



Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

MODIFICACIÓN DE CLONAS BAC QUE
CONTIENEN A LOS GENES DE LOS CANALES DE
SODIO $Na_v1.7$ y Na_x .

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

ALEJANDRO LÓPEZ JUÁREZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México

Julio 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



CINVESTAV-IPN

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Refugio García-Villegas.

Durante la realización del trabajo el autor fue becario de tesis de licenciatura, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con fondos del proyecto “Aislamiento y caracterización de reguladores genéticos a larga distancia en promotores de genes neuronales” (No. 34397-N).

Dedico todo el trabajo de hoy y de siempre a mis progenitores, a mi progenie y a mis congéneres. Mi muy querida familia.

ÍNDICE

RESUMEN _____	1
INTRODUCCIÓN _____	3
TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA.....	3
LOS CANALES DE SODIO VOLTAJE-DEPENDIENTES.....	5
LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS NaCh.....	9
LA REGULACIÓN DE LA EXPRESION GÉNICA.....	13
LA TECNOLOGÍA PARA ESTUDIAR LA FUNCIÓN DE LOS GENES.....	16
OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS _____	23
CEPAS BACTERIANAS.....	23
CLONAS BAC.....	23
PLÁSMIDOS.....	24
MEDIOS DE CULTIVO.....	25
MÉTODOS DE OBTENCIÓN, MANIPULACIÓN Y CORTE DE DNA.....	26
OLIGONUCLEÓTIDOS.....	28
AMPLIFICACIÓN DE LOS CASSETTES LINEALES DE RECOMBINACIÓN.....	29
RECOMBINACIÓN.....	30
ANÁLISIS DE RECOMBINANTES POR HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN BLOT.....	33

RESULTADOS	36
I. MODIFICACIÓN DE CLONAS BAC DEL NaCh Na _v 1.7	36
I. a.) Introducción del marcador de selección negativa	
Tc ^R en el exón 1 del gen de Na _v 1.7	38
I. b.) Inserción del cassette Nav-Tc en el plásmido p6S58	39
I. c.) Recombinación con el cassette Nav286Tc812	42
I. d.) Recombinación con el cassette Nav-ApSacB	
en la clona BAC B71neo	45
II. MODIFICACIÓN DE CLONAS BAC DEL GEN DEL NaCh Na _x	48
II. a.) Introducción del gen <i>neo</i> en la clona BAC BNaG1	48
II. b.) Introducción del marcador Ap-SacB en fase con el gen de Na _x	50
II. c.) Reemplazo de los genes Ap-SacB por el gen reportero	
LacZ en la clona BAC DY380/BNaG1neo-ApSB	54
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	60
MODIFICACIÓN DEL GEN DE Na _v 1.7	61
INTRODUCCIÓN DEL GEN <i>NEO</i> EN LA CLONA BNaG1	64
MODIFICACIÓN DEL GEN DE Na _x	64
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71

RESUMEN

La transmisión y recepción de estímulos en el sistema nervioso requiere de la excitación de la membrana plasmática de las neuronas, que se produce por la apertura y cierre de canales iónicos dependientes de voltaje. En general, las diferentes isoformas de los canales de sodio (NaCh) dependientes de voltaje son responsables de generar la primera corriente de entrada del potencial de acción, sin embargo cada una de ellas tiene características singulares que van desde sus propiedades electrofisiológicas hasta su patrón de expresión específico de tejido.

Na_v1.7 y Na_x son dos NaCh que se expresan preferencialmente en ganglios de raíz dorsal del sistema nervioso periférico (Toledo-Aral *et al.*, 1995, 1997; Watanabe *et al.*, 2000;). Los genes de estos NaCh se encuentran contiguos en el genoma de ratón y humano, y aunque sus promotores han sido caracterizados, no se han identificado los elementos que regulan su expresión tejido-específica (García-Villegas *et al.*, 2000, 2001, 2002; Morales, 2004).

El presente trabajo se hizo con el objeto de modificar clonas de Cromosomas Artificiales de Bacteria (BAC's, Shizuya *et al.*, 1992), que contienen a los genes de los NaCh Na_v1.7 y Na_x, con el fin de obtener modelos de estudio con los cuales iniciar la búsqueda (en regiones genómicas de cientos de kilobases) de elementos que regulen la expresión tejido específica de Na_v1.7 y Na_x.

Para seleccionar y mantener establemente a las clonas BAC modificadas en cultivos celulares específicos, se introdujo inicialmente por medio de recombinación homóloga del sistema RED (Yu *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2001), al gen de resistencia a neomicina en un sitio del vector de la clona BAC (pBeloBAC11). La introducción y funcionalidad del gen en bacterias se comprobó por la habilidad de éstas para crecer en medio con kanamicina, y la inserción del gen en el sitio planeado se comprobó por la hibridación de una sonda radioactiva específica en un ensayo tipo Southern Blot.

Planteamos una estrategia para introducir por recombinación homóloga del sistema RED al gen reportero *LacZ* bajo la transcripción del promotor del gen de Na_v1.7, contenido en las clonas BAC B71neo y B126neo. Por este método no fue posible modificar una región genómica comprendida entre el final del exón 1 y el principio del exón 2 (región de 67 Kb)

del gen de $Na_v1.7$, donde fueron dirigidos dos cassettes de recombinación homóloga. Sin embargo, sí fue posible insertar por recombinación homóloga del sistema RED, al gen de resistencia a tetraciclina en el exón 1 del gen de $Na_v1.7$ presente en el plásmido p6S58, que contiene 11 Kb a partir del final del exón 1. La inserción correcta del gen se comprobó al hacer la restricción del plásmido y observar los fragmentos esperados en el caso de la recombinación planeada. Dado que sí fue posible modificar al gen de $Na_v1.7$ en un sistema de plásmidos, y por la falta de clonas recombinantes en los ensayos realizados con las clonas BAC B71neo y B126neo, se sugiere la existencia de estructuras secundarias presentes en la región comprendida entre el exón 1 y el exón 2 del gen de $Na_v1.7$, lo cual probablemente puede impedir la acción de las recombinasas del sistema RED.

Por otro lado se planteó una estrategia para introducir por recombinación homóloga del sistema RED al gene reportero *LacZ* en fase con el gen de Na_x contenido en la clona BAC BNaG1 de 135 Kb. En la primera parte de la estrategia se insertaron simultáneamente los genes de resistencia a ampicilina y de sensibilidad a sacarosa (*Ap-SacB*) en el sitio de inicio de la traducción en el exón 2 del gen de Na_x . La inserción correcta de los genes se comprobó por el fenotipo $Ap^R SacB^+$ esperado y por hibridación de una sonda específica en un ensayo tipo Southern Blot. En el segundo paso de la estrategia se intentó reemplazar a los genes *Ap-SacB* por el de *LacZ* seleccionando clonas $Ap^S SacB^-$, sin embargo no se observó ninguna clona positiva de la inserción específica del gen *lacZ*. Tras algunas modificaciones en el proceso de inducción a la recombinación del sistema RED y de selección de clonas BAC recombinantes, el resultado no varió, por lo que probablemente exista alguna particularidad de la secuencia del exón 2 del gen de Na_x que impidió el segundo proceso de recombinación e inclusive promovió la exclusión de la región modificada en el primer paso.

Dada la importancia de obtener un gen como *LacZ* reportando la actividad transcripcional de los genes $Na_v1.7$ y Na_x , en un sistema en el que se incluyan regiones genómicas de cientos de kilobases como lo es el sistema BAC, y dado que el sistema de recombinación homóloga RED utilizado en este trabajo probó promover la recombinación específica entre secuencias homólogas, se piensa continuar el trabajo en posteriores proyectos utilizando diferentes estrategias para la selección de las recombinantes y preferentemente en un solo paso de recombinación.

INTRODUCCIÓN

TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA

Como cita la teoría celular, uno de los paradigmas de la biología, los seres vivos son o están compuestos de “células”. Ellas están delimitadas por membranas, las cuales son la barrera entre un sistema altamente organizado llamado citoplasma y su medio externo que existe en relativo caos. Termodinámicamente hablando, la célula es un sistema abierto y para el mantenimiento e incremento de su grado de organización, o para responder a cambios en el ambiente, requiere constantemente de intercambiar moléculas y energía con el medio (Aidley, 1989). Con el desarrollo de una membrana impermeable en forma de bicapa lipídica en los seres vivos (Singer y Nicholson, 1972), fueron necesarios también mecanismos de transporte de moléculas para el intercambio de metabolitos. Debido a su interior hidrofóbico, la membrana celular sirve como una barrera para el paso de elementos polares como iones, azúcares, aminoácidos, nucleótidos, etc. La célula en sus necesidades de ingestión de estos nutrientes esenciales, de la excreción de productos de desecho metabólico y de regulación de la concentración iónica intracelular, utiliza vías de transferencia de moléculas específicas a través de la membrana. El transporte a través de la membrana se lleva a cabo por proteínas especializadas habiendo dos tipos principales: las proteínas “acarreadores” también llamadas permeasas, que ligan el soluto específico a transportar y sufren una serie de cambios conformacionales para cumplir su función, y las proteínas “canales”, que no necesitan ligar un soluto sino que forman un poro hidrofílico que se extiende atravesando la membrana. El transporte mediado por canales ocurre mucho más rápido que el transporte mediado por acarreadores (Alberts, *et al.*, 1994).

El transporte de proteínas, como “bombas” de solutos, en contra de un gradiente electroquímico es un proceso llamado transporte activo, y es mediado por acarreadores. En este tipo de transporte la actividad de la bomba es direccional debido a que está acoplada a una fuente de energía metabólica como la hidrólisis de ATP. En todos los canales y algunos acarreadores, se permite el cruce de solutos a través de la membrana sin necesidad de consumo de energía en un proceso llamado transporte pasivo o “difusión facilitada”. Si las

moléculas transportadas no tienen carga esto se hace simplemente por la diferencia de concentración en ambos lados de la membrana (gradiente de concentración) determinando así la dirección del transporte. Si el soluto lleva una carga neta, es el gradiente de concentración y la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana (potencial de membrana) lo que influye en el transporte. En comparación con los canales que forman las “gap-junctions” (unión entre dos células adyacentes), que son grandes y permisivos a diferentes moléculas, la mayoría de los canales que conectan el citoplasma celular con el medio extracelular son poros altamente selectivos (Alberts, *et al.*, 1994).

Al tipo de proteínas que concierne específicamente el transporte de iones a través de la membrana se les llama canales iónicos, y están involucrados en muchos procesos fisiológicos incluyendo el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación de la excitabilidad de membrana y la modulación de secreción de hormonas y neurotransmisores (Hille, 1992). Estos canales llevan a cabo su transporte de forma pasiva permitiendo que iones inorgánicos específicos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- puedan difundirse rápidamente a través de la membrana. La propiedad distintiva de los canales iónicos es que no se encuentran permanentemente abiertos, ellos tienen un “gate” o puerta, la cual sólo abre momentáneamente. En la mayoría de los casos la apertura responde a un estímulo específico siendo los principales tipos de estímulos conocidos: los mecanismos de estrés (canales abiertos mecánicamente), la unión de un ligando (canales ligando-dependientes) o un cambio en el voltaje de la membrana (canales voltaje dependientes o sensibles a voltaje)(Alberts, *et al.*, 1994).

Los canales iónicos voltaje-dependientes tienen como función más reconocida, generar la actividad eléctrica celular, y así ellos participan en varias de las más impresionantes manifestaciones de la vida, como son: el movimiento, la percepción, y la función cognitiva del cerebro de organismos superiores (Anderson y Greenberg, 2001). Por esta razón, se han realizado variadas investigaciones sobre este tipo de canales, incluyendo la caracterización de sus propiedades electrofisiológicas, bioquímicas y estructurales (Goldin, 2001).

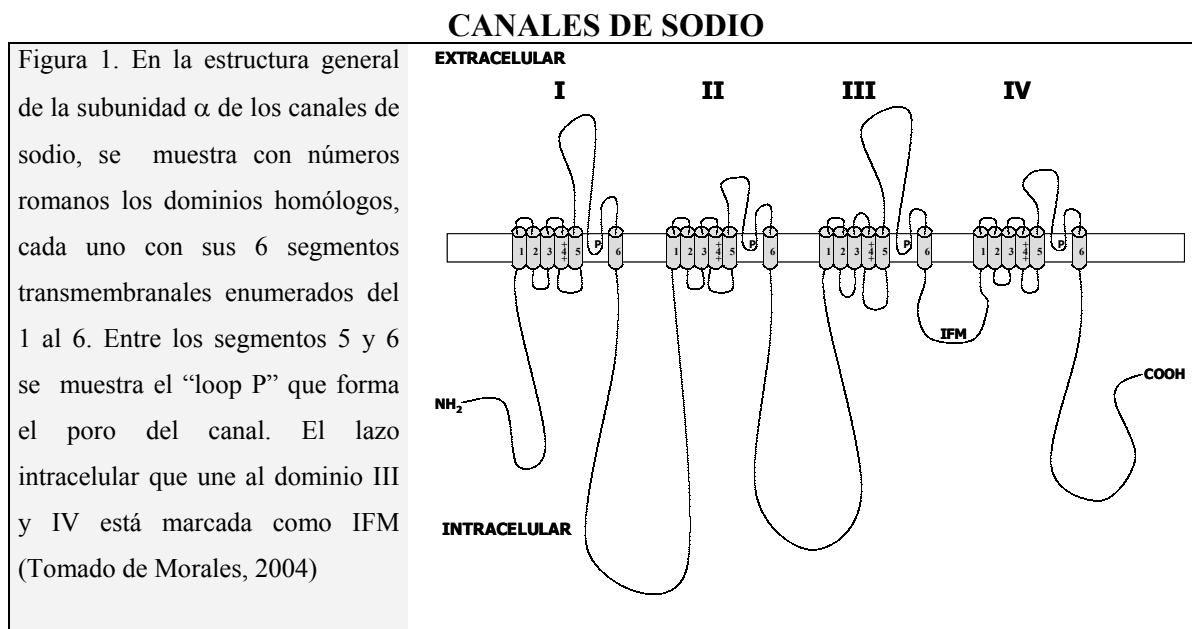
Debido a la dificultad para la obtención de cristales tridimensionales de proteínas de canales iónicos para hacer estudios de cristalografía de rayos-X, la estructura tridimensional detallada de ellos no se conoce, sin embargo, se ha obtenido información importante de su estructura por otros métodos de estudio, especialmente por el uso de la

tecnología de DNA recombinante. Una vez que el DNA que codifica para una proteína de transporte ha sido clonado (introducido a un vector) y secuenciado, se puede deducir la secuencia del polipéptido codificado y el número de α hélices transmembranales estimadas por análisis de hidropatía. Se pueden diseñar anticuerpos contra péptidos sintéticos correspondientes a segmentos específicos de la cadena polipeptídica completa, pudiendo determinar así qué segmentos están expuestos de uno u otro lado de la membrana. La secuencia de DNA que codifica para partes específicas del canal se puede alterar por mutagénesis dirigida y el RNA mensajero (mRNA) correspondiente puede ser inyectado en modelos de expresión heteróloga de canales iónicos, como pueden ser los cultivos de ovocitos de *Xenopus*, donde la síntesis directa de la proteína mutante presentará una función de transporte que puede ser estudiada. Además el DNA que codifica para un canal puede ser usado como una sonda para aislar por homología a otras secuencias de DNA relacionadas que codifiquen para proteínas homólogas (Alberts, *et al.*, 1994). Estos últimos estudios han revelado que el transporte de iones en la membrana es mediado por un pequeño número de familias de proteínas, donde sus miembros están relacionados estructuralmente, por mecanismos de acción y por un origen evolutivo común (Alberts, *et al.*, 1994). Así, la súper familia de los canales iónicos dependientes de voltaje incluye a las familias de los canales de K^+ voltaje-dependientes, a la de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, a la de los canales dependientes de nucleótidos cíclicos, y a la familia de canales de Na^+ (NaCh) voltaje-dependientes (Goldin, 2002), dos de los cuales son objeto de estudio en este trabajo.

LOS CANALES DE SODIO VOLTAJE-DEPENDIENTES

Los NaCh generan la primera corriente de entrada del potencial de acción en células excitables como neuronas y células musculares (Hille, 1992). Se han purificado proteínas específicas de NaCh mediante cromatografía de afinidad en columnas con toxinas inmovilizadas, como por ejemplo la tetrodotoxina (TTX) que es el veneno paralizante producido por peces del orden de los tetrodontiformes y que actúa bloqueando la conducción del potencial de acción en células nerviosas y musculares por la unión específica con el extremo carboxilo de algunos NaCh (Darnell, 1993).

Noda *et al.*, (1984) comenzaron con la elucidación de la estructura primaria de los NaCh con tecnología de DNA recombinante, y en la actualidad se sabe que en general consisten de una subunidad α de aproximadamente 260 kDa, que contiene 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno con 6 segmentos transmembranales (S1-S6), y un “loop P” tipo “hairpin” entre los segmentos S5 y S6 (Fig. 1; Goldin, 2002). Los estudios de estructura-función relacionados con la subunidad α , han mostrado que los segmentos transmembranales S4 de cada dominio repetido son capaces de sensor los cambios en el voltaje transmembranal y por lo tanto son cruciales para la activación de los canales, que los segmentos S5, S6 y el lazo que los une forman el poro conductor de iones, y que el lazo intracelular altamente conservado que une a los dominios III y IV del canal da lugar a la compuerta de inactivación o IFM (Fontaine *et al.*, 1990). La subunidad α está asociada con subunidades accesorias en ciertas especies, como son la subunidad β_1 , β_2 o β_3 de 33-36 kDa en mamíferos, que se asocian de manera no covalente a través de puentes disulfuro (Catterall, 1995), y tienen sólo un segmento transmembranal. La subunidad β juega un papel funcional muy importante al regular de manera fina la apertura de los canales (Vega y Félix, 2001).



La estructura y propiedades electrofisiológicas de los NaCh no son idénticas, existen diferentes isoformas de NaCh que tienen distintos papeles en la excitabilidad eléctrica de una célula y que han sido clasificadas dentro de una familia con nueve miembros (Tabla 1),

de los cuales la nomenclatura utilizada es la recientemente propuesta por Goldin, *et al.*, (2000) y Caterall *et al.*, (2000), la cual consiste del prefijo Na_v para indicar el principal ión permeable (Na^+) y el regulador fisiológico del canal (en este caso voltaje), sigue un número que indica la subfamilia (actualmente Na_v1 es la única subfamilia), y después del punto decimal un número indica la isoforma del canal, por ejemplo $\text{Na}_v1.7$. Existe una décima isoforma de NaCh llamada Na_x (descrita más adelante), que se encuentra en esta familia por exhibir una homología a nivel de secuencia de aminoácidos del 40-50 % con las demás isoformas de la familia.

Por su identidad de secuencia, las isoformas de NaCh se han distribuido en 5 diferentes ramas del árbol filogenético. Esta división se ha relacionado con la localización de sus genes en los cromosomas, teniendo así a los genes que codifican para $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.7$ y Na_x en el cromosoma 2 de humano y de ratón (Goldin, *et al.*, 2000).

TABLA 1. SUBUNIDADES α DE NaCh VOLTAJE- DEPENDIENTES

Nombre formal	Nombres Tradicionales	Nombre del Gen	Localización en cromosoma	Sensibilidad a TTX	Localización Predominante
$\text{Na}_v1.1$	Tipo I, rat I, scn1a HBSCI, GPBI	<i>SCN1A</i>	M: 2 H: 2q24	S	SNC, SNP.
$\text{Na}_v1.2$	Tipo II, rat II HBSCII, HBA	<i>SCN2A</i>	M: 2 H: q23-24	S	SNC.
$\text{Na}_v1.3$	Tipo III, rat III	<i>SCN3A</i>	M:2 H:2q24	S	SNC (Embrión).
$\text{Na}_v1.4$	SkM1, μ 1	<i>SCN4A</i>	M:11 H:17q23-25	S	Músculo Esquelético.
$\text{Na}_v1.5$	SkM2, rHI, HI	<i>SCN5A</i>	M:9 H:3p21	R	Corazón (Músculo).
$\text{Na}_v1.6$	Tipo IV, NaCh6, Na6, PN4, Scn8A, Cer III	<i>SCN8A</i>	M:16 H: 12q13	S	SNP, SNC, Glia, Nodos de Ranvier.
$\text{Na}_v1.7$	PN1, hNE, Nas	<i>SCN9A</i>	M:2 H:2q24	S	SNP, Células de Schwann, DRG.
$\text{Na}_v1.8$	SNS, PN3, NaNG	<i>SCN10A</i>	M:9 H:3q22-24	R	SNP (neuronas sensoriales).
$\text{Na}_v1.9$	SNS2, NaN, NaT, SCN12A	<i>SCN11A</i>	M:9 H:3p21-24	R	SNP.
Na_x	$\text{Na}_v2.1$, $\text{Na}_v2.2$ $\text{Na}_v2.3$, SCL11, NaG	<i>SCN6A</i> (<i>SCN7A</i>)	M:2 H:2q23-24	R	Corazón, útero, glía, SNP, DRG.

M: Ratón, H: Humano, S: Sensible, R: Resistente, TTX: Tetrodotoxina, SNC: Sistema Nervioso Central, SNP: Sistema Nervioso Periférico, DRG: Ganglio de Raíz Dorsal (modificado de Ogata y Yoshiaki 2002, Goldin, 2001) .

El NaCh Na_v1.7: Toledo-Aral *et al.*, (1995, 1997) trabajando con la línea celular neuronal PC12 inducida a diferenciación con Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) obtuvieron y reportaron la secuencia del DNA complementario (cDNA) del NaCh de nervio periférico 1 (PN1), el cual mostró una homología de 90% en secuencia de aminoácidos respecto al NaCh neuroendocrino humano “hNE-Na” descrito por Klugbauer *et al.*, (1995), y con el de células de Schwann de conejo “Nas” (Belcher *et al.*, 1995). Estos canales se han agrupado bajo el nombre formal de **Na_v1.7**.

Por análisis tipo Northern blot se identificó que Na_v1.7 es expresado preferentemente en el Ganglio de Raíz Dorsal (DRG) y en el Ganglio Cervical Superior del Sistema Nervioso Periférico (SNP), y se ha propuesto a Na_v1.7 como el canal responsable de la mayor corriente sensible a TTX en el SNP (Toledo *et al.*, 1995, 1997, Black *et al.*, 1996). Na_v1.7 produce una corriente rápida y transiente en respuesta a una despolarización repentina, además de una corriente persistente por un cierre lento de despolarización para restaurar el potencial (Cummins 1998). Experimentos de administración subcutánea de NGF en ratas, demostraron un incremento del NaCh Na_v1.7 en neuronas del SNP, específicamente en los DRG. Este incremento está asociado a un aumento en el umbral del dolor sugiriendo un papel de Na_v1.7 en alguna vía de transducción de dolor (Gould *et al.*, 2000).

El NaCh Na_x: George *et al.*, (1992), aislaron y caracterizaron a partir de corazón y músculo esquelético humano, el cDNA que codifica para una subunidad α que exhibe una moderada identidad con los miembros de la familia 1 de los NaCh dependientes de voltaje a la que llamó Na_v2.1, sugiriendo así la existencia de otra subfamilia de genes de NaCh. Posteriormente se clonó un canal de sodio de ratón de una línea celular de tumor atrial, que mostró un parecido de 40-50% con la secuencia de aminoácidos de la familia 1 de los NaCh voltaje-dependientes, a este canal se le llamó Na_v2.3 (Felipe *et al.*, 1994). La estructura inferida de este canal muestra diferencias en el segmento S4, que se ha reportado como región importante para la inactivación del canal (Auld *et al.*, 1990). Felipe *et al.*, (1994), compararon regiones en la secuencia de aminoácidos del canal Na_v2.3 (ratón), con la secuencia de Na_v2.1 (humano), y además con otros NaCh como rH-1 obtenido de corazón de rata (Rogart *et al.*, 1989) y con r-NaG/SCL11 de glía de rata (Gautron *et al.*, 1992, 2001; Akopian *et al.*, 1997), encontrando homologías aproximadas de 68%, 74% y

90% respectivamente, lo que indicó que los genes de este NaCh son conservados en diferentes especies. Ninguno de estos canales pudo ser expresado funcionalmente en sistemas clásicos de expresión heteróloga de canales iónicos como lo son los ovocitos de *Xenopus*, células de ovario de hámster (CHO) y células embrionarias HEK-293 de riñón humano (Goldin, 2001, Watanabe *et al.*, 2000; Trimmer y Agnew, 1989), por lo cual, y por la posibilidad de que el regulador fisiológico de este tipo de canal no fuera el voltaje, quedó su nomenclatura formal como Na_x (Goldin, 2002).

Watanabe *et al.*, (2000), trabajando con vectores de “targeting” para generar ratones “knock-out” del gen de Na_x , reportaron que el canal Na_x es expresado en neuronas del DRG y células de Schwann en el SNP, y en menor cantidad en pulmón y corazón. Ellos sugieren que Na_x juega un papel importante al regular los niveles de sodio de los fluidos corporales y en la regulación de la entrada de sales. Recientemente se demostró que Na_x es un canal de sodio activado por incremento en la concentración de sodio extracelular (Hiyama, *et al.*, 2002).

LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS NaCh

En las células del sistema nervioso y muscular, la diversidad de los canales iónicos es utilizada para la recepción, conducción y transmisión de distintas señales. Así sucede con las diversas isoformas de NaCh que se asocian directamente a la transmisión de la sensación al dolor y sus cambios patológicos, por lo que su estudio ha sido de gran relevancia hoy en día (Ogata y Yoshiaki, 2002). Por ejemplo se ha sugerido que el dolor neuropático, que a diferencia del dolor nociceptivo o el inflamatorio que actúan como un mecanismo de defensa, se trata de un dolor completamente “inútil” y perjudicial (ardor espontáneo y dolor exagerado a un estímulo inocuo), que es causado por un incremento espontáneo de fibras nerviosas aferentes, desde un sitio dañado química o físicamente, atribuible a un armado anormal de NaCh donde el nervio crece y se puede hacer neuroma (Sheen y Chung, 1993).

Con las investigaciones en genética molecular se han dado los avances más trascendentes en la medicina de los últimos años. Un buen ejemplo de ello lo constituye el campo de la investigación sobre los canales iónicos, donde la lista de enfermedades genéticas asociadas a ellos (canalopatías) ha crecido rápidamente caracterizándose principalmente por ser

alteraciones neurológicas, neuromusculares o cardíacas (Vega y Felix, 2001). Se han identificado una gran variedad de desordenes genéticos autosómicos dominantes causados por mutaciones en los genes de NaCh que en general son enfermedades paralizantes del músculo esquelético y miotonías no distróficas como la parálisis periódica hiperkalémica, la paramiotonía congénita, la miotonía agravada por potasio y los síndromes epilépticos entre otros (Fontaine *et al.*, 1990; Ptacek *et al.*, 1991). Las mutaciones que producen estos defectos han sido localizadas, y concuerdan en su localización en regiones de la proteína involucradas en el proceso de inactivación (Ogata y Yoshiaki, 2002). Los estudios biofísicos en canales iónicos mutados están permitiendo una caracterización detallada de los mecanismos moleculares subyacentes a los mecanismos de acción de los NaCh y sus desórdenes, pero el entendimiento integral de este campo requiere conocer el papel que los canales juegan en su contexto celular y sistémico (Vega y Felix, 2001).

Como se mencionó anteriormente, las sutiles diferencias en las propiedades estructurales y funcionales de cada isoforma de NaCh, resultan en conductancias únicas y específicas para cada tipo de célula, lo cual tiene importantes efectos fisiológicos para el organismo. Las distintas subunidades de NaCh revelan varios grados de diferencia en propiedades como “gating”, activación, cinética de inactivación, y aunado a esto hay que recalcar que cada NaCh tiene un patrón específico de expresión en tejidos y grupos celulares distintos.

La expresión selectiva de NaCh funcionales en células excitables, sugiere la presencia de mecanismos generales que pueden suprimir su expresión en células no excitables. Maue *et al.*, (1990) así como Kraner *et al.*, (1992), demostraron la presencia de un elemento genético silenciador de 28 pb localizado en la región flanqueante 5' del gen de Na_v1.2. Posteriormente se describió que la expresión de este gen depende de la ausencia o presencia de una proteína llamada REST (Regulatory Element 1 Silencing Transcription Factor) o NRSF (Neuron-Restrictive Silencer Factor) que actúa en conjunto con otras proteínas auxiliares (Andres *et al.*, 1999; Grimes *et al.*, 2000) para reprimir la expresión de Na_v1.2 en líneas no neuronales (Chong *et al.*, 1995; Tapia-Ramírez *et al.*, 1997). Este mismo complejo represor también participa en el control de la expresión de otros genes que son esenciales para la inducción y el sostenimiento del fenotipo neuronal (Schoenherr y Anderson, 1995).

Por otro lado se demostró que el promotor del gen del canal $\text{Na}_v1.4$ llega a tener especificidad de expresión respondiendo a la interacción de factores de transcripción propios de músculo esquelético con una secuencia denominada “caja E”, ésto en presencia ya sea de un elemento negativo en la región 5' del gen que reprime su expresión en células no musculares, o de un segundo elemento de regulación localizado al 3' del promotor que amplifica su expresión de manera específica en células musculares (Kraner *et al.*, 1992).

Múltiples genes de NaCh son expresados dentro de grupos bien definidos de neuronas como sucede en las neuronas del DRG, las cuales transmiten toda la información somatosensorial desde las extremidades y el tronco al sistema nervioso central (Kandel *et al.*, 2000). En las neuronas del DRG se expresan altos niveles del mRNA de cuatro NaCh que no son detectables en niveles significativos en otros tipos de neuronas. Estos NaCh son: $\text{Na}_v1.7$ (Toledo-Aral *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1996), $\text{Na}_v1.8$ (Akopian *et al.*, 1996), $\text{Na}_v1.9$ (Dibhajj *et al.*, 1998) y Na_x que aunque es un canal originalmente identificado en glía (Gautron *et al.*, 1992), se expresa en gran cantidad en neuronas de DRG (Black *et al.*, 1996). El análisis de la función y expresión de cada uno de esos canales se lleva a cabo en la actualidad y se ha sugerido que sus corrientes interactúan de manera compleja durante la generación del potencial de acción (Waxman, 2000). Por ejemplo las evidencias de estudios biofísicos indican que la expresión selectiva de hNE ($\text{Na}_v1.7$), en grupos de neuronas de DRG, las dotaría con diferentes propiedades transductivas por su característico periodo de inactivación (Cummins, 1998).

La expresión de los NaCh en las neuronas no es estática, sino por el contrario es un proceso altamente dinámico, observando así que durante el desarrollo de regiones específicas del sistema nervioso, el nivel de expresión de algunos NaCh incrementa mientras que el de otros decremanta como efecto de algunas neurotrofinas y otros factores de transcripción de genes de NaCh (Brysch *et al.*, 1991, Waxman *et al.*, 1994). Algunos estudios mostraron que el NGF reprime la expresión de los NaCh SNS y tipo III ($\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.3$) regulando así de forma negativa su expresión en neuronas maduras de DRG (Dib-Hajj *et al.*, 1998; Black *et al.*, 1997). Por otro lado Gould *et al.*, (2000), determinaron la importancia del NGF en la expresión de NaCh's al observar un incremento de ellos, particularmente de PN1 ($\text{Na}_v1.7$), en neuronas del DRG en ratas, tras la administración subcutánea de NGF, mientras que Toledo-Aral *et al.*, (1995, 1997) demostraron que la

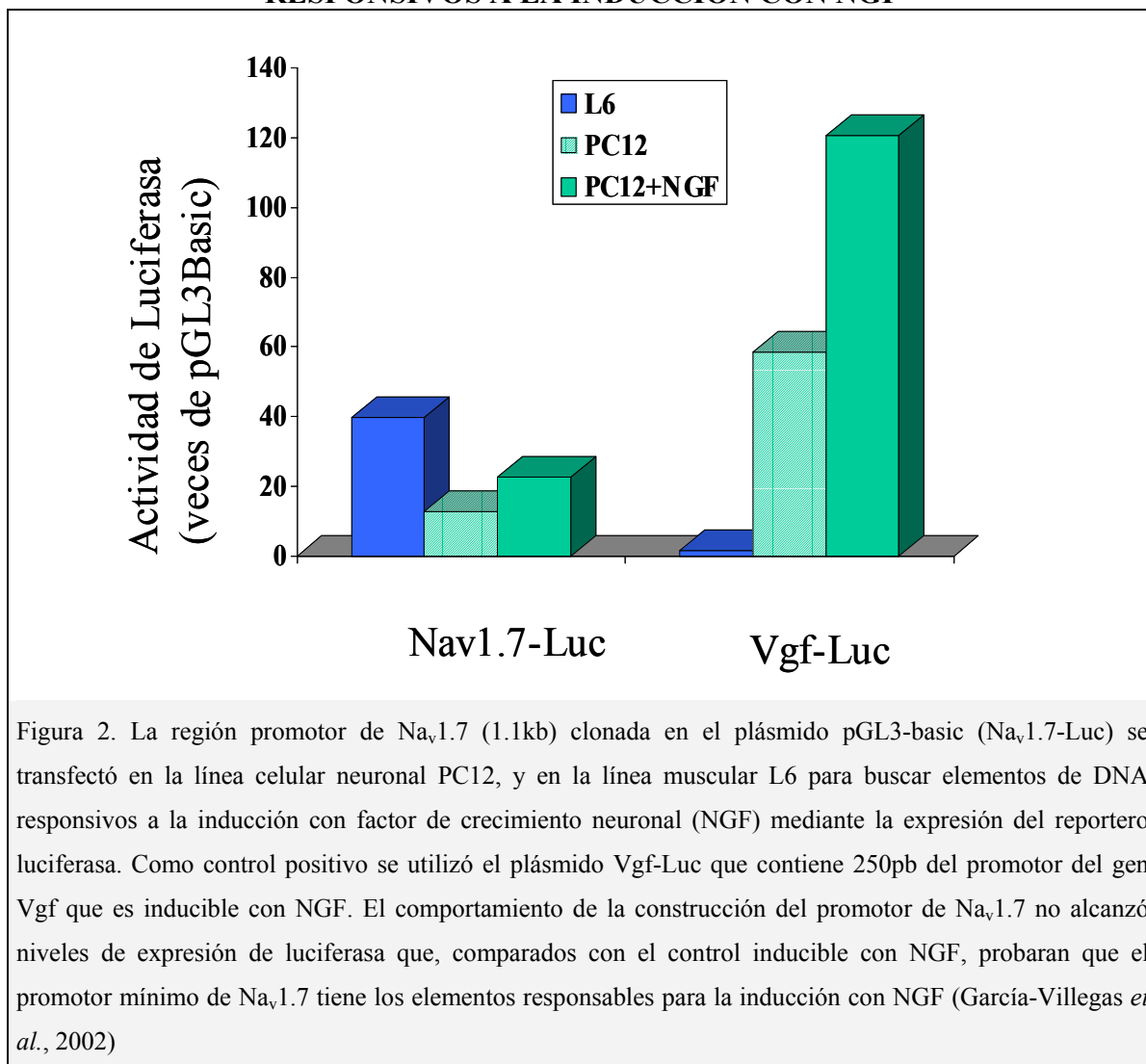
administración de NGF por períodos tan cortos como 1 minuto puede inducir la expresión selectiva de la subunidad α del NaCh PN1 ($\text{Na}_v1.7$) en células de la línea neuronal PC12.

Los mecanismos moleculares que durante la diferenciación terminal, determinan la expresión de la mayoría de los tipos de NaCh responsables de la excitabilidad del SNP es una investigación que apenas emerge, siendo éste un estudio necesario para ofrecer herramientas con las cuales desarrollar fármacos contra desórdenes relacionados con canales iónicos.

García-Villegas *et al.*, (2000, 2001) han trabajado con el gen *mScn9A* de ratón, que codifica para la subunidad α del NaCh $\text{Na}_v1.7$, clonando y caracterizando al promotor transcripcional mínimo de este gen. Encontraron que el promotor no contiene caja TATA y presenta múltiples sitios de inicio de la transcripción, no presenta elementos de regulación tejido-específicos cercanos al promotor, ni tampoco los elementos responsivos a la inducción con NGF en la región del promotor mínimo (Fig. 2) ni en las 12 kb inmediatas río arriba del promotor mínimo. Por otro lado durante la caracterización del promotor de $\text{Na}_v1.7$ se encontró que el gen *mScn7A* que codifica para la subunidad α del NaCh Na_x se localiza hacia el extremo 5' del gen de $\text{Na}_v1.7$ en el genoma de ratón y humano (García-Villegas, *et a.*, 2001).

Recientemente se clonó y caracterizó al promotor mínimo del gen del NaCh Na_x de ratón (Morales, 2004), encontrando que al igual que el gen del NaCh $\text{Na}_v1.7$, no contiene caja TATA y presenta múltiples sitios de inicio de la transcripción (García-Villegas, *et al.*, 2002, Morales 2004). Además de estas similitudes en sus respectivos promotores de transcripción y su cercanía en el genoma, los canales de sodio $\text{Na}_v1.7$ y Na_x comparten un patrón de expresión tejido-específica en neuronas del DRG lo que los convierte en un modelo interesante para el estudio de su expresión genética específica en neuronas del SNP.

EL PROMOTOR DE $\text{Na}_v1.7$ NO CONTIENE ELEMENTOS DE EXPRESIÓN RESPONSIVOS A LA INDUCCIÓN CON NGF



LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Las diferencias y similitudes en las propiedades de los NaCh, radican en la secuencia en la que se encuentran arreglados los aminoácidos de las proteínas que los conforman. Esas secuencias de aminoácidos están codificadas por secuencias de nucleótidos contenidas en el material genético de las células (Aidley, 1989). La expresión de cada gen está regulada a varios niveles, siendo uno de los más importantes la transferencia de la información a moléculas de mRNA en el proceso llamado transcripción, en el cual la RNA polimerasa II (pol-II) cataliza la síntesis de una molécula de RNA a partir de una secuencia de DNA, para

que ésta sea traducida a una proteína en los ribosomas del citoplasma celular. En los genes eucariontes la transcripción es regulada por señales externas que convergen en la célula y que dan lugar a una cascada de factores reguladores que interactúan en el complejo de transcripción, siendo este proceso uno de los temas de mayor actualidad en la biología molecular (Tjian, 1995). El complejo de transcripción se constituye por la enzima pol-II y por una gran cantidad de proteínas o factores de transcripción (Tabla 2) ensamblados ordenadamente (Ge, *et al.*, 1996). La pol II requiere asociarse a estos factores transcripcionales y reguladores para iniciar la transcripción (Fig. 3), y así sintetizar la molécula de mRNA (Ge, *et al.*, 1996).

TABLA 2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Generales	Proteínas que en conjunto con la pol II forman el complejo de inicio de la transcripción, funcionan sin necesidad de moléculas reguladoras y llevan a cabo la transcripción basal de genes.
Activadores	Son proteínas que se unen directamente al DNA en secuencias específicas del promotor para incrementar la transcripción basal. Están presentes en la mayoría de las células eucariontes (activadores ubicuos) o en ciertos tipos celulares (factores específicos de tejido).
Coactivadores	Actúan en conjunto con los activadores sin unirse directamente al DNA del promotor, interconectando a los activadores con el complejo de inicio de la transcripción.
Represores	Regulan el proceso de transcripción de manera negativa, ya sea bloqueando el acceso de los factores transcripcionales o el de los activadores al promotor, o también uniéndose a secuencias específicas sobre el promotor y actuando directamente sobre el complejo de inicio de la transcripción.
Tomado de Ge H., <i>et al.</i> , 1996	

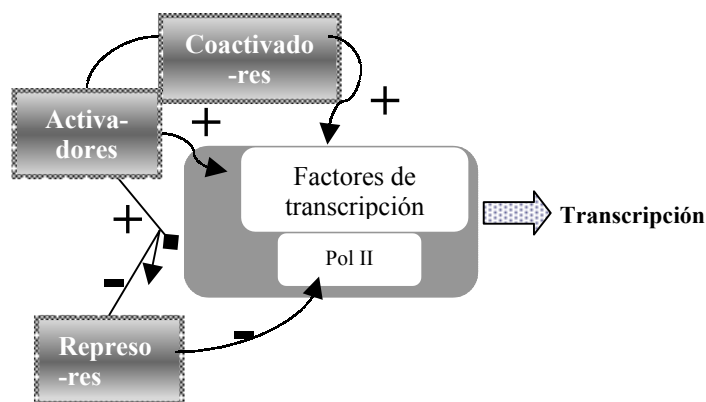
En el material genético, además de la parte codificante de la proteína, existen secuencias de nucleótidos relacionadas con el inicio, paro, y regulación de la expresión génica (Hille, 1992). En el proceso de transcripción participan elementos reguladores propios del gen que consisten en secuencias nucleotídicas que pueden ser reconocidas por factores de transcripción generales (como ejemplo el promotor básico), o por factores tejido-específicos (como en regiones reguladoras localizadas generalmente antes del promotor). Existen otras secuencias localizadas en sitios distantes al promotor, conocidas como “potenciadores” o “enhancers”, que incrementan la tasa transcripcional del gen al que están asociadas (Fig. 4). A cada una de estas regiones del gen se le unen diversas proteínas o

factores de transcripción, algunos específicos de tejido o tipo celular, y otras comunes para todas las células.

El conocimiento del proceso de transcripción a nivel molecular ayuda a comprender la relación que tiene éste con el desarrollo y salud de los individuos.

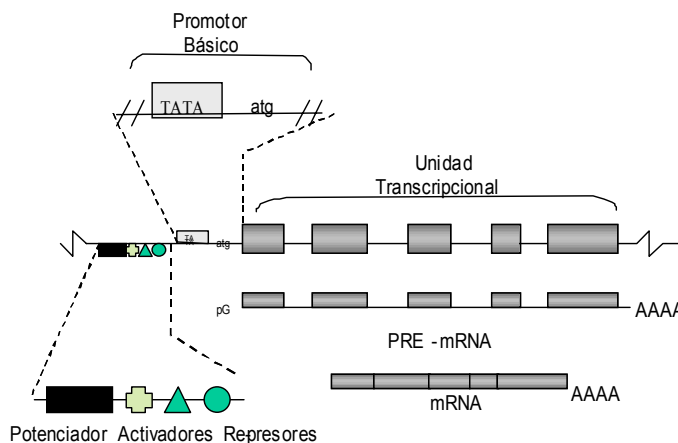
COMPLEJO DE TRANSCRIPCIÓN

Figura 3. Se esquematiza la manera en la que interactúan factores de transcripción y reguladores de la transcripción. La pol II se asocia con los factores generales, formando el complejo de inicio de la transcripción, el cual es capaz de transcribir un gen a niveles basales. Sobre el complejo pueden actuar factores activadores y coactivadores para incrementar los niveles de transcripción (+). También existen factores represores que inhiben la misma (-). Sin embargo, algunos activadores pueden bloquear la acción de los represores evitando su efecto inhibitorio sobre el gen. (Moreno, *et al.*, 1999).



ELEMENTOS DE REGULACIÓN GENÉTICA

Figura 4. En la estructura de un gen eucarionte el promotor cuenta con una región básica proximal y otra distante que es regulable. El potenciador es otro elemento de regulación que en ocasiones es específico del tejido y está frecuentemente situado en una región alejada del gen. La información codificada para la síntesis de la proteína es transcrita en una molécula de pre-mRNA (Moreno, *et al.*, 1999).



LA TECNOLOGIA PARA ESTUDIAR LA FUNCIÓN DE LOS GENES

Los mecanismos de regulación genética de eucariotes necesitan de secuencias que no se transcriben a RNA, es decir, secuencias presentes solo en el DNA genómico (gDNA), y para estudiar estos mecanismos las técnicas modernas de ingeniería genética representan herramientas indispensables.

Estudiar directamente un cromosoma eucarionte completo no es posible, debido a su tamaño excesivo que no puede ser manejado adecuadamente en un sistema o modelo de estudio. La biología molecular hace uso de "genotecas", construidas tomando un genoma completo, cortándolo en miles de trozos con una enzima de restricción y ligando los fragmentos resultantes de DNA a un vector genético adecuado al modelo de estudio. Con los vectores así obtenidos, se "infecta" un cultivo del organismo huésped para ser transformado, llevando de esta manera en su interior un fragmento del DNA del organismo en cuestión y transmitiéndolo a su progenie (clonación). Para escoger al huésped que haya incorporado el fragmento o gen de interés se hace un "screening" o sondeo, rastreándolo dentro de la genoteca. Esto se puede hacer con una sonda de RNA o DNA marcada radioactivamente, cuya secuencia sea complementaria a la del gen que se busca, y que al hibridar con éste marque a los organismos portadores del gen (www.adngo.com).

Antiguamente el problema de las genotecas con bacterias como huésped de clonación, era que los trozos de DNA que pueden almacenar los vectores comunes son de escasa longitud (hasta 20 Kb). Después se desarrolló un sistema para la clonación de fragmentos "grandes" de DNA en bacterias, basado en el bacteriófago P1 cuya capacidad máxima como huésped de DNA es de 100 Kb (Sternberg, 1990). La construcción de genotecas usando cromosomas artificiales de levaduras (YAC's) permitió la clonación de fragmentos de aprox. 500 Kb (Burke *et al.*, 1987), sin embargo se vieron algunas dificultades, como que una fracción de las clonas YAC's resulta en eventos de co-clonación "quimérica", es decir que una clona sencilla contiene un DNA proveniente de dos o mas fragmentos no contiguos en el genoma original (Green *et al.*, 1991).

Shizuya *et al.*, (1992) describieron un sistema suplementario y alternativo a las YAC's llamado cromosoma artificial de bacterias (BAC), el cual está basado en el bien estudiado factor o plásmido F responsable del proceso natural de conjugación en *E. coli* (Willetts y

Skurray, 1980). El factor F codifica para genes que regulan la replicación (*OriS*, *RepE*) y que controlan el número de copias del plásmido a 1 o 2 por célula (*parA* y *parB*). Así la replicación del factor F es estrictamente controlada y el plásmido F es mantenido en bajo número de copias en el sistema de Shizuya, reduciéndose el potencial de combinación para producir quimeras entre fragmentos llevados por el mismo plásmido. El factor F puede llevar inserto DNA bacterial y es capaz de mantener fragmentos tan largos como 1 Megabase. Basándose en el factor F se creó el vector BAC pBAC108L (Shizuya *et al.*, 1992) que ofrece algunas ventajas respecto a otros sistemas de clonación; La transformación de bacterias por electroporación es de 10 a 100 veces más eficiente que la de levaduras. Se pueden utilizar los métodos tradicionales como “colony lift” e hibridación para el “screening” aún cuando se trata sólo de una o dos copias del plásmido por célula. A diferencia de las YAC’s que son lineales, las BAC’s con el inserto existen como un plásmido superhelicoidal en *E. coli*. lo cual permite una fácil extracción y manipulación del DNA. Un juego de genes del plásmido F es suficiente para mantener establemente el DNA extraño BAC en la bacteria (Shizuya, 1992).

Aunque algunas clonas de cualquier genoteca de DNA genómico pueden mostrar inestabilidad en el huésped debido a la actividad de recombinación de ciertas secuencias específicas de DNA, el uso de cepas de bacterias mutantes adecuadas puede reducir los problemas de inestabilidad. Shizuya *et al.*, utilizaron cepas bacterianas basadas en la cepa *E. coli* DH10B (Gibco BRL) que son capaces de ser transformadas con fragmentos largos de DNA pues son deficientes en el mecanismo de restricción-modificación controlado por el huésped (gen *hsdMRS*), restricción sensible a metilación (*mcrABC*, *mrr*) y varios tipos de recombinación general (*recBC*, *sbcBC*, *rec A*) (Shizuya *et al.*, 1992). El sistema de BAC ha sido la herramienta para hacer grandes mapas físicos, para posicionar a los genes afectados en ciertas enfermedades y para la secuenciación de genomas completos como el Proyecto del Genoma Humano y la secuenciación del genoma de ratón (Shaying, 2001).

Para investigar las funciones y expresión de proteínas, son necesarias herramientas de genómica funcional para la manipulación del DNA clonado en las BAC’s. Algunos métodos *in vitro* de manipulación genética y de recombinación estándar, dependen del corte del DNA con enzimas de restricción, purificación de fragmentos, unión de los nuevos DNA’s con la enzima DNA-ligasa y transformación con las clonas obtenidas a células

competentes. Otros métodos de manipulación genética se basan en el sistema de “recombinación homóloga” que ocurre naturalmente, por ejemplo, durante la reparación de DNA dañado (Campbell, 1984), o durante la infección de un profago (Skalka, 1977). Hoy se entiende que, “la recombinación homóloga es el proceso de intercambio de DNA entre dos moléculas a través de regiones de secuencias idénticas” (Court, 2002). La manipulación de DNA por recombinación homóloga hace posible que genes reporteros, como *lacZ* (que codifica para la proteína β -galactosidasa) o *GFP* (proteína verde fluorescente), puedan ser incorporados a una región específica de un gen, reportando así la actividad transcripcional de dicha región.

Un avance significativo para la manipulación de DNA por recombinación homóloga *in vivo* fue provisto por Zhang *et al.*, (1998) quienes desarrollaron el plásmido pBAD-ET γ y mostraron la posibilidad de modificar DNA exógeno en *E. coli* usando las proteínas de recombinación Rec E y Rec T. Por otro lado Murphy (1998), utilizó las funciones de recombinación de las proteínas del fago λ provistas en un plásmido para promover el reemplazo de genes en *E. coli*. En este trabajo reemplazaron el operón *recBCD* cromosomal de *E. coli* con los genes *exo* y *bet* del fago λ y así demostraron que el sistema de fagos tiene la ventaja de poder catalizar una recombinación eficiente con regiones de secuencias homólogas largas. Muyrers, *et al.*, (1999), modificaron el plásmido pBAD-ET γ sustituyendo a las proteínas Rec E y Rec T por las que cumplen la función equivalente en el fago λ , extendiendo así su uso para la recombinación de moléculas de clonas BAC, y aumentando la eficiencia de recombinación homóloga específica de 1 a 3 veces. Este sistema funciona aún en ausencia de RecA que es una proteína esencial para la recombinación generalizada en *E. coli*. Esta es una ventaja extra, dado que la acción de RecA puede generar recombinaciones o rearrreglos no deseados dentro de las extensas regiones genómicas de las clonas BAC's (Court *et al.*, 2002).

En el fago λ (Fig. 5) se encuentra el operón p_L , en el que se localizan los genes del sistema de recombinación “RED” *exo*, *bet* y *gam* (proteínas Exo, Beta y Gama) que son expresados tempranamente en la infección del fago o después de la inducción del profago. En el profago, el promotor p_L es directamente reprimido por el represor CI, y aún removiendo al represor la expresión de los genes es inicialmente prevenida por un terminador de la transcripción. La proteína N de λ modifica a la RNA polimerasa para

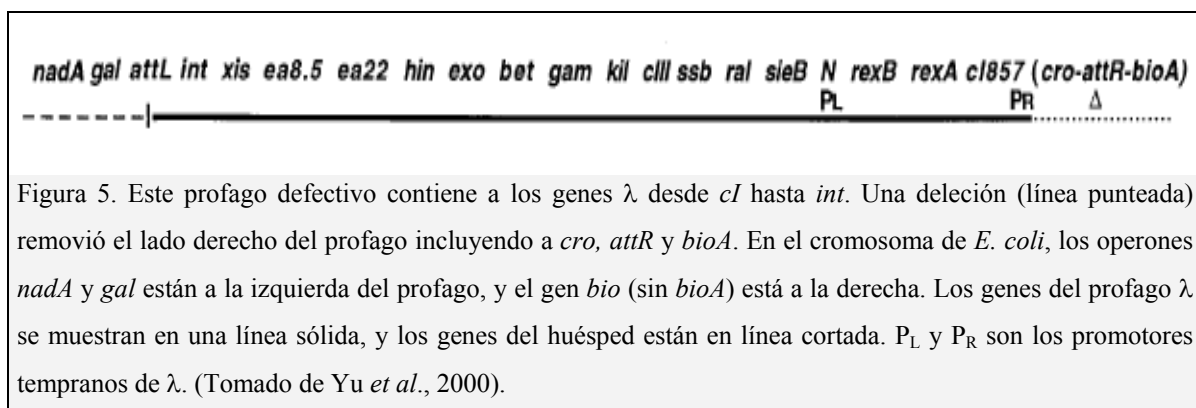
prevenir la terminación de la transcripción permitiendo así la expresión de los genes *exo*, *bet* y *gam* (Court *et al.*, 2002).

La proteína Exo funciona uniéndose a DNA de doble cadena (dsDNA) lineal, y se desliza sobre la cadena terminal 3' para cortar mononucleótidos de la cadena 5', permaneciendo unida al DNA y dejando intacto el extremo 3' saliente. Resulta así un corte en dirección 5'-3' que deja un DNA de cadena sencilla (ssDNA) lineal (Kovall y Matthews, 1997). La proteína Beta se liga establemente al ssDNA y lo protege del ataque de las nucleasas de cadena sencilla, además promueve el emparejamiento o alineamiento entre cadenas complementarias de ssDNA. Es razonable que Exo y Beta actúen cooperativamente pues cuando Exo degrada el extremo 5' de un dsDNA para exponer el extremo 3', Beta es capaz de ligarse y promover la recombinación (Cassuto y Radding, 1971). Una de las funciones de la proteína Gama es unirse a la subunidad RecB de la nucleasa bacteriana RecBCD formando así el complejo RecBCD-Gam, e inhibiendo la función de destrucción de cualquier dsDNA lineal (Karu *et al.*, 1975).

Recientemente Yu *et al.*, (2000) utilizaron un sistema con la función del sistema RED del fago λ para recombinar *in vivo* el cromosoma de *E. coli* con un cassette lineal de dsDNA con una secuencia sustrato. El sistema está basado en un profago λ defectivo desarrollado para la expresión de los genes, *exo*, *bet* y *gam*. Estos genes son llevados como una copia sencilla en el genoma de la bacteria y son expresados a partir del promotor P_L de λ . La expresión es regulada por el represor sensible a temperatura λ cI₈₅₇ (Fig. 5). A 32°C el represor se encuentra bloqueando al promotor P_L , y la inactivación del represor se hace por un cambio transitorio de temperatura a 42°C, permitiendo así la inducción de los genes *exo*, *bet* y *gam*. Es importante mencionar que la recombinación es eficiente con homologías tan cortas como 30-50 pb, haciendo posible usar fragmentos amplificados por PCR como cassettes de recombinación sitio-dirigidos (Yu *et al.*, 2000).

Este sistema, en donde los genes *exo*, *bet* y *gam* están en un profago, puede ser de 50 a 100 veces más eficiente que el sistema de proteínas Rec E y Rec T, en donde la función de recombinación homóloga se expresa a partir de un plásmido (Muyrers *et al.*, 1999).

DESCRIPCIÓN DEL PROFAGO λ SOBRE EL CROMOSOMA DE *E. coli*.



Swamitathan, *et al.*, (2001) utilizaron al sistema de recombinación RED para modificar clonas BAC describiendo el uso de un método en dos pasos para generar cambios en el DNA como una delección, una inserción, cambio de bases o mutaciones puntuales. El primer paso consiste en introducir un marcador de selección positiva en la región de interés (resistencia a algún antibiótico), junto con un marcador de selección negativa (Contra-selección), como el gen *SacB* de *B. subtilis*, el cual es letal para *E. coli* en presencia de sacarosa (Blomfield *et al.*, 1991). En el segundo paso, un cassette de DNA de doble cadena que contiene la mutación deseada es dirigido a la misma región, y las bacterias recombinantes que incorporaron el nuevo marcador son seleccionadas por perder el marcador de selección negativa.

Ahora estamos en una nueva era de la Biología, la ingeniería genética que se hace utilizando funciones de recombinación codificada por fagos a través de regiones cortas de homología en el DNA ha sido llamada “Recombineering” (Court, *et al.*, 2002), y puede ser usada para subclonar directamente DNA en un vector (como clonas BAC) sin la necesidad de enzimas de restricción y ligasas. A diferencia de las técnicas clásicas de ingeniería genética, la “Recombineering” no requiere de la construcción de plásmidos o fagos intermediarios que lleven los segmentos homólogos preconstruidos. Todo lo que se necesita *in vitro* es la síntesis de oligonucleótidos que provean la homología a las regiones buscadas, los cuales pueden ser usados directamente, o para construir productos de PCR de manera que el fragmento de DNA con el que se desea modificar, quede flanqueado por sitios de homología de 30 a 50 pb que le permitan recombinar con la secuencia blanco. De esta manera, un gen marcador o reportero puede ser incorporado a una región específica

con la única condición limitante del tamaño del DNA a ser amplificado por PCR y la fidelidad de la amplificación.

En el presente trabajo se siguió una estrategia para modificar a los genes de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x por medio de recombinación homóloga utilizando al sistema RED del fago λ , para así obtener modelos para la búsqueda de sus elementos de regulación genética. Específicamente el trabajo se realizó utilizando clonas BAC de ratón con regiones genómicas controladas por los promotores transcripcionales de $Na_v1.7$ y de Na_x , para introducir el gen reportero *lacZ* a dichas regiones. Con el análisis de construcciones de este tipo se hace posible, mediante transfecciones en modelos celulares, saber qué moléculas están implicadas en la expresión de los canales Na_x y $Na_v1.7$, al interactuar con las diferentes regiones genómicas contenidas en lo extenso de las clonas BAC. Además, la localización contigua de los genes de los canales $Na_v1.7$ y Na_x en el genoma de ratón y de humano (García-Villegas *et al.*, 2001), el hecho de que sus promotores transcripcionales compartan características importantes (López-Juárez *et al.*, 2002), y que su patrón de expresión tejido-específica sea preferente en Ganglio de Raíz Dorsal (García-Villegas, 2002), hace de estos dos canales un modelo interesante para estudiar su regulación genética en conjunto y por separado. La función y expresión de los NaCh $Na_v1.7$ y Na_x es un estudio necesario pues ambos canales tienen papeles trascendentes en diferentes campos del conocimiento humano como la biofísica, biología del desarrollo, neurociencias, etc., y por que así se pueden sentar las bases para el desarrollo de nuevas drogas y aplicaciones terapéuticas en el área de la farmacología.

OBJETIVO GENERAL

Modificar por recombinación homóloga del sistema RED a clonas BAC de ratón que contienen a los genes de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x .

Objetivos Particulares:

Utilizar al sistema de recombinación homóloga RED para generar las siguientes modificaciones en las respectivas clonas BAC:

-Insertar al gen reportero *LacZ* en el exón 1 del gen del canal de sodio $Na_v1.7$ de manera que quede regulado por los elementos de expresión del gen de $Na_v1.7$ presentes en la clona B126neo.

-Insertar al gen reportero *LacZ* al inicio de la región codificante del gen del canal de sodio Na_x de manera que quede regulado por los elementos de expresión genética del gen de Na_x .

-Insertar al gen de resistencia a neomicina (*neo*) (marcador de selección positiva) en el vector de la clona BAC NaG1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas: Las cepas bacterianas de *E. coli* utilizadas en el presente trabajo se describen en la tabla 3.

TABLA 3: CEPAS BACTERIANAS

Nombre	Genotipo	Referencia o fuente
DH 5 α	F ⁻ ϕ 80dlacZ ϕ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> .	Hanahan D. (1983) (Gibco BRL)
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>nupG</i> λ ⁻ <i>tonA</i>	Grant S. <i>et al.</i> , (1990) (Gibco BRL)
DY380	Isógena de la DH10B: RED (λ cI 857), <i>cro-bioA</i> \diamond <i>Tc</i> ^R	Lee <i>et al.</i> , 2001
DYRG	Isógena de la DY380: <i>Tc</i> ^R \diamond <i>Ap</i> ^R	García-Villegas M.R. (datos no publicados)
NC397	RED (λ cI 857), prom. <i>lacZ</i> \diamond <i>Cm/sacB. Km</i> ^R <i>Cm</i> ^R <i>SacB</i> .	Court D. (datos no publicados)
NCLJ	Isógena de la NC397; <i>Cm</i> ^R \diamond <i>Ap</i> ^R	Presente trabajo.
La construcción de la cepa NCLJ se describe en este trabajo. \diamond : indica substitución		

Todas las cepas utilizadas en este trabajo, excepto DH10B y DH5 α , fueron crecidas a 32°C dado que son termosensibles por la presencia de un profago λ (*CI*₈₅₇).

Clonas BAC (Cromosomas Artificiales de Bacterias): La localización y tamaño de las regiones genómicas de ratón que guardan las clonas BAC B126neo, B71neo y BNaG1 utilizadas en este trabajo, se describe en la Figura 6. Estas clonas fueron identificadas a partir de la genoteca de clonas BAC de la empresa “Incyte genomics” utilizando sondas amplificadas por PCR específicas de los canales Na_v1.7 y Na_x. A las clonas B126neo y B71neo se les introdujo el gen *neo* en la región del vector (García-Villegas, 2001). El vector de clonación de las clonas BAC es el pBeloBAC11 desarrollado por Simon y

Shizuya en 1992 (<http://www.wheat.pw.usda.gov/homepage/lazo/methods/bac/BACVEC.html>, No. Gene Bank U51113) a partir del plásmido pBAC108L (Shizuya *et al.*, 1992).

Todas las clonas BAC llevan el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^R) en la región del vector, y fueron adquiridas en la cepa *E. coli* DH10B.

MAPA DE LAS CLONAS BAC QUE CONTIENEN A LOS GENES DE LOS NaCh Na_x y $Na_v1.7$

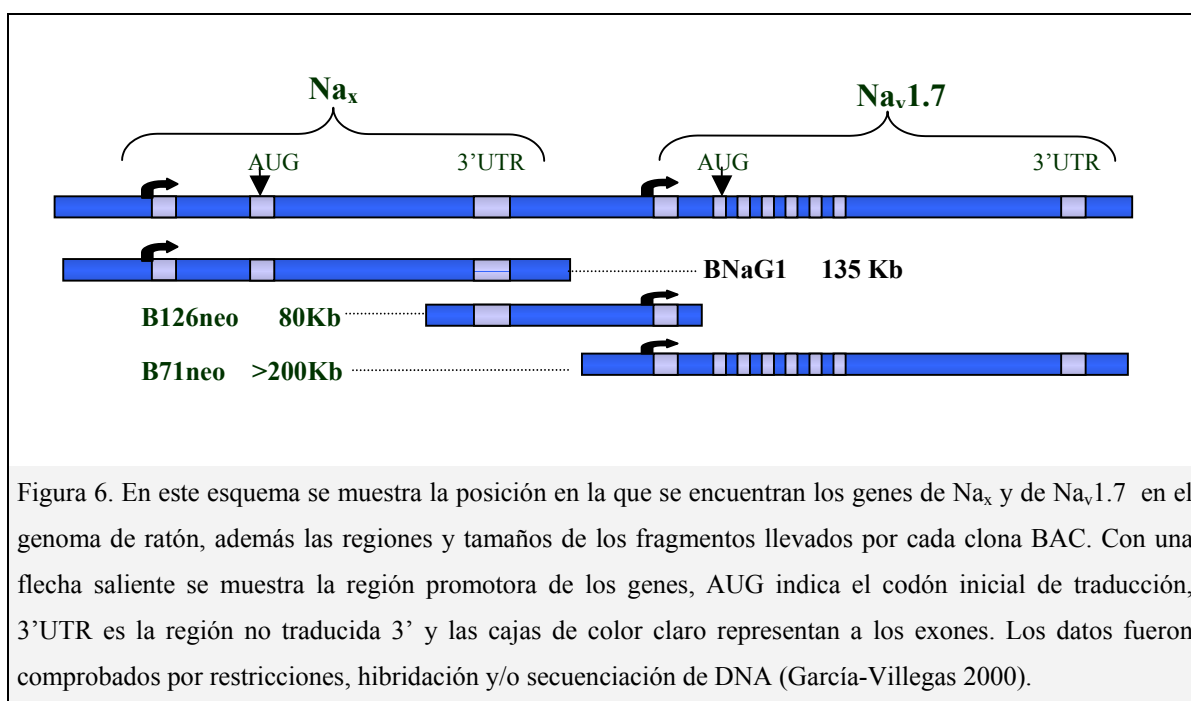


Figura 6. En este esquema se muestra la posición en la que se encuentran los genes de Na_x y de $Na_v1.7$ en el genoma de ratón, además las regiones y tamaños de los fragmentos llevados por cada clona BAC. Con una flecha saliente se muestra la región promotora de los genes, AUG indica el codón inicial de traducción, 3'UTR es la región no traducida 3' y las cajas de color claro representan a los exones. Los datos fueron comprobados por restricciones, hibridación y/o secuenciación de DNA (García-Villegas 2000).

Plásmidos: Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4.

TABLA 4. PLÁSMIDOS.

Plásmido	Datos relevantes	Referencia
pBR322	Ap^R y Tc^R	Bolívar <i>et al.</i> , 1977 (Obtenido de New England Biolabs)
pCMV β	Expresa <i>LacZ</i> en células de mamíferos partir del promotor de citomegalovirus. Señal de poliadenilación de SV40. Ap^R	MacGregor y Caskey 1989, 1987 (Obtenido de Clontech)
pBlue Script II SK +	Ap^R	Short <i>et al.</i> , 1988, Altling-Mees 1989, (Obtenido de Stratagene).
p6S58	Fragmento de 11 kb correspondiente al final del exón 1 y principio del intrón 1 del gen de $Na_v1.7$ clonado en el sitio Sac I del vector pBlueScript II SK+, Ap^R (Fig. 9).	García-Villegas (Datos no publicados).
pNaG1	Fragmento de 1086 pb que contiene al exón 2 del gen de Na_x amplificado por PCR y clonado en el vector pCR2.1 (Invitrogen).	García-Villegas 2001.
pCR2.1	T-vector para clonación de fragmentos de PCR Ap^R , Km^R .	(Obtenido de Invitrogen).
pBV-BBNeo	Cassette PGK/Tn5neo clonado en el vector pBV-Belo-interm. Km^R , Ap^R	García-Villegas (Datos no publicados).
pBSA126	Región de 553 pb de la región 5' del final del exón 1 del gen de $Na_v1.7$, clonada en el sitio EcoRI del plásmido pBlue Script II SK +.	García-Villegas (Datos no publicados).

Medios de cultivo: La composición de los medios (por litro) fue la siguiente:

- ✦ Luria-Bertani (LB): 10g. de triptona, 5g. de extracto de levadura, 10g. de NaCl, 15g. de agar (sólo en el caso de medio sólido). El pH fue ajustado a 7 con ~0.2 ml de NaOH 5N y se esterilizó por autoclave.
- ✦ 2XYT: 16g. de triptona, 10g. de extracto de levadura, 5g. de NaCl. El pH fue ajustado a 7 con NaOH 5N y se esterilizó por autoclave.
- ✦ Medio mínimo M9: 6g Na_2HPO_4 , 6g de KH_2PO_4 , 0.5g NaCl, 1g NH_4Cl . Después de la esterilización por autoclave se añadió 1 ml de $MgSO_4$ 1M y 10 ml de $CaCl_2$ 0.01M, (ambos previamente esterilizados por filtración en membrana).

✦ Medio mínimo M63 (Pardee, *et al.*, 1959 citado por Miller, 1992): 13.6g. de KH_2PO_4 , 2g. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5mg. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se ajustó el pH a 7 con KOH y se esterilizó por autoclave. Se le agregó 1 ml de MgSO_4 1M y 10 ml de CaCl_2 0.01M (ambos estériles). Para el crecimiento de la cepa NC397, se añadió 0.2 % de glicerol, 0.0001% de biotina y $2\mu\text{g}/\text{ml}$ de tiamina. Para la selección de bacterias DY380 SacB^- , se agregó al medio 0.05% de casaminoácidos y 5% de sacarosa.

Métodos de obtención, manipulación y corte de DNA

✦ Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina (MINIPREP): Este protocolo es una modificación del citado por Sambrook y Davidl (2001), y se utilizó para la obtención de DNA de plásmidos y de clonas BAC.

Se transfirió una colonia bacteriana a 5 ml de medio de cultivo rico (LB o 2XYT) con el antibiótico adecuado (gen de resistencia en su genoma, plásmido o BAC), y se creció a 37°C o a 32°C con agitación toda una noche. Se enpastillaron en un tubo Eppendorf los 5 ml del cultivo y se resuspendieron en 200 μl de solución I (por litro: 9g de Glucosa, 25ml de Tris 1M pH 8, 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8) fría. Se agregaron 400 μl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) recién preparada, se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 4 minutos. Se agregaron 300 μl de solución III estéril fría (para 100 ml: 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético y 28.5 ml de H_2O desionizada [dH_2O]), y se mezcló por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos y se transfirieron cuidadosamente 800 μl del sobrenadante a un tubo limpio. La precipitación del DNA se hizo agregando 480 μl de isopropanol, mezclando y esperando 15 minutos para centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se dejó secar al aire durante 5 minutos para después disolverla en 50 μl de dH_2O estéril.

✦ Extracción de DNA cromosomal bacteriano (Owen y Pitcher, 1985). Este protocolo se utiliza con bacterias Gram negativas. Se enpastillaron las bacterias crecidas durante una noche a partir una sola colonia cultivada en 5 ml de medio líquido con el antibiótico adecuado y con agitación. Se lavó la pastilla con 1XSE (150mM NaCl, 100mM EDTA pH 8) y se resuspendió en 480 μl de buffer SET (150mM NaCl, 15 mM de EDTA, 60 mM de Tris-HCl, pH 8.3) con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa A. Se agregó SDS a concentración final de 1 % y se incubó a 37°C por 15-30 min. Se agregó proteinasa K a concentración final de

50µg/ml, e incubó 30 minutos a 37° C. Se agregaron 500µl de cloroformo, y se centrifugó a máxima velocidad por 15 min. La fase acuosa se mezcló con ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y el DNA se precipitó con 0.54 volúmenes de isopropanol, se centrifugó por 1 min. y la pastilla se lavó con etanol 70% para después resuspenderla en 50 µl de dH₂O.

✦ Extracción de DNA con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sambrook y Davidl, 2001): Se llevó la muestra a un volumen de 200 µl con dH₂O y se agregaron 20 µl de acetato de sodio (se usan otras sales según la purificación). Se agregaron 220 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezclaron y se centrifugó a velocidad máxima por 5 min. Se recuperó solo la fase acuosa y se le agregaron 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa con el DNA se separó y precipitó agregando dos volúmenes de etanol absoluto y 10 µl de glucógeno como “acarreador” para facilitar la precipitación del DNA, se dejó 30 min. a -20° C. Se centrifugó 5 min. a máxima velocidad, y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol 70%. El DNA se resuspendió en 20-50 µl de dH₂O estéril.

✦ Corte con enzimas de restricción: El DNA suficientemente puro se cortó con 3u de enzima por cada µg de DNA, utilizando el buffer, temperatura y tiempo de corte, que indica el proveedor.

✦ Electroforesis de DNA en gel de agarosa: Se utilizaron geles de agarosa al 0.8 y 1.3 % para separar las moléculas de DNA en una cámara en electroforesis con buffer TAE 1X (40mM de Tris-acetato, y 1mM EDTA a pH 8) y EtBr 0.5 µg/ml. Como marcador de peso molecular se utilizaron las escaleras de 1 kb y de 100 pb (Gibco BRL) y se tomaron fotos del DNA teñido, expuesto a un transluminador de luz UV utilizando un equipo GeneSnap-Singene GVM 20.

✦ Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa: Se utilizó el kit “Prep-a-Gene” (Bio-Rad No. Cat:732-6010). Se disolvió el trozo del gel que contenía el DNA en 3 volúmenes de binding-buffer durante 5 min a 50° C, se agregaron 5 µl de “matriz” por cada µg de DNA y se incubó durante 10 min para que el DNA se uniera a la matriz. Se enpastilló la matriz y se lavó dos veces con 125 µl de “wash-buffer”. El DNA se separó de la matriz agregando 125µl de buffer de elusión, centrifugando y recuperando el sobrenadante con el DNA puro.

Oligonucleótidos: La secuencia de los oligonucleótidos (oligos) utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 5.

Todos los oligos fueron diseñados utilizando de 40 a 50 nt de homología a la región de la clona BAC a donde se dirigió la recombinación, seguidos de 20 a 25 nt (funcionan como “primer” de polimerización para PCR) de homología al gen que se amplificó para producir el cassette de recombinación. En cada cassette se diseñaron dos oligos para la amplificación por PCR, un oligo 5’ en sentido (F) y otro en 3’ o antisentido (R).

TABLA 5. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS CASSETTES DE RECOMBINACIÓN

Nombre	Secuencia de nucleótidos en dirección 5’- 3’
Nav-Tc(F)	<i>AAAGAAGCCTGGGAAGAGAGGAAGACTTCCCTTGGATCAGAATCCGCAGG</i> GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATC
Tc-Nav (R)	<i>AAAAAAAAAAGACTTTCCTGACCTGGCCCCACGGATCATGCCACCCGGT</i> GACAGGAGCACGATCATGCGCACCC
Cm-Ap(F)	<i>AAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAAC TTT</i> AGAGTTGGTAGCTCTTGATC
Ap-SacB (R)	<i>ACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCC</i> CATTCAAATATGTATCCGCTC
Nav-ApSB (F)	<i>GTAAGGATCCGAAGGGGAAATAAAACCTACAGGATGAGAAGATGGCGATG</i> CGCCCGCCATAAACTGCCAGGAATT
ApSB-Nav (R)	<i>CGTTGTTCAATGAGGGCAAGGGACTGTTTTGTGAAGTGAACGAAGCTCTG</i> ATCAAAGGGAAAACCTGTCCATATGC
Nax-ApSB (F)	<i>ATGGCCATATTTTACACATTTACTATTTTACAGGTATAAAACCGAAAATG</i> CGCCCGCCATAAACTGCCAGGAATT
ApSB-Nax (R)	<i>TGATTTTCTATAAGTTCAAGTGAAGTCTGTTGTAAATGGGACAAGGCCCT</i> TATCAAAGGGAAAACCTGTCCATATGC
Nax-LacZ (F)	<i>ATGGCCATATTTTACACATTTACTATTTTACAGGTATAAAACCGAAAATG</i> TCGTTTACTTTGACCAACAAGAACG
LacZ-Nax (R)	<i>TGATTTTCTATAAGTTCAAGTGAAGTCTGTTGTAAATGGGACAAGGCCCT</i> GGTCGACTCTAGAGGATCCGAAAA
Los nucleótidos en letras cursivas son homólogos a la región blanco de recombinación, y los nucleótidos en letras negras corresponden a la región de homología de los extremos del gen a amplificar por PCR.	

Los oligos diseñados fueron sintetizados por Invitrogen o Sigma a una escala de síntesis de 50 nmoles y para ser utilizados en la PCR fueron tratados según el protocolo E-T cloning (Stewart, 2001) descrito a continuación:

✦ Purificación de oligonucleótidos de más de 50nt: La finalidad de este procedimiento es purificar al oligo de los sustratos de síntesis y que de esta manera no interfieran en la reacción de PCR.

El oligo en polvo (50 nmol) se disolvió en 500µl de H₂O MilliQ. Se tomaron 100 µl de esta solución y se agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 7.5 y 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló en el vortex por 30 seg., se centrifugó a máxima velocidad por 3 min. y se recuperó la fase acuosa a la que se le agregaron 360µl de etanol absoluto. Se incubó a -80°C por 10 min. y se centrifugó por 5 min. Posteriormente se desechó el sobrenadante, y la pastilla se lavó con etanol al 70%. Se secó la pastilla al aire por 10 min. y se resuspendió en 100µl de H₂O milliQ estéril.

Amplificación de los cassettes lineales de recombinación: Para la amplificación de todos los cassettes de recombinación fueron utilizadas condiciones estándar para PCR (Tabla 6), utilizando una mezcla de reacción de PCR con las siguientes concentraciones: 39.25µl de dH₂O, 5.0µl de buffer 10X para la enzima correspondiente, 1.25µl de dNTP's 10mM, 1.5µl de oligo (F), 1.5µl de oligo (R), 1.0µl de DNA molde (2ng/µl), 0.5µl de la enzima DNATaq polimerasa 5 U/µl (Roche), o "Expand high fidelity PCR system" 5 U/µl (Roche). Después de la reacción los productos fueron purificados utilizando la columna "QIAquick PCR purification kit 50" (Quiagen No. Cat. 28104), y fueron tratados con 20u de la enzima DpnI (Roche) por 1 hr. a 37°C, para digerir el DNA molde de la reacción. Posteriormente se purificaron por una extracción fenol-cloroformo y se resuspendió en H₂O MilliQ.

✦ Cassette Nav-286Tc812: El cassette Nav-286Tc812 fue obtenido por la restricción del plásmido p6S58-Tc con las enzimas SacI y AseI, y después purificando el fragmento de 2576 pb de un gel de agarosa al 0.8%.

✦ **Cassette PGK/Tn5neo:** El cassette PGK/Tn5neo fue obtenido por la restricción del plásmido pBV-BBNeo con la enzima Sal I, y purificando el fragmento de 4 Kb, a partir de un gel de agarosa al 0.8%.

TABLA 6. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS CASSETTES DE RECOMBINACIÓN

Cassette de recombinación.	Oligos	DNA Molde	Tiempo y Temp. de reacción			No. de ciclos	Tamaño del producto
			Desnaturalización	Alineamiento	Polimerización		
Nav-Tc	Nav-Tc (F) Tc-Nav (R)	PBR322	94°C 30 seg.	60°C 1 min.	72°C 2 min.	30	1578 pb
Nc-Cm Cm ↔ Ap	Cm-Ap (F) Ap-SacB (R)	pBSIISK+	94°C 30 seg.	60°C 1 min.	72°C 2 min.	30	1282 pb
Nav-ApSB	Nav-ApSB(F) ApSB-Nav (R)	NCLJ*	94°C 30 seg.	60°C 1 min.	68°C 3 min.	30**	3636 pb
Nax-ApSB	Nax-ApSB(F) ApSB-Nax (R)	NCLJ*	94°C 30 seg.	60°C 1 min.	68°C 3 min.	30**	3636 pb
Nax-LacZ	Nax-LacZ(F) LacZ-Nax (R)	pCMVβ	94°C 30 seg.	60°C 1 min.	68°C 3 min.	30**	3473 pb

Antes del primer ciclo de la reacción, el DNA se desnaturizó a 94°C por 5 minutos.
Al finalizar los ciclos se dejó un periodo de polimerización de 7 min.
* El DNA molde fue DNA cromosomal de la cepa NCLJ linearizado con la enzima XhoI.
* * A partir del ciclo 11 se agregaron 5 segundos de polimerización por cada ciclo adicional.

Recombinación: Para introducir al gene marcador o al reportero en la región blanco a la cual se dirigieron los cassettes de recombinación, se siguió la metodología de recombinación homóloga del sistema RED de Yu *et al.*, (2000). La cepas huésped del sistema RED (DY380, DYRG ó NC397) llevan la región blanco de recombinación de los cassettes en su genoma (NC397), en un plásmido (p6S58) o en una clona BAC (B71neo, B126neo o BNaG1) como se detalla en la Tabla 7.

En una centrifuga (Beckman J2-MC) estabilizada a 4° C se centrifugaron los 10 ml de bacterias (8 min., 7000 rpm), y se resuspendieron en 1 ml de dH₂O estéril a 4°C. Las bacterias se transfirieron a un tubo Eppendorf para ser lavadas 3 veces (centrifugando y resuspendiendo a 4°C) con 1 ml de dH₂O estéril. Después del lavado final la pastilla se resuspendió en 100µl de H₂O estéril a 4° C.

✦ Electroporación: En una celda de electroporación de 0.1 cm (Bio-Rad Cat 165-2089) fría, se agregaron 100 ng de DNA del cassette de recombinación indicado para la recombinación planeada. En la recombinación del cassette Nav-Tc con el plásmido p6S58 se agregaron 600ng del plásmido siguiendo una relación molar 3:2 de cassette:plásmido respectivamente. Posteriormente se agregaron 50 µl de las bacterias electrocompetentes e inmediatamente se electroporaron utilizando un electroporador “Micropulser” (Bio-Rad No. Cat: 165-2100) a un voltaje de 1.8 kV con un set controlador de 200 ohms, en un tiempo constante mayor a 5 mseg (condiciones citadas por Yu *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2001). Inmediatamente después, las bacterias se llevaron a 1 ml de medio LB, y se incubaron a 32° C por 1-2 hora con agitación para la recuperación de las bacterias. Cuando se electroporó con los cassettes Nax-ApSB y NaxLacZ la recuperación de las bacterias se hizo resuspendiendo en 10 ml de medio LB. Cuando se electroporó para introducir DNA de clonas BAC no se indujo a la expresión del sistema RED y se electroporó a 2.5 kV.

Para seleccionar a las bacterias recombinantes, las bacterias electroporadas se concentraron por centrifugación y alícuotas de 20% a 30% del cultivo se sembraron en cajas con el medio selectivo adecuado para cada ensayo (Tabla 8). Se sembró también una alícuota en medio no selectivo para determinar el número de células viables después de la electroporación. Se incubaron a 32° C.

En la selección de las recombinantes con fenotipo SacB⁻ (reemplazo de *Ap-SacB* por *lacZ*), las bacterias electroporadas después de la recuperación fueron lavadas 3 veces con medio mínimo M9. Después se sembraron alícuotas de 20% del cultivo, de diluciones 10⁻¹ y 10⁻² en medio mínimo M63-Sacarosa 5%. Además en este ensayo se llevó un control de bacterias en donde se indujo la expresión del sistema RED pero se electroporó solo con dH₂O.

TABLA 8. CONDICIONES PARA SELECCIÓN DE RECOMBINANTES

Recombinantes	Medio	Antibiótico	Incubación
DYRG/B71 neo -Tc	Luria-Bertani	Tetraciclina (10 µg/ml)	1 día 32° C
DYRG/B126 neo -Tc			
DYRG/p6S58-Tc			
DYRG/B126 neo - 286Tc812			
DYRG/B71 neo -ApSB	Luria-Bertani	Ampicilina (50 µg/ml)	1 día 32° C
DY380/BNaG1-ApSB			
NCLJ			
DY380/BNaG1-LacZ	Medio mínimo M63- Sacarosa 5%	Kanamicina (12.5 µg/ml) (no selectivo para recombinantes)	2-3 días 32° C

Análisis de recombinantes por hibridación tipo Southern Blot:

✦ Transferencia del DNA a membranas de nylon: Por el método de miniprep, se extrajo el DNA de colonias aisladas que crecieron en medio selectivo después de la recombinación, y este DNA fue cortado con una enzima de restricción adecuada para obtener fragmentos de tamaño conocido con los cuales poder discriminar a las clonas en las que ocurrió la inserción del cassette en el sitio planeado. Los fragmentos de DNA obtenidos fueron separados por tamaño durante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, utilizando marcador de peso molecular como referencia de migración de los fragmentos y tomando una foto para registrar la distancia de migración de los distintos fragmentos de DNA. El gel fue lavado con HCl 0.25 N durante 10 minutos y posteriormente con NaOH 0.4 N por 20 minutos. El DNA se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer) puesta encima del gel. Los fragmentos de DNA fueron arrastrados hacia la membrana con una solución de NaOH 0.4 N la cual subió por capilaridad desde el gel hasta una pila de papel absorbente situada encima de la membrana. Después la membrana de

nylon fue lavada con solución neutralizante (Tris 0.2 M pH 7.5-SSC 2X) durante dos minutos y el DNA fue fijado por entrecruzamiento por exposición a luz UV ($1200 \mu\text{j}/\text{cm}^2$).

En el caso de la selección de recombinantes con fenotipo SacB^- , se obtuvo un fondo muy elevado de colonias crecidas en el medio selectivo M63-sacarosa por lo que fue necesario analizar cientos de colonias. Cajas con 100 a 150 colonias de la dilución 10^{-1} fueron transferidas a membranas de nylon según el protocolo de “Colony lifting”; Una membrana de nylon (Boehringer) circular con referencias acerca de la orientación de las colonias en la placa, fue puesta sobre el medio para posteriormente levantar las colonias. La membrana se transfirió en forma secuencial a 3 papeles humedecidos, el primero con solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M), el segundo con solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1 M), y el último con 20X SSC, permaneciendo 5 minutos en cada uno sin que las colonias tocaran directamente el papel. Posteriormente el DNA fue fijado por entrecruzamiento exponiéndolo a luz UV $1200 \mu\text{j}/\text{cm}^2$. Los restos celulares de las bacterias se lavaron con 2X SSC.

✦ Marcaje radioactivo de sondas específicas de DNA por “Random primer”: Un fragmento de DNA con homología específica a la región modificada durante la recombinación homóloga, se utilizó como molde de síntesis de una sonda radioactiva de DNA utilizando el kit “Random primed DNA labeling” (Roche Cat:1004760). En la reacción se pusieron, $2 \mu\text{l}$ de mezcla de exanucleótidos en buffer 10 X, $3 \mu\text{l}$ de dNTP 0.5 mM (solo dATP, dTTP, dGTP), 30-50 ng del DNA molde, $1 \mu\text{l}$ de la enzima Klenow (Roche) y $5 \mu\text{l}$ de $\text{dCTP}\alpha^{32\text{P}}$ ($10 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; $3000 \text{mCi}/\text{mmol}$, Amersham Cat:A0005) aforando a $20 \mu\text{l}$ con H_2O MilliQ. La reacción se incubó 1 hr a 37°C y se llevó a un volumen de 0.1 ml con buffer TEN (10 mM tris-Cl pH8, 1 mM EDTA pH8, 100 mM NaCl) para después aplicarla a una columna de Sephadex-G50 y centrifugarla a 3100 rpm por 4 min. La columna de Sephadex-G50 se preparó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Davidl (2001). Con este procedimiento se separaron las moléculas de DNA que incorporaron el $^{32\text{P}}$ dCTP (que eluyeron de la columna) de los nucleótidos no incorporados.

Se midió la cantidad de radioactividad incorporada en la sonda sintetizada, registrando las cpm de una dilución 1/50 de la sonda; $2 \mu\text{l}$ de esta dilución se aplicaron a 1cm^2 de

papel filtro llevándolo a un vial con 5ml de líquido de centelleo “EcoLume” (ICN No Cat 882470). Las cpm incorporadas se midieron en un contador de centelleo Beckman 6000TA.

✦ Hibridación tipo Southern Blot: Para hibridar al DNA fijado en la membrana de nylon con la sonda radioactiva respectiva, se siguió el procedimiento siguiente: En un tubo de hibridación se incubó la membrana de nylon con 15 ml de la solución de hibridación (1.5X SSPE, 1% SDS, 0.5% de leche descremada) precalentada a 65°C, con 0.21 mg/ml de DNA de esperma desnaturalizado de salmón. Después de una hora se desechó esta solución y se agregaron 7 ml de solución de hibridación con 0.15mg/ml de DNA de esperma de salmón y 1×10^6 cpm/ml de la sonda radioactiva previamente desnaturalizada por ebullición durante 10 min. Esta reacción se incubó a 65° C por toda la noche en un horno de hibridación con rotación y después se hizo una serie de lavados; Una vez con 2X SSC, 0.1 % SDS durante 15 min. a temperatura ambiente, dos veces más con la misma solución pero a 65°C, y por último con solución 0.2X SSC, 0.1 % SDS durante 15 min. a 65° C.

La membrana se transfirió a un cassette de auto radiografía y se expuso por 12-48 hrs. con una película Kodak Biomax MS.

RESULTADOS

Para iniciar el estudio de las secuencias de DNA genómico implicadas en la regulación de la expresión de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x , se siguió una estrategia de recombinación homóloga para modificar clonas BAC que contienen a los promotores transcripcionales de estos genes. La estrategia de modificación de clonas BAC para introducir genes reporteros en sitios bajo la regulación de los promotores de los canales de sodio, consistió en dos pasos de recombinación homóloga. En el primer paso se trató de introducir en el lugar adecuado a un gen “marcador” de selección positiva como Tc^R ó Ap^R - $SacB$, y seleccionar a las bacterias recombinantes por su habilidad para crecer en medio con tetraciclina (Tc^R) o ampicilina (Ap^R) respectivamente. Después, en el segundo paso, se trabajó para reemplazar el primer gen “marcador” por el gen reportero $lacZ$ y hacer una selección negativa descartando bacterias que hayan conservado el primer marcador, con ácido fusárico que es letal para bacterias Tc^R o con sacarosa que es letal para bacterias $SacB^+$. La estrategia general utilizada se esquematiza en la Figura 7.

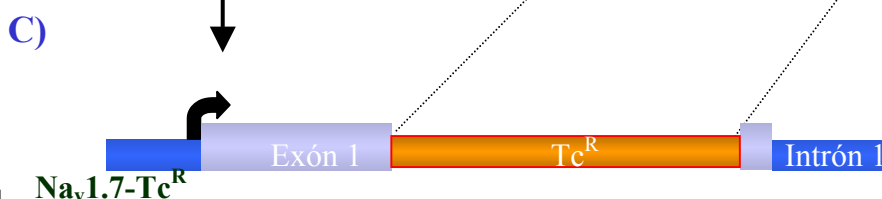
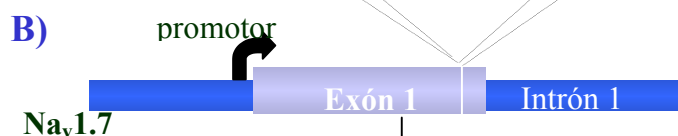
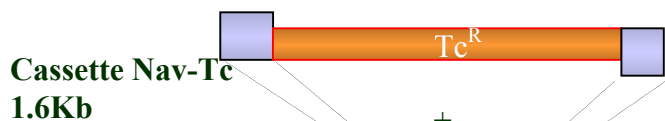
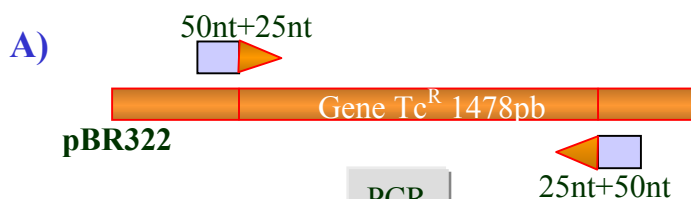
I. MODIFICACIÓN DE CLONAS BAC DEL NaCh $Na_v1.7$

La modificación genética de clonas BAC realizada en este trabajo se hizo con la idea de introducir al gen reportero $LacZ$ en las clonas BAC B126neo y B71neo que contienen al promotor del gen $Scn9A$ que codifica para el NaCh $Na_v1.7$ (ver figura 6). Con la obtención de las clonas BAC modificadas se tendría a la proteína β -galactosidasa reportando la actividad del promotor transcripcional del gen del canal $Na_v1.7$. Las clonas BAC modificadas se podrían utilizar para transfectar células en cultivo que expresen endogenamente al canal $Na_v1.7$ y se podría hacer un estudio funcional de la presencia de elementos o secuencias de regulación genética en una región genómica de aproximadamente 50 Kb hacia el 5' del gen $Scn9A$, todo el gen $Scn9A$ y 100 Kb hacia el extremo 3'. La estructura de las BAC's B126neo y B71neo se detalla en la figura 6.

En la figura 7 se resume la estrategia que se utilizó para introducir el gen $LacZ$ en la región del final del exón 1 del gen de $Nav1.7$.

ESTRATEGIA EN DOS PASOS PARA INTRODUCIR AL GEN REPORTERO *LacZ* BAJO LA REGULACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN DEL NaCh $Na_v1.7$.

Paso 1 INTRODUCIR EL GENE Tc^R



Confirmación de
la inserción
correcta de cada
cassete por
Southern Blot

E)

Recombinación RED
y selección de
recombinantes Tc^S



Paso 2 REMPLAZAR AL GENE Tc^R POR *LacZ*. SELECCIÓN NEGATIVA DEL MARCADOR Tc^R CON ACIDO FUSÁRICO

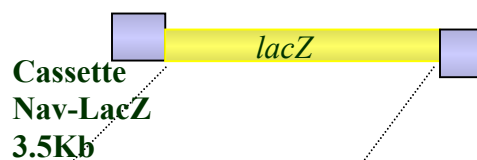
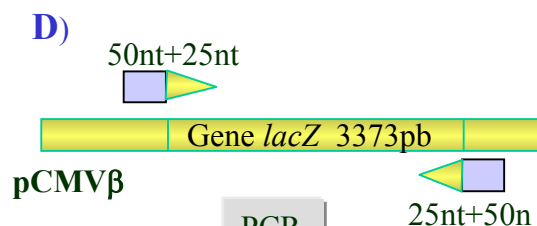


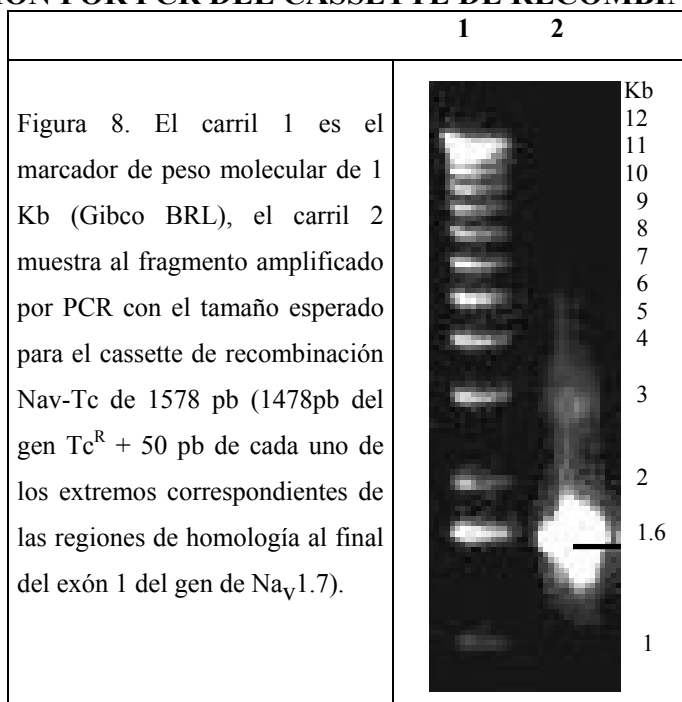
Figura 7. **A)** Se diseñaron oligos, con 50nt idénticos a la región blanco en Nav1.7 (\square) y 25 nt de homología a los extremos del gen Tc^R (\triangleright). Con ellos se sintetizó mediante PCR el cassette lineal de recombinación Nav-Tc tomando al plásmido pBR322 como molde de amplificación. El fragmento resultante contiene al marcador Tc^R flanqueado por dos regiones de 50 pb de homología al sitio blanco en el gen de $Na_v1.7$ (final del exón 1). **B)** Las bacterias portadoras del sistema RED y que contienen a las clonas BAC de $Na_v1.7$ se incubaron 15 min. a 42°C para inducir al sistema de recombinación RED, se hicieron electrocompetentes y se les introdujo por electroporación el cassette de recombinación Nav-Tc. **C)** Ocorre la recombinación entre secuencias homólogas del cassette y el sitio blanco en $Na_v1.7$ dando un fenotipo Tc^R capaz de ser seleccionado. **D)** De forma similar al primer cassette, se elaboró el cassette Nav-LacZ tomando como molde del gen $LacZ$ al plásmido pCMV β . **E)** Las bacterias recombinantes $Na_v1.7-Tc^R$ se inducen a la recombinación y se electroporan con el cassette Nav-LacZ. Si la recombinación entre secuencias homólogas ocurre, se reemplaza el gene Tc^R por el de $LacZ$ y se pueden seleccionar recombinantes Tc^S en cajas con ácido fusárico que es letal para bacterias Tc^R .

I. a. Introducción del marcador de selección negativa Tc^R en el exón 1 del gen de $Na_v1.7$

Como se muestra en el panel A) de la figura 7, para introducir al marcador Tc^R en el exón 1 del gen de $Na_v1.7$, se diseñaron dos oligonucleótidos (oligos) de 75 nt cada uno, con la finalidad de amplificar al cassette de recombinación lineal Nav-Tc (Ver tabla 6), y de esta manera dirigir la inserción del gen Tc^R a la secuencia deseada del final del exón 1 del gen del canal $Na_v1.7$.

Los oligos Nav-Tc (F) y Tc-Nav (R) (Tabla 5) se utilizaron como “primers” para amplificar por PCR el cassette lineal de recombinación Nav-Tc, tomando como molde de amplificación del gen Tc^R al plásmido pBR322 y siguiendo las condiciones descritas en materiales y métodos. El producto de la PCR mostró un tamaño acorde al esperado para una amplificación correcta del cassette, es decir, las 1478 pb de la región del gen Tc^R de pBR322 (amplificadas por las regiones de homología de los oligos a los extremos del gen Tc^R), + 50 pb que flanquean a la secuencia de Tc^R por cada lado, y que corresponden a la secuencia de homología 5' y 3' del final del exón 1 de $Na_v1.7$ (Figura 8).

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL CASSETTE DE RECOMBINACION Nav-Tc



Continuando con la estrategia para introducir al gen reportero *LacZ* bajo la regulación del promotor de Na_v1.7, se procedió a recombinar al cassette Nav-Tc con la clona BAC B71neo contenida en la cepa bacteriana DYRG (Tabla 3). Las bacterias DYRG/B71neo se crecieron a fase exponencial ($D.O_{600nm}=0.5$) a 32° C y se indujo la expresión del sistema de recombinación RED elevando la temperatura a 42° C durante 15 min. Posteriormente las bacterias se hicieron electrocompetentes y fueron electroporadas con el DNA del cassette Nav-Tc, como está detallado en materiales y métodos. Finalmente las bacterias viables se seleccionaron en cajas con medio LB con 12.5µg/ml de tetraciclina a 32°C, sin embargo sólo se observó el crecimiento de 5 colonias Tc^R en las bacterias en donde se indujo la expresión del sistema de recombinación RED, mientras que se observaron 8 colonias Tc^R en el control en donde no se indujo la expresión del sistema de recombinación RED, lo que indicó que el cassette Nav-Tc no recombinó con el DNA de las clonas BAC. Este experimento fue repetido observando el mismo resultado.

I. b. Inserción del cassette Nav-Tc en el plásmido p6S58.

Para descartar que la falta de recombinación del cassette Nav-Tc se debiera a algún problema técnico, se realizó un experimento para probar si la inducción del sistema de

recombinación RED en la cepa DYRG era eficiente, y si el diseño del cassette de recombinación Nav-Tc dirigido al final del exón 1 del gen de Na_v1.7 era correcto. Se intentó introducir por recombinación homóloga al cassette Nav-Tc en el plásmido p6S58. Este plásmido contiene un fragmento de 11 kb de DNA genómico de ratón, que corresponde a la parte final del exón 1 de Na_v1.7 (sitio blanco de recombinación del cassette Nav-Tc) y el resto de las 11 kb del intrón 1, clonado en el sitio SacI del plásmido pBlueScript II SK+ (García-Villegas M. R. comunicación personal; ver esquema detallado en la figura 9).

La cepa DYRG se creció a fase exponencial y se indujo la expresión del sistema de recombinación RED, las bacterias se hicieron electrocompetentes y se electroporaron con una mezcla del DNA del plásmido p6S58 y 100ng del DNA del cassette Nav-Tc en una relación molar 3:2 respectivamente. Las bacterias resultantes se crecieron en medio de selección LB-Tc (12.5 µg/ml). De este ensayo se obtuvieron 326 colonias Tc^R en las bacterias inducidas a recombinación, mientras que de las bacterias control sin inducir el sistema de recombinación RED, se obtuvieron 129 colonias.

Para determinar si las colonias Tc^R obtenidas correspondían a las recombinantes del plásmido p6S58 con el cassette Nav-Tc, se aisló el DNA plasmídico de 20 colonias Tc^R independientes y se analizaron por restricción con la enzima EcoRI. Como se muestra en la figura 9A el plásmido p6S58 tiene dos sitios de reconocimiento para la enzima EcoRI y el cassette Nav-Tc tiene un sitio, de tal manera que la recombinante que haya integrado el cassette Nav-Tc en el sitio correcto (final del exón 1) debe tener tres sitios de corte para EcoRI y producir 3 fragmentos, de 1.6, de 3 y de 11 Kb. En la figura 9 B se muestran 4 de los 20 plásmidos analizados, y en los carriles 2 y 3 se muestran los fragmentos esperados en el caso de la recombinación correcta del plásmido p6S58 con el cassette Nav-Tc.

Mediante este análisis se identificaron dos recombinantes que muestran el patrón de restricción esperado, lo que indica que la inserción del cassette Nav-Tc ocurrió de manera específica en 2 de 20 plásmidos. En la figura 9 B se muestra también el patrón de restricción de dos de las 18 clonas Tc^R (carriles 1 y 4) que no correspondieron a las recombinantes esperadas, y en las cuales no se realizaron más experimentos para ver si la resistencia a Tc era conferida por algún artefacto en el plásmido o porque el cassette se haya integrado de manera inespecífica en el cromosoma bacteriano.

Si bien hubo un fondo alto de falsas positivas, la obtención y comprobación de recombinantes p6S58/Nav-Tc nos demostró que el sistema de recombinación RED utilizado funciona adecuadamente y que el cassette Nav-Tc se puede integrar de manera específica en el sitio planeado al final del exón 1 de $Na_v1.7$.

INSERCIÓN DEL GEN Tc^R EN EL PLASMIDO p6S58

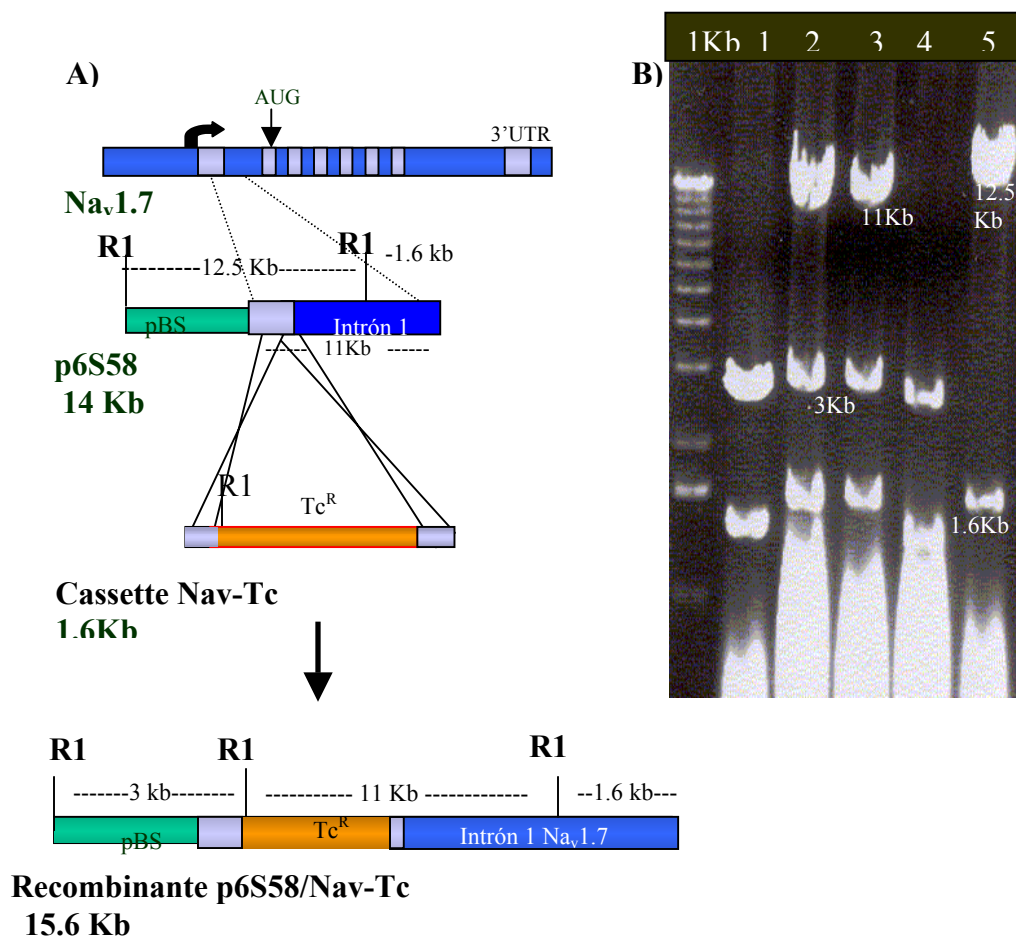


Figura 9. **A)** Esquema del plásmido p6S58 de 14 Kb que contiene un fragmento de 11 Kb correspondiente al final del exón 1 y principio del intrón 1 de $Na_v1.7$. Del plásmido p6S58 cortado con EcoRI (RI) se obtienen fragmentos de 12.5 y de 1.6 Kb. Una vez recombinado con el cassette Nav-Tc se agrega un sitio de reconocimiento para RI con lo cual se obtienen los fragmentos de 3 Kb, 11 Kb, y 1.6 Kb con los cuales se puede comprobar la inserción correcta del cassette. **B)** Foto de un gel de agarosa 0.8%-EtBr que muestra el DNA plasmídico de las recombinantes p6S58/Nav-Tc cortado con RI. A la extrema izquierda se muestra la escalera de peso molecular de 1 Kb. Los carriles 2 y 3 muestran a las recombinantes número 18 y 20, cortadas con RI que presentan los fragmentos esperados para el caso de una recombinación exitosa. El carril 1 y 4 son plásmidos que pudieron haber incorporado al cassette en una zona no específica. El carril 5 es el plásmido p6S58 sin recombinar, mostrando los fragmentos originales del corte con RI.

I.c. Recombinación con el cassette Nav286Tc812

Con el objeto de tener un cassette de recombinación del gen Tc^R con regiones homólogas al gen de $Na_v1.7$ más largas que las del cassette Nav-Tc, el plásmido recombinante p6S58/Nav-Tc fue cortado con las enzimas SacI y AseI, para después purificar, a partir de gel de agarosa, al fragmento que contiene al gen Tc^R flanqueado por 286 pb de homología al gen de $Na_v1.7$ hacia el extremo 5' y 812 pb al extremo 3' al cual se le denominó cassette Nav-286Tc812.

Una vez obtenido el nuevo cassette de recombinación Nav-286Tc812 se hizo el procedimiento para recombinarlo con la clona BAC B126neo contenida en la cepa DYRG de manera similar a la descrita con el primer cassette (ver sección de materiales y métodos). De este experimento no se obtuvieron colonias Tc^R en el control, en el cual no se indujo el sistema de recombinación RED, se obtuvieron 7 colonias Tc^R en las bacterias donde se indujo el sistema de recombinación y se electroporó con el cassette.

Para comprobar si la resistencia a tetraciclina de las colonias obtenidas se debía a la inserción correcta del cassette Nav-286Tc812 al final del exón 1 del gen de $Na_v1.7$, se aisló el DNA de las 7 colonias obtenidas, se cortaron con la enzima de restricción EcoRI y se separaron en un gel de agarosa para posteriormente transferir los fragmentos a una membrana de nylon cargada positivamente y analizarlos por hibridación en un ensayo tipo Southern Blot. En este ensayo se utilizó como referencia al DNA de la clona BAC B126neo cortado con EcoRI, en donde la región del exón 1 del gen de $Na_v1.7$, donde se esperaba la inserción del cassette, se localiza en un fragmento de 14.4 Kb (No. Acc. Genbank CAAA01194511). Cabe aquí mencionar que el tiempo de crecimiento de las bacterias con las clonas BAC Tc^R fue el doble (48 Hrs) del que comúnmente se observó para saturar el medio LB Tc (10 μ g/ml), Km (20 μ g/ml).

Como se muestra en la Figura 10, la recombinación de la clona BAC B126neo con el cassette Nav-286Tc812 debe agregar un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima EcoRI en la recombinante $Na_v1.7$ -Nav286Tc812 obteniéndose dos fragmentos, uno de 5.4 Kb y otro de 10.4 Kb y con éstos se podría discriminar a las clonas BAC's recombinantes de las no recombinantes.

Para identificar a las clonas recombinantes se obtuvo la sonda 553 que corresponde a un fragmento de 553 pb del final del exón 1 de $Na_v1.7$, liberado por la restricción con Eco RI del plásmido pBSA126 (ver detalles en materiales métodos). Se purificó el fragmento de 553 pb y se marcó radioactivamente con dCTP- ^{32}P por medio de la técnica de “Random primer” (Ver materiales y métodos). Como se indica en la figura 10A la sonda 553 debe hibridar con un fragmento de 5.4 Kb si ocurrió la recombinación adecuada y con un fragmento de 14.4 kb en la clona BAC B126neo sin recombinar.

La membrana de nylon que llevaba el DNA de las 7 colonias recombinantes Tc^R fue hibridada con la sonda 553 marcada radioactivamente para buscar cuáles clonas hibridaban con el fragmento de 5.4 Kb, y por lo tanto cuáles correspondían a las recombinantes. Como se observa en el panel B) de la figura 10, la autorradiografía de la membrana de nylon, no mostró marca evidente de la sonda en el peso molecular esperado de 5.4 Kb, lo que indicó que no ocurrió la recombinación, y que la resistencia a tetraciclina se debió a otra causa, como por ejemplo una recombinación del cassette en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, aún si la recombinación no fuera específica en las 7 colonias probadas, la sonda 553 tendría que haber hibridado con un fragmento de 14.4 Kb que es el peso molecular del fragmento de la clona BAC B126neo no modificada, y que es el que se observa en el carril 9 tomado como referencia de la clona B126neo intacta. Como no se encontró marca de la sonda en las colonias probadas, los resultados sugieren que la región del final del exón 1 de $Na_v1.7$ no está recombinando en la BAC y que además la región se pierde durante el proceso.

RECOMBINACIÓN DEL CASSETTE Nav-286Tc812 CON LA REGIÓN DEL GEN DE Nav_v1.7 CONTENIDA EN LA CLONA BAC B126neo

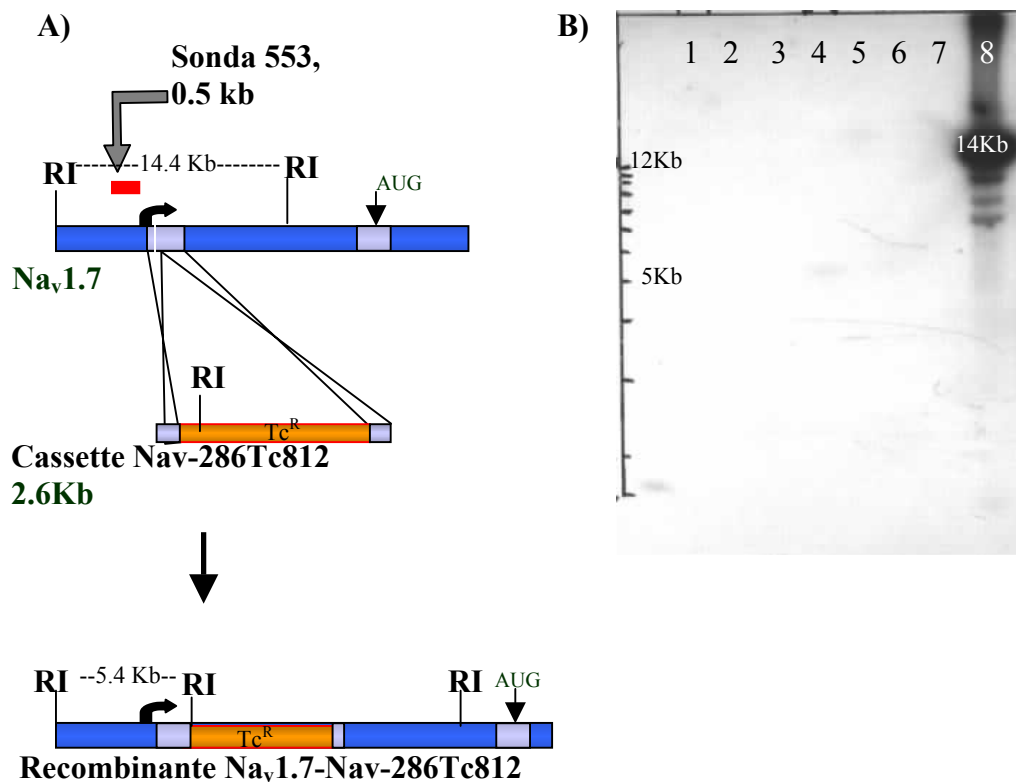


Figura 10. **A)** Esquema de los sitios de restricción para la enzima EcoRI (RI) en la secuencia del gen de Nav_v1.7, en el cassette de recombinación Nav-286Tc812, y en el producto teórico de la recombinación de estos dos últimos (Nav_v1.7-Nav-286Tc812). Se muestra la sonda de 553 pb y se indica el tamaño del fragmento con que hibrida en la región del gen de Nav_v1.7 (14.4 Kb), contenida en la clona BAC B126 neo. Después de la recombinación del cassette Nav-286Tc812 con la clona B126neo, la inserción del cassette en el lugar correcto agrega un sitio RI a la secuencia, lo que origina dos fragmentos, uno de 5.4 Kb con el que hibrida la sonda 553, y otro de 10.5 Kb. **B)** Autorradiografía del ensayo tipo Southern Blot que muestra a la izquierda al marcador de peso molecular de 1 Kb, de los carriles 1 al 7 son las 7 clonas obtenidas de la recombinación del gen de Nav_v1.7 con el cassette Nav-286Tc812 cortadas con RI, y en el carril 8 se muestra a la región de Nav_v1.7 sin modificar (clona BAC B126neo) cortada con RI. Ninguna de las 7 clonas probadas muestra hibridación con la sonda 553 en la región de peso molecular de 5.4 Kb, mientras que en el carril 8 es evidente que la sonda hibrida con un fragmento de aprox. 14 Kb como se esperaba para el control.

I.d. Recombinación del cassette Nav-ApSacB en la clona BAC B71neo

Dado que la estrategia para introducir al cassette de recombinación Nav-Tc, con el gen de resistencia a tetraciclina, específicamente en el final del exón 1 del gen de Na_v 1.7 contenido en la clona BAC B126neo no condujo a resultados positivos, y tomando en cuenta que esta recombinación sí se llevó a cabo con el plásmido p6S58, se pensó en la posibilidad de que algunas secuencias de DNA presentes en la clona BAC pudieran formar estructuras secundarias en regiones específicas que estuvieran de alguna manera interfiriendo con el acceso de las enzimas de recombinación del sistema RED a la región de DNA del final del exón 1 de Na_v 1.7. Considerando lo anterior se planteó modificar la estrategia original de modificación de la clona BAC B126neo e introducir un gen reportero distinto en un sitio diferente y distante.

En esta modificación de la estrategia para introducir al gene reportero *LacZ* en una región regulada por el promotor transcripcional del gen de Na_v 1.7, se planteó en el primer paso introducir un cassette de recombinación homóloga que contenía al gen marcador de resistencia a ampicilina junto con el gen de selección negativa SacB que inhibe el crecimiento en presencia de sacarosa (cassette Nav-Ap^RSacB), a la región de inicio de la traducción de Na_v 1.7 (AUG al inicio del exón 2, No. Acc Genbank CAAA01149184, ver figura 6) contenido en la clona BAC B71neo. De esta forma las bacterias en las que se insertara el cassette de recombinación serían seleccionadas en medio con ampicilina y, posteriormente en el segundo paso, el gen de selección negativa (SacB) se reemplazaría por el gen reportero *LacZ* seleccionando a las bacterias capaces de crecer en medio con sacarosa. Es relevante señalar que entre el nuevo sitio blanco de recombinación seleccionado y el sitio del anterior cassette Nav-Tc, existen 67 Kb de distancia, con lo cual se quiso eliminar la posibilidad de interferencia de secuencias de DNA que impidieran la recombinación.

Para obtener al cassette marcador Ap^RSacB inicialmente se modificó por recombinación homóloga, la cepa bacteriana NC397 (ver Tabla 3) que lleva en su genoma al gen de resistencia a Cloramfenicol (Cm^R) e inmediatamente después al gen SacB (D. Court, datos no publicados). El cassette marcador Cm^RSacB contenido en NC397 no puede ser utilizado

para seleccionar recombinantes en este proyecto por que las clonas BAC ya llevan el gen de resistencia a cloranfenicol.

Siguiendo los lineamientos para el diseño de oligos para amplificación de cassettes de recombinación (ver oligonucleótidos en materiales y métodos) se diseñaron los oligos Cm-Ap(F) y Ap-SacB (R) (Tabla 5) utilizando como molde de amplificación al gen de Ap^R presente en el plásmido pBlueSript II SK+. Siguiendo las condiciones citadas en la Tabla 6, se amplificó por PCR el cassette de recombinación al que se le denominó Nc-Cm \leftrightarrow Ap. Este cassette lleva al gen Ap^R dirigido por 40 pb de homología a la secuencia del gen Cm^R en el cromosoma de la cepa NC397 con la intención de intercambiar el gen Cm^R por el de Ap^R . El tamaño del producto obtenido fue acorde al esperado de 1282 pb por la suma del gen Ap^R de 1202 pb y 40 pares de bases a cada lado de la homología a la región Cm^R .

La cepa NC397, que también es huésped del sistema de recombinación RED, se creció a fase exponencial y se indujo a la expresión del sistema RED a 42° C por 15 min. para introducirle por electroporación el cassette Nc-Cm \leftrightarrow Ap y así intercambiar el gen de Cm^R por el de Ap^R . De esta recombinación se obtuvieron 180 colonias Ap^R con las bacterias control no inducidas a la recombinación del sistema RED y electroporadas con el cassette, mientras que se obtuvieron 543 colonias Ap^R en las bacterias que sí fueron inducidas a la recombinación. El número de bacterias de este último grupo es 3 veces mayor que el del control, y para comprobar que el cassette de recombinación Ap^R hubiera reemplazado al gen Cm^R se sembraron 50 colonias independientes Ap^R en medio con cloramfenicol. Se encontró que 38 de las 50 colonias probadas no crecieron en presencia de cloramfenicol indicando el reemplazo exitoso del gen Cm^R . A la cepa resultante de esta recombinación se le denominó NCLJ (Tabla 3). Esta cepa lleva en su genoma al gen Ap^R seguido de SacB, con lo cual además se comprobó nuevamente que el diseño y ejecución de los experimentos de recombinación homóloga es el correcto.

Se extrajo el DNA cromosomal de la cepa NCLJ y se utilizó como molde de amplificación para el cassette de recombinación Nav-ApSB (ver detalles en materiales y métodos, Tabla 6), utilizando los oligos Nav-ApSB(F) y ApSB-Nav (R) diseñados previamente (Tabla 5). Este nuevo cassette de recombinación lleva al gen Ap^R seguido del gen SacB, dirigidos por secuencias de 50 pb de homología, al sitio de inicio de la

transcripción de $Na_v1.7$ (Fig. 6). El tamaño del producto de la amplificación de este cassette fue acorde al esperado de 3636pb (ver Tabla 6).

La cepa DY380 que lleva a la clona BAC B71neo (DY380/B71neo) fue crecida a fase exponencial y se indujo a 42°C la expresión del sistema de recombinación RED. Paralelamente se llevó un control donde no se indujo la expresión del sistema RED. Las bacterias fueron electroporadas con 100 ng del cassette Nav-ApSB (ver detalles en materiales y métodos) para después sembrarlas en cajas con medio LB/ampicilina (50µg/ml). A las 48 horas a 32°C se observó un número igual de colonias Ap^R crecidas en el grupo experimental y en el control por lo que no se justificó realizar el procedimiento para la comprobación de las recombinantes esperadas. Se intentó esta misma recombinación aumentando a 200 ng la cantidad del cassette con el que se electroporaron las bacterias, sin embargo el número de colonias Ap^R crecidas de las bacterias inducidas a la recombinación y de las control, no tuvo una diferencia significativa por lo que no se continuaron los experimentos hasta encontrar una estrategia o sistema diferente con el cual insertar el gen marcador y posteriormente intercambiarlo por el gen reportero (o hacerlo en un solo paso) en una región regulada por el promotor transcripcional del gen de $Na_v1.7$.

II. MODIFICACIÓN DE CLONAS BAC DEL GEN DEL NaCh Na_x

Dado que el gen del canal de sodio Na_x no contiene elementos de regulación genética tejido-específica cercanos a su promotor (Morales, 2004) en el presente trabajo se planteó introducir al gen reportero *LacZ* en la clona BAC BNaG1 (Incyte Genomics) de 135 Kb de DNA genómico que contiene al gen completo del canal de sodio Na_x (Fig. 6). De esta manera la expresión de la proteína de *lacZ* (β -galactosidasa) reportaría cuantitativamente la actividad del promotor transcripcional del gen de Na_x conservando además su interacción con los elementos de expresión genética en las 135 Kb de la clona BAC. La estrategia que seguimos para modificar al gen del NaCh Na_x, fue similar a la que se escogió para hacer las modificaciones de las clonas BAC del gene del canal de sodio Na_v1.7 (Fig. 7). En este caso se planteó introducir, en un primer paso de recombinación homóloga del sistema RED, al marcador de selección positiva Ap^R seguido del marcador de selección negativa SacB (*Ap-SacB*), en la región del inicio de la traducción del gen de Na_x contenida al principio del exón 2 (AUG Fig. 6). De este modo las recombinantes se pueden escoger por su habilidad para crecer en medio con ampicilina. En el segundo paso de recombinación se planeó sustituir a los genes marcadores *Ap^R-SacB* por el gen *LacZ* y seleccionar a las bacterias recombinantes por la habilidad para crecer en medio con sacarosa el cual sería letal para las bacterias que conservaran el gene *SacB*.

Por otro lado se planteó introducir al gen *neo* (resistencia a neomicina) en una región del vector de la BAC (pBeloBAC11), para de esta manera obtener un modelo de clona BAC con el cual poder hacer en un futuro transfecciones estables en líneas celulares específicas, para buscar los elementos de regulación genética del gen del canal de sodio Na_x.

II. a. Introducción del gen *neo* en la clona BAC BNaG1

Para comenzar con el trabajo, la clona BAC BNaG1 que contiene las 135 Kb de DNA genómico de la región del gen de Na_x fue aislada a partir de su cepa huésped DH10B (Gibco BRL) mediante lisis alcalina “Miniprep” para después ser electroporada en bacterias electrocompetentes de la cepa DY380 mediante un pulso eléctrico de 2.5 kV. (ver materiales y métodos). Esto se hizo para que la BAC pudiera ser modificada por medio del sistema de recombinación homóloga RED presente en la cepa DY380. Las bacterias que

incorporaron a la BAC BNaG1 fueron seleccionadas por haber crecido en medio con cloramfenicol (12.5 $\mu\text{g/ml}$) debido a que el vector de la BAC le confiere a la bacteria la resistencia a dicho antibiótico. Una vez obtenida la cepa DY380/BNaG1 se hizo el procedimiento para introducir el gen *neo* a la región del vector de la BAC (pBeloBAC11). La clona DY380/BNaG1 fue inducida a la expresión del sistema de recombinación RED llevándola a 42°C por 15 min. y fue electroporada con el cassette PGK/Tn5neo (García-Villegas, datos no publicados), el cual lleva al gen *neo* dirigido, por 1.2 Kb de homología de secuencia, a la región Cm^R en el vector pBeloBAC11 (Fig. 11). Las bacterias recombinantes que incorporaron al cassette PGK/Tn5neo se seleccionaron por crecer en medio con kanamicina (20 $\mu\text{g/ml}$) dado que el cassette otorga resistencia a kanamicina (Km^R) en procariontes por la presencia del promotor Tn5. De este ensayo se obtuvieron 100 colonias Km^R en las bacterias inducidas y electroporadas con el cassette PGK/Tn5neo mientras que solo se obtuvieron 12 colonias Km^R en las bacterias control no inducidas y electroporadas con el cassette.

Para comprobar que las bacterias inducidas a la recombinación que resultaron Km^R , eran el tipo de recombinantes que planeamos (BNaG1-neo), se aisló el DNA de 7 colonias independientes Km^R y se cortaron con la enzima HindIII. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 0.8 %, y transferidos a una membrana de Nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) para analizarlos en un ensayo tipo Southern Blot mediante la hibridación de la sonda radioactiva Neo de 1.2 Kb que es específica para la región Cm^R del vector de la BAC (Fig. 11). De esta manera se comprobó que 7 de 7 clonas BAC analizadas, incorporaron al gen *neo* en el sitio planeado, pues la sonda dirigida a la región de Cm^R de la BAC, hibridó en los dos fragmentos de 1.9 y 6 Kb que resultaron por la incorporación de un sitio de corte HindIII a la secuencia, llevado por el cassette PGK/Tn5neo (Fig. 11).

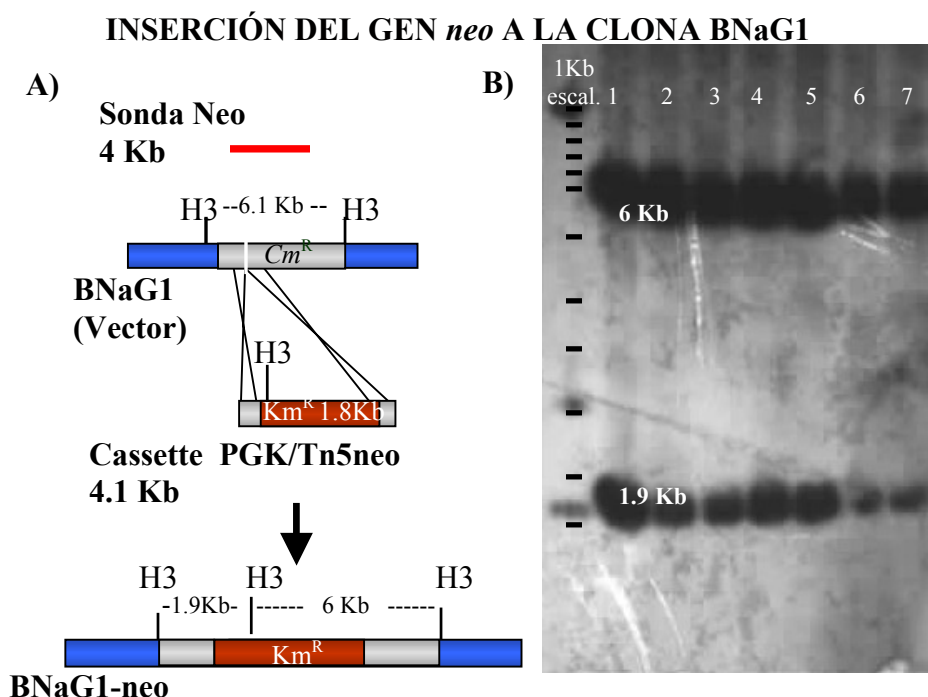


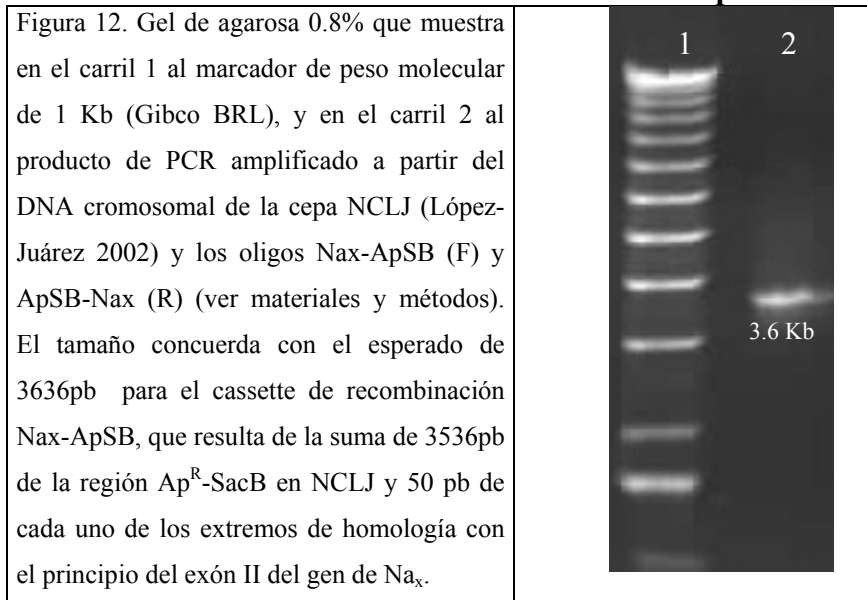
Figura 11. **A)** Se esquematiza la región del vector de la clona BAC BNaG1, con la zona de resistencia a cloramfenicol (Cm^R) y los sitios de restricción de la enzima HindIII (H3). El cassette PGK/Tn5neo con un sitio de corte H3, va dirigido por homología de secuencias a la zona Cm^R en la clona BAC BNaG1 y otorga resistencia a Kanamicina (Km^R) por la presencia del promotor Tn5. Tras la recombinación de la clona BAC BNaG1 y el cassette PGK/Tn5 (BNag1-neo) un sitio de corte para H3 se incorpora a la secuencia de BNaG1 dividiendo en dos la región con la que hibrida la sonda Neo; Un fragmento de 1.9 Kb y otro de 6 Kb. **B)** Autorradiografía del Southern blot del DNA de 7 clonas recombinantes BNaG1-neo cortadas con Hind III e hibridadas con la sonda radioactiva Neo de 4 Kb. Se comprueba que la sonda hibrida con los fragmentos esperados de 1.9 y de 6 Kb en el caso de una recombinación correcta.

II.b. Introducción del marcador *Ap-SacB* en fase con el gen de Na_x

Para continuar con la estrategia e introducir el gen marcador *Ap-SacB* en una región regulada del promotor transcripcional del gen de Na_x , se diseñaron los oligos Nax-ApSB (F), y ApSB-Nax (R) con los cuales se sintetizó por PCR el cassette de recombinación Nax-ApSB (ver materiales y métodos) tomando como molde de amplificación al cromosoma de la cepa bacteriana NCLJ que lleva al gen de resistencia a ampicilina seguido del gen de sensibilidad a sacarosa (Ap^R -SacB). El producto de esta PCR mostró el tamaño esperado en el caso de una amplificación correcta del cassette Nax-ApSB (Fig. 12). Este cassette lleva la región del gen Ap^R seguida del de SacB flanqueada por regiones de 50 pb

de homología al principio del exón 2 o inicio de la traducción del gen Na_x (AUG Fig. 6). De esta manera se dirigió la recombinación del cassette Nax - $ApSacB$ al exón 2 del gen de Na_x .

CASSETTE DE RECOMBINACIÓN Nax - $ApSacB$



La cepa DY380-BNaG1neo fue inducida a la expresión del sistema de recombinación RED a 42°C por 15 min., y fue electroporada con 100 ng del cassette de recombinación Nax - $ApSB$ (ver materiales y métodos) llevando paralelamente un control no inducido a la recombinación RED. Las bacterias electroporadas fueron sembradas en medio con ampicilina (50µg/ml) y al cabo de 24 hrs. de incubación a 32° C se observó el crecimiento de 141 colonias Ap^R del grupo de bacterias inducidas a la recombinación y electroporadas con el cassette, mientras que sólo se encontraron 2 colonias en las bacterias control no inducidas y electroporadas con el cassette. En este ensayo, además se probó la sensibilidad de crecimiento al medio mínimo con sacarosa (expresión del gen $SacB$) para lo cual se tomaron 9 colonias independientes Ap^R y se crecieron a saturación en 5 ml de medio rico LB. Las bacterias obtenidas fueron lavadas tres veces con medio mínimo M9 (ver materiales y métodos) y se hizo una serie de diluciones hasta llegar a la concentración de 10^{-6} respecto al medio saturado. El 20 % de la dilución de las bacterias fue sembrado en placas de medio rico L-B y también en medio mínimo M63, sacarosa 5% (ver materiales y métodos) el cual debe ser letal para bacterias con el gen $SacB$ al metabolizar la sacarosa. Se observó que después de 48 hrs. de incubación de las bacterias en el medio mínimo, y de 24

h de las bacterias del medio rico, ambas a 32°C, el número de colonias crecidas varió desde 3.8 % hasta 120% tomando como referencia a las crecidas en medio mínimo (Tabla 9).

TABLA 9. RECOMBINANTES DY380/BNaG1neo-ApSB Y CRECIMIENTO EN MEDIO CON SACAROSA

Colonia recombinante	Colonias que crecieron en LB-Ap 50µ/ml (24hrs)	Colonias que crecieron en medio M63-Sacarosa (48 hrs.)	% de crecimiento en medio M63-sacarosa 5% (*)
DY380/BNaG1neo-ApSB 1	276	145	52 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 2	313	99	31.6 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 3	710	198	27.88 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 4	230	149	64.7 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 5	409	510	120.16%
DY380/BNaG1neo-ApSB 6	503	52	10.3 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 7	366	171	46 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 8	757	29	3.8 %
DY380/BNaG1neo-ApSB 9	880	156	17.7 %
DY380/BNaG1neo (control)	797	923	115 %

(*) Se tomó como 100% el número de colonias que crecieron en medio LB-Ap.

Por otro lado, para probar que la resistencia a Ap y la sensibilidad al crecimiento en medio con sacarosa de las bacterias obtenidas se debía a la inserción del cassette Nax-ApSB en el sitio planeado, se aisló por el método de miniprep el DNA de las mismas 9 colonias probadas para la sensibilidad a sacarosa, y fue cortado con la enzima AccI. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 0.8% y fueron transferidos a una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) para hacer un ensayo tipo Southern Blot hibridando con una sonda marcada radioactivamente en la región modificada. La sonda utilizada en este ensayo fue un fragmento de 1.1 Kb de la región de inicio de la traducción de Na_x (Sonda Nax) que durante la identificación del promotor transcripcional del gen de Na_x había sido clonado en el plásmido pNaG1 (García-Villegas, datos no publicados, Tabla 4, Fig. 13). Como referencia de la región intacta se tomó a la clona BAC BNaG1neo donde la sonda Nax debe hibridar en un solo fragmento de 3 Kb que es el tamaño esperado por los sitios de corte AccI presentes en la secuencia (No. Acc. Genbank CAAA01183759), y en la clona BAC BNaG1neo recombinada con el cassette Nax-ApSB, la sonda Nax debe hibridar en dos fragmentos, uno de 4 Kb y otro de 2.5 Kb que resultan por la incorporación de un nuevo

sitio de corte *AccI* al integrarse el cassette en el sitio planeado (Fig. 13A). La autorradiografía de la figura 13B es de la membrana de nylon hibridada con la sonda *Nax*, y muestra que 6 de 9 clones BAC incorporaron el cassette *Nax-ApSB* en sitio correcto pues en las clonas de los carriles 1, 2, 3, 5, 7 y 8 son evidentes las marcas de la hibridación de la sonda con los fragmentos de 2.5 Kb y 4 Kb que se esperaban. En el carril 10 está el DNA de la clona BAC BNaG1neo y se muestra que la sonda híbrida con el fragmento del peso molecular esperado de 3 Kb. Con lo anterior se comprueba la recombinación exitosa y la obtención de la clona BAC BNaG1neo-*ApSB*.

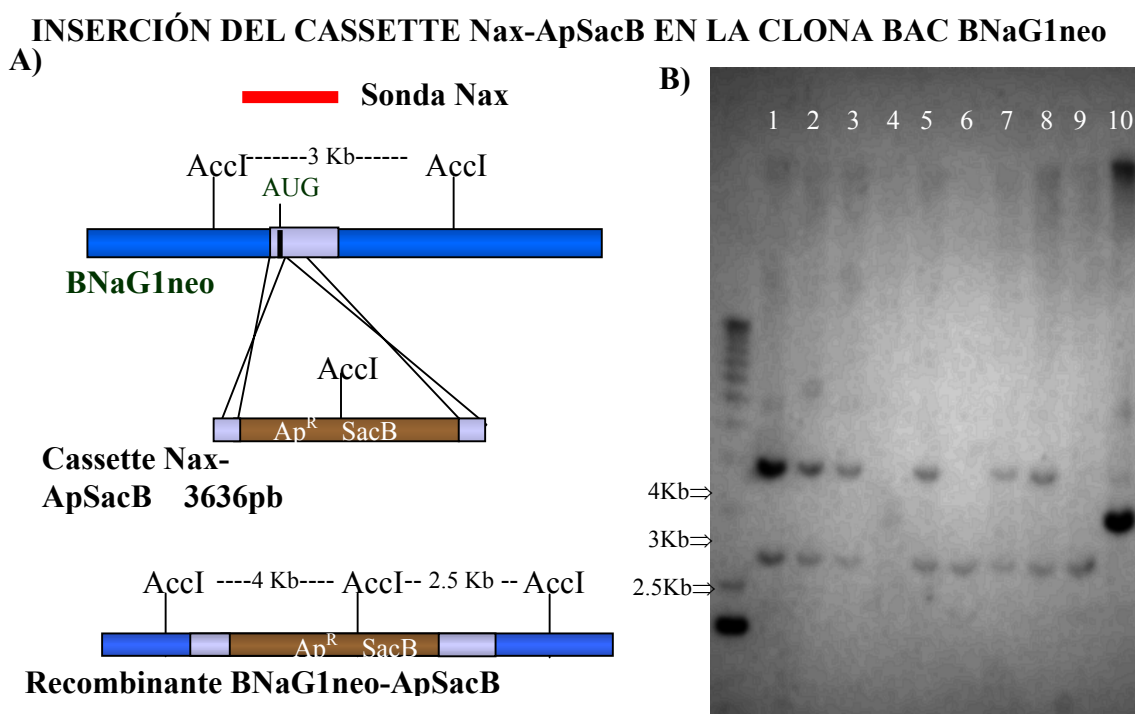


Figura 13. **A)** Se esquematiza a la clona BAC BNaG1neo, al cassette *Nax-ApSacB* y al producto de la recombinación de estos (recombinante BNaG1neo-*ApSacB*), con sus respectivos sitios de corte para la enzima *AccI*. La recombinación homóloga del cassette *Nax-ApSacB* le agrega un sitio de corte *AccI* a la secuencia del gen de *Nax*, y la sonda *Nax* que tiene complementariedad con un fragmento de 3 Kb en la clona BNaG1neo cortada con *AccI*, después de la recombinación híbrida con dos fragmentos, uno de 4 Kb y otro de 2.5 Kb. **B)** Autorradiografía del ensayo tipo Southern Blot donde se muestra DNA de 9 recombinantes BNaG1neo-*ApSacB* cortadas con la enzima *AccI*. En los carriles 1, 2, 3, 5, 7 y 8 están las marcas de la hibridación de la sonda *Nax* marcada radiactivamente, con los fragmentos de 4 y 2.5 Kb que son los que se esperaban en el caso de una recombinación adecuada, comprobando así la inserción del cassette en el sitio planeado. El carril 9 es la clona BNaG1neo-*AccI* sin recombinar, por lo cual la sonda híbrida con un solo fragmento de 3Kb.

De las 6 clonas BAC comprobadas como recombinantes hubo que seleccionar a la que sería utilizada para continuar con el trabajo, y para discriminar se tomó en cuenta la viabilidad del gen *SacB* probada previamente (sensibilidad de las bacterias al crecimiento en medio con sacarosa). Por ser la clona que demostró mas sensibilidad de crecimiento en sacarosa respecto a crecimiento en medio rico se decidió trabajar en lo subsecuente con la clona DY380/BNaG1neo-ApSB proveniente de la colonia 8 (ver Tabla 9).

II.c. Reemplazo de los genes *Ap-SacB* por el gen reportero *LacZ* en la clona BAC DY380/BNaG1neo-ApSB

Para continuar con la estrategia planeada y reemplazar a los genes marcadores *Ap-SacB*, insertos en la secuencia del inicio de la traducción del gen de Na_x en la clona BAC BNaG1neo-ApSacB, por el gen reportero *LacZ*, se diseñaron los oligos Nax-LacZ (F) y LacZ-Nax (R) (ver materiales y métodos, Tabla 5). Con estos oligos y siguiendo las condiciones citadas en materiales y métodos, se amplificó por PCR el cassette de recombinación Nax-LacZ tomando como molde de amplificación de la región *LacZ* al plásmido pCMV β (Clontech). El tamaño del producto de la PCR correspondía al esperado en el caso de una amplificación correcta del cassette Nax-LacZ de 3636 pb (Fig. 14). Este cassette lleva al gen *LacZ* dirigido, por homología de secuencias (50 pb a cada lado), al sitio del inicio de traducción del gen de Na_x , sitio donde se dirigió el primer cassette Nax-ApSacB para que de esta manera la inserción del gen *LacZ* sustituya a los genes *Ap-SacB*.

La cepa DY380/BNaG1neo-ApSB, fue inducida a la recombinación a 42°C por 15 min. y fue electroporada con 100 ng del cassette Nax-LacZ. En este ensayo además del control de bacterias sin inducir y electroporadas con el cassette, se llevó un nuevo control (control 2) de bacterias inducidas a la recombinación y electroporadas pero sin el cassette de recombinación. Una vez realizado el procedimiento, las bacterias se pusieron en un periodo de recuperación por 1 hora en medio rico a 32°C, se hicieron 3 lavados con medio mínimo M9 y se sembraron alícuotas del 20% de diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en placas con medio mínimo M63/sacarosa 5%, para seleccionar a las bacterias que por haber perdido el gen marcador *SacB* (junto con el de *Ap*) pudieran crecer en presencia de sacarosa como único carbohidrato para metabolizar. El número de colonias que crecieron en cada uno de los grupos trabajados en esta experimentación se muestra en la Tabla 9. Estos números indican

que la diferencia entre los grupos inducidos a 42° C (experimental y control 2) es pequeña, en tanto que se esperaba una diferencia notable, similar al grupo experimental y control 1. Por estos resultados se pensó en la posibilidad de que las condiciones de inducción de la expresión del sistema RED pudieran influenciar o desatar procesos para eliminar o dañar al gen *SacB* y por esto se modificaron las condiciones de inducción a la recombinación tratando de eliminar el problema supuesto.

CASSETTE DE RECOMBINACIÓN Nax-LacZ

Figura 14. Gel de agarosa 0.8 % que muestra en el carril 1 al marcador de peso molecular de 1 Kb y en el carril 2 el producto de la amplificación por PCR “Cassette Nax-LacZ” a partir de los oligos Nax-LacZ (F), LacZ-Nax (R) utilizando como molde de amplificación del gen *LacZ* (3536 pb) al plásmido pCMVβ. El tamaño corresponde al esperado de 3636 pb.

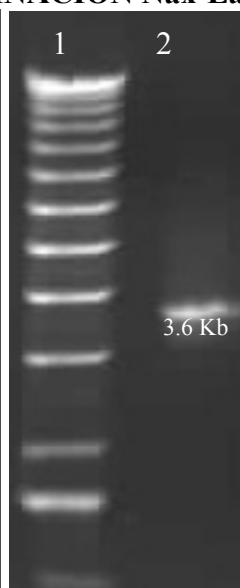


TABLA 10. RECOMBINACIÓN DE LA CEPA DY380BNaG1neo-ApSacB 8 CON EL CASSETTE NaxLacZ

DY380/BNaG1neo-ApSB 8	Inducción a la recombinación	Electroporación con el cassette NaxLacZ	Colonias crecidas en M63 sacarosa 5%
Experimental	Si	Si	96
Control 1	No	Si	3
Control 2	Si	No	72

Con el objeto de minimizar el número de bacterias espontáneas con la capacidad de crecer en medio con sacarosa como las observadas en el grupo control 2 del ensayo de recombinación de la clona BAC BNaG1 con el cassette Nax-LacZ, se realizaron nuevos ejercicios de recombinación en los cuales se disminuyó en todo lo posible el tiempo de inducción a la recombinación a 42°C llegando a ser de hasta 9 min., sin embargo el patrón

de crecimiento de colonias se repitió. La temperatura de inducción a la recombinación también se llevó al mínimo llegando hasta 38°C, sin embargo no se encontró diferencia en el comportamiento de los datos obtenidos. La modificación de las condiciones en las que se llevó a cabo la inducción a la expresión del sistema RED se llevó a cabo teniendo como base las investigaciones del grupo que desarrolló el sistema RED en la cepa bacteriana DY380 (Yu *et al.*, 2000), sin embargo ellos no reportan haber trabajado con recombinantes donde la selección se hiciera habiendo insertado un gen de selección negativa como es el caso del gen *SacB* en medio mínimo con sacarosa.

De acuerdo con los experimentos realizados por Court D. con la cepa NC397 (datos no publicados) trabajando con selección negativa de bacterias *SacB*, el número de bacterias *SacB* mutantes *di novo* resistentes al crecimiento en medio mínimo con sacarosa es de 1 de cada 10000 bacterias, y considerando que la frecuencia de recombinantes con la habilidad para crecer en medio con sacarosa es de 1 en 1000 y que de ellas se tienen que seleccionar las recombinantes buscadas, podemos pensar en encontrar un fondo grande de las bacterias que crecen en sacarosa de manera espontánea. Con esta base se planteó hacer la búsqueda de las bacterias con el reemplazo de los genes *Ap-SacB* por el cassette *Nax-LacZ*, desde un fondo grande de bacterias mutantes *di novo* por medio del ensayo de “colony lifting” (ver metodología).

Filtros de nylon redondos cargados positivamente (Boehringer Mannheim) fueron puestos sobre cajas con unas 100 colonias recombinantes DY380BNaG1neo-LacZ (que crecieron en medio con sacarosa), y se levantaron para posteriormente lisar las colonias con NaOH (ver materiales y métodos). El DNA de las colonias se fijó a los discos de nylon por la exposición a luz UV con el fin de analizar este DNA en un ensayo Southern Blot por hibridación con una sonda marcada radioactivamente. En este caso la sonda marcada con la que se buscaron las colonias que incorporaron el gen *LacZ*, fue el mismo cassette *Nax-LacZ* (Sonda *LacZIII*) con el que se trató de recombinar la clona BAC BNaG1neo-*ApSacB*. Se hizo de esta manera para tener la certeza de que las colonias que resultaran con una marca positiva por la hibridación de la sonda, tuvieran la secuencia del cassette completo (aún en un sitio no específico) y no confundirlas con la región de *LacZ* que lleva el vector de la BAC pBeloBAC11.

Como se muestra en la figura 15, se encontraron 22 colonias con una marca evidente (a diferencia de las colonias del fondo) de hibridación con la sonda LacZIII. Estas colonias fueron identificadas y sembradas en medio con ampicilina (50µg/ml) para probar su sensibilidad a este antibiótico (Ap^S) por la pérdida del gen Ap^R al ser reemplazado por el de *LacZ*, paralelamente se sembraron en medio no selectivo (LB-Cm) para recuperar las colonias de interés. De las 22 colonias analizadas, 8 resultaron Ap^S y con ellas se procedió a hacer la comprobación de la inserción específica del cassette Nax-LacZ en la zona de inicio de la traducción del gen de Na_x en la clona BAC NaG1neo, mediante un ensayo tipo Southern Blot.

Por el método de miniprep se extrajo el DNA de las 8 colonias Ap^S (BNaG1neo-LacZ) y se cortaron con la enzima SacI, por ser la enzima adecuada para mostrar las diferencias entre las regiones modificadas por la inserción correcta del cassette, y las regiones no modificadas (Fig. 16). Como referencia de la región no modificada se utilizó el DNA de la clona BAC BNaG1neo y también se tomó a la clona BAC modificada BNaG1neo-*ApSB* en la cual se insertaron los genes *Ap-SacB* en el inicio de la traducción del gen de Na_x . La sonda que se marcó radioactivamente por el método de “Random primer” fue la sonda Nax, misma que se utilizó en el ensayo de comprobación de las recombinantes BNaG1neo-*Ap-SacB*, sólo que en este ensayo el tamaño de los fragmentos con los que híbrida la sonda son diferentes porque fueron generados por corte con la enzima SacI en vez de AccI como en la Figura 13. En la clona BAC BNaG1neo, la sonda Nax debe hibridar con un fragmento de 6.3 Kb, en la clona BAC recombinante NaG1neo-*Ap-SacB* debe hibridar con un fragmento de 9.8 kb (Fig. 16). En la figura 16 B se muestra la autorradiografía del ensayo tipo Southern Blot donde se observó que la sonda Nax hibridó con los fragmentos de clonas control BNaG1neo-*ApSacB8* y BNaG1neo que se esperaban, sin embargo no se observó marca de hibridación en los fragmentos de 3.8 Kb y 6.1 Kb que demostrarían la inserción correcta del cassette en las clonas BNaG1neo-LacZ.

La recombinación se llevó a cabo en más ocasiones cambiando primeramente la sonda *LacZ* por una más pequeña, específica solo a la región de *LacZ* llevada por el cassette y no presente en el vector de la BAC, esto en el ensayo de hibridación de “colony lifting”. También se aumentó el número de colonias probadas en los ensayos pero se obtuvieron los mismos resultados.

Dado que en los controles llevados en todos los experimentos se observó siempre el resultado esperado y que en el grupo experimental no se encontraron colonias que mostraran marca alguna de hibridación con la sonda Nax, es decir no se presentaba hibridación alguna con la sonda Nax (Fig. 16, carriles 1, 2, 3, 6, 7, 9) se dedujo que el reemplazo de los genes *Ap-SacB* por el cassette Nax-LacZ en la secuencia del inicio de la traducción del gen de Na_x no puede ser llevada a cabo por el método de recombinación homóloga del sistema RED utilizado. Un dato interesante es que en las clonas probadas no se observó hibridación alguna de la sonda Nax, siendo que aunque no hubiera habido una recombinación correcta, la región del inicio de la traducción del gen de Na_x debería haber permanecido intacta y por lo tanto la sonda haber hibridado en el fragmento de 6.3 Kb como en la clona BAC BNaG1neo. Por lo tanto se sugiere que la región en cuestión se pierde durante la experimentación.

Los resultados obtenidos no justifican la realización de más experimentos hasta tener una estrategia diferente para introducir al gen *LacZ* en un sitio regulado por el promotor transcripcional del gen de Na_x. Como el primer paso de recombinación fue exitoso se pretende seleccionar las bacterias recombinantes con el gen *LacZ* en un solo paso, solo que por cuestión de tiempo y recursos, esto se llevará a cabo en nuevos proyectos de investigación.

COLONIAS DY380 BNaG1neo-LacZ HIBRIDADAS CON LA SONDA LacZ

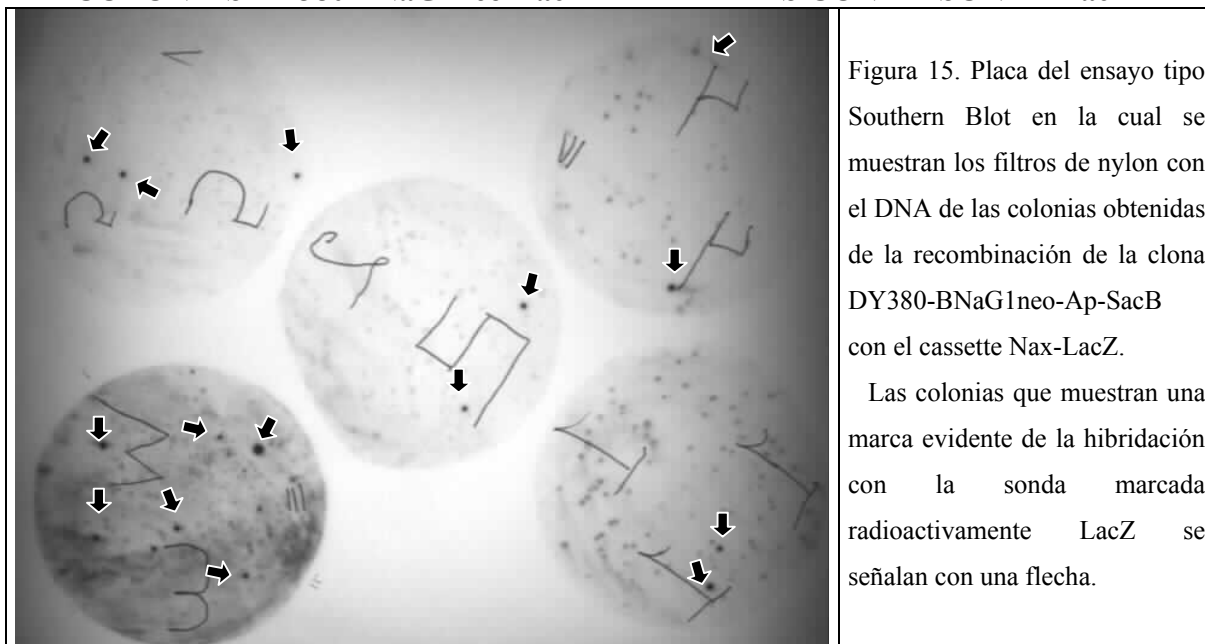


Figura 15. Placa del ensayo tipo Southern Blot en la cual se muestran los filtros de nylon con el DNA de las colonias obtenidas de la recombinación de la clona DY380-BNaG1neo-*Ap-SacB* con el cassette Nax-LacZ.

Las colonias que muestran una marca evidente de la hibridación con la sonda marcada radioactivamente LacZ se señalan con una flecha.

REEMPLAZO DE LOS GENES *Ap-SacB* POR EL DE *LacZ* EN LA CLONA BAC BNaG1neo-*ApSacB*

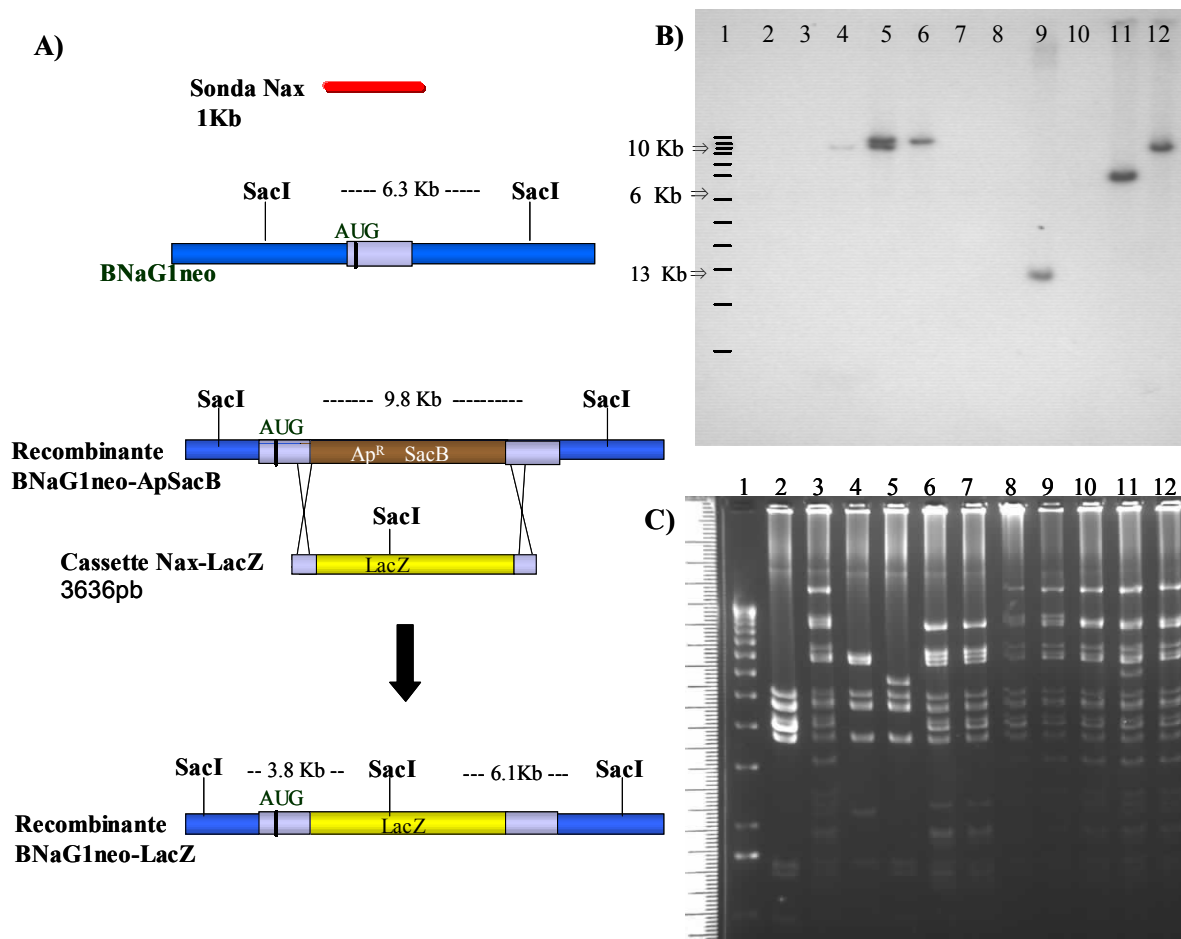


Figura 16. **A)** Se esquematiza a las clonas BAC BNaG1neo, BNaG1neo-*ApSacB*, el producto de la recombinación de esta última con el cassette Nax-*LacZ*, y los sitios de restricción para la enzima *SacI*. Tras la recombinación, la región del inicio de la traducción (AUG) del gen de Na_x incorpora un sitio de restricción para la enzima *SacI* que le fue agregado por la inserción del cassette Nax-*LacZ*. Se muestra que la sonda Nax tiene complementariedad con un fragmento de 6.3 Kb en la clona BAC BNaG1neo, con un fragmento de 9.8 Kb en la recombinante BNaG1neo-*ApSacB* y por la introducción del cassette Nax-*LacZ* en la clona BNaG1neoNax-*LacZ* tiene complementariedad con un fragmento de 3.8 Kb y otro de 6.1 Kb. **B)** La autorradiografía del ensayo tipo Southern Blot muestra en el carril 1 al marcador de peso molecular de 1 Kb (Gibco). De los carriles 2 al 10 son las clonas recombinantes BNaG1neo-*LacZ* cortadas con la enzima *SacI*, y en ninguna de ellas aparecen las marcas de hibridación de la sonda Nax con los fragmentos esperados de 3.8 y 6.1 Kb para comprobar una recombinación adecuada con el cassette Nax-*LacZ*. Solo los carriles 5 y 6 muestran que la sonda Nax hibrida con la región intacta de la clona BNaG1neo-*ApSacB*. El carril 9 muestra la marca de hibridación de la sonda en un fragmento de 3 Kb que puede ser un artefacto. Los carriles 11 y 12 muestran a las clonas BNaG1neo, y BNaG1neo-*ApSacB* cortadas con *SacI* en las cuales la sonda Nax hibridó en los fragmentos esperados. **C)** Es el gel de agarosa utilizado para el Southern Blot mostrando la cantidad de DNA utilizada en el ensayo.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los trabajos realizados por García-Villegas *et al.*, (2001), López-Juárez *et al.*, (2002) y Morales (2004), los promotores de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x no tienen elementos para regular su expresión en neuronas, en regiones genómicas cortas (menores a 12 Kb y 3.4 Kb respectivamente) inmediatamente río arriba de sus promotores transcripcionales. En esos mismos trabajos se hace evidente que los promotores transcripcionales de ambos genes comparten características como múltiples sitios de inicio de la transcripción y ausencia de caja TATA. Además, la localización contigua de los genes de los canales $Na_v1.7$ y Na_x en el genoma de ratón y de humano (García-Villegas *et al.*, 2001), aunado a que ambos genes se expresan preferencialmente en ganglio de raíz dorsal en el sistema nervioso periférico (Toledo-Aral *et al.*, 1997, Watanabe, *et al.*, 2000), hace de estos dos canales un modelo interesante para estudiar su regulación génica.

En el presente trabajo se utilizaron diversas técnicas de biología molecular para manipular regiones genómicas de cientos de kilobases con la finalidad de obtener modelos con los cuales se pueda iniciar la búsqueda de elementos responsables de la expresión tejido-específica de los genes de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x , respetando además, distancias en las secuencias del gen que pudieran ser importantes en menor o mayor medida en el proceso de transcripción. El modelo de estudio utilizado fue el de clonas BAC que en este caso, llevan las regiones genómicas de los genes completos de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x , y probablemente las regiones genómicas responsables de su expresión. Para trabajar con dichas regiones se utilizó el modelo que permitió trabajar con el DNA de interés siendo albergado en un organismo de manipulación y evaluación relativamente sencilla como lo es la bacteria *E. coli*.

Para obtener el sistema con el cual se pueda medir cuantitativamente la expresión de los genes de $Na_v1.7$ y Na_x se planteó usar al gen reportero *LacZ* e introducirlo a una región de DNA que estuviera bajo la regulación del promotor transcripcional del gen de interés, como lo es el final del exón 1 o el sitio de inicio de la traducción de ambos genes. De esta manera el gen reportero *LacZ* se expresaría respondiendo a los factores que regulan la expresión de los canales $Na_v1.7$ y Na_x .

Con los avances más recientes de la biología molecular, como la recombinación homóloga del sistema RED (Yu *et al.*, 2000), es posible dirigir e introducir genes reporteros de manera específica a una región de un gen dado; en teoría cualquier gen puede ser modificado de esta manera (Court *et al.*, 2002).

Existen diferencias entre los genes de un organismo comenzando porque la proteína para la cual codifican, se debe producir en mayor o menor cantidad de acuerdo a la necesidad del tipo celular y localización en el sistema. Así sucede con los genes de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x , los cuales se expresan preferentemente en el SNP y más específicamente en el ganglio de raíz dorsal, por lo tanto su expresión debe ser regulada por factores muy específicos en estos sitios. La diferencia en cuanto a secuencia o estructura de los genes y su posible interacción con las enzimas de recombinación no ha sido tratada en los trabajos citados del sistema de recombinación homóloga RED del fago λ (Court *et al.*, 2002, Swamithan *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 2000). Hoy en día se conoce mucho acerca de las bases moleculares de los procesos de recombinación homóloga y con estas bases se trata de entender el por qué de las dificultades que se tuvieron en este trabajo para introducir, por medio de recombinación homóloga del sistema RED, al gen reportero *lacZ* al final del exón 1 del gen del canal $Na_v1.7$ y en el sitio de inicio de la traducción de los genes de $Na_v1.7$ y de Na_x contenidos en clonas BAC de DNA genómico de ratón.

Modificación del gen de $Na_v1.7$: Como se detalla en los resultados de la introducción del gen reportero *LacZ* en el gen de $Na_v1.7$, el proceso de recombinación no mostró resultados positivos en la primera fase de la estrategia donde se pretendía introducir el gen marcador de resistencia a tetraciclina al final del exón 1 del gen de $Na_v1.7$. Con la idea de que el tamaño de la región genómica de la secuencia de DNA contenida en la clona BAC pudiera interferir en el proceso de recombinación, y para comprobar la eficiencia del sistema de recombinación RED en la cepa bacteriana DYRG, a la vez de comprobar el correcto diseño y funcionalidad del cassette de recombinación Nav-Tc (una limitante del sistema podría ser la correcta amplificación del cassette), se decidió intentar la inserción del cassette en la región planeada del exón 1 del gen de $Na_v1.7$ pero albergada en una molécula más sencilla (región del gen de $Na_v1.7$ mas corta) como lo fue el plásmido p6S58.

Los resultados de la recombinación del plásmido p6S58 con el cassette Nav-Tc fueron alentadores (Fig. 9) pues se observaron colonias resistentes a tetraciclina del grupo experimental a razón de 2.5 veces más, comparadas con el control donde no se indujo la expresión del sistema RED. El análisis de los plásmidos recombinantes para comprobar la inserción del cassette Nav-Tc en la región planeada demostró que 1 de 10 plásmidos Tc^R analizados habían tenido la inserción específica. Aún cuando el número de clonas recombinantes fue bajo, con este experimento pudimos descartar la incorrecta amplificación del cassette y deficiencias del sistema de RED en la cepa bacteriana DYRG como causas por las que no se obtenían las recombinantes resistentes a tetraciclina esperadas. Además con esto se obtuvo al gen marcador Tc^R insertado en la secuencia del final del exón 1 de $Na_v1.7$ y lo que faltaba era llevarlo a la región del gen completo en las clonas BAC.

Con la intención de insertar al gen de Tc^R en el exón 1 del gen de $Na_v1.7$ contenido en la clona B126neo, se cortó el plásmido recombinante p6S58 y se obtuvo un nuevo cassette de recombinación, pero ahora con regiones de homología más largas al exón 1 de $Na_v1.7$, que las llevadas por el cassette Nav-Tc. Con esto se pretendía que resultara más fácil y específico el acoplamiento de las moléculas de DNA involucradas en la recombinación como sucede con otros sistemas (Murphy, 1998). Del ensayo de recombinación resultaron 7 colonias crecidas en el grupo experimental contra 0 del control, sin embargo cuando se hizo la comprobación de recombinantes por medio de un ensayo tipo Southern Blot ninguna colonia Tc^R tenía la recombinación planeada, y de hecho la región buscada por el cassette de recombinación estaba ausente en las recombinantes, lo que nos indicó que se perdió durante el proceso (Fig. 10).

Considerando que el principal problema hasta el momento tenía que ver con el tamaño de la región donde estaba contenido el exón 1 del gen de $Na_v1.7$ en la clona BAC B126neo, se pensó en la existencia de estructuras secundarias formadas por la interacción de secuencias lejanas en el mismo gen y que esto impidiera el acceso y acción de las enzimas de recombinación del sistema RED. Con base en lo anterior se planteó modificar la estrategia y sintetizar un cassette de recombinación para introducir conjuntamente a los genes marcadores Ap^R y $SacB$ (en vez de Tc^R) y dirigirlo al sitio de inicio de la traducción del gen $Na_v1.7$ en el exón 2. Con esta modificación se trató de minimizar la posibilidad de que las

teóricas estructuras secundarias interfirieran con el proceso, pues entre el fin del exón 1 y el inicio del exón 2 existen por lo menos 67 Kb de distancia (No. Acc. GenBank. CAAA01149184).

Como se detalló en los resultados, para obtener al cassette Nav-ApSacB fue necesario primero hacer un nuevo ejercicio de recombinación homóloga para modificar la cepa NC397 cambiando al gen de Cm^R por el de Ap^R y obtener así el molde de amplificación de los genes Ap^R y $SacB$. La recombinación se realizó y se obtuvieron 3 veces más bacterias recombinantes Ap^R que las observadas en el control. En la comprobación del reemplazo del gen Ap^R por el Cm^R se encontró que del total de las colonias probadas el 76 % reemplazó los genes como se esperaba (resultados sección I.d.) y por lo tanto fueron tomadas como recombinantes específicas.

En los ensayos de recombinación para introducir al cassette Nav-ApSacB en el exón 2 de $Na_v1.7$ no se obtuvieron colonias con el fenotipo del marcador introducido, o el número de bacterias obtenidas del grupo experimental no tuvo diferencia significativa con el control, considerándose por lo tanto artefactos.

Entre los dos sitios blanco de recombinación a donde se dirigieron los cassettes Nav-Tc y Nav-ApSacB en las clonas BAC, existen 67 Kb de distancia en el DNA genómico, y es éste el tamaño de la secuencia donde la recombinación homóloga por el sistema RED del fago λ no se llevó a cabo. La razón por la que algunos genes presentan problemas para la recombinación puede ser un tema amplio de investigación pues no se puede dar una causa exacta por el momento, sin embargo podemos hablar de que en los cromosomas hay regiones poco expresadas y super-empaquetadas por las proteínas nucleares de la célula. Se piensa que tales regiones son poco accesibles a diferentes maquinarias enzimáticas y probablemente con el sistema RED pudiera suceder algo semejante. Existe además, el antecedente de que la región que se trabajó en este proyecto (inicio del gen de $Na_v1.7$) no pudo ser recombinada utilizando vectores de “targeting” en ensayos *in vivo* para producir ratones knock-out del canal $Na_v1.7$ (García-Villegas, comunicación personal), y hasta la fecha no se ha reportado la obtención de animales Knock-out de este gen.

El trabajar con clonas con secuencias genómicas de ratón en bacterias, como lo son las clonas BAC, excluye la participación de factores de empaquetamiento celular, sin embargo parece ser que el acceso de la maquinaria de recombinación a la región planeada del exón 1

del gen de Nav1.7 no fue posible dentro de las BAC's B71neo y B126neo, mientras que se comprobó que en la región del gen $Na_v1.7$ del plásmido p6S58 la recombinación específica sí se llevo al cabo. Por estas razones creemos que el impedimento para la recombinación RED en una región de por lo menos 67 Kb comprendida entre el final del exón 1 y el principio del exón 2, podía deberse a la secuencia de nucleótidos del DNA como tal. Esta secuencia pudiera estar formando estructuras secundarias, tanto en su entorno natural en células eucarióticas, como en modelos experimentales bacterianos lo que probablemente impediría el acceso de las recombinasas del sistema RED.

Introducción del gen *neo* en la clona BNaG1: Esta parte del trabajo se planeó para obtener un modelo de estudio que reportara la actividad transcripcional del gen del canal de sodio Na_x , en una molécula que pudiera ser seleccionada al momento de hacer transfecciones en líneas celulares neuronales y no neuronales. El gen apropiado para este fin es el de resistencia a neomicina (*neo*), el cual se dirigió por homología de secuencias, en un cassette de recombinación a la zona del vector pBeloBAC11 de la clona BAC BNaG1. De esta manera cuando se hicieran las transfecciones de la clona BAC en las líneas celulares se aseguraría la presencia de la BAC por la resistencia de las células al antibiótico G418 o geneticina.

Del proceso de recombinación de la clona BAC BNaG1 con el cassette PGK/Tn5neo se comprobó la inserción correcta del gen marcador *neo* en la clona BAC BNaG1 (Fig. 11) y el número de bacterias recombinantes fue mayor a los números antes observados en recombinaciones como las del cassette Nav-Tc en el plásmido p6S58 o del cassette Nc-Cm \diamond Ap en la cepa NC397. El número de bacterias Km^R obtenidas fue casi 10 veces mayor que el observado en el control y, de las clonas Km^R analizadas por hibridación de una sonda radioactiva en un ensayo tipo Southern Blot, el 100 % mostró la inserción correcta del cassette en la región planeada. Esto demostró la eficacia del sistema RED para modificar a las clonas BAC y también indica que no todas las regiones de una clona BAC se recombinan con la misma eficiencia.

Modificación del gen de *Nax*: Durante la recombinación para introducir a los genes Ap^R -*SacB* en la clona BNaG1, encontramos un número de recombinantes del grupo experimental 70 veces mayor que el observado en el control, siendo estos los datos que demostraron mayor eficiencia de recombinación durante este proyecto. Tras la

comprobación por hibridación con la sonda Nax (Fig. 13), el número de recombinantes específicas fue de 66% del total de las clonas BAC probadas. Con esto hemos probado que la inserción del gen se llevó a cabo en el sitio adecuado al inicio del exón 2 de Nax.

Por otro lado, se probó que las colonias recombinantes BNaG1neo-ApSacB que crecieron en ampicilina tuvieron sensibilidad al crecimiento en medio mínimo con sacarosa (5 %), y por lo tanto que el gen SacB fuera funcional. Como se muestra en la Tabla 9 las colonias probadas presentaron mucha diferencia en su grado de sensibilidad a la sacarosa. Por ejemplo, el número de colonias de la clona DY380/BNaG1neo-ApSB **5** que crecieron en medio mínimo con sacarosa, no presenta diferencia con el número de colonias que crecieron en medio rico, por lo tanto esta clona no tiene al gen SacB funcionando correctamente. La diferencia de las otras clonas va de 64 % de crecimiento respecto al crecimiento en medio no selectivo, hasta 3.8 % que presentó la recombinante BNaG1neo-ApSB **8** de la cual se comprobó por ensayo tipo Southern Blot la inserción correcta del cassette y se utilizó para continuar la segunda parte de la estrategia.

Técnicamente, la selección positiva de un marcador que confiere resistencia a una droga está libre de fondo de colonias mutantes resistentes al antibiótico, pues la bacteria necesitaría incorporar al gen de resistencia de algún sitio. El fondo encontrado en esos experimentos podría deberse a bacterias que incorporaron al gen en un sitio inespecífico o por remanentes de la secuencia molde (plásmido templado) del cassette de recombinación en la PCR. En el caso de selección negativa puede haber colonias con el fenotipo de habilidad para crecer en el medio selectivo y para esto sólo es necesario que la región del gen (en este caso sacB) mute y ya no sea funcional, lo cual se hace más probable por las condiciones de estrés a las que se someten las bacterias durante la inducción de la expresión del sistema RED y la electroporación. La inactivación de SacB ocurre con una frecuencia de 1 en 10 000 células (Court, 2002) y la frecuencia de recombinación para el sistema RED es de 1 en 1000. En teoría las recombinantes deseadas debían ser aisladas de un fondo de colonias mutantes espontáneas resistentes a sacarosa en una relación 1/10 dependiendo del número de colonias que crecieran en el control.

Durante la recombinación para reemplazar al gen *Ap-SacB* por el de *LacZ* en la clona BAC BNaG1neo-ApSacB se obtuvieron resultados contrastantes respecto a la primera recombinación de esta clona. Como se menciona en los resultados y en la Tabla 9, en la

recombinación DY380/BNaG1neo-LacZ, el número de colonias obtenidas del grupo experimental (inducido a la recombinación y electroporado con el cassette) no mostró una diferencia considerable comparado con el control 2 (inducidas a la recombinación y electroporadas con agua), aunque en estos dos últimos grupos el número de colonias obtenidas fue en promedio 25 veces mayor que las observadas en el control 1 (no inducidas a la recombinación y electroporadas con el cassette (Tabla 9). Como la única variable que hace que los resultados se disparen de esta forma es la inducción de la expresión del sistema de recombinación RED a 42° por 15 min. se consideró que una posible causa fuera una respuesta de estrés calórico (Heat-Shock) lo que detonaría mutaciones espontáneas en las bacterias. En ejercicios subsecuentes de recombinación se redujeron temperatura y tiempo de inducción de la expresión del sistema RED, pero el patrón observado en los primeros experimentos no cambió significativamente.

La diferencia entre colonias mutantes espontáneas del gen *SacB* y las colonias que debían haber insertado el gen *lacZ* y perdido la región de *SacB* sería justamente la presencia de la región de *LacZ*, y esto se tomó como base para buscar a las recombinantes DY380/BNaG1neo-LacZ de entre un fondo de bacterias que crecieron en medio mínimo con sacarosa. En la figura 15 se muestra la estrategia para identificar por hibridación con una sonda marcada radioactivamente, a las colonias que tuvieran la región de *LacZ* (que llevaran el cassette Nax-LacZ) de entre un fondo de mas de 500 colonias crecidas en sacarosa. Se hace evidente que la marca que presentaron las colonias señaladas con una flecha es de la hibridación de la región *LacZ* que el resto no tuvo y con estas colonias se continuó el trabajo para comprobar que hubieran insertado al cassette Nax-LacZ en el sitio planeado del inicio de la traducción del gen de Na_x .

La figura 16 muestra que ninguna de las clonas BAC DY380/BNaG1neo-LacZ hibridó con la sonda Na_x en los fragmentos esperados, por lo que ninguna correspondió a la recombinante que esperábamos sino que sólo hubo recombinación inespecífica. Un dato interesante que se puede destacar de esta figura, es que en la mayoría de las clonas BAC probadas (6 de 9) la sonda no hibridó con el fragmento correspondiente a la región del inicio de la traducción del gen de Na_x a donde iba dirigida, el cual debería estar presente aunque no hubiera ocurrido la recombinación específica, y de hecho no hibridó con ningún fragmento, sugiriendo que la clona BAC perdió específicamente esta región. En todas las

clonas probadas la cantidad de DNA transferido a la membrana de nylon es similar como se constata en la figura 16C. Este comportamiento ya se había hecho notar durante la modificación de las clonas BAC del gen del canal $Na_v1.7$.

Como se puede apreciar en la figura 13, la inserción de un cassette de recombinación homóloga en la zona del inicio de la traducción del gen de Na_x es posible, pero en un segundo paso de recombinación se presentaron dificultades que impidieron el reemplazo del gen por el segundo cassette de recombinación. Con esta observación lo más factible resultaría introducir y seleccionar en un solo paso las bacterias que incorporen al gen reportero *LacZ*. Esto se llevará a cabo en proyectos posteriores.

En este proyecto nos enfocamos al trabajo de recombinación homóloga específicamente mediado por el sistema RED proveniente del fago λ . Este sistema es el desarrollado más recientemente y presenta una serie de ventajas por las cuales fue escogido de entre los diferentes sistemas de recombinación homóloga de los cuales se habla más adelante. El caso es que el sistema no presenta inconvenientes respecto a su funcionalidad pues su capacidad para mediar la recombinación homóloga se hizo evidente en este trabajo en 4 ocasiones: en la recombinación del cassette Nav-Tc con el plásmido p6S58, El cassette Nc-Cm \leftrightarrow Ap con la cepa NC397, el cassette PGK/Tn5neo con la región vector de la BAC BNaG1, y en la recombinación del cassette Nax-ApSacB con la clona BAC BNaG1neo. Se observó que la eficiencia de recombinación puede variar mucho y esto podría depender básicamente de la región a modificar y también si la recombinación se da con un plásmido, con el cromosoma bacteriano, o con el vector de la BAC. La mayor eficiencia de recombinación observada fue al introducir el cassette Nax-ApSacB en la clona BAC BNaG1neo, sin embargo en el segundo paso de recombinación no se obtuvieron las recombinantes esperadas lo cual no sólo implica a la región a modificar, sino al número de recombinaciones necesarias para introducir al marcador deseado (tratar de hacer el menor número de pasos en la estrategia podría dar mejores resultados).

Existen otros sistemas utilizados para introducir genes reporteros a un sitio específico de un gen dado por medio de recombinación homóloga, como el que describieron Jessen *et al.*, (1998), en el cual se utilizó un método para modificar clonas BAC basándose en la

recombinación homóloga estimulada por secuencias-Chi (5' GCTGGTGG 3'; Smith *et al.*, 1981). Ellos usaron una construcción de “targeting” que llevaba al gen reportero *GFP* y al gen marcador de Km^R flanqueados por regiones de homología (3.6 Kb al 5' y 1.7 Kb al 3') al sitio del codón de iniciación del gen GATA-2 del pez cebra. A su vez las regiones de homología estaban flanqueadas por tres sitios Chi que promovían la recombinación por la vía de las recombinasas RecBCD. La elaboración de dicha construcción de targeting requiere de múltiples técnicas, como la elaboración de oligonucleótidos por cada extremo de homología, e inserción en plásmidos independientes, unión de plásmidos con ligasas, intercambio de sitios de origen de replicación necesarios, PCR para introducción de sitios de restricción, corte de nuevos fragmentos, además de rellenar extremos salientes para posteriores ligaciones con sitios Chi, entre otros menesteres que consumen tiempo y recursos. Por ser una recombinación dependiente de la vía RecBCD requiere que las clonas BAC permanezcan en cepas Rec⁺ lo que eleva la probabilidad de recombinaciones intramoleculares no deseadas dentro de las clonas BAC. Además la eficiencia de eventos de recombinación es proporcional a lo largo de las regiones de homología usadas en la construcción por lo que éstas deben estar en el rango de kilobases.

Otro sistema utilizado recientemente para modificar clonas BAC, es el reportado por Yang, *et al.*, (1997) que depende del sistema de recombinación RecA. Pero en este caso se hacen dos pasos de clonación para introducir dos fragmentos amplificados por PCR (homología al gen a modificar) a un vector que lleva un gen reportero, éste se debe subclonar en un segundo vector que lleva al gen de RecA y tiene un origen de replicación termosensible. Posteriormente se hace la recombinación mediada por RecA para generar cointegrados en las clonas BAC y se hace un segundo proceso de recombinación para integrar completo al gen reportero en la clona BAC teniendo que comprobar cada vez el producto obtenido por ensayos tipo Southern Blot. Este protocolo puede llevarse hasta dos meses y elevados recursos para concluirlo, entre otras desventajas como las ya observadas en el sistema mediado por Chi.

Por último, la finalidad de utilizar el sistema de cromosomas artificiales de bacterias (BAC) es la de abarcar la mayor cantidad de DNA genómico posible de los genes Na_v1.7 y Na_x y con esto asegurar que las secuencias que influyen en su transcripción puedan estar

presentes en la clona analizada aún si se encuentran a gran distancia de la región promotora del gen. Además se hace más notoria esta necesidad de utilizar clonas BAC para buscar elementos reguladores de transcripción, dado que ambos canales de sodio son expresados específicamente en neuronas del ganglio de raíz dorsal y además se encuentran contiguos en el genoma. A este respecto podemos citar el trabajo de Wong, *et al.*, (1999) con el que se hizo evidente que algunas secuencias implicadas en la regulación del gen RAG 1 (una recombinasa que cataliza la recombinación V (D) J en linfocitos) se encuentran al extremo 5' del gen contiguo RAG 2, y que esos elementos genéticos actúan regulando a ambos genes. Este descubrimiento no se hubiera realizado si el trabajo no se hubiera hecho utilizando clonas BAC. Por este motivo creemos indispensable trabajar con clonas BAC para evaluar si algún mecanismo similar pudiera regular a los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x .

Es por todo lo anterior que consideramos de gran importancia el encontrar las condiciones óptimas para la recombinación que nos den como resultado un gen como *LacZ*, reportando la actividad de los promotores transcripcionales de los genes $Na_v1.7$ y Na_x , en una región genómica de varias kilobases como las clonas BAC, con la posibilidad de ser transfectadas establemente en líneas celulares específicas.

Por el momento y cumpliendo con los objetivos del trabajo de tesis se concluye lo siguiente.

CONCLUSIONES

1.- La región del final del exón 1 y el principio del exón 2 en $Na_v1.7$ (67Kb), no pudo ser modificada con la estrategia de recombinación homóloga el sistema RED probablemente por la existencia de estructuras secundarias en el DNA.

2.- La estrategia y los cassettes de recombinación utilizados en este trabajo son mediadores de la recombinación homóloga específica dado que pudieron insertar genes en el plásmido p6S58, en el cromosoma de la cepa NC397 y en la clona BAC BNaG1.

3.- La inserción del gen *neo* en la región del vector de la clona BNaG1 la habilita para ser utilizada en experimentos de transfección estable en líneas celulares.

4.- Se insertó por medio de recombinación homóloga del sistema RED a los genes *Ap-SacB* en la región del inicio de la traducción del gen de Na_x en la clona BAC BNaG1neo, sin embargo estos genes no pudieron ser reemplazados por el gen de *LacZ* utilizando el mismo sistema. Se propone diseñar una estrategia de inserción del gen *LacZ* en un solo paso de recombinación.

BIBLIOGRAFIA

- Akopian Armen N., L. Sivilotti, J. Wood, (1996), "A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons", *Nature*; **379**: 257-262.

- Akopian Armen N., V. Souslova, L. Sivilotti, J. Wood, (1997), "Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel", *FEBS letters* **400**: 183-187.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D.,(1994), "Molecular Biology of the Cell", Third Edition, Garland Publishing Inc., New York, p. 808

- Altting-Mees MA, J. Short, (1989), "pBlueScript II: gen mapping vectors", *Nucleic Acids Res*; **17**: 9494.

- Anderson P. A.V., R. M. Greenberg, (2001), "Phylogeny of ion channels: clues to structure and function" *Comparative Biochemistry and Physiology* **129** 17-28.

- Andres M. E., Burger, C., Peral-Rubio, M.J., Battaglioli, E., Anderson , M.E., Grimes J., Dalloman J., Ballas M., G. Mandell, (1999) "CoREST: a functional corepressor required for regulation of a neural-specific gene expression". *PNAS* **96**, 9873-9878.

- Auld V.J., A. Goldin, D. Krafte, W. Catterall, H. Lester, N. Davidson, Dunn R., (1990), "A neutral amino acid charge in segment IIS4 dramatically alters the gating properties of the voltage-dependent sodium channel" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 323-327.

- Belcher S.M., C. Zerillo, R. Levenson, J. Ritchie, J. Howe., (1995), "Cloning of a sodium channel alpha subunit from rabbit Schwann cells", *Proc Natl Acad Sci.*, **92**: 11034-11038.

- Black JA, K. Langworthy, A. Hinson, Dib-Hajj, S. Waxman, (1997) "NGF has opposing effects on Na⁺ channel III and SNS gen expression in spinal sensory neurons", *Neuroreport* **8**: 2331-2335.

- Black JA, S. Dib-Hajj, K. McNabola, S. Jeste, M. Rizzo, J. Kocsis, S. Waxman, (1996), "Spinal sensory neurons express multiple sodium channel alpha-subunit mRNAs" *Brain Res.*, **43**: 117-31.
- Blomfield IC, V. Vaughn, R. Rest, B. Eisenstein, (1991), "Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon". *Mol Microbiol*, **5**: 1447-1457.
- Bolivar F, R. Rodriguez, P. Greene, M. Betlach, H. Heyneker, H. Boyer, (1977), "Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system", *Gene* **2**: 95-113.
- Brysch W, O. Creutzfeldt, K. Luno, R. Schlingensiepen, K. Schlingensiepen, (1991) "Regional and temporal expression of sodium channel messenger RNAs in the rat brain during development", *Exp Brain Res*, **86**: 562-567.
- Burke DT, Carle GF, Olson MV. (1987) "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors" *Science* **15**; 236: 806-812.
- Campbell A., (1984) "Types of recombination: common problems and common strategies", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **49**: 839-844.
- Cassuto E, Radding CM., (1971), "Mechanism for the action of lambda exonuclease in genetic recombination", *Nat New Biol* **229**: 13-16.
- Catterall W. A., (1995), "Structure and function of voltage-gated ion channels". *Annu. Rev. Biochem.* **64**:493-531.
- Catterall W.A., (2000), "Nomenclature of voltage-gated sodium channels", *Neuron* **28**: 365-368.

- Chong, J.A., Tapia-Ramirez J., Kim, S., Toledo-Aral J.J., Zheng Y., Boutros, M.C., Altshuler, Y.M., Frohman M.A., Jkraner, S.D., and Mandel G. (1995), "REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons", *Cell* **80**, 949-957.
- Court D. L., James A., Sawitze, L. Thomanson, (2002), "Genetic engineering using homologous recombination", *Annu. Rev. Genet.***36**: 361-388.
- Cummins T., J. R. Howe, S. Waxman, (1998) "Slow Closed-State Inactivation: A Novel Mechanism Underlying Ramp Currents in Cells Expressing the hNE/PN1 Sodium Channel", *J. of Neurosc*, **18**: 9607-9619.
- Darnell James, Harvey L., David B., (1993) "Biología celular y molecular", Segunda edición, Edit. Omega S.A., Barcelona España. p. 839-842.
- Dib-Hajj S, J. Black, T. Cummins, A. Kenney, J. Kocsis, S. Waxman, (1998), "Rescue of alpha-SNS sodium channel expression in small dorsal root ganglion neurons after axotomy by nerve growth factor in vivo", *J Neurophysiol*; **79**: 2668-2676.
- Felipe A., T. Knittle, K. Doyle, M. Tamkun, (1994), "Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse", *J of Biol. Chem.*, **269**: 30125-30131.
- Fjell J, T. Cummins, S. Dib-Hajj, K. Fried, J. Black, S. Waxman, (1999), "Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons", *Brain Res*, **67**: 267-82.
- Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, Bruns GA, Haines JL, Trofatter JA, Hanson MP, Rich J, McFarlane H, Yasek DM, (1990), "Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene", *Science* **6**; **250**: 1000-1002.

- García-Villegas M. R., S. Arni, M. Morales, A. López-Juárez., (2002¹) “caracterización funcional de los promotores de los canales de sodio $Na_v1.7$ y Na_x , dos de los genes de subunidades alfa de los canales de sodio. Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Colima, Mex, O75.
- García-Villegas M.R., M. Morales, (2002²), "Caracterización funcional del promotor del gene *Scn7* de ratón que codifica para el canal de sodio Na_x ", Memorias; XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Puerto Vallarta Jalisco Mex. 3-8 Nov 2002. C121.
- García-Villegas M. R., I. Guerrero, S. Arni. (2001), “Búsqueda funcional de reguladores genéticos de la expresión de los canales de sodio $PN1$ y NaG ”, V Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biología del Desarrollo, Septiembre 24-26, Querétaro Mex.
- García-Villegas M.R., R. Brehm P. G. Mandel. (2000), "Cloning and characterization of the $PN1$ sodium channel gene promoter, a gene preferentially expressed in peripheral nervous system. 30th Society of neurosciences., Annual meeting., November 4-9 Nueva Orleans Louisiana. USA.
- Gautron S., C. Gruszczynski, A. Koulakoff, E. Poiraud, S. López, H. Cambier, G. Dos santos, Y. Berwald-Netter., (2001), "Genetic and Epigenetic control of the $Na-G$ ion channel expression in glia" *Glia* **33**, 230-240.
- Gautron S., G. Dos Santos, D. Pinto-Henrique, A. Koulakoff, F. Gros, Y. Berwald, (1992), "The glial voltage-gated sodium channel: Cell-and tissue-specific mRNA expresión" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 7272-7276.
- Ge H, E. Martinez, C. Chiang, R. Roeder, (1996), "Activator-dependent transcription by mammalian RNA polymerase II: in vitro reconstitution with general transcription factors and cofactors", *Methods. Enzymol.*, **274**: 57-71.

- George A L. Jr, T.J. Knittle, M. Tamkun, (1992), "Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family", *Proc Natl Acad Sci*, **89**: 4893-4897.
- Goldin A. L., (2002) "Evolution of voltage-gated Na⁺ Channels" *J. of Exp. Biol.*, **205**, 575-584.
- Goldin A. L., (2001), "Resurgence of sodium channel research", *Annu. Rev. Physiol*, **63**:871-894.
- Goldin A. L., B. Barchi, J. Caldwell, F. Hofmann, J. Howe, J. Hunter, R. Kallen, G. Mandel, M. Meisler, Y. Netter, M. Noda, M. Tamkun, S. Waxman, J. Wood, W. Catterall. (2000), "Nomenclature of voltage-gated sodium channels", *Neuron*, **28**: 365-368.
- Gould III H., T. N., D. England, P. Denis, Z. Liu, P. Levinson R. (2000) "A possible role for nerve factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pain" *Brain Res*, **854**: 19-29.
- Grant S. G., J. Jessee, F. Bloom, D. Hanahan., (1990), "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants", *Proc Natl Acad Sci*, **87**: 4645-4649.
- Green ED, H. Riethman, J. Dutchik, M. Olson, (1991), "Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones", *Genomics* **11**: 658-669.
- Grimes J. A., Nielsen, S.J., Battaglioli, E., Miska, E.A., Speh, J.C., Berry, D.L., Atouf, F., Holdener, B.C., Mandel, G., and Kouzarides, T. (2000), "the corepressor mSin3A is a functional component of the REST-coREST complex." *J. Biol. Chem.* **275**, 9461-9467.

- Hanahan D. (1983), "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids", *J. Mol Biol*, **166**: 557-580.
- Hille B., (1992), "Ionic channels of excitable membranes", Second edition, Sinauer associates Inc. Soudreland Massachussets, p.p 594.
- Hiyama, T., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M., Yoshida, S., and Noda, M. (2002). "Nax channel involved in CNS sodium-level sensing." *Nature Neuroscience*. **5**: 511-512.
- Jessen J. R., A. Meng, R. McFarlane, B. Paw, L. Zon, G. Smith, S. Lin, (1998), Modification of bacterial artificial chromosome through Chi-stimulated homologous recombination and its application in zebrafish transgenesis" *PNAS*, **95**, 5121-5126
- Kandel R. J. Eric, T. Schwartz, T. Jessell, (2000), "Principles of neural science", Fuorth edition, Mc Graw-Hill, U.S.A., p. 341, 431.
- Karu AE, Y. Sakaki , H. Echols, S Linn, (1975), "The gamma protein specified by bacteriophage gamma. Structure and inhibitory activity for the recBC enzyme of *E. coli* " *J. Biol Chem* **250**: 7377-7387.
- Klugbauer N, L. Lacinova, V. Flockerzi, F. Hofmann, (1995), "Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells", *EMBO J*. **14**: 1084-90.
- Kovall R., B. Matthews, (1997), "Toroidal structure of lambda-exonuclease" *Science*; **277**: 1824-1827.
- Kraner SD, J. Chong, H. Tsay, G. Mandel. (1992), "Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation", *Neuron* **9**: 37-44.

- Lee E-Chiang, D. Yu, J. Martinez, L. Tessarollo, D. Swing, D. Court, N. Jenkins, N. Copeland., (2001), "A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA", *Genomics* **73**: 56-65.
- Lopreato Gregory F., Y. Lu, A. Southwell, N. Atkinson, D. Hillis, T. Wilcox, H. Zakon, (2001) "Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates" *PNAS* **98**: 7588-7592.
- López-Juárez Alejandro, García-Villegas M. R., (2002), "Modificación de clonas BAC por recombinación homóloga para identificar elementos de regulación de los genes de los canales de sodio Na_x y Na_v1.7", XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Puerto Vallarta Jalisco Mex. 3-8 Nov 2002. C-458.
- MacGregor G., C. Caskey, (1989) "Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells". *Nucleic Acids Res.* **17**: 2365.
- MacGregor G., A. Mogg, J. Burke, C. Caskey, (1987), "Histochemical staining of clonal mammalian cell lines expressing E. coli beta-galactosidase indicates heterogeneous expression of the bacterial gene". *Somat. Cell Mol. Genet.* **13**: 253-265.
- Mantyh P.W., S. Rogers, P. Honore, B. Allen, J. Ghilardi, J. Li, R. Daughters, D. Lappi, R. Wiley, D. Simone (1997) "Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor". *Science* **278**: 275 – 279.
- Maue R., S. Kraner, R. Goodman, G. Mandel, (1990), "Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements", *Neuron*; **4**:223-231.
- Miller J., (1992), "A short course in bacterial genetics" Cold spring harbor laboratory press, U.S.A., p 25.3.

- Morales M. A., (2004), "Caracterización funcional del promotor del gene Scn7A de ratón que codifica para el canal de sodio Na_x ", Tesis de licenciatura, FES Iztacala UNAM, p.p 68.
- Moreno R., C. A. Mendoza, H. Barrera. (1999), Transcripción genética en eucariontes: De los factores de transcripción a la enfermedad. Rev. Invest. Clin. **51**: 375-384.
- Murphy K. C., (1998), "Use of bacteriophage recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia. coli* " J. Bact., **180**: 2063-2071.
- Muyrers J.P., Zhang Y, Testa G, Stewart AF. (1999), "Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination", Nucleic Acids Res. **27**, 1555-1557.
- Noda M., S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takay, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. Raftery, T. Hirose, S. Inayama, S. Numa., (1984), "Primary structure of electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence" Nature **318**, 121-127.
- Ogata N., O. Yoshiaki, (2002), "Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na^+ Channels", Jpn. J. Pharmacol., **88**, 365-377.
- Owen R., D. Pitcher., (1985), "Chemical methods in bacterial systematics", Goodfellow y Minnikin Eds, Academic Press, London. , p. 67-93.
- Ptacek L. J., Trimmer, W. Agnew, J. Roberts, J. Petajan, M. Leppert. (1991) "Paramyotonia congenit and hyperkalemic periodic paralysis map to the same sodium-channel gene locus" Am J Hum Genet. 1991 **49**: 851-854.

- Rogart RB, Cribbs LL, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW., (1989), "Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform", Proc Natl Acad Sci. **86**: 8170-8174.
- Sambrook J., K. Davidl, (2001), "Molecular cloning, laboratory manual", 3ra edición, Cold Spring Habor Laboratory Press, New York U.S.A. pp 1954
- Shaying Z., (2001), "A comprehensive BAC resource" Nucleic Acids Res., **29**: 141-143.
- Schoenherr, C.J., and Anderson , D.A., (1995), "Silencing is golden: negative regulation in the control of neuronal gene transcription" Curr Opin Neurobiol **5**: 566-71.
- Sheen K., J. Chung, (1993), "Signs of neuropathic pain depend on signals from injured nerve fibers in a rat model",: Brain Res, **610**: 62-68.
- Shizuya H., B. Bruce, U. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, S. Melvin. (1992), "Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector", PNAS, **89**: 8794-8797.
- Short J.M., Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD. (1988), "Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties.", Nucleic Acids Res. **16**,: 7583-7600.
- Singer S. J., G. Nicholson., (1972), "The fluid mosaic model of the esturcture of cell membranes", Science, **175**: 720-731.
- Skalka A.M., (1977), "DNA replication-bacteriophage lambda", Curr. Top. Microbiol. Immunol. **78**: 201-237.
- Smith GR, Kunes SM, Schultz DW, Taylor A, Triman KL; (1981) "Structure of chi hotspots of generalized recombination", Cell, **24**: 429-436.

- Sternberg N., (1990), "Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs", Proc. Natl. Acad. Sci., **87** : 103-107.
- Stewart F., (2001) "Protocols for ET recombination.": <http://www.embl-heidelberg.de/Externalinfo/stewart/ETprotocols.html>.
- Strong M., G. Chandy, G. Gutmany, (1993), "Molecular Evolution of Voltage-sensitive Ion Channel Genes: On the Origins of Electrical Excitability" Mol. Biol. Evol. **10**: 221-242.
- Swaminathan S., H. Ellis, L. Waters, D. Yu, E. Lee, D. Court and S. Sharan. (2001), "Rapid Engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleótidos", Genesis, **29**: 14-21
- Tapia-Ramirez J., Eggen, B.J., Peral-Rubio, M.J., Toledo-Aral J.J., Mandel G. (1997), "A single Zinc Finger motif in the silencing factor REST represses the neural specific tpe II sodium channel promoter", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 1177-1182.
- Tjian R.(1995) "Molecular machines that control genes" Sci Am, **272**: 54-61.
- Toledo-Aral JJ., P. Brehm, S. Halegoua, G. Mandel, (1995), "A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability through sodium channel gene induction", Neuron **14**: 607-611.
- Toledo-Aral JJ., Brenda L. M., He J., Adam G., Whisenand S., Levinson S., Wolf J., Santiago I., G. Mandel., (1997), "Identification of PN1, a predominant voltaje-dependent sodium channel expressed principally in periferal neurons" PNAS, **94**: 1527-1532.

- Trimmer JS, W. Agnew, (1989), "Molecular diversity of voltage-sensitive Na channels", *Annu Rev Physiol* **51**: 401-418.
- Vega H., R. Félix, (2001), "Fisiopatología de los canales iónicos sensibles al voltaje" *Avance y Perspectiva*, **20**: 83-96.
- Watanabe E., A. Fujikawa, H. Matsunaga, Y. Yasoshima, N. Sako, T. Yamamoto, C. Saegusa, M. Noda (2000) "Nav2/NaG Channel Is Involved in Control of Salt-Intake Behavior in the CNS". *J. of Neurosc.*, **20**: 7743-7751.
- Waxman G., (2000), "The neuron as a dynamic electrogenic machine: modulation of sodium-channel expression as a basis for functional plasticity in neurons", *Phil.Trans. R. Soc. Lond.* **355**: 199-213.
- Waxman G., J. Kocsis, J. Black. (1994), "Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy", *J. Neurophysiol*, **72**: 466-470.
- Willetts N., R. Skurray, (1980), "The conjugation system of F-like plasmids", *Annu. Rev. Genet.*, **14**: 41-76.
- Wong Y., Z. Misulovin, H. Suh, R. Hardy, M. Jankovic, N. Yannoutsos, M. Nussenzweig, (1999), "Coordinate regulation of RAG1 and RAG2 by cell type-specific DNA elements 5' of RAG2.", *Science.*, **285**: 1080-1084.
- Yang X. W., P. Model, N. Heintz, (1997), "Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosom". *Nat. Biotech.*, **15**: 859-865.

- Yu D., H. Ellis, E-C Lee, N. Jenkins, N. Copeland, D. Court, (2000), "An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*" PNAS **97**: 5978-5983.
- Zhang Y, F. Buchholz, J. Muyrers, A. Stewart., (1998) "A new logic for DNA engineering using recombination in *E. coli*", Nat. Genet. **20**: 123-128.

ABREVIATURAS

Ap ^R :	Resistencia a ampicilina
BAC:	Cromosoma artificial de bacteria
Cm ^R :	Resistencia a cloranfenicol,
cpm:	Cuentas por minuto.
dATP:	Trifosfato de deoxiadenina
dCTP:	Trifosfato de deoxicitosina
dGTP:	Trifosfato de deoxiguanina
dH2O:	Agua desionizada
dTTP:	Trifosfato de deoxitimina
EDTA:	Etilendinitrilotetraacétato sódico
Kb:	Kilobase, mil pares de bases
<i>LacZ</i> :	Gen de la proteína β galactosidasa,
Mb:	Megabase, un millón de pares de bases
<i>neo</i> :	Gen de resistencia al antibiótico G418 en eucariotes y a Km en procariotes
Pb:	Par de bases
Primer	Secuencia iniciadora de la polimerización
Km ^R	Resistencia a kanamicina
rpm:	Revoluciones por minuto
<i>SacB</i> :	Gen de Sensibilidad a Sacarosa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SSC:	Amortiguador de cloruro y citrato de sodio
SSPE:	Amortiguador: NaCl, NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, EDTA
Tc ^R :	Resistencia a tetraciclina
TE:	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-EDTA
Tris-Cl:	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-HCl