



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de la interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con
C/Ebp- β sobre el promotor del gen específico de ovario *Fbxw15*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
LÓPEZ BALLESTEROS REBECA ALEJANDRA

ASESOR:
Dra. Elsa Verónica De La Chesnaye Caraveo

ASESOR INTERNO:
M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo Profesional.**

Evaluación de la interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con C/Ebp-β sobre el promotor del gen específico de ovario Fbwx15.

Que presenta la pasante: **Rebeca Alejandra López Ballesteros**

Con número de cuenta: **311036701** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Enero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Unidad de Investigación Biomolecular en Cardiología Dr. Rubén Argüero Sanchez durante el periodo de diciembre 2017-2018, bajo la tutoría de la Dra. Elsa Verónica De La Chesnaye Caraveo y la asesoría de la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a Dios y a la vida, por permitirme culminar esta etapa.

A mi madre, por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional. Por mantenerme con vida y luchar hasta el último momento conmigo, por ser mi fiel compañera.

A mi padre, por siempre estar ahí para mi y por enseñarme que las niñas lo pueden todo.

A mi hermano por ser mi motivación diaria para ser mejor y darle un buen ejemplo.

A mi tía Oli y a mi abuelita Mary por forjarme desde pequeña, y brindarme su amor incondicional en todo momento.

A mi tía Tere por mantenerme sana y a salvo siempre, sin importar las circunstancias.

A Edgar, por nunca soltar mi mano a pesar de todo, por motivarme a salir adelante y por ser mi pilar en todo momento.

A mi gran amiga Arely, por ser mi fiel acompañante y abrirme las puertas de su hogar siempre.

Al Dr. García Gonzáles por aparecer en el momento indicado en mi vida y por su gran trabajo durante todo el proceso de mi cirugía.

A mi Facultad por darme los días más felices que he tenido hasta el día de hoy, por no dejarme caer a pesar de las circunstancias y fungir como mi segundo hogar durante 4 años.

A mis profesores por darme la mano cuando más los necesite y permitirme llegar a la meta.

Evaluación de la interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con C/Ebp- β sobre el promotor del gen específico de ovario *Fbxw15*

ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS	2
AGRADECIMIENTOS	2
ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Foliculogénesis	13
2.2 Gen <i>Fbxw15</i>	15
2.3 Proteínas con caja F	16
2.4 Factores de transcripción	18
2.5 Factores de transcripción Ets1 y Ap1	19
2.6 Factor de transcripción C/Ebp- β	20
2.7 Mutagénesis sitio dirigida	21
2.8 Plásmido pRL-null y pCMV6-Entry	22
2.9 Células DH5- α y transformación de células competentes	24
2.10 Células CHO-K1 y transfección celular	25
2.11 Ensayo de luciferasa	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. HIPÓTESIS	28
5. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL	29
6. METODOLOGÍA	30

6.1	Análisis bioinformático	30
6.2	Mutagénesis sitio dirigida en los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción Ets1 y Ap1	31
6.3	Transformación de células competentes DH5- α	32
6.4	Purificación de plásmidos recombinantes	34
6.5	Cultivo celular y transfecciones	35
6.5	Ensayos de luciferasa	37
6.6	Análisis de los datos	37
7.	RESULTADOS	38
7.1	Análisis bioinformático de la región del promotor <i>Fbxw15</i>	38
7.2	Mutagénesis sitio dirigida en los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción Ets1 y Ap1	43
7.3	Actividad transcripcional del promotor pRL/ <i>Fbxw15</i> mutado	45
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
8.1	Identificación de las mutaciones en plásmidos recombinantes	49
8.2	Interacción entre el factor de transcripción Ap1 y el factor C/Ebp- β	50
8.3	Interacción entre el factor de transcripción Ets1 y el factor C/Ebp- β	51
8.4	Interacción entre los factores de transcripción Ap1 y Ets1 con el factor C/Ebp- β	52
9.	CONCLUSIONES	53
10.	PERSPECTIVAS	54
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXOS	59
1.	Reactivos y soluciones	59
2.	Reactivos de kit	61
3.	Enzimas de restricción	62
4.	Secuenciación de mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para Ap1	63

ABREVIATURAS

Fbxw15	Proteína con caja F box con dominios de ácido aspártico 15 (del inglés, “F-box and W-40 domain protein 15”)
AMP	Adenosín monofosfato
ATF	Factor de activación de transcripción
ATP	Adenosín trifosfato
Ap1	Factor de transcripción Ap1 (del inglés, “Protein Activation 1”)
C/Ebp-β	CCAAT / proteína beta de unión al potenciador (del inglés “CCAAT/ Enhancer-Binding Protein Beta”)
CHOK-1	Células de ovario de hámster chino tipo K-1 (del inglés, “Chinese hamster ovary-K1”)
D3	Fragmento de la región 5' no traducida del gen <i>Fbxw15</i>
DH5-α	Cepa de <i>E.coli</i> , nombrada en honor a Douglas Hanahan
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (“Dulbecco Modified Eagle Minimal Essential Medium”, por sus siglas en inglés)
DMEM-HG	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco Alto en Glucosa (“Dulbecco Modified Eagle Minimal Essential Medium-High Glucose”, por sus siglas en inglés)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés, “Deoxyribonucleic Acid”)
EOS47	Promotor del gen <i>Eos47</i> (del inglés, “ETn Oct-4 and Sox2”)
Dpn1	Enzima de restricción derivada de <i>Diplococcus pneumoniae</i>
Ets1	Factor de transcripción Ets1 (del inglés, “E-twenty six 1”)
FSH	Hormona folículo estimulante (del inglés, “Follicle-Stimulating Hormone”)

GATA1	Factor de transcripción eritroide
H3	Histona 3
H4	Histona 4
Hbo1	Complejo de Origen y Reconocimiento de Unión a la Acetiltransferasa de Histonas
Ing	Inhibidor de crecimiento (del inglés, “Inhibitor of growth”)
Kb	Kilobases
KpnI	Enzima de restricción derivada de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LARII	Reactivo de Ensayo de Luciferasa II
LB	Medio Luria Bertani
LH	Hormona luteinizante (del inglés, “Luteinizing Hormone”)
mda-7	Gen asociado a la diferenciación del melanoma-7 (del inglés, “melanoma differentiation associated gene-7”)
Mek1	Proteína kinasa 1 activada por mitógenos (del inglés, “Mitogen Activated Protein Kinase 1”)
MLE-12	Epitelio pulmonar murino-12 (del inglés, “Murine Lung Epithelial”)
NotI	Enzima de restricción derivada de <i>Nocardia otitidis</i>
p21	Promotor p21
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés, “Phosphate Buffered Saline”)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, “Polymerase Chain Reaction”)
PLB	Buffer de lisis pasiva (del inglés, “Passive Lysis Buffer”)
R_{luc}	Luciferasa de renilla (del inglés, “ <i>Renilla luciferase</i> ”)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés, “Ribonucleic Acid”)
mRNA	RNA mensajero (del inglés, “ Messenger Ribonucleic Acid”)
SCF-E3	Así nombrado por tres de sus componentes, proteína asociada a la cinasa de la fase S, Skp1 (del inglés, “S-phase Kinase associated Protein 1”), un miembro de la familia de las culinas (Culina-1, del inglés, “cull”) y otro, de la familia de proteínas con motivo F; y por el complejo que forma con la ubiquitina ligasa (E3)
TBE	Buffer Tris, borato y EDTA
T_m	Temperatura de fusión (del inglés, “Temperature melting”)
UTR	Región no traducida del gen (del inglés, “Untranslated region”)
UPS	Sistema ubiquitina-proteosoma
UV	Ultra-violeta
XbaI	Enzima de restricción derivada de <i>Xanthomonas badrii</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación folicular en cortes histológicos de ovario de ratón	14
Figura 2. Esquema de la organización genómica del gen <i>Fbxw15</i> .	16
Figura 3. Esquema del complejo SCF	17
Figura 4. Secuencia de aminoácidos codificada por el gen <i>C/Ebp-β</i> en rata y ratón	20
Figura 5. Representación esquemática de la técnica de mutagénesis sitio dirigida	21
Figura 6. Representación esquemática del vector pRL-null	23
Figura 7. Representación esquemática del vector pCMV6	24
Figura 8. Representación esquemática del ensayo de luciferasa	27
Figura 9. Secuencia del fragmento D3 con la mutación sitio dirigida para el sitio de reconocimiento al factor de transcripción Ets1 con el primer par de oligonucleótidos (Tabla 1)	38
Figura 10. Secuencia del fragmento D3 con la mutación sitio dirigida para el sitio de reconocimiento al factor de transcripción Ets1 con el segundo par de oligonucleótidos (Tabla 1)	38
Figura 11. Secuencia del fragmento D3 con la mutación sitio dirigida para el sitio de reconocimiento al factor de transcripción Ap1	39
Figura 12. Representación esquemática del análisis por restricción enzimática de la mutación sitio dirigida en el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1 con el primer par de oligonucleótidos	40
Figura 13. Representación esquemática del análisis por restricción enzimática de la mutación sitio dirigida en el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1 con el segundo par de oligonucleótidos	41
Figura 14. Representación esquemática del análisis por restricción enzimática de la mutación sitio dirigida del sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1	42

Figura 15. Patrón de electroforesis horizontal de DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1.2%, 50 V por 1 h, en tampón TBE 1X, teñido con bromuro de etidio	43
Figura 16. Patrón de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.2% de la restricción enzimática con Not1 del sitio de reconocimiento mutado para el factor de transcripción Ap1, 50 V por 1 h, en tampón TBE 1X, teñido con bromuro de etidio	44
Figura 17. Patrón de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2% de mutagenesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento para Ets1, 50 V por 1 h, en tampón TBE 1X, teñido con bromuro de etidio	45
Figura 18. Actividad transcripcional cuantificada mediante el ensayo de luciferasa	46
Figura 19. Representación esquemática de la actividad transcripcional del fragmento correspondiente a la región 5' no traducida del gen <i>Fbxw15</i>	47
Figura 20. Representación esquemática de la actividad transcripcional del fragmento correspondiente a la región 5' no traducida del gen <i>Fbxw15</i> con el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1 mutado	48
Figura 21. Representación esquemática de la interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con el co-activador CBP/p300	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para mutagénesis sitio dirigida en los sitios de reconocimiento para Ets1 y Ap1	30
Tabla 2. Parámetros para la mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1	31
Tabla 3. Parámetros para la mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1	32
Tabla 4. Primer par de oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1	39
Tabla 5. Parámetros analizados en el programa de computación “OligoAnalyzer” para los primeros oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1	39
Tabla 6. Segundo par de oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1	40
Tabla 7. Parámetros analizados en el programa de computación “OligoAnalyzer” para los segundos oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1	41
Tabla 8. Oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ap1	42
Tabla 9. Parámetros analizados en el programa de computación “OligoAnalyzer” para los oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ap1	42

RESUMEN

Uno de los procesos más importantes para mantener el potencial reproductivo es la foliculogénesis, este evento requiere de una organización y coordinación molecular precisa. En 2008 De la Chesnaye, et. al., identificaron un gen denominado *Fbxw15*, cuyo RNA mensajero presenta una expresión bifásica previo al inicio del ensamble folicular, evento independiente del estímulo gonadotrópico. *Fbxw15* es un gen que codifica para una proteína con caja F que se localiza exclusivamente en los ovocitos del ovario murino. Se demostró que esta proteína es parte del complejo SCF-Fbxw15 (complejo Skp1-Culina-Caja F) que en la línea celular MLE-12 (epitelio de pulmón murino) regula al Complejo de Origen y Reconocimiento de Unión a la Acetiltransferasa de Histonas (Hbo1), a través del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), validando a SCF-Fbxw15 como una enzima E3 del UPS (Zou, et. al.; 2013). La forma en la cuál se regula la expresión transcripcional de *Fbxw15* es una pregunta abierta, por lo cual, en el presente trabajo se llevó a cabo la mutagénesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento a el factor de transcripción Ap1, que se encuentra en el promotor del gen *Fbxw15* con la finalidad de estudiar la interacción de este con el factor de transcripción C/Ebp- β , y el impacto de dicha interacción en la actividad transcripcional del promotor del gen *Fbxw15*. También se pretendía estudiar la interacción del factor de transcripción Ets1 con el factor C/Ebp- β , sin embargo, no se logró la mutagénesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento para dicho factor de transcripción.

Al llevar a cabo la transfección celular del plásmido recombinante obtenido y el posterior ensayo de luciferasa se encontró que dicho plásmido tiene una actividad transcripcional muy baja, por lo cual se podrían deducir dos escenarios: el primero de ellos sería, que no existe interacción entre los factores de transcripción Ap1 y el factor C/Ebp- β , por lo cual, no aumentaron la actividad transcripcional del promotor y el otro escenario sería que la interacción necesaria para activar al promotor es entre los factores de transcripción Ap1 y Ets1 con el factor C/Ebp- β .

1. INTRODUCCIÓN

En el ovario de ratón, la foliculogénesis inicia con el ensamblaje de folículos primordiales que comprenden un ovocito y una capa de células de la pregranulosa planas que se diferencian para que se lleve a cabo el desarrollo folicular temprano. Las etapas de ensamblaje y crecimiento folicular temprano comienzan tras el nacimiento y son independientes del estímulo gonadotrópico (Flores, 2017; Pepling y Spradling, 2001).

En el 2008, De La Chesnaye y colaboradores, identificaron un gen cuyo transcrito se expresa de forma abundante durante el inicio de la foliculogénesis. Este gen, denominado *Fbxw15*, codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas con caja F. La expresión del gen se encontró únicamente en el ovocito y dado que dicha expresión corresponde con el momento del ensamblaje y crecimiento folicular temprano, se ha sugerido que *Fbxw15* participa en el proceso de foliculogénesis (De La Chesnaye, *et. al.*; 2008).

En el caso del gen *Fbxw15*, se demostró mediante un estudio en células epiteliales de pulmón murino (MLE-12), que dicho gen regula selectivamente los niveles de proteína Hbo1 (Complejo de origen y reconocimiento de unión a la acetil-transferasa de histonas), la cual es miembro de la familia de la histona acetil-transferasa, y cuya función es iniciar la replicación del DNA mediante la acetilación de las histonas H3 y H4; así mismo, recluta a la familia de supresores tumorales Ing (Inhibidor del crecimiento) para regular la proliferación celular. Para que Hbo1 pueda ser reconocido por *Fbxw15* tiene que ser fosforilado por Mek1 (Zou, *et. al.*; 2013).

Debido a la posible participación del gen *Fbxw15*, en el proceso de foliculogénesis como parte de las proteínas del complejo SCF-E3 y dado que la caracterización del promotor basal de este gen, se llevó a cabo el análisis de los factores de transcripción que podrían estar actuando como potencializadores o inhibidores de la actividad transcripcional de dicho promotor. Asimismo, en el presente trabajo se pretende determinar la interacción de los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con el factor C/Ebp- β , cuyos sitios de reconocimiento se encuentran presentes en una región del promotor del gen *Fbxw15*. Lo anterior con base en estudios anteriores que han demostrado que estos factores interactúan entre sí elevando la actividad transcripcional de ciertos genes (Karin, *et. al.*, 1997; Malavi, *et. al.*, 2000; Lelièvre, *et. al.*, 2001).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Foliculogénesis

Durante la diferenciación y desarrollo del ovario, las células germinales primordiales se diferencian en ovogonias, y junto con las células epitaliales (células de la pregranulosa), se forman los cordones ovígeros, los cuales se encuentran delimitados por una delgada membrana basal rodeada en la parte externa por células del mesénquima. Estos cordones ovígeros se mantienen comunicados intercelularmente por medio de puentes citoplasmáticos, formando los llamados nichos ovocitarios (Flores, 2017).

En el ovario de ratón, la formación de folículos primordiales, inicia cuando algunos nichos ovocitarios se remodelan para dar paso a la unidad estructural folicular, esto ocurre tras la disminución del número de células germinales mediante procesos apoptóticos. Dicha estructura folicular comprende un ovocito rodeado por una capa de células de la pregranulosa planas que se diferencian a cúbicas, para dar lugar al folículo primario (Peplin, *et. al.*; 2001). Las dos etapas mencionadas anteriormente (ensamblaje y crecimiento folicular temprano) comienzan tras el nacimiento y son independientes del estímulo gonadotrópico (Flores, 2017; Pepling y Spradling, 2001).

En respuesta a diversos factores de crecimiento las células de la granulosa sufren mitosis sucesivas dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar) y este crecimiento va acompañado de la formación de una capa de células de la teca alrededor de la membrana basal. Posteriormente, los folículos crecen gracias al estímulo de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH (Primero se libera FSH y LH después). La FSH se dirige a las células foliculares, las cuales sintetizan estrógenos. La LH, en cambio, actúa sobre las células del estroma ovárico cercanas a las células foliculares y las diferencia en células de la teca (Raga, *et.al.*; 2011).

La misión principal de estas células es la síntesis de hormonas; concretamente, progesterona y andrógenos, las cuales son utilizadas como precursoras del estrógeno en las células de la granulosa. Por otro lado, la formación del antro es

dependiente del estímulo de la FSH, este está lleno de líquido folicular, que es sintetizado por las células de la granulosa, posteriormente se forman varias capas de estas células alrededor del ovocito para formar las células del cúmulo. Estos efectos producen un incremento notable en los niveles de hormonas sexuales en sangre que ejercen una retroalimentación negativa hacia el cerebro disminuyendo la secreción de las gonadotropinas hipofisarias. Ante la disminución de la señal hipofisaria, sólo el folículo que se había desarrollado más rápidamente consigue mantener su crecimiento, mientras que los restantes degeneran, de tal forma que, cuando la cavidad antral está completamente establecida, el folículo que logró mantener su desarrollo recibe el nombre del folículo terciario, antral o de Graaf (Cabello, 2013; Raga, *et.al.* ;2011; Hernández, 2001).

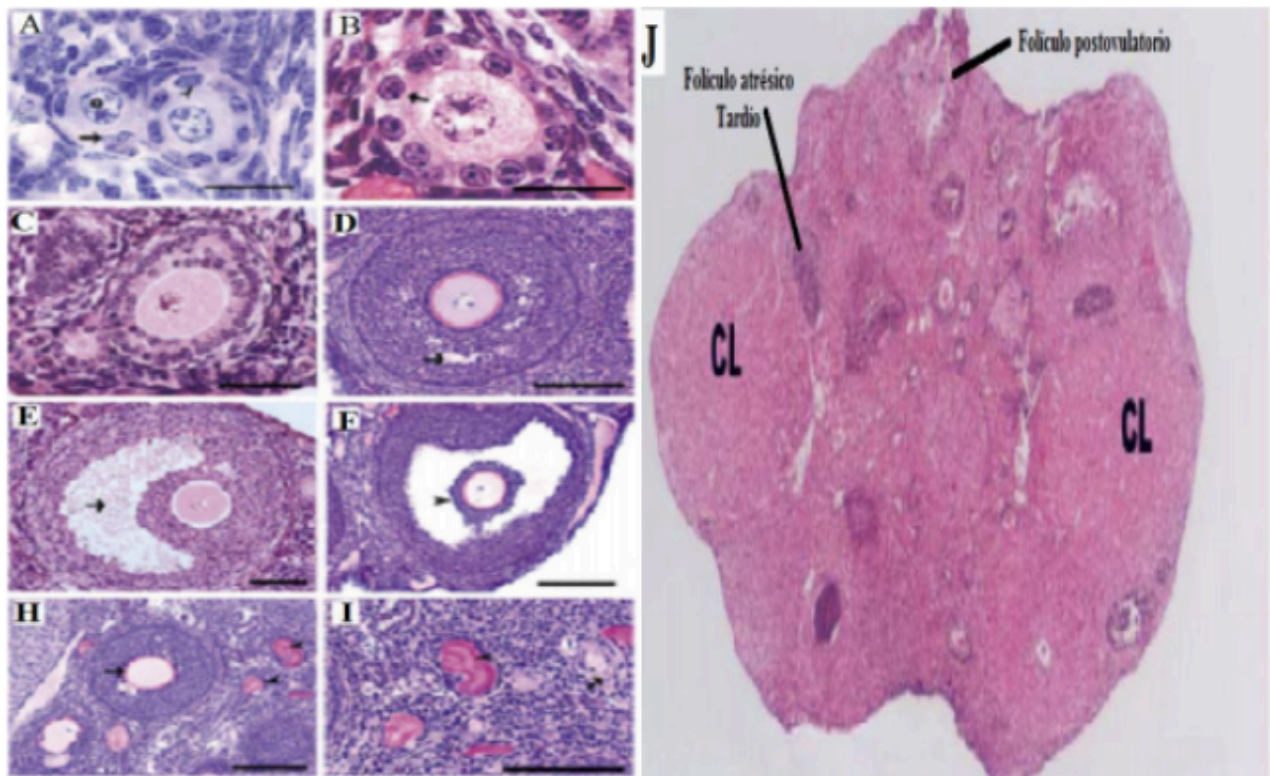


Figura 1. Clasificación folicular en cortes histológicos de ovario de ratón. A) Folículo primordial. B) Folículo primario. C) Folículo secundario. D) Folículo antral temprano. E) Folículo antral. F) Folículo preovulatorio. H) Folículo antral temprano y folículos atrésicos. I) Folículos atrésicos. J) Corte histológico de ovario de ratón. (Modificada por Cabello, 2013)

2.2 Gen *Fbxw15*

En el 2008, De La Chesnaye, *et al.*, identificaron al gen *Fbxw15* mediante un ensayo de microarreglos de DNA con el fin de identificar nuevos genes con expresión diferencial durante la foliculogénesis temprana en el ovario de ratón, en este estudio se identificó que el mRNA del gen *Fbxw15* presenta una elevada expresión a partir del segundo día post-nacimiento y se mantiene así hasta la vida adulta; así mismo, mediante estudios de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se demostró que este gen muestra una expresión bifásica; es decir, el transcrito se encuentra en niveles elevados a los 18 días poscoito, y estos niveles disminuyen al día siguiente manteniéndose así hasta el segundo día post-nacimiento (De La Chesnaye, *et al*; 2008).

El gen *Fbxw15* del genoma del ratón, se localiza en la cadena antisentido del cromosoma 9 en la cito-banda F2; comprende una secuencia genómica de 16 452 pb, transcribe un RNAm de aproximadamente 1.5 Kb con un marco de lectura abierto de 1 401 pb y codifica una proteína de 467 aminoácidos, que pertenece a la familia de proteínas con caja F, esta se localiza tanto en el retículo endoplásmico como en el citoplasma. La expresión del gen y de su proteína se encontró únicamente en el ovocito y dado que dicha expresión corresponde con el momento del ensamblaje y crecimiento folicular temprano, se le atribuye importancia en el proceso de foliculogénesis (De La Chesnaye, *et al*; 2008).

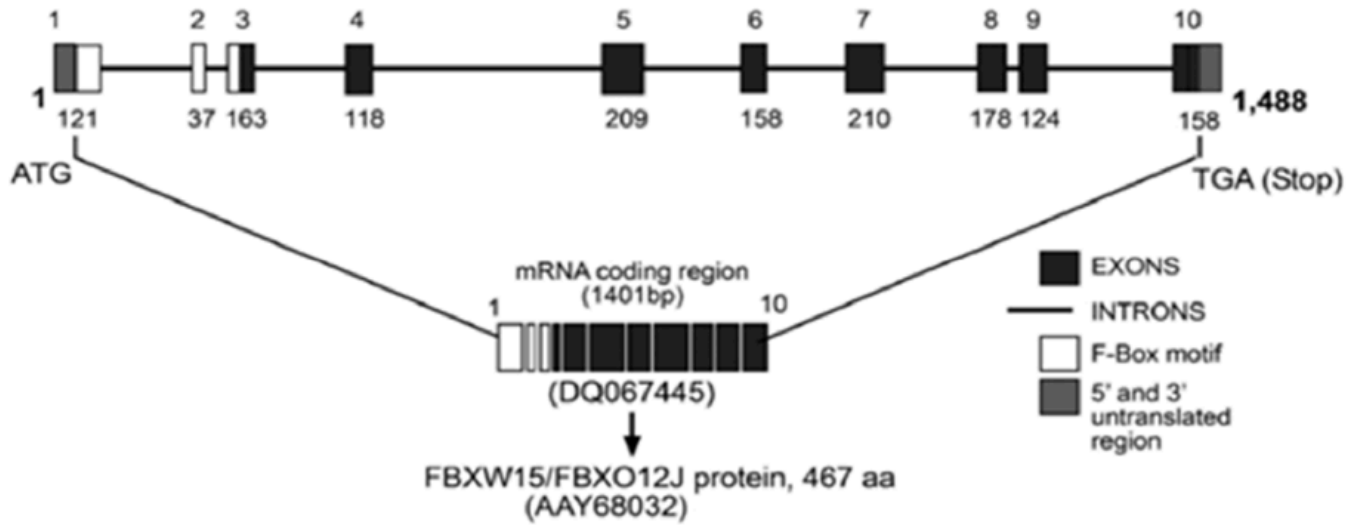


Figura 2. Esquema de la organización genómica del gen *Fbxw15*. El gen *Fbxw15* de ratón comprende 10 exones (representados con cajas), la región codificante cuenta con 1401 pb y traduce una proteína de 467 aminoácidos perteneciente a la familia de proteínas con caja F (De La Chesnaye, *et al*; 2008).

2.3 Proteínas con caja F

Las proteínas con caja F pertenecen a un complejo protéico conocido como SCF-E3 ubiquitina-ligasa, donde participan en el reconocimiento de algunas proteínas para su posterior degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés) (Skaar, *et. al.*; 2013).

El compuesto SCF está conformado por Skp1, Cullin, E2 (que es una enzima de conjugación a ubiquitina) y un componente receptor con caja F que activa sustratos. Una vez que una proteína se dirige a la degradación mediada por ubiquitina, se marca con restos de monoubiquitina o poliubiquitina. La conjugación de ubiquitina a la proteína diana se lleva a cabo mediante reacciones enzimáticas: donde E1 actúa como enzima activadora de ubiquitina, E2 como enzima de conjugación de ubiquitina y en algunos casos la proteína diana se modifica antes de unirse a la ubiquitin ligasa E3, la cual cataliza un enlace isopeptídico entre el grupo amino de un residuo de lisina dentro de la proteína diana y el grupo carboxi terminal de la ubiquitina. Posteriormente la proteína con caja F se une a Skp1 mediante su dominio amino-terminal y se enlaza a la proteína blanco a través de

su dominio carboxi-terminal rico en diferentes aminoácidos como leucina, triptófano y ácido aspártico (Zou, et. al. ;2013).

La familia de proteínas con caja F está constituida por muchos miembros, entre ellos: FBXW7, FBXW5, SKP2, FBX09, FBXL2, entre otras (Skaar, et. al.; 2013).

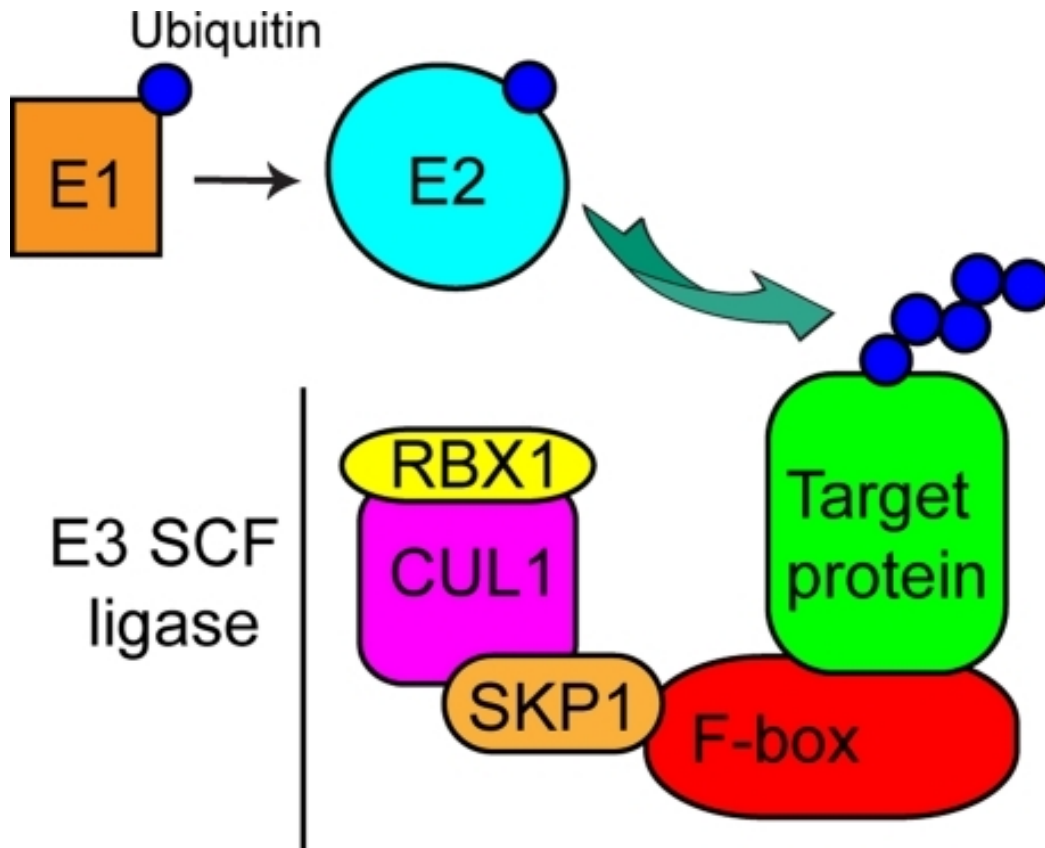


Figura 3. Esquema del complejo SCF. Complejo SCF y representación de la activación enzimática por E1 y la conjugación enzimática por E2. La enzima E1 activa y transfiere ubiquitina a E2, la cual cataliza la conjugación de ubiquitina a la proteína diana que se conjuga a su vez con la proteína de caja F (Price, et. al.; 2010).

En el caso del gen *Fbxw15*, se demostró mediante un estudio en células epiteliales de pulmón de ratón (MLE-12), que este gen se expresa de forma ectópica en dichas células y que regula selectivamente los niveles de proteína Hbo1 (Complejo de origen y reconocimiento de unión a la acetil-transferasa de histonas), la cual es miembro de la familia de la histona acetil-transferasa, y cuya función es iniciar la replicación del DNA mediante la acetilación de las histonas H3

y H4; asimismo recluta a la familia de supresores tumorales Ing (Inhibidor del crecimiento) para regular la proliferación celular. Para que Hbo1 pueda ser reconocido por *Fbxw15*, tiene que ser fosforilado por Mek1 (proteína cinasa activada por mitógeno 1) (Zou, *et. al.*; 2013).

2.4 Factores de transcripción

Un factor de transcripción es, cualquier proteína necesaria para iniciar el proceso de transcripción. Muchos de los factores de transcripción actúan mediante el reconocimiento de posiciones en cis que forman parte de los promotores o intensificadores de los genes. Sin embargo, un factor de transcripción no solo actúa por medio de su unión física al DNA. Un factor puede reconocer a otro factor o a una de las polimerasas de RNA (Guasconi, *et. al.*; 2003).

Los factores de transcripción son capaces de unirse a grupos concretos de secuencias cortas conservadas que se encuentran dentro de cada uno de los promotores de los genes. Algunos de estos elementos y factores son comunes a varios genes, y se encuentran en una cierta variedad de promotores que hace que se utilicen de manera constitutiva. Por el contrario, otros son bastante específicos, lo que hace que su utilización esté bastante regulada (Guasconi, *et. al.*; 2003).

Los factores de transcripción pueden dividirse en tres grupos:

- **Factores generales**, necesarios para el comienzo de la síntesis de RNA a partir de todos los promotores de clase II (genes codificantes). Junto a la Pol RNA II forman un complejo alrededor del punto de inicio de la transcripción, y determinan en punto concreto de inicio de ésta; este complejo constituye el complejo de transcripción basal.
- **Factores corriente arriba**, (upstream) o situados en 5', son proteínas de unión al DNA que reconocen secuencias consenso cortas específicas situadas corriente arriba o en 5' (proximales) del punto de inicio de la transcripción. Estos factores son ubicuos y actúan sobre cualquier promotor que contiene el lugar apropiado de unión al DNA. Su función es incrementar la eficiencia del comienzo de la transcripción.

- **Factores inducibles**, que funcionan de manera semejante a los factores corriente arriba, pero con un papel más regulador. Se sintetizan o activan en momentos específicos en tejidos determinados. Las secuencias a las que se unen se denominan elementos de respuesta (Guasconi, *et. al.*; 2003).

2.5 Factores de transcripción Ets1 y Ap1

En el 2017, Flores caracterizó la región promotora del gen *Fbxw15*, en la cual se identificaron sitios de reconocimiento para algunos factores de transcripción como el factor Ets1, que pertenece a la familia E-twenty six (Ets por sus siglas en inglés); los miembros de esta familia tienen una secuencia conservada de 85 aminoácidos llamada dominio ETS que generalmente se localiza en su extremo carboxi terminal (Levièvre, *et. al.*; 2001). La expresión de los transcritos de Ets1 está asociada con la inducción de la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Asimismo, se han identificado sitios de reconocimiento para Ets1 en los promotores de los genes que codifican para la colagenasa 1, estromelina 1, activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA), MMP9 (gelatinasa B), inhibidor tisular de metaloproteínasa (TIMP1), entre otros, en donde actúa como activador o represor de la actividad transcripcional, dependiendo de los factores de transcripción con los que interactúe (Flores, 2017; Levièvre, *et. al.*, 2001).

Uno de los factores de transcripción que puede participar en sinergia con Ets1 es Ap1, dando como resultado de su interacción, la activación de la transcripción debido a su cercanía dentro de las regiones promotoras de los genes en los que se han encontrado sitios de reconocimiento para ambos y que se mencionaron anteriormente, asimismo, Ets1 también se encontró dentro de la región promotora del gen *Fbxw15* (Levièvre, *et. al.*, 2001 ;Flores, 2017). Ap1, también conocido como c-Jun es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas de activación 1 (AP1 por sus siglas en inglés) y que puede formar dímeros con Fos o ATF (Factor de transcripción de activación) ya que se unen a un sitio de DNA común. Por otra parte, el gen *c-Jun* se expresa en muchos tipos de células a niveles bajos y su expresión se eleva en respuesta a muchos estímulos, incluidos factores de crecimiento, citocinas e irradiación UV (Karin, *et. al.*; 1997).

2.6 Factor de transcripción C/Ebp- β

Se tiene evidencia que tanto Ets1 como Ap1 pueden interactuar con el factor de transcripción C/Ebp- β (por sus siglas en inglés “CCAAT/ enhacer-binding protein beta”); que se caracteriza por el dominio bZIP compuesto por dos elementos funcionales, es decir, una región básica de unión a DNA y una cremallera de leucina, necesaria para formar una interfaz de dimerización (Sterneck, *et. al.*, 1997; Takiguchi, 1998).

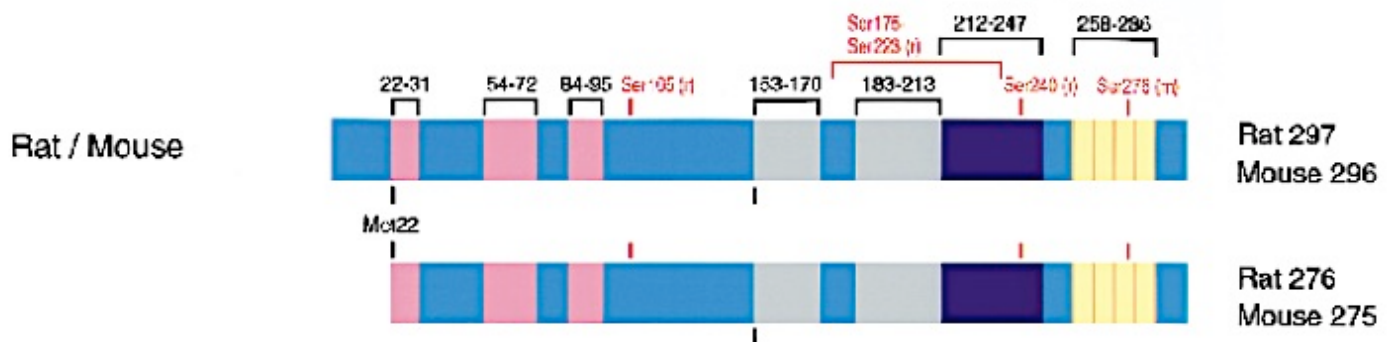


Figura 4. Secuencia de aminoácidos codificada por el gen C/Ebp- β en rata y ratón.

Los cuadros de colores representan lo siguiente: rosa, dominio de activación; gris, dominio de inhibición; violeta, secuencia desviada de la región básica en C/EBP β ; amarillo con barras anaranjadas, dominio de cremallera de leucina; azul claro, secuencia alternativa de C/EBP ϵ . En la rata esta secuencia de aminoácidos va de 276 a 297 y en el ratón de 275 a 296 (Takiguchi, 1998).

Los miembros de la familia C/EBP pueden formar homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia y heterodimerizar también con otros miembros de la familia de proteínas bZIP (Takiguchi, 1998).

Se ha comprobado que C/Ebp- β en ratones es esencial tanto para el proceso de ovulación como para el de luteinización (Ren, *et. al.*; 2016).

2.7 Mutagénesis sitio dirigida

Para este trabajo se utilizó la técnica de mutagénesis sitio dirigida mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), el uso de la PCR en mutagénesis sitio-dirigida logra la separación de las hebras complementarias de DNA, usando un paso de desnaturalización, permitiendo que el plásmido con una hebra de DNA del gen que va a ser mutado, sea apareado con un fragmento de DNA complementario que contiene la mutación que será incorporada, lo cual implica que una segunda cadena de DNA se sintetiza enzimáticamente a partir de la primera cadena, usando el oligonucleótido como iniciador para incorporar la mutación. El gen de interés es amplificado con una DNA polimerasa en condiciones donde la fidelidad transcripcional es baja y se introducen errores en las copias generadas (Cortazar y Silva, 2004; Soberón y Montero, 2006).

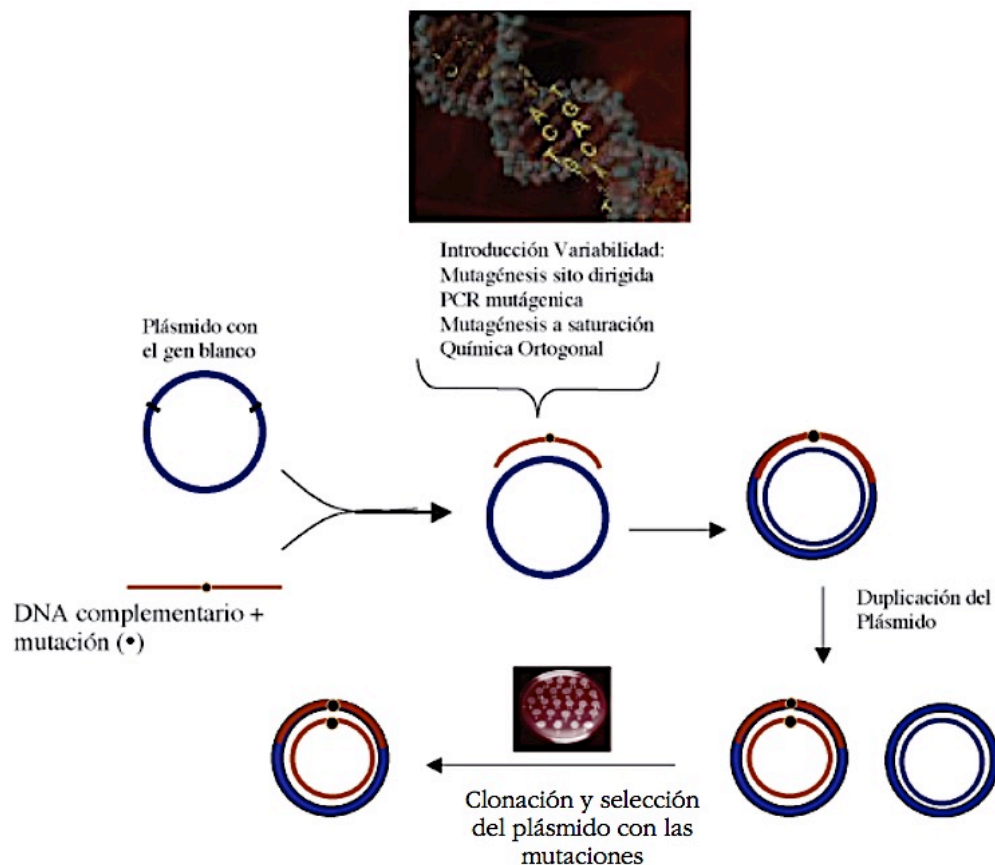


Figura 5. Representación esquemática de la técnica de mutagénesis sitio dirigida.

Mutagénesis sitio dirigida a partir de un plásmido con el gen blanco al cual se acopla un DNA complementario que ya tiene una mutación incluida en su secuencia, el plásmido se

duplica para posteriormente poder clonar y seleccionar los plásmidos que contengan las mutaciones (Soberón y Montero; 2006).

El gen de interés es amplificado con una DNA polimerasa en condiciones donde la fidelidad transcripcional es baja y se introducen errores en las copias generadas. Esta mutación puede ser el reemplazo, eliminación o inserción de uno o más nucleótidos; el único requerimiento es que los segmentos complementarios flanqueantes a los oligonucleótidos sean lo suficientemente largos para permitir que se apareen específicamente al plásmido (Cortazar y Silva, 2004; Soberón y Montero, 2006).

En este trabajo se realizó la mutagenesis del sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1.

2.8 Plásmido pRL-null y pCMV6-Entry

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se han encontrado esencialmente en todos los tipos de bacterias estudiadas hasta la fecha. Dependiendo de su tamaño pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas. Sin embargo, raramente codifican productos esenciales para el crecimiento celular, tales como RNA polimerasas o enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En cambio, los productos de sus genes generalmente dan a las bacterias una ventaja selectiva bajo ciertas condiciones, gracias a la resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y kanamicina. Los plásmidos varían ampliamente en tamaño, desde miles a cientos de miles de pares de bases (un tamaño comparable al cromosoma bacteriano) y son, con mayor frecuencia, moléculas circulares de DNA de doble cadena (Loeza, *et. al.*, 2004).

Para este trabajo se hizo uso del plásmido pRL-null de 3,320 pb, el cual no contiene enhancers ni promotores, sin embargo, contiene una región de clonación múltiple corriente arriba del gen reportero *R/luc*, que codifica para la luciferasa, para permitir la clonación de cualquier elemento regulador deseado para dirigir la expresión de *Renilla luciferasa*. La enzima luciferasa es un monómero protéico de

36 kDa que no requiere de modificaciones postraduccionales para ejercer su actividad, por lo tanto, esta enzima puede funcionar como gen reportero inmediatamente después de la traducción (Promega, 2018).

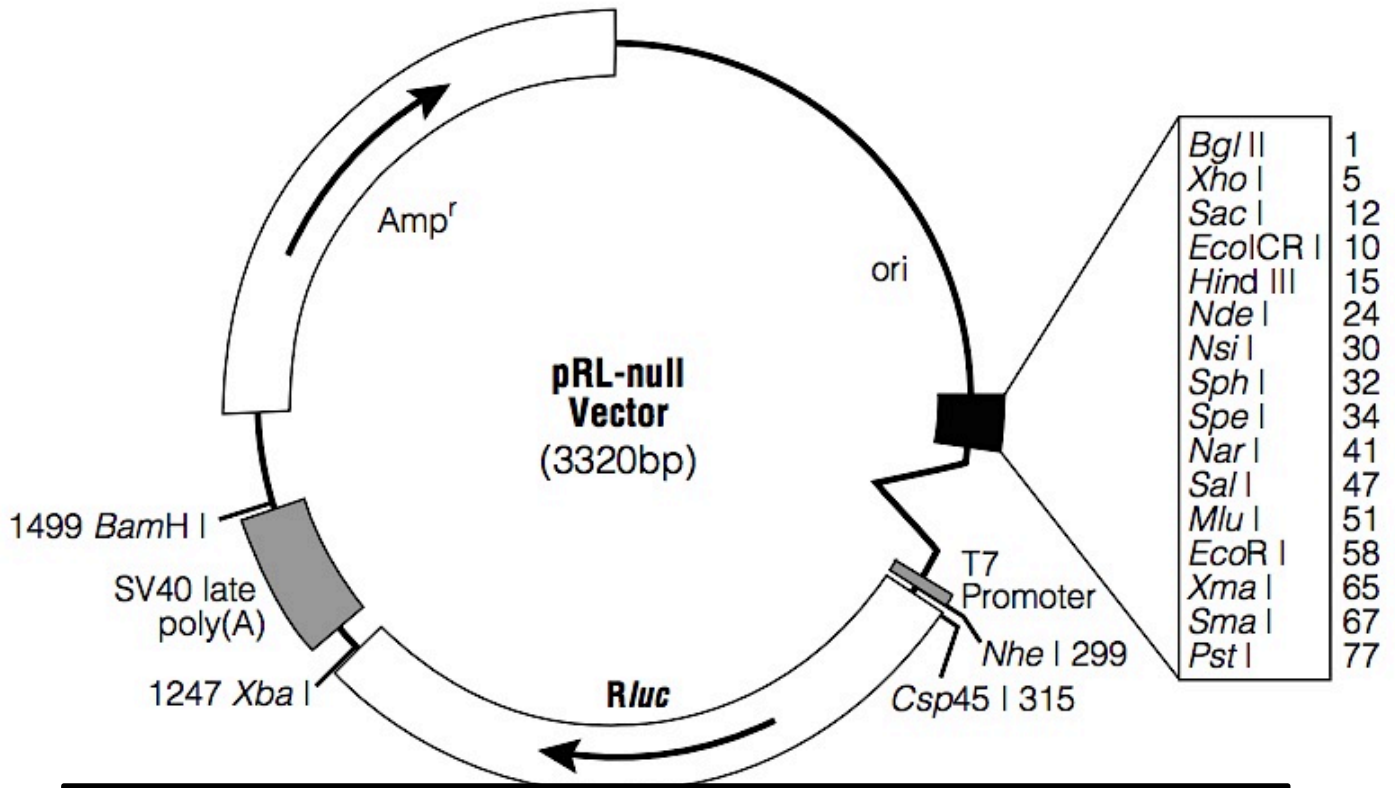


Figura 6. Representación esquemática del vector pRL-null. Puntos de referencia en la secuencia: El recuadro negro en posiciones 1-78 representa el sitio de clonación múltiple, T7 Promoter es el promotor de la RNA polimerasa en posición 281-299, el sitio de iniciación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa se encuentra en el sitio 298, el gen reportero *Rluc* (cDNA que codifica la enzima de *Renilla reniformis*) en 309-1244, señal de poliadenilación tardía SV40 en 1286-1487, región codificadora de β -lactamasa (Amp^r que indica el gen que codifica la resistencia a la ampicilina en *E.coli*) en 1634-2494 y, ori es el origen de la replicación en *E.coli*. Las flechas dentro de los genes *Rluc* y Amp^r indican la dirección de la transcripción, y el símbolo \wedge indica la posición del intrón (Promega, 2018).

Así mismo, se hizo uso del plásmido pCMV6-Entry, el cual contiene un promotor de citomegalovirus, además de tener genes que codifican para la resistencia de Neomicina y Kanamicina, como se muestra a continuación.

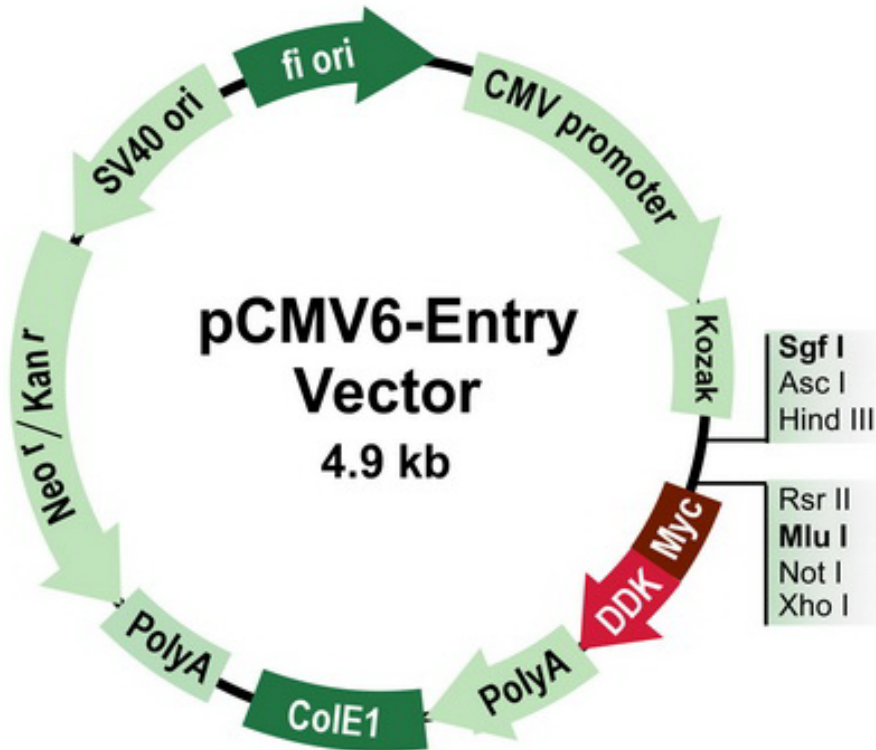


Figura 7. Representación esquemática del vector pCMV6. Puntos de referencia en la secuencia: T7 Promoter es el promotor de la RNA polimerasa en posición 953-971, el sitio de iniciación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa se encuentra en el sitio 972, señal de poliadenilación tardía SV40 en 3998-4300, Kan^r/Neo^r que indican los genes que codifican la resistencia tanto a la Neomicina como a la Kanamicina en 3169-3963. Las flechas dentro de los genes indican la dirección de la transcripción (Amsbio, 2018).

Este vector se utilizó en conjunto con el factor de transcripción a evaluar C/Ebp- β , mientras que el vector pRL-null se utilizó en conjunto con la secuencia del promotor *Fbxw15* que contenía los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción Ap1 y Ets1 después del proceso de mutagénesis.

2.9 Células DH5- α y transformación de células competentes

Escherichia coli (*E. coli*) DH5- α es la cepa bacteriana más usada para aplicaciones de clonación. Son bacterias de crecimiento lento pero que se transforman con elevada eficiencia. Al igual que otras cepas comúnmente utilizadas para clonación molecular, *E. coli* DH5- α tiene muchas características que la hacen útil para los

métodos que implican el empleo de DNA recombinante: la mutación *endA1* inactiva una endonucleasa intracelular que degrada el DNA plasmídico; la mutación *hsdR17* elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación-restricción *EcoKI*, y por lo tanto los fragmentos de DNA que poseen metilaciones en los sitios *EcoKI* no son degradados; y la mutación *recA* elimina la posibilidad de recombinación homóloga (Brea, 2013).

Estas células se utilizaron para llevar a cabo su transformación, lo que implicó introducción de DNA exógeno a una célula bacteriana (Brea, 2013); de tal forma que, las bacterias que contuvieran el plásmido de interés (DNA exógeno) se multiplicarían y se obtuviera, después de una purificación a gran escala mayor concentración del plásmido.

2.10 Células CHO-K1 y transfección celular

La línea celular CHO-K1 es una clona aislada por T.T. Puck en 1957, la cual es variante de la línea celular parental, que se derivó del ovario de un hámster chino adulto. Estas células requieren de prolina debido a la ausencia del gen que la codifica. Asimismo, se sabe que sufren cambios morfológicos en respuesta a la toxina del cólera (Pilili, 2012).

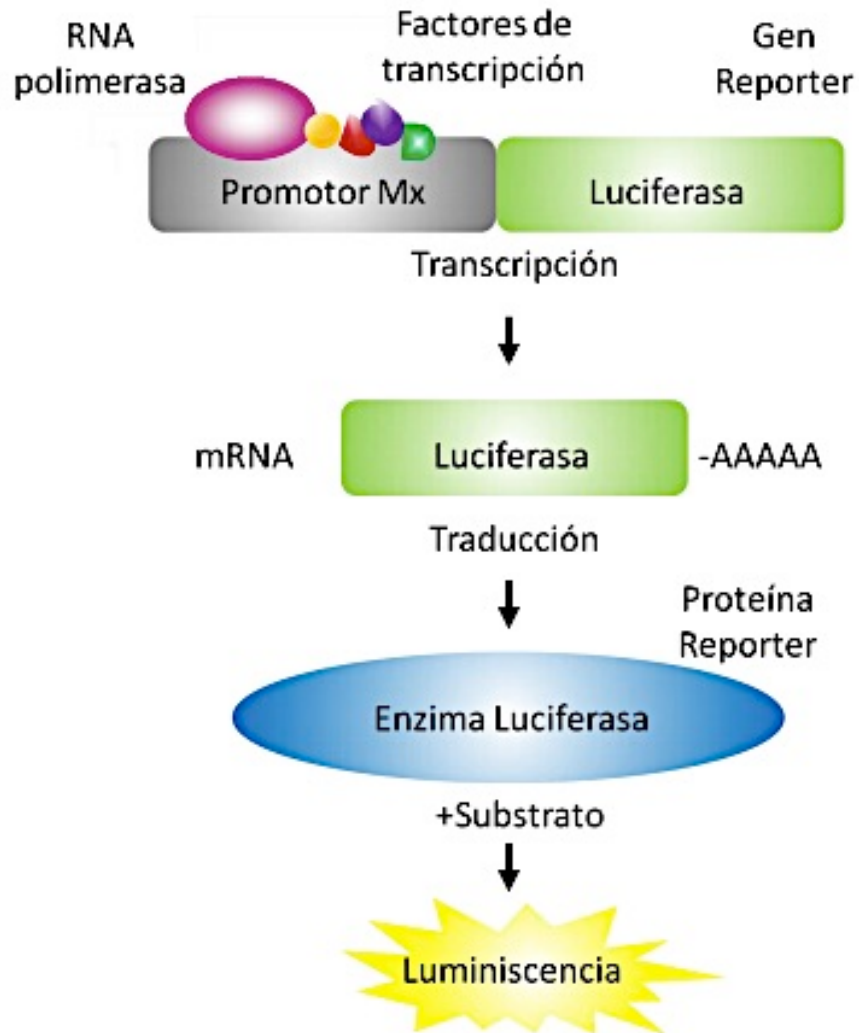
Esta línea celular se utiliza para realizar transfección celular la cual se define como la introducción dentro de una célula eucariota de una molécula de DNA que no pertenece a la célula, lo cual permite ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado una secuencia codificante de un gen reportero (luciferasa, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales (Iglesias, *et.al.*, 2015; Pietrasanta y Von B., 2011).

En este caso, se realizó la co-transfección de células CHO-K1 con los plásmidos recombinantes para los sitios de reconocimiento a Ets1 y Ap1 junto con el factor C/Ebp- β , con la finalidad de observar la participación de estos factores en la actividad transcripcional del promotor del gen *Fbxw15*.

2.11 Ensayo de luciferasa

El ensayo de luciferasa es una herramienta comúnmente usada para el estudio de la expresión génica a nivel transcripcional. Este ensayo se logra gracias a reacciones que permiten generación de luz que se mide con un luminómetro. Las enzimas luciferasa son un conjunto de enzimas oxidativas que median estas reacciones. Son encontradas en varias especies, permitiendo a estos organismos expresar bioluminiscencia, es decir, les permite emitir luz. Entre estas especies encontramos a la *Renilla reniformis* o pensamiento de mar, los copépodos y, la más común, la luciérnaga *Photinus pyralis* (Ilyina, 1998).

Para este ensayo, primero se identifica al promotor del gen de interés, posteriormente se clona río arriba del gen de la luciferasa. Esto se agrega a un plásmido que ingresa a la célula a través de transfección o transformación. Ya en la célula el gen de la luciferasa se transcribe proporcionalmente a cómo lo haría el gen de interés, pues comparten los requerimientos para su transcripción gracias al factor promotor. Este RNA mensajero se traduce normalmente en un ribosoma dando la enzima reportera luciferasa. Luego se cultivan las células y se someten a una sustancia que provoca la lisis celular, dejando la luciferasa libre. La luciferasa cataliza la reacción de la luciferina y ATP (estos sustratos podrían venir en conjunto con la sustancia que provoca la lisis celular) formando AMP, oxiluciferina y luz. Finalmente la cantidad de luz se puede cuantificar con un luminómetro (Ilyina, *et. al.*; 1998).



Señal de Luz=Expresión de Luciferasa= Actividad del promotor

Figura 8. Representación esquemática del ensayo de luciferasa. Esquema del uso del gen luciferasa para analizar la actividad de secuencias promotoras a modo de gen reporter. (González, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la interacción entre los factores de transcripción Ets y Ap1 con C/Ebp- β llevando a cabo técnicas de bioinformática y biología molecular para corroborar que dicha interacción aumenta la actividad transcripcional del promotor del gen *Fbxw15*.

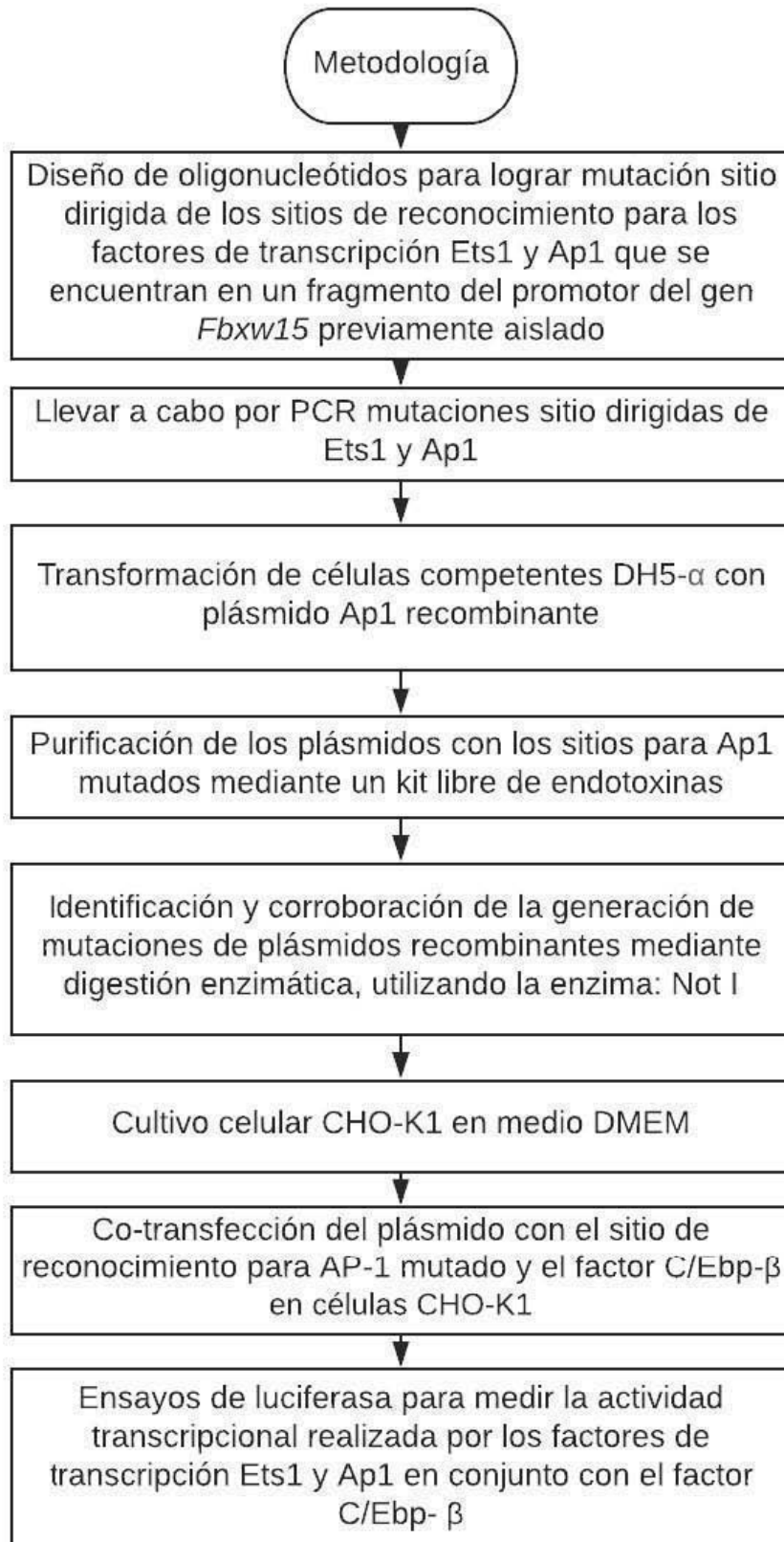
3.2 Objetivos específicos

- Generar mediante PCR mutaciones puntuales en los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción Ets1 y Ap1 localizados en el promotor del gen *Fbxw15*.
- Llevar a cabo la co-transfección de células CHO-K1 con los plásmidos recombinantes para los sitios de reconocimiento a Ets1 y Ap1 junto con el factor C/Ebp- β .
- Determinar si existe interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con C/Ebp- β para activar transcripcionalmente al promotor del gen *Fbxw15* mediante el ensayo de luciferasa.

4. HIPÓTESIS

Los factores de transcripción Ets y Ap1 interactúan respectivamente con el factor C/Ebp- β aumentando la actividad transcripcional de un fragmento del promotor del gen *Fbxw15*.

5. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



6. METODOLOGÍA

6.1 Análisis bioinformático

Se propusieron 2 mutagénesis de un fragmento de la región 5' UTR del gen *Fbxw15* (D3) empleando oligonucleótidos (Tabla 1) diseñados específicamente para esto. Así mismo, se realizó el análisis bioinformático mediante “OligoAnalyzer” para corroborar que estos oligonucleótidos cumplieran con las características requeridas para la mutagénesis, mencionadas a continuación:

- Ambos oligonucleótidos mutagénicos debían contener la mutación deseada en la misma secuencia en cadenas opuestas del plásmido.
- Debían tener una longitud de entre 25 y 45 bases nitrogenadas, con una temperatura de fusión (T_m) de $\geq 78^\circ\text{C}$.
- La mutación deseada (delección o inserción) debía estar en el medio del oligonucleótido con ~ 10 -15 bases nitrogenadas de secuencia correcta en ambos lados.
- Debían tener un porcentaje mínimo de G-C del 40%

Por otro lado, la secuencia del fragmento D3 y el correspondiente alineamiento con los oligonucleótidos mutagénicos se analizó con el programa de computación “NEBcutter”, para obtener las predicciones de las digestiones enzimáticas que se obtendrían para corroborar que se llevaron a cabo las mutaciones.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para mutagénesis sitio dirigida en los sitios de reconocimiento para Ets1 y Ap1

Sitios de reconocimiento	Secuencia
Ets1	5'-3' GCTGGGTTCCCTTGGGTTATTGTTGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTC 3'-5' GAGTAGATGAGCTCAACAACCCCAACAATAACCCAAGGAACCCAGC
	5'-3' GGTCTCCACAGTGCC AGGTACCA GGGGTTGTTGAGC 3'-5' GCTCAACAACCC TGGTACCT TGGCACTGTGGAGACC
Ap1	5'-3' CACTGTGCAGT GCGGCCGCT TAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTG 3'-5' CACTCAGCTGAGAGTGCTCACACCTTA AGCGGCCGC ACTGCACAGTG

6.2 Mutagénesis sitio dirigida en los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción Ets1 y Ap1

Las mutagénesis sitio dirigidas se llevaron a cabo utilizando el paquete comercial de mutagénesis “QuikChange Lightning Site-Directed” (Agilent Technologies, SC, EUA) de la siguiente manera: en el caso de la mutagénesis para el sitio de reconocimiento para Ap1 se colocó en un tubo para PCR se añadió 1µl de buffer de reacción 10X, 1µl (50 ng) de templado (pRL-null/*Fbxw15*), 0.2µl de la mezcla de dNTPs, 0.3 µl reactivo “QuikSolution”, 6.7µl de dH₂O y por último 0.2µl de la enzima “QuickChange Lightning” para completar una reacción con un volumen total de 9µl. De esta mezcla inicial se tomaron 4.5µl y se colocaron en dos tubos para PCR nuevos por separado. Posteriormente a uno de los tubos se le agregó 0.5µl (125ng) del oligonucleótido sentido y al otro 0.5µl (125ng) del oligonucleótido antisentido correspondientes específicos para cada mutagénesis. Una vez agregados los oligonucleótidos en cada tubo, éstos se colocaron en un termociclador y se llevó a cabo una reacción de amplificación con los siguientes parámetros:

Tabla 2. Parámetros para la mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1.

Segmento	Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	5 min
2	18	95°C	20 s
		60°C	10 s
		68°C	3 min
3	1	68°C	5 min

La reacción en los tubos prosiguió hasta terminado el quinto ciclo de la PCR y posteriormente se pausó la reacción para juntar el contenido de ambos tubos en uno solo, para después continuar la reacción hasta su terminación.

Para llevar a cabo la mutagénesis en el sitio de reconocimiento para el factor Ets1 se colocó en un tubo para PCR se añadió 1µl de buffer de reacción 10X, 1µl (50

ng) de templado (pRL-null/*Fbxw15*), 0.2µl de la mezcla de dNTPs, 0.3 µl reactivo QuikSolution, 5.5 µl de dH₂O y por último 1µl de la enzima Long PCR Enzyme Mix para completar una reacción con un volumen total de 9µl. De esta mezcla inicial se tomaron 4.5µl y se colocaron en dos tubos para PCR nuevos por separado. Posteriormente a uno de los tubos se le agregó 0.5µl (125ng) del oligonucleótido sentido y al otro 0.5µl (125ng) del oligonucleótido antisentido específicos para esta mutagénesis. Una vez agregados los oligonucleótidos en cada tubo, éstos se colocaron en un termociclador y se llevó a cabo una reacción de amplificación con los siguientes parámetros:

Tabla 3. Parámetros para la mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1.

Segmento	Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	5 min
2	18	95°C	20 s
		55°C	10 s
		68°C	3 min
3	1	68°C	5 min

La reacción en los tubos prosiguió hasta terminado el quinto ciclo de la PCR y posteriormente se pausó la reacción para juntar el contenido de ambos tubos en uno solo, para después continuar la reacción hasta su terminación. Para esta mutagénesis en particular, se utilizaron dos pares de oligonucleótidos diferentes en reacciones por separado (Tabla 1).

Posteriormente, se llevó a cabo una digestión enzimática del producto de ambas PCR con la enzima *Dpn1* que se incluye en el kit. A cada uno de los dos tubos se le adicionaron 0.4µl de esta enzima y cada reacción se incubó a 37°C por 30min.

6.3 Transformación de células competentes DH5- α

Una vez transcurrida la digestión enzimática se continuó con la transformación de las células competentes DH5- α mediante choque térmico de la siguiente manera.

Se tomaron dos tubos cónicos Eppendorf y a cada uno se le agregaron 2µl de β-mercaptoetanol incluido en el paquete comercial de mutagénesis QuikChange Lightning Site-Directed y 45µl de células competentes DH5-α previamente descongeladas. Ambos tubos se mezclaron gentilmente y se incubaron durante 2 minutos en hielo para posteriormente agregar a cada uno 2µl del producto de PCR (Ets1 y Ap1 respectivamente). Posterior a esto, ambos tubos se incubaron en hielo durante 30 min. Luego se agregaron 300µl de medio LB previamente calentado a 42°C y finalmente los tubos se incubaron a 37°C por 1 h con agitación constante a 250rpm.

Posteriormente, se utilizó un volumen de 150µl de las células transformadas de ambas reacciones de mutagénesis sitio dirigidas más un control negativo para cada una (células competentes transformadas con agua en lugar del plásmido), se sembraron en medio sólido LB con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C durante toda la noche para su selección. Al día siguiente, las colonias positivas para cada una de las eliminaciones se inocularon en 5ml de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/mL) para su crecimiento y proliferación, y se incubaron a 37°C con agitación a 250 rpm durante 16h. Posteriormente, con la finalidad de generar una pastilla celular, 3 ml de cada cultivo se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200 µl de solución de lisis I fría. Se continuó con la adición de 400µL de solución II (desnaturalizante) y se agitó vigorosamente para después incubar 2 min en hielo. Finalmente, se agregaron 300µl de solución III (sol. de acetatos) que se mezcló 5 veces por inversión, luego se incubó en hielo 5 min para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C.

El sobrenadante del procedimiento anterior se pasó a un tubo nuevo, al cual se le agregó el mismo volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (1:1:4), se mezcló con vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min a 4°C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo al cual se le añadieron 600µl de isopropanol a temperatura ambiente, y se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente. Luego se colectó el sobrenadante por aspiración y se drenó el tubo en posición invertida. Una vez semiseco el tubo y observándose la pastilla de DNA,

se agregó 1ml de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Nuevamente se removió el sobrenadante, se dejó secar y una vez seco el tubo, se adicionó 100µl de dH₂O libre de DNAsa. El plásmido obtenido de cada mutagénesis sitio dirigida se cuantificó en un NanoDrop utilizando un rango de absorbancia de 260/280nm y una dilución de 1:100.

La integridad e identidad de las mutaciones sitio dirigidas correspondientes, se corroboraron mediante restricción enzimática utilizando las enzimas que flanquean el inserto (*XbaI*, *KpnI* y *NotI* respectivamente). Para ello, se colocaron 500 ng de DNA plasmídico de la mutagénesis para Ets1 generada con el primer par de oligonucleótidos (Tabla 1), 1µl de la enzima *XbaI*, 1µl del buffer correspondiente y la cantidad necesaria de dH₂O para completar la reacción a un volumen total de 12µl. Para la segunda reacción de restricción para Ets1 se colocaron 500 ng de DNA plasmídico de la mutagénesis realizada con el segundo par de oligonucleótidos (Tabla 1), 1µl de la enzima *KpnI*, 1µl del buffer correspondiente y la cantidad necesaria de dH₂O para completar la reacción a un volumen total de 12µl. Por otro lado se colocaron 500ng del DNA plasmídico de la mutagénesis de Ap1, 1µl de la enzima *Not1*, 1µl de buffer Green y la cantidad necesaria de dH₂O para completar la reacción a un volumen total de 12µl. Cada reacción se incubó a 37°C por 2h. Los productos de las reacciones de digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Además se verificaron las secuencias de las construcciones obtenidas, empleando un secuenciador automático (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

6.4 Purificación de plásmidos recombinantes

La extracción y purificación de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo por "Maxiprep" utilizando el kit comercial "EndoFree Plasmid Purification" (QIAGEN, EUA) de la siguiente manera: Se inoculó 1ml de cultivo bacteriano en 100ml de medio LB, se dejó incubando a 37°C toda la noche, posteriormente se centrifugó a 6000g durante 15 min a 4°C descartando el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacterial en 10ml de buffer P1. A esto se le adicionaron 10ml de buffer P2, mezclando por inversión de 4 a 6 veces y se incubó durante 5 min a temperatura

ambiente. Durante la incubación, se colocó la tapa del “QIAfilter Cartridge” en la boquilla de salida del mismo (se colocó el “QIAfilter Cartridge” en otro tubo). Se añadieron 10ml de buffer P3 frío, mezclando por inversión de 4 a 6 veces. Después se vertió el lisado en el depósito del “QIAfilter Cartridge” y se dejó incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró el lisado celular en un tubo de 50ml. A este lisado se le agregaron 2.5ml de buffer ER y se mezcló por inversión 10 veces para dejar incubando en hielo durante 30 min. Se equilibró un “QIAGEN-tip 500” adicionando 10ml de buffer QBT y dejando que el buffer humedeciera la columna por gravedad. Se adicionó el filtrado en el “QIAGEN-tip” y se dejó filtrar. (El DNA plasmídico quedó en la columna). Para lavar el cartucho se utilizaron 30ml de buffer QC y este paso se llevó a cabo por duplicado. Después se dejó eluir el DNA con 15ml de buffer QN precalentado en un tubo libre de pirógenos y endotoxinas; para posteriormente precipitar el DNA, agregando 10.5ml de isopropanol y mezclar. Lo anterior se centrifugó a 15000g durante 30 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se lavó el pellet de DNA con 5ml de etanol al 70% y se centrifugó a 15,000g durante 10 minutos. Por último se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet 10 minutos para finalmente resuspender el DNA en 1ml de buffer TE.

6.5 Cultivo celular y transfecciones

Se utilizó la línea celular CHO-K1 que deriva del epitelio ovárico de hámster chino, para evaluar la posible interacción entre los factores Ets1 y AP1 con C/Ebp- β en el promotor del gen *Fbxw15* y así poder determinar la actividad transcripcional generada por dicha interacción. La línea celular se mantuvo en medio “DMEM High-Glucose” (Dulbecco’s modified Eagle’s medium, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), el cual se suplementó con suero fetal bovino (Bioproduct, Guadalajara, México) al 10%, L-glutamina al 1%, piruvato de sodio al 1%, y penicilina (100 U/mL)/estreptomycin (100 U/mL), a un pH de 8, en un ambiente de 5% CO₂ a 37 °C. Para realizar las transfecciones, las células CHO-K1 se sembraron en placas de cultivo con 24 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Inicialmente se sembraron 1.5×10^5 células, que posteriormente se transfectaron con 1 μ g de cada

construcción (pRL/*Fbxw15*, D3 correspondiente a un fragmento de la región 5' UTR del gen *Fbxw15* previamente aislado y mutado, en el sitio de reconocimiento para Ap1 con y sin C/Ebp- β y el fragmento parental D3 con C/Ebp- β) empleando el paquete comercial "TurboFect Transfection Reagent" (Thermo Scientific, Rockford Illinois, EUA). Asimismo en otro tubo, además de los plásmidos que contienen las eliminaciones, se colocaron 100 μ l de medio DMEM-HG sin suplementar y 4 ng del plásmido pGL3/CMV. Este último se utilizó como control interno ya que contiene el gen reportero luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) y el promotor del citomegalovirus (CMV), el cual genera un alto nivel de expresión del gen reportero (luciferasa). Los componentes de cada reacción de transfección se mezclaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

De igual forma, en otro tubo se agregaron 100 μ l de medio DMEM-HG sin suplementar y 2 μ l de "TurboFect Transfection Reagent", los componentes se mezclaron y se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el contenido de ambos tubos (medio + construcción y medio + agente de transfección) se mezcló y se dejó reposar nuevamente durante 15 min a temperatura ambiente. Es en este paso, donde la formación de los complejos DNA-TurboFect se lleva a cabo. Posteriormente se adicionó la mezcla por goteo a las células cultivadas en los pozos de la placa. Las células de cada pozo se lavaron con 1 ml de PBS para posteriormente agregar 1 ml de medio DMEM-HG sin suplementar y por goteo se agregó la mezcla que contiene los complejos de transfección. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 h.

Para los ensayos de co-transfección se siguió la misma metodología antes mencionada, agregando además del plásmido con las mutagénesis generadas, el vector de expresión pCMV6-Entry (100ng/ μ l) que contiene el cDNA del gen C/Ebp- β de ratón (NCBI Sequence: NM_009883.4), clonado de TrueClone (OriGene Technologies, Rockville, MD, EUA). Como controles negativos y positivos se utilizaron los vectores pRL-null y pGL3 basic.

6.6 Ensayos de luciferasa

Al término de las 48 h de incubación con las reacciones de transfección, el medio se aspiró y las células se lisaron utilizando un buffer de lisis pasiva PLB 5X, incluido en el paquete comercial “Dual-Luciferase Reporter Assay System” (Promega, Madison, WI, EUA), del cual se agregaron a cada pozo 100 µl al 1X. La placa se agitó durante 15 min a temperatura ambiente, después el lisado se recuperó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se procedió a determinar la actividad enzimática de la luciferasa de *Renilla reniformis*. Los valores obtenidos se normalizaron con los correspondientes a la actividad enzimática de la luciferasa de *Photinus pyralis*. La cuantificación de la luminiscencia producida por *P. pyralis*, se llevó a cabo utilizando un multidetector Victor III (Applied Biosystems), al colocar 30 µl del lisado en una placa opaca para luminómetro y 30 µl del reactivo LARII. Posteriormente, para medir la actividad de *R. reniformis* se agregaron 30 µl del reactivo “Stop & Glo” (Promega). Cada ensayo se realizó por triplicado.

6.6 Análisis de los datos

Realizadas las dos medidas, la actividad luciferasa o RLA (“Relative Luciferase Activity”) de cada pocillo se normalizó con los valores obtenidos con *Renilla reniformis*. De este modo se obtuvieron los valores RLU (“Relative Luciferase Units”) de cada pocillo. A continuación, los valores RLU obtenidos fueron relativizados con los valores obtenidos en los controles positivo y negativo, obteniendo los valores RRR (“Relative Response Ratio”) según la fórmula que se muestra a continuación:

$$RLU = \frac{RLA \text{ Luciferasa}}{Rla \text{ Renilla}}; RRR = \frac{(RLU \text{ experimental}) - (RLU C-)}{(RLU C+) - (RLU C-)}$$
$$(RLU C-) = pRL - NULL$$
$$(RLU C+) = pGL3/CMV$$

Para establecer las diferencias estadísticas entre los datos obtenidos, se llevó a cabo la prueba t de Student (P<0.05).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis bioinformático de la región del promotor *Fbxw15*

Para obtener las predicciones de los fragmentos obtenidos cuando los plásmidos recombinantes fueran sometidos a digestión enzimática con las enzimas correspondientes, la secuencia específica para el fragmento D3 del promotor *Fbxw15* proporcionada por la Dra. Elsa de la Chesnaye se analizó con el programa “Nebcutter”.

```
5'CTCTGCTGGGTTCCCTGGGTTATTGTTGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCGCTGGGTTCC  
CTTGGGTTATTGTTGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGTGAAAATCACTGTGCAGTGAG  
TTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTTTCTGGTTCCAGTGAGTGGGGGCTTGGAGT  
CAGGCTGAGCGTCTACACAGCTGCAGCTTTCTCCAGTCAAAGTCTGATGAGCTGTGGTC  
GGCAATCCTGTGAAATCTTTGGCCAAGTCTTTAAAATCAGAGCAAGCTGGGGAGGAGAA  
AGAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCACTGAAGATGGCGATCCATTTACCTTGTTTGCCG  
AAGCT -3'
```

Figura 9. Secuencia del fragmento D3 con la mutación sitio dirigida para el sitio de reconocimiento al factor de transcripción Ets1 con el primer par de oligonucleótidos (Tabla 1).

```
5'CTCTGCTGGGTTCCCTGGGTTATTGTTCCCTGTTGAAAATTAGTGTGCTACTCAGAATTTT  
CTAGAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAGCCCCAGATCATGTGCTTTTGGT  
CTCCACAGTGCCAGGTACAGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGTGAAAATCACTGTG  
CAGTGAGTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTTTCTGGTTCCAGTGAGTGGGGGC  
TTGGAGTCAGGCTGAGCGTCTACACAGCTGCAGCTTTCTCCAGTCAAAGTCTGATGAGC  
TGTGGTCGGCAATCCTGTGAAATCTTTGGCCAAGTCTTTAAAATCAGAGCAAGCTGGGG  
AGGAGAAAGAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCACTGAAGATGGCGATCCATTTACCTTG  
TTTGCCGAAGCT -3'
```

Figura 10. Secuencia del fragmento D3 con la mutación sitio dirigida para el sitio de reconocimiento al factor de transcripción Ets1 con el segundo par de oligonucleótidos (Tabla 1).

```

5'-CTCTGCTGGGTTCCCTTGGGTTATTGTTCCCTGTTGAAAATTAGTGTGCTACTCAGAATTT
TCTAGAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAGCCCCAGATCATGTGCTTTTGG
TCTCCACAGTGCCAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGTGAAAATCACTGTGCA
GTGCGGCCGTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGTTTCTGGTTCCAGTGAGTGGG
GGCTTGGAGTCAGGCTGAGCGTCTACACAGCTGCAGCTTTCTCCAGTCAAAGTCTGATG
AGCTGTGGTCGGCAATCCTGTGAAATCTTTGGCCAAGTCTTTAAAATCAGAGCAAGCTG
GGGAGGAGAAAGAAGAGTCAGTGTGGACTTAGGCCACTGAAGATGGCGATCCATTTAC
CTTGTTTGCCGAAGCT-3'

```

Figura 11. Secuencia del fragmento D3 con la mutación sitio dirigida para el sitio de reconocimiento al factor de transcripción Ap1.

Así mismo, se llevó a cabo el análisis bioinformático de los oligonucleótidos utilizados para el presente estudio, de tal forma que, se corroborara que los tres pares cumplieran con los requisitos enunciados en la metodología. Con base en dichos parámetros, se determinó que todos los oligonucleótidos cumplieran con lo necesario, por lo cual fueron utilizados para las mutagénesis sitio dirigidas con la finalidad de obtener los plásmidos recombinantes necesarios.

Tabla 4. Primer par de oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento para Ets1.

Sitio de reconocimiento	Secuencia
Ets1	5'-3' GCTGGGTTCCCTTGGGTTATTGTTGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTC 3'-5' GAGTAGATGAGCTCAACAACCCCAACAATAACCCAAGGAACCCAGC

Tabla 5. Parámetros analizados en el programa de computación "OligoAnalyzer" para los primeros oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1.

Parámetro	Resultado
Longitud	46 pb
Contenido G-C	50%
Tm	87°C
Tipo de mutación	del



Figura 12. Representación esquemática del análisis por restricción enzimática de la mutación sitio dirigida en el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1 con el primer par de oligonucleótidos. Se llevó a cabo un análisis bioinformático en “NEBcutter” (BioLabs, Nueva Inglaterra, EUA) para realizar la predicciones de los fragmentos que se obtendrían en el gel de electroforesis después de digerir con la enzima XbaI la muestra que había sido resultado de la mutagénesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento Ets1. Con lo cual se determinó que se tenían que obtener dos fragmento: un fragmento de 3,674 pb en el caso de la muestra con mutagénesis (gel derecho); mientras que en el caso de la muestra que no tuviera mutagénesis en el sitio se tendrían que obtener dos fragmentos: uno de 2,134 pb y otro de 1,604 pb (gel izquierdo).

Tabla 6. Segundo par de oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1.

Sitio de reconocimiento	Secuencia
Ets1	5'-3' GGTCTCCACAGTGCC GGTACCA GGGGTTGTTGAGC 3'-5' GCTCAACAACCC TGGTACCT TGGCACTGTGGAGACC

Tabla 7. Parámetros analizados en OligoAnalyzer para los segundos oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ets1.

Parámetro	Resultado
Longitud	36pb
Contenido G-C	61.1%
Tm	69.9 °C
Tipo de mutación	135_136insT 136_137insCC

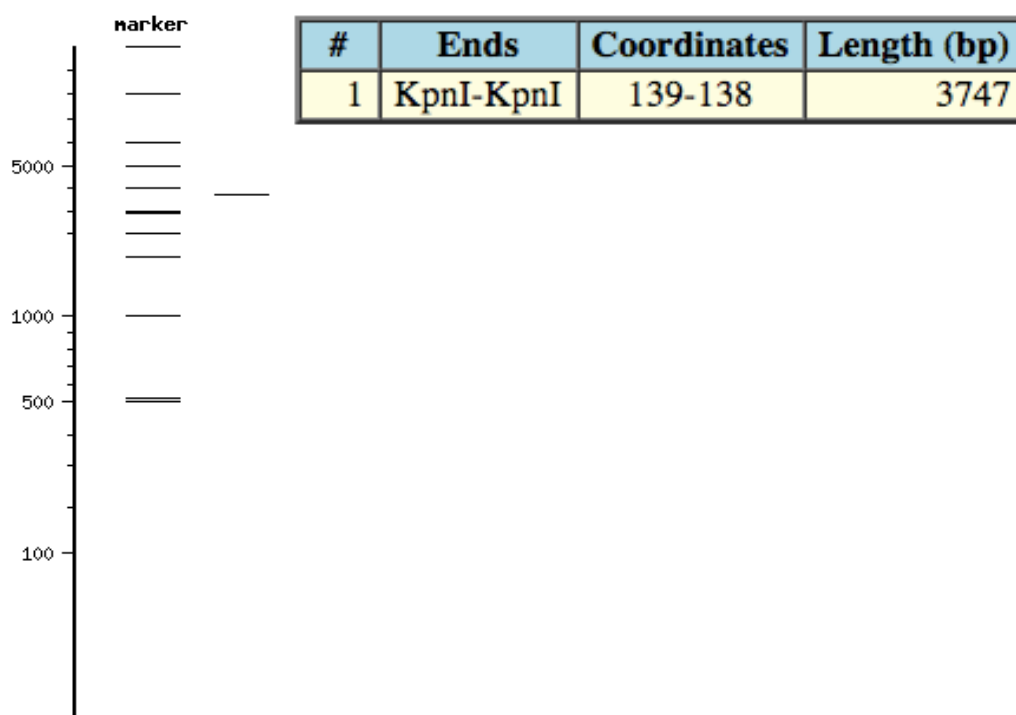


Figura 13. Representación esquemática del análisis por restricción enzimática de la mutación sitio dirigida en el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1 con el segundo par de oligonucleótidos. Se llevó a cabo un análisis bioinformático en “NEBcutter” (BioLabs, Nueva Inglaterra, EUA) para obtener la predicción del fragmento que se obtendría en el gel de electroforesis después de digerir con la enzima KpnI la muestra que había sido resultado de la mutagénesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento Ets1. Con lo cual se determinó que se tenían que obtener un fragmento de 3,747 pb, producto de la linearización del plásmido.

Tabla 8. Oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ap1.

Sitio de reconocimiento	Secuencia
Ap1	5'-3' CACTGTGCAGT GCGGCCGCT TAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTG 3'-5' CACTCAGCTGAGAGTGCTCACACCTTA AGCGGCCGC ACTGCACAGTG

Tabla 9. Parámetros analizados en “OligoAnalyzer” para los oligonucleótidos mutagénicos diseñados para el sitio de reconocimiento Ap1.

Parámetro	Resultado
Longitud	47 pb
Contenido G-C	59.6%
Tm	91.6°C
Tipo de mutación	182A>C 183_184insGCCGC

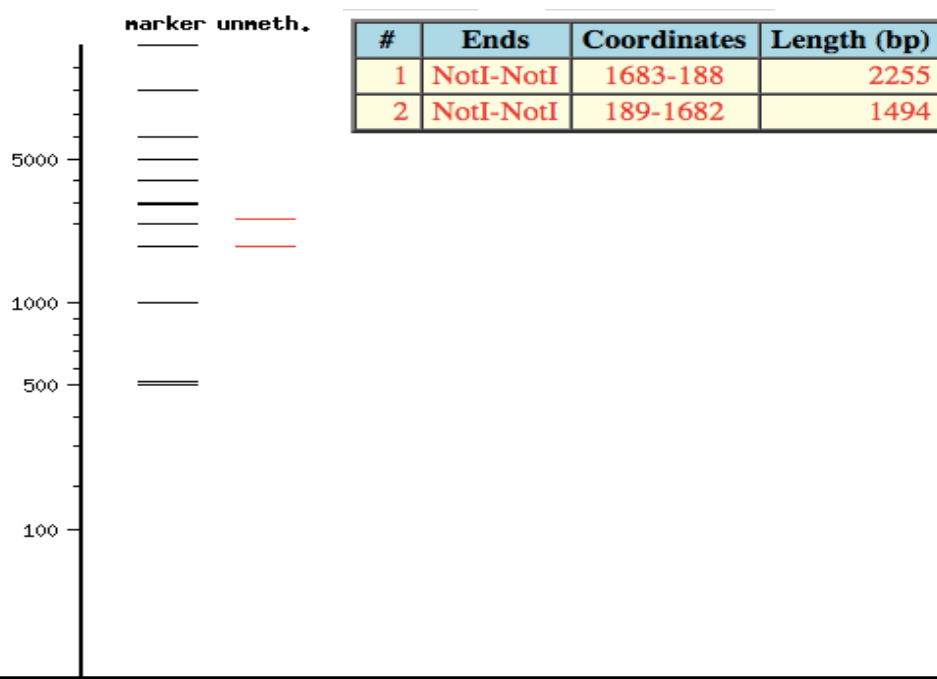


Figura 14. Representación esquemática del análisis por restricción enzimática de la mutación sitio dirigida en el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1. Se llevó a cabo un análisis bioinformático en “NEBcutter” (BioLabs, Nueva

Inglaterra, EUA) para realizar la predicciones de los fragmentos que se obtendrían en el gel de electroforesis después de digerir con la enzima NotI la muestra que había sido resultado de la mutagénesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento para Ap1. Con lo cual se determinó que se tenían que obtener dos fragmento: uno de 2,255pb y otro de 1,494 pb.

7.2 Mutagénesis sitio dirigida en los sitios de reconocimiento para los factores de transcripción Ets1 y Ap1

Para determinar que amplificó el plásmido recombinante se hizo un gel de agarosa para una electroforesis con las muestras mutantes para el sitio de reconocimiento para AP1, como se muestra a continuación, se logró la amplificación del plásmido (Carriles 2, 3 y 4) y para corroborar que se hubiera conservado el tamaño del plásmido se corrió una muestra del plásmido parental (D3) (Carril 1).

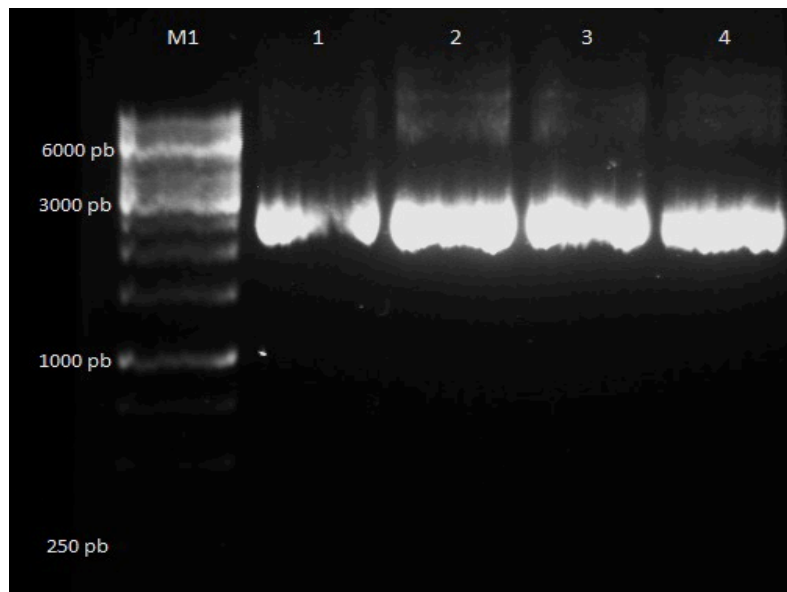


Figura 15. Patrón de electroforesis horizontal de DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1.2%, 50 V por 1 h, en tampón TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. M1: Marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Rockford Illinois, EUA). Carril 1:pRL/*Fbxw15*-D3. Carriles 2, 3 y 4: pRL/*Fbxw15*-D3 mutantes para el sitio de reconocimiento para Ap1.

Por otro lado, para evaluar que realmente se había obtenido el plásmido mutante, las muestras se sometieron a digestión enzimática con la enzima NotI, de tal forma que se obtuvieron los siguientes fragmentos después del corte con la enzima:

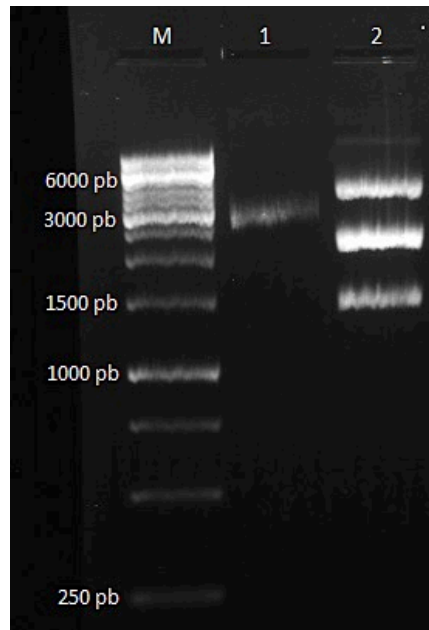


Figura 16. Patrón de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.2% de la restricción enzimática con Not1 del sitio de reconocimiento mutado para el factor de transcripción Ap1, 50 V por 1 h, en tampón TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador “GeneRuler 1 kb DNA Ladder” (Thermo Scientific, Rockford Illinois, EUA). Carril 1: pRL/*Fbxw15*-D3-Ap1 mutado sin restricción enzimática. Carril 2: Digestión enzimática de pRL/*Fbxw15*-D3-Ap1 mutado con la enzima Not1.

Para el caso del sitio de reconocimiento para Ets1, las mutagénesis sitio dirigidas con ambos pares de oligonucleótidos (Tabla 1) no se lograron, esto se verificó al realizar la electroforesis de las reacciones en un gel de agarosa al 1.2% (Figura 17), en la cual se puede observar que no hubo amplificación de plásmido recombinante.

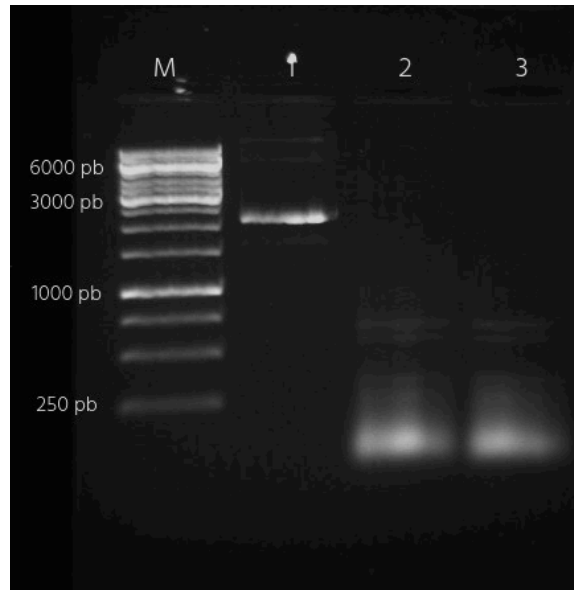


Figura 17. Patrón de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2% de mutagenesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento para Ets1, 50 V por 1 h, en tampón TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. M: Marcador “GeneRuler 1 kb DNA Ladder” (Thermo Scientific, Rockford Illinois, EUA). Carril 1: pRL/*Fbxw15*-D3. Carriles 2 y 3: pRL/*Fbxw15*-D3 mutantes para el sitio de reconocimiento para Ets1.

7.3 Actividad transcripcional del promotor pRL/*Fbxw15* mutado

La actividad transcripcional tanto del fragmento correspondiente a la región 5' no traducida del gen *Fbxw15*, así como de la eliminación de interés y del plásmido recombinante, se determinó por medio de ensayos de luciferasa. Debido a que en la actualidad no se cuentan con líneas celulares provenientes de ovario de ratón, y con la finalidad de asegurar en medida de lo posible el uso de una maquinaria transcripcional intrínseca de ovario, se utilizó la línea celular CHO-K1 (ATCC; Manassas, VA, EUA), la cual es evolutivamente cercana al ratón. Estas células, provenientes del epitelio ovárico de hámster chino se transfectaron con el fragmento 5' UTR completo, D3, D3 + C/Ebp- β , plásmido recombinante con el sitio de reconocimiento para Ap1 mutado, y este mismo plásmido recombinante + C/Ebp- β ; y cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisaron y se cuantificó la luminiscencia emitida. Los valores obtenidos de la actividad de la luciferasa *Renilla reniformis*, se normalizaron con los datos obtenidos de la construcción que contiene el gen reportero de *Photinus pyralis*.

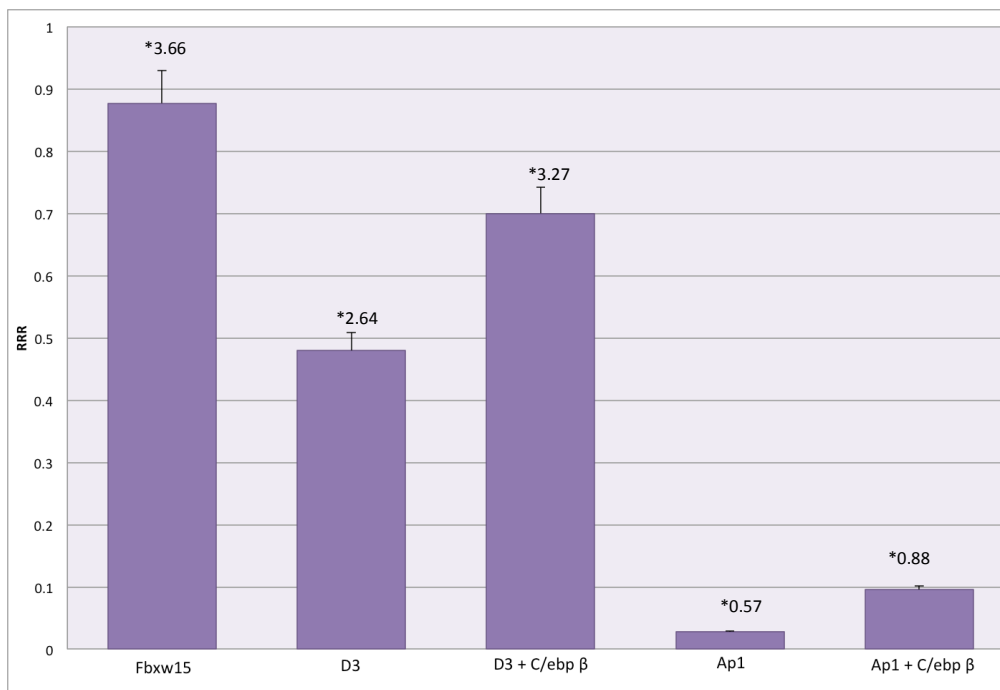


Figura 18. Actividad transcripcional cuantificada mediante el ensayo de luciferasa. Cada barra representa la actividad transcripcional de los diferentes plásmidos y el error estándar (SE) para una n=3 *. Diferencias significativas con respecto al control (P< 0.05).

En este caso, el fragmento D3 que contiene a los sitios de reconocimiento para Ets y Ap1 intactos mantuvo una actividad transcripcional de ~50% con respecto al fragmento completo del gen *Fbxw15*, sin embargo, al adicionar C/Ebp-β se puede observar que la actividad transcripcional aumentó ~80%. Por otro lado, el plásmido recombinante con el sitio de reconocimiento para Ap1 mutado mantuvo tan solo una actividad transcripcional de ~3% con respecto al fragmento completo, y en presencia del factor C/Ebp-β a este plásmido recombinante, la actividad transcripcional fue de ~10%.

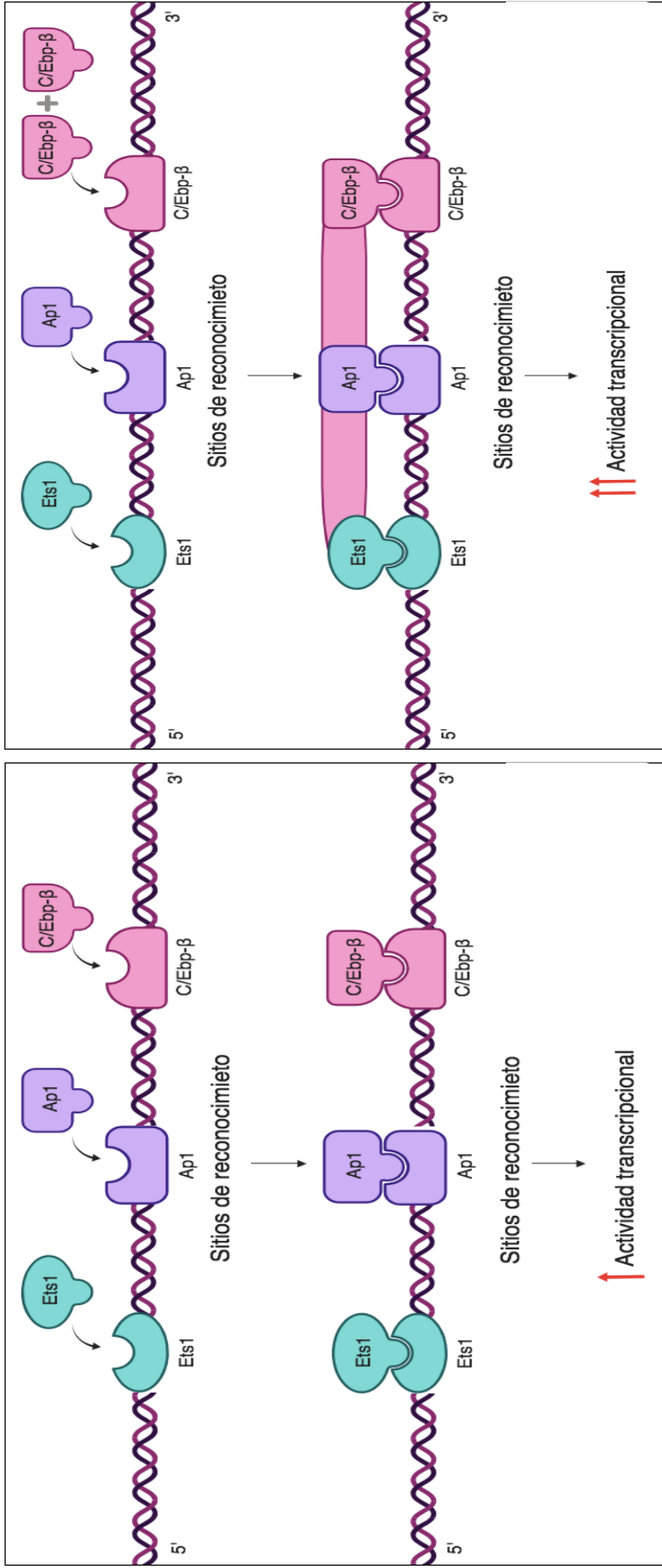


Figura 19. Representación esquemática de la actividad transcripcional del fragmento correspondiente a la región 5' no traducida del gen *Fbxw15*. En la imagen de la izquierda se observa que al encontrarse los sitios de reconocimiento de los factores de transcripción Ets1, Ap1 y C/Ebp-β intactos, los factores se unen y mediante la maquinaria celular se produce cierta actividad transcripcional. En la imagen de la derecha se muestra que al adicionar C/Ebp-β se observa un aumento de la actividad transcripcional.

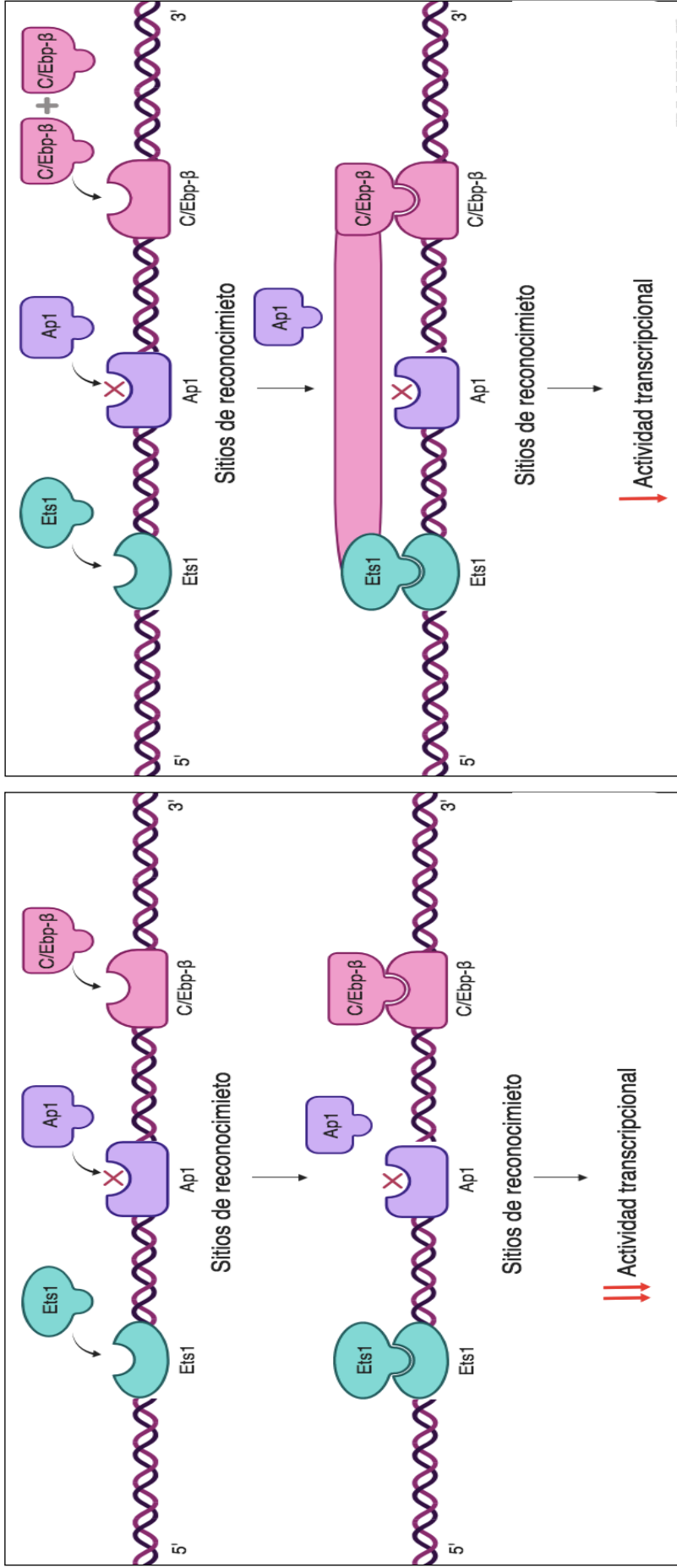


Figura 20. Representación esquemática de la actividad transcripcional del fragmento correspondiente a la región 5' no traducida del gen *Fbxw15* con el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1 mutado. En la imagen de la izquierda se observa que al encontrarse los sitios de reconocimiento de los factores de transcripción Ets1 y C/EBP-β intactos y el sitio de reconocimiento para Ap1 mutado, los factores se unen a excepción de Ap1 y mediante la maquinaria celular se produce una disminución de la actividad transcripcional. En la imagen de la derecha se muestra que al adicionar C/EBP-β se observa cierta actividad transcripcional.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Identificación de las mutaciones en plásmidos recombinantes

Después de que se llevó a cabo la purificación de los plásmidos recombinantes que tenían las mutagénesis sitio dirigidas de los sitios de reconocimiento para Ets1 y Ap1, se llevaron a cabo algunas digestiones enzimáticas con la finalidad de poder corroborar mediante electroforesis que las mutagénesis se habían llevado a cabo.

Para el sitio de reconocimiento para Ets1 se tuvieron que diseñar por bioinformática dos pares de oligonucleótidos los cuales se encuentran descritos en la tabla 1. Al llevar a cabo la mutagénesis con el primer par de oligonucleótidos que darían como resultado una delección del sitio de reconocimiento para dicho factor de transcripción se esperaba obtener un fragmento de 3,674pb como se observa en la figura 8 y en caso de que no se lograra la mutagénesis, la enzima XbaI haría dos cortes, obteniéndose dos fragmentos: uno de 2,134 pb y otro de 1,604 pb, con base en esta digestión enzimática se podría determinar que no se había logrado con éxito la mutagénesis sitio dirigida, de esta forma, cuando se llevó a cabo dicha reacción de mutagénesis se encontró que no se había logrado la amplificación del fragmento esperado y por lo tanto no se había llevado a cabo la delección del sitio de reconocimiento para Ets1. Dado el resultado obtenido, se diseñaron otro par de oligonucleótidos, con los cuales se esperaba obtener un fragmento de 3,747 pb al ser linearizado el plásmido recombinante con la enzima KpnI (Figura 9), sin embargo, con este nuevo par de oligonucleótidos tampoco se logró la mutagénesis.

El fracaso de esta mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para Ets1, con ambos pares de oligonucleótidos pudo ocurrir debido a varias causas, entre ellas, 1) que los oligonucleótidos crearan estructuras de asa debido a la longitud de los mismos y se alinearan entre ellos, 2) que la temperatura de alineamiento no fuera la indicada (por lo cual se realizaron varios ensayos con un gradiente de temperatura sin tener éxito); y 3) que la conformación superenrollada del plásmido haya impedido que el sitio de reconocimiento para este factor de

transcripción se pudiera exponer de tal forma, que los oligonucleótidos pudieran alinearse para llevar a cabo la reacción de mutagénesis (Inst. de Inv. Bio. Alberto Sols, 2006).

En el caso del sitio de reconocimiento para Ap1, al realizar la mutagénesis sitio dirigida, se esperaba obtener un fragmento de 3,749 pb que como se observa en la figura 11, donde se corrieron muestras tanto del plásmido sin mutagénesis como del plásmido recombinante; las bandas se migraron ligeramente un poco por debajo de las 3,000 pb lo cual nos indica que el plásmido se encontraba superenrollado, dado que las moléculas superenrolladas son más compactas y se mueven con mayor facilidad a través del gel, por lo tanto migran con mayor rapidez (Herraéz, 2014); de lo anterior se pudo deducir que se obtuvo plásmido recombinante del tamaño indicado, así mismo se pudo identificar que dicho plásmido recombinante mantenía prácticamente el mismo tamaño que el plásmido sin mutagénesis, lo cual, indicó que se había conseguido exitosamente el plásmido recombinante.

Por otro lado, los oligonucleótidos para llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida se diseñaron de tal forma que se obtuviera la secuencia de reconocimiento para la enzima Not1, con lo cual, cuando se llevara a cabo la mutagénesis y se realizara la digestión enzimática del plásmido recombinante, se obtendrían dos fragmentos: uno de 2,255 pb y otro de 1,495 pb; justo como se puede observar en la figura 12 en la cual, ambos fragmentos se aprecian. Así mismo, la muestra del plásmido recombinante se mandó a secuenciar, con lo cuál se verificó que la mutagénesis realizada había salido con éxito (Anexo 10).

8.2 Interacción entre el factor de transcripción Ap1 y el factor C/Ebp- β

En el caso del factor de transcripción Ap1, se ha estudiado que la presencia de este factor es importante para la inducción de promotores de algunos genes, tal es el caso del gen *mda-7* que se encuentra asociado con el crecimiento, la diferenciación y la progresión de las células del melanoma, sin embargo, también se sabe que en la mayoría de las ocasiones actúa en conjunto con otro factor de transcripción como C/Ebp- β , específicamente para llevar a cabo la diferenciación

terminal y mantenimiento específico de la expresión del gen *mda-7* (Madireddi, *et. al.*; 2000). Por otro lado, se ha visto que para que se lleve a cabo una morfogénesis placentaria adecuada, los miembros AP1 pueden heterodimerizarse con miembros de la familia C/Ebp. Lo anterior se demostró cuando al transfectar el plásmido recombinante de Ap1, se mostró una actividad transcripcional prácticamente nula, comparada con la actividad transcripcional del control en el que ningún sitio de reconocimiento de los factores de transcripción estudiados se encontraban mutados (Bégay, *et. al.*; 2004). Así mismo, como se observa en la figura 14, al plásmido recombinante se le sumó C/Ebp- β con lo cual se obtuvieron resultados muy parecidos en cuanto a actividad transcripcional, comparado con el plásmido recombinante sin la adición de C/Ebp- β , con lo cual se plantean dos escenarios: el primero de ellos sería, que no existe interacción entre los factores de transcripción Ap1 y C/Ebp- β , y por tanto la actividad transcripcional del promotor no aumenta y el otro escenario sería que la interacción necesaria para activar al promotor es entre los factores de transcripción Ap1 y Ets1 con C/Ebp- β .

8.3 Interacción entre el factor de transcripción Ets1 y el factor C/Ebp- β

A pesar de que en este proyecto no se logró llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida del sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ets1, se realizó una búsqueda bibliográfica en la cual se encontró que McNagny y cols. en 1998, realizaron un estudio en el cuál se determinó la regulación de la expresión génica específica de eosinófilos por un complejo C/Ebp-Ets y GATA1, en dicho estudio se encontró que Ets1 efectivamente tiene la capacidad de actuar en sinergia con C/Ebp- β para activar promotores de algunos genes como EOS47, sin embargo, en ese mismo estudio se determinó que a pesar de que estos dos factores de transcripción si activan la actividad transcripcional de EOS47; esta activación es un tanto ineficiente a diferencia de la activación transcripcional que surge entre la interacción de Ets1 con la isoforma C/Ebp- α (McNagny, *et. al.*; 1998). Así mismo, Park y cols. en el 2000, dilucidaron que la interacción establecida entre C/Ebp- β y Ets1 está relacionada con el aumento de la actividad del promotor de p21, y encontraron que cuando se perdía alguno de los sitios de reconocimiento para

alguno de estos factores de transcripción, la actividad transcripcional de p21 se veía disminuida significativamente (Park, *et. al.*; 2000). Con estos antecedentes podríamos deducir que en el caso del promotor de *Fbxw15*; C/Ebp- β y Ets1 si tienen interacción y que además son necesarios para aumentar la actividad transcripcional del gen.

8.4 Interacción entre los factores de transcripción Ap1 y Ets1 con el factor C/Ebp- β
Se sabe que las proteínas de la familia Ets regulan la expresión génica mediante la interacción funcional con otros factores de transcripción y cofactores en los sitios de unión al DNA compuesto. El ejemplo más conocido es la interacción de la familia Ets con las proteínas de la familia Jun en las secuencias de DNA llamadas el elemento sensible a Ras (RRE) que consiste en un sitio de unión a Ets y un sitio AP-1 (Fos / Jun) (Oikawa y Yamada; 2003). En el caso del promotor del gen MMP; además de la interacción de estos dos factores de transcripción, se requiere de un co-activador, que para este caso en específico es CBP/p300. Este gen se encuentra asociado a la remodelación de órganos y la invasión de tumores (Oikawa y Yamada; 2003).

MMP promoters

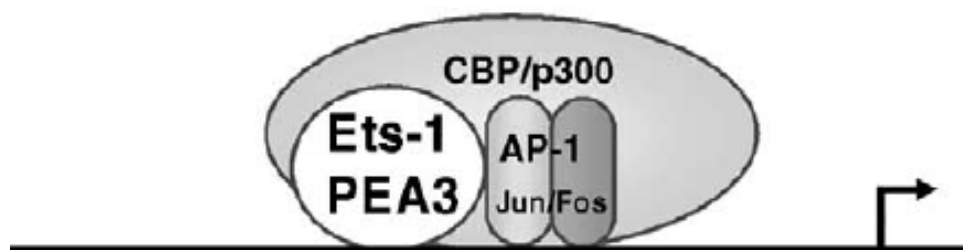


Figura 21. Representación esquemática de la interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1 con el co-activador CBP/p300.

En el caso de este proyecto, se dedujo que el factor de transcripción que actúa como co-activador es C/Ebp- β , y que dada la importancia de la interacción entre

los factores de transcripción Ets1 y Ap1, los tres factores de transcripción son esenciales para que se active la transcripción del gen *Fbxw-15* (Figura 15). Así mismo, como ya se mencionó anteriormente la interacción que se lleva a cabo entre Ets1 y C/Ebp- β no es tan eficiente por lo cuál, al estar presente el factor Ap1, la activación de la actividad transcripcional se vuelve eficiente, es por eso que, como se observa en la figura 16 al encontrarse el sitio de reconocimiento para Ap1 mutado, la actividad transcripcional del promotor es prácticamente nula y lo mismo sucede al agregar C/Ebp- β .

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó la interacción entre los factores de transcripción Ets y Ap1 con C/Ebp- β llevando a cabo técnicas de bioinformática y biología molecular, por lo cual en primera instancia se generó mediante PCR una mutación puntual en el sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Ap1 en el promotor del gen *Fbxw15*. Posteriormente, se llevó a cabo la co-transfección de células CHO-K1 con el plásmido recombinante Ap1 junto con C/Ebp- β , así como un ensayo de luciferasa; con lo cual se determinó que posiblemente existe interacción entre los factores de transcripción Ap1 y C/Ebp- β . Así mismo, a pesar de que no se logró la mutagénesis sitio dirigida en el sitio de reconocimiento para el factor Ets1, se realizó una revisión bibliografía en la cual se encontró que la interacción entre el factor de transcripción Ets1 y C/Ebp- β suele no ser muy eficiente por lo cual en la mayoría de los casos se requiere de la presencia de otro factor de transcripción. Con esto y los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que para activar transcripcionalmente al promotor del gen *Fbxw15*, se requiere forzosamente de la interacción entre los factores de transcripción Ets y Ap1 con C/Ebp- β , y que cuando alguno de los factores de transcripción no se encuentra presente la actividad transcripcional del promotor del gen *Fbxw15* es prácticamente nula, sin importar que alguno de estos factores se encuentre en mayor proporción.

10. PERSPECTIVAS

Este estudio origina nuevas interrogantes, una de ellas es que sí la actividad transcripcional del promotor del gen *Fbxw15* ocurre por la interacción entre los factores de transcripción Ets1 y Ap1, teniendo como co-activador a C/Ebp- β , entonces ¿qué papel tienen los otros factores de transcripción que tienen sitio de unión en este promotor?. Por lo anterior, se plantea estudiar de manera más detallada la región reguladora 5' UTR del gen específico de ovario *Fbxw15* para comenzar a entender la participación de este gen en algunos eventos biológicos fundamentales relacionados con la foliculogénesis, así como en eventos relacionados con la regulación de las proteínas con caja F en diversos contextos y procesos celulares donde son relevantes para mantener la homeostasis celular. Y por último, se plantea la idea de estudiar el gen homólogo de *Fbxw15* en humano que es *Fbxw12*, para saber si este gen tienen la misma actividad, en qué procesos se encuentra implicado y mediante qué mecanismos se regula su actividad transcripcional.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amsbio; (2018) *pCMV6-Entry Vector (Myc-DDK Tagged)*. Consultado en 04 junio de 2018. Disponible en: <http://www.amsbio.com/datasheets/PS100001.pdf>
- Bégay, V.; Smink, J.; Leutz, A.; (2004) Essential Requirement of CCAAT/Enhancer Binding Proteins in Embryogenesis. *Molecular and celular biology*, 24(22): 9744-9751
- Brea, M.; (2013) *Silenciamiento del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante RNA de interferencia en el miocardio de rata*. (Trabajo de Investigación de Procesos Biotecnológicos) Facultad de Ciencias Médicas, Argentina
- Cabello, T.; (2013) *Respuesta a la hiperestimulación ovárica en un modelo murino de obesidad. Potencial terapéutico del resveratrol*. (Tesis de maestría). Universidad de Oviedo, España
- Cortazar, M.; Silva, R.; (2004) *Métodos físico-químicos en biotecnología*. Instituto de Biotennología. Universidad Nacional Autónoma de México
- De La Chesnaye E.; Kerr, B.; Paredes, A.; Merchant-Larios, H.; Méndez, JP.; Ojeda, S.; (2008) Fbxw15/Fbxo12J is an F-box protein-encoding gene selectively expressed in oocytes of the mouse ovary. *Biol Reprod.*, 78(4):714-725
- Flores, A.; (2017) *Identificación y caracterización inicial de una región reguladora 5´ UTR del gen específico de ovario Fbxw15*. (Tesis de maestría). Cinvestav, México
- Gonzáles, M.; (2014) *Caracterización estructural y funcional de los promotores de las proteínas antivirales Mx1, Mx2 Y Mx3 DE DORADA (Sparus aurata)*. (Tesis doctoral). Universidad de Malaga, España
- Guasconi, V.; Yahi, H.; Ait-Si-Ali, S.; (2003) Transcription factors. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haemato.*, 2: 332-335
- Hernández, E.; (2001) Foliculogénesis: Maduración in vivo e in vitro de ovocitos. *Rev. Iber. de Fertilidad*, 18(4):18-19

- Herráez, A.; (2014) *Plásmidos en electroforesis*. Consultado el 21 de mayo de 2016. Disponible en: <http://biomodel.uah.es/an/plasmido/inicio.htm>
- Iglesias, A.; Villamonte, G.; Gonzales, M.; (2015) DNA transfection of animal cells as a tool used in animal biotechnology. *The Biologist*, 13(2): 125-142
- Ilyina, A.; Cerda, F.; Estrada, B.; Dukhovich, A.; Gaona, L.; Garza, G.; Rodríguez.; (1998) Sistema Bioluminiscente Luciferina-Luciferasa de las Luciérnagas. Parte I: Propiedades Bioquímicas y Catalíticas de la Enzima Luciferasa. *Rev. de la Soc. Quím. de Méx.*, 42(3): 99-108
- Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols; (2006) *Servicio de secuenciación automática*. Madrid, España
- Karin, M.; Liu, Z. ;Zandi, E.; (1997) AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2): 240-246
- Levièvre, E.; Lionneton, F.; Soncin, F.; Vandebunder, B.; (2001) The Ets family contains transcripcional activators and repressors involved in angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(4): 391-407
- Loeza, L.; Valdez, A.; Baizabal, A.; López, M.; (2004) Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *Revista de Educación Bioquímica*, 23(2): 71-78
- Madireddi, M.; Dent, P.; Fisher, P.; (2000) AP-1 and C/EBP Transcription Factors Contribute to mda-7 Gene Promoter Activity During Human Melanoma Differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 185: 36-46
- Malavi, T.; Dent, P.; Fisher, P.; (2000) AP-1 and C/EBP Transcription Factors Contribute to mda-7 Gene Promoter Activity During Human Melanoma Differentiation. *Journal of celular physiology*, 185(1): 36-46
- McNagny, K.; Sieweke, M.; Döderlein, G.; Graf, T.; Nerlov, C.; (1998) Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *The EMBO Journal*, 17(23):3669-3680
- Oikawa, T.; Yamada, T.; (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 303: 11-34
- Park, J.; Qiao, L.; Gilfor, D.; Yan Yang, M.; Hylemon, P.; Benz, C.; Gretchen, D.; Firestone, G.; Fisher, P.; Dent, P.; (2000) A Role for Both Ets and C/EBP

- Transcription Factors and mRNA Stabilization in the MAPK-dependent Increase in p21 Cip-1/WAF1/mda6 Protein Levels in Primary Hepatocytes. *Molecular Biology of the cell*, 11(2): 2915-2932
- Pepling, M.; Spradling, A.; (2001) Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol.* ,234(2):339-351
- Pietrasanta, L.; Von Bilderling, C.; (2011) *Transfección*. Consultado en 12 junio de 2018. Disponible en: http://users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_labo5.pdf
- Pilili, J.; (2012) *Mecanismos relacionados con la manifestación in vitro de la heteroploidía en células de mamíferos*. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de La Plata, Argentina
- Price, C.; Kwaik, Y.; (2010) Exploitation of Host Polyubiquitination Machinery through Molecular Mimicry by Eukaryotic-Like Bacterial F-Box Effectors. *Front Microbiol.* ,11(1): 122
- Promega; (2018) *pRL-null Vector*. Consultado en 04 junio de 2018. Disponible en: <http://www.yrgene.com/documents/vector/tb238.pdf>
- Raga, F.; Muñoz, M.; Ferrer, P.; (2011) Foliculogénesis. *Rev. Iber. de Fert. y Rep. Hum.* ,29(1): 88-102
- Ren, Y.; Liu, Z.; Mullany, L.; Fan, C.; Richards, J.; (2016) Growth Arrest Specific-1 (GAS1) Is a C/EBP Target Gene That Functions in Ovulation and Corpus Luteum Formation in Mice. *Biology of reproduction*, 94(2): 44-56
- Skaar, J.; Pagan, J.; Pagano, M.; (2013) Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(13):1-13
- Soberón, M.; Montero, M.; (2006) Ingeniería de proteínas y evolución dirigida. Soberón, M. (3ª Ed.), *La ingeniería genética, la nueva biotecnología y la era genómica* (pp. 213-214) México, D.F.: Fondo de Cultura Económica
- Sterneck, E.; Tessarollo, L.; Johnson, P.; (1997) An essential role for C/EBP β in female reproduction. *Genes & Development*, 11(17): 2153-2162
- Takiguchi, M.; (1998) The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int. J. Exp. Path.*, 79(6): 369-391

Zou, C.; Chen, Y.; Smith, R.; Snively, C.; Li, J.; Coon, T.; Chen, B.; Zhao, Y.; Mallampalli, R.; (2013) SCF^{Fbxw15} Mediates histone acetyltransferase binding to origin recognition complex (HBO1) Ubiquiti-Proteosomal degradations to regulate cell proliferation. *Journal of biological chemistry*, 288(9): 6306-6316

ANEXOS

1. Reactivos y soluciones

Medio LB

Reactivo	Cantidad	Esterilizar en autoclave
Peptona trípsica de caseína	5g	
Extracto de levadura	2.5g	
NaCl	5g	
H ₂ O Bidestilada	cpb 500mL	

Medio LB sólido

Reactivo	Cantidad	Esterilizar en autoclave y posteriormente verter en cajas Petri
Peptona trípsica de caseína	5g	
Extracto de levadura	2.5g	
NaCl	5g	
Agar	7.5g	
Ampicilina	100mg	
H ₂ O Bidestilada	cpb 500mL	

Solución I (Sol. de lisis)

Reactivo	Volumen	
Glucosa 1M	5mL	
TRIS 1M (pH 8.0)	2.5mL	Almacenar a 4°C
EDTA 0.5M	2mL	
H ₂ O Bidestilada	90.5mL	

Solución II (Sol. Desnaturalizante)

Reactivo	Volumen	
NaOH 0.2N	5mL	
SDS 1%	5mL	Preparar en el momento de uso

Solución III (Sol. de acetatos)

Reactivo	Volumen	
Acetato de potasio 5M (pH 5.5)	60mL	
Ácido acético glacial	1.5mL	Almacenar a 4°C
H ₂ O Bidestilada	28.5mL	

TBE 5X (Tris-borate)

Reactivo	Cantidad	
Tris base	54g	Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C
Ácido bórico	27.5g	
EDTA 0.5M (pH 8.0)	20mL	
H ₂ O Bidestilada	cpb 1L	

TBE 1X (Tris-borate)

Reactivo	Volumen	
TBE 5X	200mL	Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C
H ₂ O Bidestilada	cpb 1L	

Medio DMEM-HG

Reactivo	Volumen	
Suero fetal bovino 10%	10mL	Esterilizar con filtro y almacenar a 4°C
Piruvato-Na 1%	1mL	
Penicilina-Estreptomicina 1%	1mL	
Medio DMEM-HG	cpb 100mL	

PBS 1X

Reactivo	Cantidad	
NaCl 138mM	2g	
KCl 3mM	0.05g	
Na ₂ HPO ₄ 1.5mM	0.3g	Ajustar el pH a 7.4 con ayuda del HCl y el NaOH
KH ₂ PO ₄ 1.5mM	0.05g	
HCl 1M	100mL	
NaOH 10M	100 mL	
H ₂ O Bidestilada	cbp 150mL	

2. Reactivos de Kit

Green Buffer

Reactivo

KCl

(NH₄H)₂SO₄

DNA polimerasa

MgCl₂

Colorante azul

Colorante amarillo

TurboFect™ Transfection Reagent

Es una solución estéril de polímeros catiónicos en agua. Los polímeros y DNA forman complejos compactos, estables, cargados positivamente, que protegen el DNA de la degradación y facilita la entrada de genes en células eucariotas. El reactivo de transfección es ideal para la transfección de células primarias, difíciles de transfectar

EndoFree Plasmid Kit:

Buffer P1 (Buffer de resuspensión)

Reactivo

Tris-Cl 50mM (pH 8.0)

EDTA 10mM

RNAsa 100 μ g/mL

Buffer QC (Buffer de lavado)

Reactivo

NaCl 1M

MOPs 50mM (pH 7.0)

Isopropanol 15%

Buffer P2 (Buffer de lisis)

Reactivo

NaOH 200mM

SDS 1%

Buffer QN (Buffer de elución)

Reactivo

NaCl 1.6M

MOPs 50mM (pH 7.0)

Isopropanol 15%

Buffer P3 (Buffer de neutralización)

Reactivo

Acetato de potasio 3M (pH 5.5)

Buffer TE

Reactivo

Tris-HCl 10mM (pH 8.0)

EDTA 1mM

Buffer QBT (Buffer de equilibrio)

Reactivo

NaCl 750mM

MOPs 50mM (pH 7.0)

Isopropanol 15%

Triton 0.15%

3. Enzimas de restricción

Dpn I: Es una enzima de restricción derivada de *Diplococcus pneumoniae* que corta en la secuencia GATC sólo si está metilada por dam (G^{m6}ATC). Utilizada en

algunos protocolos de PCR para eliminar ADN plasmídico proveniente de la bacteria sin afectar al sintetizado in vitro.

KpnI: Es una enzima de restricción derivada de *Klebsiella pneumoniae*, cuyo sitio de reconocimiento es:



NotI: Es una enzima de restricción derivada de *Nocardia otitidis*, cuyo sitio de reconocimiento es:



XbaI: Es una enzima de restricción derivada de Enzima de restricción derivada de *Xanthomonas badrii*, cuyo sitio de reconocimiento es:



4. Secuenciación de mutagénesis sitio dirigida para el sitio de reconocimiento para Ap1

```
5'CTCTGCTGGGTTCCCTTGGGTTATTGTTCCCTGTTGAAAATTAGTGTGCTACTCAG
AATTTTCTAGAAAGTTCTGACAAGTACATCATCAATCAGGACAGCCCCAGATCAT
GTGCTTTTGGTCTCCACAGTGCCAGGAAGGGGTTGTTGAGCTCATCTACTCAGT
GAAAATCACTGTGCAGTGCGGCCGCTTAAGGTGTGAGCACTCTCAGCTGAGTGT
TTCTGGTTCCAGTGAGTGGGGGCTTGGAGTCAGGCTGAGCGTCTACACAGCTG
CAGCTTTCTCCAGTCAAAGTCTGATGAGCTGTGGTTCGGCAATCCTGTGAAATCTT
TGGCCAAGTCTTTAAAATCAGAGCAAGCTGGGGAGGAGAAAGAAGAGTCAGTGT
GGACTTAGGCCACTGAAGATGGCGATCCATTTACCTTGTTTGCCGAAGCT -3'
```