



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM

“INSERCIÓN DE UN CASETE DE SELECCIÓN POSITIVA
PARA LA GENERACIÓN DE DOS ALELOS MUTANTES EN
EL GEN DE LA FOSFATASA DE FOSFOLÍPIDOS 3”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

VIRIDIANA BELEN MEZA GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA VALERIA MARTÍNEZ SILVA



CDMX

ENERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular-UNAM, en el laboratorio de la Dra. Diana Escalante Alcalde, bajo la tutoría de la Dra. Ana Valeria Martínez Silva. Además del apoyo de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. Este proyecto fue financiado por los donativos de CONACyT CB-250613, DGAPA-PAPIIT IN205812.

Contenido:

1. Resumen
2. Abreviaturas
3. Introducción
 - 3.1 Lípidos
 - 3.2 Lípidos bioactivos
 - 3.3 Principales lípidos bioactivos
 - 3.4 Fosfatasa de Fosfolípidos (PLPPs)
 - 3.5 Clasificación de las Fosfatasa de fosfolípidos
 - 3.6 Fosfatasa de Fosfolípidos-3 (PLPP3)
 - 3.7 Mutagénesis
4. Justificación
5. Hipótesis
6. Objetivos
7. Materiales y Métodos
 - 7.1 Obtención de los vectores
 - 7.2 Obtención del inserto
 - 7.3 Purificación plasmídica
 - 7.4 Defosforilación de los vectores
 - 7.5 Ligación del vector y el inserto
 - 7.6 Generación de células ultracompetentes
 - 7.7 Transformación bacteriana
 - 7.8 Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina
 - 7.9 Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina con el kit QIAPREP spin mini prep de QIAGEN
 - 7.10 Verificación de la inserción del casete de selección positiva
 - 7.11 Verificación de la orientación del casete de selección positiva
 - 7.12 Extracción de plásmido (maxi prep)
 - 7.13 Purificación plasmídica por gradiente de densidad con Cloruro de Cesio (CsCl)
 - 7.14 Diálisis con membranas
 - 7.15 Precipitación de ADN con Cloruro de sodio (NaCl)
8. Resultados
9. Discusión
10. Conclusiones
11. Referencias

1. Resumen

La modificación genética es una de las técnicas más empleadas en la ingeniería genética, para estudiar la actividad de proteínas o genes de interés, mediante la desactivación o sobreexpresión de un gen, por ejemplo, se han generado ratones mutantes nulos para la Fosfatasa de fosfolípidos 3 (PLPP3), que carecen de los exones 3 y 4, responsables de su actividad catalítica que además contienen el tripéptido *RGE* responsable de su interacción con integrinas, mostrando que estos ratones presentan un fenotipo letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario caracterizado por defectos en la vasculogénesis. Con la finalidad de discernir cuál de las regiones inactivadas es la responsable de producir los distintos defectos observados, se requiere de la generación de dos nuevos organismos transgénicos. Como primer paso, se necesita generar la inactivación de dichas regiones mediante mutaciones específicas, como segundo paso y como objetivo de tesis, la inserción de un casete de selección positiva que permita avanzar en el desarrollo de estos dos nuevos alelos con las mutaciones en el gen de la PLPP3, para finalmente generar dos nuevos organismos transgénicos que permitan su estudio.

En este trabajo se emplearon diversas técnicas de biología molecular; para obtener los vectores plasmídicos y el inserto (casete de selección positiva) mediante digestiones enzimáticas, después la ligación de dichos fragmentos de ADN y la incorporación del mismo en bacterias ultracompetentes *E. coli*, mediante clonación molecular; para finalmente obtener vectores plasmídicos que expresen el ADN recombinante. Sin embargo, al realizar la inserción del casete de selección positiva observamos que el casete de selección positiva se insertaba en una posición distinta a la de interés, aun cuando se realizaron diversos cambios en los protocolos de las técnicas utilizadas, razón por la cual no fue posible obtener una clona con el casete insertado en la posición y orientación requeridas. Sin embargo, se plantea que la generación de estos dos alelos se puede realizar mediante técnicas de clonación molecular más sofisticadas.

2. Abreviaturas

BrEt	Bromuro de Etidio
C1-C3	Sitios catalíticos 1 a 3
<i>CIP</i>	Fosfatasa alcalina intestinal de ternero
C1P	Ceramida-1-fosfato
CsCl	Cloruro de Cesio
DAG	Diacilglicerol
DGPP	Diacilglicerol pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
ES	Células troncales
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293
LPA	Ácido lisofosfatídico
PA	Ácido Fosfatídico
<i>pKS II+</i>	<i>pBluescript II KS+</i>
PLPPs	Fosfatasas de Fosfolípidos
S1P	Esfingosina 1 fosfato
SDM	Mutagénesis sitio dirigida
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>VCIP</i>	Proteína inducible de colágeno tipo I para VEGF
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

3. Introducción

3.1 Lípidos

Los lípidos son el cuarto grupo principal de moléculas presentes en las células. A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos, los lípidos no son poliméricos, sin embargo, se agregan funcionando como matriz estructural de las membranas biológicas, la cual es su función principal (Voet *et al.*, 2007). En los seres vivos, sirven como material de reserva de energía y al ser los componentes de las membranas celulares, participan activamente en la fisiología celular (Acuña, 2006).

El principal componente de la mayoría de los lípidos son los ácidos grasos, estos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas largas no ramificadas (Koolman y Röhm, 2008). Dependiendo del contenido de ácidos grasos los lípidos se pueden clasificar en dos grupos; lípidos saponificables o complejos y lípidos insaponificables o sencillos (figura 1). Los lípidos complejos son aquellos que contienen en su estructura ácidos grasos, este grupo incluye a las ceras, triacilglicéridos y fosfolípidos. Los lípidos más abundantes en las membranas celulares son los fosfolípidos, los cuales se caracterizan por tener una cabeza hidrófila unida al resto del lípido mediante un grupo fosfato (Alberts, 2006). Este grupo está involucrado en diversas funciones biológicas y sirven como reservorio de energía almacenándose para estar disponible como energía a largo plazo (Garrido y Teijon, 2006).

El segundo grupo son los lípidos insaponificables, los cuales no contienen ácidos grasos en su estructura e incluyen a los esteroides y prostaglandinas; que actúan regulando distintas actividades fisiológicas, por ejemplo, son componentes de la superficie celular

relacionados con el reconocimiento de las células, la especificidad y la inmunidad de los tejidos (Garrido y Teijon, 2006).

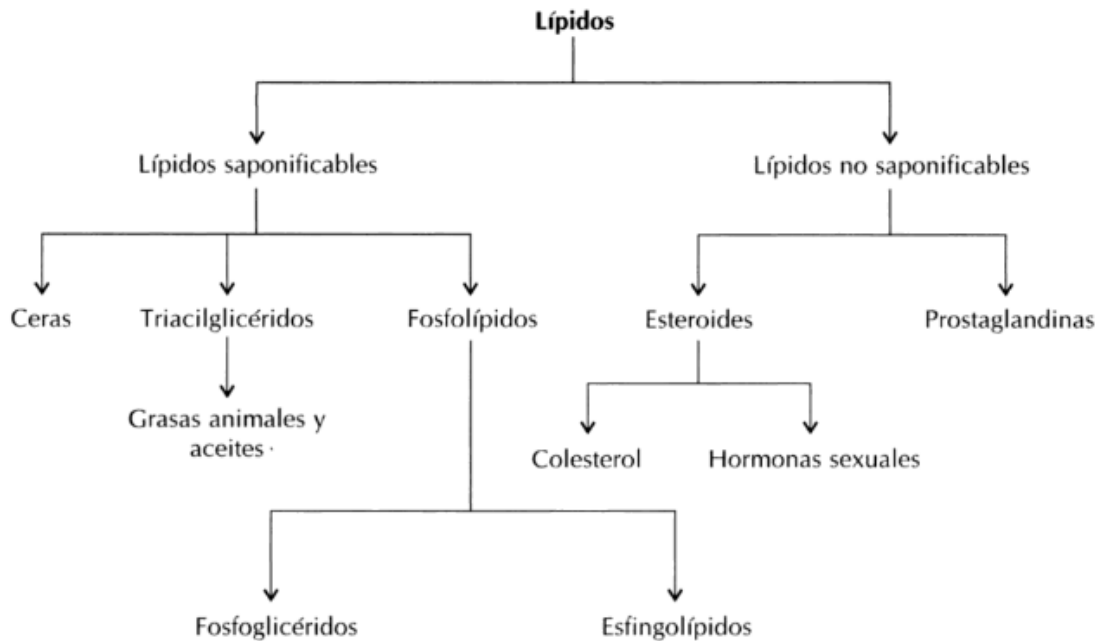


Figura 1. Clasificación de los lípidos. Imagen tomada de Acuña 2006.

3.2 Lípidos Bioactivos

Como se mencionó anteriormente los lípidos se han asociado con dos funciones básicas: como componente estructural de las membranas (lípidos sencillos); y como fuente de energía metabólica (lípidos complejos). Posteriormente surgió una tercera clasificación muy diferente, denominada "lípidos bioactivos", donde los lípidos actúan como moléculas reguladoras y de señalización (Stillwell, 2016). Los 'lípidos bioactivos', se definen como aquellos cuyo cambio en sus niveles de concentración tienen consecuencias funcionales (Hannun y Obeid, 2008), modificando vías de señalización biológicas (Sekin y Raben, 2016). Algunos de los procesos en los que están involucrados son: regulación del crecimiento celular, muerte, senescencia, adhesión, migración, inflamación, angiogénesis y tráfico intracelular, entre muchos otros más (Stillwell, 2016).

Aunque existen muchas especies de lípidos de señalización, la gran mayoría son producto de dos grupos principales: los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos (Tabla 1). Los esfingolípidos son la segunda fuente principal de señalización y aunque también son fosfolípidos, contienen una base esfingoidea como esqueleto en lugar de una fracción de glicerol, por lo tanto, son metabólicamente y químicamente distintos a los glicerofosfolípidos. En el ciclo de los esfingolípidos la ceramida es el lípido central y la fuente de la que se derivan los demás esfingolípidos (Sekine y Raben, 2016).

Los lípidos de señalización canónicos (lípidos bioactivos) incluyen principalmente a los fosfatidilinositoles: fosfatidilinositol-4-fosfato, fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato y fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato, diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico (PA), esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida-1-fosfato (C1P) y eicosanoides. Con la excepción del DAG y los esteroides, los principales lípidos de señalización transportan una o más cargas negativas que proporcionan especificidad de unión y estabilizan la interacción proteína-lípido (Sekine y Raben, 2016).

Lípidos en células de mamíferos	
<i>Categoría</i>	<i>Número de Clases</i>
<i>Acidos Grasos</i>	14
<i>Glicerolípidos</i>	6
<i>Glicerofosfolípidos</i>	21
<i>Esfingolípidos</i>	10
<i>Lípidos Esteroides</i>	6
<i>Lípidos Prenoles</i>	5

Tabla 1. Principales categorías de lípidos presentes en células de mamíferos, se muestran el número de clases de cada uno, definido por el sistema de clasificación de “LIPID MAPS” (*LIPID Metabolites And Pathways Strategy*). Tomado y modificado de Sekine y Raben, 2016.

3.3 Principales lípidos bioactivos y sus funciones

Ceramidas

Las ceramidas se encuentran en pequeñas cantidades en las membranas celulares de todos los tejidos y se acumulan como componentes estructurales de la piel. Al igual que otros lípidos señalizadores, se producen de forma rápida y transitoria, manteniendo bajos sus niveles en la membrana celular y se producen como respuesta a estímulos específicos que posteriormente afectan la actividad de las proteínas diana. En general, se pueden sintetizar de *novo*, pero también se pueden producir como productos de hidrólisis de esfingolípidos más grandes. Se han relacionado con una amplia variedad de funciones fisiológicas como el crecimiento y el arresto celular, diferenciación celular, migración, adhesión, senescencia y apoptosis, además de que podrían estar implicadas en muchas patologías humanas como cáncer, trastornos neurológicos e inflamación. Son consideradas moléculas pro-apoptóticas y su acumulación se vincula con diversos tipos de estrés celular, por lo cual se le ha denominado como “el lípido supresor de tumores” (Stillwell, 2016).

Ceramida-1-fosfato (C1P)

Es un esfingolípidio considerado como el principal metabolito de la ceramida generada mediante la acción de la ceramida cinasa y como su nombre lo indica, es la forma fosforilada de este lípido. Además de ser un punto clave en el metabolismo de todos los esfingolípidos, la C1P puede regular eventos de señalización celular como inhibir la proliferación celular y actuar como potentes inductores de la apoptosis (Gómez-Muñoz *et al.*, 1995).

Esfingosina-1-fosfato (S1P)

Es un lípido bioactivo con múltiples acciones, involucrado en diversos aspectos del crecimiento celular, la señalización celular y la función inmunológica. S1P es principalmente obtenido por fosforilación de la esfingosina por la esfingosina cinasa, que a su vez puede ser defosforilado nuevamente a esfingosina por la esfingosina fosfatasa o degradado por esfingosina fosfato liasa (Figura 2). Se transporta a través de la sangre principalmente en lipoproteínas de alta densidad y media la señalización celular mediante la unión a uno de al menos cinco tipos de receptores de superficie que miran hacia el exterior de la célula.

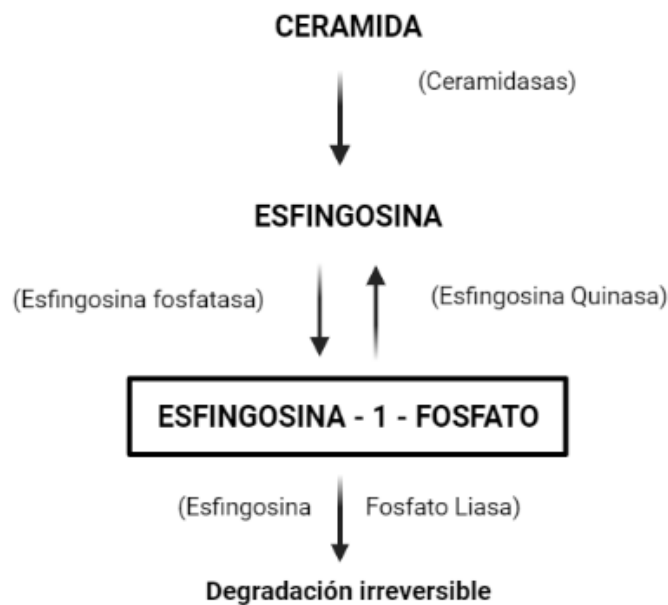


Figura 2. Producción metabólica y degradación de la Esfingosina-1-fosfato. Modificada de Stillwell, 2016.

Finalmente, S1P, esfingosina y ceramida-1-fosfato no están estrechamente relacionados con la estructura y función de la balsa lipídica pues no facilitan su formación (Stillwell, 2016). Además, se sabe que las Fosfatasas de lípidos fosfatados (PLPPs) son un importante regulador de las concentraciones de S1P externa, pues se forma dentro de las células a través de la fosforilación de esfingosina por la esfingosina cinasa; además

se defosforila por dos fosfatasa S1P específicas, las cuales se expresan principalmente en el retículo endoplásmico más que en la membrana plasmática (Tang *et al.*, 2015).

Diacilglicerol (DAG)

La gran familia de DAG (diacilgliceroles o diglicéridos) son moléculas, que, como las ceramidas, residen e influyen en la estructura y función de la membrana. Pueden existir en tres formas estereoquímicas, 1,2- y 2,3-DAG, estos se acumulan transitoriamente en las membranas, donde pueden causar cambios en las propiedades físicas de la bicapa de la membrana y se pueden unir a través de fuertes interacciones hidrofóbicas a proteínas diana. Además, son un intermediario central en el metabolismo de los lípidos; y juegan papeles esenciales como segundos mensajeros en muchos procesos celulares, modulando mecanismos bioquímicos (Stillwell, 2016).

Fosfatidilinositoles (IPs)

Los fosfoinosítidos, están localizados principalmente en el lado intracelular de la bicapa lipídica y comprenden del 4-5 % del total de los fosfolípidos membranales. Son capaces de regular una gran variedad de funciones en la transducción de señales; entre éstas, la regulación de canales iónicos. En particular, el PI (4,5) P2 es el fosfoinosítido que tiene más capacidad de modulación hacia los canales iónicos. En la mayor parte de las células eucariotas, un grupo de enzimas denominadas fosfolipasas se encargan de hidrolizar a los fosfolípidos. Cada una de las fosfolipasas corta a los fosfolípidos en diferentes sitios, generando así diferentes productos y/o residuos. Además, se sabe que todas las fosfolipasas que degradan el PI (4,5) P2 son calcio-dependientes; lo que permite al PI (4,5) P2 realizar importantes cambios en la excitabilidad celular mediante la modulación de los canales iónicos presentes en la membrana de las células (Pérez-Burgos, 2010).

Ácido fosfatídico (PA)

Es el fosfolípido más simple, posee dos cadenas de acilo y por lo tanto sirve como un precursor metabólico para más fosfolípidos de membrana complejos. Se han descrito funciones estructurales, metabólicas y como lípido bioactivo. Su principal función estructural, debido a que es un lípido anfipático, es asociarse con el agua para producir bicapas lipídicas, también se mezcla con los demás fosfolípidos para producir bicapas con características físicas multicomponentes. Se ha relacionado el PA y su producto de hidrólisis más potente, el LPA (ácido lisofosfatídico) con innumerables reacciones bioquímicas críticas, vías y redes de señalización. El LPA es considerado el glicerofosfolípido más simple dado que se puede derivar fácilmente del PA, además, de encontrarse en niveles mucho más bajos que el PA, es posible que muchas de las funciones celulares originalmente atribuidas al PA sean en realidad causadas por el LPA (Stillwell, 2016). Se sabe que el LPA juega un papel muy importante en diversos procesos celulares, por ejemplo, en el desarrollo embrionario (ya que es necesario para la vasculogénesis y el desarrollo de la cresta neural) y la reparación neuronal, dolor neuropático, reumatoide, artritis, fertilidad, obesidad y cáncer durante el desarrollo. La señalización de LPA juega un papel importante. Además, se cree que todas estas acciones del LPA podrían verse afectadas por la acción de las Fosfatasa de lípidos fosfatados, en especial la PLPP3 (Tang *et al.*, 2015).

3.4 Fosfatasas de Fosfolípidos (PLPPs)

Las PLPPs (Fosfatasas de fosfolípidos) son proteínas integrales de membrana, pertenecientes a la familia de las fosfohidrolasas, su principal función es regular los niveles de lípidos bioactivos y sus productos defosforilados, y en consecuencia las vías de señalización donde participan estas moléculas. Por ello tienen un papel fundamental en la regulación de procesos celulares como sobrevivencia, proliferación, apoptosis, migración y diferenciación celular. Catalizan la hidrólisis independiente de iones de cationes divalentes de fosfomonoésteres de lípidos y también pueden realizar la defosforilación completa de diacilglicerol pirofosfato, lo que indica que tienen actividad de fosfodiesterasa contra un enlace pirofosfato. Sin embargo, no escindirán el enlace fosfodiéster de los glicerofosfolípidos (Tang *et al.*, 2015).

Se han propuesto dos funciones principales para las PLPPs, en primer lugar, se ha sugerido que regulan el metabolismo lipídico intracelular mediante el control del equilibrio entre PA y DAG con efectos sobre la señalización celular. Y, en segundo lugar, debido a su localización en la membrana plasmática de muchos tipos celulares, y su actividad como ecto-enzimas que defosforilan lípidos bioactivos, se ha propuesto que funcionan como reguladores negativos de la señalización dirigida a los receptores de estos lípidos bioactivos (Morris *et al.*, 2005; Sigal, 2005). Los sustratos de estas enzimas incluyen a los lípidos bioactivos: ácido fosfatídico (PA), ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida 1-fosfato (C1P), esfingosina 1-fosfato (S1P) y pirofosfato de diacilglicerol (DGPP) los cuales

son convertidos a sus productos defosforilados, como se muestra en la Figura 3 (Sciorra y Morris, 2002).

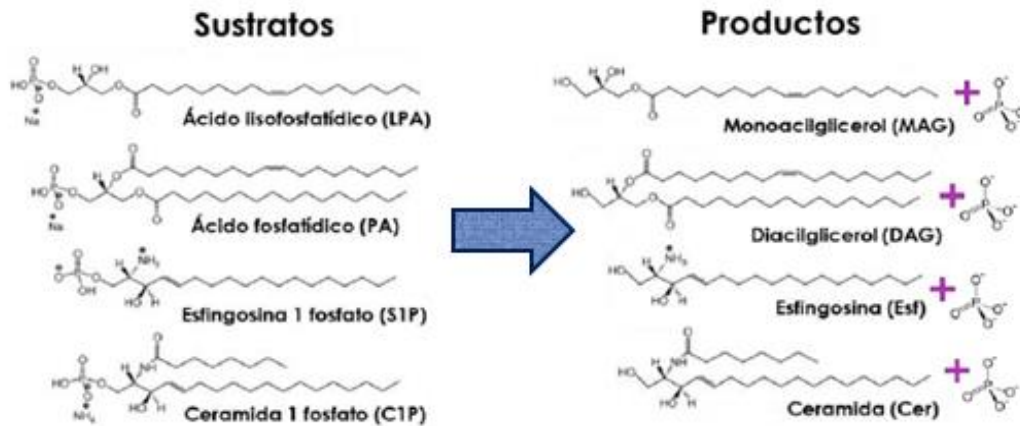


Figura 3. Sustratos de las PLPPs y sus productos defosforilados.

3.5 Clasificación de las Fosfatasa de fosfolípidos

Se han descrito dos tipos de fosfatasa de fosfolípidos en mamíferos: las “Lipinas” y las PLPPs. Las primeras se encuentran en el citoplasma, dependen de Mg^{2+} para su actividad catalítica y son sensibles al inhibidor N- etilmaleimida. Mientras que las PLPPs son proteínas integrales de membrana, no dependen del Mg^{2+} para su actividad catalítica y son insensibles a N-etilmaleimida (Sciorra y Morris, 2002).

Las PLPPs se caracterizan por un dominio central que contiene seis dominios transmembranales compuestos por α -hélices, tres asas extracelulares, dos intracelulares y sus dominios amino y carboxilo terminales que se ubican hacia el citosol. El sitio catalítico se encuentra en el espacio extracelular y está conformado por tres dominios conservados. Esto permite que las PLPPs defosforilen los lípidos fosfatados. Los dos primeros dominios catalíticos conservados, C1 y C2, se localizan en la segunda asa

extracelular, entre las hélices transmembranales III y IV, mientras que el tercer dominio catalítico conservado, C3, se encuentra en la tercera asa extracelular entre las hélices transmembranales V y VI (Figura 4) (Tang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2000). El sitio activo se encuentra frente al lumen de los compartimentos de endo-membrana o en la cara extracelular de la membrana plasmática. El dominio conservado C1 del sitio catalítico se encarga del reconocimiento de los sustratos mediante los aminoácidos lisina y arginina 156, mientras los dominios C2 y C3 poseen la actividad de fosfatasa con los aminoácidos catalíticos histidina, arginina en C2 y aspartato en el C3, en este la histidina actúa como un nucleófilo para formar una fosfo-histidina intermediaria, mientras que la histidina del C2 está involucrada en la ruptura del enlace fosfato para liberar el producto lipídico defosforilado. Los residuos de lisina y arginina conservados en C1, así como la arginina en C3, ayudan a coordinar el sustrato en el sitio activo. Además, las PLPPs pueden formar homo y hetero-oligómeros, con cada subunidad capaz de funcionar independientemente de las demás en las reacciones de defosforilación. Estas diferentes combinaciones de estados oligoméricos podrían regular su localización subcelular (Sigal *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2015). Se localizan principalmente en el retículo endoplásmico y en la membrana, pero posiblemente puedan localizarse en otros compartimentos membranales. Frecuentemente se localizan en dominios de membrana, lo cual puede ser una manera de compartimentalizarse con receptores de LPA o S1P y con enzimas de señalización de lípidos (Kai *et al.*, 1997). En mamíferos, se han identificado tres isoformas de las PLPPs, PLPP1, PLPP2 y PLPP3 codificadas por los genes *Plpp1*, *Plpp2* y *Plpp3* respectivamente (Sciorra y Morris, 2002), anteriormente conocidos como *Ppap2A/Lpp1*, *Pppap2C/Lpp2*, y *Ppap2B/Lpp3* (Tang *et al.*, 2015).

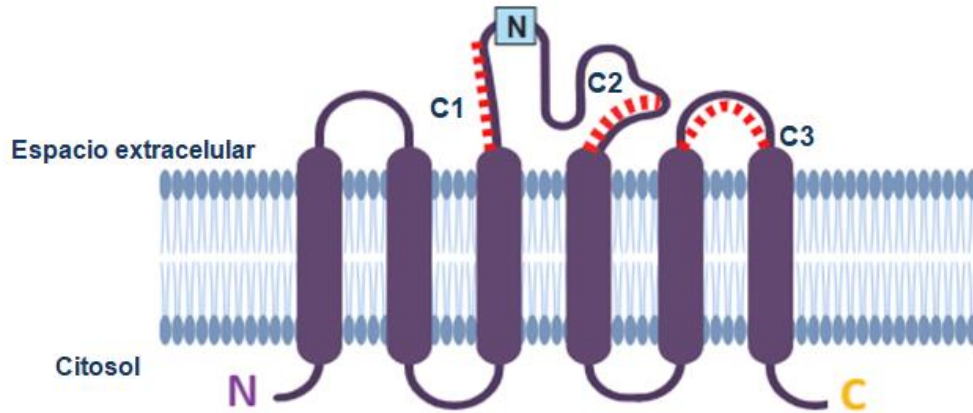


Figura 4. Estructura típica de las Fosfatasa de fosfolípidos (PLPPs). Se muestran los seis dominios transmembranales, el sitio de N-glicosilación (N) que se encuentra entre los dominios transmembranales 3 y 4, los tres dominios conservados del sitio catalítico (C1-C3) marcados con una línea roja punteada.

Los patrones de expresión amplios y superpuestos (de tipo celular, tejido y etapa del desarrollo del organismo) de las PLPPs sugieren que sus funciones no son redundantes. Por ejemplo; PLPP1 y PLPP3 se expresan ampliamente en tejidos humanos, mientras que los niveles de transcritos de PLPP2 son más bajos y restringidos. Sin embargo, la mayoría de los tejidos examinados expresan los tres genes (Tabla 2), y estos resultados son ampliamente consistentes con los análisis publicados de la distribución del ARN de las PLPPs y, de la expresión de la proteína, en los casos en que se encuentran disponibles los anticuerpos apropiados (Sigal *et al.*, 2005).

Expresión de transcritos de las PLPPs en tejidos humanos

	PLPP1	PLPP2	PLPP3
Vejiga	191	0	47
Hueso	35	17	143
Médula ósea	27	0	136
Cerebro	107	30	166
Cuello uterino	72	48	24
Colon	64	347	58
Ojo	80	43	222
Corazón	161	0	287
Riñón	172	44	202
Laringe	41	0	292
Hígado	22	7	197
Pulmón	67	56	106
Ganglio linfático	39	0	724
Glándula mamaria	132	24	490
Músculo	119	0	82
Ovario	63	116	21
Páncreas	74	211	161
SNP	318	0	238
Placenta	108	4	535
Hipófisis	-	-	-
Próstata	483	38	576
Piel	30	12	6
Tejidos blandos	102	0	153
Bazo	0	0	0
Estómago	77	58	48
Lengua	36	0	36
Testículos	60	7	68
Timo	0	0	0
Útero	196	156	214
Sistema vascular	154	0	656
Sangre	105	0	39

Tabla 2. La abundancia de transcritos de EST correspondientes a cada gen es expresada como transcripciones por millón. Modificada de Sigal, 2005.

Se han generado ratones mutantes nulos para las isoformas PLPP2 y PLPP3, mostrando que la ausencia de PLPP2 (PLPP2^{-/-}) no produce un fenotipo distinguible, mientras que los ratones carentes de PLPP3 (PLPP3^{-/-}) presentan un fenotipo letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario y un complejo fenotipo caracterizado por defectos en la vasculogénesis (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2000). Para PLPP1 aún no se ha informado sobre su inactivación en ratones, sin embargo, se ha observado

que la sobreexpresión transgénica bajo el control de un promotor de actina ubicuamente activo produjo un fenotipo enano con defectos en la espermatogénesis y el crecimiento del pelaje (Sigal *et al.*, 2005).

3.6 Fosfatasa de Fosfolípidos-3 (PLPP3)

La PLPP3 a diferencia de las demás tiene una única función "no enzimática" involucrada en la regulación de las interacciones célula-célula mediante el dominio *RGD* (Arginina-Glicina-Aspartato) (Figura 5), que es una secuencia de reconocimiento de núcleo para las integrinas de tipo $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, presente en muchas proteínas componentes de la matriz extracelular (ECM). Las integrinas son moléculas de adhesión celular heterodiméricas que unen la matriz extracelular al citoesqueleto. Funcionan como receptores de adhesión que organizan el citoesqueleto. Estas moléculas son importantes en el control de varios pasos en las vías de señalización que regulan procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis y migración celular (Van der Flier y Sonnenberg, 2001). Este dominio de unión a integrinas se localiza en la segunda asa extracelular entre los dominios transmembranales III y IV y le confiere funciones relacionadas a adhesión celular (Humtsoe *et al.*, 2003; Sigal *et al.*, 2005).

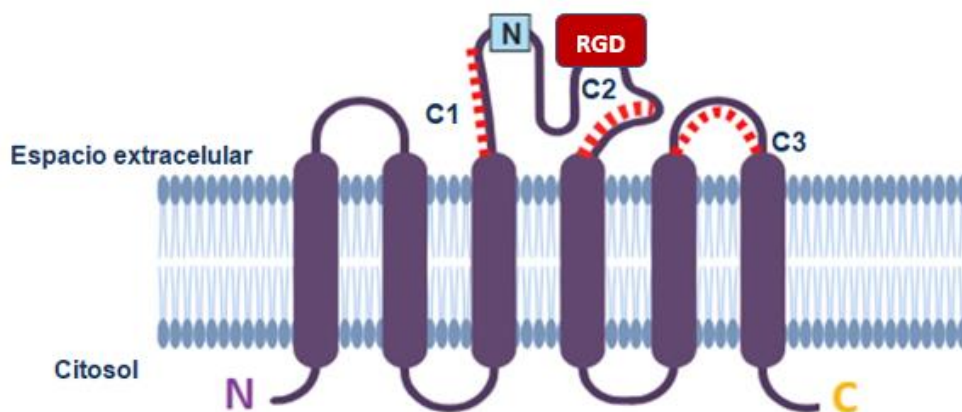


Figura 5. Estructura de la Fosfatasa de fosfolípidos 3 (PLPP3) en humano. Se muestra el dominio de unión a integrinas (RGD).

La unión de integrinas a ligandos que contienen *RGD* promueve la adhesión, propagación y la señalización, regulando la fosforilación de la tirosina de varias proteínas intracelulares, la afluencia de calcio, los cambios en el p^H y la expresión génica (Giancotti y Ruoslahti, 1999).

En 2003, Humtsoe y colaboradores, identificaron 12 nuevos genes derivados de células endoteliales que experimentan morfogénesis capilar en matrices tridimensionales de colágeno; caracterizaron la función de uno de esos genes designado *VCIP* (Proteína inducible de colágeno tipo I para el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF), que es en realidad, *PLPP3* y evaluaron los efectos de la expresión de *PLPP3* de tipo silvestre (*RGD*) contra *PLPP3* mutante (*RGE*) en células HEK293, mediante la generación de construcciones de ADNc que codifican las diversas construcciones retrovirales de *PLPP3*, de tipo silvestre y mutante. Estos fueron sometidos a inmunoprecipitación con un anticuerpo para *PLPP3*, después analizados por inmunotransferencia con anti-hemaglutinina y observaron que las células de tipo silvestre que contienen el motivo *RGD* formaban agregados celulares, mientras que las células mutantes con el motivo *RGE*, no lo hicieron. Además, determinaron la relevancia fisiológica de las interacciones célula-célula mediadas por *PLPP3* y proponen que actúa como un ligando de integrina capaz de promover 'interacciones heterofílicas', ya que puede mediar tanto las adhesiones celulares "homotípicas" (similares) como "heterotípicas" (diferentes) debido a que contiene la secuencia *RGD*. Sin embargo, la interacción *RGD*-integrinas no depende de la actividad catalítica de la *PLPP3*, ya que la mutación *RGD* por *RGE* (arginina-glicina-glutamato) en la *PLPP3* de humano solo anula su interacción con integrinas, manteniendo intacta su actividad catalítica. Curiosamente, la *PLPP3* de ratón y de rata contienen un sitio *RGE* en lugar de *RGD*, el cual se ha comprobado que está involucrado en la interacción con las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha 5 \beta 1$ (Figura 6) (Humtsoe *et al.*, 2005).



Figura 6. Constitución de las PLPPs en humano y ratón. Se muestra el sitio de reconocimiento a integrinas *RGD* en PLPP3 de humano y *RGE* de ratón. Imagen tomada de Chun 2013.

Para conocer más de los mecanismos y el papel de la PLPP3, en el laboratorio de la Doctora Diana Escalante, se han utilizado diferentes estrategias que permitan seguir estudiando el papel de la PLPP3 en el desarrollo. Una de ellas fue la generación de un alelo mutante nulo de la enzima, en el que se eliminó la región del gen que codifica parte del sitio catalítico y el motivo de unión a integrinas (*RGE*), y se observó que los embriones que carecen de PLPP3 tienen defectos en el desarrollo de la vasculatura extraembrionaria y en la formación del eje embrionario, probablemente debido a deficiencias en la migración de células endoteliales durante la estructuración de vasos sanguíneos. Además, los ratones homocigotos para el alelo nulo presentan letalidad embrionaria, entre el día 8.5 y 10.5 de gestación, debido al desarrollo vascular anormal del saco vitelino, y del alantoides, falla en la fusión corio-alantoidea y defectos de gastrulación. También se observó que el patrón de expresión de PLPP3 es tiempo y tejido específico, debido a que se restringe al ectodermo extraembrionario en etapas muy tempranas del desarrollo (6.5 días de gestación); para los 7.5 días de gestación se

expresa en la parte anterior del embrión. Este patrón de expresión coincide con los sitios donde se produjeron los defectos en el embrión debido a la ausencia del gen, sin embargo, se desconoce cuál de las dos funciones (catalítica o de adhesión) de PLPP3 o incluso ambas, es responsable de los fenotipos observados (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

Posteriormente para estudiar su participación en etapas más avanzadas en el desarrollo y en linajes celulares específicos, se generó un alelo condicional, flanqueando los exones 3 y 4, responsables de su actividad catalítica que además contienen el tripéptido *RGE* responsable de su interacción con integrinas. Para la generación de este vector, se introdujo un casete de selección *PGKneo* flanqueado por secuencias *loxP*, en el segundo intrón en el sitio *XbaI* ubicado río arriba del exón 3 (Figura 7 b). Después células ES fueron electroporadas con el constructo; un clon fue seleccionado para la derivación de quimeras para probar la transmisión de la línea germinal y para establecer la nueva línea de ratón. A este alelo se le designó *Ppap2bfloxed* (floxed). Para probar la escisión mediada por Cre de los exones 3 y 4 in vivo, ratones heterocigotos *Ppap2bfloxed* (f/f) fueron cruzados con la línea *TNAPCre* que expresa la recombinasa Cre en la línea germinal. La secuencia flanqueada por los sitios *loxP* puede ser escindida por la recombinasa Cre bajo el control del promotor de nestina que se expresa en precursores neurales del sistema nervioso central (SNC), teniendo de esta manera ratones knockout condicionales de la PLPP3 en el SNC. A este nuevo alelo se le designó *Ppap2bDeltafloxed* (Δ f) (Figura 7 d) (Escalante-Alcalde *et al.*, 2007).

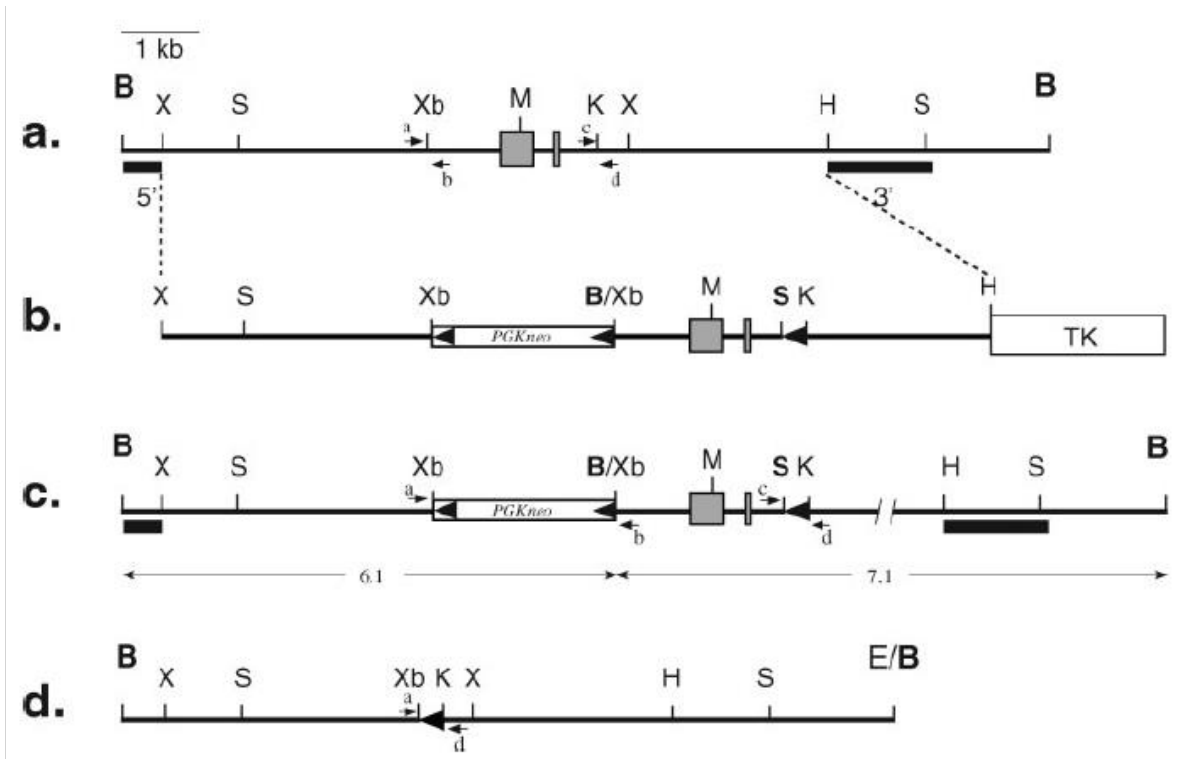


Figura 7. Generación de los alelos Ppap2bfloxed (f) y Ppap2bDeltafloxed (Δf). a) Estructura genómica del fragmento de 11 kb que contiene los exones 3 y 4 de PLPP3 (cajas grises). b) Estructura del constructo donde se introdujo un casete PGKneo floxed. c) Estructura del alelo antes de la recombinación mediada por Cre (alelo floxed). d) Estructura del alelo completo después de la recombinación mediada por Cre (alelo Deltafloxed), tomada de Escalante- Alcalde 2007.

Al analizar los embriones, se observó que los ratones homocigotos para el alelo Deltafloxed (Δf) presentan letalidad embrionaria en etapas tempranas del desarrollo (alrededor de los 9.5-10.5 días de gestación) producido por distintos defectos en la organización vascular del saco vitelino, apertura del tubo neural anormal y pliegues neurales poco desarrollados y deformados, así como poco desarrollo del alantoides impidiendo que se fusione con el corion (Figura 8).

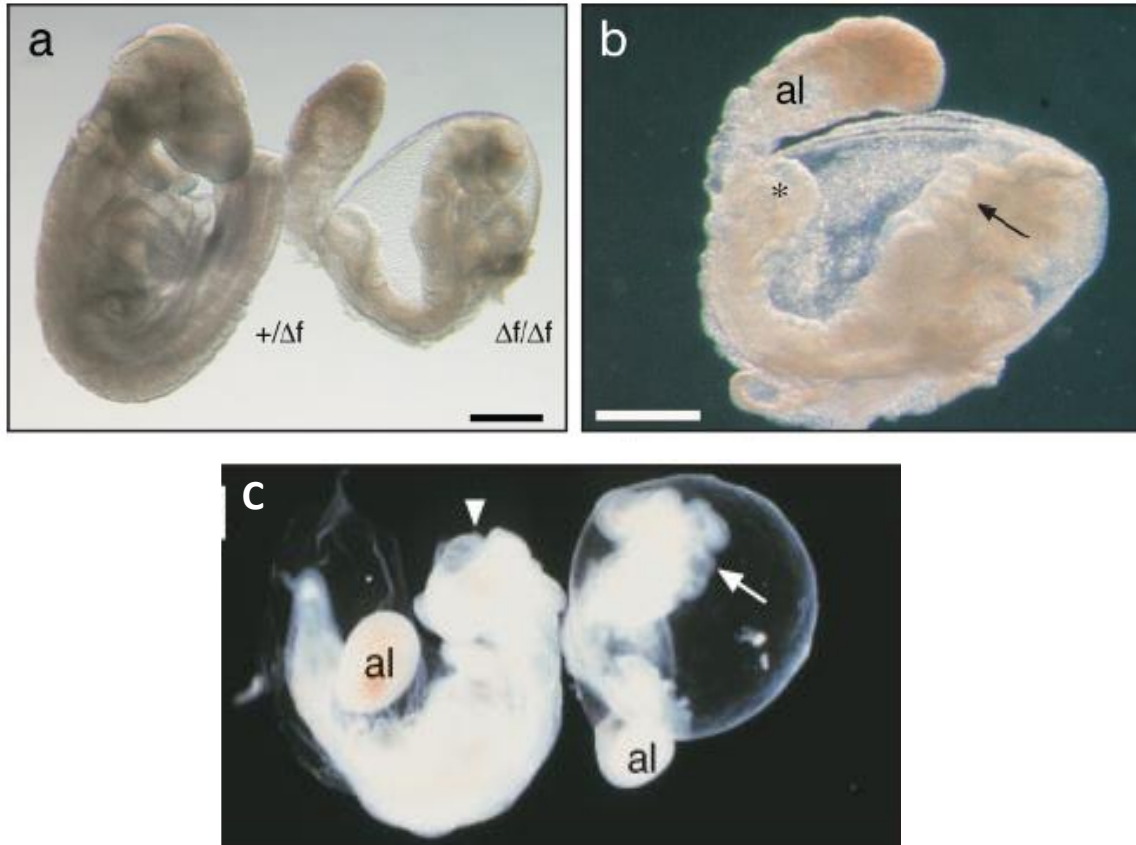


Figura 8. Fenotipo del alelo nulo *Ppap2bDeltafloxed* (Δf). a) Embriones E9.5, embrión con retraso en el desarrollo, no se había girado, alantoides anormal con signos de compactación en la punta y sin evidencia de fusión a la placa coriónica. (b) Embrión E9.5 $\Delta f/\Delta f$ muestra compactación más pronunciada del alantoides, pliegues neurales ondulados (flecha) y la yema de la cola es anormal (*). (d) embriones mutantes homocigóticos para el alelo nulo en E10.5 (izquierda) y E9.5 (derecha), muestran tubo neural abierto (punta de flecha) o pliegues neurales ondulados (flecha) y alantoides compactadas (al). Tomada y modificada de Escalante-Alcalde 2007.

La letalidad embrionaria temprana por la deficiencia de PLPP3 dificulta el análisis de su participación en etapas posteriores del desarrollo del ratón, con la finalidad de obtener información sobre la posible participación de PLPP3 en etapas posteriores del desarrollo mediante el análisis detallado de su patrón de expresión se generó un alelo nulo reportero para la actividad de la β -galactosidasa (β -gal) de bacteria, denominado $Plpp3^{lacZ}$ (Escalante-Alcalde *et al.*, 2009). El gen reportero fue insertado en el exón 3 de *Plpp3* mediante recombinación homologa en células troncales embrionarias de ratón. Este alelo, aparte de ser reportero, es nulo, ya que interrumpe la secuencia de la proteína

entre el dominio C1 y C2, los cuales son esenciales para su actividad catalítica y generan una PLPP3 no funcional (Ramírez, 2018).

Para dilucidar el patrón específico en los tejidos del embrión se realizaron ensayos para la actividad de β -gal donde se analizó el patrón de expresión en embriones de 8.5 a 13.5 días de gestación, encontrando que PLPP3 muestra un patrón de expresión muy dinámico y específico durante el desarrollo del embrión de ratón, principalmente en varias estructuras donde ocurren redes de señalización complejas que aseguran su correcto desarrollo y patrón, como los brotes de extremidades, primordios de glándulas mamarias y corazón, esto sugiere que su expresión puede desempeñar un papel clave en la modulación/integración de múltiples vías de señalización durante el desarrollo (Escalante-Alcalde et al., 2009).

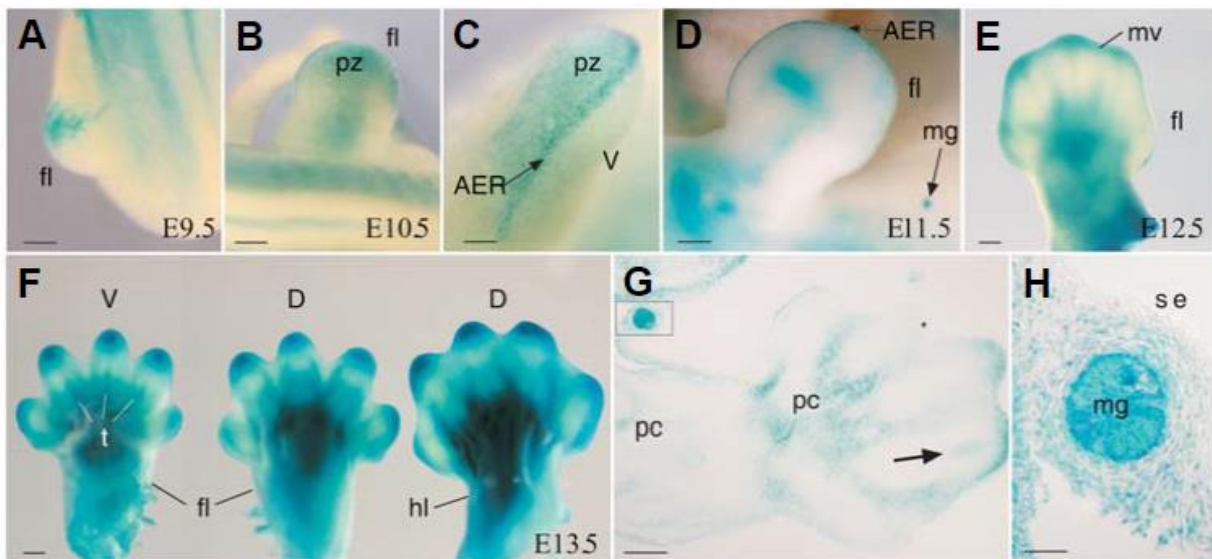


Figura 9. Tinción con β -galactosidasa de las extremidades en E9.5 (A), E10.5 (B y C), E11.5 (D), E12.5 (E) y E13.5 (F YG). Embriones heterocigotos Ppap2blacZ. (B, C). Vista Dorsal y laterales de una extremidad anterior, respectivamente. (G) Sección longitudinal de una extremidad anterior en E13.5; muestra la expresión en el dominio central del dígito. (H) Mayor aumento del área encuadrada en (G) que muestra expresión en el epitelio de la glándula mamaria.

3.7 Mutagénesis

La inactivación y la sobreexpresión de genes son técnicas fundamentales para determinar la función general de un gen y aportar información sobre su actividad. Sin embargo, estas técnicas no pueden aportar información detallada sobre la actividad de una proteína codificada por un gen específico, pero existen métodos que permiten inducir una alteración precisa en una secuencia de un gen, con el fin de cambiar la estructura y, posiblemente, la actividad de una proteína; uno de estos métodos es la Mutagénesis sitio-dirigida (SDM), que permite inducir cambios en la estructura proteica provocando alteraciones definidas de la secuencia nucleotídica del gen que codifica una proteína de interés. Los métodos de mutagénesis sitio-dirigida se utilizan para generar ADN clonados con secuencias modificadas para examinar la importancia de residuos específicos en la estructura de la proteína y función, este es el principal método utilizado en ingeniería de proteínas para alterar la selectividad del sustrato (Brown, 2008).

Existen diferentes maneras realizar SDM, la más empleada es la Mutagénesis sitio-dirigida por PCR donde se utiliza como cebador un oligonucleótido (con la secuencia de bases alteradas deseada) en la amplificación del gen de interés mediada por ADN polimerasa. Originalmente, estas técnicas solo permiten generar una mutación por experimento. Por lo que deben realizarse dos reacciones de PCR, cada una con un cebador normal (que forma un híbrido apareado por sus bases con el ADN molde) y un cebador mutagénico (que contiene un solo error de apareamiento de pares de bases, que corresponde a la mutación). Esta mutación está presente al principio en ambos productos de la PCR, que corresponden cada uno a una mitad de la molécula de ADN inicial, después se mezclan y se lleva a cabo un ciclo final de PCR para construir y completar la molécula de ADN mutada (Brown, 2008; Voet *et. al*, 2006).

Actualmente, se han desarrollado nuevos kits de mutagénesis que permiten la inserción simultánea de múltiples mutaciones, además de ser métodos rápidos y confiables. Para realizar la SDM utilizando estos kits, se requiere un solo oligonucleótido mutagénico para mutar cada sitio, utilizando un molde de ADN de doble cadena, así como una mezcla de enzimas que incluyen una polimerasa de ADN Pfu que proporciona una síntesis de ADN de alta fidelidad y una enzima *DpnI*, que, junto con los parámetros de ciclo de PCR, permiten la mutagénesis en múltiples sitios en aproximadamente dos horas, además de una transformación durante la noche.

En el laboratorio de la Doctora Diana Escalante, la Dra. Ana Valeria Martínez Silva trabajó en la generación de un par de ADN plasmídicos que contienen mutaciones puntuales del sitio catalítico y del motivo de unión a integrinas de la PLPP3 (figura 10) mediante SDM tradicional, pero esta técnica representó diversos problemas, dificultando el cambio de bases en dichos plásmidos, en su trayectoria por obtener los nuevos vectores plasmídicos para la generación de dos nuevos alelos del gen de la PLPP3 se tomó la decisión de usar el Kit “QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis” (Aligent Technologies, 210515).

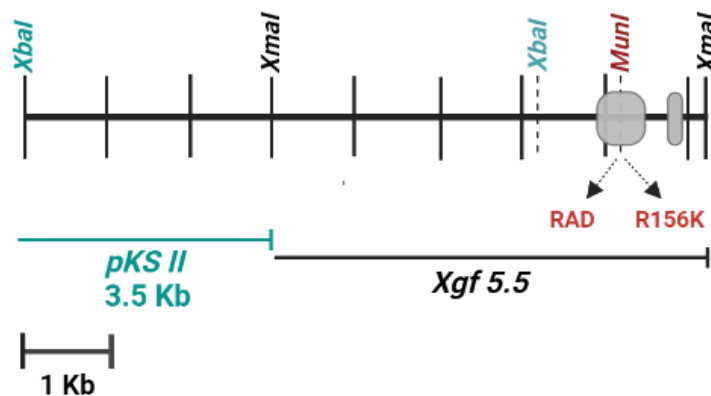


Figura 10. Mapa de la construcción inicial de los vectores de 8.5 Kb (*Xgf 5.5 + pKS II+*). Las flechas indican el lugar donde se generaron las mutaciones puntuales, las cajas grises representan los exones, caja grande exón 3 y la caja delgada al exón 4 (cada vector contenía solo una mutación). Se muestran algunos de los sitios de restricción importantes.

El método de mutagénesis dirigida que sigue este kit consiste en tres pasos que se describe en la figura 11. El paso 1 utiliza un termociclo acelerado para lograr varias rondas de síntesis de cadenas mutantes. Los componentes de esta reacción incluyen un molde de ADN de doble cadena superenrollada, cebadores de oligonucleótidos sintéticos que contienen las mutaciones deseadas y la combinación de enzimas proporcionada por el kit que incluyen una ADN polimerasa Pfu Fusion. En primer lugar, los cebadores mutagénicos se hibridan con el ADN molde desnaturalizado. La ADN polimerasa extiende los cebadores mutagénicos con alta fidelidad y sin desplazamiento del cebador, generando moléculas de ds-DNA donde una cadena lleva las mutaciones. En el paso 2 del procedimiento, los productos de la reacción del termociclo se tratan con la endonucleasa de restricción *DpnI*. La endonucleasa *DpnI* cuya secuencia blanco es 5'-Gm⁶ATC-3', es específica para el ADN metilado y hemimetilado y se utiliza para digerir el ADN parental. En el paso 3, la mezcla de reacción, que está altamente enriquecida en ADN monocatenario mutado, se transforma en células ultracompetentes XL10-Gold. El ss-DNA circular mutante se convierte en forma dúplex *in vivo*. A continuación, el ADN plasmídico de doble cadena puede prepararse a partir de los transformantes y analizarse mediante métodos apropiados para identificar las clonas que portan cada una de las mutaciones deseadas. Las clonas obtenidas son secuenciadas para corroborar la inserción adecuada de cada mutación. Finalmente, la Dra. Martínez obtuvo los plásmidos *Xgf 5.5/RAD + pKS II* y *Xgf 5.5/R156K + pKS II* que contienen las mutaciones de interés, necesarias para la generación de los dos nuevos alelos. A lo largo de este trabajo serán nombrados *RAD* y *R156K*.

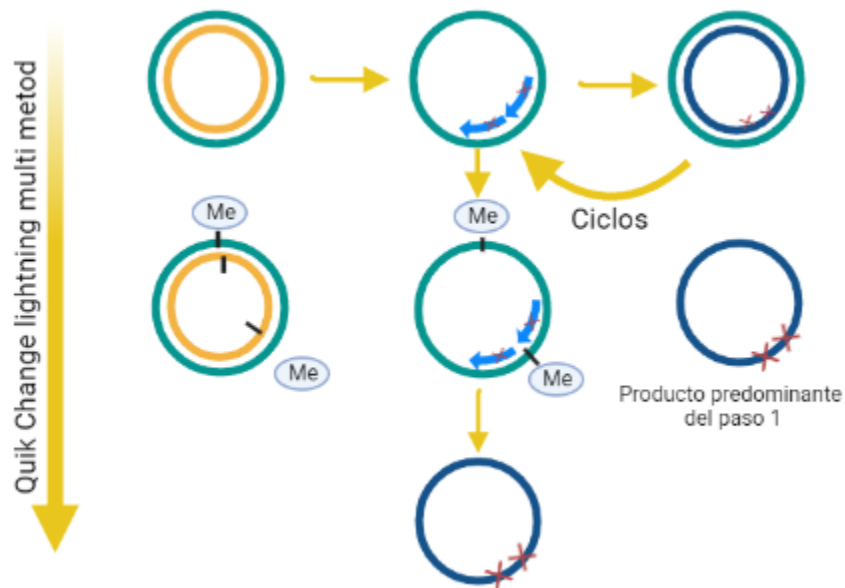


Figura 11. Principio que sigue el Kit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis.

El siguiente paso en la generación de los alelos es insertar un casete de selección positiva, que es el objetivo de esta tesis; para ello se utilizará el casete de selección positiva *pSK lox neo lox* (figura 12) en los vectores plasmídicos *RAD* y *R156K* (Figura 10), los cuales contienen dos sitios de corte para la enzima de restricción *XbaI*, en los que el casete puede insertarse y en dos orientaciones diferentes. Si los plásmidos *Xgf 5.5/RAD + pKS II* y *Xgf 5.5/R156K + pKS II* son digeridos con la enzima *XbaI*, se obtendrán dos fragmentos, uno de 2.2 y otro de 6.3 Kb. Mientras que después de la inserción del casete y debido a que en cada sitio puede insertarse en dos orientaciones diferentes, al ser digeridos con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, se liberaran fragmentos de ADN de diferentes tamaños, teniendo como resultado diferentes patrones de bandas al ser analizados por electroforesis en geles de agarosa (Figura 13).

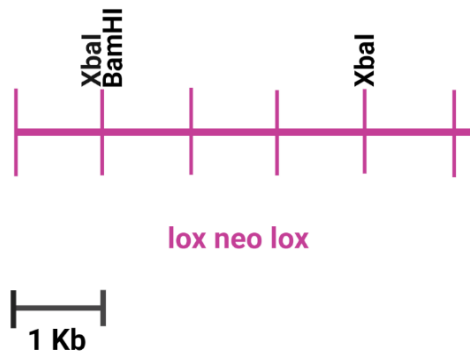


Figura 12. A) Construcción del plásmido *pSK lox neo lox*. El cual se utilizó para obtener el fragmento correspondiente al casete de selección positiva. Este casete contiene un único sitio de restricción para la enzima *BamHI*. B) Construcción de los vectores plasmídicos *RAD* y *R156K*.

Después de la inserción del casete, si los plásmidos son digeridos con la enzima *XbaI*, el fragmento correspondiente al casete será liberado (2.2 Kb), además de otro fragmento de 2.2 y uno de 6.1 Kb; que, al ser analizados en un gel de agarosa, se podrán visualizar una banda de 2.2 Kb y otra de 6.1 Kb. Mientras que al digerir el ADN con la enzima *BamHI* se podrá conocer el sitio y la orientación en la cual se insertó el casete, ya que el casete contiene un único sitio de restricción para esta enzima. El primer sitio de *XbaI* pertenece al fragmento de *Xgf 5.5* del vector, si el casete se insertó en sentido 3' a 5', se liberarían dos fragmentos de ADN uno de 2.2 y otro de 8.3 Kb. Mientras que, si se insertó en sentido contrario (5' a 3') los fragmentos resultantes serían de 6.3 y 4.2 Kb (Figura 13 B).

El segundo sitio pertenece al fragmento de *pKS II+*; si se inserta de 3' a 5' al ser digerido con *BamHI* se liberará un fragmento de 10.5 Kb, linealizando el plásmido. Cuando la orientación es la contraria (5' a 3') solo se liberarán dos fragmentos de ADN uno de 8.5 y otro de 2 Kb, (figura 13 A). Para asegurar que la eficiencia de recombinación legítima sea mayor, se elegirán las clonas donde el casete se haya insertado en el sitio de *Xgf5.5*, en cualquiera de sus dos orientaciones, a estas nos referiremos como sitio de interés (13 B).

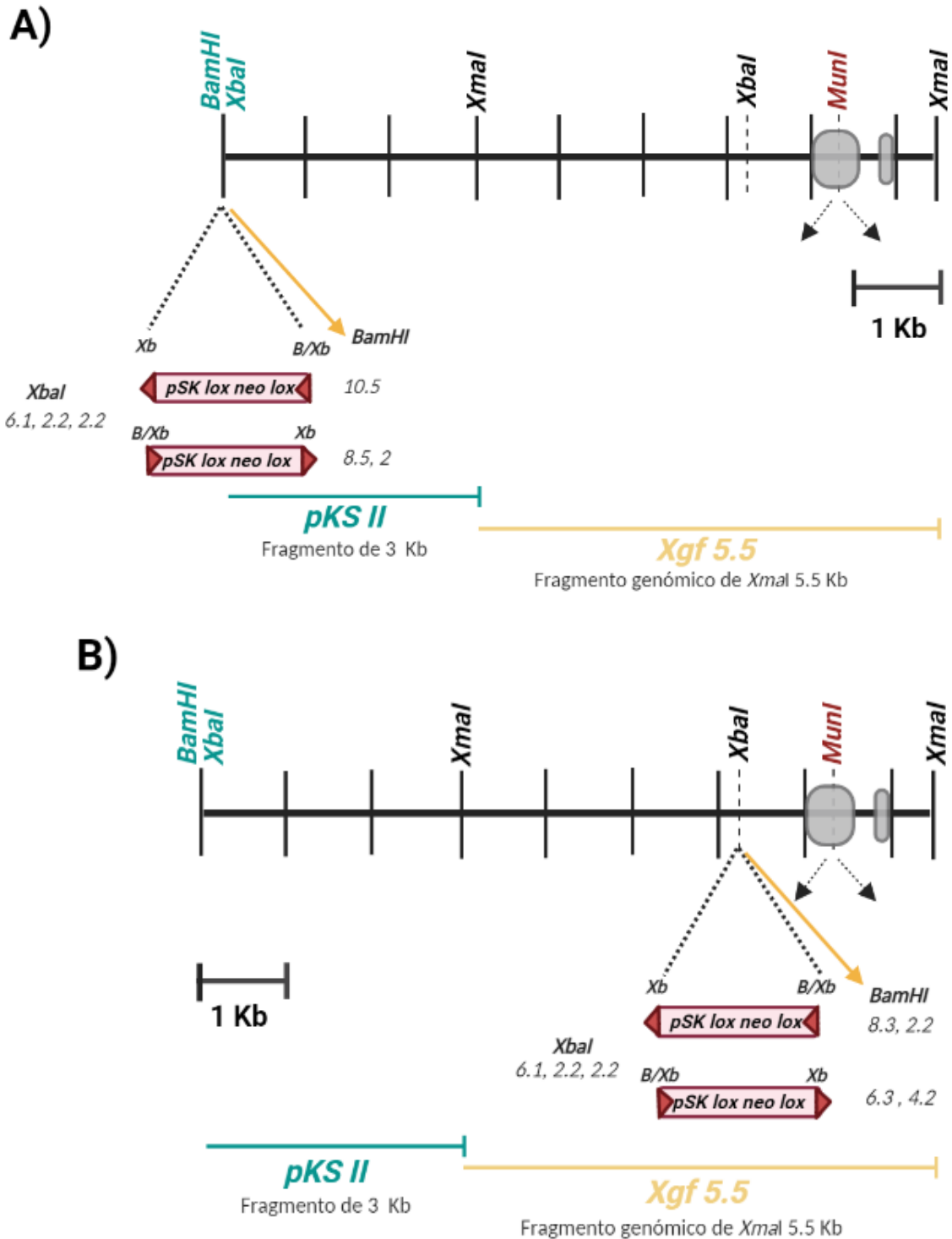


Figura 13. Mapa de la construcción del vector con el casete de selección positiva, se presentan las diferentes orientaciones de inserción del casete. A) Sitio 1, cuando el casete se inserta en el sitio de restricción de *XbaI* de *pKS II*+. B) Sitio numero 2: cuando se inserta en el sitio de restricción de *XbaI* de *Xgf 5.5*. Los números indican los pesos esperados en Kb al realizar las digestiones con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, respectivamente.

4. Justificación

Dado que la PLPP3 ha demostrado tener al menos dos dominios funcionales (catalítico y de adhesión) y con la finalidad de discernir cuál de ellos es el responsable de producir los distintos defectos observados, en el laboratorio se propuso generar dos nuevos alelos con mutaciones en el gen de la PLPP3. El primero consiste en cambiar la secuencia *RGE*, que interactúa con receptores de integrinas y media la adhesión célula-célula, por la secuencia *RAD* (Arginina-Glicina-Glutamato), la cual se ha visto que anula dicha interacción. Y el segundo consiste en insertar una mutación inactivadora del sitio catalítico al sustituir la Arginina (R) 156 por lisina (K). Con la finalidad de avanzar en el diseño de estos nuevos alelos, nos proponemos insertar un casete de selección positiva *pSK lox neo lox* en los vectores que contienen las mutaciones necesarias para inactivar las áreas antes mencionadas, para que futuros proyectos inserten un casete de selección negativa y finalmente generar los plásmidos de recombinación homóloga para células troncales.

5. Hipótesis

Si el casete *PSK lox neo lox* se inserta en la dirección adecuada dentro de un vector plasmídico que contiene las mutaciones puntuales que inactivan el sitio de unión a integrinas y el sitio catalítico de la PLPP3, se podrá generar un nuevo vector plasmídico que contenga el casete de selección positiva y las mutaciones, necesarios para la generación de los dos nuevos alelos.

6. Objetivos

- Insertar el casete de selección positiva PSK *lox neo lox* en un vector plasmídico que contenga la mutación puntual del sitio de unión a integrinas de *RGE* (Arginina-Glicina-Glutamato) por *RAD* (Arginina-Alanina-Aspartato) de la PLPP3.
- Insertar el casete de selección positiva PSK *lox neo lox* en un vector plasmídico que contenga la mutación puntual del sitio activo Arginina (R) 156 por Lisina (K) de la PLPP3.

7. Metodología

Para insertar el casete de selección positiva, se utilizaron como vectores los plásmidos generados anteriormente en el laboratorio por la Dra. Ana Valeria Martínez Silva, que contienen las mutaciones puntuales del sitio de unión a Integrinas (*RAD*) y sitio activo (R 156 por K) de la PLPP3, mediante PCR mutagénico, dando como resultado la construcción indicada en la figura 12 B.

7.1 Obtención de los vectores

Ambos vectores tienen un tamaño de 8.5 Kb y se linealizaron mediante una digestión enzimática con la enzima de restricción *XbaI* (NEB R0145S). Esta enzima puede digerir el ADN plasmídico de los vectores en dos sitios, como se muestra en la figura 12, resultando dos fragmentos, uno de 6.3 y otro de 2.2 Kb; para la construcción de los dos nuevos alelos se necesitó liberar el fragmento linealizado de 8.5 Kb mediante digestión enzimática de manera parcial. Para conocer el tiempo exacto donde la digestión parcial favorecía la liberación de dicho fragmento se realizó una cinética enzimática (curva de digestión), utilizando 1 µg de ADN plasmídico de cada uno de los vectores, 1 µl de enzima

de restricción *Xba*I (20 unidades), 5 μ l de Buffer Cutsmart-r 10mX y agua Milli-Q para llevar la reacción a un volumen total de 50 μ l. Se incubó a 37 °C y se tomaron alícuotas de 3 μ l de la reacción cada 30 segundos, durante 5 minutos (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5), después cada 60 segundos hasta llegar a los 10 minutos (6, 7, 8, 9 y 10), cada alícuota se inactivó con 5 μ l de buffer de carga que contiene urea y colorante azul de bromofenol.

Las digestiones parciales se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X (Trizma Base 45mM, ácido bórico 44mM y EDTA 1mM) con bromuro de etidio (BrEt) a 10 mg/ml y se corrió la electroforesis usando TBE 0.5X como buffer de corrida, también se cargó 1 μ l de marcador de peso molecular (Invitrogen,10787018). Las condiciones de la electroforesis fueron 100 V durante 30 minutos aproximadamente, después se tomaron fotografías de los geles en un transiluminador de luz UV con una cámara digital Canon Power Shot G6 y los colores de las imágenes fueron invertidos usando el programa Image J.

Una vez que se determinó el tiempo de la digestión parcial donde se favoreció la liberación del fragmento de 8.5 Kb se realizaron varias digestiones independientes para cada uno de los vectores y se colocaron en un pozo de aproximadamente 2 cm del gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X, también se cargó 1 μ l de marcador de peso molecular (Invitrogen,10787018) y la electroforesis se realizó en las mismas condiciones anteriores. Al finalizar la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador de luz UV y con ayuda de una navaja se cortó cuidadosamente la banda correspondiente a los 8.5 Kb, el fragmento de gel se colocó en un tubo de microvolumen de 1.5 ml y se pesó en una balanza analítica.

7.2 Obtención del inserto

Se utilizó como inserto el casete de selección positiva *pSK lox neo lox*, el plásmido se linealizó mediante digestión con la enzima de restricción *XbaI* (NEB R0145S). La reacción de digestión se preparó agregando 1 µg de ADN plasmídico, 1 µl de enzima *XbaI* (20 unidades), 5 µl de Buffer Cutsmart-r 10X y agua Milli-Q para llevar la reacción a un volumen total de 50 µl y se incubó a 37 °C por 1 hora, se inactivó la reacción incubando a 65 °C por 20 min. La electroforesis se realizó en un gel de Agarosa al 1% en TBE 0.5X y se realizó en las mismas condiciones que con los vectores, en este caso, las bandas obtenidas fueron de 3.0 y 2.2 Kb (figura 13 A). Con ayuda de una navaja limpia se cortó la banda de interés que correspondía a los 2.2 Kb y se colocó el fragmento de gel en un microtubo de 1.5 ml para posteriormente pesarlo.

7.3 Purificación plasmídica

Para purificar los fragmentos de plásmido cortados del gel de agarosa, se utilizó el Kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, 8704). Se siguió el protocolo proporcionado en el kit para cada uno de los fragmentos de gel, iniciando por el pesado de estos:

- 1) Se añadieron 3 volúmenes de buffer QG (solubilization buffer). Cada 100 mg de gel equivalen a un volumen (100 µl).
- 2) Se incubó a 50 °C por 10 minutos, agitando con vortex cada 2-3 minutos, para facilitar que el gel se disolviera completamente.
- 3) Se añadió un volumen de Isopropanol grado de biología molecular (Sigma, I9516) y se mezcló con vortex.

4) En una de las columnas del kit se añadieron 800 μ l de la muestra y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm en una microcentrífuga, después el sobrante se desechó, repitiendo este paso hasta centrifugar la muestra completa.

5) Para lavar la columna se añadieron 750 μ l de buffer PE (Wash buffer) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm y se desechó el sobrante.

6) Para eliminar el exceso de buffer de la columna, nuevamente se centrifugó.

7) Para eluir el ADN, se colocó la columna en un microtubo de 1.5 ml, se añadieron 50 μ l de buffer EB (Elution buffer) justo en el centro de la membrana, se incubó por 1 minuto para mejorar el rendimiento, y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm para recolectar el ADN plasmídico.

Al terminar, se cargaron 3 μ l de DNA extraído y 1 μ l de marcador molecular en un gel de Agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X, la electroforesis se realizó a 100V por aproximadamente 30 minutos, se visualizó y fotografió en un transiluminador de luz UV. Se cuantificó en un espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop) para conocer la concentración y la pureza de la muestra.

7.4 Defosforilación de los vectores

Para evitar la recircularización de los vectores y facilitar las futuras ligaciones, los vectores se defosforilaron con Fosfatasa alcalina intestinal *CIP* de la siguiente manera: en un microtubo de 1.5 ml se añadieron 1 μ g de ADN plasmídico, 2 μ l de *CIP* (10 unidades) (NEB M0525S), 5 μ l de Buffer Cut Smart-r 10X y agua Milli-Q para llevar la reacción a un volumen total de 50 μ l. La reacción se incubó a 37 °C por 1 hora, y se

inactivo a 65°C por 20 minutos, seguido de una incubación de 5 minutos en hielo. Debido a que el ADN se utilizó para reacciones de ligación, era necesario que la muestra estuviera lo más limpia posible, por lo cual se purificó utilizando nuevamente el Kit de extracción de gel QIAquick de QIAGEN, iniciando el protocolo desde el paso 3 (porque la muestra no se encontraba en un fragmento de gel) añadiendo un volumen de isopropanol (100 µl de la muestra equivalen a 1 volumen); a excepción de esta única modificación el protocolo se realizó de la misma manera. Con 3 µl del ADN defosforilado y purificado se corrió la electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X, en las mismas condiciones anteriores, se fotografió y se cuantificó la muestra. Este proceso se realizó en reacciones independientes para ambos vectores.

7.5 Ligación del vector y el inserto

Para unir los vectores y el inserto, en reacciones independientes, se utilizó la enzima T4 ADN Ligasa (Roche 10716359), la reacción se realizó en un radio 1:1 (vector: inserto) calculándolo con la herramienta NEB Calculator de New Englan Biolabs que realiza el cálculo mediante la siguiente formula:

$$m I = \left(\frac{1}{1}\right) (m V ng)(l V: I kb)$$

Donde $m I$ es la masa necesaria del inserto en nanogramos, $\left(\frac{1}{1}\right)$ es la relación molar deseada entre el vector y el inserto, $(m V ng)$ es la masa del vector expresada en nanogramos y $(l V: I kb)$ es la relación entre la longitud del vector e inserto expresada en Kb.

Se realizaron reacciones independientes para cada uno de los vectores, donde cada reacción contenía 50 ng del vector, el número de ng de inserto resultantes del cálculo, 5 µl de buffer Roche 10x para *Ligasa de ADN T4*, 1 µl de la enzima (1 unidad) y agua Milli-Q para llevar la reacción a un volumen total de 50 µl. La reacción fue incubada durante 16 horas a 4°C, pasado el tiempo de incubación la reacción se inactivó con calor incubando a 65°C por 10 minutos, seguido de una incubación en hielo de 10 min. Además, se incluyó un control negativo (20 ng de vector defosforilado con 1 µl de ligasa) y uno positivo (20 ng de vector sin defosforilar).

7.6 Generación de células ultracompetentes

Utilizando una asada de *E. coli* tomada directamente del glicerol congelado a – 70 °C, se inoculó una placa de medio LB sólido (20 ml de medio y 0.15 gr de Agar) y se incubó por 16 horas a 37°C. Todo el procedimiento se realizó en una área limpia y estéril, entre dos mecheros.

- 1) Para generar un cultivo de arranque y controlar el crecimiento bacteriano se inoculó con una sola colonia 25 ml de medio LB estéril en un matraz con de 250 ml con tapa y se incubó a 37 °C por 6 horas, pasado el tiempo de la incubación se tomó una alícuota de 10 µl del cultivo de arranque para inocular 250 ml de medio LB en un matraz de 1 litro, con tapa. Se incubó por aproximadamente 12 horas a 22 °C y 250 rpm.
- 2) Para medir el crecimiento bacteriano se tomó 1 ml del cultivo el cual se colocó en una celda de plástico para medir en el espectrofotómetro y se midió la Densidad Óptica (D.O) a 600 nm, utilizando como blanco 1 ml de medio LB estéril. Cuando

el cultivo alcanzó una densidad de 0.55 nm, el matraz se colocó en agua con hielo durante 10 minutos para detener el crecimiento bacteriano.

- 3) El cultivo fue colocado en frascos plásticos para centrífuga de 250 ml; se centrifugó a 3900 rpm en la Centrífuga de alta velocidad “Sorvall RC-5B” utilizando el rotor Sorvall GSA por 10 minutos a 4 °C, después se removió el medio decantando el frasco y colocándolo boca abajo en toallas absorbentes para permitir que el pellet formado tuviera la menor cantidad de medio posible.
- 4) Se resuspendió el pellet con 80 ml de “Inoue transformation buffer” (MnCl₄ H₂O 55mM, CaCl₂ H₂O 15 mM, KCl 250 mM, Pipes 10 mM pH 6.7 y agua necesaria para llevar la solución a 100 ml) previamente enfriado en hielo, remolinándolo cuidadosamente hasta que estuviera completamente disuelto, seguido de una centrifugación por 10 minutos a 4 °C.
- 5) Se removió el medio decantando el frasco y nuevamente se resuspendió con 20 ml de “Inoue transformation buffer”, cuando se resuspendió completamente, se añadieron 1.5 ml de dimetilsulfóxido o DMSO (Sigma D8418) remolinándolo e incubándolo por 10 minutos en hielo. Con puntas y microtubos de 500 µl fríos y estériles se hicieron alícuotas de 100 µl y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido para después ser almacenadas a – 70 °C.

7.7 Transformación bacteriana

Células ultracompetentes de *E. coli* fueron transformadas con el ADN de las reacciones de ligación por el método de Hannan “Ultra competent cells inoue” (Sambrook, 2001). Se descongelaron las alícuotas de 100 µl de células ultracompetentes en la palma de la mano y se incubaron en hielo durante 10 minutos, después en un área limpia y estéril

entre dos mecheros, a cada alícuota de células se añadió 1 μ l de las reacciones de ligación y se colocaron en tubos plásticos de ensaye con tapa de presión de 10 ml. Se incubaron en hielo por 30 minutos, después se indujo un choque térmico incubando en baño de agua por 90 segundos a 42°C e inmediatamente tras incubación en calor, se incubaron 90 segundos en hielo, posteriormente se agregaron 800 μ l de medio LB estéril previamente incubado a 37 °C. Para permitir la recuperación de las bacterias, se incubaron a 37°C por 2 horas con agitación constante a 250 rpm (figura 14).

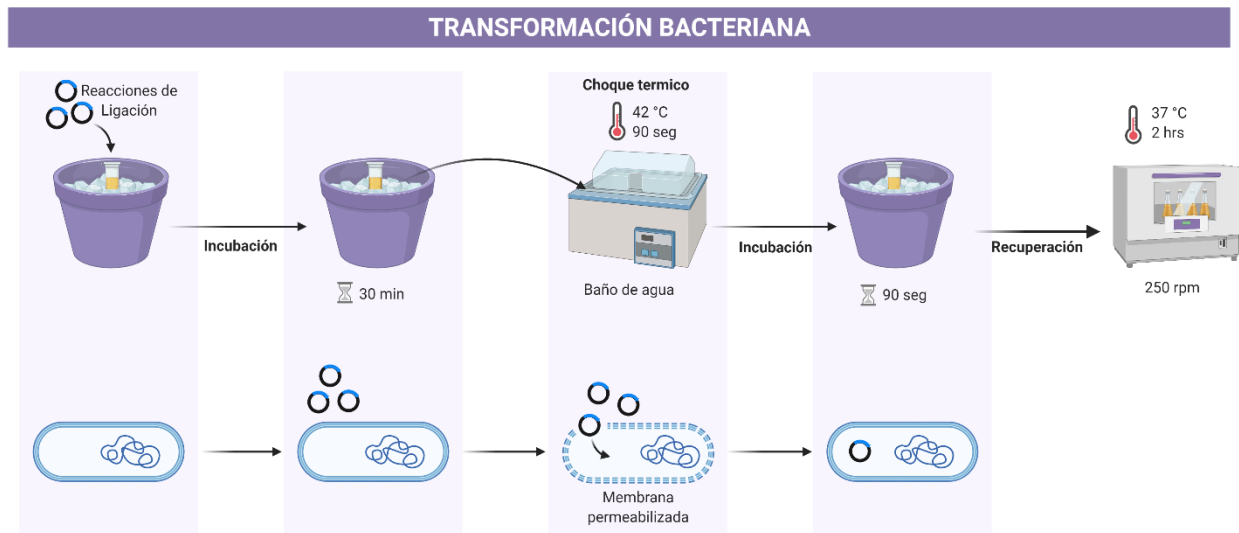


Figura 14. Protocolo de transformación bacteriana por el método de Hannan “Ultra competent cells inoue”. En la parte inferior del esquema se muestra el proceso por el cual pasan las bacterias: 1) Las bacterias contienen únicamente su ADN. 2) Las bacterias y el ADN plasmídico que se desea incorporar a la célula. 3) El choque térmico es inducido mediante un baño de agua caliente para que la membrana de las bacterias se vuelva permeable, permitiendo que el ADN plasmídico entre en la célula. 4) Para evitar que siga siendo permeable la membrana, se coloca nuevamente a temperaturas bajas. 5) Las células se recuperan y reproducen en incubación.

En cajas Petri que contenían medio LB selectivo sólido; cada una con aproximadamente 20 ml de medio LB, 0.15 g de agar y 20 μ l de ampicilina (100 mg/ml), se sembraron 200 μ l de bacterias transformadas con ayuda de un asa de vidrio hasta que el líquido se

incorporó completamente en el medio LB sólido. Las cajas se invirtieron e incubaron durante 12 horas a 37°C. Con las colonias transformadas se inocularon tubos de ensaye de vidrio con 3 ml de medio LB estéril y 6 µl de ampicilina, se incubaron a 37 °C durante toda la noche, con agitación constante a 250 rpm (figura 15).

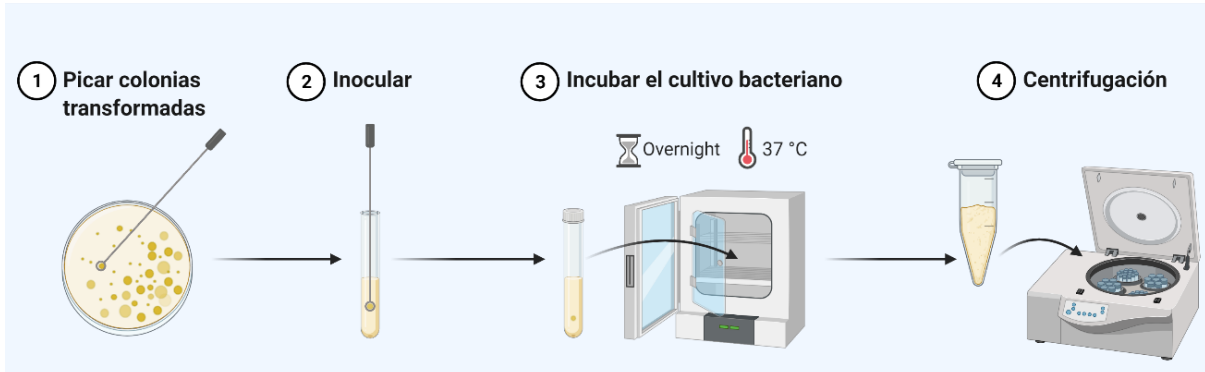


Figura 15. Cultivo de colonias transformadas. Este protocolo se realizó para cada una de las colonias, como primer paso del protocolo de extracción de plásmido.

Debido al gran número de colonias que se analizaron y para reducir costos, se utilizaron dos protocolos de extracción de plásmido mediante lisis alcalina; en uno de ellos se prepararon todos los reactivos en el laboratorio (7.8) y el segundo se utilizó el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, 27106).

7.8 Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina (miniprep)

Pasadas las 12 horas de incubación de los tubos inoculados, 1 ml de cultivo fue transferido a un microtubo de 1.5 ml para recuperar las bacterias por centrifugación a 3,000 rpm durante 4 min, el sobrenadante fue removido dejando el pellet lo más seco posible, el procedimiento se repitió hasta que se centrifugó todo el cultivo.

- 1) Para iniciar la lisis celular una vez obtenido el pellet se resuspendió en 100 µl de ALS I (Alkaline Lysis Solution I) estéril, previamente enfriada en hielo, que contiene Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM y EDTA pH 8.0 10 mM.

- 2) Se añadieron 200 μ l de ALS II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) recién preparada y a temperatura ambiente, rápidamente se mezcló la solución invirtiendo el tubo 5 veces.
- 3) Se añadieron 150 μ l ALS III (Acetato de potasio 5 M, Ácido acético glacial 5 M) previamente enfriado en hielo. Se invirtió el tubo varias veces hasta dispersar completamente la solución, después, se incubó en hielo de 3 a 5 minutos.
- 4) Se centrifugó por 5 minutos, se transfirieron 600 μ l de sobrenadante a un microtubo nuevo de 1.5 ml.
- 5) Se añadió un volumen de Fenol: Cloroformo y se mezcló con ayuda del vórtex, después, fue centrifugado por 2 minutos a 13,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo.
- 6) Para la recuperación del ADN, los ácidos nucleicos fueron precipitados, añadiendo 600 μ l de Isopropanol de grado biología molecular a temperatura ambiente. Nuevamente se mezcló con ayuda del vórtex, seguido de una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, rápida y cuidadosamente se desechó el sobrenadante, después el microtubo se colocó abierto y boca abajo en una toalla desechable para eliminar cualquier gota que pudiera quedar.
- 7) Se añadió 1 ml de etanol al 70 % seguido de una centrifugación a 13,000 rpm por 2 minutos, el etanol removió cuidadosamente y el microtubo se mantuvo abierto boca arriba por unos minutos para permitir que el Etanol se evaporara completamente y el pellet estuviera más seco.
- 8) Por último, el pellet se resuspendió en 50 μ l de H₂O Milli-Q.

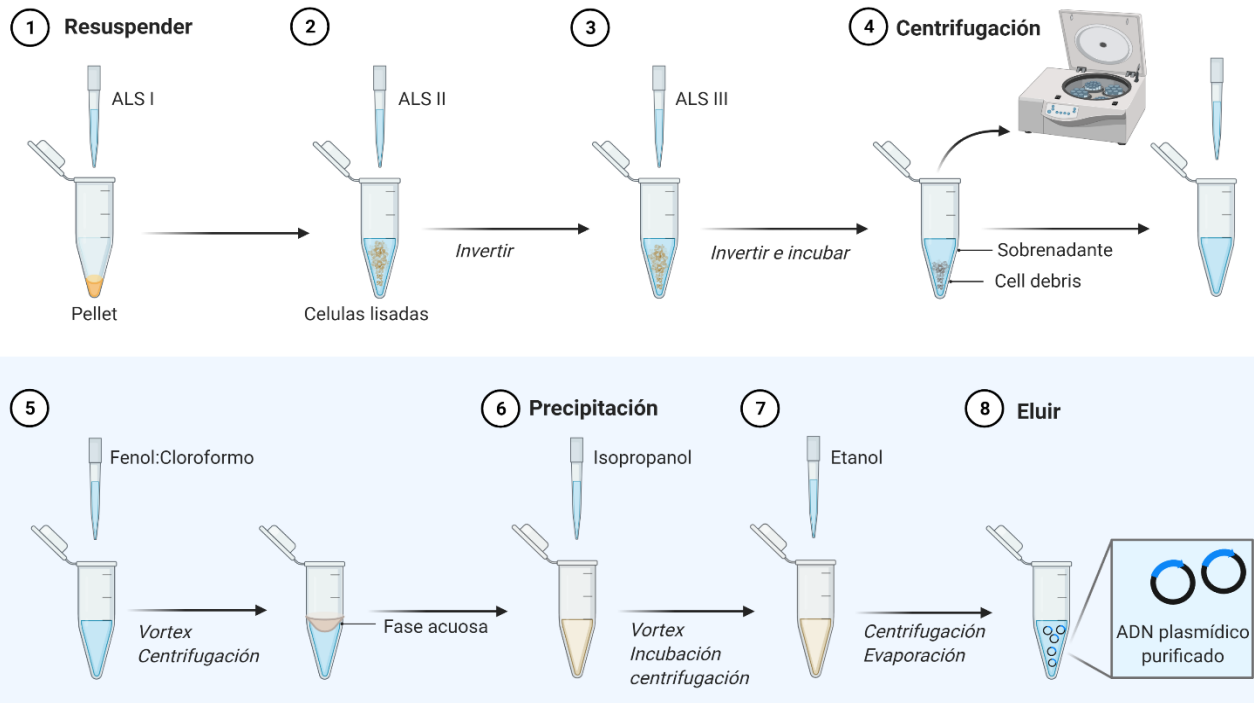


Figura 16. Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina (miniprep).

7.9 Protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina con el kit QIAPREP spin miniprep de QIAGEN

1. El cultivo celular de cada colonia fue colocado en microtubos de 1.5 ml y centrifugado a 3,000 rpm por 4 minutos, después el medio fue decantado y el pellet se resuspendió con 250 μ l de Buffer P1 (Resuspension buffer)
2. Se añadieron 250 μ l de Buffer P2 (Lysis buffer) y el tubo se invirtió de 2-3 veces para mezclar y permitir la lisis celular.
3. Se añadieron 350 μ l de Buffer N3 y se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm.
4. Al terminar, se formó un pellet, con ayuda de una pipeta se tomaron 800 μ l del sobrenadante sin tocar el pellet y se colocaron en la columna. Se centrifugó por 1

min para permitir que el líquido se filtrara por la columna y al finalizar el tiempo se decantó para eliminar el buffer.

5. Para lavar la columna se añadieron 750 µl de Buffer PE y se centrifugó por 1 minuto y se decantó.
6. Nuevamente se centrifugó para eliminar el Buffer residual que pudiera quedar en la columna.
7. Para eluir el ADN se añadieron 50 µl de buffer EB (Elution Buffer) al centro de la columna, para mejorar el rendimiento se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y después se centrifugó por 1 minuto.

Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro de micro-volumen (NANODROP) para conocer su concentración y pureza.

7.10 Verificación de la inserción del casete de selección positiva

Se realizó una nueva reacción de digestión enzimática utilizando la enzima de restricción *XbaI*, esta digestión permitió discernir las colonias que habían incorporado el casete, de las que no. Cuando las colonias lo habían incorporado, la digestión liberaría el casete y daría como resultado dos fragmentos de ADN de 2.2 Kb y uno de 6.1 Kb.

La reacción de digestión se preparó de la siguiente forma para cada una de las colonias transformadas: 0.5 µg de ADN de plasmídico, 2 µl de buffer Cutsmart-r 10X, 0.5 µl de enzima de restricción *XbaI* (10 unidades) y agua Milli-Q para llevar la reacción a un volumen total de 20 µl, se incubó a 37 °C por 1 hora y se inactivo la reacción incubando a 65 °C por 20 minutos. Con 2 µl de la reacción y 1 µl de marcador de peso molecular se cargó un gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 0.5 X y la electroforesis se realizó a 100 V

por 30 minutos, nuevamente el gel fue observado en un transiluminador de luz UV y fotografiado.

Con las colonias seleccionadas se inocularon nuevamente tubos de ensaye de vidrio con 3 ml de medio LB estéril y 6 µl de ampicilina, para cada colonia seleccionada y se incubaron a 37 °C toda la noche, con agitación constante a 250 rpm por 12 horas, finalmente se purificó el ADN plasmídico por el protocolo de lisis alcalina y centrifugación por columnas usando el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN 27106).

7.11 Verificación de la orientación del casete

Como ya se mencionó anteriormente, los vectores contienen dos sitios de restricción de *XbaI* donde el casete se puede insertar durante la reacción de ligación, las colonias podían incorporar el casete en ambos sitios y en dos diferentes orientaciones (figura 13). Recordando que necesitamos que el casete se inserte en el sitio *XbaI* de *Xgf 5.5* (Figura 13 B), es necesario verificar el sitio de inserción y la orientación del inserto. Para ello se realizó digestión enzimática con la enzima de restricción *BamHI* a cada colonia. Se eligió dicha enzima debido a que el casete contiene solo un sitio de restricción de *BamHI*, y dependiendo en que orientación se insertó el casete será el tamaño de los fragmentos digeridos, lo cual permitirá orientarnos en la construcción y elegir la colonia que insertó el casete en el sitio de interés (13 B).

La reacción se realizó de la siguiente manera: 0.5 µg de ADN plasmídico, 10 unidades de *BamHI* (NEB R0136S), 5 µl de Buffer 3.1 10X y agua Milli-Q para llevar la reacción a un volumen total de 20 µl, se incubo a 37 °C por 1 hora; esta enzima no requiere ser inactivada, por lo cual al finalizar el tiempo de incubación solo se incubó en hielo por 5

minutos y se analizó mediante electroforesis en las mismas condiciones que las anteriores. Se visualizó el gel en el transiluminador de luz UV para ver el patrón de bandas y elegir las colonias que presentan las orientaciones de interés. Una vez seleccionadas las colonias, se mandaron a secuenciar las muestras para asegurar que las mutaciones y la construcción de los plásmidos fuera correcta.

7.12 Extracción de plásmido (maxi prep)

Con la finalidad de obtener ADN plasmídico más limpio y con un mayor porcentaje de pureza, los plásmidos una purificación mediante gradiente de Cloruro de Cesio, para el cual se necesitó mayor cantidad de ADN plasmídico; para obtenerlo se utilizó el Plasmid Maxi kit de QIAGEN (12163) que permite la purificación de hasta 10 µg de ADN en una sola purificación.

El procedimiento inició con un cultivo celular en placas preparadas con medio LB selectivo (aproximadamente 20 µg de medio LB estéril, 1.5 g de Agar y 20 µl de ampicilina a 100 µg/µl) de cada uno de los plásmidos de ambos vectores; se sembró una asada tomada directamente del glicerol de cada uno, se invirtió la placa y se incubó a 37 °C por 12 horas. El protocolo del kit se realizó exactamente igual para cada uno de los vectores en reacciones independientes.

- 1) Se escogió una sola colonia de la placa recién sembrada, con ayuda de un palillo de madera estéril se picó la colonia y se inoculó un tubo de ensaye con 5 ml de medio LB selectivo (30 µl de ampicilina a 100 µg/µl), para obtener un cultivo iniciador, después se incubó por 8 h a 37°C con agitación constante a 250 rpm.
- 2) En un matraz de 500 ml se diluyó el cultivo iniciador, inoculando 100 ml de medio LB selectivo con 200 µl del cultivo iniciador.

3) Se incubó a 37 °C durante 12 horas con agitación constante 250 rpm.

El cultivo debía alcanzar una densidad celular de aproximadamente 3 a 4 x 10⁹ células por mililitro, lo que equivale a aproximadamente 3 gr de peso húmedo.

3. Una vez que el cultivo alcanzó dicho crecimiento celular se colocó en tubos de ultracentrífuga de polipropileno de 50 ml y se centrifugó a 6000 g por 15 minutos a 4 °C en la ultracentrífuga Beckman Coulter J-26XP, después se retiró el medio

4. Se resuspendió el sedimento bacteriano en 10 ml de buffer P1 (Resuspension buffer) y se colocó en tubos de 50 ml.

5. Se añadieron 10 ml de Buffer P2 (Lysis buffer lysis buffer) y se mezclaron completamente invirtiendo vigorosamente de 4 a 6 veces el tubo sellado, sin agitar manualmente o con vortex, después se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Debido a que el buffer P1 contiene LyseBlue la suspensión de células se volvió azul después de la adición del buffer P2, la mezcla debía dar como resultado una suspensión de color homogéneo, si la suspensión contenía regiones incoloras localizadas, nuevamente se invertía el tubo hasta que la suspensión fuera de color azul homogéneo.

6. Después de la incubación se agregaron inmediatamente 10 ml de Buffer P3 (Neutralization buffer) enfriado previamente, se mezcló completamente invirtiendo vigorosamente de 4 a 6 veces e incubando en hielo durante 20 min, la suspensión se mezcló hasta que se viera incolora y homogénea, sin ningún rastro de color azul.

7. La mezcla se colocó nuevamente en tubos de centrifuga de 50 ml de polipropileno y se centrifugó a 20,000 g durante 30 min a 4 °C, después se recolectó el sobrenadante en un tubo limpio de centrífuga.

8. Para evitar que el sobrenadante tuviera partículas en suspensión y obstruyera la columna se centrifugó nuevamente a 20,000 x g durante 15 min a 4 °C, después se recolectó el sobrenadante en un tubo limpio de centrifuga.
9. Para equilibrar una columna (QIAGEN-tip 500) se añadieron 10 ml de buffer QBT (Equilibration buffer); la columna se drenó completamente por gravedad.
10. El sobrenadante del paso 8 se colocó en a la columna de QIAGEN-tip, hasta drenarse por completo.
11. Para eliminar los contaminantes presentes en la mayoría de las preparaciones de ADN plasmídico la punta se lavó con 30 ml Buffer QC (Wash buffer) por flujo de gravedad. Se realizó un segundo lavado, este paso es necesario cuando se utilizaron grandes volúmenes de cultivo o cepas bacterianas que producen grandes cantidades de carbohidratos.
12. Finalmente para eluir el ADN plasmídico se añadió 15 ml de buffer QF (Elution buffer) y el eluato se recolectó en un tubo de centrifuga de 50 ml.
13. El ADN se Precipitó añadiendo 10,5 ml (0,7 volúmenes) de Isopropanol a temperatura ambiente, después se mezcló y centrifugo inmediatamente a 15 000 x g por 30 min a 4°C, después se desechó con cuidado el sobrenadante, pues los gránulos de isopropanol tienen una apariencia vidriosa y pueden ser difíciles de ver en comparación con los gránulos esponjosos resultantes de la precipitación con etanol.
14. El pellet de ADN se lavó con 5 ml de Etanol de grado molecular al 70% (3.5 ml de Etanol y 1.5 ml de agua Milli-Q) a temperatura ambiente y se centrifugó a 15 000 x g

durante 10 min. Al finalizar se desechó con cuidado el sobrenadante procurando que el pellet no se desprendiera del tubo.

15. El pellet se secó durante 5 a 10 min a temperatura ambiente, después se disolvió en 500 μ l de agua Milli-Q pipeteando hacia arriba y hacia abajo para resuspenderlo completamente.

Al terminar se determinó la concentración del ADN, cuantificando 1 μ l de las muestras en espectrofotómetro de micro volumen, a 260 nm, las lecturas debían estar entre 0,1 y 1,0, para asegurar la pureza de las muestras. Posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa de 1% en buffer TBE 0.5X, se cargaron 2 μ l de cada DNA extraído, además se cargó 1 μ l de marcador de peso molecular (Invitrogen,10787018); la electroforesis se realizó a 100 V por aproximadamente 30 minutos. El gel se visualizó y fotografió en un transiluminador de luz UV.

7.13 Purificación plasmídica por gradiente de densidad con Cloruro de Cesio (CsCl)

Para poder obtener ADN plasmídico más puro y con la menor cantidad de ADN genómico se realizó purificación por gradiente de densidad utilizando CsCl. El ADN extraído previamente, fue preparado de la siguiente manera:

A los 0.5 ml de ADN se agregaron 1.6 ml de agua Milli-Q para tener una solución final de 2.1 ml de ADN. La solución fue colocada en tubos Open-Top thinwall ultra clear de 5 ml (Beckman Coulter 344057), después, se agregaron 2.15 gr de CsCl y 150 μ l BrEt (1 μ g/ μ l), el tubo se cubrió con aproximadamente 2.3 ml de aceite mineral. El protocolo se realizó exactamente igual para cada uno de los plásmidos en tubos independientes.

Una vez preparados los dos tubos se pesaron en la balanza analítica procurando que ambos pesaran exactamente lo mismo, de no ser así se ajustó el peso agregando un aceite mineral. Los tubos se centrifugaron utilizando la ultracentrífuga Beckman Coulter a 36,000 rpm durante 22 horas con un valor de K de 113 (medida de la eficiencia de pelletización del rotor), utilizando el rotor Swinging-Bucket SW 55 Ti. Terminado el tiempo de centrifugación los tubos fueron sacados cuidadosamente del rotor, sin inclinarlos para visualizarlos en un transiluminador de Luz UV.

En el tubo se podía observar la separación por densidades de la muestra preparada, mientras que el ADN presentó fluorescencia debido al Bromuro de Etidio agregado a la muestra. El ADN formó dos líneas; la primera aproximadamente a la mitad del tubo la cual correspondían al ADN plasmídico, mientras que el ADN genómico se encontraba en arriba del ADN plasmídico. Para recolectar únicamente el ADN plasmídico, con ayuda de una jeringa con aguja de capacidad de 3 ml se perforó el tubo por un costado a la altura de la línea de ADN y se aspiró, procurando no revolver los componentes (Figura 17). El volumen extraído de cada tubo fue colocado en un tubo de microvolumen de 1.5 ml y medido con una pipeta de 1,000 μ l, lo demás fue desechado en los residuos tóxicos.

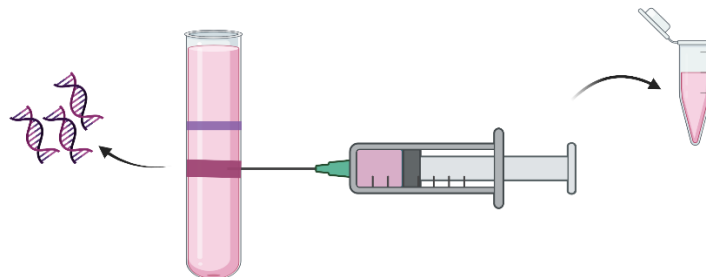


Figura 17. Esquema representativo de la extracción del ADN del gradiente. La línea rosa representa el ADN plasmídico y la morada el ADN genómico.

Para eliminar el Bromuro de etidio de las muestras, se agregaron 500 µl de Isopropanol grado biología molecular y se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm, al terminar se extrajo la fase superior de color rosa, que correspondía al bromuro de etidio. Este procedimiento se realizó varias veces hasta que dejara de observarse la fase rosa a simple vista, después se observaron en el transiluminador de luz UV y se repitieron los lavados hasta que no quedara rastro del bromuro de Etidio en las muestras bajo la luz ultravioleta.

7.14 Diálisis con membranas

Para eliminar las sales que las muestras contenían por el gradiente con CsCl se realizó el protocolo de diálisis con membranas Spectra/Por 4 (Spectrum 132700), estas membranas son tubulares con un MWCO de 12,000 a 14,000 kD.

1. Preparación del tubo de diálisis

Para utilizar la membrana de diálisis fue necesario esterilizarla primero, en un vaso de precipitado de vidrio de 1 litro se agregaron 500 ml de solución de Bicarbonato de sodio al 2 % con 1 ml de EDTA 1 mM, después, se calentó hasta que la solución llegara al punto de ebullición y se agregaron 4 membranas de 5 cm previamente cortadas, se hirvió por 10 minutos. Pasado el tiempo de ebullición las membranas se sacaron de la solución y se enjuagaron con agua destilada, después se hirvieron nuevamente en 500 ml de EDTA 1 mM durante 10 minutos, se esperó el tiempo necesario para que la solución se enfriara y se guardaron a 4 °C hasta el momento en que fueron usadas. Antes de ser usadas las membranas se abrieron y cortaron para formar un cuadro de 1.5 cm² de una sola capa, después, se lavaron con abundante agua destilada.

Microtubos de 1.5 ml se adaptaron para realizar la diálisis; la tapa del microtubo fue perforada en forma de círculo con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio calentada en un mechero para realizar el orificio al centro de la tapa, pero sin afectar el cerrado del tubo (Figura 18). La muestra de ADN se agregó al tubo y con la membrana previamente esterilizada, cortada, y lavada se tapó el tubo colocando la membrana entre la boca del tubo y la tapa, después para sellar el microtubo y evitar que la muestra pudiera salirse se colocó parafilm alrededor del tubo sin tapan o tocar la membrana.

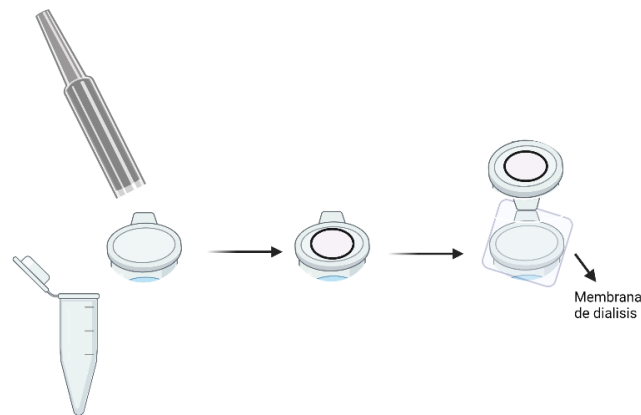


Figura 18. Tubo de micro volumen adaptado para funcionar como tubo para diálisis. La membrana de diálisis se coloca entre la boca del tubo y la tapa, previo al cerrado la muestra se coloca dentro del tubo.

2. Diálisis

En un vaso de precipitado de plástico se agregaron 4 litros de buffer TE al 1X se sumergieron los tubos invertidos procurando que la tapa con la membrana tocara en todo momento el buffer, ajustándolos al vaso de precipitado con hilo y cinta adhesiva. El vaso fue colocado sobre una placa de agitación y guardado dentro del cuarto frío durante 12 horas, pasado el tiempo el buffer TE fue reemplazado por nuevo y se dejó dializando aproximadamente 2 horas o hasta que ya no salieran sales del tubo.

7.15 Precipitación de ADN con Cloruro de sodio (NaCl)

El tubo de microvolumen fue destapado y el ADN extraído con una pipeta de 1,000 µl con la cual se midió el volumen de la solución y se colocó en un tubo nuevo. Para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 20 µl de NaCl 5 M por cada 500 µl de solución a precipitar, 1 ml de Etanol absoluto grado biología molecular (E7148) y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces, se incubó 1 hora a - 70 °C. Terminado el tiempo de incubación se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de Etanol al 70% (350 µl de Etanol grado biología molecular y 150 µl de agua Milli-Q), se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante, el lavado se repitió una vez más en las mismas condiciones. Con el etanol decantado el microtubo que contenía el pellet se dejó abierto durante 10 minutos para que se evaporara el etanol que pudiera quedar en las paredes, finalmente se resuspendió el pellet en 100 µl de agua Milli-Q.

8. RESULTADOS

La clonación molecular es una técnica empleada para estudiar y modificar un gen o bien reintroducir un gen modificado. Esta técnica consiste en insertar el ADN de interés (inserto) en un plásmido (vector), mediante enzimas de restricción y *Ligasa de ADN T4*, para obtener una molécula de ADN recombinante. Para realizar esta técnica nosotros incorporaremos un “casete” de selección positiva *pSK lox neo lox* (inserto) a los vectores plasmídicos *Xgf 5.5/RAD + pKS II* o *Xgf 5.5/R156K + pKS II* que contienen las mutaciones.

8.1 Linealización de los Vectores

Como primer paso, se linealizó el ADN plasmídico de los vectores *Xgf 5.5/RAD + pKS II* y *R156k* mediante digestiones enzimáticas con la enzima de restricción *XbaI*. Estos plásmidos contienen dos sitios de restricción para esta enzima; por lo tanto, para linealizarlos se realizaron digestiones parciales para obtener el fragmento de interés de 8.5 Kb.

A) Cinética de digestión de los vectores

Para conocer el tiempo exacto donde la digestión parcial favorece la liberación del fragmento de interés de 8.5 Kb, se realizó una cinética de digestión con el plásmido *Xgf 5.5/RAD + pKS I*, con la enzima de restricción *XbaI*. La reacción se realizó digiriendo 1 µg de ADN con 10 unidades de enzima *XbaI*, en un volumen total de reacción de 30 µl, la reacción se incubó a 37 °C tomando alícuotas de 5 µl cada dos minutos y medio e inactivándolas con 3 µl de buffer de carga (urea y colorante azul de bromofenol), durante 10 minutos. La reacción se analizó por medio de electroforesis en gel de concentración de agarosa del 1% en TBE 0.5X a 100 V durante 30 minutos o hasta que las bandas se separaran.

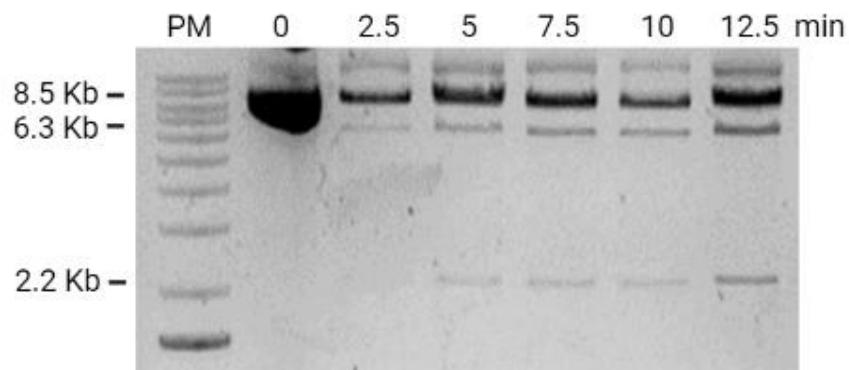


Figura 19. Cinética de digestión del vector *RAD* con la enzima de restricción *XbaI*. Los números de la parte superior corresponden a minutos. Se cargaron 5 µl de la reacción en cada pozo, en gel de concentración de agarosa del 1% en TBE 0.5X.

Se observó que, incubando durante 5 minutos, la digestión parcial favoreció la liberación del fragmento de interés. Una vez determinado el tiempo de incubación se realizaron dos reacciones de digestión parciales de 1 µg de ADN de cada uno de los vectores con 10 unidades de enzima *XbaI* para cada reacción, en un volumen final de 50 µl y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación se inactivaron las reacciones agregando 10 µl de buffer de carga a cada una.

Las reacciones fueron analizadas por medio de electroforesis en geles de concentración de agarosa del 1% en TBE 0.5X, en un pozo de aproximadamente 2 cm. Cuidadosamente, con ayuda de una navaja, se cortó el fragmento de gel que contenía la banda de interés de 8.5 Kb. Después, el ADN fue extraído y purificado con “QIAquick Gel Extraction kit” de QIAGEN (28704). Por último, se cuantificaron las muestras en un espectrofotómetro de microvolumen (NANODROP).

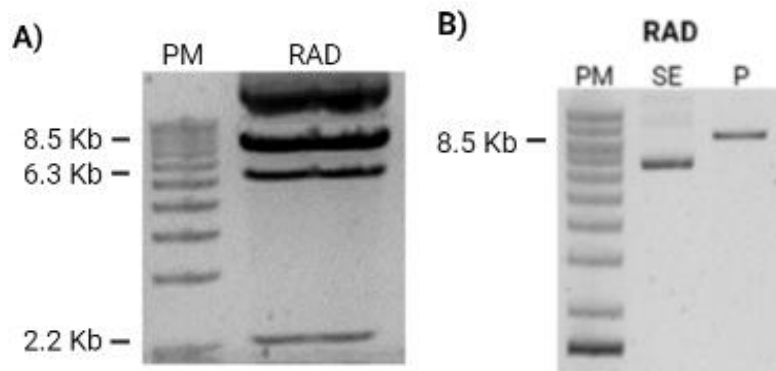


Figura 20. A) Digestión parcial del vector *RAD* con *XbaI*. La banda marcada con el * corresponde al ADN sin digerir. B) Vector linealizado y purificado. Se cargaron 3 µl de la reacción en un gel de concentración de agarosa del 1% con TBE 0.5 X.

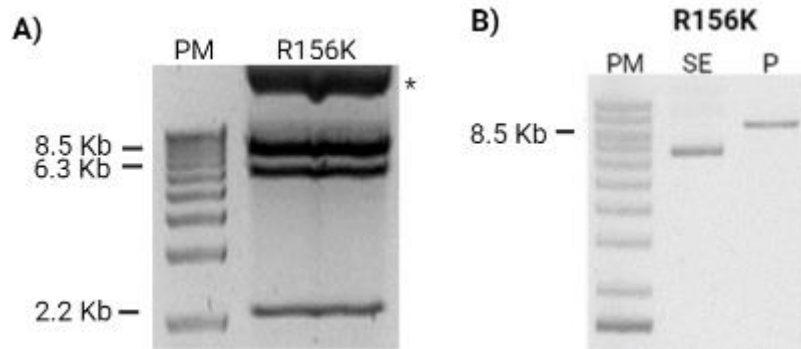


Figura 21. A) Digestión parcial del vector *R156K* con *XbaI*. La banda marcada con el * corresponde al ADN sin digerir. B) Vector linealizado y purificado. Se cargaron 3 µl de la reacción en un gel de concentración de agarosa del 1% con TBE 0.5 X.

Al cuantificar las muestras, se observó que el rendimiento del ADN fue muy bajo; con la finalidad de obtener mayor rendimiento se modificaron los siguientes parámetros de la cinética de digestión: concentración de enzima de restricción, tiempo de incubación y porcentaje del gel de agarosa para la electroforesis (ya que ambos vectores tienen la misma construcción, las pruebas para optimizar el protocolo se realizaron solo en uno de ellos, *RAD*).

Concentración de enzima de restricción y tiempo de incubación

Durante la digestión parcial el tiempo es un paso determinante para obtener la mayor cantidad del fragmento de interés posible, en este caso, de 8.5 Kb. Por lo cual se modificó el intervalo de tiempo donde la reacción de digestión fue inactivada, disminuyendo el intervalo inicial de 2.5 minutos a 2 minutos, durante 20 minutos, seguido de un intervalo a los 30 minutos e iniciando en el momento en que la reacción se incubó a 37 °C. Además, se realizaron digestiones parciales modificando el número de unidades de enzima *XbaI* agregadas en cada de reacción: 5, 10 y 15 unidades.

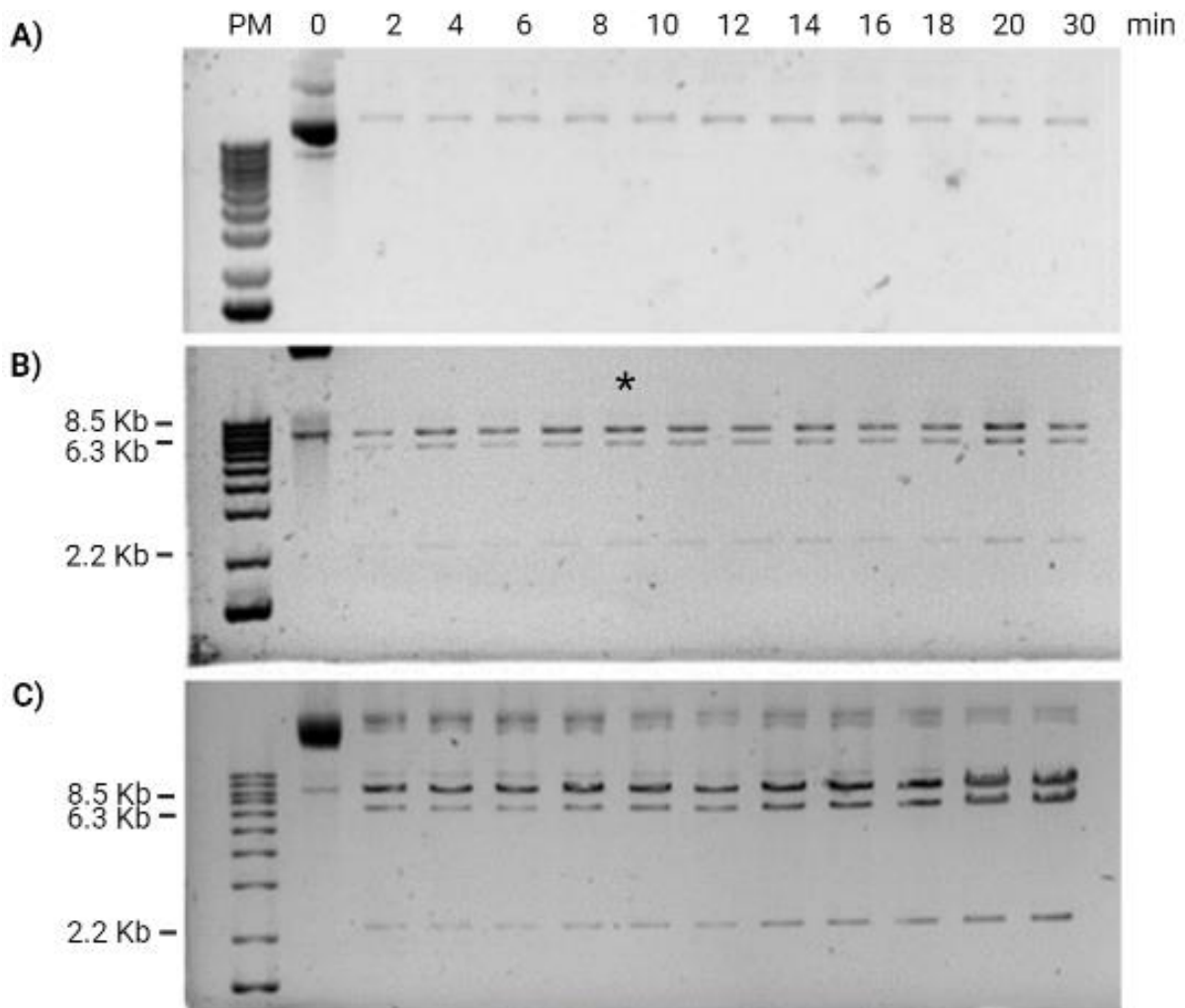
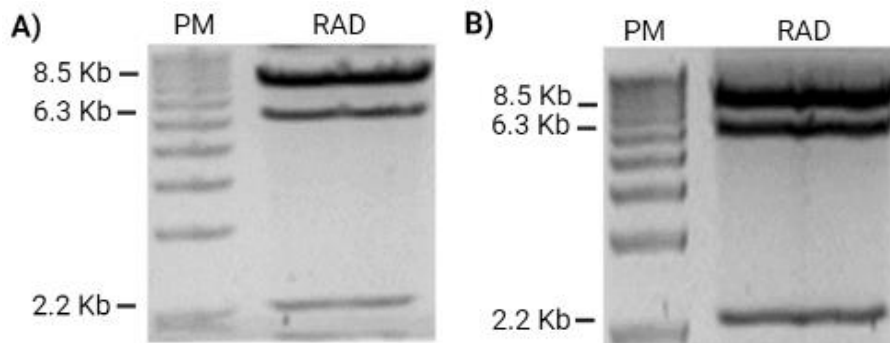


Figura 22. Cinética de digestión del vector RAD con la enzima XbaI. A) Con 5 unidades de enzima XbaI. B) 10 unidades y C) 15 unidades. Se cargó cada alícuota de 4 μ l por pozo en gel de concentración de agarosa del 1%. El asterisco indica el tiempo de digestión seleccionado.

Una vez realizadas las electroforesis, se analizaron las imágenes de los geles, concluyendo que la liberación del fragmento de 8.5 Kb se favorece al digerir 1 μ g de ADN con 10 unidades de enzima XbaI e incubando la reacción durante 8 minutos a 37° C (Figura 22 B, marcado con *).

Porcentaje del gel de Agarosa para la electroforesis

Durante los experimentos realizados para la cinética de digestión se analizaron las muestras en geles de concentración de agarosa del 1% con TBE 0.5X, pero al realizar el gel donde se colocó toda la reacción, las bandas no se separaban lo suficiente entre sí y era imposible cortar exclusivamente la banda de 8.5 Kb, por lo cual se disminuyó el porcentaje de agarosa en los geles, probando concentraciones de agarosa del 0.7 y 0.9.



En el gel de concentración de agarosa de 0.7%, los fragmentos resultantes de la digestión se separaron de manera eficiente, sin embargo, las bandas se observaban poco definidas, mientras que en el gel con concentración de agarosa del 0.9% las bandas si se observaron bien definidas y aunque no se separaban tanto como en el gel de 0.7 %, se lograban separar lo suficiente para cortar únicamente el fragmento de interés.

Finalmente, se logró optimizar el protocolo de digestión parcial con las siguientes condiciones: para digerir parcialmente 1 μ g de ADN plasmídico, se utilizaron 10 unidades de enzima de restricción *Xba*I, en un volumen total de reacción de 50 μ l, las reacciones de digestión se incubaron por 8 minutos a 37 °C y se analizaron en gel de concentración de agarosa del 0.9 % en TBE 0.5X.

Seguendo el protocolo optimizado, se realizaron las digestiones parciales para ambos vectores y se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa con un pozo de aproximadamente 2 cm, en el cual se cargaron dos reacciones de digestión independientes, se cortó el fragmento de 8.5 Kb y el ADN se extrajo con el mismo kit de extracción de gel utilizado anteriormente.

Optimización de la concentración de ADN del Vector

Como se muestra en la figura 24 B y D, los fragmentos se purificaron adecuadamente, ya que no se observa la presencia de otras bandas de ADN; pero cuando el ADN extraído del gel de agarosa se cuantificó, se observó que el rendimiento seguía siendo bajo, por lo cual, para obtener mayor concentración de ADN de la banda purificada, se probó realizar 5 y 7 reacciones de digestión independientes del vector *RAD*.

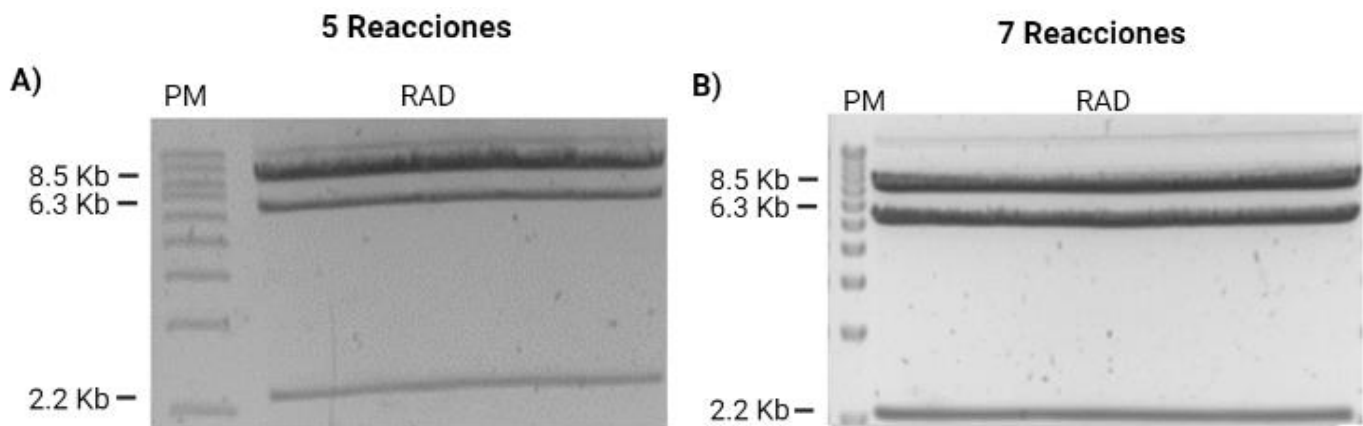


Figura 24. Digestión parcial del vector *RAD* con *XbaI*. A) Muestra el gel donde se cargaron 5 reacciones en un mismo pozo y B) con 7 reacciones. Geles de concentración de agarosa de 0.9% en TBE 0.5 X.

Al cuantificar el ADN de cada fragmento de gel obtenido luego de juntar 7 reacciones de digestión y después de la purificación usando el Kit de extracción de gel de QIAGEN, se obtuvo un rendimiento óptimo. Por lo cual para futuras digestiones parciales de los vectores se corrieron 7 reacciones en un mismo pozo de 8 cm.

C. Defosforilación

Los vectores linealizados fueron defosforilados para evitar su recirculación y permitir las ligaciones posteriores. Cada reacción de defosforilación se realizó con 200 ng de vector y 10 unidades de *CIP* (Fosfatasa alcalina intestinal de ternero, NEB, M0525S) durante 60 minutos, en un volumen total de reacción de 100 μ l.

8.2 Linealización del Inserto

Como siguiente paso se realizó la linealización del inserto, en este caso, el “casete de selección positiva”. Para obtener el fragmento de interés de 2.2 Kb que corresponde al casete; se digirió el plásmido *pSK lox neo lox* con la enzima de restricción *Xba*I. La reacción se hizo digiriendo 1 μ g de ADN con 10 unidades de enzima *Xba*I, se incubó por 20 min a 37 °C, en un volumen total de reacción de 50 μ l y la reacción se analizó por medio de electroforesis en gel de concentración de agarosa del 1% en TBE 0.5X. Los geles fueron analizados en un transiluminador de luz UV y cuidadosamente, con ayuda de una navaja, se cortó el fragmento de gel que contenía la banda de interés de 2.2 Kb. Después, el ADN fue extraído y purificado del fragmento de gel con el kit de extracción de plásmido de QIAGEN mencionado anteriormente.

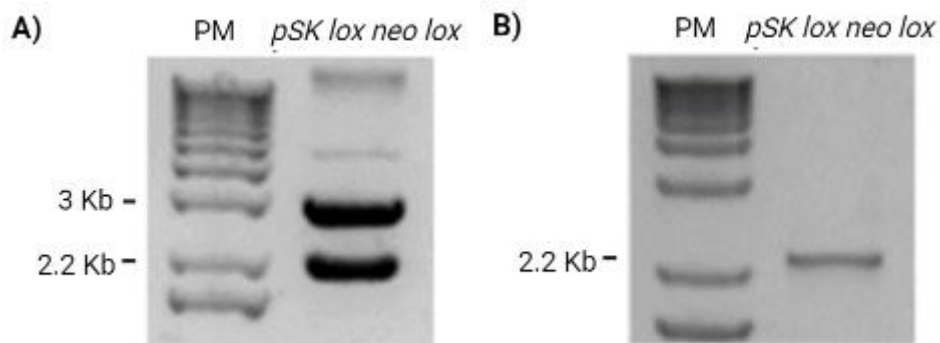


Figura 26. Obtención del Inserto o casete de selección positiva. A) Digestión del plásmido *pSK lox neo lox*. B) Fragmento purificado correspondiente al casete. Geles de Agarosa al 1% en TBE 0.5X.

Se observó que, al incubar por 20 minutos a 37° C, como el protocolo proporcionado por el fabricante de la enzima lo indica, el ADN no era digerido en su totalidad, para obtener una digestión óptima y mejor rendimiento, al igual que con los vectores, se hicieron modificaciones para optimizar el protocolo de digestión.

Tiempo de incubación y porcentaje de agarosa en el gel

Para mejorar la eficiencia de la digestión se probaron diferentes tiempos de incubación: 60 y 90 minutos. Las reacciones se realizaron con las mismas cantidades y se analizaron por electroforesis en las condiciones descritas anteriormente.

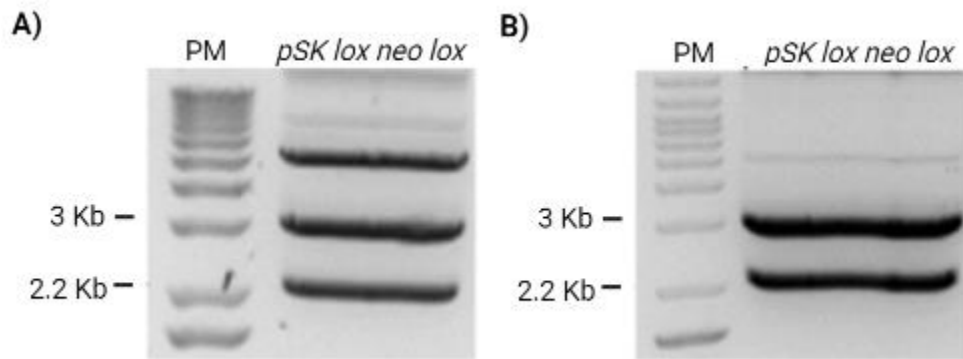


Figura 27. Digestión del plásmido *pSK lox neo lox* con la enzima de restricción *XbaI*. Del lado izquierdo se muestra la reacción de digestión incubada durante 60 minutos y del lado derecho durante 90 minutos. Geles de Agarosa al 1% en TBE 0.5X.

Analizando las imágenes de los geles, se concluyó que al incubar por 90 minutos se logra una liberación del fragmento de 2.2 Kb más eficiente, ya que se observó menor cantidad de ADN sin digerir en la parte superior del gel. Una vez determinado el tiempo de incubación óptimo, se probaron diferentes porcentajes de agarosa en gel: 0.7 y 0.9 % en TBE 0.5X.

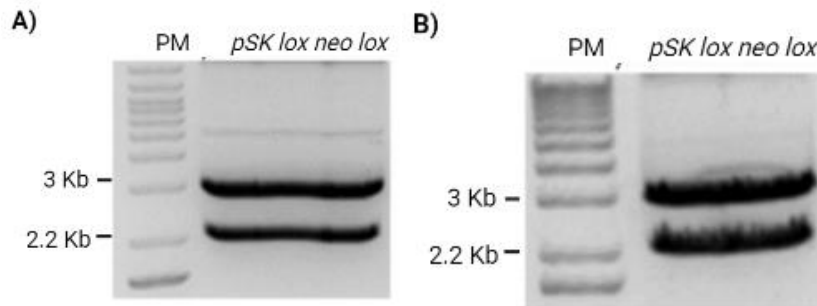


Figura 28. Modificación de la concentración de agarosa en gel. Las imágenes muestran la digestión del plásmido *pSK lox neo lox* con *XbaI*, en geles con diferente concentración de agarosa, la imagen del lado izquierdo corresponde al gel con porcentaje de agarosa del 0.7% y del lado derecho 0.9%.

Se observó que en el gel de concentración de agarosa al 0.7% los fragmentos resultantes de la digestión se lograban separar adecuadamente. Por lo tanto, el protocolo de digestión para la obtención del inserto se optimizó con las siguientes condiciones: para digerir 1 µl de ADN plasmídico, se utilizaron 10 unidades de enzima de restricción *XbaI*, la reacción de digestión se incubó por 90 minutos a 37 °C y se analizó en un gel de concentración de agarosa de 0.9 %.

8.3 Ligación de los Vectores y el Inserto

Una vez optimizados los protocolos de digestión enzimática de los vectores e inserto, y realizada la defosforilación de los vectores, se continuó con el protocolo de ligación para unir ambos fragmentos de ADN (Sambrook, 2001). Se realizaron reacciones de ligación para cada uno de los vectores en las siguientes condiciones:

	A 1:1	B 1:3	C (+)	D (-)
<i>RGExRAD</i> ó <i>R156K</i> (8.5 Kb) Defosforilado	50 ng	50ng	10 ng Sin defosforilar	10 ng
<i>lox neo lox</i> (2.2 Kb)	18.75 ng	6.25 ng	---	---
<i>Ligasa de ADN T4</i>	1	1	1	0
Buffer 10X	2	2	2	2

*Se adicionó la cantidad de agua Milli- Q necesaria para llevar cada reacción en un volumen final de 50 μ l.

Para la condición de ligación A, se calcularon el número de ng necesarios de inserto para obtener un ratio vector: inserto de 1:1, partiendo de 50 ng de vector con el programa NEBioCalculator de la marca New England Biolabs. En la condición B se realizó el cálculo para la reacción de ligación con un ratio de 1:3, también partiendo de 50 ng de vector. Las condiciones C y D corresponden a los controles, en la condición C (control positivo) se agregó 1 μ l de *Ligasa de ADN T4* a 10 ng de vector linealizado y sin defosforilar, mientras que en la condición D linealizado y defosforilado (control negativo), no se agregó enzima. Las reacciones se incubaron por 16 horas a 4 °C y se inactivaron incubando por 20 minutos a 65 °C, seguido de una incubación de 5 minutos en hielo; inmediatamente después, se realizó la transformación bacteriana.

8.4 Transformación bacteriana

Una vez inactivadas las reacciones de ligación se transformaron 100 μ l de células competentes *E. coli* de la cepa JM109 con 1 μ l de cada reacción de ligación. Siguiendo el protocolo de transformación bacteriana de Sambrook, 2001. La recuperación de las células se realizó durante 2 horas a 37 °C con agitación constante a 250 rpm, después, se sembraron 200 μ l de las células transformadas en placas con medio LB sólido y ampicilina y se incubaron por 12 horas a 37 °C.

Pasado el tiempo de incubación de las placas, no se observó ningún crecimiento de colonias transformadas con las reacciones de ligación A Y B, sin embargo, en el control negativo crecieron colonias, lo cual indicaba que la defosforilación de los vectores no era eficiente. Se realizaron nuevas reacciones de defosforilación aumentando la cantidad de enzima y tiempo de incubación. Estos cambios se muestran en la siguiente tabla:

	CONDICION 1	CONDICION 2	CONDICION 3	CONDICION 4
ADN <i>RAD</i> o <i>R156K</i>	200 ng	200 ng	200 ng	200 ng
<i>CIP</i> (unidades)	15	15	20	20
Buffer 10x	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Tiempo de incubación (min)	90	120	90	120

*Se adicionó la cantidad de agua Milli-Q necesaria para llevar cada reacción en un volumen final de 100 µl.

Con estas reacciones de defosforilación se realizaron nuevas reacciones de ligación para cada una de las condiciones, siguiendo el protocolo de ligación anterior; pasado el tiempo de incubación e inactivación de las reacciones, se transformó con 1 µl de cada una de las reacciones. Se observó que en las placas sembradas con las reacciones de ligación A Y B, no crecieron colonias transformadas, en los controles positivos (C) si crecieron colonias y en los controles negativos, se observaron los siguientes resultados:

- Condición 1 y 2: crecieron entre 2 y 5 colonias en cada placa
- Condición 3: creció una colonia
- Condición 4: no crecieron colonias

Analizando estos resultados se modificó el protocolo de defosforilación tomando en cuenta que los parámetros de la condición 4 fueron los más eficientes. Para defosforilar 200 ng de ADN de los vectores linealizados (8.5 Kb) se agregaron 20 unidades de *CIP*, 10 µl de Buffer 10X, agua Milli-Q para un volumen total de reacción de 100 µl y se incubó por 120 minutos a 37 °C.

Al tener colonias en los controles positivos, se comprobó que el protocolo de transformación era eficiente, sin embargo, al no tener colonias transformadas en las

reacciones de ligación A y B, y ya comprobado que la reacción de defosforilación era eficiente, se decidió cambiar un nuevo parámetro en la reacción de ligación: la cantidad de ADN del inserto utilizada. Los cálculos se hicieron nuevamente utilizando el programa NEBioCalculator, para cada uno de los vectores:

	A 1:1	B 1:2	C 1:1	D (+)	E (-)
<i>RAD</i> o <i>R156K</i> (8.5 Kb)	50 ng	50 ng	37.5 ng	15 ng	15 ng
<i>pSK lox neo lox</i> (2.2 Kb)	18.75 ng	37.5 ng	37.5 ng	---	---
Ligasa de ADN T4	1	1	1	1	---
Buffer 10X	5	5	5	5	5

*Se adicionó la cantidad de agua Milli-Q necesaria para llevar cada reacción en un volumen final de 50 µl.

Nuevamente se calcularon los ng de inserto requeridos partiendo de 50 ng de vector en cada reacción. La reacción A se realizó en el mismo radio 1:1, la B se realizó con un radio 1:2 vector: inserto y en la condición C, únicamente se agregaron igual cantidad de ng de vector e inserto; además del control positivo (D) y control negativo en E.

Se transformaron las células competentes con 1 µl de las nuevas reacciones de ligación para cada uno de los vectores, pero nuevamente no crecieron colonias; de las mismas reacciones de ligación se tomaron 5, 10 y 15 µl de cada una para realizar nuevos ensayos de transformación bacteriana. En las placas sembradas con las reacciones de ligación del vector *RAD* no crecieron colonias. En el caso del vector *R156K*, en las placas donde se sembraron las células transformadas con 5 µl de la reacción B crecieron 2 colonias, y 1 colonia en las placas inoculadas con las células transformadas con 10 µl de la reacción C.

8.5 Análisis de colonias transformadas

Las colonias transformadas (clonas) de *R156K* fueron analizadas mediante digestión enzimática con la enzima *XbaI* y *BamHI*, para verificar la incorporación del inserto y su orientación. Primero para extraer el ADN plasmídico, con estas colonias se inocularon tubos de ensaye con medio LB y ampicilina, se incubaron a 37° C durante toda la noche, después, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit para la Extracción de plásmido, miniprep (QIAGEN, 27106). Las digestiones se realizaron con 0.5 µg de ADN, 5 unidades de enzima *XbaI*, en un volumen total de 20 µl, se incubó por 1 hora a 37°C; se analizaron mediante electroforesis en gel de concentración de agarosa del 0.9 % en TBE 0.5X.

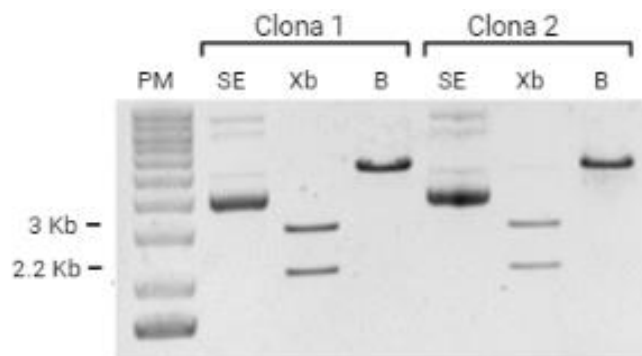


Figura 31. Análisis de las clonas obtenidas del vector *R156K*. Se analizaron mediante digestiones enzimáticas con las enzimas *XbaI* y *BamHI*. Se cargaron 5 µl de cada reacción en gel de concentración de agarosa de 0.9 % en TBE 0.5X. SE: ADN super enrollado, Xb: digerido con la enzima *XbaI*, B: digerido con la enzima *BamHI*.

Al analizar el gel se observó un patrón inusual de bandas con ambas enzimas, pues este patrón no correspondía a ninguno de los esperados y explicados en la figura 13. Además

de que al ser digerido con *XbaI* se esperaba que el fragmento del casete y el fragmento de 8.5 Kb del vector fueran liberados, sin embargo, solo se pueden observar bandas de 2.2 y 3.2 Kb aproximadamente, Con la finalidad de obtener más colonias transformadas que incorporaran el inserto en el sitio correcto de *XbaI* del vector, se realizaron nuevas transformaciones bacterianas aumentando la cantidad de reacción de ligación con la que se transformaron las células competentes, de 1 a 10 µl de cada una de las reacciones de ligación anteriores (A, B y C). El protocolo de transformación no fue modificado, se sembraron las células transformadas en placas de LB sólido con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación se observó que solo en las placas inoculadas con células transformadas correspondientes al vector *RAD* crecieron colonias. Estas colonias se analizaron digiriéndolas con la enzima *XbaI* (figura 32 A) y con *BamHI* (32 B). La reacción de digestión y electroforesis se realizaron en las mismas condiciones.

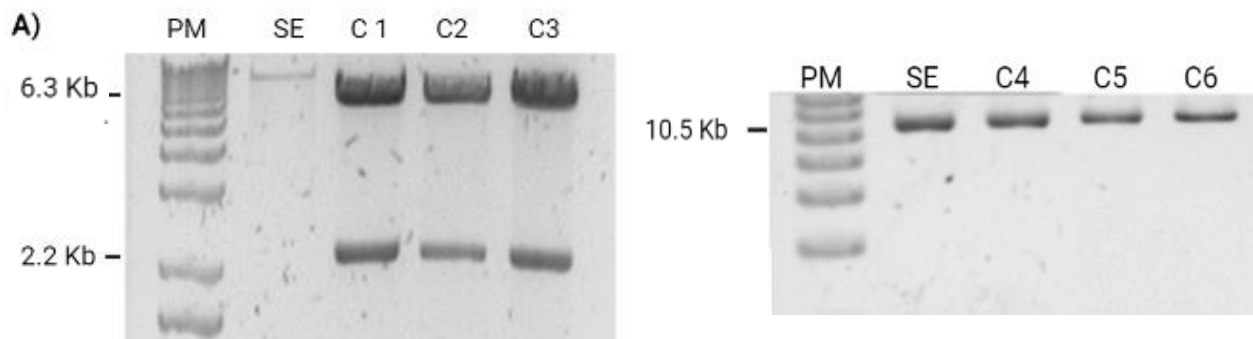


Figura 32. Análisis de clones del vector *RAD*. A) Digeridas con *XbaI*. B) digeridas con *BamHI*. SE: ADN super enrollado sin digerir. C corresponde a colonias 1,2 y 3 respectivamente.

Como se mencionó anteriormente durante la reacción de ligación el inserto se puede incorporar en cualquiera de los dos sitios de *XbaI* del vector y en dos orientaciones diferentes, como se muestra en la figura 12. Debido a que el inserto solo contiene un sitio de restricción para *BamHI*, es posible, mediante una digestión con dicha enzima, conocer

la ubicación y orientación en la que se incorporó al vector. Observando las imágenes podemos concluir que estas clonas si insertaron el casete, pero en el sitio de *XbaI* de *pKS II+*(Figura 13 A), el cual no es el sitio de interés en el cual requerimos insertar dicho casete. La reacción de digestión y electroforesis se realizaron en las mismas condiciones descritas para digestión con la enzima *XbaI*.

Para disminuir la probabilidad de recombinación y que el casete se inserte en el sitio correcto como siguiente estrategia se cambió la temperatura a la que se recuperaron las células después de la transformación y durante la incubación de placas, disminuyendo la temperatura de 37 a 30 °C. Al mismo tiempo probamos realizar las reacciones de ligación con el kit de ligación rápida “Quick Ligasa” (NEB M2200). Siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, se realizaron reacciones de ligación repitiendo los radios de las condiciones A, B y C. Las reacciones fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación en hielo por 5 minutos, inmediatamente después, se transformaron células competentes con 10 µl de cada reacción. Las células se recuperaron a 30 °C por 2 horas, se sembraron las placas con 200 µl de las células y se incubaron toda la noche a 30 °C.

Al día siguientes se observó el crecimiento de aproximadamente 100 colonias en cada placa sembrada con las células transformadas con las reacciones de ligación del vector *RAD*, mientras que en las placas correspondientes al vector *R156K*, nuevamente, no creció ninguna colonia. Para analizar el ADN de las colonias, se inocularon tubos de ensayo con medio LB y ampicilina, se incubaron toda la noche y se extrajo el ADN con el kit de extracción de plásmido de QIAGEN utilizado anteriormente. Eligiendo el mismo número de colonias transformadas de cada placa, se analizaron aproximadamente 100

colonias; primero realizando digestiones con la enzima *XbaI* para descartar aquellas colonias que no habían incorporado el inserto (casete de selección positiva). Una vez seleccionadas las colonias, se realizaron digestiones con la enzima de restricción *BamHI* para conocer la ubicación y orientación del casete; nuevamente las reacciones se realizaron en las mismas condiciones y se analizaron por medio de electroforesis.

Los resultados mostraron que un 90 % de las colonias analizadas incorporaron el casete de selección positiva (*pSK lox neo lox*), que al ser digeridas con la enzima *BamHI* mostraron la misma orientación que habían presentado las colonias analizadas anteriormente (Figura 32 B). El 10 % restante de las colonias mostraron un patrón inusual de bandas (Figura 33), parecidas a las colonias de *R156K*, al ser digeridas con la enzima *XbaI* (Figura 31); al analizar el gel se observaron dos bandas, una de 3 Kb y otra de 2 Kb, que no correspondía a ninguna de las dos orientaciones esperadas. Debido a la gran cantidad de colonias analizadas y por fines prácticos solo se mostrarán algunas imágenes de los geles analizados.

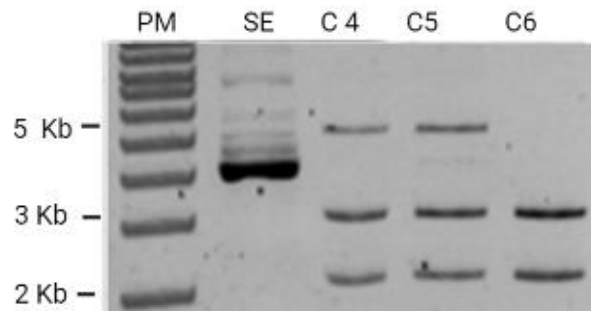


Figura 33 Análisis de colonias transformadas del vector *RAD*. El ADN de las colonias fue digerido con la enzima *XbaI*. Engel de agarosa del 0.9 %.

Gradiente de densidad con CsCl

Al analizar una gran cantidad de colonias y observar los mismos resultados después de cambiar varias condiciones se analizó la posibilidad de que los plásmidos presentaran gran cantidad de ADN genómico que impidiera la inserción del casete en el sitio correcto, evitando que la parte donde se encuentra el segundo sitio de *XbaI* del vector no estuviera lo suficientemente expuesto para que el casete se lograra insertar. Por lo cual, para obtener ADN plasmídico de los vectores, más puros y sin presencia de ADN genómico, el ADN de los vectores fue sometido a una ultra purificación, después de la purificación con el Kit de extracción de plásmido, Esta purificación se realizó mediante un gradiente de CsCl.

Se obtuvieron nuevos plásmidos utilizando el Kit de purificación de plásmido Maxi prep (QIAGEN 12163). Después, el ADN plasmídico fue purificado mediante centrifugación por 22 horas a 36,000 rpm en gradiente de CsCl con BrEt Terminado el tiempo de centrifugación los tubos fueron visualizados en un transiluminador de luz UV. En los tubos se observó la separación por densidades de las muestras, el ADN plasmídico y genómico se visualizaron como dos líneas que presentaron fluorescencia por el Bromuro de Etidio añadido. El ADN plasmídico fue aislado perforando el tubo con una jeringa con aguja y el bromuro de etidio fue eliminado con lavados de isopropanol.

Una vez eliminado el bromuro de etidio, las muestras de ADN plasmídico se dializaron durante 2 horas para eliminar las sales. Finalmente, el ADN fue precipitado con NaCl 5M y cuantificado en Nano Drop. Para comprobar la pureza de los plásmidos, nuevamente

se digirieron los plásmidos con la enzima *Xba*I, seguido del análisis por medio de electroforesis (Figura 34).

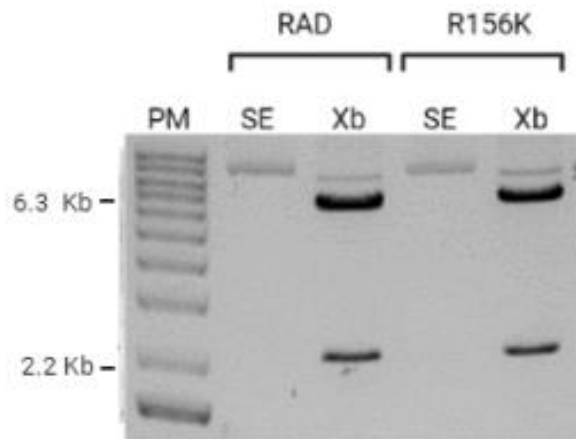


Figura 34 Digestión enzimática con *Xba*I de los vectores *RAD* Y *R156K* purificados por gradiente de concentración con CsCl. En gel de concentración de agarosa del 0.9 % en TBE 0.5X. SE: ADN super enrollado, Xb: Digerido con *Xba*I.

Como se puede observar en la figura 34, tanto la purificación como la digestión enzimática fueron eficientes, ya que se observa menor cantidad de ADN sin digerir en la parte superior del gel.

8.9 Clonación molecular utilizando el ADN plasmídico con doble purificación

Una vez que se obtuvieron los plásmidos μ ltra puros, se repitieron las metodologías optimizadas para intentar insertar el casete de selección positiva en el sitio correcto.

A) Cinética de digestión del vector *RAD*

Siguiendo el protocolo optimizado, se realizó la cinética enzimática solo del vector *RAD* para conocer el tiempo exacto donde la digestión parcial favorece la liberación del fragmento de interés de 8.5 Kb. Se tomaron alícuotas de 4 μ l de la reacción de digestión, cada dos minutos durante 20 minutos, después se tomaron alícuotas a los 40 y 60 minutos.

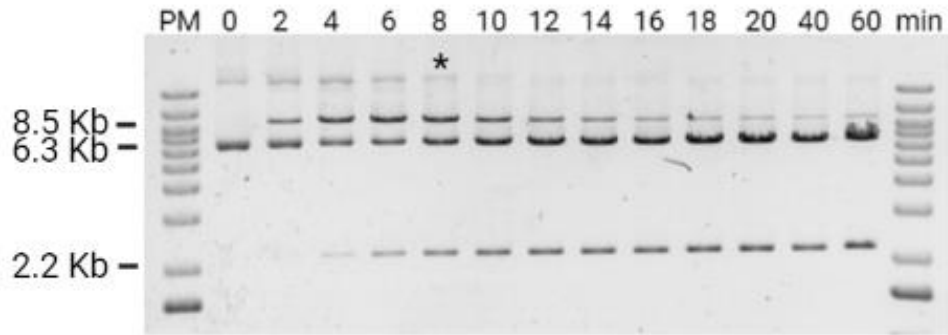


Figura 35. Cinética de digestión del vector *RAD*. Cada pozo contiene 4 μ l de la reacción de digestión y 2 μ l de buffer de carga. El gel fue realizado en concentración de agarosa del 0.9% en TBE 0.5X.

Nuevamente se observó que la liberación del fragmento de 8.5 Kb se favorece a los 8 minutos de incubación.

B) Digestión parcial de los vectores

Una vez determinado el tiempo de incubación se realizaron las digestiones parciales para ambos vectores. Se realizaron 7 reacciones de digestión parcial para cada uno de los plásmidos de los vectores. Se incubaron durante 8 minutos a 37 °C y se colocaron juntas en un pozo de aproximadamente 8 cm de un gel de 0.9 % de agarosa en TBE 0.5X, para cada uno de los vectores. Se realizó la electroforesis y se cortó el fragmento de interés, el cuál fue purificado con el Kit de Extracción de gel de QIAGEN.

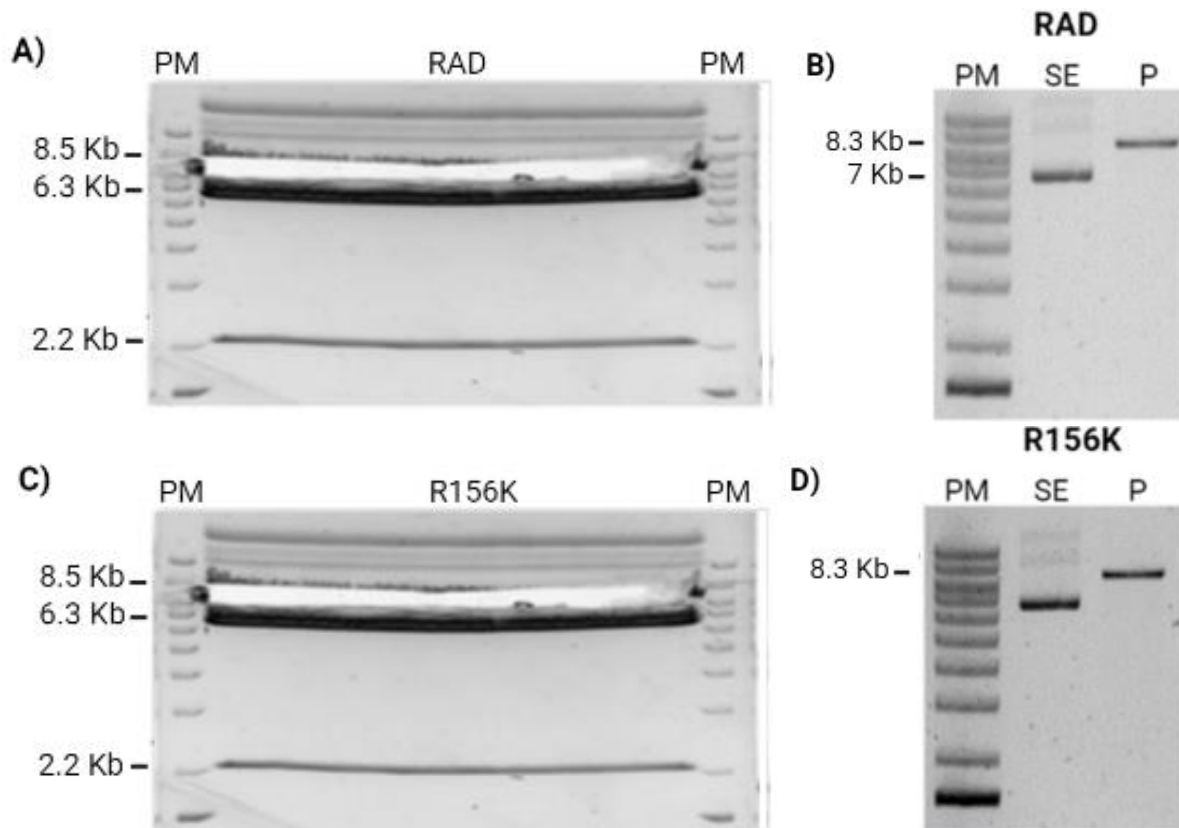


Figura 36. Digestión parcial de los vectores *RAD* Y *R56K*. A y C muestran las 7 reacciones de digestión parcial cargadas en un mismo pozo para cada uno de los vectores. B y D muestran el fragmento cortado y purificado de los vectores. SE: ADN super enrollado, P: fragmento de interés purificado. En geles de concentración de agarosa del 0.9 % en TBE 0.5X.

C) Defosforilación de los vectores

Utilizando la nueva enzima *Quick CIP* de NEB (M0525S) y el protocolo optimizado, se defosforilaron 200 ng de cada uno de los vectores previamente linealizados. A diferencia de la enzima anterior, con esta inactivación ya no fue necesario volver a purificar las muestras.

D) Ligación de los vectores y el inserto

Con el kit de ligación rápida “Quick Ligasa” de NEB (M2200) se repitieron las reacciones de ligación con las condiciones utilizadas anteriormente, presentadas en la siguiente tabla (el ADN del inserto fue tomado de las reacciones de digestión anteriores).

	A 1:2	B 1:1	C (+)	D (-)
<i>RGEXRAD</i> o <i>R156K</i> (8.5 Kb)	50 ng	37.5 ng	15 ng	15 ng
LOX NEO LOX (2.2 Kb)	37.5 ng	37.5 ng	---	---
QUICK LIGASA	1 µl	1 µl	1 µl	---
Buffer 10X	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

- Se agrego la cantidad necesaria de agua Milli-Q para alcanzar un volumen final de 20 µl.

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, al terminar el tiempo de incubación se colocaron en hielo.

E) Transformación bacteriana

Se transformaron 10 µl de cada reacción de ligación para cada uno de los vectores, las células se recuperaron por 2 horas a 30 °C y las placas se incubaron a la misma temperatura toda la noche. Al revisar las placas se observó que en aquellas donde se sembraron las bacterias transformadas con las reacciones de ligación del vector *R156K* no presentaron crecimiento de colonias, sin embargo, en las placas del vector *RAD* sí. Con estas colonias se inocularon tubos de ensaye con medio LB que contenía ampicilina, se incubaron a 30 °C toda la noche, pasado el tiempo de incubación se extrajo el ADN plasmídico, por último, el ADN fue cuantificado.

F) Análisis de colonias transformadas

Con el ADN purificado y cuantificado se realizaron digestiones con la enzima *Bam*HI para conocer la orientación en la que se insertó el casete de selección positiva. Para las digestiones se utilizaron 0.5 ng de ADN, 5 unidades de enzima *Xba*I o *Bam*HI, en un volumen final de reacción de 20 µl y se incubaron por 1 hora a 37 °C. Después se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.9% (figura 36).



Figura 37. Colonias de *RAD* digeridas con la enzima *Bam*HI, de las células transformadas con los plásmidos de doble purificación. SE: ADN super enrollado y los números en la parte superior corresponden a el número de colonia.

Las colonias analizadas nuevamente incorporaron el casete en el mismo sitio de *Xba*I del vector, el sitio 1 de *Pks II+*, como en todas las colonias analizadas anteriormente y no en el sitio de interés (*Xba*I de *Xgf 5.5*, figura 12 B).

1. Discusión

Para la inserción del casete de selección positiva en los vectores plasmídicos *Xgf 5.5 + pKS II+* que contienen las mutaciones del sitio catalítico (*Xgf 5.5/R156K + pKS II*) y del motivo de unión a integrinas (*Xgf 5.5/RAD + pKS II*), se utilizaron técnicas de clonación molecular, con el fin de generar dos nuevos alelos del gen de la PLPP3 que contengan dichas mutaciones.

Inicialmente se utilizaron los protocolos convencionales para clonación molecular siguiendo en cada paso los protocolos y recomendaciones de los fabricantes de las enzimas y kits utilizados, pero fue necesario optimizar dichos protocolos; por ejemplo en

la digestión utilizando la enzima *XbaI* de la marca NEB, el protocolo indica que la digestión de 1ug de ADN de los vectores debía completarse después de incubar las reacciones durante 1 hora, no obstante, la electroforesis mostró que el ADN no se digería completamente, quedando ADN superenrollado en la parte superior del gel incluso después de modificar el protocolo aumentando el tiempo de incubación de 1 a 2 horas y calentando previamente las muestras de ADN a 50 °C por 5 minutos para facilitar la relajación del ADN y mejorar la calidad de la digestión, ya que es posible desestabilizar la estructura tridimensional del DNA mediante un simple aumento de la temperatura. Después de estas modificaciones la cantidad de ADN super enrollado que no era digerido disminuyó significativamente.

Ya que los vectores contenían dos sitios de corte para la enzima de restricción *XbaI*, para linealizarlos se realizaron digestiones parciales. Sabiendo que la enzima digería casi en su totalidad el ADN después de 1.5 horas, se analizó el tiempo donde la digestión favorecía la liberación del fragmento linealizado, realizando una curva de digestión. Al observar los geles de la electroforesis nos enfrentamos a un nuevo obstáculo, los fragmentos de ADN no se separaban lo suficiente para cortar limpiamente el fragmento de interés, de 8.5 Kb. Para solucionarlo se disminuyó el porcentaje de agarosa en los geles preparados con buffer TBE, ya que, a menor concentración de agarosa, es más fácil separar bandas de alto peso molecular. La concentración (p/v) de la agarosa determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN. Se ha reportado que el rango de separación de ADN en un gel de concentración de agarosa del 1 % es de 250 pb-12 Kb y cuando la concentración del gel es 0.8 % es de 500 pb- 15 Kb (Fierro, 2014). Inicialmente los geles se prepararon con

una concentración de agarosa del 1% y se fue disminuyendo la concentración de agarosa para aumentar el tamaño del poro, lo que permitió la adecuada separación del fragmento de interés. Como se mostró en la figura 23 se requería un gel que fuera lo suficientemente poroso, para permitir la separación de los fragmentos sin dejar un barrido en el gel, por ello la mejor opción fue preparar los geles a una concentración de agarosa de 0.9 %, ya que, utilizando este porcentaje, la separación de fragmentos fue adecuada y uniforme.

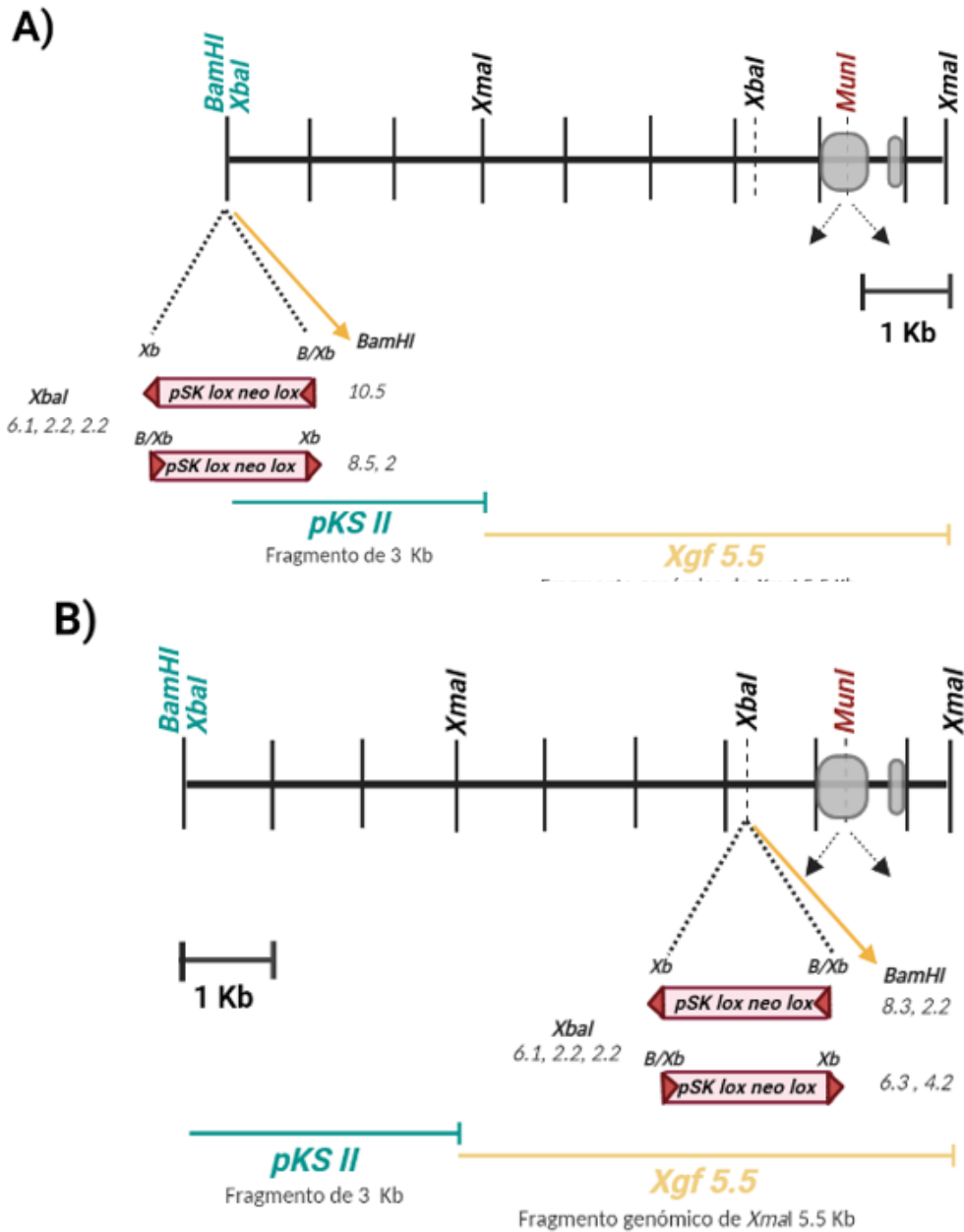
Para la purificación de los plásmidos, utilizamos el kit de extracción de gel de la marca QIAGEN, basado en el método de lisis alcalina con columnas. Este kit permite la purificación de hasta 10 µg de ADN (de 70 pb a 10 kb). Al finalizar el protocolo de extracción, las muestras fueron cuantificadas, obteniendo bajo rendimiento del ADN, pero dentro de los valores de pureza óptimos, aun cuando el kit asegura hasta un 95 % de recuperación de ADN. Sin embargo, la baja concentración obtenida pudo ser consecuencia de la digestión incompleta del ADN superenrollado. Para aumentar el rendimiento se realizaron varias reacciones de digestión independientes y se colocaron juntas en un mismo pozo, esta modificación permitió el aumento del rendimiento de ADN linealizado de los vectores.

En cuanto a las reacciones de ligación, primero probamos diferentes ratios de concentración Vector: Inserto, pero no obtuvimos crecimiento de colonias, a diferencia de los controles negativos donde si hubo crecimiento; esto indicaba que el ADN de los vectores se recircularizó como resultado de una reacción de defosforilación ineficiente. Se realizaron pruebas aumentando la cantidad de enzima *CIP* y el tiempo de incubación, logrando realizar reacciones de defosforilación eficientes ya que en los controles negativos ya no se observó crecimiento de colonias. Sin embargo, las reacciones que

contenían el inserto (para ambos vectores), tampoco presentaron crecimiento, mientras que los controles positivos tenían un gran número de colonias, estos resultados indicaron que el protocolo de transformación bacteriana era eficiente, pero la reacción de ligación no. Para evaluar si el problema era la cantidad de ADN de cada inserto presente en la reacción se probaron diferentes proporciones o radios de vector: inserto, pero nuevamente no se observó crecimiento de colonias mutantes. Para aumentar la probabilidad de ligación, se utilizó un Kit de ligación rápida de la marca NEB; este kit permite la ligación a temperatura ambiente o a 25 °C y alcanza un punto final en 5 minutos o menos. Sin embargo, al día siguiente de la transformación bacteriana las cajas sembradas nuevamente no presentaron ningún crecimiento. Se siguieron probando diferentes radios de ligación, con la ligasa de *ADN T4* de Roche y el Kit de Ligación rápida de NEB, al mismo tiempo; siendo la mejor opción colocar la misma cantidad de cada ADN (50 ng) del vector y del inserto. En ambos casos crecieron colonias, pero se observó mayor cantidad en las cajas sembradas con las células transformadas con las reacciones de ligación hechas con el Kit.

Se analizaron 100 colonias al azar de las cajas sembradas con las células transformadas con las reacciones de ligación hechas con el Kit y con la ligasa de *ADN T4* de Roche, mediante digestiones enzimáticas con *XbaI*, para verificar la inserción del casete. En el 80 % de las colonias se logró la inserción del casete, el 20 % restante mostró un patrón inusual de fragmentos digeridos ([Figura 37](#)). Como se mencionó anteriormente el casete puede insertarse en dos sitios de *XbaI* del vector, y en cada uno puede insertarse en dos

orientaciones diferentes, las cuales se muestran nuevamente en el mapa de la construcción del vector con el casete de selección positiva.



La figura A ejemplifica, cuando el casete se inserta en el sitio de restricción de *XbaI* de *pKS II+* se inserta de 3' a 5' al ser digerido con *BamHI* se liberará un fragmento de 10.5 Kb, linealizando el plásmido. Cuando la orientación es la contraria (5' a 3') solo se liberarán dos fragmentos de ADN uno de 8.5 y otro de 2 KB. La figura B pertenece al sitio de *XbaI* pertenece al fragmento de *Xgf 5.5* del vector, si el casete se insertó en sentido 3' a 5', se liberarían dos fragmentos de ADN uno de 2.2 y otro de 8.3 Kb. Mientras que, si se insertó en sentido contrario (5' a 3') los fragmentos resultantes serían de 6.3 y 4.2 Kb, recordando que este es el sitio de inserción correcto, sin importar la orientación, en la cual se debe insertar para asegurar que la eficiencia de recombinación legítima sea mayor. Por lo tanto, para analizar el ADN de las clonas el siguiente paso fue analizar aquellas clonas que incorporaron el inserto, mediante digestión con la enzima *BamHI*; pero nuevamente la mayor parte de las colonias, aproximadamente el 90%, presentaron el mismo patrón de bandas observado en geles anteriores, indicando que el casete seguía insertándose en el sitio incorrecto de *XbaI*, el de *pKS II+* en dirección 5' a 3' (Figura A).

Debido a que el proceso de recombinación es azaroso, al seguir transformando y analizando colonias mutadas, debería de insertarse el casete en el otro sitio de *XbaI*, sin embargo, para analizar y descartar que la inserción en un solo sitio este siendo favorecida por alguna condición o parámetro, se cambió la cepa JM109 de las células ultracompetentes por *E. coli* XLGold10, para analizar la eficiencia de transformación de la cepa, también se modificó la temperatura a la cual se incubaban y recuperaban las células luego de la reacción de transformación, esto para descartar si está era la limitación. Nuevamente se repitieron los protocolos optimizados y los resultados fueron

los mismos el casete se insertaba en el mismo sitio en cada una de las colonias analizadas, el cambio de cepa nos permitió descartar que la cepa de células fuera la causante de la inserción del casete en el mismo sitio, regresando a utilizar la cepa JM109.

Se repitieron los protocolos optimizados, manteniendo el cambio de temperatura de la incubación y recuperación de las células en todo momento a 30 °C, con el fin de evitar la recombinación que pudiera estar generando patrones inusuales y desconocidos. Los resultados seguían siendo los mismos, las colonias mutantes insertaban el casete en la misma posición, que no correspondía a la de interés. Como último recurso se realizó la doble extracción y purificación del ADN plasmídico utilizando la técnica de Gradiente de Cloruro de Cesio, posterior a la extracción plasmídica por lisis alcalina con columnas: Plasmid Maxiprep Kit; para evaluar si existía una gran cantidad de ADN genómico presente en el ADN plasmídico de los vectores, el cual impedía que el ADN plasmídico se relajara lo suficiente para dejar expuesta la región que pertenece al segundo sitio de restricción para *XbaI*. Posterior al protocolo del gradiente, mediante electroforesis en gel de agarosa, se verificó que el ADN presente en la parte superior del gel, perteneciente al ADN superenrollado disminuyó considerablemente, se comenzó nuevamente con los protocolos optimizados para clonación molecular, de la misma forma en que se utilizaron en el último experimento, contrario a lo esperado el resultado fue el mismo. Sin encontrar la causa por la cual el casete se insertaba solo en un sitio de restricción para ambos vectores, se dio por terminado el estudio, no sin antes mandar a secuenciar algunos plásmidos pertenecientes a colonias mutantes de ambos vectores.

Conclusión

A pesar de las numerosas modificaciones realizadas a los protocolos, no fue posible obtener una sola clona en la que el casete *lox neo lox* se insertara en el sitio adecuado. Analizamos más de 100 colonias obtenidas de los distintos protocolos de ligación y transformación, en la mayoría de estas clonas se observó la inserción del casete, pero en el sitio incorrecto. Lo anterior nos lleva a la conclusión de que el sitio de *XbaI* de *Xgf 5.5* no está disponible dada la naturaleza intrínseca del plásmido y probables eventos de recombinación.

Referencias

- B. Tu-Sekine, D.M. Raben, Lipid Signaling, Editor(s): Ralph A. Bradshaw, Philip D. Stahl, Encyclopedia of Cell Biology, Academic Press, 2016, Pages 194-200, ISBN 9780123947963, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10023-9>.
- Escalante-Alcalde, D., Hernandez, L., Le Stunff, H., Maeda, R., Lee, H., Cheng, G., Sciorra, V., Daar, I., Spiegel, S., Morris, A. and Stewart, C., 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development*, 130(19), pp.4623-4637.
- Escalante-Alcalde, D., Morales, S. and Stewart, C., 2009. Generation of a reporter-null allele of Ppap2b/Lpp3 and its expression during embryogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(1), pp.139-147.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, 285, 1028±1032.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):139-50. doi: 10.1038/nrm2329. PMID: 18216770.
- Humtsoe, J., 2003. Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *The EMBO Journal*, 22(7), pp.1539-1554.
- Humtsoe, J., Bowling, R., Feng, S. and Wary, K., 2005. Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), pp.906-919.

- Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F. and Kanoh, H., 1997. Cloning and Characterization of Two Human Isozymes of Mg²⁺-independent Phosphatidic Acid Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), pp.24572-24578.
- Sciorra VA, Morris AJ. Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1582:45–51.
- Sigal, Y., Mcdermott, M. And Morris, A., 2005. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochemical Journal*, 387(2), pp.281-293.
- Voet, J. P., & Preciado, M. (2009). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. Buenos Aires: Panamericana.
- William Stillwell, Chapter 20 - Bioactive Lipids, Editor(s): William Stillwell, *An Introduction to Biological Membranes (Second Edition)*, Elsevier, 2016, Pages 453-478, ISBN 9780444637727, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00020-8>.
- Zhang, N., Sundberg, J. and Gridley, T., 2000. Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *genesis*, 27(4), pp.137-140.
- Koolman, J. & Rohm, K. H. (2004) Cap. 3 Biomoléculas. En *Bioquímica Texto y Atlas* (pp. 48) Madrid, España: Medica panamericana.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):139-50. doi: 10.1038/nrm2329. PMID: 18216770.

- B. Tu-Sekine, D.M. Raben, Lipid Signaling, Editor(s): Ralph A. Bradshaw, Philip D. Stahl, Encyclopedia of Cell Biology, Academic Press, 2016, Pages 194-200, ISBN 9780123947963, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.10023-9>.
- Gómez-Muñoz, A., Waggoner, D. W., O'Brien, L., & Brindley, D. N. (1995). Interaction of Ceramides, Sphingosine, and Sphingosine 1-Phosphate in Regulating DNA Synthesis and Phospholipase D Activity (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26318-26325.