Dimetilsulfóxido (DMSO Hybri-Max®, # Cat. D2650, Sigma).
  - Geneticina (G418 sulfato), 50mg/mL (# Cat. 10131-027, Gibco).
  - Piruvato sódico 100X (# Cat. 11360-070, GIBCO).
  - Amortiguador fosfato salino (PBS) 1X.  
 Contiene:
 

136mM NaCl	8g/L
2mM KCl	0.2g/L
10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g/L
1mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g/L
- Para preparar 1L:
1. Se disolvieron los 4 compuestos en 900mL de agua grado de cultivo, se aforó a 1L.
  2. En campana, la solución se filtró por membrana de 0.22µm.
  3. Se almacenó a temperatura ambiente.
- Tripsina a 0.025%.  
 Para preparar 10mL, en campana:
    1. Se mezcló 1mL de tripsina al 2.5% (# Cat. 15090-046, GIBCO) con 9mL de verseno (# Cat. 15040-066, GIBCO). Se agitó por vórtex.
    2. Se tomó 1mL de la solución de tripsina a 0.25% y se mezcló con 9mL de verseno. Se agitó por vórtex.
    3. Ambas soluciones se almacenaron a 4°C.
  - Polietilenimina lineal (PEI) a 1X.  
 Para preparar el stock de 10X, se disolvió PEI lineal de 25kDa (# Cat. 23966-2, Polysciences) a 10mg/mL en 200mL de agua Mill-Q a 80°C. El stock se almacenó en alícuotas de 10mL a -20°C. Para preparar alícuotas de 1X:
    1. Se incubó una alícuota de PEI 10X a 80°C hasta redissolver su contenido.
    2. La alícuota se diluyó en agua Milli-Q en una proporción 1:9.

3. Se ajustó el pH a 7.2.
4. En campana, se filtró por membrana de 0.22µm.
5. Se almacenó en alícuotas de 1mL a -20°C. La alícuota a usar se guardó a 4°C.

- Luciferina 100mM.  
Contiene D-Luciferina sal de potasio (# Cat. LUCK-100, GoldBiotechnology) disuelta en H<sub>2</sub>O grado de cultivo. Preparado en campana. Almacenado en alícuotas de 100µL a -20°C.
- Ácido ascórbico 100mM.  
Contiene L-ácido ascórbico (# Cat. A4403, Sigma) disuelto en H<sub>2</sub>O grado de cultivo. Almacenado en alícuotas de 1mL a -20°C.

Los medios suplementados se prepararon en campana, se almacenaron a 4°C y se utilizaron hasta por un mes después de preparados. Se prepararon los siguientes medios suplementados:

- Medio de proliferación para COS-7 y 3T3.  
Para preparar 200mL:       186mL de DMEM.  
                                  10mL de SFB (final 5%).  
                                  2mL de GPS 100X (final 1%).  
                                  2mL de piruvato de sodio 100X (final 1%).
- Medio de proliferación reducida para 3T3.  
Para preparar 10mL:       9.55mL de DMEM.  
                                  250µL de SFB (final 2.5%).  
                                  100µL de GPS 100X (final 1%).  
                                  100µL de piruvato de sodio 100X (final 1%).
- Medio de transfección por PEI.  
Para preparar 10mL:       9.4mL de DMEM.  
                                  500µL de SFB (final 5%).  
                                  100µL de piruvato de sodio 100X (final 1%).
- Medio de sincronización para 3T3.  
Para preparar 20mL:       19.6mL de DMEM.  
                                  100µL de SFB (final 0.5%)  
                                  200µL de GPS 100X (final 1%).  
                                  200µL de piruvato de sodio 100X (final 1%).
- Medio de congelación 2X.  
Para preparar 10mL:       6mL de DMEM.  
                                  2mL de SFB (final 20%).  
                                  2mL de DMSO (final 20%).

### 5.2.3 Subcultivo celular.

Se realizó de la siguiente manera:

1. Se calentó medio de proliferación a 37°C.
2. El medio de la caja de cultivo con células se aspiró con la bomba de vacío.
3. Se adicionaron con cuidado 5mL de PBS 1X. La caja se agitó suavemente para lavar.
4. Se repitió el proceso de lavado (pasos 2 y 3).
5. De manera uniforme, se añadió 1mL de tripsina a 0.025% para despegar las células.
6. Se incubó por 2-3 minutos a 37°C.
7. Se suministraron 5mL de medio de proliferación previamente calentados. Se pipeteó suavemente para levantar de la caja a las células restantes.
8. Se transfirió el medio con las células a un tubo Falcon de 15mL. Se pipeteó suavemente para disgregar las células. Se tomó una muestra de 10µL de la solución para el conteo de células en la cámara de Neubauer \*.
9. Se centrifugó el contenido del tubo Falcon a 1000 rpm durante 5 minutos.
10. El sobrenadante se aspiró con la bomba de vacío, cuidando no llevarse la pastilla.
11. Las células se resuspendieron en medio de proliferación. El volumen del medio utilizado dependió de la concentración final de células deseada.
12. A una caja petri limpia de 10cm de diámetro se añadió medio de proliferación, y se sembraron  $3-5 \times 10^5$  células provenientes del tubo Falcon. El volumen final en la caja debió ser de 10mL.
13. La caja se guardó en incubadora (37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en condiciones de humedad).

\* Conteo de células en la cámara de Neubauer:

1. La muestra de 10µL se mezcló con 10µL de azul de tripano por pipeteo.
2. Se tomaron 10µL de esta mezcla para colocarse en la cámara de Neubauer. Se observó a microscopio la muestra usando un objetivo de 10X.
3. El azul de tripano tiñó las células muertas. Se contabilizaron las células vivas de al menos 2 de los cuadrantes.
4. El promedio de células por cuadrante es un estimado del número de células en 0.5µL de la solución de células. Este valor se multiplicó por  $2 \times 10^4$  para obtener un estimado de células en 1mL. Después este valor se multiplicó por 6 (1mL de tripsina + 5mL del medio) para estimar el total de células en solución.

#### 5.2.4 Congelación y descongelación de células.

- Para congelar:
  1. Los crioviales (# Cat. 2028, Corning) a utilizar fueron etiquetados con el nombre de la línea celular, el número de pases, la densidad celular y la fecha.
  2. Se despegaron, suspendieron y centrifugaron las células a congelar, siguiendo el protocolo de subcultivo celular.
  3. La pastilla de células se resuspendió en medio de proliferación en un volumen tal para obtener una densidad celular de  $1-2 \times 10^6$  células/mL.
  4. Se añadieron 500 $\mu$ L de medio de congelación 2X en los crioviales. Este medio se combinó con 500 $\mu$ L de la suspensión de células y se homogeneizó suavemente por pipeteo.
  5. Los crioviales se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante un día. Después se almacenaron en nitrógeno líquido.
  
- Para descongelar:
  1. Se retiró un criovial del tanque de nitrógeno líquido y se incubó en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , hasta descongelar que el contenido del vial ( $\sim 2$  minutos).
  2. Se añadieron 5mL del medio de proliferación en un tubo Falcon de 15mL y se agregó a este el contenido del criovial. Se mezcló suavemente por pipeteo
  3. Se centrifugó a 1000 RPM durante 5 minutos.
  4. Se aspiró el medio del tubo Falcon con la bomba de vacío.
  5. Las células de la pastilla se resuspendieron en 10mL del medio de proliferación y se sembraron en una caja de 10cm.
  6. La caja se guardó en incubadora.
  7. Se esperó un pase de células antes de hacer uso de las células.

#### 5.2.5 Transfección de células de mamífero mediante polietilenimina (PEI) lineal.

Se utilizó el protocolo siguiente:

1. Un día antes de la transfección, se sembraron las células a utilizar en cajas de 35mm con fondo de vidrio. Dependiendo del tipo celular, fue el número de células sembradas:
  - $2 \times 10^5$  células COS-7,
  - $1.5 \times 10^4$  células 3T3 con expresión de luciferasa bajo el promotor de *c-Fos*, o
  - $3 \times 10^4$  células 3T3 con expresión de luciferasa bajo el promotor de *Ciclina A2*.
2. El día de la transfección, se añadió en un tubo Eppendorf esteril 1 $\mu$ g del plásmido ó plásmidos a transfectar. Como control de transfección, se adicionó pGFP (con expresión

constitutiva de GFP) a 1/20 de la cantidad total de plásmido o plásmidos de interés a transfectar. Se adicionó medio DMEM hasta tener un volumen final de 100 $\mu$ L (el equivalente a 1/20 del volumen de medio ocupado en cajas de 35mm). Se mezcló por pipeteo.

3. En un segundo tubo Eppendorf, se añadió PEI 1X a un volumen de 3 $\mu$ L por cada  $\mu$ g de plásmido. Se adicionó medio DMEM hasta tener un volumen final de 100 $\mu$ L. Se mezcló por pipeteo.
4. Se mezcló el contenido de los 2 tubos por pipeteo.
5. La solución se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
6. El medio de la(s) caja(s) de 35mm a utilizar se aspiró con la bomba de vacío. Se adicionó 1mL de PBS 1X y se agitó suavemente para lavar.
7. Se aspiró el medio de la(s) caja(s) y se vierten 800-1000  $\mu$ L de medio de transfección por caja.
8. Se adicionó la solución de PEI:ADN en la(s) caja(s) mediante goteo.
9. Se mantuvo en incubadora al menos por 4 horas, pero no más de 16 horas.
10. Se aspiró el medio de transfección mediante bomba de vacío y se suministraron 2mL de medio de proliferación o medio de proliferación reducida.

### *5.2.6 Preparación de muestras en el ensayo de bioluminiscencia de dinámica transcripcional.*

Las células a utilizar se transfectaron previamente con plásmidos que contienen genes de luciferasa. El proceso de captura de bioluminiscencia se presenta en la sección 5.3.1 El proceso de preparación de muestras fue el siguiente:

1. Las células a sincronizar se cultivaron en cajas de petri de 35mm con 2mL de medio de proliferación reducida, guardados en incubadora por al menos 12 horas.
2. Se aspiró el medio de la caja con la bomba de vacío y se adicionó 1mL de PBS 1X. Se agitó suavemente la caja para lavar. Se repitió una vez más este paso.
3. Se aspiró el medio de la caja y se suministraron 2mL de medio de sincronización. Se mantuvo en incubadora por al menos 24 horas.
4. Se adicionó al medio de sincronización ácido ascórbico a una concentración final de 250 $\mu$ M.
5. **Seis horas antes** del ensayo se adicionó luciferina para una concentración final de 1mM en el medio. Esto con el propósito de estabilizar la actividad de la luciferasa tras la adición de su sustrato.
6. Se llevó a cabo la captura de bioluminiscencia en ausencia de suero.
7. Se pausó la captura de bioluminiscencia. Se añadieron al medio 200 $\mu$ L de SFB.
8. Se reinició la captura de bioluminiscencia hasta llegar a término.

### ***5.2.7 Preparación de muestras en el ensayo de bioluminiscencia para detección de actividad.***

Al igual que en los ensayos de dinámica transcripcional, el proceso de captura de bioluminiscencia se presenta en la sección 5.3.1 El proceso de preparación de muestras fue el siguiente::

9. Para las células transfectadas con pCBG99-Ubx4-cfos y pCBR-Ubx4-cycA2, las células se mantuvieron en medio de sincronización por al menos 24hrs.
10. Al menos **6 horas antes** del ensayo, se retiró 1mL del medio, y se añadió luciferina a una concentración final de 1mM en el medio.
11. Para las células transfectadas con pCBG99-Ubx4-cfos, antes de iniciar el ensayo se añadieron al medio 100µL de SFB.
12. Se llevó a cabo la captura de bioluminiscencia.

### ***5.2.8 Ensayo de curva de letalidad.***

Se utilizó el protocolo siguiente:

1. Se sembraron  $6 \times 10^4$  células 3T3 en cada pozo de 2 cajas de 6 pozos. Las células se guardaron en incubadora 12 horas antes del ensayo.
2. A cada pozo se adicionó geneticina a concentraciones de 0, 400, 800, 1000, 1200 y 1600µg/mL, por duplicado y se guardó en incubadora.
3. Cada tercer día se cambió el medio con antibiótico.
4. Se seleccionó la concentración adecuada para selección por resistencia a geneticina al ser aquella en donde la población de células muere en su totalidad entre el tercer y el quinto día de tratamiento.

### ***5.2.9 Establecimiento de líneas celulares con transfección estable.***

Se utilizó el protocolo siguiente:

1. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células de la línea 3T3 en cajas de 60mm. Se guardaron en incubadora por al menos 12 horas antes de la transfección.
2. Se transfectaron 5µg del vector de luciferasa a integrar y 1µg de vector con resistencia a neomicina, siguiendo el protocolo de transfección. Como control negativo y de transfección, se co-transfectaron en cultivos control 5µg de pMPM-A2 y 1µg de pGFP.
3. Se aspiró el medio de las cajas con bomba de vacío y se lavó con 2mL de PBS 1X.
4. Se aspiró el PBS y se suministraron 4mL de medio de proliferación.
5. Se mantuvo alrededor de 12 horas en incubadora.
6. Se añadieron 1000µg/mL de geneticina en cada caja por goteo, y se distribuyeron

- mediante un movimiento suave a la caja. Se guardó en incubadora.
7. El cambio de medio con antibiótico se llevó a cabo cada 2-3 días.
  8. El día 16 se subcultivaron las células en selección en dos cajas:  $2 \times 10^5$  células en una caja de 60mm y  $\sim 2000$  células en una caja de 35mm. Ambas cajas se suministraron con geneticina a  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  para mantener la transfección estable. La primer caja sirvió para conservar el pool de células transfectadas, mientras que la segunda se utilizó para crecer y picar colonias monoclonales.
  9. Las células de la caja de 60mm se subcultivaron cada 3 días a otra caja de 60mm. En cada pase también se sembró una caja de 35mm en caso de no haber encontrado aún colonias para picar.
  10. Las cajas de de 35mm se mantuvieron por 6 días en medio de proliferación en incubadora, con un cambio de medio en el tercer día.
  11. Durante el sexto día se llevó a cabo la sincronización del ciclo celular. Se añadió luciferina a 1mM.
  12. Se seleccionaron las colonias de acuerdo a la presencia de fenotipo de bioluminiscencia en respuesta a suero. La medición se llevó a cabo durante el pico de actividad del promotor que lo regula: tras la adición de suero para *c-Fos* y 12 horas después de la adición para *Ciclina A2*. Se utilizaron cuadrículas marcadas en mica transparente, colocadas en la base de cajas de 35mm, para localizar las colonias de interés.

Para picar una colonia, se siguieron estos pasos:

1. Observando en microscopio bajo un objetivo de 5X, se desprendieron todas las células adyacentes a la colonia de interés mediante raspado con una punta de micropipeta.
2. Se aspiró el medio de la caja y se lavó 2 veces con 1mL de PBS 1X.
3. Se aspiró el PBS y se añadió una vez más 1mL PBS 1X.
4. En microscopio, se adicionaron por goteo  $20 \mu\text{L}$  de tripsina a 0.25% sobre la colonia a picar y se esperó a que las células se desprendieran.
5. Las células se retiraron con micropipeta y se sembraron en una nueva caja de 35mm con 2mL de medio de proliferación y  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  de geneticina.

Para la selección de colonias con transfección estable de CBG99-Ubx4-cfos, la detección de fenotipo requirió de un luminómetro de placas FLUOstar Omega (BGM Labtech). La preparación de colonias se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se sembraron en pozos de una caja de 96 pozos, aproximadamente 1 célula por pozo. Se apartó un par de pozos para sembrar células 3T3 con transfección estable de CBG99-cfos, las cuales se usaron como control positivo. También se apartó un pozo vacío como control negativo.
2. Cada pozo se mantuvo por 6 días en  $100 \mu\text{L}$  de medio de proliferación con geneticina a

500 $\mu$ g/mL, con la caja guardada en incubadora. En el día tercero se renovó el medio de proliferación.

3. En el séptimo día se llevó a cabo la sincronización del ciclo celular y adición de luciferina. Se adicionaron 100 $\mu$ L de medio de proliferación en el pozo apartado como control negativo.
4. Se preparó el luminómetro de placas bajo los siguientes parámetros: temperatura de incubación de 37°C, uso del lector óptico inferior, tiempo de exposición de 20 segundos y el máximo de ganancia del tubo fotomultiplicador.
5. Se adicionaron 10 $\mu$ L de SFP a los pozos y se envolvieron las caras laterales de la caja con Parafilm.
6. Se colocó la caja en el luminómetro de placas y se capturó la señal de bioluminiscencia.
7. Los pozos con células de interés se subcultivaron en cajas de 35mm con 2mL de medio de proliferación y 500 $\mu$ g/mL de geneticina.

## 5.3 Microscopía y análisis de imágenes.

### 5.3.1 Sistema de captura de bioluminiscencia en microscopio óptico.

El equipo utilizado para los ensayos de bioluminiscencia consistió en un microscopio óptico invertido Eclipse TE300 (Nikon), una cámara-CCD con registro electromultiplicador iXon X3 897 (Andor), un enfriador Oasis 160 (Solid State) para la cámara y un sistema de incubación de cultivos celulares para microscopio óptico. El sistema de incubación consistió en una caja incubadora de acrílico negro, un calefactor Heating Unit XL S (PECON), una placa Heating Insert P S (PECON), una cubierta gasificadora CO<sub>2</sub> Cover S (PECON), un humidificador Humidifier S (PECON), y los módulos TempModule S y CO<sub>2</sub> Module S (ambos de PECON) que regularon la actividad de los equipos de PECON. Para comunicarse con los módulos del sistema de incubación se utilizó el programa MTB2004 Configuration 1.8.0.7 (Zeiss). Los parámetros de incubación utilizados fueron:

- Heating Unit = 38.7°C
- Heating Insert = 38.9°C
- CO<sub>2</sub> = 5%

Dentro de la caja incubadora se colocaron un ventilador pequeño colgado de la parte superior de la caja, una bandeja pequeña llena de agua a nivel de la mesa y dos tapas pequeñas colocadas sobre la placa de incubación y junto a la muestra. Esto con la finalidad de distribuir el calor proveniente del calefactor y mantener condiciones de humedad. El objetivo utilizado para la captura de todas las imágenes fue de 10X.

La cámara-CCD utilizada para la captura de imágenes se mantuvo a -90°C ó a -100°C durante su operación. La cámara se controló mediante un ordenador usando el programa MicroManager 1.4 (<http://www.micro-manager.org/wiki/Micro-Manager> ). Para tomar imágenes de fluorescencia y campo claro, se utilizó el modo de adquisición de señal de mayor rango dinámico (amplificador convencional) con tiempos de exposición de 10-500ms. Para tomar imágenes de bioluminiscencia, el modo de adquisición de señal utilizado fue el de conteo de fotones para tiempos de exposición largos (>1s) y los tiempos de exposición utilizados son específicos de cada ensayo. El valor de binning utilizado en todas las capturas fue de 1. Todas las capturas de imagen se guardaron en formato tif de 16 bits.

Para los ensayos de bioluminiscencia para detección de actividad, se tomaron al menos 3 imágenes de bioluminiscencia a tiempos de exposición variable (de 15s a 25min, dependiendo el caso), una imagen de campo claro y una de fluorescencia. En los ensayos de bioluminiscencia de dinámica transcripcional, se tomaron al menos 2 imágenes de campo claro y 2 de fluorescencia (una al inicio y otra después de la adición de suero). Además se tomó una serie de imágenes de bioluminiscencia. Estas

imágenes se tomaron de manera periódica, a un tiempo de exposición y frecuencia de captura predeterminados para cada ensayo. Estos tiempos se presentan en la Tabla 2.

<b>Tabla 2: Tiempo de exposición y frecuencia de captura de imágenes de bioluminiscencia en los ensayos de dinámica transcripcional.</b>	
Tipo de ensayo	Tiempo de exposición y frecuencia de captura
Ensayos con luciferasas nativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• pCBG99-cfos</li> <li>• pCBR-cycA2</li> </ul>	12 minutos de exposición, captura cada 15 minutos.
Ensayos con pCBG99-Ubx4-cfos.	28 minutos de exposición, captura cada 30 minutos.
Ensayos con pCBR-Ubx4-cycA2.	25 minutos de exposición, captura cada 30 minutos.

### ***5.3.2 Análisis de las imágenes obtenidas en los ensayos de expresión dinámica.***

Se utilizó el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) para la revisión de los resultados y creación de videos. Se utilizó el software CellProfiler 2.1.1 (rev 6c2d896, <http://www.cellprofiler.org/>) para el análisis automatizado de imágenes. CellProfiler funciona mediante el armado y la aplicación de una tubería de análisis de datos. Una tubería de análisis de datos es una serie ordenada de procesos en donde la información de salida de uno de los procesos puede servir como información de entrada para procesos posteriores. En este caso, las imágenes obtenidas de los ensayos sirvieron como información de entrada, el software recuperó información proveniente de la imagen o de las regiones de interés dentro de ella (la señal proveniente de células bioluminiscentes o del fondo) y la entregó al usuario.

La interfaz del programa se puede separar en tres secciones: la sección de la tubería de datos, la sección del módulo y la barra de menús (Figura 10). La primera contiene una interfaz a través de la cual se seleccionan, añaden, eliminan o reacomodan los módulos que forman parte de la tubería, y para iniciar el proceso de análisis de la tubería o hacer pruebas a uno o varios módulos. La segunda contiene los parámetros asociados al módulo seleccionado en la sección de tubería de datos, los cuales pueden ser definidos por el usuario. Sobre ambas secciones se encuentra la barra de menus, en cuyo menú Archivo se pueden abrir, guardar y cerrar proyectos, importar y exportar tuberías de datos.

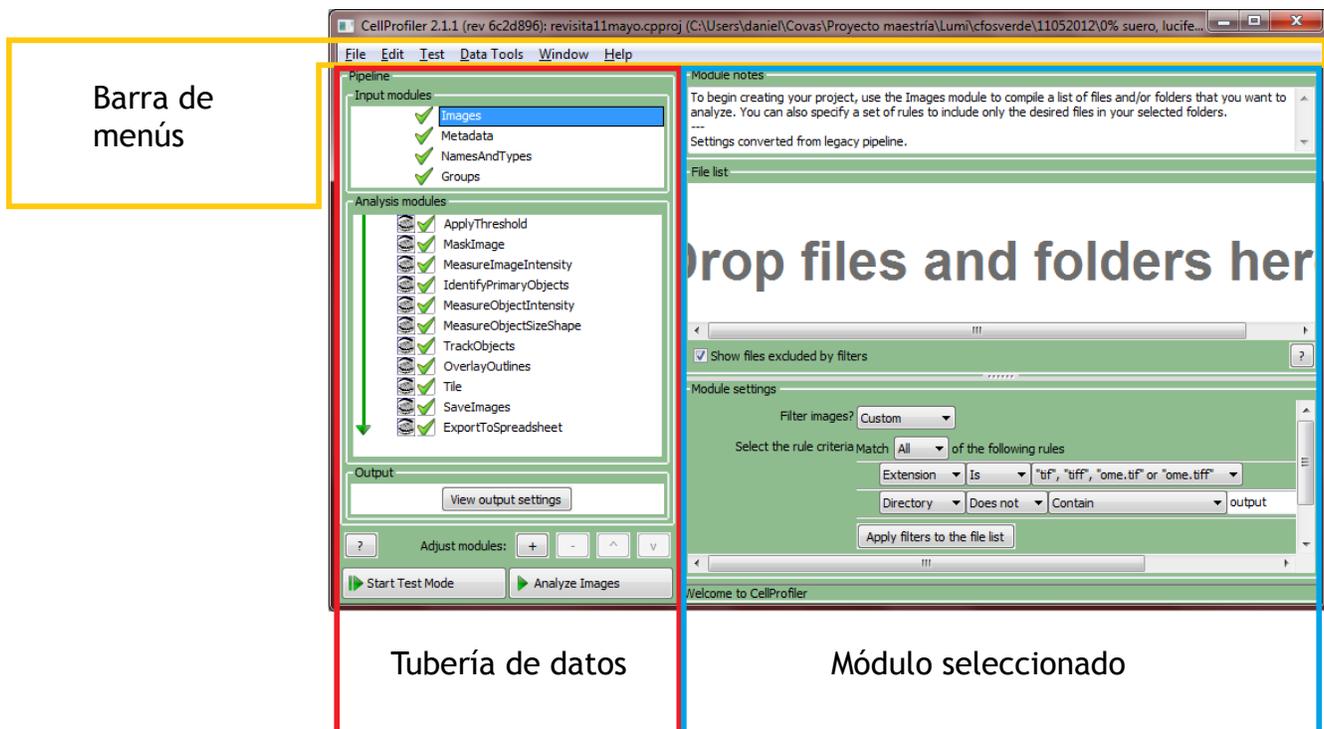


Figura 10: Interfaz de CellProfiler. En barras de color amarillo, rojo y azul se indican las secciones mencionadas.

La tubería de datos tiene tres secciones: módulos de entrada, de análisis y de salida:

- Los módulos de entrada capturan la información de entrada y la clasifican de acuerdo a parámetros establecidos. Estos módulos son los siguientes:
  - (a) **Images** selecciona los archivos a analizar dentro de una carpeta seleccionada, siguiendo una serie de reglas definidas por el usuario.  
Se definieron dos reglas de selección: que los archivos tengan una extensión .tif (usado comúnmente en la captura de imágenes) y que si las imágenes están en una subcarpeta, que esta no contenga la palabra “output” (pues es la carpeta con los datos de salida).
  - (b) **Metadata** captura los metadatos (descripción) de las imágenes. No se utilizó.
  - (c) **NamesAndTypes** tiene la única función de definir un “tipo” asociado a cada imagen capturada. Este “tipo” es requerido para que los módulos de análisis puedan seleccionar la imagen para hacer uso de ella.  
Se pidió como regla que las imágenes tenga extensión .tif; cada imagen se denominó de tipo “OrigGray”, con las características de ser imágenes en escala de grises y que la intensidad de los píxeles de la imagen toma valores de 0 a 1 (el valor del píxel en la imagen original se divide entre 65535).
  - (d) **Groups** separa las imágenes de entrada en grupos. No se utilizó.

- Los módulos de análisis se encargan de procesar las imágenes introducidas. Cada imagen se analiza individualmente en un ciclo. Estos módulos actúan siguiendo un orden establecido por el usuario. Los primeros tres módulos de análisis se encargan de obtener información acerca del fondo, los siguientes cuatro se encargan de obtener información acerca de las células bioluminiscentes, y los últimos cuatro arman los archivos de salida. Los módulos utilizados con sus respectivos parámetros se presentan a continuación:

(a) ***ApplyThreshold*** clasifica los píxeles de un objeto en una de dos poblaciones, la de los píxeles brillantes de las células ó la de los oscuros que forman parte del fondo. Para ello el módulo utiliza alguno de los algoritmos que tiene a su disposición para definir un umbral de intensidad. Este umbral separa la señal del resto de la imagen y produce una imagen que represente la separación de los píxeles en sus respectivas clases.

Los parámetros utilizados para todos los ensayos fueron los siguientes: una imagen de entrada “OrigGray”, una imagen de salida “Backmask” de tipo binario (la señal de las células en blanco y el fondo de negro), un método de alisado (smoothing) automático, y valores de 1 y 0 para los márgenes superior e inferior del umbral.

El algoritmo de selección de umbral y el factor de corrección del umbral son parámetros que variaron de ensayo a ensayo. Los algoritmos de selección de umbral usados fueron el método de Otsu y el de Mezcla de Gaussianas, bajo una estrategia global ó adaptativa:

- ◆ El método de Otsu consiste en la selección de un umbral que consiga que la distribución de las dos poblaciones tenga la menor varianza ponderada posible, es decir, tenga la menor dispersión de valores. En los casos que se utilizó este método, se siguió un modelo de umbralización de dos clases, y se dió preferencia a minimizar la varianza ponderada en lugar de la entropía.
- ◆ El método de Mezcla de Gaussianas supone que hay tres poblaciones de píxeles de acuerdo a su intensidad, cuya distribución se asemeja a las gaussianas. Mediante el algoritmo de E-M (Expectativa-Maximización) se define que par de valores de umbral genera tres poblaciones de distribución gaussiana con mayor verosimilitud en la imagen. Una vez establecida, se define si la población de intensidad intermedia pertenece a las regiones de interés o al fondo a partir de la fracción esperada de la imagen ocupada por las regiones de interés proporcionada por el usuario. Este algoritmo pide un estimado del porcentaje de la imagen que contenga las señales de interés; este valor ayuda a reducir el rango de valores de umbral sobre el cual el algoritmo trabajará.
- ◆ Cualquiera de estos métodos puede seguir una estrategia global, calculando el umbral para toda la imagen, o una estrategia adaptativa, que divide la imagen en secciones y a cada sección le determina un valor de umbral específico.

El factor de corrección del umbral es un valor puesto por el usuario que se multiplica

por el valor del umbral obtenido para usarse como nuevo umbral; si este valor es mayor que 1, el nuevo umbral se considera más restrictivo, pero si es menor que 1, se considera más laxo. Este valor se modificó de acuerdo a la series de imágenes obtenidas, con el propósito de aumentar la precisión del programa al detectar señales individuales. Los valores utilizados para cada ensayo se presentan en la Tabla 3.

<b>Tabla 3: Algoritmos de selección de umbral y factor de corrección del umbral utilizados en el análisis de los ensayos de bioluminiscencia.</b>	
Tipo de ensayo	Algoritmo de umbralización, factor de corrección
Con pCBG99-cfos	Otsu Global, factor de corrección de 1.2
Con pCBG99-Ubx4-cfos	Otsu Global, factor de corrección de 0.7
Con pCBR-cycA2	Mezcla de Gaussianas adaptativa, suponiendo inicialmente que la señal de interés ocupa 35% de la imagen, factor de corrección de 1.2.
Con pCBR-Ubx4-cycA2	Mezcla de Gaussianas adaptativa, suponiendo inicialmente que la señal de interés ocupa 35% de la imagen, factor de corrección de 1.25.

- (b) **MaskImage** cubre ciertas regiones de una imagen indicadas por una imagen binaria, y produce una imagen enmascarada a la cual el programa le ignorará la región cubierta. La imagen de entrada fue “OrigGray” y la imagen binaria fue “BackMask”. Esta última fue invertida por el módulo para que enmascare la señal proveniente de las células. A partir de los valores de entrada se creó la imagen enmascarada “Getback”.
- (c) **MeasureImageIntensity** hace mediciones sobre la intensidad de la imagen de entrada y lo almacena en la memoria. Se midió la imagen “Getback”, para obtener la intensidad promedio del fondo.
- (d) **IdentifyPrimaryObjects** tiene la doble función de definir un umbral que separe la señal de las células de la señal del fondo (al igual que *ApplyThreshold*) y de segmentar el total de la señal de las células en regiones de interés individuales denominadas objetos. A estos objetos se les asocia un nombre, se utilizó el default “Cells”.
- Los parámetros para definir al umbral fueron los mismos que los usados en *ApplyThreshold*, los parámetros de segmentación fueron los siguientes: un valor mínimo de diámetro del objeto para ser aceptado de 13 pixeles (el área del objeto se adapta para un círculo), se descartaron los objetos fuera del diámetro, se permitieron objetos que toquen el borde de la imagen, se utilizó el método de intensidad para distinguir objetos juntos (los objetos forman distribuciones de intensidad donde los picos de intensidad máxima sirven como centro), para crear líneas de división entre los objetos se utilizó el método de propagación, el tamaño del filtro de alisado y la distancia mínima permitida entre los máximos locales de intensidad se calcularon automáticamente, no se redujo la resolución de la imagen para la segmentación y se llenaron huecos localizados dentro de los objetos. Los contornos de los objetos generados se guardaron como la imagen

“CellOutlines”.

- (e) **MeasureObjectIntensity** hace mediciones sobre las intensidad de los objetos definidos y lo almacena en la memoria.

La imagen base fue “OrigGray”, se midieron los objetos “Cells”.

- (f) **MeasureObjectSizeShape** hace mediciones sobre la forma y el tamaño de los objetos definidos y lo almacena en la memoria. Se midieron los objetos “Cells”.

- (g) **TrackObjects** da seguimiento a los objetos a lo largo de los ciclos de análisis mediante etiquetas, bajo la idea de que la serie de imágenes analizada contiene a un mismo grupo de objetos observados a través del tiempo.

El método de rastreo utilizado fue el de sobrelape, se tomó por idéntico al objeto que en dos imágenes sucesivas ocupe el mismo sitio o se haya movido máximo 5 píxeles de distancia fuera del este. Se rastrearon los objetos “Cells” y se creó una imagen que muestra cada objeto seguido con su etiqueta de identidad y un color distintivo, la cual se guardó bajo el nombre de “TrackedCells”.

- (h) **OverlayOutlines** coloca los contornos de los objetos generados anteriormente sobre una imagen dada.

La imagen utilizada fue “OrigGray” y los contornos se obtuvieron de la imagen “CellOutlines”, la imagen producida se llamó “OutlineImage”. El modo de presentación de los contornos fue a color, con un grosor de 1 píxel.

- (i) **Tile** genera un montaje a partir de las imágenes introducidas por el usuario, las cuales son colocadas una adyacente de otra.

La primer imagen a introducir fue “OrigGray”, la segunda “CellOutlines” y la tercera “TrackedCells”. El modo de ensamblado fue dentro del ciclo (es decir, toma las imágenes correspondientes a un mismo ciclo), en una sola fila, con el número de columnas calculado automáticamente, con el orden de adición de imágenes de izquierda a derecha a lo largo de la fila y se descartó el estilo de meandro (Meander mode). La imagen producida se llamó “AdjacentImage”.

- (j) **SaveImages** toma una imagen u objeto de interés de la memoria del programa y la entrega al usuario como archivo de salida.

La imagen a guardar fue “AdjacentImage”, el archivo de salida tomó el nombre del archivo de entrada usado como “OrigGray” acompañado de un sufijo “out”, en formato tiff de 32 bits a color, y se guardó en la carpeta de salida definida por el usuario. El módulo entregó un archivo por ciclo.

- (k) **ExportToSpreadsheet** recupera de la memoria las mediciones hechas por otros módulos, para escribirlas en uno o más archivos de salida que serán entregados al usuario en la carpeta definida por el usuario al terminar la tubería de datos.

Las mediciones hechas se guardaron en forma de tablas, donde cada columna está separada por tabuladores. Las tablas se guardaron en diferentes archivos de acuerdo a lo

que se estaba midiendo: el fondo se guardó en Image.txt, los objetos (regiones de interés) en Cells.txt. Se exportaron las siguientes mediciones:

- ◆ El área ocupada, la intensidad total y la etiqueta de seguimiento de los objetos.
  - ◆ El área ocupada, la media, desviación estándar, e intensidad total del fondo.
- La sección de salida no es precisamente un módulo, pero en ella se definen las carpetas para la información de entrada y de salida. La carpeta de salida se creó dentro de la carpeta del ensayo a analizar, bajo el nombre de “Output”. En la Figura 11 se muestra un ejemplo de los archivos de salida que entrega el programa.

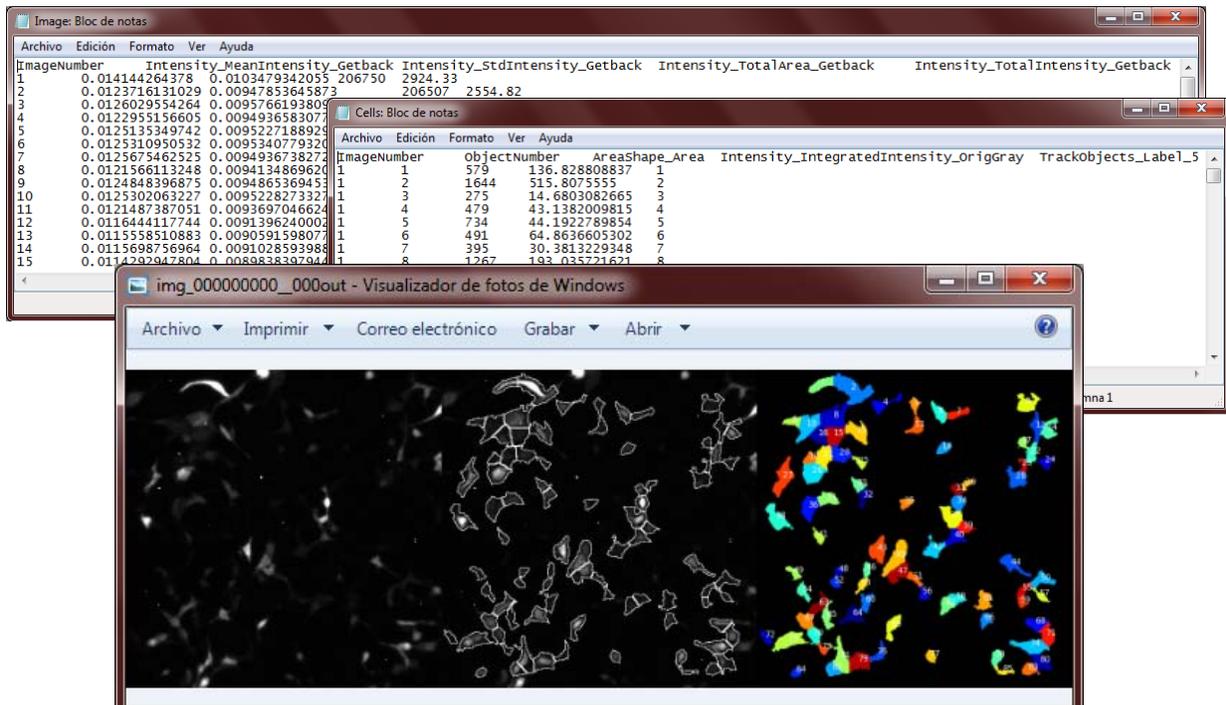


Figura 11: Archivos de salida de CellProfiler. Los tres archivos mostrados son una tabla con las mediciones relativas al fondo (Image.txt), una tabla con las mediciones relativas a los objetos con señal relevante (Cells.txt) y una serie de imágenes que representan el proceso de segmentación y rastreo de los objetos en la serie de imágenes (img\_00000000\_000out.tif es la primera imagen de la serie).

Una vez analizado un ensayo de bioluminiscencia con CellProfiler, se revisaron manualmente los resultados del análisis. Se revisó la serie de montajes generados por la tubería de datos que contienen los contornos y las etiquetas de los objetos detectados por imagen. Se eligieron al menos 5 células que hayan sido detectadas por el programa en la mayoría de las imágenes, como parte de uno o más objetos, y cuya señal no estuviese saturada en ninguna de las imágenes. Estos objetos pasaron por los siguientes criterios (Figura 12):

- Se descartaron los objetos cuya señal estuviese saturada (es decir, que contuviera fotones con el valor máximo de intensidad).
- Se descartaron los objetos que contengan la señal de un rayo cósmico (fotones de alta energía provenientes del espacio exterior), ya que satura la señal de los pixeles en los que aparece.
- Se descartaron los objetos que aún en conjunto no cubran el área correspondiente a alguna de las células de interés. La única excepción es si la parte faltante es una proyección de la célula, la cual suele representar una fracción muy reducida de la señal emitida.
- Se descartaron los objetos que en su área contengan la señal de más de una célula; si la señal de la(s) célula(s) extra pertenece a una proyección, el objeto no se descartó.

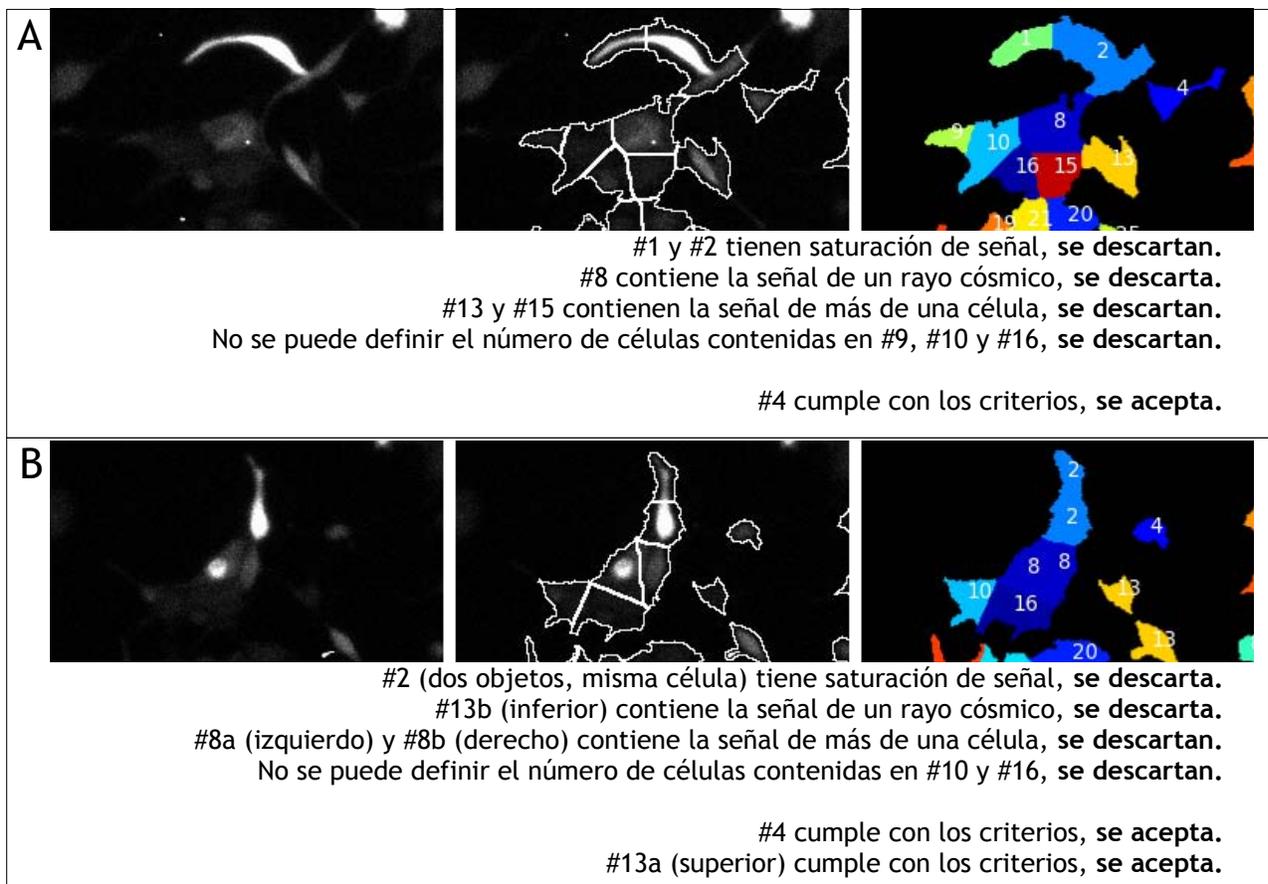


Figura 12: Dos ejemplos del proceso de selección. En ambos paneles se observan tres imágenes, que de izquierda a derecha son: una región de una de las imágenes analizadas, la misma región con los contornos de los objetos identificados por CellProfiler y una imagen que representa el etiquetado de los objetos. Bajo las imágenes aparece el proceso de selección.

Una vez seleccionados, se juntaron los valores asociados a objetos que pertenezcan a una misma célula. Se armó una nueva tabla con los valores de tamaño e intensidad total para cada una de las células elegidas. La etiqueta final de cada célula reconstruida se obtuvo a partir de la etiqueta de uno de los objetos asociados a la célula. Se detectaron los eventos de división celular de las células analizadas.

A partir de los resultados, se calcularon los siguientes valores: Intensidad promedio ( = intensidad total / área), Intensidad neta ( = intensidad promedio de la célula / intensidad promedio del fondo), Cambio por inducción ( = intensidad neta imagen actual / intensidad neta primer imagen) y Relación Señal-Ruido ( = intensidad neta / desviación estandar del fondo). El cambio por inducción se utilizó para cuantificar el efecto activador/represor de algún elemento, en este caso el suero, sobre la actividad del promotor monitoreado. Es un indicativo de la eficiencia del modelo de sincronización e inducción del ciclo celular por suero; se considera significativo el cambio por inducción si su actividad aumentó a más del doble como respuesta al estímulo.

En los ensayos de bioluminiscencia llevados a cabo en esta tesis, el origen del ruido de captura es principalmente de disparo fotónico, porque las otras fuentes de ruido son prácticamente abatidas por la cámara: el registro electromultiplicador (que amplifica la señal capturada antes de su medición) y el modo de medición “lenta” disminuyen la contribución del ruido de lectura, mientras que el enfriamiento de la cámara disminuye la contribución del ruido termal. El ruido de disparo fotónico es inevitable, pero su contribución a la señal es inversamente proporcional a la intensidad de la señal capturada.

### ***5.3.3 Captura de imágenes en el ensayo de curva de letalidad.***

Se utilizó un microscopio automatizado AxioObserver. Z1 (Zeiss), la cámara AxioCam Mrm (Zeiss) y el programa AxioVision Release 4.8.2 (Zeiss). Se utilizó un objetivo 5X.

### ***5.3.4 Monitoreo de la señal de bioluminiscencia en colonias de 3T3.***

Para detectar actividad de luciferasa en colonias se utilizó un microscopio MVX10 MacroView (Olympus), la cámara iXon X3 anteriormente mencionada, una placa incubadora modelo Tokai Hit INU ZILCS F-1 (TOKAI) y los equipos Humidifier S y CO<sub>2</sub> Module S. Los parámetros de incubación fueron los siguientes:

- Temperatura de la tapa = 41°C
- Temperatura de la placa incubadora = 38°C
- CO<sub>2</sub> = 5%

Se utilizaron los objetivos de 1X y 2X, con el aumento de 0.63X. Para la captura de imágenes de bioluminiscencia se programó el modo de adquisición de la cámara-CCD para conteo de fotones por tiempos de exposición largos, con tiempos de exposición de 12 minutos para las luciferasas sin modificar y 25 minutos para las poliubiquitinadas. Para localizar las colonias de interés se utilizaron cuadrículas marcadas en mica transparente, colocadas en la base de cajas de 35mm. Se tomaron imágenes en 4 sitios diferentes de la caja. La señal de bioluminiscencia se revisó con ImageJ. Para asegurarse de que la señal de bioluminiscencia proviniera de colonias, se utilizó el microscopio AxioObserver. Z1, la cámara AxioCam Mrm y el programa AxioVision Release 4.8.2 para tomar imágenes de campo claro en la zona correspondiente. Se utilizó un objetivo de 5X en el área que presentó actividad bioluminiscente.

## 6. Resultados

### 6.1 Construcción de plásmidos para ensayos de bioluminiscencia.

Los promotores de *c-Fos* y *Ciclina A2* humanos se amplificaron con DreamTaq™ a partir de ADN genómico y se integraron a vectores de clonación pDrive. Se seleccionaron dos clones con el promotor de *c-Fos* integrado (pcFos-Drive 1 y pcFos-Drive 2) y dos clones con el promotor de *Ciclina A2* integrado (pCycA-Drive 3 y pCycA-Drive5) en la orientación deseada. El mapa de las clonas en la orientación deseada se muestra en la Figura 13.

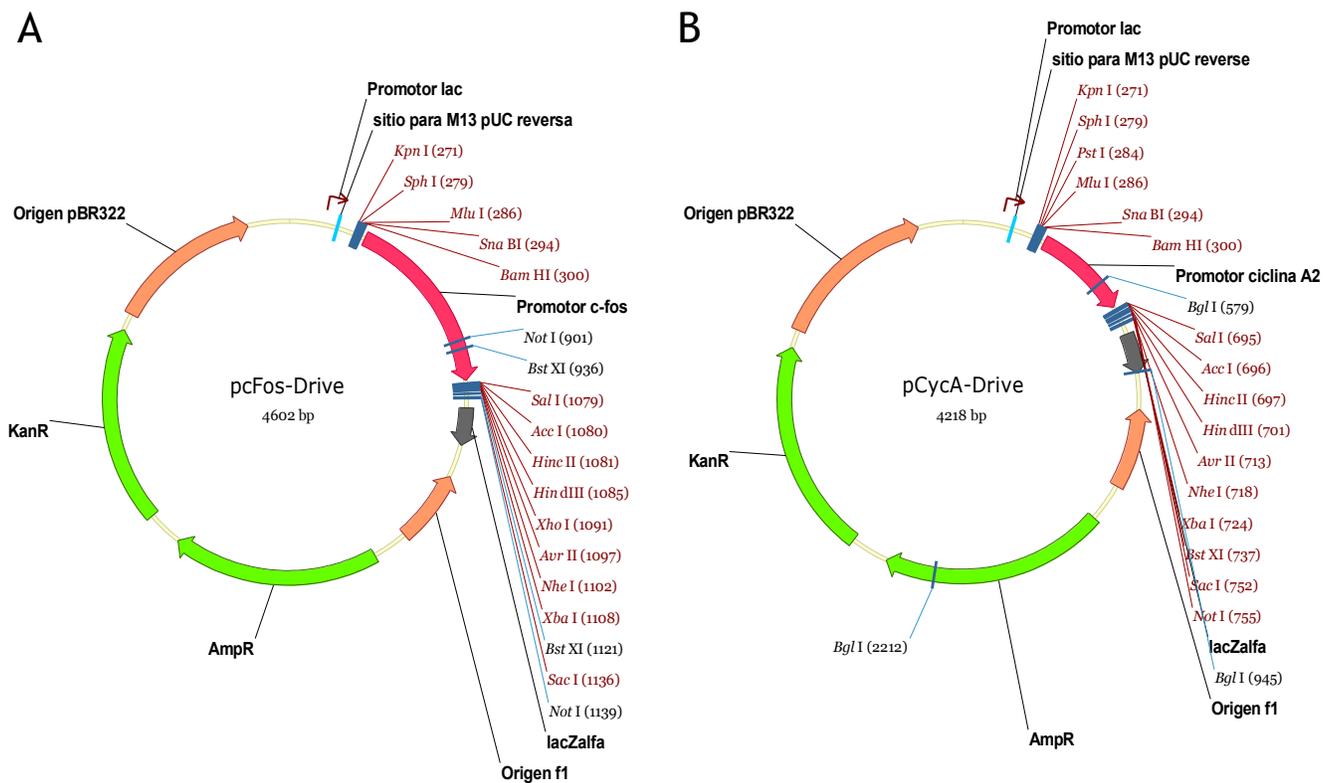


Figura 13: Mapa de los plásmidos obtenidos en la clonación de los promotores *c-fos* (panel A) y *ciclina A2* (panel B). Se muestran los sitios de corte de las endonucleasas de restricción utilizadas y de las pertenecientes al Sitio de Clonado Múltiple. Las enzimas con sitio de corte único están en rojo, las que tienen más de uno están en negro. AmpR = gen de resistencia a ampicilina, KanR = gen de resistencia a kanamicina, lacZalfa = subunidad alfa del gen de  $\beta$ -galactosidasa.

Se secuenció la región del promotor de las clonas seleccionadas para revisar si hubo mutaciones durante la amplificación de los mismos. Las cuatro clonas presentaron sustituciones puntuales con respecto a la referencia de GenBank (Figura 14): pCycA-Drive 1 y pCycA-Drive 2 presentaron 4 y 3 sustituciones respectivamente, mientras que pCycA-Drive 3 y pCycA-Drive5 presentaron 1 sustitución cada una. La sustitución encontrada en el sitio de unión a DRE del promotor de *c-Fos* en los plásmidos con este promotor resultó ser una variante alélica (refSNP rs2239615), por lo que se descartó como producto de la amplificación. Ninguna de las sustituciones restantes se localizó en sitios de unión a factores de transcripción. Por otro lado, el promotor de *Ciclina A2* del plásmido pCycA-Drive 5 tuvo una sustitución de timidina a pirimidina (T→Y). Esto último pudo deberse a que dos clonas del plásmido crecieron en una misma colonia, una de ellas con una sustitución timidina a citocina (T→C) en ese sitio y la otra sin mutación. Por tener un menor número de sustituciones, los plásmidos pCycA-Drive 2 y pCycA-Drive 5 sirvieron de donadores de los promotores de *c-Fos* y *Ciclina A2*.

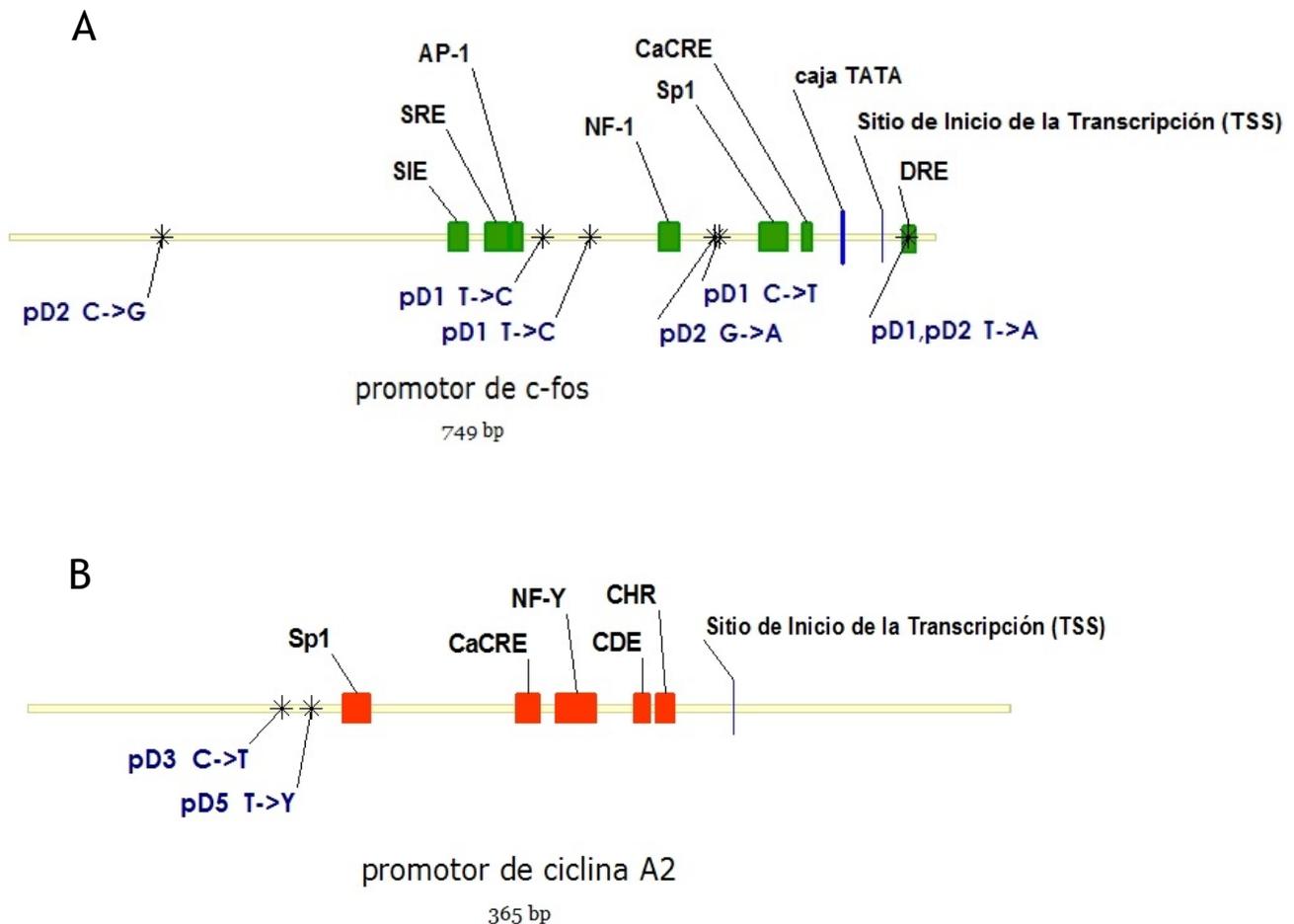


Figura 14: Sustituciones nucleotídicas en los promotores de *c-Fos* (panel A) y *Ciclina A2* (panel B) humanos clonados. Se muestran los mapas de los promotores mencionados. Los elementos de regulación transcripcional conocidos aparecen en cuadros de color o líneas verticales azules. La localización de las sustituciones nucleotídicas encontradas por secuenciación de los plásmidos pCycA-Drive 1 (pD1), pCycA-Drive 2 (pD2), pCycA-Drive 3 (pD3) y pCycA-Drive 5 (pD5) aparece en asterisco. Las abreviaturas corresponden a: el elemento sensible a suero (SRE), el elemento sensible a calcio y a AMP cíclico (CaCRE), el elemento inducible a *v-sis* (SIE), el elemento regulador río-abajo (DRE), el elemento dependiente del ciclo celular (CDE) y la región de homología de genes del ciclo celular (CHR).

Los promotores clonados se integraron a los plásmidos pCBG99basic y pCBRbasic dentro del Sitio de Clonado Múltiple. De acuerdo a su contenido, los plásmidos construidos tuvieron por nombre pCBG99-cfos, pCBR-cfos, pCBG99-cycA2 y pCBR-cycA2 (Figura 15). Estos plásmidos se utilizaron en los ensayos de bioluminiscencia de dinámica transcripcional.

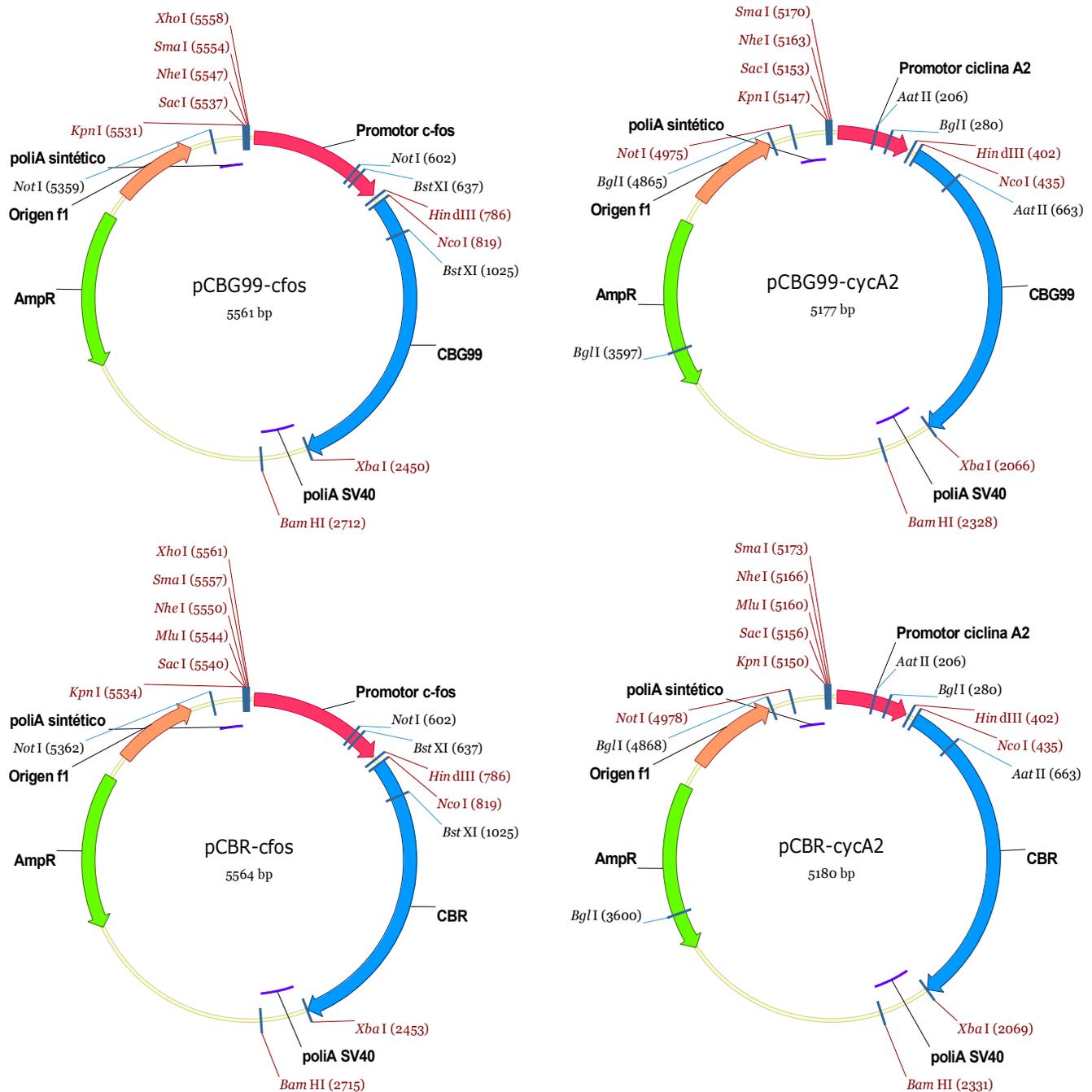


Figura 15: Mapa de los plásmidos construidos con genes reporteros. Se muestran los sitios de corte de las endonucleasas de restricción utilizadas y de las pertenecientes al Sitio de Clonado Múltiple. Las enzimas con sitio de corte único están en rojo, las que tienen más de uno están en negro. AmpR = gen de resistencia a ampicilina, poliA = sitio de poliadenilación.

Para la construcción de plásmidos con luciferasas desestabilizadas, los plásmidos pCBG99-cfos, pCBR-cycA2 y pSV40-ELuc se abrieron en el sitio de inicio de la traducción de las luciferasas correspondientes. La secuencia codificante de cuatro ubiquitinas G76V concatenadas se extrajo del plásmido CMV-Ubx4-FLuc y se integró a los plásmidos abiertos ya mencionados. Los plásmidos construidos se nombraron pCBG99-Ubx4-cfos, pCBR-Ubx4-cycA2 y pSV40-Ubx4-ELuc (Figura 16).

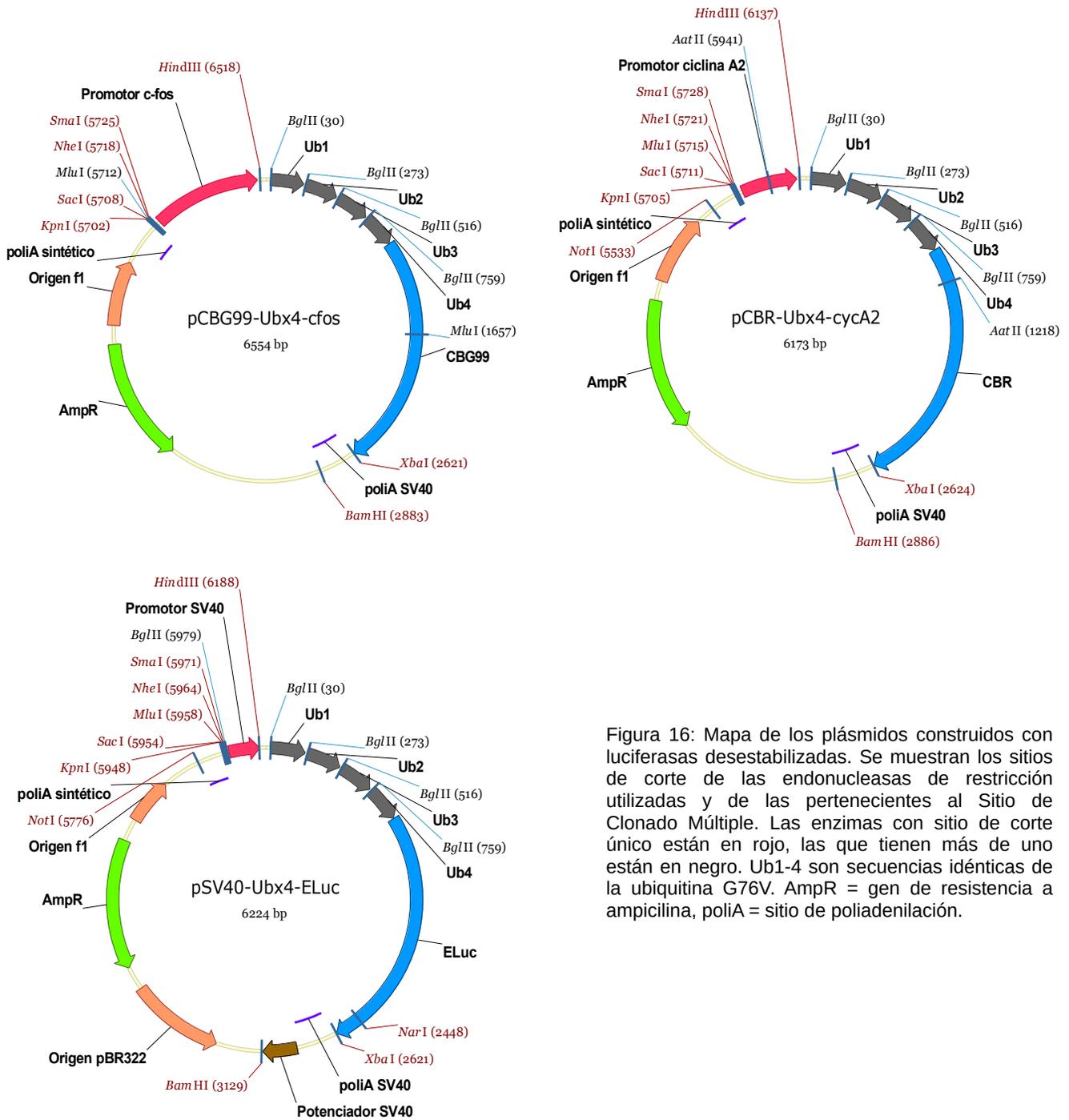


Figura 16: Mapa de los plásmidos construidos con luciferasas desestabilizadas. Se muestran los sitios de corte de las endonucleasas de restricción utilizadas y de las pertenecientes al Sitio de Clonado Múltiple. Las enzimas con sitio de corte único están en rojo, las que tienen más de uno están en negro. Ub1-4 son secuencias idénticas de la ubiquitina G76V. AmpR = gen de resistencia a ampicilina, poliA = sitio de poliadenilación.

Para confirmar que las fusiones traduccionales hechas tienen actividad de bioluminiscencia, cada plásmido se utilizó en un ensayo de bioluminiscencia para detección de actividad. Se capturaron células con actividad bioluminiscente (Figura 17), por lo que se confirmó que el plásmido permitía la expresión de los genes de luciferasa contenidos. pCBG99-Ubx4-cfos y pCBR-Ubx4-cycA2 se utilizaron en los ensayos de dinámica transcripcional.

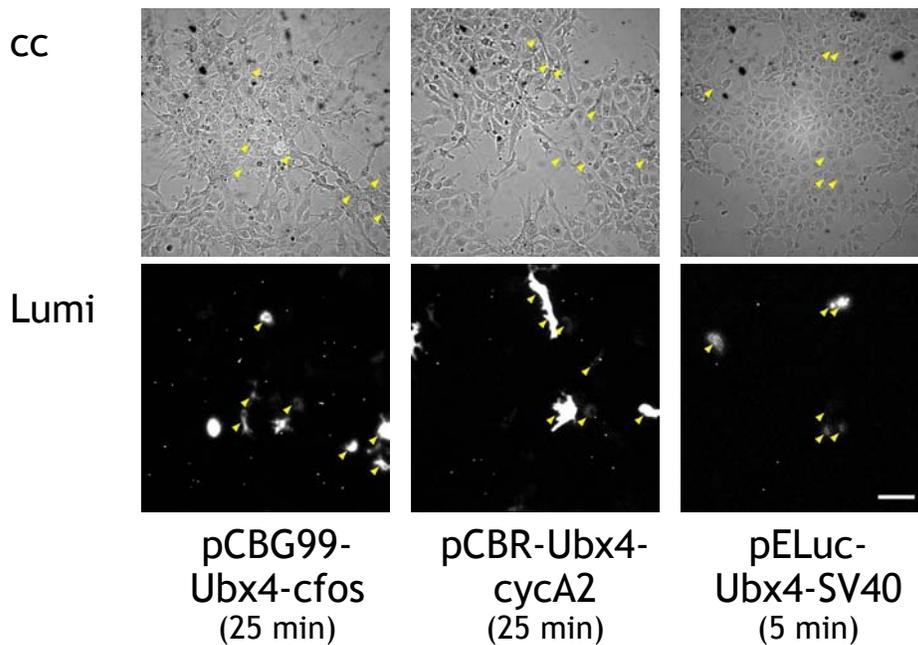


Figura 17: Actividad de bioluminiscencia en células COS-7 transfectadas con plásmidos de luciferasas desestabilizadas. Se tomaron imágenes en campo claro (cc) y bioluminiscencia (Lumi) de una región del cultivo celular. Bajo el nombre de cada plásmido transfectado aparece entre paréntesis el tiempo de exposición utilizado en la captura de bioluminiscencia. La eficiencia de transfección en los ensayos mostrados fue de ~4% para pCBG99-Ubx4-cfos, de ~5% para pCBR-Ubx4-cycA y de ~1% para pELuc-Ubx4-SV40. Se señala con punta de flecha la señal proveniente de algunas células individuales y la localización de las células en campo claro. La barra de escala es de 100µm.

Para la construcción de los plásmidos a utilizar en los ensayos de vida media, se eligió al promotor de timidina cinasa (TK) del virus de herpes simple, para la expresión constitutiva de las luciferasas de interés. Se retiró al gen de luciferasa de *Renilla* del plásmido pRL-TK, y en su lugar se integraron los genes de las luciferasas de interés. Los plásmidos donadores de las luciferasas fueron pCBG99-cfos para CBG99, pCBR-cfos para CBR, pSV40-ELuc para ELuc y pSV40-Luc2 para Luc2. Se construyeron 4 plásmidos: pTK-CBG99, pTK-CBR, pTK-ELuc y pTK-Luc2 (Figura 18). La actividad de las luciferasas expresadas con estos plásmidos se confirmó en ensayos de bioluminiscencia para detección de actividad, en células COS-7 co-transfectadas con el plásmido de interés y un plásmido que permite la expresión constitutiva de GFP con un par de ensayos por plásmido (Figura 19).

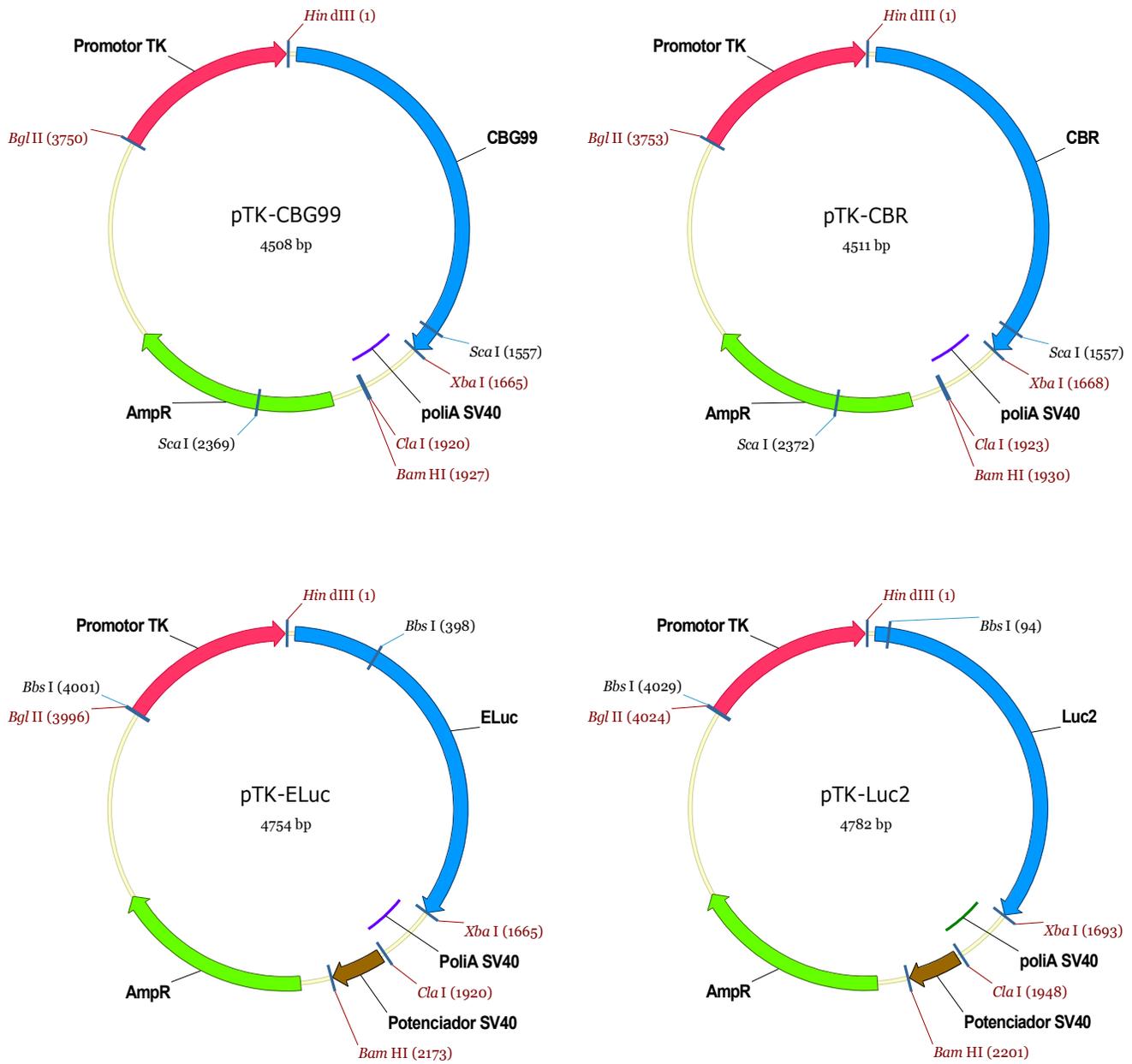


Figura 18: Mapa de los plásmidos construidos para expresión constitutiva de luciferasas. Se muestran los sitios de corte de las endonucleasas de restricción utilizadas y de las pertenecientes al Sitio de Clonado Múltiple. Las enzimas con sitio de corte único están en rojo, las que tienen más de uno están en negro. AmpR = gen de resistencia a ampicilina, poliA = sitio de poliadenilación, TK = timidina cinasa del virus de herpes simple.

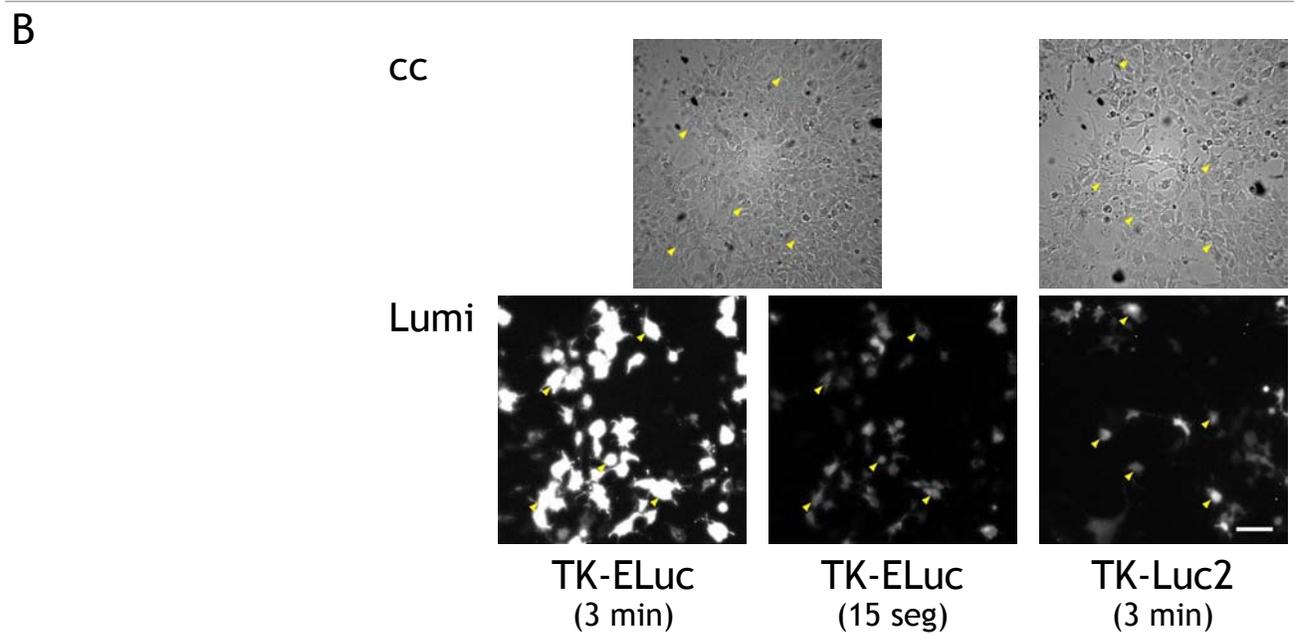
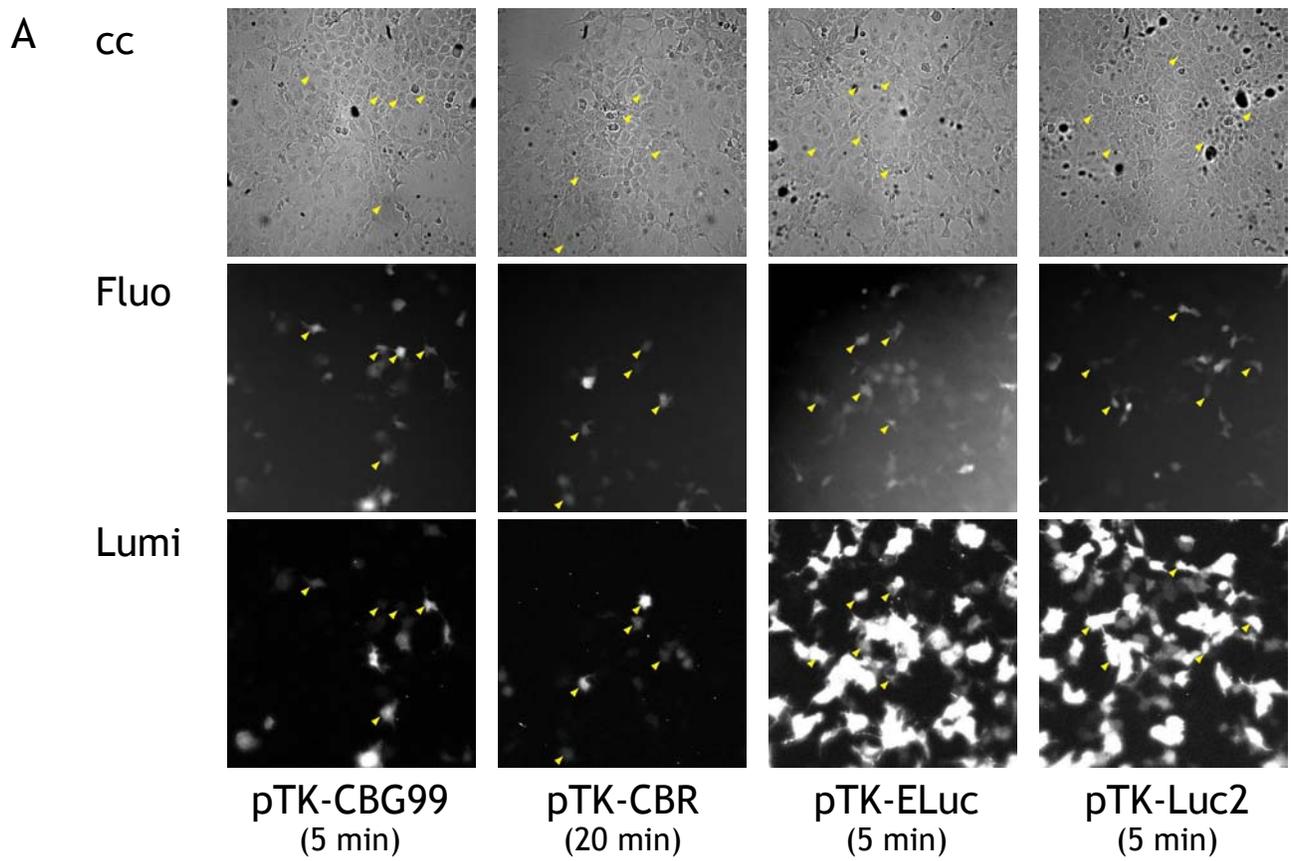


Figura 19: Actividad de bioluminiscencia en células COS-7 co-transfectadas con plásmidos de expresión constitutiva de GFP y de la luciferasa de interés. Se tomaron imágenes en campo claro (cc), fluorescencia (Fluo) y bioluminiscencia (Lumi) de una región del cultivo celular. Bajo el nombre de cada plásmido aparece entre paréntesis el tiempo de exposición utilizado para la captura de bioluminiscencia. La eficiencia de transfección en los ensayos mostrados fue de ~13% para pTK-CBG99, de ~10% para pTK-CBR y de ~32% para pTK-ELuc y pTK-Luc2 en los ensayos del panel A; de ~21% para pTK-ELuc y de ~14% para pTK-Luc2 en los ensayos del panel B. Se señala con punta de flecha la señal proveniente de algunas células individuales y la localización de las células en campo claro. La barra de escala es de 100µm.

<b>Tabla 4: Intensidad neta promedio de la señal bioluminiscente de células transfectadas con diferentes plásmidos.</b>		
Plásmido utilizado	Intensidad neta promedio (tiempo de exposición)	Intensidad neta promedio / minuto
pTK-CBG99	20346 (5 minutos)	4069
pTK-CBR	11508 (20 minutos)	575
pTK-ELuc	23649 (15 segundos)	94599
pTK-Luc2	32800 (3 minutos)	10933

La intensidad neta promedio de la señal de bioluminiscencia obtenida de dichos ensayos se observa en la Tabla 4. Al estimar la señal bioluminiscente por minuto obtenida de estos ensayos, se observó que con pTK-ELuc y pTK-Luc2 se consiguió una señal ~2.7 y 23 veces mayor que con pTK-CBG99. A su vez, la señal obtenida con pTK-CBG99 fue 7 veces mayor que la de pTK-CBR. En el primer caso, la integración accidental del potenciador de SV40 [Herr, 1993] en pTK-ELuc y pTK-Luc2 (Figura 18) pudo influir en que la señal obtenida con estos dos plásmidos fuera la de mayor intensidad. Por tener sistemas de regulación transcripcional diferentes, sólo fue posible comparar indirectamente la actividad de ELuc con la de Luc2, y la de CBR con la de CBG99. La intensidad de la señal bioluminiscente obtenida con ELuc fue ~10 veces mayor que la de Luc2, lo cual va de acuerdo con un estudio previo de ambas luciferasas [Nakajima et al, 2010]. La señal de CBR fue considerablemente débil comparada con la de CBG99. Por lo anterior se consideró la posibilidad de no poder medir adecuadamente la actividad bioluminiscente de CBR en los ensayos de vida media.

Por cuestiones de tiempo, los ensayos de determinación de vida media no se llevaron a cabo, y forman parte de las perspectivas. Los resultados de estos ensayos serán de utilidad para estimar la resolución temporal que ofrece la actividad de estas luciferasas para ensayos de dinámica transcripcional.

## 6.2 Dinámica transcripcional de los promotores de *c-Fos* y *Ciclina A2* durante el reinicio del ciclo celular.

### 6.2.1 Detección de actividad bioluminiscente de los plásmidos construidos para ensayos de dinámica transcripcional.

Los cuatro plásmidos construidos que contienen a los promotores de *c-Fos* y *Ciclina A2* unidos a los genes de las luciferasas CBG99 y CBR se utilizaron en ensayos de bioluminiscencia para detectar la expresión de los reporteros. Estos plásmidos se transfirieron en células de la línea COS-7, por ser de fácil cultivo y transfección. Los resultados de estos ensayos se presentan en la figura 20.

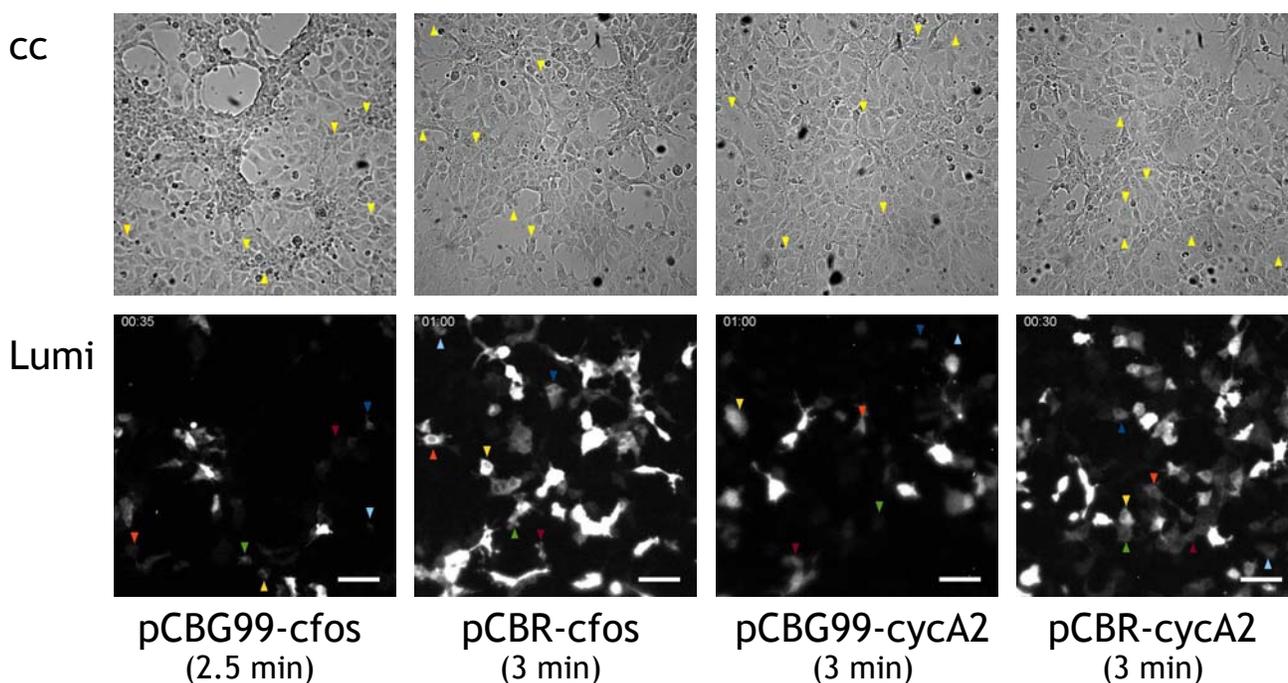


Figura 20: Actividad de bioluminiscencia en células COS-7 transfiridas con plásmidos para expresión de las luciferasas CBG99 y CBR bajo control transcripcional de los promotores de *c-Fos* y *ciclina A2*. Se tomaron imágenes en campo claro (cc) y bioluminiscencia (Lumi) de una región del cultivo celular. Bajo el nombre de cada plásmido transfirido aparece entre paréntesis el tiempo de exposición utilizado en la captura de bioluminiscencia. Se señala con punta de flecha la señal proveniente de algunas células individuales y la localización de las células en campo claro. La barra de escala es de 100µm.

Debido a que las células de la línea COS-7 son transformadas, su ciclo celular progresa independientemente de la presencia de suero [Alberts et al, 2014], y no es posible sincronizar su ciclo celular en ausencia de este. Por lo tanto, para los ensayos de dinámica transcripcional se empleó la línea celular no transformada 3T3. Se decidió utilizar transfecciones estables para esta línea, con el fin de reducir la variabilidad en la señal bioluminiscente consecuencia de diferencias en la dosis génica.

### 6.2.2 Establecimiento de líneas celulares a partir de fibroblastos 3T3 con transfección estable.

Se llevó a cabo un ensayo de curva de letalidad, para determinar la concentración adecuada de geneticina en el medio de cultivo en los ensayos de selección de células 3T3 con resistencia al antibiótico. Se seleccionó la concentración mínima de antibiótico que conduzca a la muerte de un cultivo celular sin resistencia a geneticina, entre el tercer y el quinto día de tratamiento (Figura 21). Los pozos con medio sin geneticina se descartaron debido a contaminación en el medio. El pozo con una concentración nominal de geneticina de 1000µg/mL en el medio se quedó sin células vivas en el quinto día del ensayo, por lo que esta concentración se usó en los ensayos de selección.

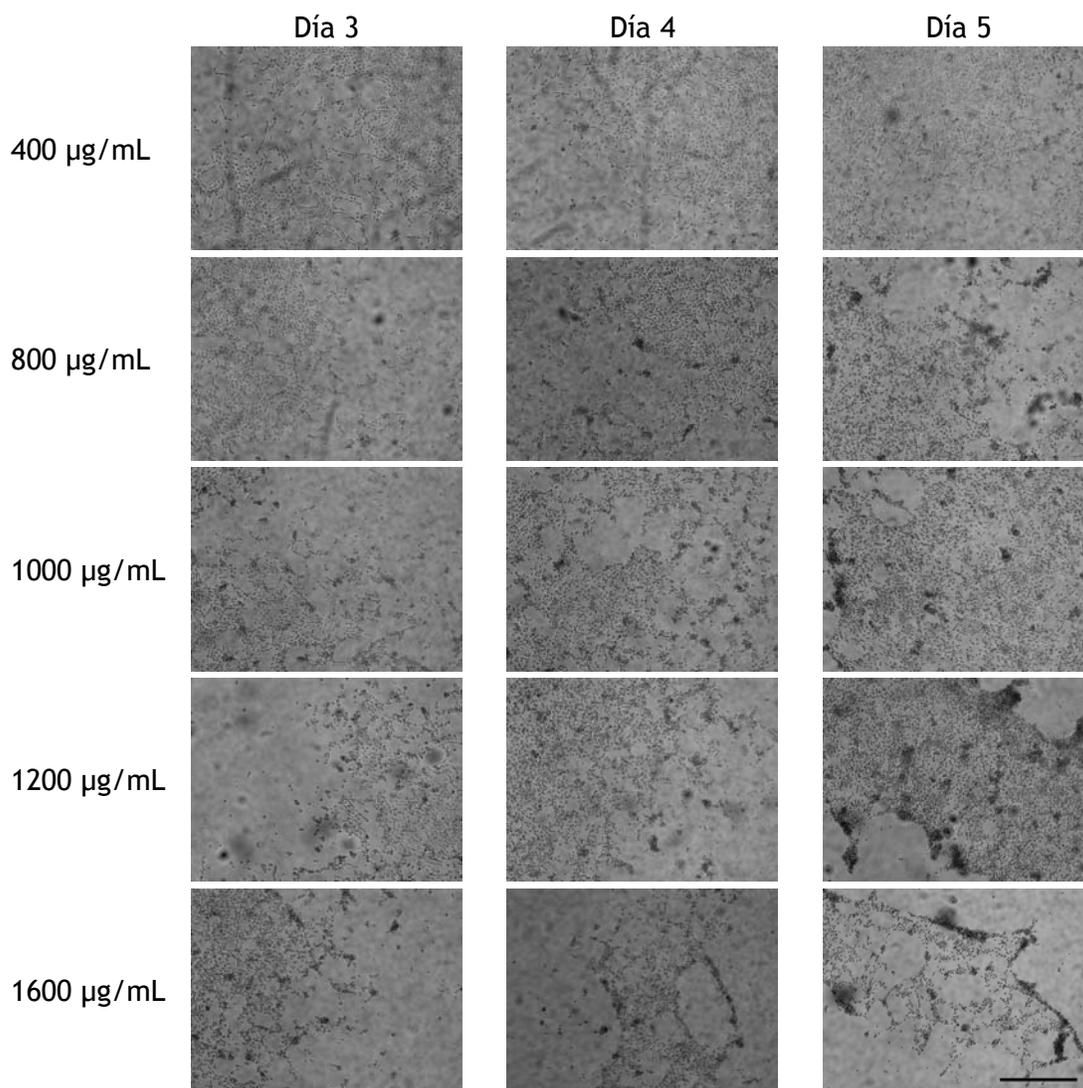


Figura 21: Resultados del ensayo de curva de letalidad. Se presentan imágenes de campo claro de cultivos de células 3T3, en tratamiento de geneticina a las concentraciones indicadas, del tercer, cuarto y quinto día de tratamiento. Las células observadas se clasificaron de acuerdo a su morfología en 3 grupos: sanas (células aplanadas, con 1 ó 2 proyecciones), estresadas (células no aplanadas, redondeadas, sin proyecciones) y muertas (células totalmente redondas, pequeñas, despegadas de la caja). La barra de escala es de 500µm.

Los plásmidos seleccionados para ser transfectados fueron pCBG99-cfos, pCBG99-Ubx4-cfos,

pCBR-cycA2 y pCBR-Ubx4-cycA2. Los vectores sin concatenados de ubiquitina se co-transfectaron con el plásmido pPGK-Neo, mientras que los vectores con concatenados se co-transfectaron con pQBI-pgk. Ambos plásmidos contienen al gen de resistencia a neomicina, el cual también le otorga a las células que lo expresan resistencia a geneticina. pQBI-pgk contiene una fusión traduccional del gen de GFP en su extremo amino y el gen de resistencia en su extremo carboxilo. El proceso de selección representado en la figura 22, consistió en la recuperación de colonias de células resistentes a geneticina con actividad bioluminiscente observable.

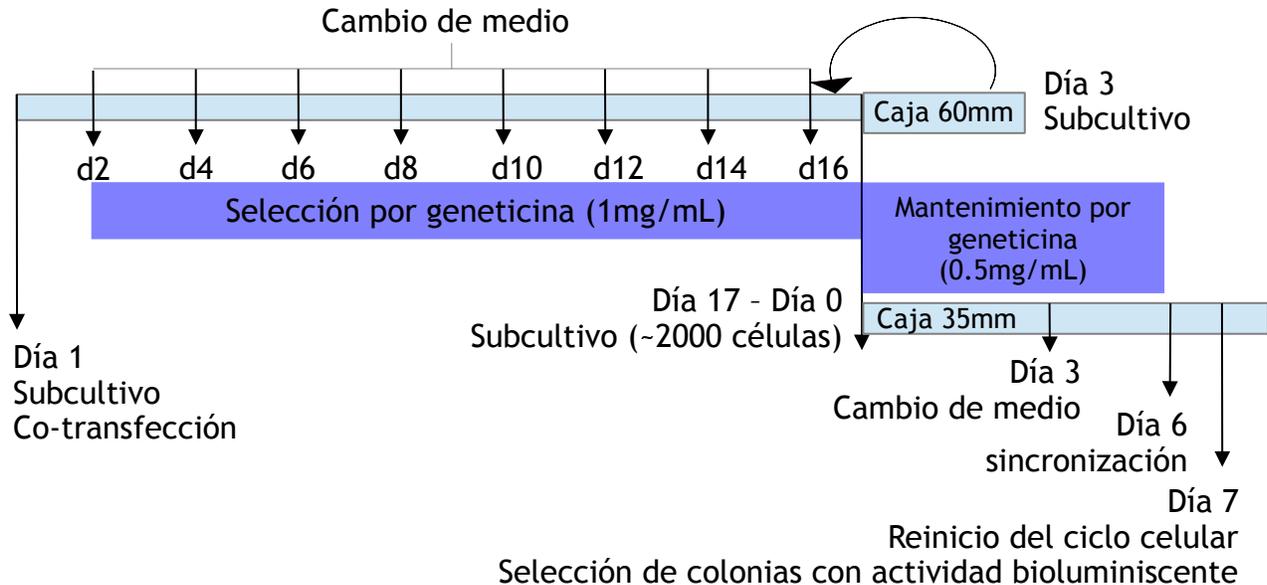


Figura 22: Esquema del protocolo de selección de células con transfección estable. Durante el primer día del ensayo, las células subcultivadas en una caja de 60mm se co-transfectaron con un plásmido de expresión de luciferasa y uno de expresión de resistencia a neomicina. En el segundo día se suministró geneticina a la concentración de selección, y este tratamiento se mantuvo por 16 días, con cambio de medio cada 2 días. Después, las células se subcultivaron en una caja de 60mm (para conservar las células) y en una o dos cajas de 35mm a baja densidad. (para selección de clonas) Las células de estas cajas se trataron con geneticina a concentración de mantenimiento. Cada 3 días, el cultivo de la caja de 60mm se subcultivó en otra caja de 60mm y en una o dos cajas de 35mm. Las cajas de 35mm se cultivaron por 6 días, para luego colocarlas en medio de sincronización. En el día 7 de cultivo, las células de las cajas de 35mm se utilizaron en ensayos de selección de colonias con actividad bioluminiscente.

Se seleccionaron 2 colonias con actividad bioluminiscente alta, de células transfectadas con pCBG99-cfos, 2 con pCBR-cycA2 y 2 con pCBR-Ubx4-cycA2, con las cuales se formaron las líneas celulares con transfección estable F0G1, F0G2, C0R1, C0R2, C4R1 y C4R2, respectivamente (Figura 23). La recuperación de las colonias fue por pipeteo suave de células suspendidas con ayuda de tripsina. Este método ocasionó la obtención de células pertenecientes a otras colonias, como se observó más adelante. Para las células transfectadas con CBG99-Ubx4-cfos se utilizó el protocolo de selección

de colonias individuales por lector de placas. Se seleccionaron las 2 colonias con mayor actividad de bioluminiscencia y con ellas se formaron las líneas celulares F4G1 y F4G2 (Figura 24).

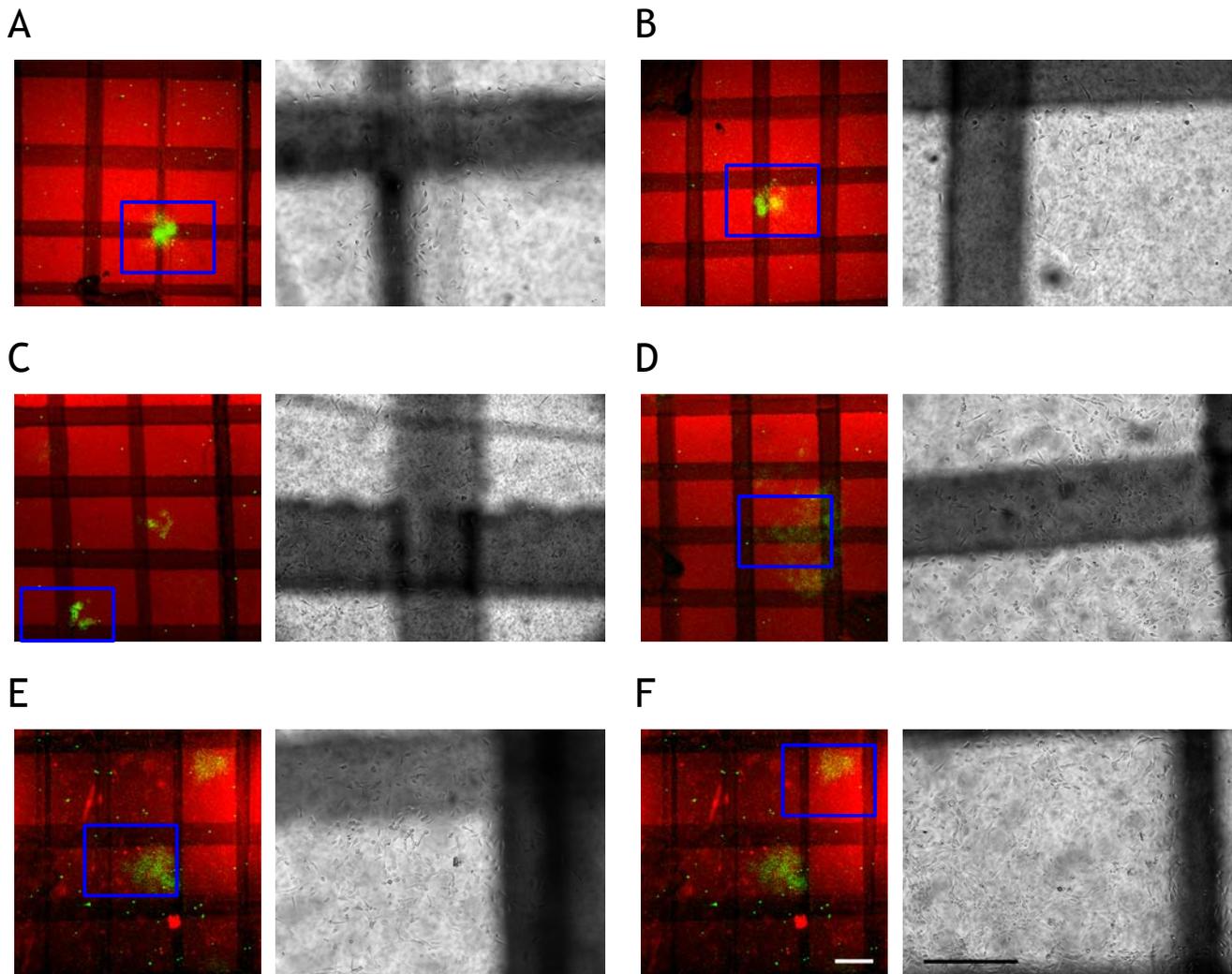


Figura 23: Resultados de los ensayos de selección de colonias con transfección estable. Se muestran las colonias con las que se formaron las líneas F0G1 (Panel A), F0G2 (Panel B), C0R1 (Panel C), C0R2 (Panel D), C4R1 (Panel E) y C4R2 (Panel F). Para cada panel se presenta del lado izquierdo una imagen compuesta que contiene la imagen de campo claro (rojo) y de bioluminiscencia (verde) de una región del cultivo celular revisada en el ensayo. Se observa en campo claro la cuadrícula utilizada para localizar los cúmulos de células con actividad bioluminiscente en la caja de petri. Del lado derecho de cada panel, se muestra una imagen de campo claro con mayor aumento que el de la imagen de la izquierda, la cual cubre aproximadamente el área cubierta por el recuadro azul de la imagen del lado izquierdo del panel. Esta imagen se tomó para corroborar la presencia de células en la región con señal de luminiscencia. La barra de escala es de 1mm para las imágenes compuestas (barra blanca) y de 500 $\mu$ m para las imágenes de mayor aumento (barra negra).

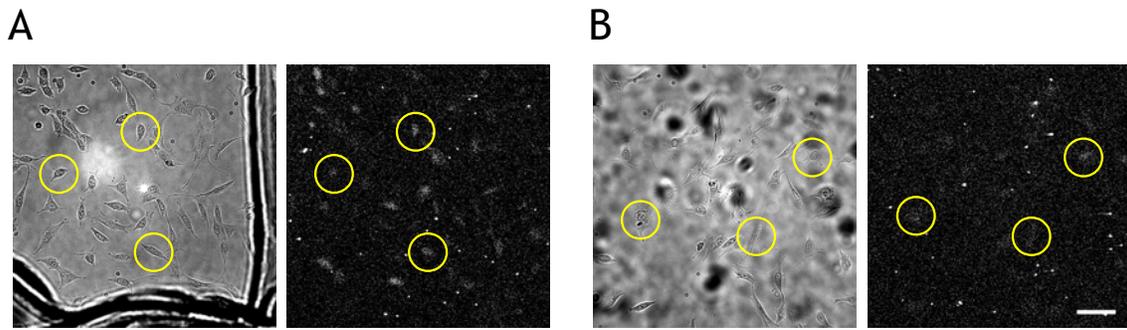


Figura 24: Líneas celulares obtenidas del ensayo de selección de colonias individuales por lector de placas. Se presentan imágenes de campo claro (izquierda) y bioluminiscencia (derecha) de células de las líneas F4G1 (panel A) y F4G2 (panel B). La imagen de bioluminiscencia muestra señales débiles provenientes de las células observadas. Se encierran en círculos azules células observadas en las imágenes del mismo panel. La barra de escala es de 100 $\mu$ m.

De los resultados de selección de colonias efectuados con ayuda de microscópio, se observó que la densidad celular en las zonas con señal de bioluminiscencia no fue elevada (Figura 23, imagen derecha en los paneles). Esto no impidió la recuperación de células con actividad bioluminiscente, como se observa en la siguiente sección de esta tesis. Con respecto a las líneas obtenidas por selección de colonias individuales con ayuda del lector de placas, se observaron células sin señal aparente de bioluminiscencia (Figura 24). Esto pudo deberse a que la actividad de las luciferasas en estas células es imperceptible o que su expresión se perdió. De las líneas celulares obtenidas, se utilizaron F0G1, C0R2, F4G1 y C4R1 para los ensayos de dinámica transcripcional.

### 6.2.3 Monitoreo de la actividad bioluminiscente en fibroblastos 3T3 con transfección estable.

Se llevaron a cabo dos ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 con transfección estable del plásmido pCBG99-cfos, las cuales pasaron por privación de suero 24 horas antes del ensayo. En la figura 25 se muestran imágenes representativas de ambos ensayos y en la figura 26 se presentan los resultados del análisis de las imágenes obtenidas.

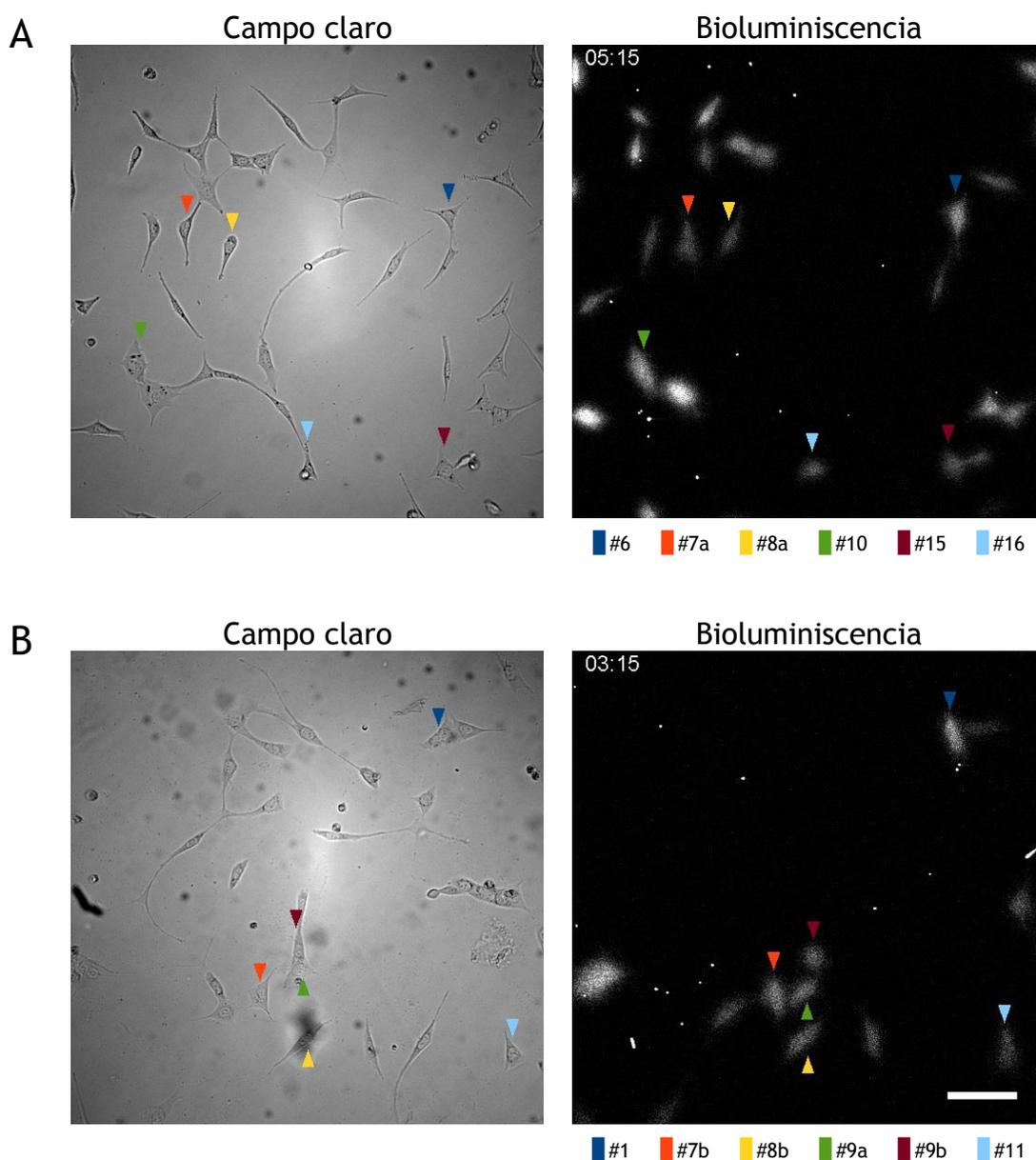


Figura 25. Imágenes representativas de los dos ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea FOG1. Se presentan imágenes de campo claro y bioluminiscencia tomadas durante el monitoreo de células individuales en los primeros (Panel A) y segundos ensayos (Panel B). Se señalan las células analizadas en las imágenes de campo claro y bioluminiscencia con triángulos de color. Debajo de la imagen de bioluminiscencia se muestra el número de identificación (generado por el programa de análisis) asociado a cada célula. La barra de escala es de 100µm.

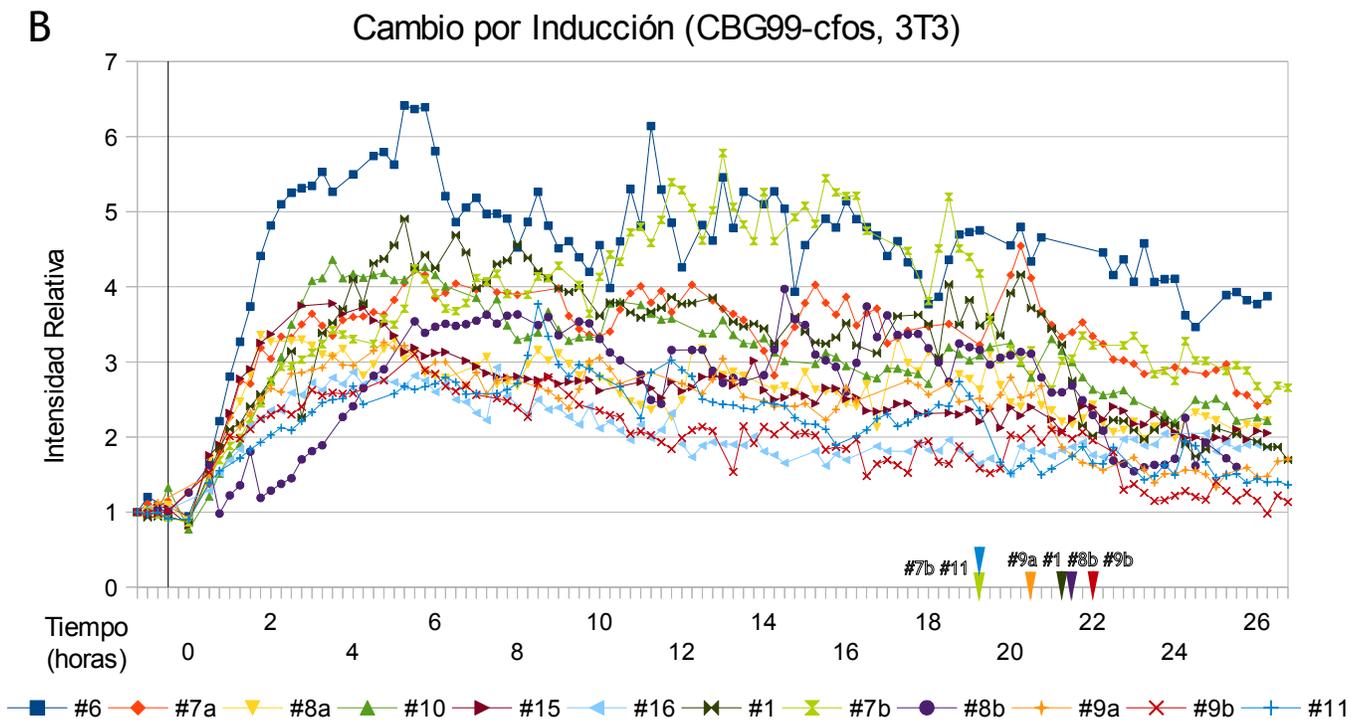
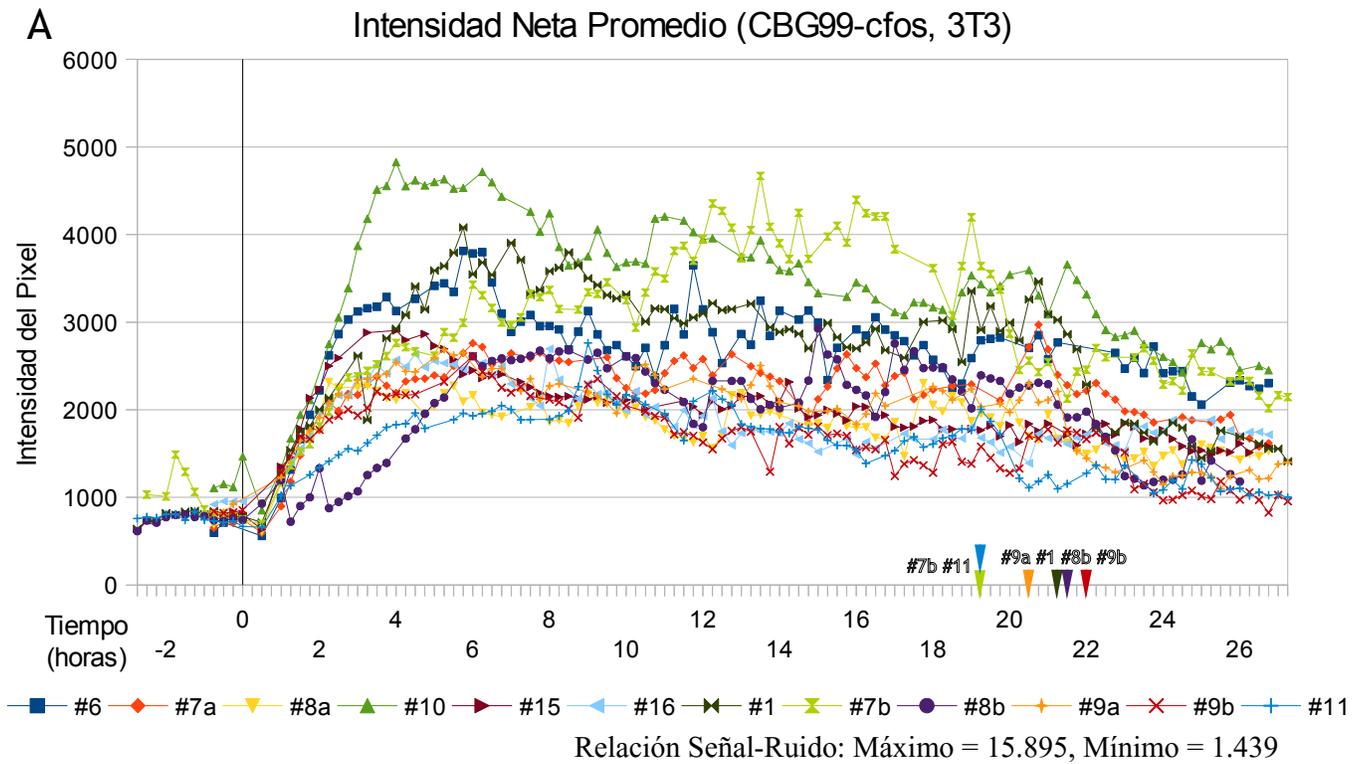


Figura 26. Resultado de los ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea F0G1. Se presentan dos gráficas, que muestran la Intensidad Neta Promedio (Panel A) y el Cambio por Inducción (Panel B) de la señal de bioluminiscencia obtenida de células individuales, con respecto al tiempo. Cada una de las líneas de la gráfica representa la señal obtenida de una célula individual, cuyo número de identificación correspondiente aparece en la leyenda debajo de cada gráfica. La última medición hecha antes de la adición de 200µL de suero al medio de cultivo se colocó bajo el Tiempo = 0 horas. Las células analizadas aparecen señaladas en la Figura 25. En triángulos de color se indican eventos de división. Debajo de la gráfica de Intensidad Neta Promedio se muestran los valores mínimo y máximo de la Relación Señal-Ruido obtenido de las células analizadas.

También se llevaron a cabo dos ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 con transfección estable del plásmido pCBG99-Ubx4-cfos, en condiciones similares a los ensayos anteriores. En la figura 27 se muestran imágenes representativas de ambos ensayos y en la figura 28 se presentan los resultados del análisis de las imágenes obtenidas.

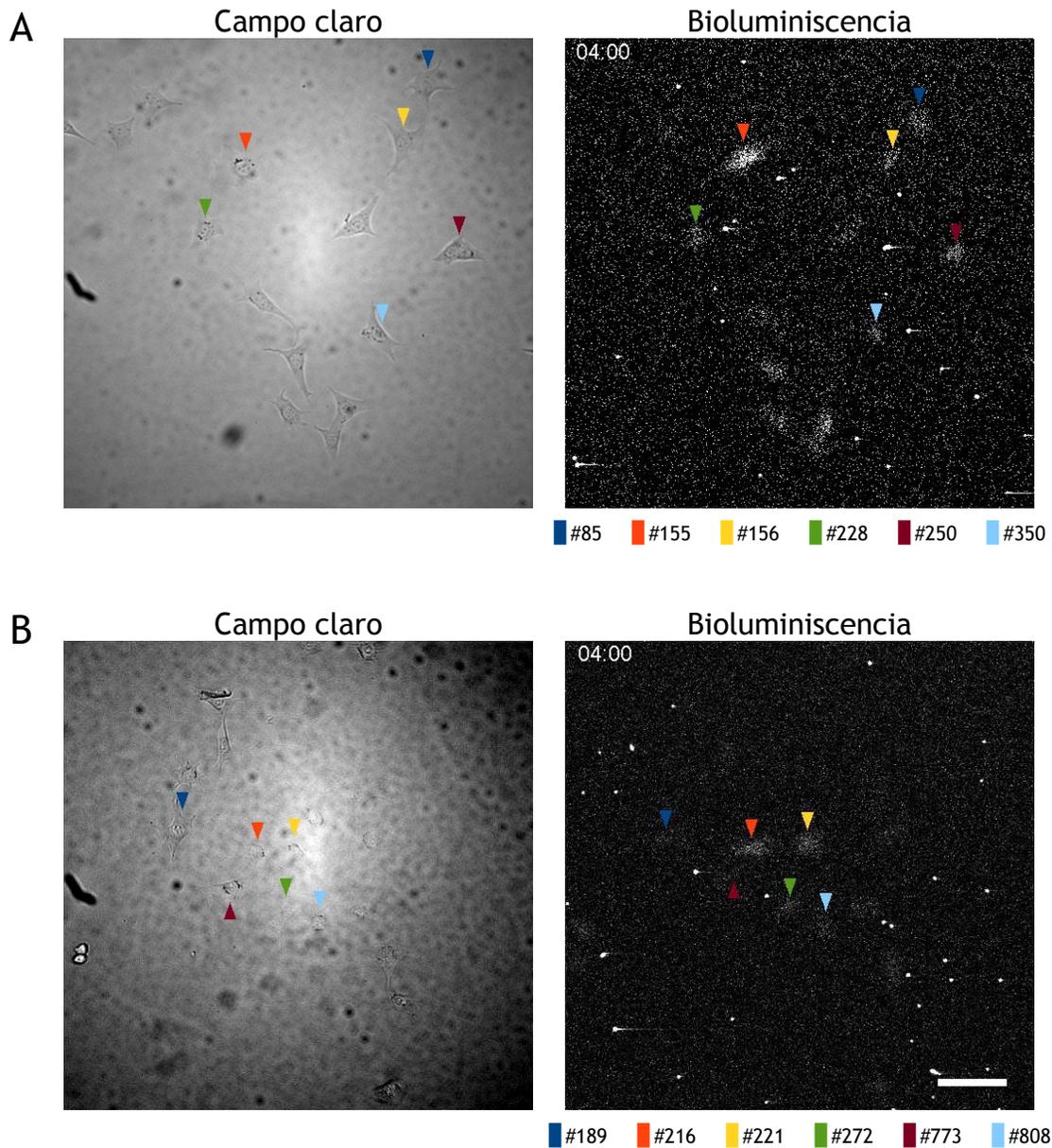


Figura 27. Imágenes representativas de los dos ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea F4G1. Se presentan imágenes de campo claro y bioluminiscencia tomadas durante el monitoreo de células individuales en los primer (Panel A) y segundo ensayos (Panel B). Se señalan las células analizadas en las imágenes de campo claro y bioluminiscencia con triángulos de color. Debajo de la imagen de bioluminiscencia se muestra el número de identificación (generado por el programa de análisis) asociado a cada célula. La barra de escala es de 100µm.

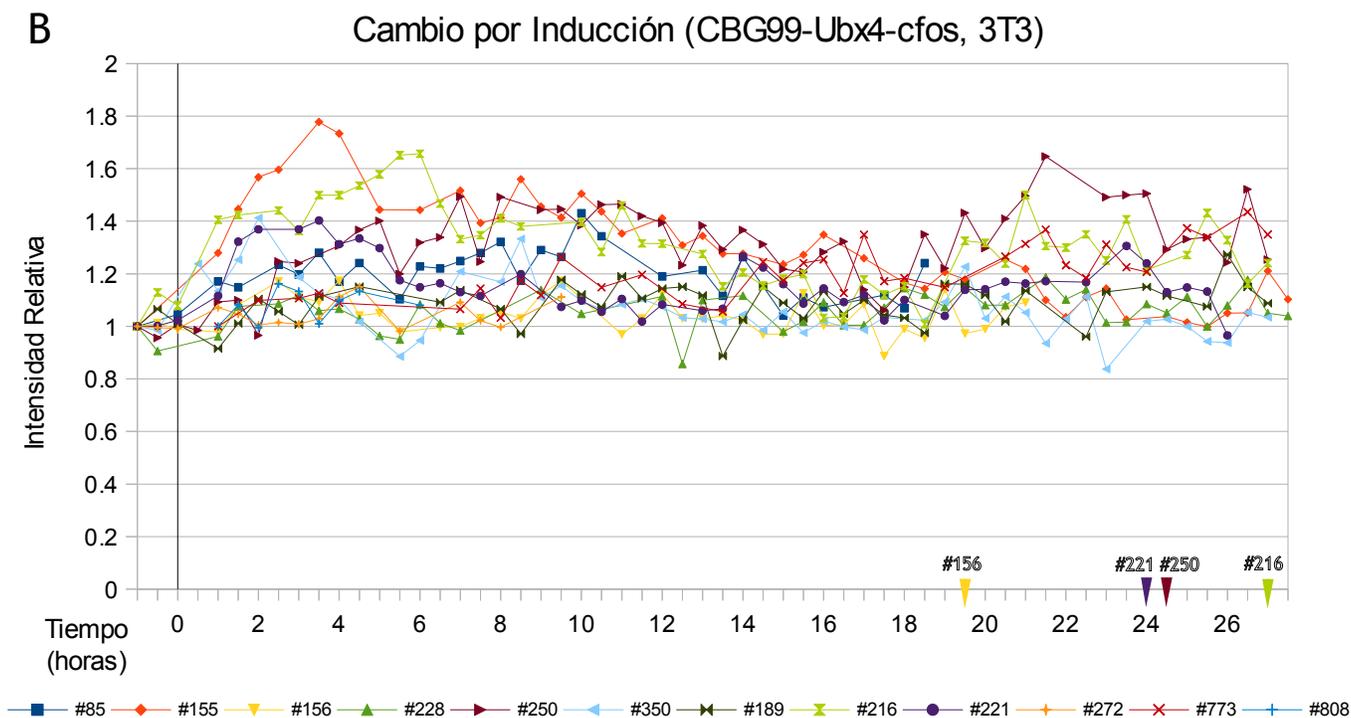
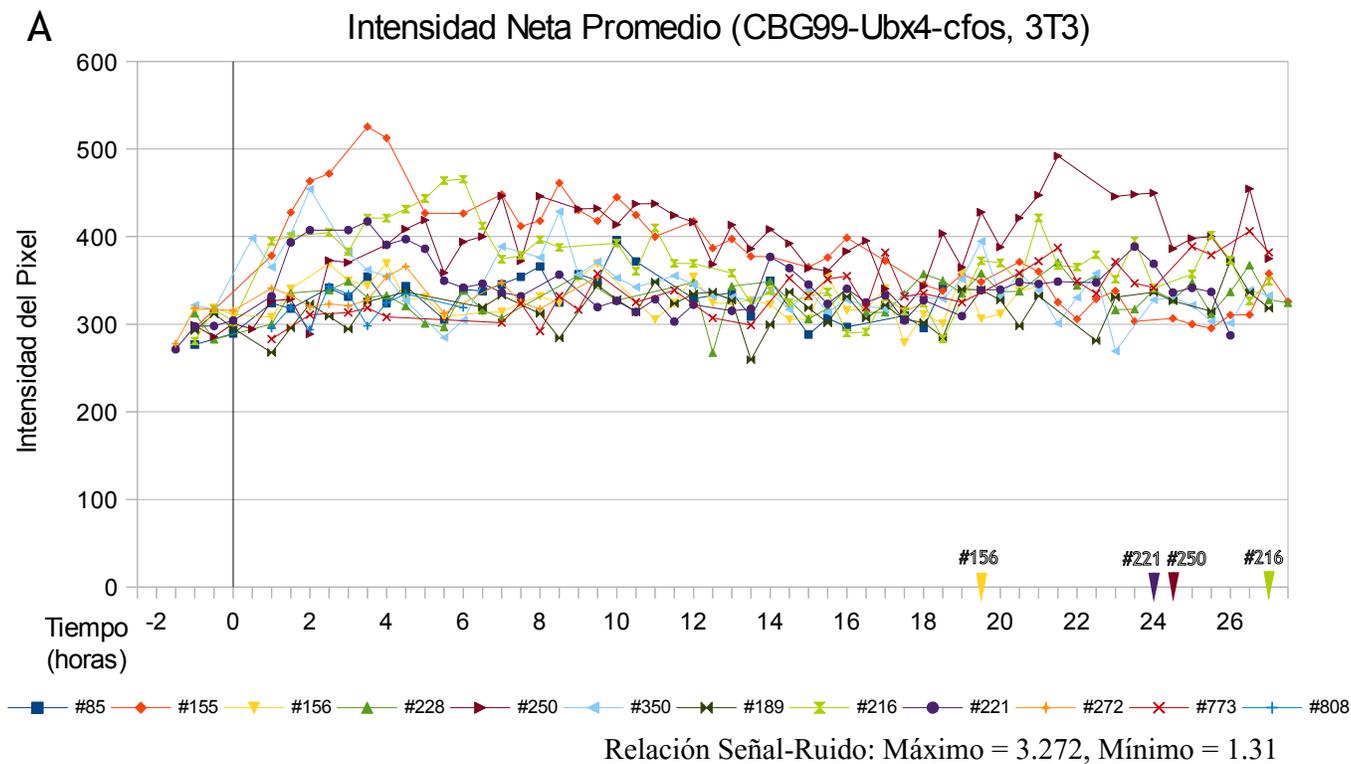


Figura 28. Resultado de los ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea F4G1. Se presentan dos gráficas, que muestran la Intensidad Neta Promedio (Panel A) y el Cambio por Inducción (Panel B) de la señal de bioluminiscencia obtenida de células individuales, con respecto al tiempo. Cada una de las líneas de la gráfica representa la señal obtenida de una célula individual, cuyo número de identificación correspondiente aparece en la leyenda debajo de cada gráfica. La última medición hecha antes de la adición de 200µL de suero al medio de cultivo se colocó bajo el Tiempo = 0 horas. Las células analizadas aparecen señaladas en la Figura 27. En triángulos de color se indican eventos de división. Debajo de la gráfica de Intensidad Neta Promedio se muestran los valores mínimo y máximo de la Relación Señal-Ruido obtenido de las células analizadas.

En los ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 con transfección estable de pCBG99-cfos, las células analizadas tuvieron niveles similares de actividad basal (Figura 26). Esto podría ser consecuencia de que estas células tengan un mismo número de copias del gen reportero. También se observaron células sin actividad bioluminiscente (Figura 25), las cuales podrían provenir de otras colonias y que se recuperaron junto con las células de la colonia con células bioluminiscentes. La presencia de células sin actividad bioluminiscente indica que las células utilizadas forman parte de una población heterogénea, provenientes de células con diferencias en la expresión de los genes transfectados. Otra posibilidad podría ser consecuencia de una baja estabilidad de la transfección, aunque no se observó una reducción significativa en la actividad bioluminiscente de estas células durante el tiempo que tomó implementar el ensayo (3 meses).

La Relación Señal-Ruido, o RSR, obtenida en la mayoría de las mediciones fue aceptable ( $>3$ ) bajo un tiempo de exposición a 12 minutos (Figura 26). Se observó un aumento inmediato en la actividad bioluminiscente de las células analizadas tras la adición de suero. Se consideró significativa la respuesta a suero si el cambio por inducción, el aumento relativo en la señal con respecto a la misma en estado basal, fuera mayor a 3 veces. En 9 de 12 células se observó una respuesta significativa a la adición de suero, aunque esta actividad no regresó niveles basales en la 5 de ellas (#6, #7a, #7b, #8a y #10), y en 4 de ellas el retorno fue tardío (#1, #8b, #9a y #15). Las 3 células restantes no tuvieron un aumento significativo (#9b, #11 y #16). Se observaron eventos de división celular entre las 19 y 22 horas posteriores a la inducción por suero en la mitad de las células analizadas (Tabla 5). Sin embargo, el resto de las células no tuvo eventos de división celular observables. Para calcular la intensidad y la robustez de la respuesta a la adición de suero del total de células analizadas, se utilizó el promedio del cambio por inducción más elevado obtenido durante el ensayo y el coeficiente de variación (CV) del mismo. El valor máximo de cambio por inducción promedio en los ensayos fue de 3.75 y su CV fue de 0.29, obtenido a las 6 horas posteriores a la adición de suero. La actividad bioluminiscente promedio obtenida en los ensayos con pCBG99-cfos tuvo una respuesta significativa a suero, pero menos fuerte y robusta que en los ensayos de referencia de Wood, 1999 (cambio por inducción máximo de 5.8 y CV de 0.14 respectivamente, Tabla 6).

Los ensayos de bioluminiscencia en células con transfección estable de pCBG99-Ubx4-cfos (Figura 28), tuvieron en general una actividad de bioluminiscencia débil. La RSR en la mayoría de las mediciones fue tan baja que se debieron descartar por su contenido de ruido. El valor máximo de cambio por inducción promedio fue de 1.24 y su CV fue de 0.17, obtenido a las 4 horas post-suero, lo cual corrobora la aparente insensibilidad a suero. Si aceptáramos la señal de las células como confiables, se observaría que las células no respondieron significativamente a la adición de suero.

**Tabla 5: Distribución de los eventos de división celular en los ensayos de dinámica transcripcional en células 3T3 con transfección estable.**

	Células con evento de división temprana	Células con evento de división tardía	Células sin eventos de división observados
Ensayos con pCBG99-cfos (n=12)	0	6 (#1, #7b, #8b, #9a, #9b y #11)	6 (#6, #7a, #8a, #10, #15, #16)
Ensayos con pCBR-cycA2 (n=12)	9 (#3, #4, #5, #6, #12, #13, #20* #25)	10 (#3, #4, #5, #6, #12, #13, #20a, #17, #271, #319)	0
Ensayos con pCBG99-Ubx4-cfos (n=12)	0	4 (#156, #216, #221, #250)	8 (#85, #155, #189, #272, #288, #350, #773, #808)
Ensayos con pCBR-Ubx4-cycA2 (n=12)	0	2 (#65, #50)	4 (#688, #828, #879, #890)

Se presenta el número de células que presentaron eventos de división temprana (anterior a 12 horas post-suero), tardía (posterior a 12 horas post-suero) o que no presentaron eventos de división observables. Entre paréntesis se encuentran las etiquetas correspondientes a cada una de las células del grupo. En negritas se encuentran células que tuvieron dos eventos de división, por lo que tienen eventos de división temprana y tardía. Estos resultados provienen de dos ensayos de bioluminiscencia por plásmido, excepto pCBR-Ubx4-cycA2 que sólo tuvo un ensayo. \*La célula #20 generó dos células hijas, #20a y #20b, las cuales fueron también analizadas en el ensayo correspondiente.

**Tabla 6: Intensidad y robustez en la inducción de la actividad bioluminiscente por adición de suero en los ensayos de dinámica transcripcional que utilizaron al promotor de *c-Fos*.**

Línea celular y plásmido utilizado en el ensayo.	Máximo cambio por inducción promedio.	CV del máximo cambio por inducción promedio.
3T3, pCBG99-cfos (n=12)	3.75	0.29
3T3, pCBG99-Ubx4-cfos (n=12)	1.24	0.17
Ensayo de referencia*: 3T3, pcFos_Luc (n=75)	5.8	0.14

La intensidad de la respuesta a la adición de suero se representó por el valor máximo obtenido del cambio por inducción promedio en la actividad bioluminiscente de las células analizadas en los ensayos correspondientes. Un valor mayor a 3 se consideró significativo. La robustez en la respuesta a la adición de suero se representó por el coeficiente de variación (CV) del máximo cambio por inducción promedio. El número de células analizadas en cada categoría se colocó entre paréntesis. \*Valores calculados a partir de los resultados mostrados en Wood, 1999.

Se llevaron a cabo dos ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 con transfección estable del plásmido pCBR-cycA2, las cuales pasaron por privación de suero 24 horas antes del ensayo. En la figura 29 se muestran imágenes representativas de ambos ensayos y en la figura 30 se presentan los resultados del análisis de las imágenes obtenidas.

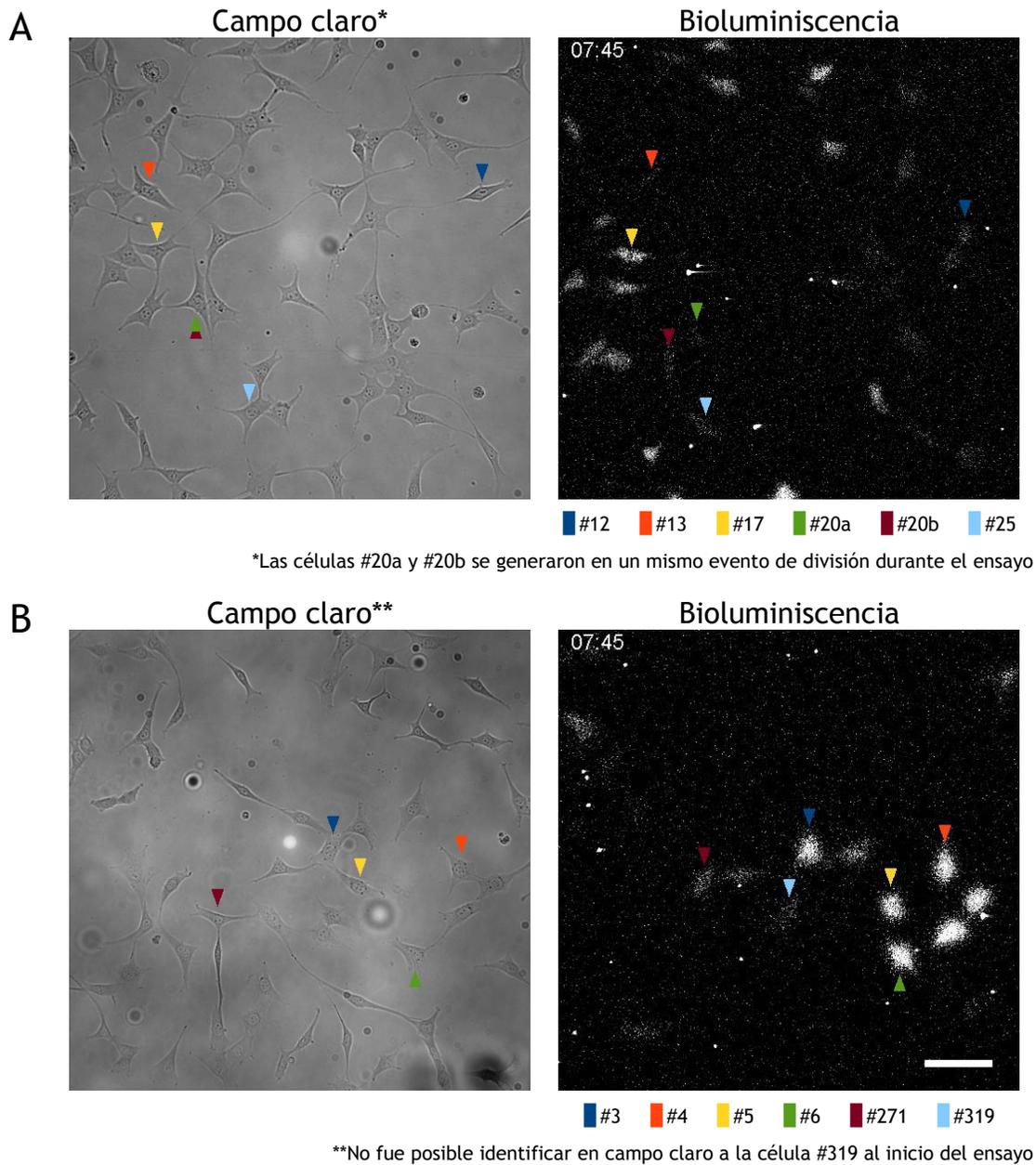


Figura 29. Imágenes representativas de los dos ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea COR2. Se presentan imágenes de campo claro y bioluminiscencia tomadas durante el monitoreo de células individuales en los primer (Panel A) y segundo ensayos (Panel B). Se señalan las células analizadas en las imágenes de campo claro y bioluminiscencia con triángulos de color. Debajo de la imagen de bioluminiscencia se muestra el número de identificación (generado por el programa de análisis) asociado a cada célula. La barra de escala es de 100µm.

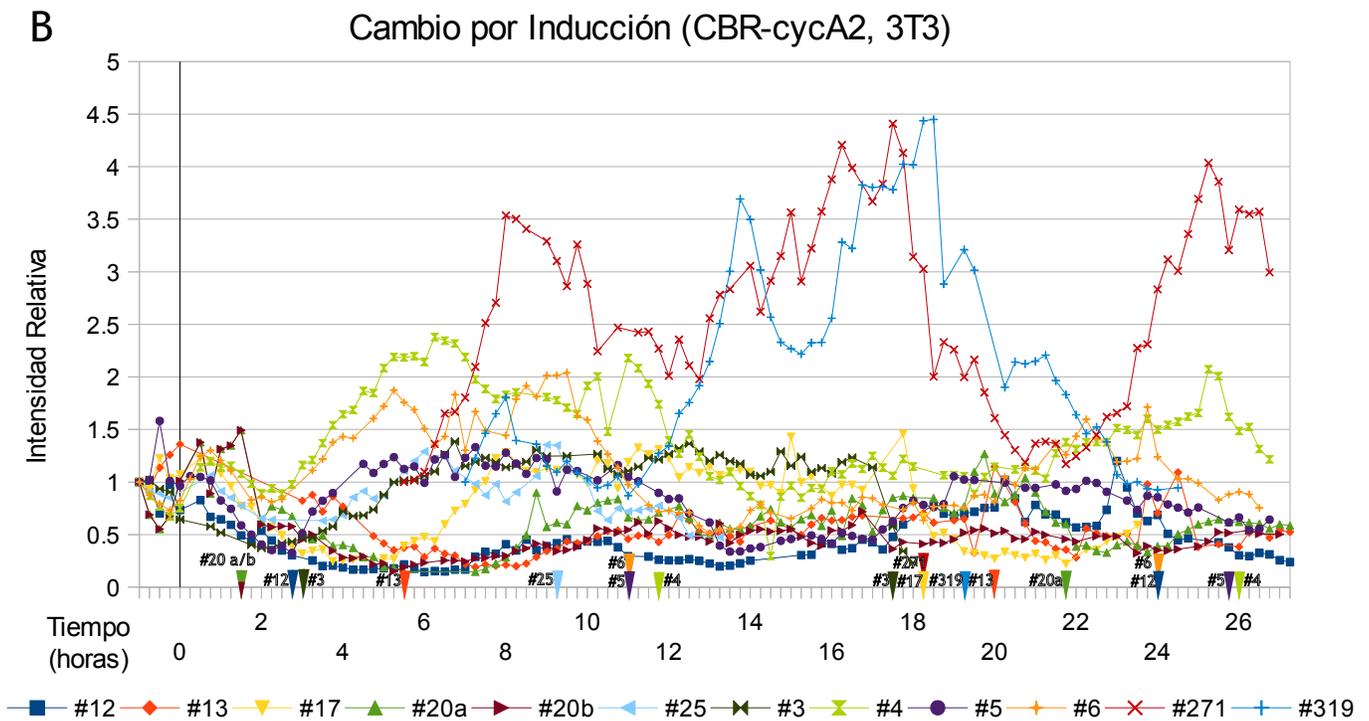
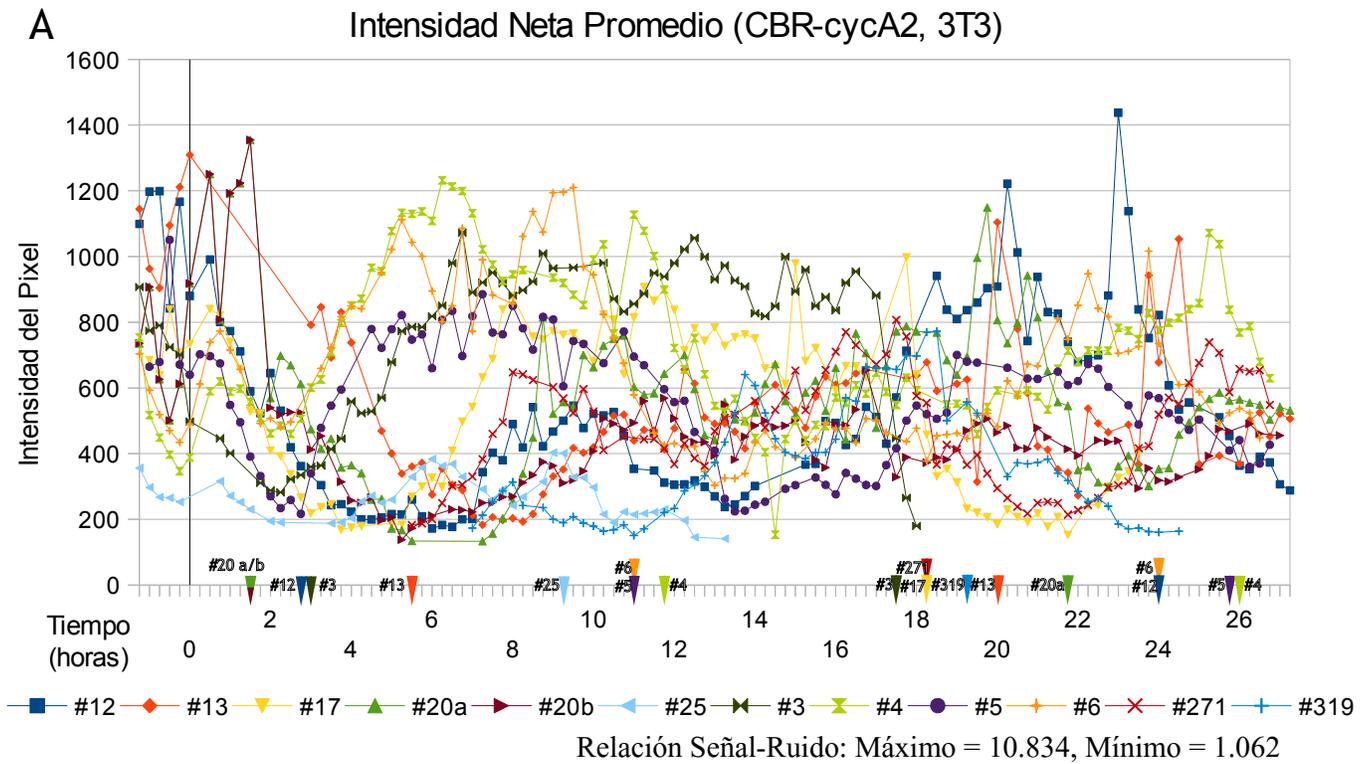


Figura 30. Resultado de los ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea C0R2. Se presentan dos gráficas, que muestran la Intensidad Neta Promedio (Panel A) y el Cambio por Inducción (Panel B) de la señal de bioluminiscencia obtenida de células individuales, con respecto al tiempo. Cada una de las líneas de la gráfica representa la señal obtenida de una célula individual, cuyo número de identificación correspondiente aparece en la leyenda debajo de cada gráfica. La última medición hecha antes de la adición de 200µL de suero al medio de cultivo se colocó bajo el Tiempo = 0 horas. Las células analizadas aparecen señaladas en la Figura 29. En triángulos de color se indican eventos de división. Debajo de la gráfica de Intensidad Neta Promedio se muestran los valores mínimo y máximo de la Relación Señal-Ruido obtenido de las células analizadas.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de bioluminiscencia en células 3T3 con transfección estable del plásmido pCBR-Ubx4-cycA2, en condiciones similares a los ensayos anteriores. En la figura 31 se muestran imágenes representativas del ensayo y en la figura 32 se presentan los resultados del análisis de las imágenes obtenidas.

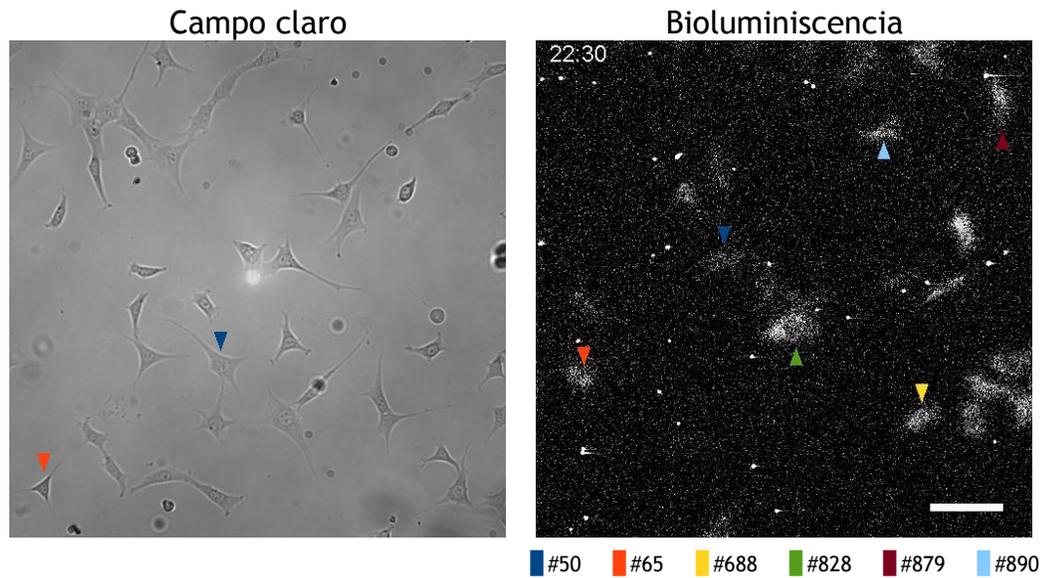


Figura 31. Imágenes representativas del ensayo de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea C4R1. Se presentan imágenes de campo claro y bioluminiscencia tomadas durante el monitoreo de células individuales en el ensayo. Se señalan las células analizadas en las imágenes de campo claro (sólo las identificables) y bioluminiscencia con triángulos de color. Debajo de la imagen de bioluminiscencia se muestra el número de identificación (generado por el programa de análisis) asociado a cada célula. La barra de escala es de 100µm.

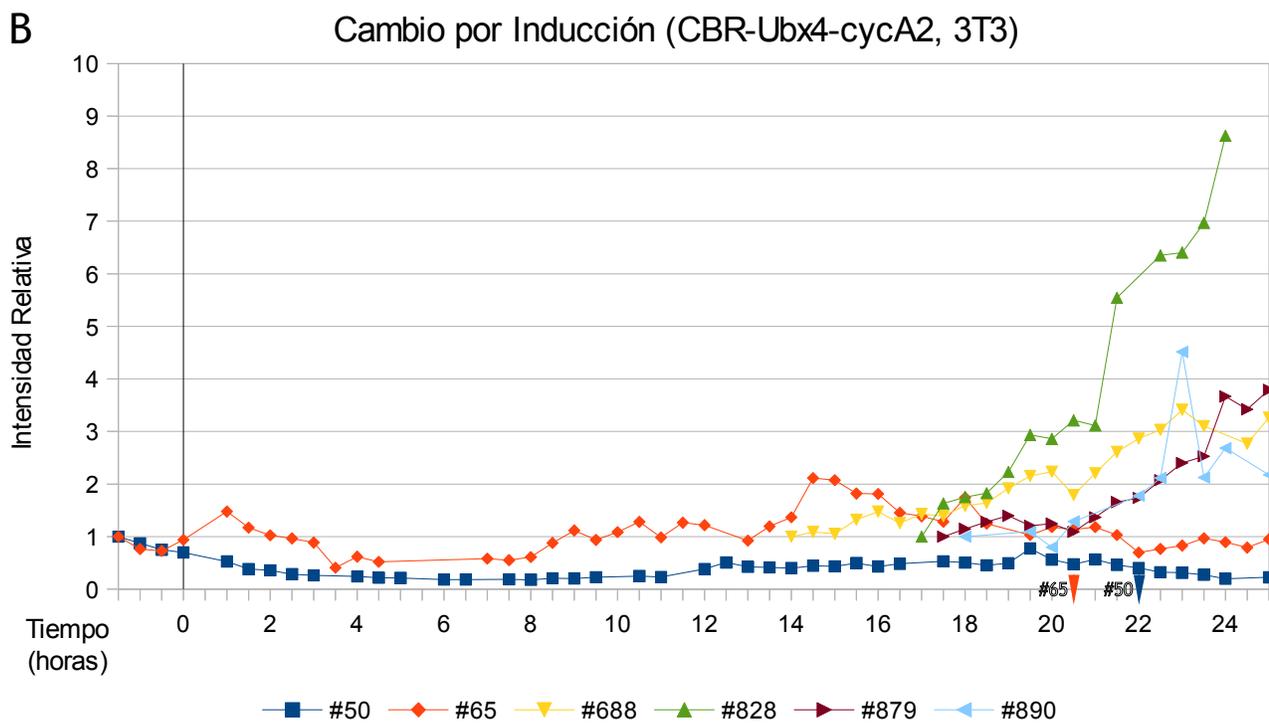
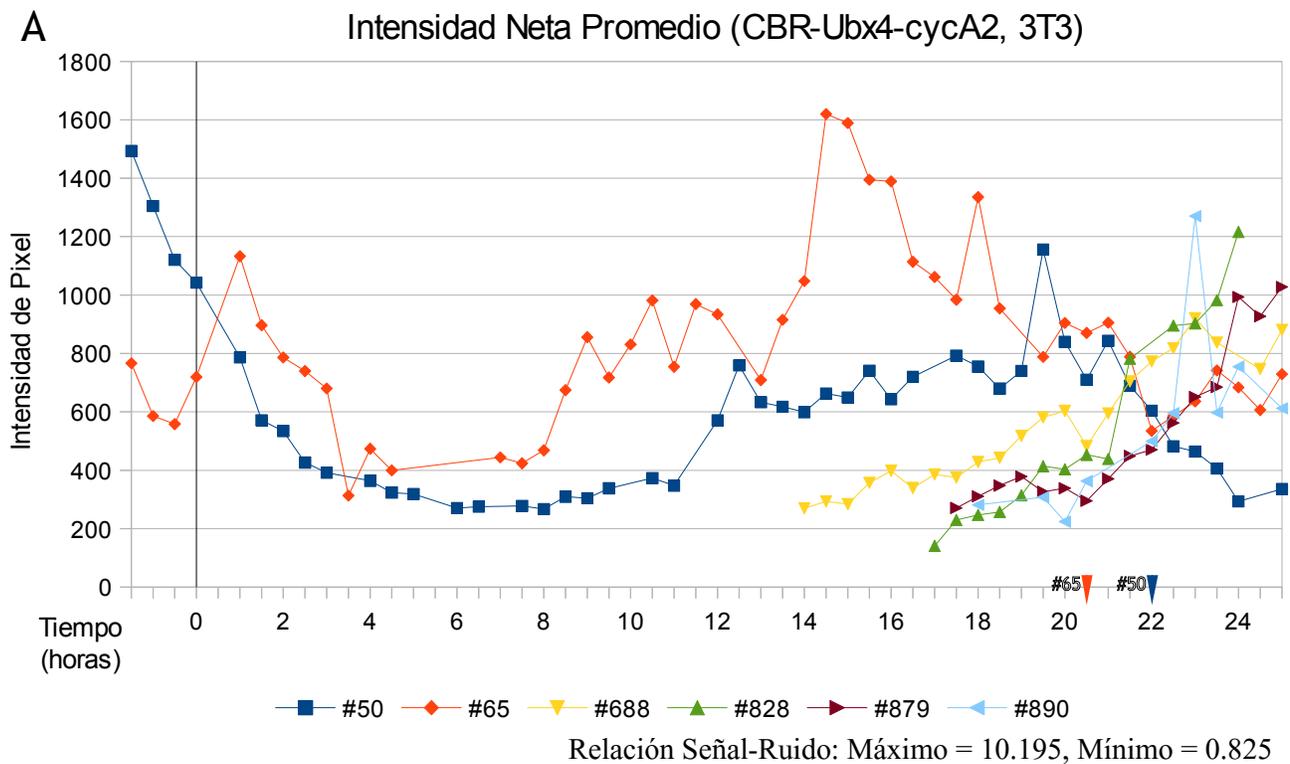


Figura 32. Resultado del ensayo de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea C4R1. Se presentan dos gráficas, que muestran la Intensidad Neta Promedio (Panel A) y el Cambio por Inducción (Panel B) de la señal de bioluminiscencia obtenida de células individuales, con respecto al tiempo. Cada una de las líneas de la gráfica representa la señal obtenida de una célula individual, cuyo número de identificación correspondiente aparece en la leyenda debajo de cada gráfica. La última medición hecha antes de la adición de 200µL de suero al medio de cultivo se colocó bajo el Tiempo = 0 horas. Las células analizadas aparecen señaladas en la Figura 31. En triángulos de color se indican eventos de división. Debajo de la gráfica de Intensidad Neta Promedio se muestran los valores mínimo y máximo de la Relación Señal-Ruido obtenido de las células analizadas.

En los dos ensayos con transfección estable de pCBR-cycA2 también se observaron células sin actividad de bioluminiscencia (Figura 29). La actividad bioluminiscente de las células analizadas no se sincronizada (Figura 30). Se detectaron eventos de división celular tempranos en 8 de las 12 células analizadas y tardíos en 10 de las células (en 7 de ellas, un segundo evento de división) (Tabla 5). Por las observaciones anteriores, se consideró que las células analizadas no estaban sincronizadas en su ciclo celular.

Los resultados de los ensayos con pCBR-cycA2 fueron a simple vista difíciles de discutir más allá de la asincronía y aparente oscilación en la actividad bioluminiscente. Sin embargo, al seleccionar las células analizadas de acuerdo al momento de su división celular, fue posible obtener más información de los resultados. Primero, se seleccionaron aquellas con un solo evento de división celular ocurrido tardíamente, y se denominaron células sincronizadas (Figura 30, células #17, #271 y #319). Las células sincronizadas tuvieron una actividad en respuesta a suero similar a lo observado en los ensayos de referencia: un aumento en la actividad bioluminiscente a partir de las 5 horas post-suero con una caída en la actividad previo a la división celular (Figura 33a). Segundo, se seleccionaron células con dos eventos de división celular observados. En 4 de estas células se observó un aumento tardío en la actividad de bioluminiscencia, la cual decayó antes de la división celular (Figura 33b, células #13, #20a, #5 y #6). Las observaciones anteriores se consideraron evidencia de que la expresión de CBR en estos ensayos podría seguir un comportamiento similar al de la actividad transcripcional de *Ciclina A2*.

En el ensayo en células 3T3 con transfección estable de pCBR-Ubx4-cycA2 la señal bioluminiscente capturada tuvo valores de RSR entre 0.8 y 10. En 2 de las 6 células analizadas se presentó un aumento en la actividad bioluminiscente 8 y 11 horas después de la inducción (Figura 32, células #65 y #50 respectivamente), con una disminución en su actividad antes del evento división celular ocurrido entre las 20 y 22 horas post-suero. Estas células tuvieron una actividad similar a la observada en las células aparentemente sincronizadas en los ensayos de pCBR-cycA. Las 4 células restantes (células #688, #828, #879 y #890) tuvieron actividad perceptible entre las 14 y 18 horas post-suero y no se observó división celular en ellas durante el ensayo.

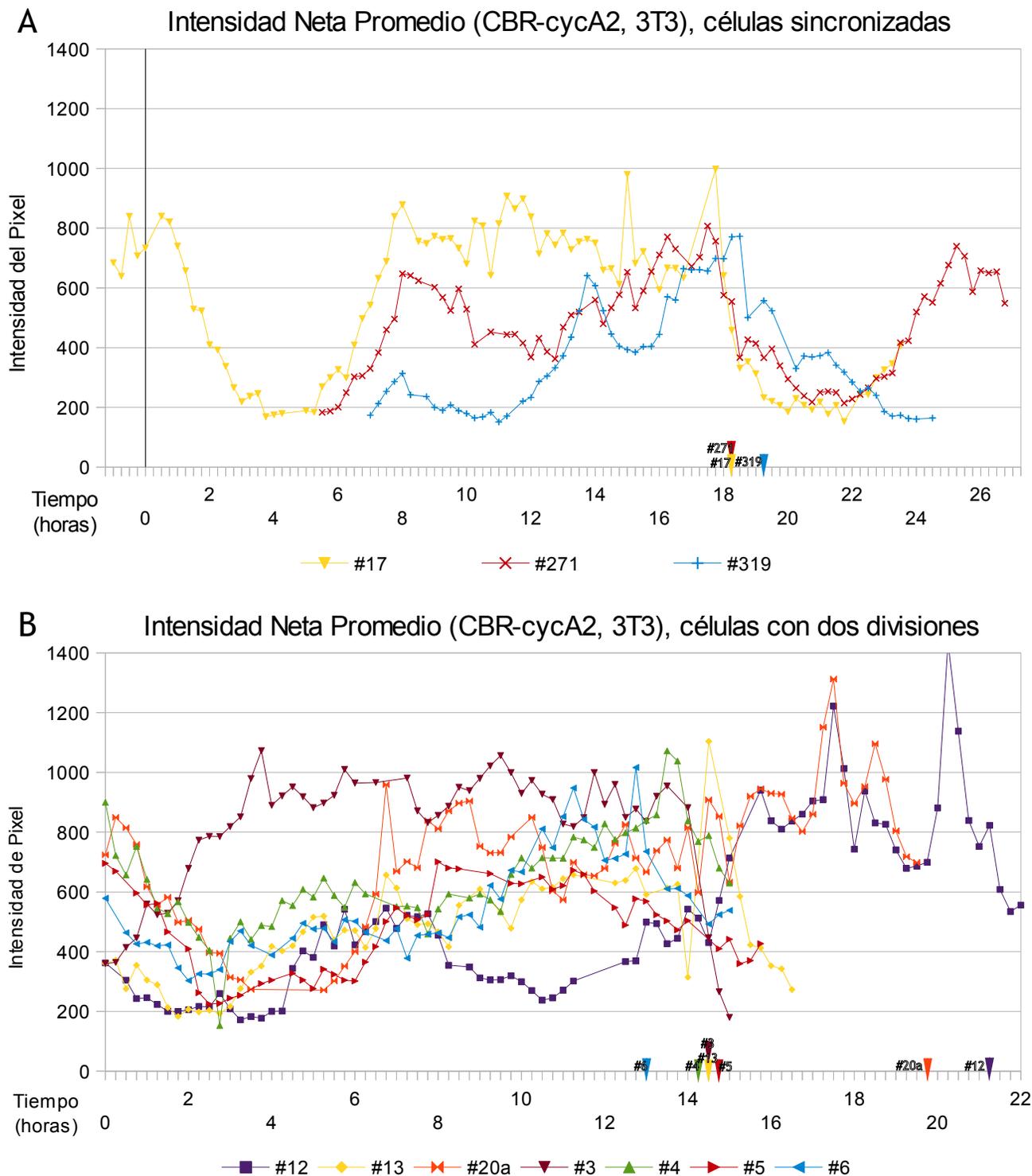


Figura 33. Actividad de bioluminiscencia de células seleccionadas de los resultados de los ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 de la línea C0R2. Se presentan dos gráficas, que muestran la Intensidad Neta Promedio de la señal de bioluminiscencia de células con ciclo celular sincronizado (Panel A) y células que presentaron dos eventos de división (Panel B), con respecto al tiempo. Cada una de las líneas de la gráfica representa la señal obtenida de una célula individual, cuyo número de identificación correspondiente aparece en la leyenda debajo de cada gráfica. La última medición hecha antes de la adición de 200 $\mu$ L de suero al medio de cultivo se colocó bajo el Tiempo = 0 horas. Las células analizadas aparecen señaladas en la Figura 29. En triángulos de color se indican eventos de división. Debajo de la gráfica de Intensidad Neta Promedio se muestran los valores mínimo y máximo de la Relación Señal-Ruido obtenido de las células analizadas.

## 7. Discusión de los resultados

**Se debe de integrar el potenciador de SV40 a los plásmidos de pTK-CBG99 y pTK-CBR para el ensayo de vida media.**

Se construyeron cuatro plásmidos destinados a utilizarse en ensayos de vida media. Cada plásmido contienen a uno de los genes de las luciferasas a analizar, CBG99, CBR, ELuc y Luc2, regulado bajo el promotor de TK. Este promotor se seleccionó por ofrecer una expresión constitutiva del gen al que se encuentre asociado y por su demanda relativamente baja de factores de transcripción (contiene 4 sitios de unión identificados) [Jones et al, 1985]. Sin embargo, se integró accidentalmente un elemento de regulación extra en dos de los plásmidos. Los cuatro plásmidos del ensayo de vida media contienen al promotor de TK integrada, pero pTK-ELuc y pTK-Luc2 contienen además al potenciador de SV40 [Herr, 1993], río abajo de la secuencia de poliadenilación (Figura 18). Por lo anterior no fue posible hacer una comparación superficial de la intensidad de señal que ofrece cada luciferasa. Es probable que la presencia del potenciador en estos plásmidos influyera en la intensidad de la señal de bioluminiscencia obtenida con pTK-ELuc y pTK-Luc2 con respecto a pTK-CBG99 y pTK-CBR (Figura 19).

Por otro lado, la señal obtenida con pTK-CBR fue la más débil del grupo, se requirió de un tiempo de exposición elevado (20 minutos) para obtener una señal aceptable (Tabla 4). El promotor de TK no fue el principal responsable de la señal débil, pues CBG99 utilizó el mismo sistema de regulación transcripcional que CBR y tuvo una actividad bioluminiscente aceptable. La diferencia entre la señal de CBR y CBG99 no fue producto de un sesgo en la cuantificación de fotones. La eficiencia espectral (el porcentaje de fotones cuantificados por el dispositivo con respecto a los emitidos por la muestra) de la cámara-CCD utilizada es similar para la mayoría de los fotones emitidos por estas luciferasas (500-650 nm, <http://www.andor.com/scientific-cameras/ixon-emccd-camera-series/ixon3-897>). Es posible que la actividad bioluminiscente de CBR sea responsable de la señal débil obtenida en los ensayos referidos. Existen estudios que sugieren que las luciferasas de insecto con emisión de fotones restringida a longitudes de onda en el rango del color rojo tienen una actividad bioluminiscente menor que el resto de las luciferasas [Branchini et al, 2005] [Niwa et al, 2010]. Aunque CBR no aparece en estos estudios, es posible que esta luciferasa comparta propiedades enzimáticas con las luciferasas con emisión en el rango del color rojo que aparecen en los estudios. La señal débil obtenida con pTK-CBR podría dificultar la detección de su luciferasa durante los ensayos de vida media, por lo que será necesario aumentar la intensidad de la señal.

La integración del potenciador de SV40 a pTK-CBG99 y pTK-CBR podría ser una alternativa para aumentar la señal de bioluminiscencia obtenida con estos plásmidos. La adición del potenciador podría causar un aumento en la variabilidad de la expresión de los genes de luciferasa, similar a lo observado en promotores fuertes [Banik et al, 1996] [Brightwell et al, 1997] [Qin et al, 2010]. Sin

embargo, aumentar el número de repeticiones del ensayo ayudaría a aumentar la confianza en los resultados a pesar de la variabilidad. La señal de bioluminiscencia débil es una limitante técnica más complicada de resolver sin modificar el contenido de los plásmidos utilizados. Si se transfecta una mayor cantidad de plásmido, esto podría resultar tóxico para el cultivo celular debido al agente de transfección utilizado. Aumentar el tiempo de exposición para la captura de la señal disminuiría la resolución temporal del ensayo. Por otro lado, la integración del potenciador de SV40 podría provocar el acaparamiento de factores de transcripción generales y la represión de genes episomales. Sin embargo, la demanda de factores de transcripción por parte del potenciador de SV40 y del promotor de TK no debe de ser tan fuerte como la del promotor de CMV, donde se ha observado este fenómeno [Reddy et al, 1995]. Por lo tanto, se recomienda la integración del potenciador de SV40 a los plásmidos TK que aún no lo contienen, o bien, el uso de promotores más fuertes.

Quedó en las perspectivas el ensayo de vida media, que será en tiempo real, con cultivos celulares en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la traducción. Las luciferasas Luc2 y ELuc servirán como controles positivos, pues su tiempo de vida media es conocida (~2 horas y >8 horas respectivamente) [Ignowski y Schaffer, 2004] [Nakajima et al, 2010].

**Las líneas celulares derivadas de células 3T3 con transfección estable de pCBG99-cfos y pCBR-cycA2 mostraron deficiencias en la eficiencia de sincronización y de reinicio del ciclo celular. Faltó evaluar estos parámetros en las células 3T3 precursoras de las líneas y en las líneas celulares generadas.**

La proliferación de las células 3T3 se inhibe en ausencia de factores de crecimiento o de supervivencia [Todaro y Green, 1963] [Zetterberg y Larsson, 1985]; mediante la sincronización por privación de estos factores se han estudiado algunos genes del ciclo celular en esta línea celular [Runkel et al, 1991] [Henglein et al, 1994]. Estas células se utilizaron en ensayos de referencia, donde se consiguió una eficiencia de sincronización del ciclo celular mayor al 90% bajo condiciones de ausencia de suero durante 24 horas [Wood, 1999]. Fue por lo anterior que se decidió utilizar a esta línea en los ensayos de bioluminiscencia para dinámica transcripcional. Además, se decidió utilizar transfecciones estables de células 3T3 para eliminar el efecto de la variación en la cantidad de plásmido transfectado por célula en la variación en la señal bioluminiscente.

En los ensayos en células 3T3 con transfección estable de pCBG99-cfos se observó un aumento significativo y homogéneo en la actividad bioluminiscente en respuesta a la adición de suero en las células analizadas. Sólo la mitad de las células analizadas (6 de 12) tuvieron un evento de división celular observable, ocurrido al menos 19 horas después de la adición de suero. Lo anterior podría ser reflejo de una eficiencia de sincronización aceptable, pero la presencia de células que no alcanzaron a dividirse podría indicar problemas para reiniciar el ciclo celular en algunas de las células. Los valores

de cambio por inducción promedio y CV fueron menores al de los ensayos de referencia (Tabla 6). Esta diferencia podría ser consecuencia de que las células utilizadas provienen de más de una colonia, lo que podría aumentar su variabilidad en la actividad bioluminiscente. Otra posibilidad es que el método de transfección utilizado en los ensayos de referencia, por microinyección en células privadas de suero 24 horas, influya en la diferencia en los resultados con respecto a los de este proyecto.

En los ensayos en células 3T3 con transfección estable de pCBR-cycA2 no se observó un cambio en la actividad bioluminiscente tras la adición de suero. Se observaron aumentos y descensos en la intensidad de la actividad, los cuales no fueron sincronizados entre células ni guardaron una relación causa-efecto con la adición de suero. Este comportamiento pudo ser consecuencia de la baja eficiencia de sincronización, la cual se corroboró en base a que todas las células analizadas tuvieron eventos de división celular a lo largo del ensayo. No fue posible hacer inferencias sobre la actividad reportera de la luciferasa CBR bajo estas condiciones, por lo que es necesario aumentar la eficiencia de transfección para estos ensayos. Por otro lado, estas células no vieron perturbada su capacidad de proliferación, a diferencia de las células con transfección estable de pCBG99-cfos.

Se consideraron varios factores que pudieron influir en la baja eficiencia de sincronización de las células transfectadas con pCBR-cycA2 y la ausencia de eventos de división en células con pCBG99-cfos. Primero, la línea de células 3T3 utilizada podría tener una eficiencia de sincronización menor a lo esperado debido a condiciones de cultivo previas. Estas células pueden transformarse espontáneamente después de varios pases en cultivo, y ser seleccionadas positivamente en condiciones de ausencia de suero y confluencia [Rubin y Xu, 1989]. De tener células transformadas en el cultivo inicial de 3T3s, es posible que estas células se seleccionaran durante el establecimiento de células con transfección estable. Para confirmar si estas células sincronizan eficientemente su ciclo celular en ausencia de suero, es necesario medir su eficiencia de sincronización. Para este fin, se podría revisar el porcentaje de células en fase  $G_1$ , S ó  $G_2$  del ciclo celular en un cultivo celular bajo condiciones de sincronización y reinicio del ciclo celular. Se utilizaría un marcaje fluorescente de ADN mediante DAPI o Hoechst 3334 y la medición se llevaría a cabo en un ensayo de citometría de flujo. Las células marcadas entrarían en una de 3 categorías: con un marcaje fluorescente de intensidad “X” para células en fase  $G_1$ , con un marcaje de intensidad “2X” para células en fase  $G_2$ , y un marcaje con intensidades entre “X” y “2X” para células en fase S. En caso de que las células 3T3 utilizadas tuvieran una baja eficiencia de sincronización, se podrían conseguir cultivos más tempranos de la misma línea. Como alternativa, se podrían utilizar células de cultivos primarios, los cuales suelen tener una elevada sensibilidad a factores de crecimiento y supervivencia. La desventaja de utilizar cultivos primarios radica en su baja eficiencia de transfección, aunque se podrían buscar métodos que permitan una transfección aceptable en estos cultivos, ya sea por electroporación, lipofección, microinyección u otros.

Segundo, los resultados observados podrían ser causados por diferencias en la respuesta a suero

por parte de las células seleccionadas tras la transfección estable. Se recomienda seleccionar otras colonias celulares para los ensayos de bioluminiscencia. A las nuevas colonias se les deberá evaluar su eficiencia de sincronización, usando la misma estrategia mencionada en líneas celulares precursoras.

Tercero, los promotores de *Ciclina A2* y *c-Fos* de los plásmidos podrían interferir en el control del ciclo celular. Bajo esta situación, todas las colonias con transfección estable obtenidas tendrían los mismos problemas de sensibilidad al suero, por lo que no solucionaría el problema. Como alternativa a la construcción de nuevas líneas celulares, se podría cambiar de método de sincronización del ciclo celular. Se podría utilizar la “sacudida mitótica” para seleccionar las células en mitosis para su subcultivo, aprovechando que se circularizan y pueden desprenderse con facilidad de la caja de cultivo. También se podrían utilizar tratamientos con fármacos que detienen el ciclo celular en distintas etapas del ciclo celular: nocodazol (deestabilizador de microtúbulos, arresta en fase M), lovastatina (inhibidor de HMG-CoA reductasa, arresta en fase G<sub>1</sub> temprana), afidicolina (inhibidor de polimerasas de ADN eucariote, arresta en fase G<sub>1</sub>/S) ó mimosina (con función desconocida, arresta en fase G<sub>1</sub> ó G<sub>1</sub>/S) [Jackman y O'Connor, 2001]. Estos métodos de sincronización tendrían que evaluarse por citometría de flujo para seleccionar al más eficiente.

Una vez que se solucione el problema de la eficiencia de sincronización y la respuesta a suero, se podrán llevar a cabo repeticiones de los ensayos de dinámica transcripcional, con el fin de aumentar la confianza en los resultados y evaluar adecuadamente la actividad de CBG99 y CBR.

### **El tipo de transfección y el criterio de selección de colonias por señal bioluminiscente pudieron influir en la expresión de luciferasa en las líneas celulares con transfección estable.**

Los plásmidos utilizados para introducir al gen de luciferasa CBG99 y CBR carecen de un gen de resistencia que permitiera la selección de colonias con transfección estable. Debido a lo anterior, estos plásmidos se co-transfectaron con un plásmido que contenía al gen de resistencia a geneticina en el establecimiento de líneas celulares. Se obtuvieron colonias con actividad bioluminiscente mantenida bajo tratamiento de geneticina, pero también se observaron células sin actividad bioluminiscente aparente. También se observaron células sin actividad bioluminiscente en las líneas con transfección estable de pCBG99-cfos, pCBR-cycA2 y pCBR-Ubx4-cycA2 (Figuras 25, 29 y no presentado), estas líneas se seleccionaron por microscopía de bioluminiscencia en cajas de 35mm. Las células sin actividad aparente podrían no contener al plásmido del luciferasa, o bien el gen de luciferasa podría estar integrado pero silenciado. No se observó una disminución aparente en la proporción de células con actividad bioluminiscente durante 3 meses de cultivo, por lo que se consideró que las células sin actividad bioluminiscente provendrían de otras colonias. Para la selección de colonias futuras, se recomienda cultivar colonias en cajas de 96 pozos (una célula fundadora por pozo) y llevar a cabo la identificación de colonias con actividad bioluminiscente por medio del lector de placas. Bajo esta

estrategia, el riesgo de contaminación sería mínimo y fácil de identificar mediante la observación por microscopía de las colonias en cada pozo. Queda destacar que las líneas con transfección estable de pCBG99-Ubx4-cfos también tuvieron células sin actividad bioluminiscente aparente (Figura 24), pero se consideró que era consecuencia de la señal débil del reportero. De utilizar reporteros con señal fuerte en los ensayos de selección por cajas de 96 pozos se podrá corroborar si el método de co-transfección está influyendo pérdida de actividad bioluminiscente en las líneas generadas.

Con respecto al criterio de selección, se eligieron colonias que tuvieran una elevada actividad bioluminiscente. Se aseguró que las células seleccionadas tuvieran una señal fuerte, lo cual es una característica deseada para los ensayos de bioluminiscencia. Sin embargo, no se tomó en cuenta el papel de elementos regulatorios cercanos al sitio de inserción del gen de luciferasa en la actividad bioluminiscente observada. La presencia de potenciadores o promotores fuertes cerca del gen de luciferasa integrado podría aumentar su expresión, pero reduciría su respuesta a la adición de suero [Hampf y Gossen, 2007]. El uso de criterios de selección más prácticos podrían reducir el riesgo de elegir colonias con una regulación alterada en la expresión de luciferasa. Se podrían seleccionar colonias cuya intensidad de señal fuera cercana al promedio, donde el gen reportero podría encontrarse libre de elementos de regulación externos al plásmido que influyeran considerablemente en su expresión. Bajo este criterio, se descartarían colonias en donde el gen reportero se sobreexpresara (mostrando una actividad bioluminiscente elevada) o se encontrara en proceso de silenciamiento transcripcional (con una baja actividad bioluminiscente). También se podrían seleccionar las colonias con mayor respuesta a la adición de suero en ensayos de sincronización y reinicio del ciclo celular. Para este fin se tendría que armar un ensayo de dinámica transcripcional para colonias, el cual se tendría que llevar a cabo después de evaluar la eficiencia de sincronización de estas colonias. En cualquiera de los casos, también se recomienda utilizar cajas de 96 pozos para el cultivo de colonias individuales. El ensayo de bioluminiscencia con el lector de placas permite comparar simultáneamente un número elevado de colonias, mientras que el ensayo de microscopía en cajas de 35mm está limitado por el área de la caja y la necesidad de utilizar concentraciones bajas de células para evitar el contacto entre colonias.

**La actividad de la luciferasa CBR bajo la regulación del promotor de *Ciclina A2* en células 3T3 podría reflejar la actividad transcripcional del gen correspondiente. Para corroborar esta observación se deben optimizar las condiciones de sincronización.**

En los ensayos de dinámica transcripcional en células 3T3 transfectadas con pCBR-cycA2 se observó que la actividad bioluminiscente de las células analizadas no respondió a la adición de suero. En cambio, se observaron oscilaciones en la intensidad de actividad de las células, las cuales sucedieron aparentemente de forma aleatoria (Figura 30). Se encontró evidencia de una baja eficiencia de sincronización en estos ensayos, lo cual pudo tener un papel en la actividad bioluminiscente

observada. La baja eficiencia de sincronización también impidió utilizar al momento de la adición de suero al cultivo como referencia del paso por el punto de restricción de  $G_1$  del ciclo celular. No fue posible establecer una relación entre las oscilaciones en la actividad bioluminiscente de las células y su paso por el ciclo celular.

Se decidió entonces utilizar a la división celular como referencia del paso por la mitosis, con el fin de inferir la etapa del ciclo celular en la cual se observaron los cambios en la actividad bioluminiscente. Se escogieron células que en los ensayos presentaron un sólo evento de división celular tardío (>16 horas después de la adición de suero), al ser la progresión de su ciclo celular similar a lo esperado en células sincronizadas (Figura 33a). También se escogieron células que presentaron dos eventos de división celular en los ensayos, pues se esperó que todas las etapas del ciclo celular se presentaran entre los dos eventos (Figura 33b). En las 3 células con evento de división tardía y en 4 de las células con dos eventos de división (un total de 7 de 12 células analizadas), se observó con un aumento en su actividad 6 horas después de la adición de suero o 0 de la primer división celular, y una caída antes de la división celular tardía. Este comportamiento fue semejante a lo observado en los ensayos de referencia (Figura 9) y al modelo de expresión de *Ciclina A2* en el ciclo celular [Alberts et al, 2014]. En el modelo, el aumento en la expresión del gen sucede durante el paso de  $G_1$  a S, y su caída sucede durante el paso por  $G_2$ .

Para corroborar que la actividad bioluminiscente de las células con transfección estable de pCBR-cycA2 corresponde a la expresión de *Ciclina A2* en las células 3T3, primero se tendrá que resolver el problema de la baja eficiencia de sincronización. De no hacerlo no se observará un cambio significativo en la concentración de transcritos. Una vez corregido este problema, se podría cuantificar la concentración de transcritos de *Ciclina A2* y de la luciferasa CBR a lo largo del reinicio del ciclo celular. Como método de cuantificación se podrían utilizar ensayos de RT-PCR o de Northern Blots. Los cultivos a evaluar pasarían previamente por un periodo de sincronización por ausencia de suero, y se obtendrían muestras de cultivos sincronizados y cultivos tras distintos tiempos de inducción del ciclo celular. Si el cambio en la concentración de ambos transcritos ocurriera en tiempos similares, se consideraría que el gen de CBR tiene el mismo sistema de regulación que *Ciclina A2*.

**La actividad de la luciferasa CBG99 bajo la regulación del promotor de *c-Fos* en células 3T3 podría reflejar la actividad transcripcional del gen correspondiente, aunque no se observó el regreso a un nivel basal tras el aumento en su actividad inducido por suero.**

La actividad bioluminiscente observada en los ensayos en células 3T3 con expresión de pCBG99-cfos aumentó en respuesta a la adición de suero, siendo el aumento significativo en 9 de 12 células analizadas. Debido a que todas las células analizadas respondieron de forma sincronizada se logró calcular el cambio por inducción promedio y CV de las células analizadas en su pico de

actividad, obteniéndose resultados satisfactorios. Sin embargo, este aumento se mantuvo a lo largo del ensayo en lugar de regresar a valores basales, contrario a lo que se esperaba para el promotor de *c-Fos*. La permanencia de la actividad bioluminiscente inducida por suero podrían ser producto de varios factores: la estabilidad de la proteína de luciferasa CBG99 y su transcrito, los elementos de regulación en el promotor de *c-Fos* que reguló a CBG99, o la disponibilidad de los factores de transcripción en la célula.

La vida media de las moléculas de la luciferasa CBG99 influye en la tasa de decaimiento de la actividad bioluminiscente de este reportero tras la represión de su síntesis. Si su vida media fuera demasiado elevada, esto podría explicar por qué en los ensayos efectuados no se observó que la bioluminiscencia regresara a un nivel basal. La determinación de la vida media de esta luciferasa mostrará que tanto influyó esta en los resultados de los ensayos referidos. De ser su estabilidad demasiado elevada, esta podría reducirse mediante la adición de elementos de degradación o de ubiquitinas no hidrolizables [Li et al, 1998] [Masamizu et al, 2006]. Por otro lado, la estabilidad del mismo depende en parte de su secuencia de poliadenilación y la secuencia utilizada para esta luciferasa (obtenida de SV40) ofrece una vida media de ~3.4 horas [Fink et al, 2006]. Entonces, la estabilidad del transcrito también pudo influir en los resultados. Para reducir la estabilidad del transcrito se podrían utilizar secuencias de desestabilización, como las presentes en el transcrito de *c-Fos*, cuya función es promover la deadenilación del mismo [Shuy et al, 1991].

También se consideró la posibilidad de que elementos de regulación transcripcional dentro de la secuencia utilizada del promotor de *c-Fos* fueran responsables del comportamiento observado. Los resultados de su secuenciación indicaron que los elementos de unión a factores de transcripción involucrados en la respuesta a suero no sufrieron modificación alguna, excepto por el sitio de unión a DRE (Figura 14), el cual resultó ser una variante alélica. Se consideró la posibilidad de que la secuencia utilizada tuviera otros elementos de regulación que influyeran en la actividad bioluminiscente. La secuencia del promotor de *c-Fos* humano utilizada en los ensayos de referencia correspondía a la región entre -405 y +42 pb del sitio de inicio de la transcripción. En estos ensayos, la actividad bioluminiscente empezó a decaer a partir de las 6 horas después de la adición de suero [Wood, 1999]. En cambio, la secuencia del promotor de *c-Fos* en pCBG99-cfos correspondió a la región entre -705 y +44 pb. En la región entre -705 y -405 pb del promotor de *c-Fos* se encuentran dos sitios de unión a factores de transcripción identificados, uno para HSF1/2 (Factor de transcripción de choque térmico 1 y 2) y uno para SPZ1 (Proteína de cremallera de leucina espermatogénica 1). El primero está involucrado en la represión transcripcional bajo condiciones de choque térmico [Xie et al, 2003] y en la actividad basal de *c-fos* [Wilkerson et al, 2007]. De acuerdo a los resultados de secuenciación, el sitio de unión a HSF1/2 no tuvo modificación alguna. Tampoco el sitio de unión a SPZ1 presentó modificaciones, aunque se descarta que influyera en los resultados debido a que este factor de transcripción sólo se expresa en testículo [Hsu et al, 2001]. El sitio de unión a HSF1/2 o algún elemento de regulación no caracterizado podría estar influyendo en la permanencia de la actividad

bioluminiscente observada en los ensayos con pCBG99-cfos. Para identificar si la regulación transcripcional de CBG99 en el plásmido es diferente a la del gen de *c-Fos*, se podría cuantificar la actividad transcripcional de ambos genes en células 3T3 con transfección estable del plásmido de interés. Las condiciones del ensayo serían similares a las propuestas para la evaluación de la actividad reportera de pCBR-cycA2 (cuantificación de transcritos por Northern Blot o RT-PCRs, en muestras de cultivos sincronizados y cultivos con reinicio del ciclo celular). Si se observara una caída temprana en la concentración del transcrito de *c-Fos* pero no en la del transcrito de la luciferasa tras la inducción del ciclo celular por suero, se corroboraría el papel de la secuencia de promotor en los resultados. En cambio, si esta caída ocurriera simultáneamente en ambos transcritos, se consideraría que ambos genes se regulan bajo los mismos elementos.

Por último, la integración de copias del promotor de *c-Fos* pudo influir en la respuesta transcripcional a la adición de suero debido al cambio en la disponibilidad de factores de transcripción. El factor transcripcional AP-1 es el principal represor de la transcripción de *c-Fos*, el cual es un dímero formado por las proteínas de las familias de cFos y cJun [Schönthal et al, 1989] [König et al, 1989]. La introducción de varias copias del promotor de *c-Fos* podría reducir la disponibilidad de AP-1 debido al aumento en la demanda de este factor. Este fenómeno se consideró en los ensayos de referencia, donde la expresión de luciferasa bajo el promotor de *c-Fos* se mantuvo elevada hasta 6 horas post-suero, cuando la actividad transcripcional del gen correspondiente no permanece más allá de dos horas tras la inducción por suero [Wood, 1999]. Es posible que este acaparamiento sea dependiente del número de copias del plásmido transfectado, lo cual se ha observado en transfecciones transitorias [Lee et al, 2000]. Para conocer que tanto influye la integración del plásmido pCBG99-cfos en la línea celular con transfección estable utilizada, se podría cuantificar la concentración de los transcritos de *c-Fos* y de *CBG99* en cultivos de células 3T3 con transfección estable de pCBG99-cfos y sin transfectar, bajo condiciones de sincronización y reinicio del ciclo celular por suero. Si se observara una diferencia significativa en el cambio de la concentración del transcrito a distintos tiempos del reinicio del ciclo celular, se corroboraría el efecto de la integración del plásmido en la regulación del gen reportero y del gen de *c-Fos*.

**La señal proveniente de las luciferasas poliubiquitinadas fue demasiado débil. Es necesario aumentar la sensibilidad del ensayo para poder hacer uso de estos reporteros.**

Se compararon los resultados de los ensayos de bioluminiscencia en células 3T3 con los plásmidos CBG99-Ubx4-cfos y CBR-Ubx4-cycA2 (Figuras 28 y 32), con los de sus contrapartes no ubiquitinadas (Figuras 26 y 30, respectivamente). En el caso de CBG99-Ubx4-cfos, la relación señal-ruido en la mayoría de las mediciones no fue aceptable. Dado que la línea celular utilizada tuvo la actividad bioluminiscente más alta en la selección de colonias, se podría considerar que ninguna de las colonias generadas con CBG99 desestabilizada podría utilizarse para los ensayos de bioluminiscencia.

En el ensayo con la CBR-Ubx4-cycA2, la señal obtenida tuvo valores de Relación Señal-Ruido relativamente aceptables, pero solo durante el aumento en la actividad transcripcional. No se llevaron a cabo repeticiones de estos ensayos debido a la baja eficiencia de sincronización en los ensayos con CBR nativa, pues se consideró que las células con expresión de CBR-Ubx4 tendrían el mismo problema.

La principal desventaja de los ensayos mencionados fue la necesidad de utilizar tiempos de exposición largos para captura de señal, lo cual ocasionó un aumento en la presencia de artefactos en las imágenes de bioluminiscencia. Estos artefactos fueron producto del paso de rayos cósmicos, los cuales atraviesan al sensor de la cámara de forma azarosa. Extender el tiempo de exposición para la captura de señal en los ensayos, aumentaría el número de artefactos luminosos en la imagen. Existen diferentes estrategias que podrían aumentar la señal bioluminiscente de estos reporteros, las cuales podrían combinarse. Primero, es posible aumentar la sensibilidad de la cámara-CCD a señales débiles mediante el binning (combinación de señal) de pixeles. Este método consiste en la medición conjunta de grupos de pixeles adyacentes en la cámara, acomodados en cuadros de  $n \times n$  pixeles. El uso de binning reduce la contribución de ruido de fondo en la señal del pixel, pero la imagen generada pierde resolución espacial debido a la combinación de pixeles.

La segunda opción sería reducir el número de ubiquitinas en el concatenado. Cada ubiquitina G76V del concatenado tiene un efecto acumulativo en la desestabilización del reportero al que se fusiona [Stack et al, 2000] [Masamizu et al, 2006], pero el mayor efecto se observó con la primera ubiquitina añadida. Por ejemplo, la vida media de la luciferasa de *P. pyralis* pasó de ser de ~2 horas a ser de 15 y 10 minutos, tras la fusión de una y dos ubiquitinas G76V en su extremo amino respectivamente [Masamizu et al, 2006]. Sería recomendable comparar entre luciferasas con diferente número de ubiquitinas para elegir a aquella que mantuviera una alta sensibilidad temporal sin perder considerablemente la intensidad de su señal. El ensayo de vida media de estos reporteros utilizando promotores fuertes e idénticos para cada gen sería informativo para este propósito.

La tercer opción sería utilizar vectores multicistronicos, los cuales permitirían la expresión de varias copias de un gen reportero con ayuda de un mismo promotor. Estos vectores utilizan una secuencia de 18 a 22 aminoácidos proveniente de picornavirus llamada 2A [Szymczak et al, 2004] [Szymczak-Workman et al, 2012]. En estos vectores, la secuencia codificante de cada gen a expresar se coloca de manera concatenada, pero entre la secuencia de cada gen se coloca la secuencia de 2A. El multicistron se transcribe como un solo ARN, pero en la traducción se generan proteínas separadas de cada gen. Cada vez que el ribosoma pasa por la secuencia del péptido cortante, el ribosoma suelta al polipéptido producido y continúa con la síntesis de un nuevo polipéptido, que corresponde a un gen diferente. Se pueden construir multicistrones de hasta 5 genes, expresados a tasas de síntesis casi estequiométricas [Szymczak-Workman et al, 2012]. Esta alternativa podría utilizarse para aumentar la señal bioluminiscente no solo de luciferasas desestabilizadas, sino de cualquier reportero de interés.

Una desventaja de utilizar estos vectores sería el riesgo de perder las copias del reportero por eventos de recombinación. Este efecto se podría evitar mediante la generación de sustituciones no sinónimas en cada copia del reportero para disminuir la posibilidad de recombinación.

**El criterio de selección de colonias por señal bioluminiscente elevada no se consideró adecuado, ya que no se tomó en cuenta el efecto de elementos regulatorios externos en la expresión de las luciferasas.**

Todas las líneas celulares con transfección estable se generaron a partir de colonias seleccionadas por su elevada actividad bioluminiscente. Con este criterio se aseguró de las células seleccionadas tuvieran una señal fuerte, lo cual es una característica deseada para los ensayos de bioluminiscencia. Sin embargo, no se tomó en cuenta el papel de elementos regulatorios cercanos al sitio de inserción del gen de luciferasa en la actividad bioluminiscente observada. La presencia de potenciadores o promotores fuertes cerca del gen de luciferasa integrado podría aumentar su expresión, pero reduciría su respuesta a la adición de suero [Hampf y Gossen, 2007]. Otros criterios de selección más prácticos podrían reducir la posibilidad de elegir colonias con expresión alterada de luciferasas.

Uno de estos criterios consistiría en seleccionar colonias cuya intensidad de señal fuera cercana al promedio, donde el gen reportero podría estar libre de elementos externos al plásmido que influyeran en su expresión. Este criterio serviría para descartar colonias en donde el gen reportero se sobreexpresara por efecto de potenciadores y promotores fuertes o se encontrara en proceso de silenciamiento transcripcional. Como alternativa, se podrían seleccionar las colonias con mayor respuesta a la adición de suero en ensayos de sincronización y reinicio del ciclo celular, aunque implicaría armar un ensayo de dinámica transcripcional para colonias individuales. Cualquiera de estas opciones podría utilizarse en la selección de colonias futuras con actividad bioluminiscente.

**Se observó ruido de fondo en la primer captura de la cámara-CCD después de la adición de suero, en parte debido al uso de la cámara en campo claro para reenfocar la muestra.**

Un fenómeno presente en la mayoría de los ensayos de bioluminiscencia fue la disminución de la intensidad relativa neta en algunas de las células analizadas en la primer captura de bioluminiscencia posterior a la adición de suero. Se observó en la imagen obtenida un aumento en la intensidad de todos los píxeles, la cual se consideró resultado de un aumento en el ruido de fondo por parte de la cámara. De acuerdo a comentarios del servicio técnico de Andor, la marca de la cámara-CCD utilizada en estos ensayos, el ruido observado fue producto de residuos de la señal obtenida en campo claro. La captura en campo claro se tomaba rutinariamente después de la adición de suero para reenfocar la imagen. Al cambiar el método de adquisición a bioluminiscencia después de tomar la imagen en campo claro,

bajaba la temperatura de la cámara-CCD y esto impedía la eliminación de la señal residual de la última captura. Estos residuos ocasionaban ruido de fondo en las primeras imágenes de bioluminiscencia. El programa de análisis de imagen consideraba a las células con un tamaño mayor a lo real en las imágenes con ruido de fondo alto, debido a que consideraba al ruido adjacente a las células como parte de las mismas. Al analizarse un área mayor a la necesaria, el promedio de intensidad de la señal de cada célula se calculó menor al promedio real.

La solución propuesta por el servicio técnico fue esperar unos minutos antes de pasar al modo de adquisición de bioluminiscencia para que la cámara-CCD limpie la señal residual. También recomendó esperar a que se enfriara la cámara-CCD después de tomar capturas en campo claro y antes de pasar al modo de adquisición de imágenes de bioluminiscencia. Debido al tiempo que tomaría seguir estas precauciones, se decidió dejar de tomar capturas en campo claro tras la adición de suero en los ensayos con CBG99 y CBG99-Ubx4 en células 3T3 (Figuras 26 y 28), y se consiguió disminuir parcialmente este fenómeno. Sin embargo, el programa de análisis de imagen siguió tomando erróneamente la superficie de las células analizadas en la captura posterior a la adición de suero, por razones de momento desconocidas. Por lo tanto, las mediciones de esta captura se ignoraron. Para evitar la necesidad de detener la cámara-CCD durante la adición de suero se podrían usar inyectores que lo suministren manual o automáticamente, sin necesidad de detener la captura de bioluminiscencia.

## 8. Conclusiones.

-La señal obtenida en los ensayos de bioluminiscencia de células 3T3 individuales con expresión de las luciferasas CBG99 y CBR fue aceptable. Es necesario aumentar la eficiencia de sincronización del ciclo celular para corroborar que la señal generada por estas luciferasas reporta la actividad transcripcional de los genes *c-Fos* y *Ciclina A2*.

-Las fusiones traduccionales de luciferasas con cuatro ubiquitinas no hidrolizables G76V tuvieron una señal débil, la cual no fue conveniente para los ensayos de bioluminiscencia. El uso de técnicas o modificaciones que aumenten la señal observada podría aumentar la utilidad de estos reporteros.

## 9. Perspectivas

-Integrar la secuencia del potenciador de SV40 en los plásmidos TK-CBG99 y TK-CBR. Llevar a cabo los ensayos de vida media de las luciferasas ELuc, Luc2, CBG99 y CBR en tiempo real.

-Evaluar la eficiencia de sincronización del ciclo celular en las células a emplear. Optimizar la eficiencia de sincronización por privación de suero en células 3T3, o bien, cambiar de método de sincronización.

-Corroborar que las luciferasas expresadas en las líneas de transfección estable de pCBG99-cfos y pCBR-cycA2 reportan la actividad transcripcional de los genes correspondientes mediante la cuantificación directa de los transcritos de *c-Fos*, *Ciclina A2* y las luciferasas.

-Armar un ensayo de bioluminiscencia dual con las luciferasas CBG99 y CBR en células individuales, con ayuda de un sistema de filtros.

-Llevar a cabo ensayos de bioluminiscencia con las luciferasas desestabilizadas CBG99-Ubx4 y CBR-Ubx4 utilizando binning de pixeles. Evaluar la utilidad de reducir el número de ubiquitinas no hidrolizables en las luciferasas desestabilizadas.

## 9. Bibliografía

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) *Garland Science*. 6ta Edición.
2. Almond B, Hawkins E, Stecha P, Garvin D, Paguio A, Butler B, Beck M, Wood M, Wood K (2003) Introducing Chroma-Luc technology. *Promega Notes* **85**: 11-4.
3. Ando Y, Niwa K, Yamada N, Enomoto T, Irie T, Kubota H, Ohmiya Y, Akiyama H (2008) Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission *Nature Photonics* **2**: 44-7.
4. Auld DS, Thorne N, Nguyen DT, Inglese J (2008) A specific mechanism for nonspecific activation in reporter-gene assays. *ACS Chemical Biology* **3 (8)**: 463-70.
5. Banik GG, Todd PW, Kompala DS (1996) Foreign protein expression from S phase specific promoters in continuous cultures of recombinant CHO cells. *Cytotechnology* **22 (1-3)**: 179-84.
6. Baserga R (1984) Growth in size and cell-DNA replication. *Experimental Cell Research* **151 (1)**: 1-5.
7. Blake WJ, Kærn M, Cantor CR, Collins JJ (2003) Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* **422 (6932)**: 633-7.
8. Bosisio D, Marazzi I, Agresti A, Shimizu N, Bianchi ME, Natoli G (2006) A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-kappaB-dependent gene activity. *EMBO Journal* **25(4)**: 798-810.
9. Branchini BR, Southworth TL, Khattak NF, Michelini E, Roda A (2005) Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications. *Analytical Biochemistry* **345 (1)**: 140-8.
10. Branchini BR, Southworth TL, Murtiashaw MH, Boije H, Fleet SE (2003) A mutagenesis study of the putative luciferin binding site residues of firefly luciferase. *Biochemistry* **42 (35)**: 10429-36.
11. Branchini BR, Southworth TL, Murtiashaw MH, Magyar RA, Gonzalez SA, Ruggiero MC, Stroh JG (2004) An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry* **43 (23)**: 7255-62.
12. Brightwell G, Poirier V, Cole E, Ivins S, Brown KW (1997) Serum-dependent and cell cycle-dependent expression from a cytomegalovirus-based mammalian expression vector. *Gene* **194 (1)**: 115-23.
13. Cai L, Dalal CK, Elowitz MB (2008) Frequency-modulated nuclear localization burst coordinate gene regulation. *Nature* **455 (7212)**: 485-90.

14. Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B, Naranjo JR (1999) DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature* **80-4**: 398 (6722).
15. Chubb JR, Liverpool TB (2010) Bursts and pulses: insights from single cell studies into transcriptional mechanisms. *Current Opinion in Genetics & Development* **20 (5)**: 478-84.
16. Chubb JR, Trcek T, Shenoy SM, Singer RH (2006) Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Current Biology* **16 (10)**: 1018-25.
17. Corish P, Tyler-Smith C (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Engineering* **12 (12)**: 1035-40.
18. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173 (1 Spec No)**: 33-8.
19. Coulon A, Chow CC, Singer RH, Larson DR (2013) Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. *Nature Reviews. Genetics* **14 (8)**: 572-84.
20. da Silva LP, da Silva JC (2011) Kinetics of inhibition of firefly luciferase by dehydroluciferyl-coenzyme A, dehydroluciferin and L-luciferin. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10 (6)**: 1039-45.
21. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386 (6627)**: 855-8.
22. Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297 (5584)**: 1183-6.
23. Fink M, Flekna G, Ludwig A, Heimbucher T, Czerny T (2006) Improved translation efficiency of injected mRNA during early embryonic development. *Developmental Dynamics* **235 (12)**: 3370-8.
24. Fraser D, Kærn M (2009) A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies. *Molecular Microbiology* **71 (6)**: 1333-40.
25. Ghoda L, van Daalen Wetters T, Macrae M, Ascherman D, Coffino P (1989) Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* **243(4897)**: 1493-5.
26. Golding I, Paulsson J, Zawilski SM, Cox EC. (2005) Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell* **123 (6)**: 1025-36.
27. Hager GL, McNally JG, Misteli T (2009) Transcription dynamics. *Molecular Cell* **35 (6)**: 741-53.
28. Hampf M, Gossen M (2007) Promoter crosstalk effects on gene expression. *Journal of Molecular Biology* **365 (4)**: 911-20.

29. Harper CV, Featherstone K, Semprini S, Friedrichsen S, McNeilly J, Paszek P, Spiller DG, McNeilly AS, Mullins JJ, Davis JR, White MR (2010) Dynamic organisation of prolactin gene expression in living pituitary tissue. *Journal of Cell Science* **123** (Pt 3): 424-30.
30. Harper CV, Finkenstädt B, Woodcock DJ, Friedrichsen S, Semprini S, Ashall L, Spiller DG, Mullins JJ, Rand DA, Davis JR, White MR (2011) Dynamic analysis of stochastic transcription cycles. *PLoS Biology* **9** (4): e1000607.
31. Henglein B, Chenivresse X, Wang J, Eick D, Bréchet C (1994) Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (12): 5490-4.
32. Herr W (1993) The SV40 enhancer: transcriptional regulation through a hierarchy of combinatorial interactions. *Seminars in Virology* **Volúmen 4**: 3-13.
33. Hipskind RA, Nordheim A (1991) Functional dissection in vitro of the human c-fos promoter. *The Journal of Biological Chemistry* **266** (29): 19583-92.
34. Hirano T, Hasumi Y, Ohtsuka K, Maki S, Niwa H, Yamaji M, Hashizume D (2009) Spectroscopic studies of the light-color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **131** (6): 2385-96.
35. Hocine S, Raymond P, Zenklusen D, Chao JA, Singer RH (2013) Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nature Methods* **10** (2): 119-21.
36. Höfer K, Langejürgen LV, Jäschke A (2013) Universal aptamer-based real-time monitoring of enzymatic RNA synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **135** (37): 13692-4.
37. Holmes D, Mergen E (2007) Signal to Noise Ratio - What is the Right Size? *Quality Magazine* **Agosto 28**: 1-6.
38. Hosseinkhani S (2011) Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68** (7): 1167-82.
39. Hsu SH, Shyu HW, Hsieh-Li HM, Li H. (2001) Spz1, a novel bHLH-Zip protein, is specifically expressed in testis. *Mechanisms of Development* **100** (2): 177-87.
40. Huet X, Rech J, Plet A, Vié A, Blanchard JM (1996) Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **16** (7): 3789-98.
41. Ignowski JM, Schaffer DV (2004) Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* **86** (7): 827-34.
42. Imayoshi I, Isomura A, Harima Y, Kawaguchi K, Kori H, Miyachi H, Fujiwara T, Ishidate F, Kageyama

- R (2013) Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* **342** (6163): 1203-8.
43. Jackman J y O'Connor PM (2001) Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology* **00:8.3**: 8.3.1–8.3.20.
  44. Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, Tansey WP, Sachidanandam R, Prasanth KV, Ried T, Shav-Tal Y, Bertrand E, Singer RH, Spector DL (2004) From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* **116** (5): 683-98.
  45. Johnson CH, Fisher TS, Hoang LT, Felding BH, Siuzdak G, O'Brien PJ (2014) Luciferase does not Alter Metabolism in Cancer Cells. *Metabolomics* **10** (3): 354-360.
  46. Jones KA, Yamamoto KR, Tjian R (1985) Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell* **42** (2): 559-72.
  47. König H, Ponta H, Rahmsdorf U, Büscher M, Schönthal A, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1989) Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *The EMBO Journal* **8** (9): 2559-66.
  48. Krämer A, Carstens CP, Fahl WE (1996) A novel CCAAT-binding protein necessary for adhesion-dependent cyclin A transcription at the G1/S boundary is sequestered by a retinoblastoma-like protein in G0. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (12): 6579-82.
  49. Kwon H, Enomoto T, Shimogawara M, Yasuda K, Nakajima Y, Ohmiya Y (2010) Bioluminescence imaging of dual gene expression at the single-cell level. *Biotechniques* **48** (6): 460-2.
  50. Lambrechts D, Roeffaers M, Goossens K, Hofkens J, Van de Putte T, Schrooten J, Van Oosterwyck H (2014) A causal relation between bioluminescence and oxygen to quantify the cell niche. *PLoS One* **9** (5): e97572.
  51. Larson DR, Zenklusen D, Wu B, Chao JA, Singer RH (2011) Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *Science* **332** (6028): 475-8.
  52. Lee JS, Ngo H, Kim D, Chung JH (2000) Erythroid Kruppel-like factor is recruited to the CACCC box in the beta-globin promoter but not to the CACCC box in the gamma-globin promoter: the role of the neighboring promoter elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** (6): 2468-73.
  53. Leise TL, Wang CW, Gitis PJ, Welsh DK (2012) Persistent cell-autonomous circadian oscillations in fibroblasts revealed by six-week single-cell imaging of PER2::LUC bioluminescence. *PLoS One* **7** (3): e33334.
  54. Leitão JM, Esteves da Silva JC (2010) Firefly luciferase inhibition. *Journal of Photochemistry and*

*Photobiology B: Biology* **101 (1)**: 1-8.

55. Li L, Davie JR (2010) The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy* **192 (5)**: 275-83.
56. Li X, Nakajima Y, Niwa K, Viviani VR, Ohmiya Y (2010) Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging. *Protein Science* **19 (1)**: 26-33.
57. Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR (1998) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *The Journal of Biological Chemistry* **273 (52)**: 34970-5.
58. Liu AC, Lewis WG, Kay SA (2007) Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature Chemical Biology* **3 (10)**: 630-9.
59. Luker GD, Pica CM, Song J, Luker KE, Piwnica-Worms D (2003) Imaging 26S proteasome activity and inhibition in living mice. *Nature Medicine* **9 (7)**: 969-73.
60. Marques SM, Esteves da Silva JC (2009) Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* **61 (1)**: 6-17.
61. Martin CS, Wight PA, Dobretsova A, Bronstein I (1996) Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and beta-galactosidase. *Biotechniques* **21(3)**: 520-4.
62. Masamizu Y, Ohtsuka T, Takashima Y, Nagahara H, Takenaka Y, Yoshikawa K, Okamura H, Kageyama R (2006) Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103 (5)**: 1313-8.
63. Matsuki H, Suzuki A, Kamaya H, Ueda I (1999) Specific and non-specific binding of long-chain fatty acids to firefly luciferase: cutoff at octanoate. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426 (1)**: 143-50.
64. Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115 (6)**: 751-63.
65. Mezzanotte L, Que I, Kaijzel E, Branchini B, Roda A, Löwik C (2011) Sensitive dual color in vivo bioluminescence imaging using a new red codon optimized firefly luciferase and a green click beetle luciferase. *PLoS One* **6 (4)**: e19277.
66. Moriyama EH, Niedre MJ, Jarvi MT, Mocanu JD, Moriyama Y, Subarsky P, Li B, Lilge LD, Wilson BC (2008) The influence of hypoxia on bioluminescence in luciferase-transfected gliosarcoma tumor cells in vitro. *Photochemical & Photobiological Sciences* **7 (6)**: 675-80.

67. Nakajima Y, Yamazaki T, Nishii S, Noguchi T, Hoshino H, Niwa K, Viviani VR, Ohmiya Y (2010) Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. *PLoS One* **5** (4): e10011.
68. Naumov P, Ozawa Y, Ohkubo K, Fukuzumi S (2009) Structure and spectroscopy of oxyluciferin, the light emitter of the firefly bioluminescence. *Journal of the American Chemical Society* **131** (32): 11590-605.
69. Navizet I, Liu YJ, Ferré N, Xiao HY, Fang WH, Lindh R (2010) Color-tuning mechanism of firefly investigated by multi-configurational perturbation method. *Journal of the American Chemical Society* **132** (2): 706-12.
70. Nelson DE, Ihekweba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR (2004) Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* **306** (5696): 704-8.
71. Niswender KD, Blackman SM, Rohde L, Magnuson MA, Piston DW (1995) Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *Journal of Microscopy* **180** (Pt 2): 109-16.
72. Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, Ohmiya Y (2010) Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochemistry and Photobiology* **86** (5): 1046-9.
73. Niwa K, Ohmiya Y (2004) Inhibitory effect of lipoic acid on firefly luciferase bioluminescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **323** (2): 625-9.
74. Oba Y, Ojika M, Inouye S (2003) Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *FEBS Letters* **540** (1-3): 251-4.
75. Paguio A, Almond B, Fan F, Stecha P, Garvin D, Wood M, Wood K (2005) pGL4 Vectors: A New Generation of Luciferase Reporter Vectors. *Promega Notes* **89**: 7-10.
76. Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science* **333** (6042): 642-6.
77. Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71** (4): 1286-90.
78. Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246** (4930): 603-8.
79. Pourquié O (2003) The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* **301** (5631): 328-30.

80. Qin JY, Zhang L, Clift KL, Huler I, Xiang AP, Ren BZ, Lahn BT (2010) Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE* **5** (5): e10611.
81. Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S (2006) Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biology* **4** (10): e309 1707-19.
82. Raser JM, O'Shea EK (2004) Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science* **304** (5678): 1811-4.
83. Reddy JC, Hosono S, Licht JD (1995) The transcriptional effect of WT1 is modulated by choice of expression vector. *The Journal of Biological Chemistry* **270** (50): 29976-82.
84. Ribeiro C, Esteves da Silva JC (2008) Kinetics of inhibition of firefly luciferase by oxyluciferin and dehydroxyluciferin-adenylate. *Photochemical & Photobiological Sciences* **7** (9): 1085-90.
85. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234** (4774): 364-8.
86. Rubin H, Xu K (1989) Evidence for the progressive and adaptive nature of spontaneous transformation in the NIH 3T3 cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** (6): 1860-4.
87. Runkel L, Shaw PE, Herrera RE, Hipskind RA, Nordheim A (1991) Multiple basal promoter elements determine the level of human c-fos transcription. *Molecular and Cellular Biology* **11** (3): 1270-80.
88. Rutter GA, Kennedy HJ, Wood CD, White MR, Tavaré JM (1998) Real-time imaging of gene expression in single living cells. *Chemistry & Biology* **5** (11): R285-90.
89. Sadowski HB, Shuai K, Darnell JE Jr, Gilman MZ (1993) A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* **261** (5129): 1739-44.
90. Schönthal A, Büscher M, Angel P, Rahmsdorf HJ, Ponta H, Hattori K, Chiu R, Karin M, Herrlich P (1989) The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription. *Oncogene* **4** (5): 629-36.
91. Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Bergès J, Helin K, Jansen-Dürr P, Henglein B (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (24): 11264-8.
92. Seliger HH, McElroy WD (1964) THE COLORS OF FIREFLY BIOLUMINESCENCE: ENZYME CONFIGURATION AND SPECIES SPECIFICITY *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **52** (1): 75-81.
93. Shimojo H, Ohtsuka T, Kageyama R (2008) Oscillations in notch signaling regulate maintenance of

- neural progenitors. *Neuron* **58** (1): 52-64.
94. Shyu AB, Belasco JG, Greenberg ME (1991) Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes & Development* **5** (2): 221-31.
  95. Spiller DG, Wood CD, Rand DA, White MR (2010) Measurement of single-cell dynamics *Nature* **465** (7299): 736-45.
  96. Stack JH, Whitney M, Rodems SM, Pollok BA (2000) A ubiquitin-based tagging system for controlled modulation of protein stability. *Nature Biotechnology* **18** (12): 1298-302.
  97. Strack RL, Disney MD, Jaffrey SR (2013) A superfolder Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nature Methods* **10** (12): 1219-24.
  98. Swain PS, Elowitz MB, Siggia ED. (2002) Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression. *PNAS* **99** (20): 12795-800.
  99. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA (2004) Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology* **22** (5): 589-94.
  100. Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DA (2012) Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harbor Protocols* **2012** (2): 199-204.
  101. Thorne N, Inglese J, Auld DS (2010) Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chemistry & Biology* **17** (6): 646-57.
  102. Todaro GJ, Green H (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology* **17**: 299-313.
  103. Tsien, RY (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509-44.
  104. Tsukamoto T, Hashiguchi N, Janicki SM, Tumber T, Belmont AS, Spector DL. (2000) Visualization of gene activity in living cells. *Nature Cell Biology* **2** (12): 871-8.
  105. Tyson JJ, Novak B (2008) Temporal organization of the cell cycle. *Current Biology* **18** (17): R759-R768.
  106. Ugarova NN, Brovko LY (2002) Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. *Luminescence* **17** (5): 321-30.
  107. Ugarova NN, Brovko LY and Kutuzova GD (1993) Bioluminescence and Bioluminescent analysis. Recent Developments. *Biochemistry (Moscu, traducido al inglés)* **58**: 1351-72.
  108. Viviani VR (2002) The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases.

*Cellular and Molecular Life Sciences* **59 (11)**: 1833-50.

109. White MR, Masuko M, Amet L, Elliott G, Braddock M, Kingsman AJ, Kingsman SM (1995) Real-time analysis of the transcriptional regulation of HIV and hCMV promoters in single mammalian cells. *Journal of Cell Science* **108 (Pt 2)**: 441-55.
110. Wilkerson DC, Skaggs HS, Sarge KD (2007) HSF2 binds to the Hsp90, Hsp27, and c-Fos promoters constitutively and modulates their expression. *Cell Stress Chaperones* **12 (3)**: 283-90.
111. Winkles JA (1998) Serum- and polypeptide growth factor-inducible gene expression in mouse fibroblasts. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **58**: 41-78.
112. Wood CD (1999) Real-time imaging of gene expression during the cell cycle in single mammalian cells. *Unpublished PhD thesis*. University of Liverpool.
113. Wood KV (1998) The chemistry of bioluminescent reporter assays. *Promega Notes* **65**: 65-71.
114. Xie Y, Zhong R, Chen C, Calderwood SK (2003) Heat shock factor 1 contains two functional domains that mediate transcriptional repression of the c-fos and c-fms genes. *The Journal of Biological Chemistry* **278 (7)**: 4687-98.
115. Yang TT, Cheng L, Kain SR (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Research* **24 (22)**: 4592-3.
116. Zenklusen D, Larson DR, Singer RH. (2008) Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast. *Nature Structural & Molecular Biology* **15 (12)**: 1263-71.
117. Zetterberg A, Larsson O (1985) Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82 (16)**: 5365-9.
118. Zwicker J, Lucibello FC, Wolfrain LA, Gross C, Truss M, Engeland K, Müller R (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *The EMBO Journal* **14 (18)**: 4514-22.