



**Universidad Nacional Autónoma
de México**



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Inserción de EGFP en clonas BAC que
contienen el gen del canal de sodio Na_x .**



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

Augusto César Poot Hernández



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México
Mayo 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

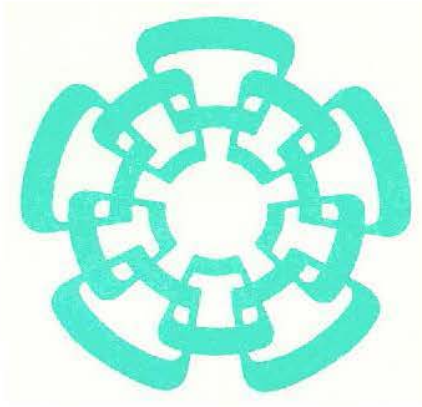


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Este trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología,
Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y
de Estudios Avanzados bajo la dirección de la Dra.
María del Refugio García-Villegas.

El autor fue becario de tesis de licenciatura por parte del CONACyT bajo
los fondos del proyecto número 43128-Q.

[hablando de una nueva interpretación de la historia de la vida y de que no hay premio novel para los paleontólogos] "...como rezan las viejas frases, usted no puede freír un huevo con su nueva concepción de la vida, o no puede viajar en metro, a menos que tenga también un boleto. (no creo siquiera que le sirva para obtener ni un solo kilómetro de pasajero frecuente. aunque casi cualquier otra cosa sirva para ello). Usted obtiene la gratitud de sus colegas paleontólogos, y ello no daña sus perspectivas de trabajo. Pero la principal recompensa debe ser la satisfacción, el privilegio de trabajar en algo excitante, la paz interna del logro, el raro placer de saber que tu vida ha sido diferente. ¿Qué otra cosa puede desear oír una persona, procedente de cualquier origen que honre como absoluto y permanente, que la única afirmación de que la vida ha sido útil: <<bien hecho, sirviente bueno y fiel>>"

=La vida Maravillosa (S.J.Gould)=

Esta tesis que se resistió a ser escrita esta dedicada a la vida... al cachito de vida que me toca a mí y al cachito de vida que le toca a todas aquellas personas que son importantes para mí...

Agradezco...

... a mis padres Elvira Hernández Pozo y Augusto C. Poot Manzanilla, por amarme tanto y apoyarme siempre.

... a Ma. del Refugio García Villegas, por introducirme y guiarme en el maravilloso mundo de la ciencia y la biología molecular.

... a Ramón V. Moreno Torres, por enseñarme tantas cosas y por ser mi amigo “Biologote”.

... a Jorge R. Gersenowies Rodríguez, por los Cordados y todos esos conocimientos que me ha transmitido.

... a mis sinodales Elías Piedra y Sergio Vaca y a todos mis maestros de la carrera, por todas las enseñanzas.

... al staff del laboratorio 38 del edificio de Fisiología II del CINVESTAV, por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo

... a la UNAM, la FES-IZ y la Biología, por formarme intelectualmente.

... a Mariana, por todo lo que me ha dado y por abrir cerraduras de mi vida que yo mismo no pude.

... a Gus por su gran amistad, por la evolución, las neurociencias, y todo lo que compartimos.

... a Thelma por confiar tanto en mí.

... y a todos mis amigos biólogos con los que compartí esta increíble travesía y que me han ayudado tanto y de diferentes maneras: Daniel, Elda, Chio, Hector, “Chaquis”, Martín, Erika, Marce, Laura y todos aquellos a los cuales no recuerdo en este momento.

Índice de contenido

1 RESUMEN.....	7
2 INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 Los canales iónicos: proteínas importantes para la función celular.....	8
2.2 La familia Na_v1 y el canal de sodio Na_x	9
2.2.1 ¿Quiénes son los canales de sodio voltaje-dependientes?.....	9
2.2.2 La estructura proteica de los canales de sodio de la familia Na_v1	12
2.2.3 El canal de sodio Na_x : su descubrimiento y la búsqueda de su función.....	14
2.2.4 Na_x es un canal de sodio concentración-dependiente y está involucrado en el comportamiento de ingesta de sal en ratón.....	17
2.2.5 Regulación genética del gen de Na_x : estudio en proceso.....	20
2.3 Regulación genética: proceso fundamental de la vida.....	21
2.3.1 La regulación transcripcional.....	23
2.4 Los cromosomas artificiales de bacteria (BAC).....	26
2.4.1 Clonas BAC y su importancia en el estudio de los genomas.....	26
2.4.2 Modificación de clonas BAC por medio de recombinación homóloga.....	27
2.4.3 Sistema de recombinación mediado por RecA.....	28
2.4.4 Sistema de recombinación RED.....	29
2.4.5 Sistema de recombinación mediado por RecE/T.....	30
3 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	31
4 OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo general.....	33
4.2 Objetivos particulares.....	33
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 Cepas bacterianas.....	34
5.2 Cromosomas artificiales de bacteria (BAC).....	35
5.3 Plásmidos.....	35
5.3.1 Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (miniprep), purificación por el método de fenol-cloroformo y precipitación etanólica.....	37
5.3.2 Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción para el análisis del patrón de corte por electroforesis.....	39
5.3.3 Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción para la ligación de fragmentos de DNA.....	39
5.3.4 Producción de extremos romos.....	39
5.3.5 Desfosforilación de moléculas de DNA.....	40
5.3.6 Ligación de fragmentos de DNA.....	41
5.3.7 Transformación de bacterias competentes.....	41
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
5.5 Ensayos de recombinación homóloga mediada por RecA.....	45
5.5.1 Preparación de bacterias electrocompetentes (protocolo corto) (Yu, et al, 2000).....	45
5.5.2 Electroporación y selección de co-integrados.....	46
5.5.3 Identificación de co-integrados.....	46
5.5.3.1 Hibridación tipo Southern.....	47
5.6 Ensayo de recombinación homóloga mediada por el sistema de recombinación RED.....	48
5.6.1 Preparación del cassette de recombinación A-EGFP-B.....	48
5.6.2 Ensayo de recombinación.....	49
5.6.3 Identificación de recombinantes por hibridación en colonia.....	50
6 RESULTADOS.....	52
6.1 Confirmación de la ausencia de sitios IRES en el gen reportero EGFP del plásmido pLD53.SCA-E-B.....	52
6.2 Modificación de clonas BAC con secuencias del gen de Na_x por recombinación homóloga mediada por RecA.....	53
6.2.1 Construcción del vector de recombinación pRNxE.....	55

6.2.1.1 Síntesis y clonación de la región 5' de homología A Box.....	55
6.2.1.2 Síntesis y clonación de la región 3' de homología B Box.....	55
6.2.2 Ensayo de recombinación homóloga mediada por RecA.....	58
6.2.2.1 Variaciones a los ensayos de recombinación homóloga mediada por RecA.....	65
6.3 Modificación de clonas BAC con secuencias del gen de Na _x por recombinación homóloga con el sistema RED.....	68
6.3.1 Ensayo con el sistema de recombinación homóloga RED.....	69
7 DISCUSIÓN.....	71
7.1 Construcción del vector de recombinación pRNxE.....	72
7.2 Ensayo de recombinación homóloga mediada por RecA.....	72
7.3 Ensayo de recombinación homóloga mediada por el sistema RED.....	75
7.4 La recombinación homóloga y el gen del canal Na _x	77
7.5 Alternativas para estudiar los elementos de regulación del promotor de Na _x	80
8 CONCLUSIONES.....	83
9 REFERENCIAS.....	84
10 ANEXO A: Composición de medios de cultivo y soluciones.....	89
11 ANEXO B: Mapas de plásmidos.....	93

Nombre de archivo: AA
Directorio: C:\Documents and Settings\PEDRO ANTONIO\Mis documentos\Augusto C Poot H\Tesis digital\doc
Plantilla: C:\Documents and Settings\PEDRO ANTONIO\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dot
Título: Índice de contenido
Asunto:
Autor: PEDRO ANTONIO
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 03/06/2007 11:53:00
Cambio número: 1
Guardado el: 03/06/2007 11:56:00
Guardado por: PEDRO ANTONIO
Tiempo de edición: 4 minutos
Impreso el: 03/06/2007 11:58:00
Última impresión completa
Número de páginas: 2
Número de palabras: 1,300 (aprox.)
Número de caracteres: 7,156 (aprox.)

1 RESUMEN

El canal de sodio Na_x es una proteína que es activada por el incremento en la concentración de sodio extracelular y se ha observado que está involucrada en el control del comportamiento de ingesta de sal en ratón. El gen de este canal presenta un patrón de expresión tejido específico muy variado, se ha observado su mRNA en tejidos como: corazón, pulmón, útero, algunas regiones del sistema nervioso central, y en mayor abundancia en los ganglios de raíz dorsal en el sistema nervioso periférico. En nuestro laboratorio se describió y caracterizó la región del promotor mínimo del gen de Na_x de ratón, y se observó que en un fragmento de 3.6 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción no se encuentran todos los elementos de regulación necesarios para su expresión tejido específica en células neuronales. Con el fin de obtener datos informativos sobre las secuencias de DNA que intervienen en la regulación transcripcional del canal Na_x , se planteó la modificación de clonas BAC que contienen regiones de este gen. Inicialmente se utilizó el sistema de recombinación *RED*, basado en recombinasas del fago λ , sin embargo, no se pudieron modificar las clonas BAC de la forma deseada (López-Juárez, 2002). Es por lo anterior, que el objetivo de este trabajo fue la modificación de clonas BAC que contienen regiones del gen de Na_x con la inserción del gen reportero EGFP, pero esta vez utilizando el sistema de recombinación basado en la proteína RecA (Gong, *et al.*, 2002). Este sistema implica: (1) la construcción de un vector de recombinación clonando dos regiones de homología a los flancos del gen reportero en el plásmido pLD53.SCA-E-B; (2) la recombinación de dicho vector con la clona BAC para formar un co-integrado; y (3) la resolución del co-integrado en un segundo evento de recombinación, para obtener la clona BAC modificada. Se construyó el vector de recombinación pRNxE clonando dos regiones de homología al gen de Na_x en el plásmido pLD53.SCA-E-B. Posteriormente al realizar los ensayos de recombinación para producir el co-integrado, observamos que la recombinación del vector no ocurrió en la clona BAC si no en el cromosoma bacteriano probablemente en la secuencia correspondiente al gen de RecA. Debido a esto ideamos una estrategia para seleccionar únicamente las clonas BAC recombinantes y eliminar los eventos de recombinación en el cromosoma bacteriano, sin embargo, no obtuvimos las clonas BAC modificadas. Con base en estos resultados, se propone obtener una cepa bacteriana donde se elimine por recombinación homóloga toda la secuencia del gen de RecA para reducir la recombinación en el cromosoma bacteriano y utilizar regiones de homología mayores a 1 kb para favorecer la recombinación en las clonas BAC.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Los canales iónicos: proteínas importantes para la función celular.

La célula es un sistema complejo que representa la unidad mínima de la vida y que se delimita a través de una membrana plasmática de naturaleza lipídica que separa la fase acuosa y de biomoléculas del interior de la célula, con el ambiente que la rodea; de igual forma, esta membrana, además de delimitar a la célula, permite la interacción con su ambiente, al modular el paso diferencial de iones y moléculas orgánicas a través de ella (Cooper y Hausman, 2004).

Existen diferentes mecanismos por los cuales una molécula pueden entrar o salir de la célula. Uno de estos mecanismos es la difusión facilitada mediada por canales iónicos. Los canales iónicos, son moléculas proteicas transmembranales que permiten el movimiento de moléculas polares y con carga eléctrica a través de la membrana ya que forman un poro o canal acuoso que cruza del lado intracelular al lado extracelular de la membrana (Aidley y Stanfield, 1998).

Estas moléculas son altamente selectivas, es decir, permiten el paso de solo uno o unos pocos tipos de iones; en su mayoría presentan una “compuerta” proteica que permite que el canal se encuentre en un estado que bloquee la entrada o salida de los iones lo cual les confiere la capacidad de modular el movimiento iónico a través de la membrana por medio de diferentes activadores fisiológicos como el potencial eléctrico de la membrana, o la presencia de alguna molécula activadora, como es el caso de los neurotransmisores; finalmente, el movimiento de los iones a través del canal se da gracias a la formación de gradientes de concentración o de carga eléctrica que permiten el desplazamiento de los iones hacia la dirección mas favorable, osmótica o eléctricamente, sin la necesidad de utilizar energía metabólica en forma de ATP (Aidley y Stanfield, 2001).

Los canales iónicos son de gran importancia para el funcionamiento de la célula ya que son los responsables de procesos tales como controlar el volumen de la célula, establecer el potencial

eléctrico de reposo en la membrana plasmática, propagar las señales eléctricas a lo largo de la membrana en las células excitables, permitir el flujo de iones Ca^{++} importantes para la señalización intracelular, y controlar el flujo neto del movimiento de iones y fluidos a través de las células epiteliales de tejidos secretores y excretores (Hille, 2001).

Existen canales con orígenes evolutivos en común y que pueden ser identificados por estructuras y/o funciones conservadas. Un ejemplo de estos canales es la superfamilia de canales voltaje-dependientes, los cuales son un conjunto de proteínas filogenéticamente relacionadas que, de manera general, reaccionan al cambio de voltaje en el potencial eléctrico de la membrana lo cual estimula que el canal se abra o se cierre al paso de iones; dentro de esta superfamilia podemos encontrar a las familias de canales de potasio, calcio y sodio voltaje-dependientes (Goldin, 2001b).

2.2 La familia Na_v1 y el canal de sodio Na_x .

2.2.1 ¿Quiénes son los canales de sodio voltaje-dependientes?

Los canales de sodio voltaje-dependientes (Na_v) son en un conjunto de proteínas cuyas características generales son (1) su permeabilidad a sodio, (2) su activación mediada por el cambio de voltaje de la membrana plasmática y (3) su rápida inactivación (Catterall, 2000). En mamíferos, estos canales están incluidos en una única familia protética y de genes homólogos (Na_v1) con más de 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Esta familia esta compuesta por un conjunto de 9 genes que codifican para canales que reaccionan al cambio de voltaje, $\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$, y un décimo gen, Na_x , que codifica para un canal cuyo activador fisiológico, en lugar de ser el cambio de voltaje de la membrana, es el incremento en la concentración de sodio extracelular (Ogata y Ohishi, 2002; Hiyama, *et al*, 2002) (figura 1).

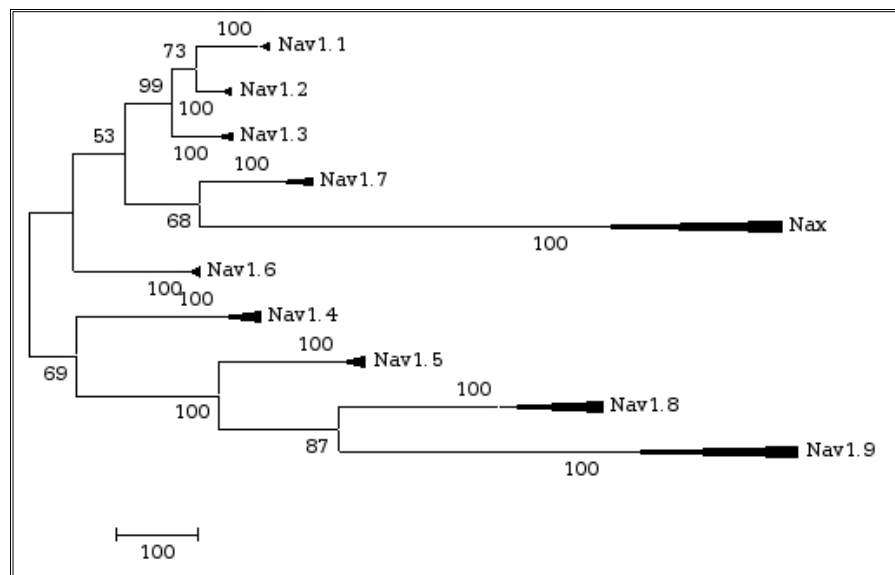


Figura 1: *Árbol filogenético de la familia Nav_v1, realizado por el método de máxima parsimonia. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de humano, rata y ratón se realizó con el programa Clustal X, la filogenia se construyó y se resumió con el método de máxima parsimonia utilizando el programa MEGA 3.1 (Kumar, et.al, 2004). La barra inferior representa 100 sustituciones de aminoácidos y las cifras en los nodos representan los valores de Bootstrap de 1000 repeticiones.*

Evolutivamente se propone que la familia de canales de sodio voltaje-dependientes tuvo un origen conjunto con el origen de los metazoarios y de las neuronas como células especializadas, ya que por un lado, no se ha reportado la existencia de canales de sodio voltaje-dependientes homólogos a esta familia en otros grupos de eucariontes, de hecho, los protozoarios usan generalmente Ca^{++} como acarreador de cargas positivas entrantes (Goldin, 2001a). Por otro lado, la función general de estos canales es la generación y propagación del potencial de acción en células excitables de animales, tales como las células musculares y las células nerviosas (Yu y Catterall, 2003).

Esta familia pudo tener su origen a partir de un gen de canal de calcio voltaje-dependiente, ya que ambas familias presentan una identidad en su secuencia de aminoácidos de alrededor del 29% y comparten una estructura tridimensional idéntica. Los canales de calcio a su vez pudieron originarse de la doble duplicación en *tandem* de un gen de canal de potasio voltaje-dependiente (Goldin, 2001a).

Los genes de los canales de la familia Nav_v1 de mamíferos, se encuentran distribuidos en cuatro grupos de genes ubicados en cuatro cromosomas diferentes relacionados con los genes Hox, lo cual a llevado a varios investigadores a proponer a esta familia como evidencia de peso para someter a prueba diferentes teorías sobre las duplicaciones del material genético a lo largo de la historia evolutiva de los vertebrados (Lopreato, *et al*, 2001; Goldin, 2001a; Novak, *et al*, 2006).

En consecuencia a lo anterior, estos genes han tenido la oportunidad de evolucionar por caminos diferentes al presentar algunas de las características propias de las familias de genes (Hunkapiller, *et al*, 1982) como la heterogeneidad en sus funciones, la evolución coincidental y el escudamiento de la selección natural, dando lugar a una intrincada “red” de regulación genética diferencial en tiempo y en espacio.

En la cuadro 1 se resumen algunos datos de los genes que integran esta familia, especialmente se indican los órganos o tejidos donde se ha reportado su expresión preferencial. Como se puede observar, estos genes tienen un patrón espacial muy específico. Hay genes que se expresan mayoritariamente en tejido nervioso ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$), hay un gen que se expresa en células gliales (Na_x); un gen que se expresa predominantemente en músculo cardiaco ($Na_v1.5$), y otro en músculo esquelético ($Na_v1.4$). Además, también hay evidencias de patrones de expresión temporal, como el gen del canal $Na_v1.3$ que se expresa durante el desarrollo embrionario y el gen de Na_x que se expresa en el útero durante la gestación (Goldin, 2001b, Ogata y Ohishi, 2002). Sin embargo, mucha de la investigación realizada sobre estos canales se ha enfocado principalmente en sus características electrofisiológicas o farmacológicas, dejando de lado los mecanismos que pueden estar involucrados en el control transcripcional de estos genes.

Es por su intervención fundamental en el funcionamiento y evolución de los metazoarios y por su intrincada “red” de regulación genética espacio temporal, que es importante el estudio de estos canales a nivel genético y transcripcional, con el fin de comprender mas sobre su función, sobre las enfermedades que se originan debido a mutaciones de estos genes (canalopatías), y tal vez, en un futuro, desarrollar vectores dirigidos de terapia génica basados en sus promotores.

Nombre formal	Otros nombres	Símbolo del gen	Localización cromosómica ¹	Sensibilidad a TTX ²	Localización predominante	Expresión en los GRD ³
$Na_v1.1$	typeI, ratI, Scn1a, HBSCI, GPBI	<i>SCN1A</i>	M:2 H:2q24	S	SNC, SNP	+++
$Na_v1.2$	typeII, ratII, HBSCII, HBA	<i>SCN2A</i>	M:2 H:2q23-24	S	SNC	+
$Na_v1.3$	TypeIII, ratIII	<i>SCN3A</i>	M:2 H:2q24	S	SNC (desarrollo embrionario), SNP, musculo esquelético, cardiaco, y otros.	Sobreexpresado posteriormente a una axotomia

Nombre formal	Otros nombres	Símbolo del gen	Localización cromosómica ¹	Sensibilidad a TTX ²	Localización predominante	Expresión en los GRD ³
Na _v 1.4	SkMI, <i>OI</i>	<i>SCN4A</i>	M:11 H:17q23-25	S	Musculo esquelético	-
Na _v 1.5	SkM2, rHI, HI	<i>SCN5A</i>	M:9 H:3p21	R	Musculo cardiaco	-
Na _v 1.6	typeIV, NaCh6, Na6, PN4, Scn8a, <i>SCN8A</i> CerIII		M:15 H:12q13	S	SNC, SNP, glías, Nodos de Ranvier	+++
Na _v 1.7	PNI, hNE, Nas	<i>SCN9A</i>	M:2 H:2q24	S	SNP, células de Schwann	+++
Na _v 1.8	SNS, PN3, NaNG	<i>SCN10A</i>	M:9 H:3p22-24	R	SNP (Neuronas sensoriales)	+++
Na _v 1.9	SNS2, NaN, NaT, SCN12A	<i>SCN11A</i>	M:9 H:3p21-24	R	SNP	+++
Na _x	Na _v 2.1, Na _v 2.2, Na _v 2.3, NaG	<i>SCN7A</i> (<i>SCN6A</i>), SCL11,	M:2 H:2q21-23	R	Corazón, útero (gestación), glías, SNP (GRD), pulmón, OCV ⁴ , próstata, testículos, riñón	+++ ⁵

Cuadro 1: Propiedades de las subunidades α de los canales de sodio voltaje dependientes y el canal Na_x. TTX:tetrodotoxina, GRD:ganglios de raíz dorsal, SNC:sistema nervioso central, SNP:sistema nervioso periférico. ¹H:humano, M:ratón; ²S:sensible, R:resistente; ³+++:abundante, +:presente, -:ausente; ^{4,5}datos tomados de Watanabe y colaboradores, 2000. Cuadro modificado de Ogata y Ohishi, 2002 y aumentada con los datos de Raymond, et al, 2004.

2.2.2 La estructura proteica de los canales de sodio de la familia Na_v1.

La subunidad α de los canales de sodio de la familia Na_v1 es una proteína transmembranal de aproximadamente 260 kDa que está constituida por cuatro dominios homólogos (I - IV) conectados entre si por asas intracelulares, y los cuales a su vez incluyen seis segmentos transmembranales (S1 – S6) (figura 2) (Catterall, *et al*, 2003). Esta subunidad puede estar acompañada por una o dos subunidades β , las cuales son proteínas integrales de la membrana con un dominio globular extracelular. La subunidad β ayuda principalmente a modular

las propiedades de activación y dependencia al voltaje de la subunidad α , son capaces de interactuar con proteínas de la matriz extracelular y aparentemente aumentan la eficacia de inserción de la subunidad α en la membrana celular (Goldin, 2001b).

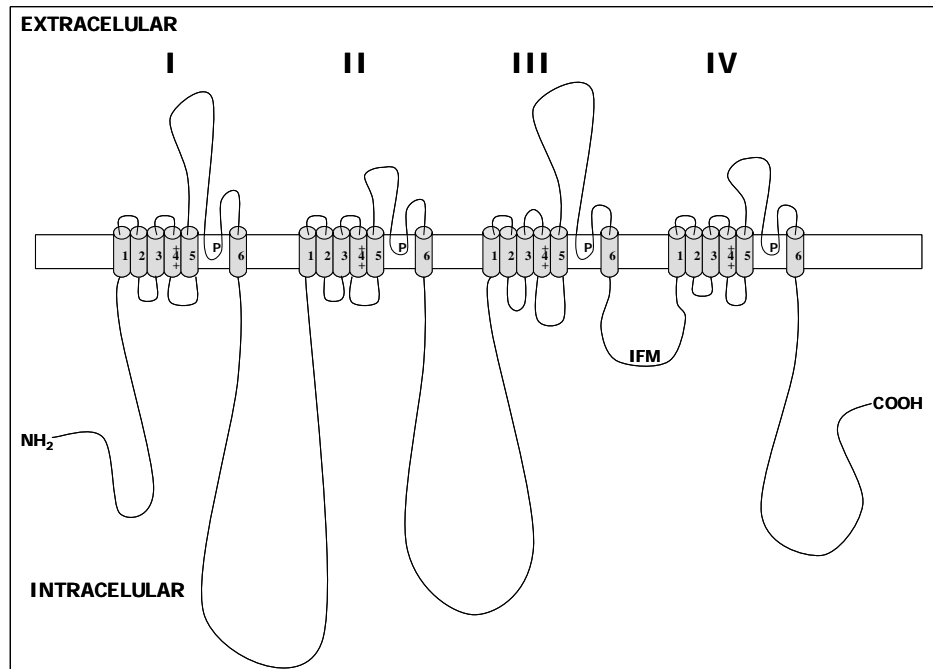


Figura 2: Subunidad α de los canales de sodio voltaje dependientes. Se componen por cuatro dominios homólogos (I - IV) unidos entre sí por asas intracelulares y compuestos cada uno por seis segmentos transmembranales (S1 - S6). El asa intramembranal "P" que une los segmentos S5 y S6 de cada dominio forma el poro; el segmento 4 es el encargado de reaccionar a los cambios de voltaje; y el asa que contiene el motivo "IFM" que une los dominios III y IV forma la compuerta de inactivación del canal (tomado de Novarovic et al. 2001 y modificado por Morales-Buendía, 2004).

Esta proteína presenta diversos motivos importantes para su función como canales de sodio voltaje-dependientes. El asa "P" que conecta los segmentos transmembranales S5 y S6 de cada dominio forma el poro del canal y es la región encargada de la selectividad iónica. Los segmentos transmembranales S4 de cada dominio son las regiones en donde se lleva a cabo la detección del cambio de voltaje y la encargada de la activación del canal. Finalmente, el motivo "IFM" que se encuentra en el asa intracelular que conecta los dominios III y IV es el encargado de la inactivación rápida del canal (Catterall, 2000).

2.2.3 El canal de sodio Na_x : su descubrimiento y la búsqueda de su función.

El RNA mensajero (mRNA) del canal de sodio Na_x fue reportado por primera vez en 1992 por George y colaboradores quienes lo aislaron de corazón de humano. La secuencia de aminoácidos

deducida de la secuenciación del cDNA de este mensajero fue comparada con la secuencia de dos de los canales de sodio voltaje-dependientes conocidos en ese momento (rata tipo I y tipo II), y se observó que compartía una identidad de aproximadamente 50% difiriendo principalmente en las secuencias involucradas en la detección de los cambios de voltaje (segmentos transmembranales S4) y de la inactivación rápida del canal (motivo "IFM"), por lo que le dieron el nombre de $Na_v2.1$, en donde el número "2" indicaba que se trata de una familia proteica diferente. También observaron por medio de hibridación tipo Northern que este mensajero se expresaba predominantemente en corazón y en útero de humano, y no así en riñón, corteza temporal de los hemisferios cerebrales, bazo, ni en células de tejido muscular liso. Por lo que se consideró como el canal voltaje-dependiente responsable de la generación de corrientes de sodio recurrentes y de lenta inactivación observadas con anterioridad en células cardiacas.

Ese mismo año, Gautron y colaboradores (1992) reportaron la secuencia parcial de un cDNA de canal de sodio de rata al que denominaron NaG, debido a que fue aislado de astrogliás. Observaron que este canal estaba relacionado con los canales de sodio voltaje dependientes y que tenía diferencias significativas en las regiones importantes para su funcionamiento. También observaron por medio de hibridaciones tipo Northern que este mensajero se expresaba en células de los ganglios de raíz dorsal (GRD) del sistema nervioso periférico, en la médula espinal, en el puente en la médula oblongada, en pulmón y en intestino.

Posteriormente Felipe y colaboradores en 1994 reportaron la secuencia completa de un cDNA de un canal de sodio aislado de células de tumor atrial de ratón, al que denominaron $Na_v2.3$ debido a su similitud en la secuencia de aminoácidos con el canal $Na_v2.1$ de George y colaboradores (1992), proponiendo que los canales de sodio $Na_v2.1$, NaG y $Na_v2.3$ eran miembros de la misma familia proteica independiente, pero relacionada con la familia de canales de sodio voltaje-dependientes que incluían al los canales de rata tipo I, II, III, SkM y cardiaco ($Na_v1.1$, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5 en la nomenclatura actual). Felipe y colaboradores (1994) también realizaron hibridaciones tipo Northern y observaron que el mRNA de este canal se expresaba en útero, corazón, cerebro y en músculo esquelético, y que además presenta un patrón de expresión temporal bien definido y diferente en cada uno de estos tejidos: mientras que en corazón y en cerebro hay un pico de expresión máxima en los días inmediatos antes del nacimiento, en músculo esquelético, la expresión de este canal aumentaba gradualmente hasta un pico máximo a los 21 días de vida. Por otro lado, en el útero de ratones hembras preñadas, observaron que la expresión de este canal aumentaba rápidamente en los dos días anteriores al nacimiento y disminuía de inmediato, lo que los llevó a proponer que este canal era el responsable de las contracciones del útero materno al

momento del nacimiento.

Tres años más tarde, Akopian y colaboradores (1997) reportaron el cDNA de un canal de sodio aislado de GRD de rata, cuya secuencia de aminoácidos era similar a los canales $Na_v2.1$, NaG y $Na_v2.3$. Este canal fue llamado SCL-1, se observó la presencia de su mRNA en varios tejidos y líneas celulares por hibridaciones tipo Northern y por RT-PCR (transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa).

Ese mismo año Felts y colaboradores (1997b), por su parte reportaron por medio de hibridaciones *in situ*, usando ribosondas complementarias para distintos mRNAs, la expresión temporal de varios canales de sodio voltaje dependientes, incluyendo NaG, en diferentes regiones del sistema nervioso central de rata en desarrollo; el mismo grupo de investigación (Felts, *et al*, 1997a) observó por hibridaciones *in situ* y por RT-PCR que el mRNA de NaG no se expresa únicamente en células gliales, sino también en otros derivados de la cresta neural como las neuronas de los GRD, del ganglio del trigémino y células satélite, con lo cual proponen que este canal es propio de algunos tipos celulares derivados de la cresta neural.

Durante el periodo de identificación de estos mRNAs se trató de caracterizar electrofisiológicamente estos canales en sistemas heterólogos, como los oocitos de *Xenopus levis* (Akopian, *et al*, 1997), las células ováricas de hamster chino (CHO) y las células HEK 293 (Felipe, *et al*, 1994), sin poder obtener ningún registro de corrientes iónicas, lo que llevó a varios investigadores a pensar que estos mRNAs correspondían a canales que no eran permeables a sodio ni voltaje-dependientes, o incluso, que se trataba de pseudogenes que se transcribían (Akopian, *et al*, 1997; Goldin, 2001b).

Posteriormente, en el año 2000 se estableció una nomenclatura estandarizada de los canales de sodio voltaje-dependientes para eliminar la confusión producida por la heterogeneidad de los nombres que se habían usado para estas proteínas, basándose en las nomenclaturas realizadas previamente para los canales de potasio y los canales de calcio voltaje-dependientes (Goldin, *et.al*, 2000). La clave para nombrar estos canales es escribir en primer lugar, el símbolo químico del principal ion al que es permeable el canal (Na), seguido por la inicial del principal activador fisiológico al que responde la proteína escrito en forma de subíndice (Na_v). Posteriormente se escribe el número de la subfamilia proteica (Na_v1) y el número del canal específico ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, ..., $Na_v1.9$). Finalmente, en caso de existir *splicing* alternativo se debe indicar escribiendo inmediatamente letras minúsculas en orden sucesivo (ej. $Na_v1.1a$). Los números de cada canal se asignaron de acuerdo al orden aproximado en el que se fueron descubriendo.

Dado que los canales $Na_v2.1$ en humano (George, *et al.*, 1992), $NaG/SCL-1$ en rata (Gaultron, *et al.*, 1992; Akopian, *et al.*, 1997) y $Na_v2.3$ en ratón (Felipe, *et al.*, 1994) no se habían podido caracterizar electrofisiológicamente se les dió el nombre de Na_x , y se consideraron como genes ortólogos, es decir, que representan el mismo gen en organismos diferentes, debido a que la similitud en la secuencia de aminoácidos entre ellos es de alrededor del 80%. Sin embargo, Na_x no se puede considerar como miembro de una subfamilia de canales de sodio independiente con un origen evolutivo separado, dado que en los análisis filogenéticos realizados por el método de máxima parsimonia (Goldin, *et al.*, 2000; y figura 1 en este trabajo) y en el análisis realizado por el método de probabilidad bayesiana (Novak, *et al.*, 2006) se puede observar que todos los canales de sodio voltaje-dependientes forman una única familia proteica, Na_v1 , en donde se incluye a Na_x quien está relacionado estrechamente con el canal $Na_v1.7$ (ver figura 1). Se le podría considerar como una familia diferente solo desde el punto de vista funcional, pero con la respectiva acotación de su origen y relación filogenética con los canales de sodio voltaje-dependientes.

2.2.4 Na_x es un canal de sodio concentración-dependiente y está involucrado en el comportamiento de ingesta de sal en ratón.

La función del canal de sodio Na_x comenzó a elucidarse con el trabajo realizado por Watanabe y colaboradores (2000) quienes generaron una línea de ratones transgénicos *knock in* en los que introdujeron el gen *lacZ* bajo el control transcripcional del gen de Na_x eliminando la expresión de este canal. Observaron que la falta del canal de sodio Na_x no es letal, y que el fenotipo de los ratones homocigotos mutantes es normal en cuanto a desarrollo y reproducción, salvo que estos ratones presentan un consumo anormal de sal ($NaCl$) en condiciones de deshidratación. Bajo estas condiciones, los ratones silvestres evitaron tomar agua con sal (0.3 M de $NaCl$), mientras que los ratones *knock in* no presentaron aversión por la solución salina.

Analizando el patrón de expresión de *lacZ* en estos ratones pudieron observar que Na_x se expresa predominantemente en las neuronas de los ganglios de raíz dorsal (GRD), en el ganglio del trigémino y en pulmón de embriones de ratón de 15 días de gestación (figura 3a). También se observó una expresión muy delimitada en el sistema nervioso central (figura 3b, c), destacadamente en el órgano subfornical (SFO, figura 3b) y en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT, figura 3c). Estos últimos son conocidos como los órganos circunventriculares sensoriales y son considerados como lugares importantes para el control iónico de los fluidos del cuerpo, ya que estos órganos no presentan barrera hematoencefálica y están separados del tercer ventrículo cerebral

únicamente por una capa de células endoteliales (Watanabe, *et al*, 2000; Noda, 2006).

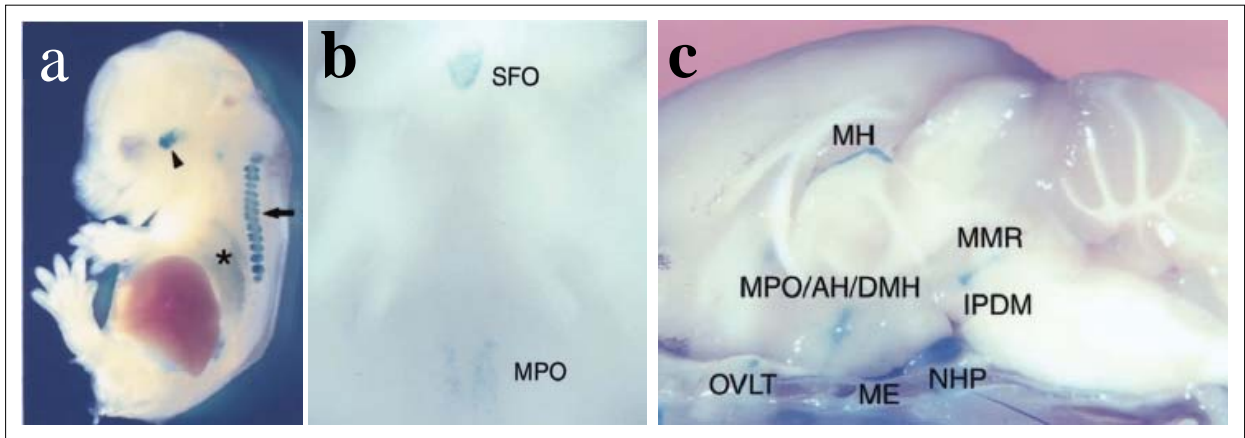


Figura 3: Expresión del gen *lacZ* bajo la regulación transcripcional del promotor del gen de Na_x . (a) Embrión de 15 días de gestación teñido con X-gal; la flecha señala los ganglios de raíz dorsal, la cabeza de flecha indica el ganglio del trigémino, y el asterisco indica el pulmón. Cerebros de ratón adulto teñidos con X-gal cortado coronalmente (b) y sagitalmente (c); SFO, órgano subfornical; MPO, área preóptica medial; MH, núcleo habenular medial; MMR, parte medial del rafe medio; AH, área anterior hipotalámica; DMH, hipotálamo dorsomedial; IPDM, núcleo interpeduncular de la parte dorsomedial; OVLT, órgano vasculoso de la lámina terminal; ME, eminencia media; NHP, neurohipófisis (tomado y modificado de Watanabe, *et al*, 2000)

Estas observaciones llevaron a este grupo de investigación a proponer que Na_x sirve como sensor de la concentración de Na^+ en los fluidos corporales, y que está involucrado en el comportamiento de ingesta de sal y en la regulación de sodio en el sistema nervioso en mamíferos (Watanabe, *et al*, 2000).

Posteriormente demostraron por medio de imágenes de pseudocolor en neuronas de GRD, del SFO y en células gliales de SFO de ratones *knock in* y silvestres (Hiyama, *et al*, 2002; Noda y Hiyama, 2005; Watanabe, *et al*, 2006), que Na_x es un canal que responde a cambios de concentración de Na^+ extracelular. Demostraron que este canal responde a Na^+ , pero no a Cl^- , a otros cationes o a la osmolaridad, además de que no es sensible a tetrodotoxina. También observaron que el umbral de activación del canal es de aproximadamente 150 mM, que no es dependiente de voltaje y que se inactiva cuando la concentración extracelular de Na^+ regresaba a los niveles normales (aproximadamente 145 mM) (Hiyama, *et al*, 2002).

Trabajos subsecuentes con los ratones *knock in* mostraron que el fenotipo anormal de ingesta de sal en condiciones de deshidratación no se debía a la alteración de la expresión de Na_x en los nervios de las entradas periféricas del gusto sino que se debe a la ausencia de la expresión del canal en el sistema nervioso central (Watanabe, *et al*, 2003). También comprobaron por medio de infusiones salinas directas en el tercer

ventrículo, que el SFO y no el OVLT es el lugar encargado de la detección del incremento en la concentración de Na^+ del líquido cefalorraquídeo por medio del canal Na_x , y que el fenotipo anormal de ingesta de sal se puede revertir con la introducción por medio de vectores adenovirales del cDNA de Na_x en el SFO (Hiyama, *et al*, 2004).

En otro estudio, demostraron por medio del análisis de la expresión de *lacZ* en los ratones *knock in* y de inmunotinción para Na_x en ratones silvestres, que este canal se expresa específicamente en las células alveolares tipo II en el pulmón. También observaron su expresión en células de Schwann no mielinizadas en nervios de diversos órganos como el corazón y la lengua, sin embargo, no se observó su expresión en las células propias de estos órganos (Watanabe, *et al*, 2002). Por lo anterior, la detección de Na_x reportada en otros trabajos por hibridación tipo Northern (George, *et al*, 1992; Gaultron, *et al*, 1992; Felipe, *et al*, 1994) o por microarreglos (Novak, *et al*, 2006) podría ser debido a la expresión del canal en las células de Schwann.

El último reporte realizado por este grupo de investigación reveló por medio de microscopía electrónica e inmunodetección con partículas de oro, que la localización subcelular de Na_x en el SFO y el OVLT es específicamente en los procesos laminares con los que los astrocitos cubren a las neuronas y a las sinapsis, y en las microvelocidades de las células endoteliales. También demostraron por medio de inmunotinciones para Na_x y para marcadores gliales y neuronales, que este canal es expresado en las células gliales y no en las neuronas (Watanabe, *et al*, 2006). Estas observaciones los llevaron a la conclusión de que las células gliales en el SFO son las encargadas de recibir la señal del cambio de Na^+ de los fluidos corporales, con lo cual se refuerza la idea emergente de que las células gliales tienen un papel activo en el proceso de transmisión de señales nerviosas (Noda, 2006)

En resumen, se ha observado *in vivo* la expresión específica del canal de sodio Na_x en (1) neuronas del ganglio de raíz dorsal; (2) células de Schwann no mielinizadas en nervios de distintos órganos; (3) células alveolares tipo II en el pulmón; y (4) células endoteliales y astrocitos en el SFO y el OVLT (Watanabe, *et al*, 2000; Watanabe, *et al*, 2002; Watanabe *et al*, 2006). Por lo anterior es probable que el canal Na_x lleve a cabo diversas funciones dado los distintos tipos celulares donde se expresa. Por el momento está comprobado que su expresión en el SFO tiene un papel central en el comportamiento de ingesta de sal en condiciones de deshidratación en el ratón.

Finalmente se puede proponer que Na_x permite equilibrar la concentración de Na^+ extracelular cuando ésta se eleva más de lo normal y probablemente ayuda a los canales de sodio epiteliales (no relacionados filogenéticamente con los canales de sodio voltaje-dependientes) a mantener el espacio alveolar libre de agua en el pulmón (Noda, 2006).

2.2.5 Regulación genética del gen de Na_x : estudio en proceso.

La proteína del canal de sodio Na_x está codificada por el gen *Scn7a*, el cual se encuentra en el brazo pequeño del cromosoma 2 de ratón. La región codificante del gen es de más de 100 kb y está conformada por 25 exones.

En nuestro laboratorio, Morales-Buendía (2004) clonó y caracterizó la región del promotor mínimo de este gen y observó que, al igual que el gen del canal de sodio $Na_v1.7$ (García-Villegas, *et al*, 2002), se transcribe de un solo promotor, presenta varios sitios de inicio de la transcripción y no presenta caja TATA, caja CAAT ni región rica en G/Cs.

El promotor se caracterizó funcionalmente usando una serie de construcciones de la región cercana al exón 1 acopladas a un gen reportero, a partir de un fragmento de DNA que incluye parte del exón 1 (correspondiente a la región 5' no traducida) y 3.4 kb río arriba del primer sitio de inicio de la transcripción (sitio +1). Estas construcciones se transflectaron en diferentes líneas celulares. Se observó que el fragmento que va de -49 a +189 es el fragmento más pequeño suficiente para obtener la mayor cantidad de expresión del gen reportero (García-Villegas, manuscrito en preparación); también se observó que la región de 3.4 kb río arriba del inicio de la transcripción, no incluye todos los elementos de regulación necesarios para su expresión específica en líneas celulares de origen neuronal (Morales-Buendía, 2004). El hecho de que el promotor mínimo sea activo en todas las líneas celulares probadas sugiere que el gen es regulado por represión en los tejidos que no expresan este gen de manera endógena y que los elementos encargados de ésta se encuentran distantes al promotor.

Por otro lado, otro grupo de investigación clonó y caracterizó el promotor mínimo del gen *Scn6a* que codifica para el canal de sodio Na_x de rata y, de manera similar, observaron que el gen se transcribe de un solo promotor, presenta varios sitios de inicio de la transcripción, y no tiene caja TATA (Poiraud, *et al*, 1999). Sin embargo, al momento de hacer la caracterización funcional de una secuencia de 11 kb que incluye ~6.5 kb río arriba del principal sitio de inicio de la transcripción, el exón 1, y ~4.5 kb del intrón 1, observaron que se encuentran los elementos de regulación necesarios para inducir la expresión específica en pulmón y células de Schwann. Estos

resultados estarían sugiriendo un modelo diferente al mencionado anteriormente, en donde las secuencias de regulación cercanas al promotor inducen la expresión en lugar de reprimirla. Posteriormente, publicaron un segundo reporte (Gautron, *et al*, 2001) en donde sugieren que la expresión de Na_x en astrocitos y células de Schwann esta influenciada por segundos mensajeros como el AMP cíclico, factores de crecimiento como el factor de crecimiento glial (GGF) y hormonas como los glicocorticoides.

Existen varios puntos de discrepancia entre los estudios de este grupo de investigación y los realizados en nuestro laboratorio que no serán detallados aquí, y que bien pueden ser el resultado de las diferentes metodologías utilizadas por ambos grupos de investigación para abordar el estudio de la transcripción del canal Na_x .

Para poder esclarecer el mecanismo molecular de la expresión del gen de Na_x es necesario seguir realizando estudios sobre las secuencias involucradas en su regulación transcripcional, por medio de diferentes estrategias como el uso de clonas BAC, ensayos de *footprinting* de DNA (huellas sobre el DNA), mapeo de sitios de hipersensibilidad a DNAsas y análisis computacionales para poder conocer con claridad las secuencias de DNA involucradas en la expresión de este gen y, así, poder comprender su regulación y tal vez obtener información adicional sobre su función.

2.3 Regulación genética: proceso fundamental de la vida.

La expresión genética es el flujo de la información desde el material genético hasta el fenotipo. Este proceso se da a partir de la información contenida en la secuencia de DNA de los genes en el genoma, la cual se transcribe (se copia) a una molécula de RNA, y ésta, en general, se traduce a una proteína que lleva a cabo una función. Entonces, el gen se puede considerar como una unidad informacional que se expresa genéticamente.

Los seres vivos tienen más genes de los necesarios para sobrevivir, lo cual les confiere una abundante plasticidad bioquímica y de funciones que les permite tener diferentes respuestas al estado de su ambiente. Sin embargo, todos estos genes no se expresan constante e indiscriminadamente, al contrario, están sujetos a un proceso estricto de modulación de su expresión llamado regulación genética. Es decir, la expresión de un gen está controlada por toda una gama de elementos que pueden ir desde la presencia de un carbohidrato como la lactosa en bacterias, hasta los complejos fenómenos de señalización celular en eucariontes pluricelulares; por lo tanto, este proceso es responsable de la gran capacidad de las bacterias de sobrevivir bajo diferentes circunstancias bioquímicas sin gastar energía innecesariamente en producir proteínas que no se necesitan y de los intrincados procesos de diferenciación celular en eucariontes (Pierce, 2003).

En eucariontes, la expresión genética es un complejo proceso integrativo de múltiples subprocesos interconectados (figura 4). Entre estos subprocesos destacan la descompactación de la cromatina que permite la interacción de diversas proteínas reguladoras con el DNA; estas proteínas son capaces de responder a diversos estímulos e intervienen en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción y en la síntesis misma del transcrito (elongación). Conjuntamente a la elongación, el transcrito o pre-RNA mensajero (pre-mRNA), es procesado, esto es, se le añade un trifosfatado de guanina en el extremo 5' del mensajero mediante un enlace 5'-3P-5' ("cap"), se le eliminan los intrones y se empalman los exones (procesamiento o *splicing*), y se le añade una cola de adeninas (poliadenilación) al extremo 3' del mensajero. Consecuentemente, el mensajero es empaquetado, transportado del núcleo celular al citoplasma y traducido a un polipéptido. Finalmente, el polipéptido es procesado para producir una proteína funcional (Orphanides y Reinberg, 2002).

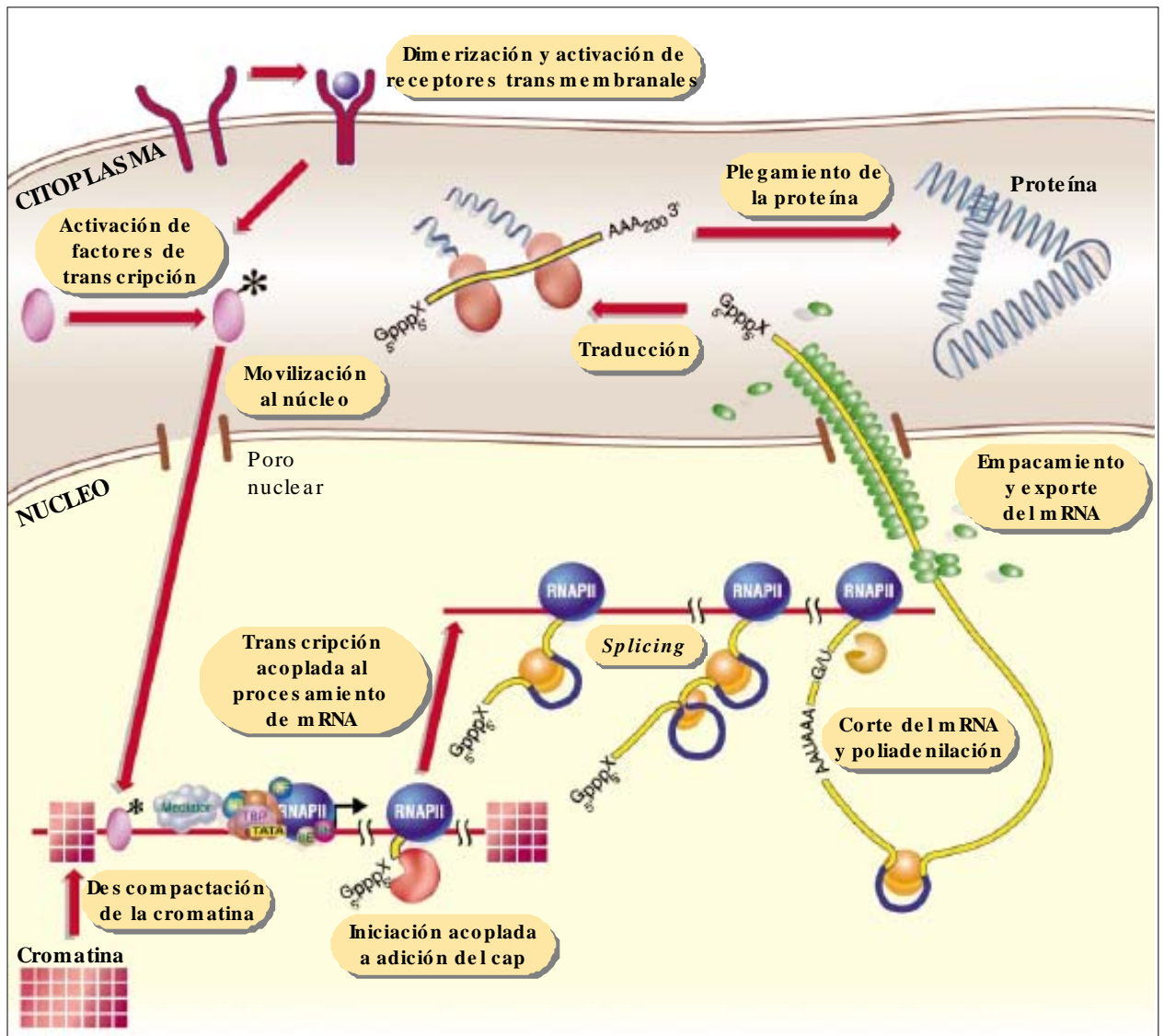


Figura 4: Modelo actual de la expresión génica en eucariotes. Es un proceso de múltiples subprocessos interconectados como la transcripción, el procesamiento y maduración del mRNA y la traducción, y no un conjunto de procesos independientes y discretos como se consideraba con anterioridad (Modificado de Orphanides y Reinberg, 2002).

Este proceso tan complejo puede ser regulado en diferentes etapas (Orphanides y Reinberg, 2002; Pierce, 2003): en la transcripción, en el procesamiento del mRNA, en la traducción y en el procesamiento y localización de la proteína funcional.

2.3.1 La regulación transcripcional.

La regulación de la transcripción es el punto más importante de regulación genética. Esta regulación se da gracias a la capacidad de diversas proteínas de asociarse al DNA en lugares específicos, y de interactuar con la RNA polimerasa, lo cual permite la síntesis de RNA a partir de un templado específico. Este templado específico de DNA son los genes.

Los genes son unidades transcripcionales. En eucariontes los genes que codifican para proteínas y son transcritos por la RNA polimerasa II, están conformados en general por los siguientes elementos (figura 5) (Lewin, 2004; Pierce, 2006):

- Una región codificante en la que se alternan exones e intrones.
- Una región mínima necesaria para inducir la transcripción, pero sin regulación específica, la cual se define funcionalmente y es llamada promotor mínimo o basal. En esta región puede encontrarse la secuencia de diversos elementos conservados como la caja TATA, la caja CAAT y/o el iniciador (Inr).
- Elementos de regulación en-cis que se pueden encontrar en la vecindad del promotor mínimo, tanto río arriba como río abajo del inicio de la transcripción.
- Elementos de regulación en-cis “lejanos” al promotor mínimo que pueden estar a decenas o centenas de kilobases (kb) río arriba o río abajo del gen, los cuales tiene una naturaleza modular y actúan independientemente de su posición y orientación. Si su acción es positiva para la transcripción, se denominan enhancers o aumentadores de la transcripción, mientras que si es negativa, se denominan silenciadores.

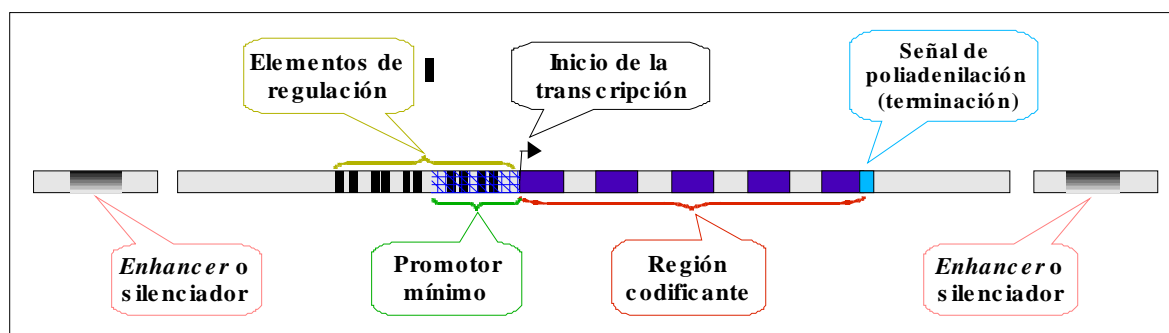


Figura 5: Componentes de una unidad transcripcional.

También existen otros elementos de regulación como los aisladores o *insulators* y las regiones controladoras de *locus* (LCR) que pueden delimitar y controlar *loci* completos con varios genes dentro de ellos (Lewin, 2004).

Tanto los promotores como los elementos de regulación son reconocidos por proteínas que se unen al DNA y permiten la transcripción. Estas proteínas son conocidas como factores de transcripción (figura 6).

Las proteínas mínimas necesarias para reconocer un promotor (con iniciador y/o caja

TATA) y transcribir un mRNA son denominadas factores generales de transcripción (TF_{II}A, TF_{II}B, TF_{II}D, TF_{II}F, TF_{II}E, TF_{II}H y TF_{II}J), los cuales, en conjunto con la RNA polimerasa II forman una holoenzima denominada maquinaria basal de transcripción (Lewin, 2004).

Sin embargo, la maquinaria basal de transcripción, no es suficiente para poder observar una transcripción específica. Son las proteínas que se unen a las secuencias de regulación (incluyendo los *enhancers* y silenciadores) las que son encargadas de generar los patrones de expresión característicos de cada gen. Estas proteínas ó factores de transcripción, pueden afectar la transcripción ayudando a reclutar la maquinaria basal, realizando cambios conformacionales o modificaciones covalentes en la maquinaria, o influyendo en la estructura de la cromatina (Goodrich, *et al*, 1996; Kodonaga, 2004).

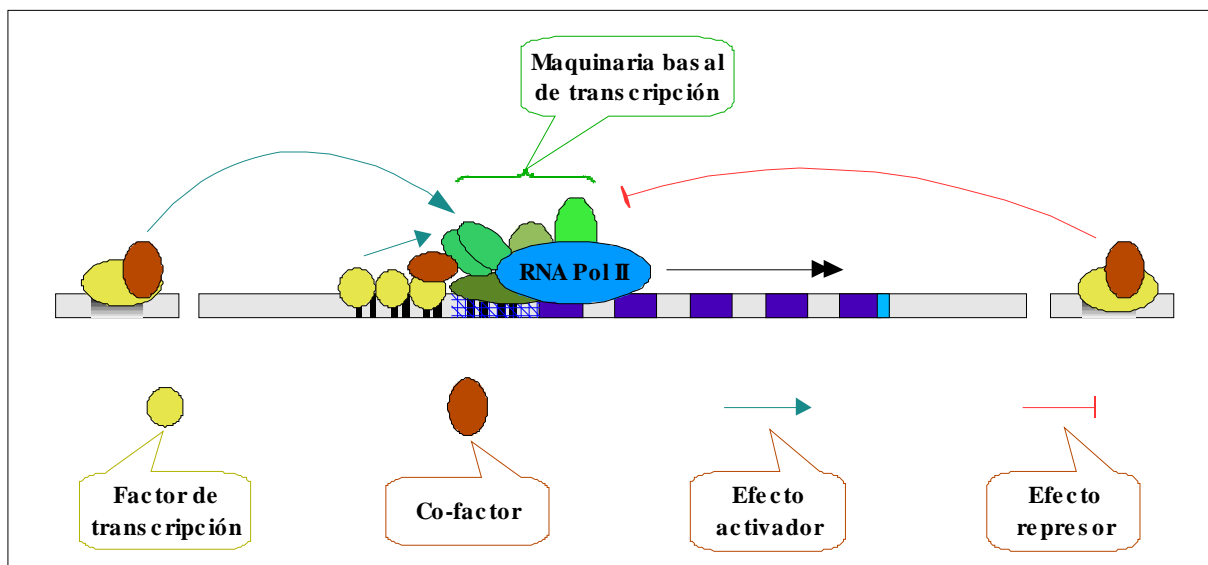


Figura 6: Factores proteicos que intervienen en la transcripción.

Cuando los factores de transcripción tienen un efecto positivo en la transcripción, son denominados activadores, y cuando el efecto es negativo, se denominan represores (Lewin, 2004). Los factores de transcripción son proteínas con múltiples dominios que les permiten unirse al DNA y tener contactos entre proteínas, en algunos casos, estos factores interactúan directamente con la maquinaria basal, mientras que en otros casos interactúan a través de proteínas que realizan contactos, proteína-proteína. Las proteínas reguladoras de la transcripción que no se unen al DNA y que ejercen su efecto a través de interacciones proteína-proteína son denominadas co-factores. Si su actividad

promueve la transcripción se denominan co-activadores y si la reprimen se denominan co-represores (Orphanides y Reinberg, 2002).

En resumen, la gran variedad de regulación genética tiempo, espacio y gen específica de los eucariontes es el resultado del gran número de contactos DNA-proteína y proteína-proteína en las secuencias reguladoras de cada gen (Goodrich, *et al*, 1996).

2.4 Los cromosomas artificiales de bacteria (BAC).

2.4.1 Clonas BAC y su importancia en el estudio de los genomas.

Los vectores de alta capacidad como los cromosomas artificiales de levadura (YAC), los cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC) y los cromosomas artificiales de bacteria (BAC) representan una herramienta muy útil para realizar estudios funcionales y sobre regulación genética, ya que son capaces de almacenar cientos de kilobases de DNA y en la actualidad se están desarrollando diversas tecnologías para manipularlos con relativa sencillez.

Las clonas BAC son vectores de alta capacidad derivados del plásmido F de *Escherichia coli* (Shizuya, *et al*, 1992), lo que les confiere la capacidad de mantenerse a un número de aproximadamente una copia por célula y de integrar fragmentos de DNA foráneo de hasta 300 kb. Debido a que están presentes en un número bajo de copias y a que se mantienen en un fondo genético *recA*⁻ (lo cual elimina el principal sistema de recombinación homóloga de la bacteria) en la cepa bacteriana DH10B, es difícil encontrar quimerismos o rearrreglos, a diferencia de lo que se ha observado en las clonas YAC. Adicionalmente, a diferencia de las clonas YAC, la extracción y purificación de las clonas BAC es mucho mas sencilla, ya que se puede extraer utilizando los protocolos convencionales de extracción de DNA plasmídico en bacterias.

Debido a la alta capacidad de almacenamiento de DNA, las clonas BAC se han usado ampliamente para la construcción de genotecas de genomas completos que se han utilizado en los proyectos de secuenciación de genomas. También permiten estudiar los genes y sus productos en un contexto genético que puede ser lo suficientemente completo para reproducir fielmente la expresión de un gen (Heintz, 2001).

Modificando adecuadamente las clonas BAC se pueden usar como herramientas de gran ayuda para hacer estudios funcionales y de regulación genética como: observar los

patrones de expresión de un gen, encontrar las secuencias involucradas en la regulación transcripcional de un gen, realizar estudios de mutagénesis dirigida, realizar proteínas de fusión, encontrar la localización subcelular de una proteína, sobreexpresar, subexpresar o expresar ectópicamente algún gen, expresarlo en un tiempo o tipo celular específico o en presencia de alguna señal o activador específico. Además se ha observado que las clonas BAC permiten producir ratones transgénicos y *knock out* mas eficientemente, ya que las grandes regiones de homología con el genoma permiten la recombinación homóloga (Heintz, 2001).

Las clonas BAC ofrecen tantas ventajas y funcionalidades, que se ha extendido su uso, he incluso se trabaja en la actualidad para generar mas bibliotecas de DNA que sean confiables y tengan representadas de varias formas genomas completos como el del ratón (Osoegawa, 2006).

2.4.2 Modificación de clonas BAC por medio de recombinación homóloga.

En paralelo a sus ventajas, las clonas BAC presentan una dificultad fundamental. Debido a su gran tamaño, no se pueden modificar por los métodos convencionales de ingeniería genética *in vitro*. Es decir no se puede cortar con enzimas de restricción y unir con ligasas, ya que una enzima de restricción podría cortar la clona BAC en cientos de fragmentos y no habría forma de reunirlos en la forma adecuada.

Para solventar esta dificultad se han desarrollado diferentes métodos para modificar las clonas BAC *in vivo* usando los mecanismos de recombinación homóloga presentes en bacterias y en bacteriófagos. La recombinación homóloga es el intercambio de DNA entre dos moléculas a través de regiones de secuencias idénticas u homólogas (Court, *et al*, 2002), y en general sucede en los organismos como estrategia para reparar el DNA y como una forma de producir variabilidad genética (Lewin, 2004).

Se han desarrollado básicamente tres estrategias diferentes para modificar clonas BAC por recombinación homóloga, las cuales se resumen en la cuadro 2.

Sistema de recombinación	Enzimas (origen)	Regulación del sistema	Localización del sistema	Requerimientos de homología	Molécula de recombinación	Referencias
RecA	RecA	Sin regulación	Plásmido	300-500 nt	Plásmido	Yang, et al,

Sistema de recombinación	Enzimas (origen)	Regulación del sistema	Localización del sistema	Requerimientos de homología	Molécula de recombinación	Referencias
	(<i>E. coli</i>)				denominado vector de recombinación	1997; Gong, et al, 2002
RED	<i>exo</i> , <i>bet</i> y <i>gam</i> (fago λ)	Represor termosensible	Cromosoma bacteriano en forma de profago defectivo	40-50 nt	Molécula lineal amplificada por PCR denominada cassette de recombinación	Yu, et al, 2000; Lee, et al, 2001; Swaminathan, et al, 2001; Warming, et.al, 2005
RecE/T	RecE, RecT (profago Rac) y <i>gam</i> (fago λ)	Dependiente de L-arabinosa	Plásmido	40-50 nt	Molécula lineal amplificada por PCR denominada cassette de recombinación	Narayanan, et al, 1999

Cuadro 2: Sistemas de recombinación homóloga diseñados para modificar clonas BAC. Se muestran algunas de sus características principales. nt: nucleótidos.

2.4.3 Sistema de recombinación mediado por RecA.

El sistema de recombinación homóloga mediada por la proteína RecA de *Escherichia coli* se basa en el hecho de que las clonas BAC se mantiene en la cepa bacteriana DH10B que es deficiente de esta proteína. Entonces al restituir la proteína RecA introduciéndola en las bacterias en un plásmido es posible que se lleve a cabo la recombinación entre dos moléculas con secuencias idénticas u homólogas (Yang, et al, 1997; Gong, et al, 2002).

En la última versión de este sistema (Gong, et al, 2002) tanto la molécula de recombinación como el gen de RecA se introducen en un plásmido denominado vector de recombinación.

RecA necesita regiones de homología de entre 300 y 500 nucleótidos y actúa uniéndose a una molécula de DNA de cadena sencilla y alineándola con su cadena complementaria. Esta proteína es capaz de invadir una molécula de DNA de cadena

doble para aparear las secuencias complementarias y posteriormente otro grupo de proteínas completan el proceso de intercambio de cadenas (Court, *et al*, 2002).

Existe una variación de este sistema, en la cual se usan secuencias *chi* para aumentar la eficiencia de recombinación por RecA, ya que se ha observado que dichas secuencias potencializan la acción de RecA (Jessen, *et al*, 1998)

2.4.4 Sistema de recombinación RED.

El sistema de recombinación homóloga RED, está basado en las proteínas *exo*, *bet* y *gam* del bacteriófago λ , este sistema fue introducido en el cromosoma bacteriano en forma de profago y le eliminaron por recombinación homóloga las secuencias necesarias para la inducción del fago a la fase lítica, por lo tanto, el sistema está “anclado” al cromosoma de *E. coli*. Las proteínas *exo*, *bet* y *gam* se encuentran bajo el control del promotor P_L , el cual se encuentra reprimido por el represor termosensible cl_{857} . Este represor permanece activo a 32°C, y se puede inactivar por un cambio de temperatura de 32 a 42°C para permitir la transcripción del promotor P_L . Este sistema termosensible permite, a diferencia del sistema mediado por RecA, modular la expresión de las proteínas encargadas de la recombinación y evitar que la presencia indiscriminadas de enzimas produzca rearrreglos en las moléculas de DNA (Yu, *et al*, 2002).

Posteriormente se asoció este sistema con recombinasas sitio específicas como *Cre* y *Flp* (Lee, *et.al*, 2001) y más recientemente con una estrategia para seleccionar positiva y negativamente con el gen *galk* (Warming, *et al*, 2005), incluso se está buscando la forma de llevar esta estrategia a otras especies de bacterias (Copeland, *et al*, 2001)

Este sistema es capaz de utilizar moléculas lineales para la recombinación, llamados cassettes de recombinación, en cuyos extremos tengan regiones de homología de entre 40 y 50 nucleótidos. Debido que se necesitan regiones de homología pequeñas para que este sistema funcione, los cassettes de recombinación pueden sintetizarse por PCR sin necesidad de construir plásmidos especiales. El uso de cassettes lineales de recombinación es posible gracias a que *gam* inhibe la actividad de nucleasa de la enzima RecBCD, quien es la encargada de degradar todo DNA lineal que entra en la bacteria. La proteína *exo*, funciona como exonucleasa de 5' a 3', dejando una región de cadena sencilla 3' saliente. Posteriormente *bet* se une a la región 3' saliente y lleva a cabo el alineamiento con la secuencia complementaria en el momento de la replicación de

DNA. Finalmente las enzimas encargadas de la replicación se encargan de hacer el intercambio de las cadenas, es por esta razón que el sistema de recombinación *RED* requiere necesariamente que alguna de las moléculas que van a recombinar sea un replicón, de otra forma no se puede llevar a cabo la recombinación homóloga (Court, *et al*, 2002).

2.4.5 Sistema de recombinación mediado por RecE/T.

El sistema de recombinación RecE/T se basa en el uso de las proteínas RecE y RecT del profago *Rac* (similar al fago λ) que se han encontrado en algunas cepas de *E. coli*. Esas proteínas son homólogas a *exo* y *bet* respectivamente, y por lo tanto su mecanismo de acción es similar, funcionan también con secuencias de homología pequeñas de entre 40 y 50 nucleótidos (Court, *et al* 2002)

Narayanan y colaboradores (1999) diseñaron un método a partir de estas proteínas. Construyeron un plásmido de recombinación en el que se clonaron los genes *recE*, *recT* y *gam* (este último del fago λ) bajo el control del promotor P_{BAD} dependiente de L-arabinosa, de esta manera, se induce la expresión de las proteínas de recombinación únicamente al agregar L-arabinosa al medio de cultivo bacteriano.

Nombre de archivo: AAA
Directorio: C:\Documents and Settings\PEDRO ANTONIO\Mis documentos\Augusto C Poot H\Tesis digital\doc
Plantilla: C:\Documents and Settings\PEDRO ANTONIO\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dot
Título: 1
Asunto:
Autor: 3
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 03/06/2007 11:25:00
Cambio número: 3
Guardado el: 03/06/2007 11:31:00
Guardado por: PEDRO ANTONIO
Tiempo de edición: 8 minutos
Impreso el: 03/06/2007 11:31:00
Última impresión completa
Número de páginas: 23
Número de palabras: 7,157 (aprox.)
Número de caracteres: 39,364 (aprox.)

3 ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio se ha estado trabajando en el estudio de la regulación transcripcional del gen del canal de sodio Na_x . Las evidencias que se han obtenido sugieren que el promotor de este gen se regula por represión. Sin embargo, los elementos de regulación encargados de su expresión específica en neuronas no se encuentran en la vecindad del promotor (Morales-Buendía, 2004).

Es por lo anterior que se ha planteado el uso de clonas BAC para hacer un análisis funcional de grandes regiones de DNA genómico alrededor del promotor de Na_x con el fin de poder identificar las secuencias de DNA involucradas en su regulación transcripcional específica en neuronas. Para cumplir este objetivo, es necesario insertar un gen reportero en clonas BAC que contengan regiones de le gen del canal de sodio Na_x , de manera que el gen reportero quede bajo la regulación transcripcional del promotor de Na_x .

En este contexto, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio por López-Juárez (2004), se buscó modificar clonas BAC que contienen regiones de los genes que codifican para los canales de sodio Na_x y $Na_v1.7$ con la inserción del gen reportero *lacZ* usando el sistema de recombinación homóloga *RED* (Yu, *et al*, 2000).

En general, la estrategia experimental implicó dos pasos de recombinación homóloga. El primero, para insertar un gen de resistencia a un antibiótico en la secuencia blanco realizando una selección positiva y el segundo, para sustituir el gen de resistencia por el gen reportero *lacZ* a través de una selección negativa.

Los resultados que obtuvo no fueron los deseados. En el caso de la clona BAC que contiene regiones del gen del canal $Na_v1.7$ no ocurrió el primer paso de recombinación, aún y cuando se varió el sitio de inserción y el gen de selección. Sin embargo, se comprobó que el sistema de recombinación *RED* funcionara correctamente, al poder

introducir el gen de resistencia a tetraciclina en un plásmido que contiene un fragmento de 11 Kb del gen de $Na_v1.7$ que incluye la secuencia blanco.

En el caso de la clona BAC que contiene al gen de Na_x , se pudo realizar con éxito el primer paso de recombinación insertando el gen de resistencia a ampicilina, sin embargo, se presentaron dificultades para realizar la sustitución del gen de resistencia por el gen reportero *lacZ*. Por otro lado, se comprobó nuevamente el funcionamiento correcto del sistema *RED* al sustituir el gen de resistencia a cloranfenicol presente en el vector de la clona BAC por el gen de resistencia a kanamicina, con el fin de usar dicha clona BAC modificada para la producción de transfectantes estables en diferentes líneas celulares, y poder hacer estudios de regulación genética.

Finalmente, López-Juárez (2004) propone la inserción del gen reportero y el gen de selección en un solo paso de recombinación o la utilización de otra estrategia para modificar clonas BAC como alternativas para solventar los problemas que se presentaron.

Posteriormente, se intentó introducir el gen reportero de la proteína verde fluorescente (EGFP) en clonas BAC que contienen regiones del gen de Na_x en un solo paso de recombinación homóloga mediada por el sistema *RED* (Lee, *et al*, 2000). Para llevar a cabo esta estrategia, era necesario amplificar por PCR un cassette lineal de recombinación que contendría el gen de EGFP y el gen de resistencia a kanamicina flanqueados por dos regiones de homología a la secuencia blanco. Desafortunadamente, no fue posible llevar a cabo la amplificación del cassette con éxito, debido a dificultades con uno de los oligonucleótidos utilizados para sintetizar por PCR el cassette de recombinación (Poot-Hernández, A.C., resultados no publicados).

Es por lo anterior que en este trabajo se utilizó el sistema de recombinación basado en la recombinasa RecA de *E. coli* (Gong, *et al* 2002) para llevar a cabo la inserción del gen reportero EGFP en clonas BAC de DNA genómico de ratón de tal manera que quede bajo la regulación del promotor del gen de Na_x .

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Insertar el gen reportero de la proteína verde fluorescente (EGFP) en clonas BAC que contienen regiones del gen del canal de sodio Na_x de ratón utilizando un sistema basado en la recombinasa RecA, de tal manera que el reportero EGFP quede bajo la regulación transcripcional del promotor del gen de Na_x.

4.2 Objetivos particulares.

- Amplificación por PCR de dos fragmentos de homología al gen de Na_x (A Box y B Box) correspondientes a los flancos del codón de inicio de la traducción.
- Clonación de los fragmentos de homología en el plásmido pLD53.SCA-E-B, flanqueando al gen de EGFP.
- Inserción del gen reportero EGFP en las clonas BAC sustituyendo el codón de inicio de la traducción del gen de Na_x por recombinación homóloga mediada por el plásmido pLD53.SCA-E-B modificado.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas.

En la cuadro 3 se muestran las cepas bacterianas de *Escherichia coli*, que fueron usadas en este trabajo, se indica su genotipo, y el uso que se les dió.

CEPA DE <i>E. coli</i>	GENOTIPO	USOS
DH5 α (Gibco BRL)	F ⁻ ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+)</i> <i>phoA supE44 λthi-l gyrA96 relA1</i>	Mantenimiento de plásmidos con origen de replicación ColE1
DH10B (Gibco BRL)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lac74 recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK λ-rpsL (Str^R) nupG</i>	Mantenimiento de clonas BAC
Pir2 (Invitrogen)	F ⁻ Δ <i>lac169 rpoS</i> (Am) <i>robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA</i> (Δ MluI):: <i>pir</i>	Mantenimiento de los plásmidos con origen de replicación R6K γ (pLD53.SCA-E-B y sus derivados)
EL250 (Lee, <i>et al</i> , 2001)	DH10B [<i>λcl857 (cro-bioA) \diamond araC-P_{BAD}flp</i>]	Modificación de clonas BAC usando el sistema de recombinación homóloga RED

Cuadro 3. Cepas bacterianas de *E. coli* que fueron usadas para la realización de este trabajo. Se indica su genotipo y el uso que se les dio.

De manera general, las bacterias fueron cultivadas en medio LB (la composición de los medios de cultivo se listan en el Anexo A) a una temperatura de 37°C. La cepa Pir2 portadora de los plásmidos pLD53.SCA-E-B y sus derivados se cultivaron predominantemente en medio NZCYM con el fin de obtener un mayor número de células, y por consiguiente, una mayor cantidad de DNA plasmídico, ya que estos plásmidos se replican a un número bajo de copias en esta cepa bacteriana (al rededor de 15 copias por célula). Por otro lado, la cepa EL 250 portadora del sistema de recombinación RED,

se cultivó a 32°C, debido a que este sistema se encuentra bajo la regulación del promotor *PL* con el represor termosensible *ci857* el cual permanece reprimido a esta temperatura.

5.2 Cromosomas artificiales de bacteria (BAC).

En la figura 7 se muestran los mapas de los Cromosomas Artificiales de Bacteria (BAC) utilizados en este trabajo, BNax1 y RP23-83A3, y las regiones del gen de Na_x de ratón que contienen. La clona BNax1 contiene en su secuencia 3.5 kb del promotor y toda la región codificante del gen; mientras que la clona RP23-83A3 contiene el promotor de Na_x precedido de aproximadamente 13.5 Kb, y un fragmento de la región codificante de aproximadamente 75.8 Kb.

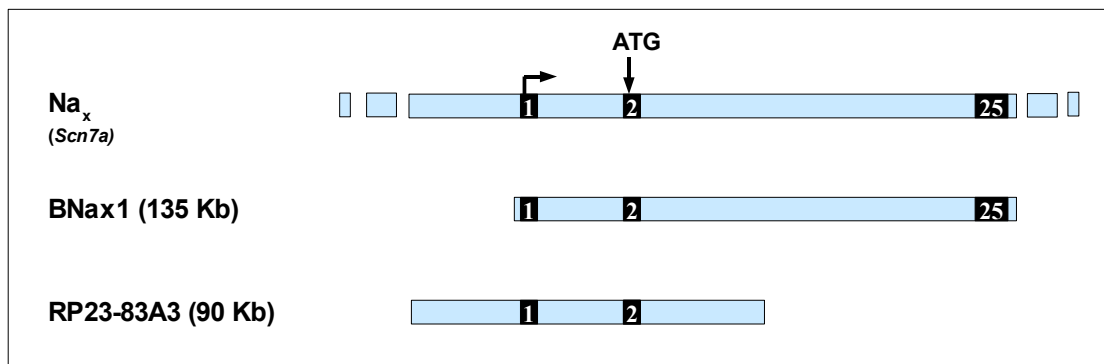


Figura 7: Mapa de las clonas BAC utilizadas para hacer los experimentos de inserción del gen reportero *EGFP* por recombinación homóloga. El mapa superior, muestra una representación del gen *Scn7a* de ratón que codifica para el canal de sodio Na_x , los mapas subsiguientes, corresponden a las clonas BAC *Nax1* y *RP23-83A3* respectivamente. Se esquematizan en cuadros negros los primeros dos exones (1 y 2) y el último exón (25); en el exón 1 se indica con una flecha en escuadra el primer sitio de inicio de la transcripción y en el exón 2 se indica la ubicación del codón "ATG" de inicio de la traducción.

5.3 Plásmidos.

En el cuadro 4 se muestran algunas características de los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo. Los mapas de estos plásmidos se incluyen en el anexo B.

Los plásmidos fueron construidos por métodos convencionales de DNA recombinante y analizados por digestión con enzimas de restricción y por electroforesis

en gel de agarosa.

Plásmido	Referencia	Antibiótico de selección *	Descripción
pLD53.SCA-E-B	Gong <i>et al.</i> , 2002	Amp (50 µg/ml)	Plásmido diseñado para poder llevar a cabo la recombinación homóloga mediada por RecA. Contiene un gen de recombinación (RecA), un gen de selección positiva (amp ^r), un gen de selección negativa (SacB), un gen reportero (EGFP) y un origen de replicación dependiente de la proteína π (R6K γ), que solo permite la replicación en la cepa Pir2
pLDAbx	Este trabajo	Amp (50 µg/ml)	Derivado de pLD53.SCA-E-B con la región de homología de Na _x “A Box”, amplificada por PCR y clonada al extremo 5' del gen de EGFP
pRNxE	Este trabajo	Amp (50 µg/ml)	Derivado de pLDAbx, con la región de homología de Na _x “B Box”, aislada de pGEMBbox y clonada al extremo 3' del gen de EGFP
pGEMBbox	Este trabajo	Amp (100 µg/ml)	Región de homología de Na _x “B Box” amplificada por PCR y clonada en pGEM-T Easy Vector
pGEM-T Easy Vector	Promega	Amp (100 µg/ml)	T-Vector diseñado para clonar fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando la A terminal que agrega la DNA <i>Taq</i> polimerasa, siguiendo la actividad de lacZ
pEGFP-1	Clontech	Kan (100 µg/ml)	Vector diseñado para realizar estudios de expresión transcripcional.

Cuadro 4: Plásmidos utilizados y contruidos en este trabajo. Se indica la referencia de construcción, el antibiótico de selección y una breve descripción de la molécula. * Entre paréntesis se indica la concentración del antibiótico. Amp, ampicilina. Kan, Kanamicina.

La técnica propuesta por Gong y colaboradores (2002) de modificación de clonas BAC por recombinación homóloga basada en RecA requiere de la construcción de un vector de recombinación a partir del plásmido pLD53.SCA-E-B (en adelante pLD53), en el cual se deben clonar dos regiones de homología a la gen blanco (denominadas “A Box” y “B Box”) flanqueando al gen reportero de la proteína verde fluorescente (EGFP).

El plásmido pLDAbx se construyó clonando la región de homología “A Box”, la cual se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(ver mas adelante para detalles sobre las PCRs y los oligonucleótidos utilizados), en el extremo 5' del gen de

EGFP del plásmido pLD53.

Posteriormente, el plásmido pGEMBbox se construyó amplificando por PCR el fragmento de homología "B Box" el cual se clonó en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector (Promega), con el fin de poder usar dicho fragmento para generar sondas radioactivas para realizar el análisis posterior por Southern Blot de las clonas BAC sometidas a la recombinación homóloga.

Finalmente, el vector de recombinación pRNxE, se construyó cortando el fragmento B Box del plásmido pGEMBbox el cual se clonó al extremo 3' del gen de EGFP en el plásmido pLDAbx.

5.3.1 Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (miniprep), purificación por el método de fenol-cloroformo y precipitación etanólica.

De manera general, el DNA plasmídico y de clonas BAC se extrajo de cultivos bacterianos por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001a) en su modalidad de miniprep de la siguiente manera:

Se transfirieron colonias bacterianas independientes en tubos de ensayo con 5 ml de caldo de cultivo conteniendo el antibiótico adecuado, y se colocaron en la incubadora con agitación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se colectó el total de cada cultivo bacteriano en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, centrifugando a máxima velocidad por 1 minuto, y se agregaron 200 µl de solución I de lisis alcalina (para ver la composición de las soluciones, consultar el Anexo A) para resuspender las pastillas bacterianas. Una vez suspendidas homogéneamente las bacterias, se agregaron 400 µl de solución II de lisis alcalina recién preparada para lisar las bacterias y se mezcló por inversión cada tubo de 4 a 6 veces; inmediatamente, se agregaron 300 µl de solución III de lisis alcalina fría para neutralizar la reacción de lisis, y se mezcló nuevamente por inversión. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos limpios, donde se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, se mezcló bien, y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a máxima velocidad por 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y centrifugando los tubos a máxima velocidad durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire durante 5 minutos.

Los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 μ l de agua bidestilada y desionizada esteril (H_2O MilliQ) para el caso de los plásmidos, y 30 μ l para el caso de las clonas BAC. Finalmente, se comprobó la presencia de DNA por electroforesis en gel de agarosa y se almacenaron los tubos a una temperatura de $-20^{\circ}C$.

En algunos casos fue necesario hacer una purificación extra al DNA, por ejemplo, para la digestión con la enzima de restricción Fse I, o para limpiar y liberar lo mas posible de sales al DNA de clonas BAC para ser electroporadas. En estos casos se utilizó el método de fenol-cloroformo y precipitación etanólica (Sambrook y Russell, 2001b). Dicho método, se llevo a cabo de la siguiente manera:

Se llevó la solución de ácidos nucleicos a un volumen de 450 μ l en un tubo de microcentrífuga y se agregó acetato de sodio pH 7.5 a una concentración final de 0.3 M. Se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente para formar una emulsión homogénea; inmediatamente se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Se recuperó la fase acuosa donde se encuentran diluidos los ácidos nucleicos y se colocó en un tubo de microcentrífuga limpio, donde se agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio, se agregó 1 ml de etanol absoluto frío para precipitar los ácidos nucleicos y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la muestra a máxima velocidad durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos, se eliminó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron los ácidos nucleicos en 50 μ l de H_2O MQ para el caso de los plásmidos, y en 30 μ l para el caso de las clonas BAC, se comprobó la presencia de DNA por

electroforesis y se almacenó la solución a -20°C .

Para el caso de los plásmidos o clonas BAC utilizadas para electroporación, la pastilla de ácidos nucleicos se lavó tres veces con etanol al 70%, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales posible.

5.3.2 Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción para el análisis del patrón de corte por electroforesis.

De manera general, para comparar los patrones de restricción de los plásmidos en geles de agarosa, las reacciones de digestión se llevaron a cabo utilizando 3 unidades de enzima de restricción por μg de DNA, 1x del *buffer* de corte 10x apropiado para cada enzima y 1x de BSA 10x, dejando incubar durante 1 hora a la temperatura especificada para cada enzima.

5.3.3 Digestión de DNA plasmídico con enzimas de restricción para la ligación de fragmentos de DNA.

La digestión de fragmentos de DNA para posteriormente ser ligados, se realizó utilizando 5 unidades de enzima por μg de DNA, 1x del *buffer* de corte 10x apropiado y 1x de BSA 10x, dejando incubar la reacción generalmente durante toda la noche, a la temperatura especificada para cada enzima.

5.3.4 Producción de extremos romos.

Cuando los extremos producidos por las enzimas de restricción en dos moléculas de DNA que se requería ligar no eran complementarios, fue necesario producir extremos romos o parejos, para poder llevar a cabo la reacción de ligación.

Si el extremo de DNA producido por una enzima de restricción era 5' saliente, entonces se produjeron extremos romos usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche) agregando a la reacción de digestión mezcla de dNTP's (dATP, dGTP, dTTP y dCTP en proporciones equimolares) a una concentración final de 300 nM y 3 unidades del fragmento Klenow, aforando la reacción a 30 μl e incubando la

mezcla durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se corrió el total de la mezcla en una electroforesis, se cortó la región del gel donde se encontraba el fragmento de DNA deseado, y se extrajo usando el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el DNA en 15 a 30 μ l de Tris 10 mM, pH 8.0.

Por otro lado, si el extremo de DNA producido por la enzima de restricción era 3' saliente se produjeron extremos parejos utilizando la DNA polimerasa *Pfu* (Stratagene). Para lo cual, el DNA de la reacción de digestión se purificó por el método de fenol-cloroformo, se precipitó con etanol (ver arriba) y se resuspendió en 16 μ l de H₂O MilliQ. Posteriormente se preparó la reacción que contenía 1x de buffer 10 x para *Pfu*, 500 nM de dNTP's y 2.5u de la enzima *Pfu* llevando la reacción a un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó a 72°C durante 30 minutos en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (Applied biosystems) y se corrió el total del volumen en una electroforesis, se cortó la región del gel con el fragmento de DNA deseado y se extrajo utilizando el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el DNA en 15 a 30 μ l de Tris 10 mM, pH 8.0.

Después de cada paso de purificación, se comprobó la presencia de DNA y se estimó su concentración corriendo una alícuota de muestra en un gel de agarosa.

5.3.5 Desfosforilación de moléculas de DNA.

La desfosforilación elimina los grupos fosfatos de los extremos 3' del plásmido producidos por las enzimas de restricción, y por lo tanto, ayuda a reducir los falsos positivos al momento de la ligación ya que evita que el plásmido se religue con sigo mismo.

La desfosforilación se realizó utilizando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) (Gibco BRL) para lo cual, el DNA plasmídico purificado en el paso anterior se llevó a 45 μ l con H₂O MilliQ, se agregó 1x de buffer 10x para CIAP y 1u de enzima CIAP. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 1 hora a 50°C. Transcurrido el tiempo, se inactivó la enzima incubando la reacción a 75°C durante 10 minutos en

presencia de EDTA a una concentración final de 5mM. Finalmente se purificó el DNA utilizando el método de fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en 20 μ l de H₂O MilliQ.

5.3.6 Ligación de fragmentos de DNA.

Las reacciones de ligación entre dos moléculas de DNA se llevaron a cabo utilizando la ligasa de DNA del fago T4 (Invitrogen). Para lo cual se realizó una mezcla que contenía 50 ng de DNA plasmídico cortado; el fragmento de DNA que se pretendió ligar en una relación molar 1:10 plásmido:fragmento; 1x de buffer de ligación 5x y 1u de ligasa de T4, en un volumen final de 20 μ l y se incubó la reacción a 16°C durante toda la noche.

La ligación de fragmentos de PCR en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega) se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.3.7 Transformación de bacterias competentes.

Las bacterias que fueron transformadas con DNA plasmídico se prepararon mediante un método químico usando RbCl.

Para transformar las bacterias competentes con DNA plasmídico, se tomó una alícuota de bacterias congeladas a -70°C y se descongeló colocándola en un baño de hielo-agua para mantenerlas en frío. Posteriormente, se tomaron 100 μ l de bacterias y se mezclaron con 1 μ l de solución de DNA plasmídico.

Inmediatamente se les dió un choque térmico incubando las bacterias durante 1 minuto y 45 segundos a 42°C y se colocaron rápidamente al baño de hielo-agua donde se mantuvieron durante 2 minutos. Después del choque térmico, se agregaron 900 μ l de medio LB, se mezclaron bien y se sembraron de 1 a 10 μ l en cajas petri con agar LB y el antibiótico de selección, finalmente se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Para transformar bacterias con la reacción de ligación, se tomó una alícuota de bacterias congeladas, se descongelaron y se colocaron inmediatamente en un baño de hielo-agua. Se tomaron 100 μ l de bacterias, se mezclaron con 10 μ l de la reacción de

ligación y se incubaron durante 30 minutos en baño de hielo-agua. Posteriormente se les dió un choque térmico incubando las bacterias durante 1 minuto y 45 segundos a 42°C, e inmediatamente se colocaron en el baño de hielo-agua durante 2 minutos.

Posteriormente se agregon 900 µl de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C para que se recuperaran. Después del tiempo de recuperación, se sembraron 100 µl de bacterias en agar LB con el antibiótico adecuado; el resto de las bacterias se colectaron centrifugando a 8000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 100 µl de medio de cultivo, los cuales se sembraron en agar LB con el antibiótico correspondiente. Finalmente, se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue usada en este trabajo para tres fines particulares.

En primer lugar, se uso para secuenciar el extremo 5' del gen de EGFP en el plásmido pLD53 en busca de algún sitio interno de unión a ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés). Para lo cual se utilizó el kit de secuenciación BigDye3.1 (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando el oligonucleótido RecAprimer (ver cuadro 6) como *primer* para la polimerasa (ver cuadro 5). Posteriormente se precipitó el producto con etanol absoluto (ver arriba), se lavó dos veces la pastilla con etanol al 70%, y se mandó a la Unidad de Ácidos Nucleicos del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados para su secuenciación.

En segundo lugar, se utilizó para la síntesis de las dos regiones de homología al gen de Na_x (A Box y B Box) que posteriormente se clonaron en el plásmido pLD53. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos (ver cuadro 6) a partir de la secuencia de la clona BAC RP23-83A3 (número de acceso al GeneBank, AL928720) de tal manera que ambas regiones de homología flanquearan el codón de inicio de la traducción de Na_x (figura 8). En la secuencia de estos oligonucleótidos se agregaron sitios de

reconocimiento para enzimas de restricción, con la finalidad de hacer una clonación dirigida en el plásmido pLD53 (ver cuadro 6). Para realizar la reacción, se usó el sistema de PCR *Taq* polimerasa High-Fidelity (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante (ver cuadro 5). Finalmente se comprobó la síntesis de los productos deseados corriendo una alícuota de la reacción en una electroforesis, y se purificó el producto del gel utilizando el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega).

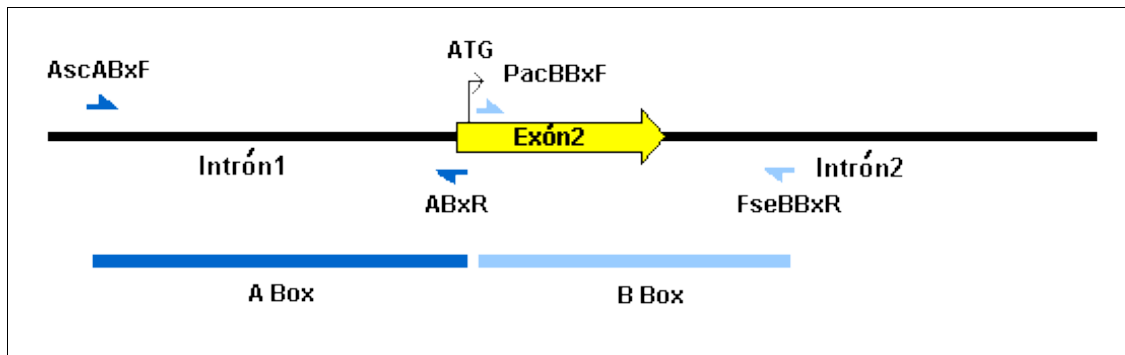


Figura 8: Regiones de homología A Box y B Box. Se muestran las posiciones de los oligonucleótidos que fueron diseñados para la amplificación de las regiones de homología A Box y B Box en relación con el gen de Na_x . Se indica el exón 2, los intrones 1 y 2 y el codón de inicio de la traducción de Na_x ; también se esquematiza en la parte inferior las regiones que fueron sintetizadas por PCR.

En tercer lugar, la PCR se utilizó para comprobar la formación del co-integrado entre la clona BAC y el vector de recombinación pRNxE (ver más adelante), para lo cual se realizó la PCR directamente de colonias bacterianas. Se levantó una colonia de bacterias y se diluyó en 20 μ l de H₂O MQ, y se incubaron en agua hirviendo durante 10 minutos para lisar a las bacterias. Posteriormente se realizó la reacción con la enzima *Taq* polimerasa (Biolabs) siguiendo las indicaciones del fabricante utilizando los oligonucleótidos RecAprimer (sentido) y FseBBxR (antisentido), y el lisado de bacterias como templado (ver cuadro 5); finalmente se analizaron los productos corriendo una alícuota de la reacción en una electroforesis.

Reacción (volumen final)	Componentes	Ciclos
Secuenciación del plasmido pLD53.SCA-E-B (20 µl)	-Buffer 1x BigDye -RecAprimer 500 nM (primer) -230 ng pLD53 (templado) -4 µl BigDye v3.1 (Applied Biosystems)	D -96°C,1' [D -96°C,10"/ A -50°C,5"/ E -60°C,4']x25 4°C,α
Síntesis de A box (50 µl)	-Buffer 1x 1.5 mM MgCl ₂ -dNTPs 250 nM -400 nM AscABxF (primer) -400 nM AbxR (primer) -5 ng BAC Nax1 (templado) -4 u <i>Taq</i> polimerasa High Fidelity (Roche)	D -94°C,5' [D -94°C,30"/ A -50°C,30"/ E -72°C,45"]x10 [D -94°C,30"/ A -50°C,30"/ E -72°C,45" Δ 5']x20 E -72°C,7' / 4°C,α
Síntesis de B box (50 µl)	-Buffer 1x 1.5 mM MgCl ₂ -dNTPs 250 nM -400 nM PacBBxF (primer) -400 nM FseBBxR (primer) -5 ng BAC Nax1 (templado) -4 u <i>Taq</i> polimerasa High Fidelity (Roche)	D -94°C,5' [D -94°C,30"/ A -51°C,30"/ E -72°C,45"]x10 [D -94°C,30"/ A -58°C,30"/ E -72°C,45" Δ 5']x20 E -72°C,7' / 4°C,α
Comprobación de la formación de co-integrado (25 µl)	-Buffer 1x 1.5 mM MgCl ₂ -dNTPs 250 nM -400 nM RecAprimer (primer) -400 nM FseBBxR (primer) -11 µl lisado de bacterias (templado) -0.5 u <i>Taq</i> polimerasa (Biolabs)	D -94°C,2' [D -94°C,15"/ A -55°C,15"/ E -72°C,2'15"]x10 [D -94°C,15"/ A -65°C,15"/ E -72°C,2'15" Δ 5']x20 E -72°C,5' / 4°C,α

Cuadro 5: Composición y ciclos de las reacciones de PCR realizadas. D- desnaturalización. A-alineamiento, E-elongación. Δ-Indica que en cada ciclo se agregó el tiempo indicado.

Nombre	Secuencia (5'-3')*	Tm (°C)	Usos
AscABxF sentido	<u>GGCGCGCCCTGACCTGTGAAAGAT</u> GGC	74.1	Amplificación de la región de homología A Box del gen de Na _x .
AbxR antisentido	GGTTTATACCTGTA AAAATAGTAA ATGTG	54.2	Amplificación de la región de homología A Box del gen de Na _x .
PacBBxF sentido	<u>TTTTAATTAAGCCGAAGGGCCTTGT</u> CC	63.9	Amplificación de la región de homología B Box del gen de Na _x .
FseBBxR antisentido	TTTTTGGCCGGCCAGGTTTAACTAT CTTGAGCATGTTGACC	76.1	Amplificación de la región de homología B Box del gen de Na _x y comprobación de la formación de co-integrados.
RecAprimer	GCTGATCGAGAAAGCAGGCGCGT GG	69.9	Comprobación de la formación de co-integrados y secuenciación del plásmido pLD53.SCA-E-B.

Cuadro 6: Oligonucleótidos utilizados como primers para las reacciones de PCR. Se indica su secuencia, la temperatura media de fusión (Tm) y el uso que se les dió. *En la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para sintetizar las regiones de homología A Box y B Box se encuentran subrayados los sitios de corte para enzimas de restricción, Asc I, Pac I o Fse I. En el extremo 5' de los oligonucleótidos PacBBxF y FseBBxR se agregaron T's para hacer mas eficiente el corte con enzimas de restricción.

5.5 Ensayos de recombinación homóloga mediada por RecA.

La estrategia de recombinación homóloga basada en RecA (Gong, *et al*, 2002) se puede dividir en tres etapas experimentales:

1. La construcción *in vitro* de un vector de recombinación como se especifica arriba.
2. La inducción *in vivo* de un primer evento de recombinación en donde el vector de recombinación se integra a la clona BAC, formando una molécula quimérica llamada co-integrado.
3. La inducción de un segundo evento de recombinación denominado “resolución”, que implica la eliminación de la secuencia del vector de recombinación dejando integrado en la clona BAC únicamente la secuencia del gen reportero EGFP.

5.5.1 Preparación de bacterias electrocompetentes (protocolo corto) (Yu, et al, 2000).

El protocolo corto para preparar bacterias electrocompetentes se realizó de la siguiente manera:

Se inoculó una colonia de bacterias DH10B hospederas de las clonas BAC en 5 ml de medio LB con cloranfenicol (20 $\mu\text{g/ml}$), y se incubó con agitación durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se tomó 1 ml del cultivo de toda la noche, se inoculó en 50 ml de medio LB con antibiótico y se incubó a 37°C en agitación hasta obtener una DO_{600} de 0.5. Posteriormente 10 ml del cultivo se centrifugaron a 7000 rpm durante 8 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman J2-MC usando el rotor JA-20. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 1 ml de H₂O MilliQ fría. Se transfirieron las bacterias en un tubo de microcentrífuga y se colectaron centrifugando a 8000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla en 1 ml de H₂O MQ fría. Este paso se repitió 5 veces, con el fin de lavar las bacterias de la mayor cantidad

posible de sales.

Finalmente las bacterias se resuspendieron en 100 μ l de H₂O MQ y se colocaron en un baño de hielo-agua.

5.5.2 Electroporación y selección de co-integrados.

En una celda de electroporación de 0.1 cm (Bio-Rad) se mezclaron 50 μ l de las bacterias preparadas en el apartado anterior con 500 ng del vector de recombinación pRNxE. Se colocó la celda en hielo y se dejó reposar durante 1 minuto. Por otro lado, se configuró el aparato de electroporación "Micropulser" (Bio-Rad) a un voltaje de 1.8 kv manteniendo el resto de los parámetros en los valores predeterminados (25 μ F, 200 Ω y un tiempo constante de 5 milisegundos). Posteriormente se electroporaron las bacterias, e inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB, se recuperó el medio con las bacterias, se colocó en un tubo de ensayo y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación para que las bacterias pudieran recuperarse. Transcurrido el tiempo de recuperación, se seleccionaron los co-integrados llevando el cultivo de bacterias a 5 ml de medio LB agregando ampicilina y cloranfenicol (concentración final de 40 μ g/ml y 20 μ g/ml respectivamente), e incubando a 37°C con agitación durante toda la noche.

Siguiendo las indicaciones de S. Gong (Gong, *et al*, 2002), se realizó una dilución 1:1000 del cultivo de toda la noche en 5 ml de medio LB con ampicilina y cloranfenicol (50 μ g/ml y 20 μ g/ml) y se incubó a 37°C con agitación durante 8 horas; posteriormente, se realizó una dilución 1:5000 del cultivo de 8 horas y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche.

Al día siguiente, se sembró 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , y 5×10^{-4} del total del cultivo en agar con los antibióticos de selección ampicilina y cloranfenicol (50 μ g/ml y 20 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.5.3 Identificación de co-integrados.

Los co-integrados se identificaron inicialmente por PCR directamente de colonias bacterianas individuales (ver apartado sobre PCR) y posteriormente se corroboraron los

resultados por hibridación tipo Southern.

5.5.3.1 Hibridación tipo Southern.

- *Preparación del gel de agarosa y transferencia de DNA a la membrana de nylon:* El DNA de las clonas BAC se extrajo por el método de lisis alcalina en su modalidad de miniprep, se tomaron 10 µl de DNA y se digirieron usando 10 u de la enzima BamH I, agregando espermidina a una concentración final de 2.5 mM. Se incubó la reacción durante 3 horas a 37°C y se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 0.8%. Una vez separados los fragmentos de DNA por su peso molecular en la electroforesis, se equilibró el gel con HCl 0.25 N durante 10 minutos y luego se neutralizó con NaOH 0.4 N durante 20 minutos. Posteriormente el DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente Gene Screen Plus (NEW life science products) montando el aparato de transferencia, utilizando NaOH 0.4 N como buffer y dejando transferir durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró la membrana de nylon y se lavó con Tris 0.2 M pH7.5, SSC 2x (la composición de las soluciones utilizadas para la hibridación tipo southern se indican en el anexo A), finalmente se dejó secar la membrana al aire y se almacenó a -20°C.
- *Síntesis de la ribosonda de B Box marcada radioactivamente:* Se linearizó el plásmido pGEMBbox con la enzima BamH I, se purificó por el método de fenol-cloroformo y se precipitó con etanol. Posteriormente se realizó una “transcripción truncada” *in vitro* de un fragmento de B Box usando la RNA polimerasa del fago T7 (kit MAXIscript, Ambion). La reacción contenía 1 µg del pGEMBbox digerido con BamH I, 1x de *buffer* 10x para transcripción con T7, 200 nM de rATP, rGTP y rCTP, 50 µCi de ³²P-rUTP, 30u de RNA polimerasa de T7, y H₂O libre de RNAsas a un volumen final de 20 µl. La reacción se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo, se agregaron 4u de DNAsa I libre de RNAsas y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se purificó la sonda pasando la mezcla por una columna Sigmaspin (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó la radiactividad incorporada a la sonda midiendo las cpm en un contador

de centelleo líquido (Beckman).

- *Hibridación y revelado*: La membrana de nylon fue colocada en un tubo de hibridación y se agregaron 15 ml de solución de prehibridación (ver anexo A) previamente calentada a 65°C y se agregó el DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado incubándolo en agua hirviendo durante 10 minutos. El tubo se colocó en un horno de hibridación y se incubó a 65°C durante 2 horas. Después, se eliminó la solución de prehibridación y se sustituyó por 7 ml de solución de hibridación calentada a 65°C, agregando el DNA de salmón previamente desnaturalizado y 1×10^6 cpm/ml de ribosonda radioactiva, y se dejó incubando a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó la solución de hibridación y se lavó una vez con 50 ml de 2x SSC, 0.1% SDS durante 10 minutos en el horno de hibridación.; luego se le dio 2 lavados de 20 minutos con 50 ml de 2x SSC, 0.1% SDS previamente calentado a 65°C; y finalmente 2 lavados de 20 minutos con 50 ml 0.2x SSC, 0.1% SDS previamente calentado a 65°C. Al terminar los lavados, la membrana de nylon se colocó en un cassette de autoradiografía y se expuso durante toda la noche con una película Kodak X-Omart.

5.6 Ensayo de recombinación homóloga mediada por el sistema de recombinación *RED*.

5.6.1 Preparación del cassette de recombinación A-EGFP-B.

El sistema de recombinación *RED* (Lee, *et al*, 2001; Swaminathan, *et al*, 2001), requiere de la utilización de una molécula lineal de DNA denominada cassette de recombinación, la cual lleva en su secuencia la modificación que se desea realizar a la clona BAC.

Para generar el cassette de recombinación se digirió el vector de recombinación pRNxE con las enzimas de restricción Asc I y Fse I para obtener el fragmento que contenía las regiones de homología A Box y B Box flanqueando al gen de EGFP, a este cassette de 1.9 kb se le denominó A-EGFP-B (figura 9). El fragmento se separó por

electroforesis, se extrajo a partir del gel como se indicó anteriormente, se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 μ l de H₂O MilliQ.

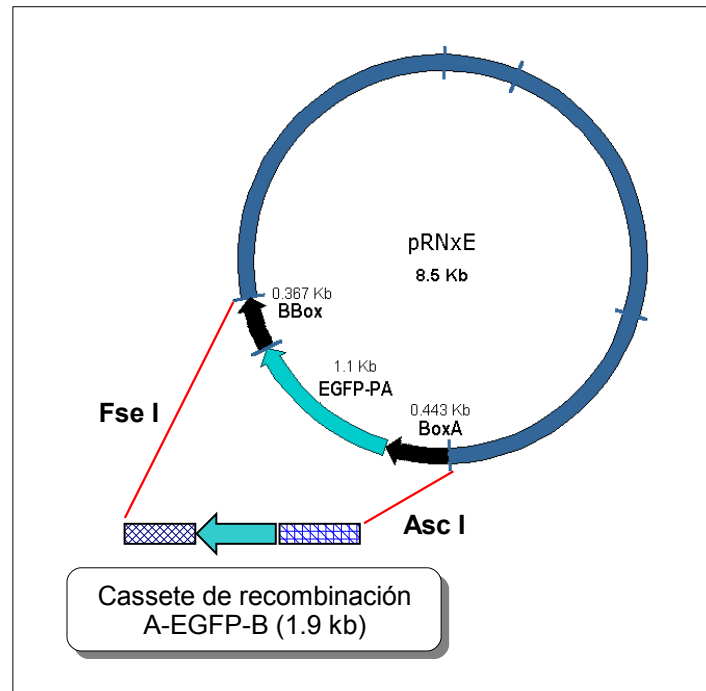


Figura 9: *Cassete lineal de recombinación A-EGFP-B.* Fragmento de 1.9 kb cortado de pRNxE con las enzimas de restricción Fse I y Asc I.

5.6.2 Ensayo de recombinación

Se inoculó una colonia de bacterias EL250 con la clona BAC correspondiente en 5 ml de medio LB con cloranfenicol (20 μ g/ml) y se incubó durante toda la noche a 32°C con agitación. Al día siguiente, se tomó 1 ml de este cultivo para inocular 50 ml de medio LB con antibiótico y se incubó a 32°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5. Posteriormente se colocó el cultivo en baño maría con agitación a 42°C durante 15 minutos, para inducir el sistema de recombinación *RED*, e inmediatamente se colocó en hielo-agua, para detener la inducción.

Después de la inducción se siguió el método corto para preparar bacterias electrocompetentes como se indicó arriba, y se electroporaron a 1.8 kv (el resto de los parámetros se mantuvieron en su valor predeterminado) con 100 ng del cassette de

recombinación A-EGFP-B previamente desnaturalizado. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB y se recuperó el medio con las bacterias, se colocaron en un tubo de microcentrífuga y se incubaron a 32°C en agitación durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se sembró una alícuota del cultivo en cajas petri con agar LB y cloranfenicol, y se incubaron a 32°C durante toda la noche.

5.6.3 Identificación de recombinantes por hibridación en colonia.

- *Levantamiento de colonias y unión de DNA a la membrana de nylon:* Las bacterias de las cajas petri se levantaron usando una membrana de nylon circular del diámetro de la caja marcada con líneas asimétricas, la cual se colocó sobre la superficie del agar durante 5 minutos. Inmediatamente se colocó la membrana circular con la cara que contiene las bacterias hacia arriba en tres papeles filtro con diferentes soluciones. Primero, se colocó durante 5 minutos en solución desnaturalizante (ver anexo A), inmediatamente se colocó durante 5 minutos en solución neutralizante y finalmente durante 5 minutos en 2x SSC. Posteriormente se fijó el DNA a la membrana por entrecruzamiento usando luz UV a 1200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, finalmente la membrana se lavó usando 2x SSC para eliminar los residuos de bacterias y se dejó secar al aire.
- *Síntesis de la sonda de EGFP marcada radioactivamente:* La sonda usada para este ensayo se marcó usando el kit “Random Primed DNA Labeling” (Roche), para lo cual se usó como templado el fragmento cortado con Hinc II del plásmido pEGFP-1 que contiene una región de 800 pb del gen de EGFP. El fragmento se separó y se purificó a partir de un gel como se indicó anteriormente. Se preparó la reacción conteniendo 40 ng de templado previamente desnaturalizado, 1x de *buffer* 10x con hexanucleótidos, 750 nM de mezcla de dNTPs excepto dCTP, 30 μCi de ^{32}P -dCTP y 1 u de Klenow, aforando a 20 μl e incubando a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se purificó la sonda pasando la mezcla por una columna Sigmaspin (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó la radiactividad incorporada a la sonda midiendo las cpm en un contador de centelleo líquido (Beckman).

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Hibridación y revelado*: Este paso fue realizado de la misma manera que en la sección 5.5.3.1. Con la única diferencia de que el DNA de la sonda radiactiva se desnaturalizó junto con el DNA de esperma de salmón antes de ser agregado a la solución de hibridación.

6 RESULTADOS

6.1 Confirmación de la ausencia de sitios IRES en el gen reportero EGFP del plásmido pLD53.SCA-E-B.

Se ha observado que los sitios internos de unión a ribosomas (IRES) pueden interferir al momento de querer observar la expresión de un gen reportero cuando se han clonado bajo la expresión del promotor del canal de sodio $Na_v1.7$ (Refugio García-Villegas, comunicación personal), es por esto que en este trabajo se decidió secuenciar un fragmento del plásmido pLD53.SCA-E-B en busca de sitios IRES que puedan preceder al gen reportero EGFP.

Se secuenció un fragmento del plásmido pLD53.SCA-E-B utilizando el oligonucleótido RecAprimer (ver mapa 2 del anexo B) y el kit de secuenciación BigDye 3.1 como se especifica en Materiales y Métodos. Se obtuvo una secuencia de 574 pb la cual se analizó con el programa Basic Local Alignment Tool (BLAST) con los algoritmos blastn y megablast para compararla con la base de datos de nucleótidos refseq del National Center of Bioinformatic Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

El resultado que arrojó el BAST mostró que las primeras 251 pb corresponden al final del gen de RecA de *Escherichia coli*, mientras que las últimas 274 pb corresponden al inicio del gen reportero EGFP. Ambos genes están separados por una región de 49 pb donde se encuentran los sitios de restricción Asc I y Sma I usados para clonar la región de homología A Box (ver mas adelante) (figura 10). Esta secuencia de 47 pb se analizó individualmente con el programa BLAST en busca de similitud con algún sitio IRES eliminando el enmascaramiento del alineamiento producido por la presencia de las secuencias correspondientes a RecA y a EGFP. No se observó la presencia de secuencias de DNA relacionadas con sitios IRES, por lo que se prosiguió a construir el

vector de recombinación.

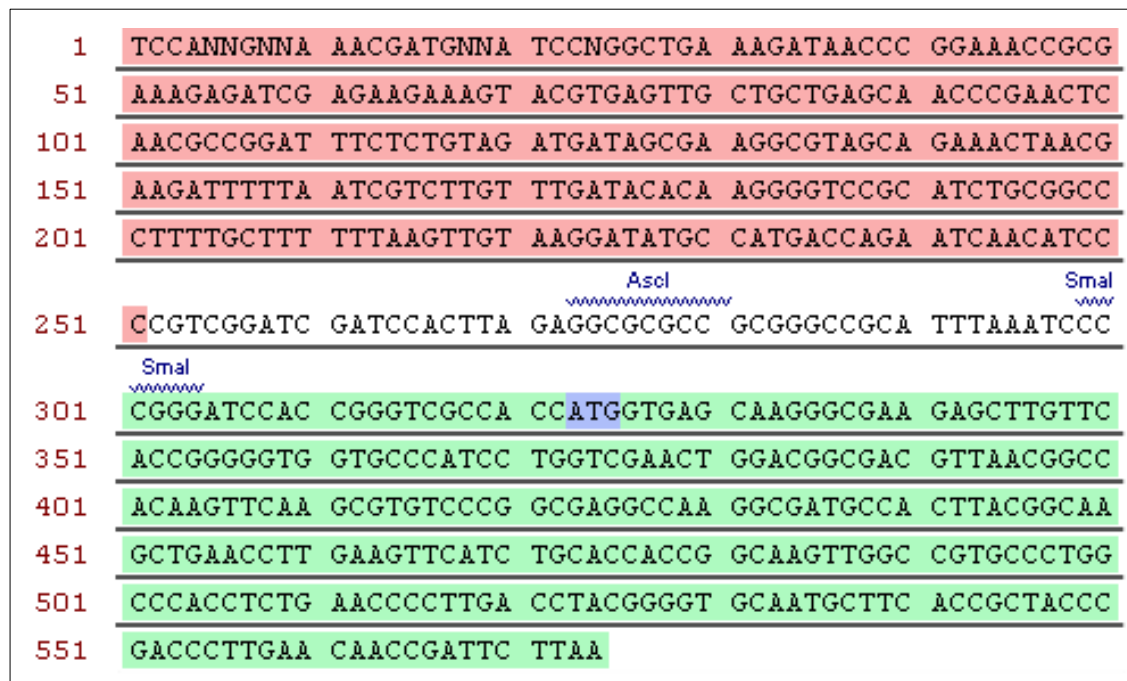


Figura 10: Secuencia de 574 nucleótidos del plásmido pLD53.SCA-E-B obtenida utilizando el oligonucleótido *RecAprimer*. Se indica sombreada en rojo la secuencia de 251 nucleótidos correspondiente al gen de *RecA* de *E. coli* y sombreada en verde la secuencia de 274 nucleótidos correspondiente al gen *EGFP*. Se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción *Asc I* y *Sma I* y sombreado en azul se indica el codón de inicio de la traducción de *EGFP*.

6.2 Modificación de clonas BAC con secuencias del gen de Na_x por recombinación homóloga mediada por *RecA*.

La estrategia de modificación de clonas BAC mediada por *RecA* (Gong, *et al*, 2002) que se resume en la figura 11, implica en primer instancia la construcción de un vector de recombinación, pRNxE, el cual debe contener al gen reportero *EGFP* flanqueado por dos regiones de homología al gen de Na_x , el gen de resistencia a ampicilina (amp^r) para realizar una selección positiva, el gen *SacB* para realizar una selección negativa, el gen *RecA* para llevar a cabo la recombinación en la cepa bacteriana DH10B cuyo genotipo es $recA^-$ y el origen de replicación R6K γ que depende de la proteína π para poder replicarse.

Este vector de recombinación debe introducirse en la cepa bacteriana DH10B, hospedera de las clonas BAC que contienen secuencias del gen de Na_x , en donde se

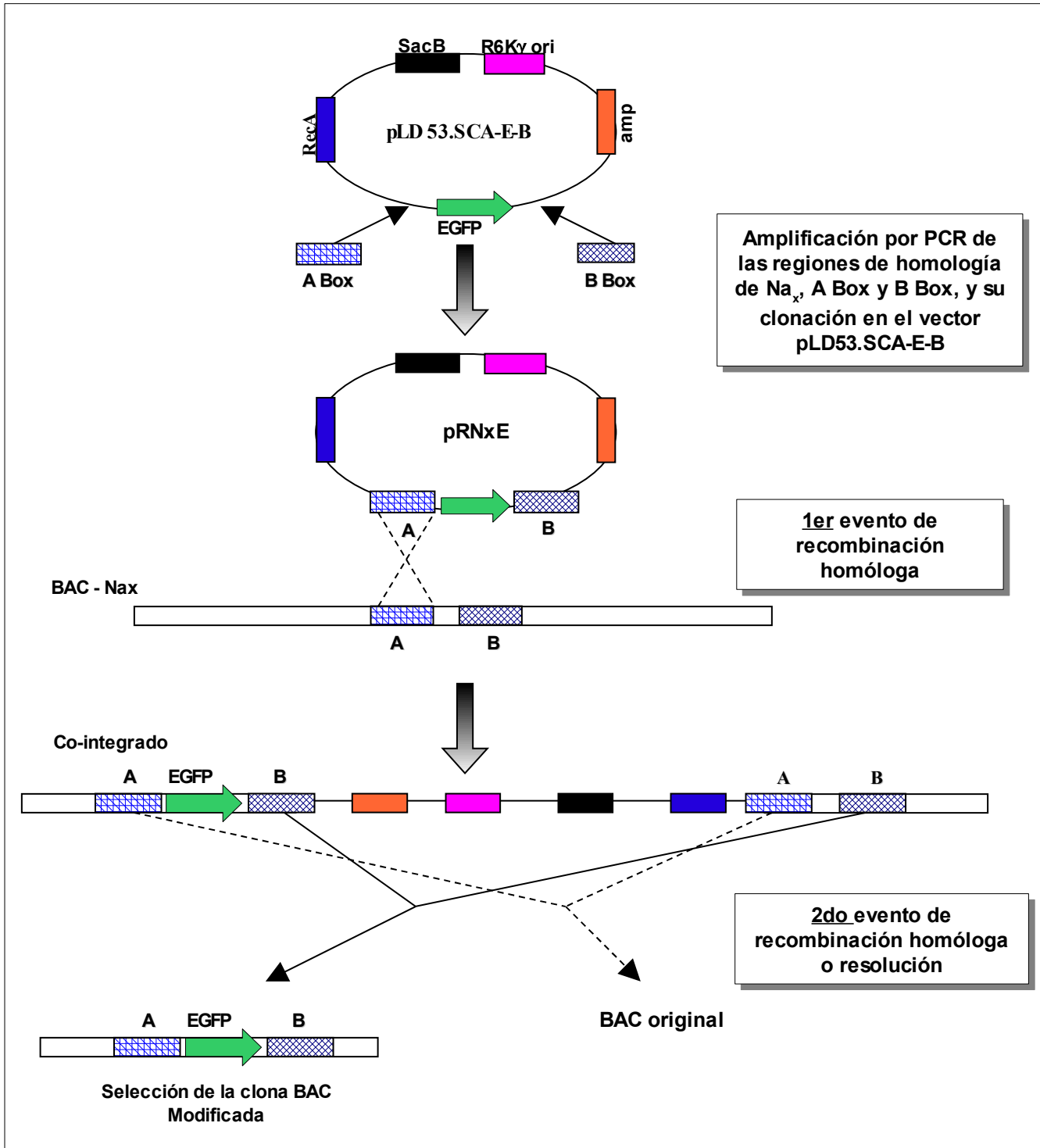


Figura 11: Estrategia de recombinación homóloga mediada por RecA. En la parte superior se esquematiza la construcción del vector de recombinación pRNxE insertando las regiones de homología A Box y B Box previamente amplificadas por PCR. En medio, se representa el primer evento de recombinación y la formación del co-integrando. Y en la parte inferior, se muestra el segundo evento de recombinación o resolución, en donde se puede obtener la clona BAC modificada con la inserción de EGFP, o la clona BAC en su estado original (ver texto).

RESULTADOS

lleva a cabo un primer evento de recombinación, en el cual, el vector de recombinación se integra en la clona BAC en alguna de las dos regiones de homología (A Box o B Box) gracias a la acción de RecA codificada por el vector, formando una molécula quimérica denominada co-integrado. Debido que esta molécula contiene resistencia a cloranfenicol conferida por la clona BAC y resistencia a ampicilina conferida por el vector de recombinación, se selecciona cultivando las bacterias en presencia de ambos antibióticos. Ya que el vector de recombinación no puede replicarse en esta cepa bacteriana debido al origen R6K γ , la única manera en que las bacterias sean resistentes a ambos antibióticos, es que el vector se integre por recombinación en algún replicón.

Una vez formado y seleccionado el co-integrado es necesario eliminar el vector de recombinación y dejar únicamente la secuencia del gen reportero en la clona BAC, por lo que se induce a que se lleve a cabo un segundo evento de recombinación denominado resolución. Para lo cual, se cultivan las bacterias en medio de cultivo únicamente con cloranfenicol, para eliminar la selección para el vector de recombinación, de manera que se permita la proliferación de bacterias que hayan realizado el segundo evento de recombinación y liberado el vector de la secuencia de la clona BAC. Posteriormente se siembran las bacterias en agar con sacarosa, de modo que las bacterias que tengan integrados en algún replicón el vector de recombinación mueran por el efecto tóxico del gen de SacB en presencia de sacarosa. De esta manera se seleccionan negativamente las bacterias que presenten el vector de recombinación y se permite que crezcan las bacterias que lo eliminaron.

Debido a que la recombinación se puede llevar a cabo en cualquiera de las dos regiones de homología (A Box o B Box), en teoría, existe una probabilidad de $\frac{1}{2}$ de obtener la clona BAC modificada con la inserción del gen reportero EGFP, mientras que el resto de las clonas BAC regresa a su configuración inicial.

Una vez terminado este proceso y de haber seleccionado y comprobado la recombinación correcta, se obtendría una clona BAC en donde la secuencia del codón de inicio de la traducción de Na_x es sustituida por el gen de EGFP.

6.2.1 Construcción del vector de recombinación pRNxE.

6.2.1.1 Síntesis y clonación de la región 5' de homología A Box.

Como se observa en la figura 12, la región de homología A Box de 450 pb se sintetizó por PCR como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Para poder realizar una ligación dirigida de la región A Box en el plásmido pLD53.SCA-E-B se añadió un sitio de corte para la enzima Asc I en el oligonucleótido sentido (AscABxF). El producto de PCR se digirió con Asc I y se ligó en el plásmido pLD53.SCA-E-B digerido previamente con Asc I (compatible con el extremo 5' producido por la enzima Asc I en el producto de PCR) y Sma I (compatible con el extremo como 3' producido por la polimerasa en el producto de PCR).

De la ligación, se obtuvieron 141 colonias, de las cuales se extrajo el DNA plasmídico de 10 de ellas para analizar su migración electroforética. El DNA superenrollado se corrió en un gel de agarosa (figura 13a) donde se observó que las clonas 6 y 9 presentan un desplazamiento más lento que el resto de las muestras lo cual puede indicar la inserción del fragmento A Box.

Ambas muestras se digirieron con las enzimas Asc I y Pac I para comprobar la inserción del fragmento. En la figura 13b se observa que ambas muestras presentan el patrón de restricción que corresponde a la inserción de A Box, un fragmento de 1.5 kb y uno de 6.6 kb, en contraste con los fragmentos de 1.1 kb y 6.6 kb correspondientes al plásmido pLD53. A este nuevo plásmido, se le denominó pLDAbx.

6.2.1.2 Síntesis y clonación de la región 3' de homología B Box.

La región de homología B Box se sintetizó por PCR obteniendo un fragmento de 389 pb. Con el fin de realizar una ligación dirigida de la región B Box en el plásmido pLDAbx se añadió un sitio de corte para la enzima Pac I en el oligonucleótido sentido (PacBBxF) y un sitio para Fse I en el antisentido (FseBBxR). Sin embargo, se presentaron problemas para digerir el DNA con la enzima Fse I debido a que esta enzima pierde su actividad muy rápidamente si se almacena a -20°C. Por lo cual decidimos clonar la región de homología B Box inicialmente en el vector de clonación para

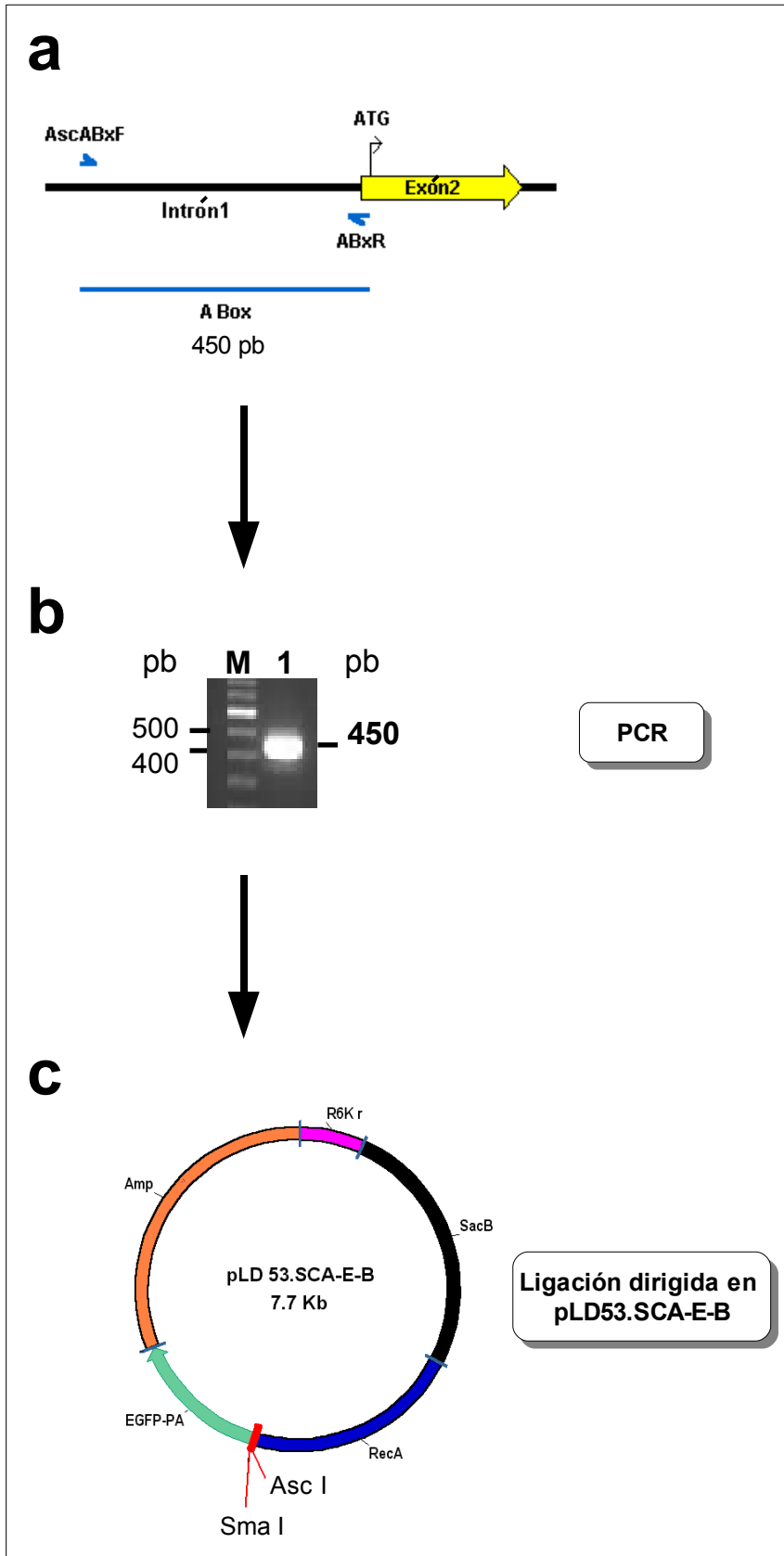


Figura 12: Síntesis por PCR de la región de homología 5' A Box y ligación dirigida en el plásmido pLD53.SCA-E-B. (a) Estructura genómica de la región blanco del gen de Na_x donde se muestra la región A Box amplificada por PCR (barra azul) y los oligonucleótidos AscABxF y ABxR usados para su síntesis (flechas azules); se indica el intrón 1, el exón 2 y el codón de inicio de la traducción. **(b)** Comprobación de la síntesis de la región de homología A Box de 450 pb (1); M: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb. **(c)** Mapa del plásmido pLD53.SCA-E-B, se marcan en rojo los sitios Asc I y Sma I usados para la ligación dirigida de la región de homología A Box.

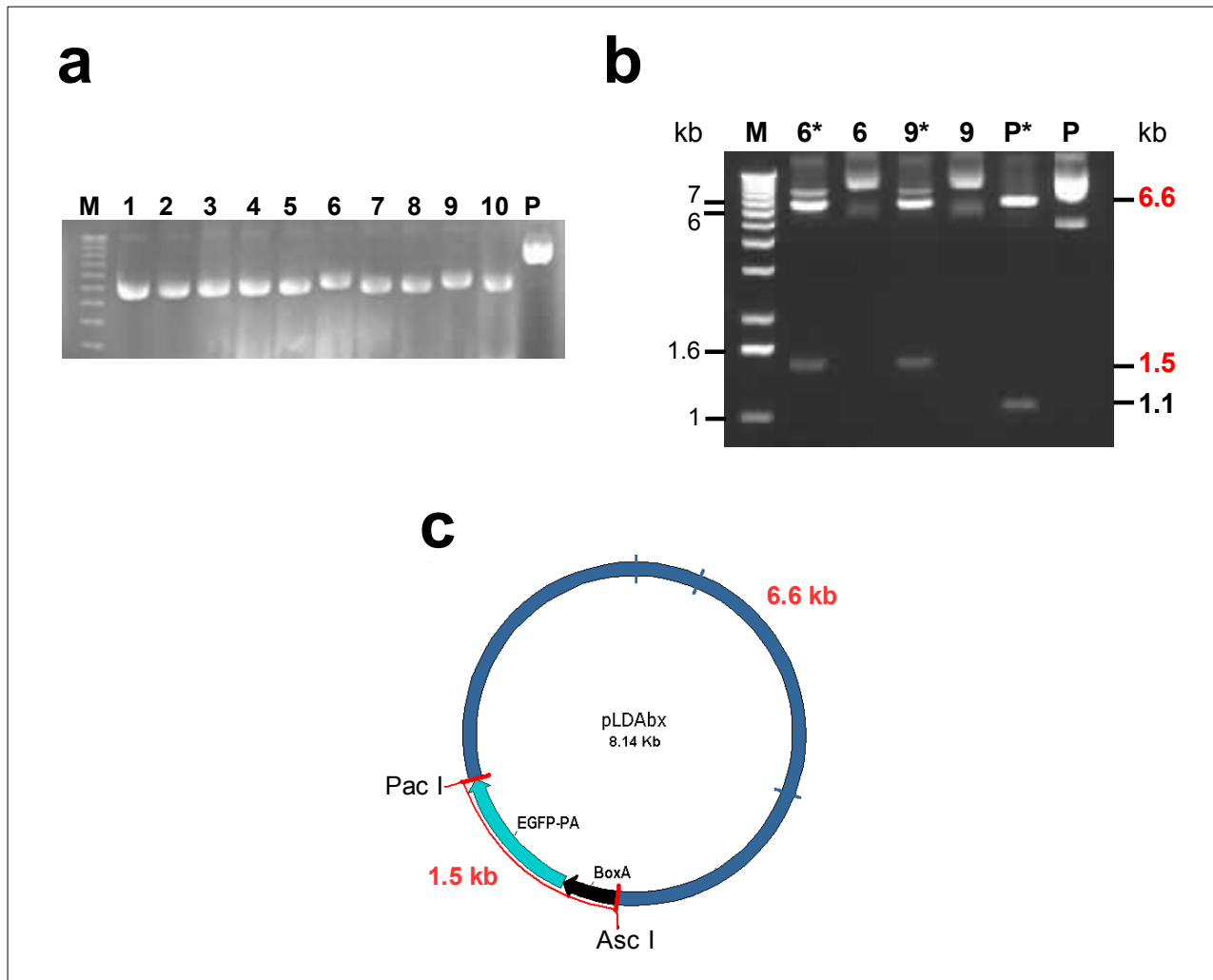


Figura 13: Verificación de la inserción de A Box en el plásmido pLD53.SCA-E-B. (a). Patrón electroforético del DNA plasmídico superenrollado de 10 colonias independientes (1-10) resultantes de la ligación de la región de homología A Box en el plásmido pLD53.SCA-E-B, se observa que las clonas 6 y 9 presentan un desplazamiento mas lento, sugiriendo la inserción de A Box. M: marcador de peso molecular escalera de 1 kb; P: pLD53.SCA-E-B (b). Patrón electroforético de las clonas 6 y 9 de (a) cortadas con las enzimas Asc I y Pac I. Se indica del lado derecho los tamaños de los fragmentos observados correspondientes a las clonas 6 y 9 (1.5 y 6.6 kb marcados en rojo) y pLD53.SCA-E-B (1.1 y 6.6 kb), se puede observar que ambas clonas contienen la región de homología A Box. 6*, 9*, P*: clonas 6, 9 y pLD63.SCA-E-B respectivamente cortados con las enzimas Asc I y Pac I. (c). Mapa del plásmido pLDAbx resultado de la ligación de A Box en el plásmido pLD53.SCA-E-B, en rojo se indican los sitios de corte con Asc I y Pac I y el tamaño de los fragmentos producidos que se observan en (b).

productos de PCR pGEM-T Easy (Promega) (figura 14c).

Se analizó el DNA plasmídico de 8 colonias individuales resultantes de la ligación y se digirieron con la enzima EcoR I observando que 7 de las 8 clonas presentaban el patrón esperado correspondiente a la inserción de Bbox: un fragmento de 2.9 kb y uno

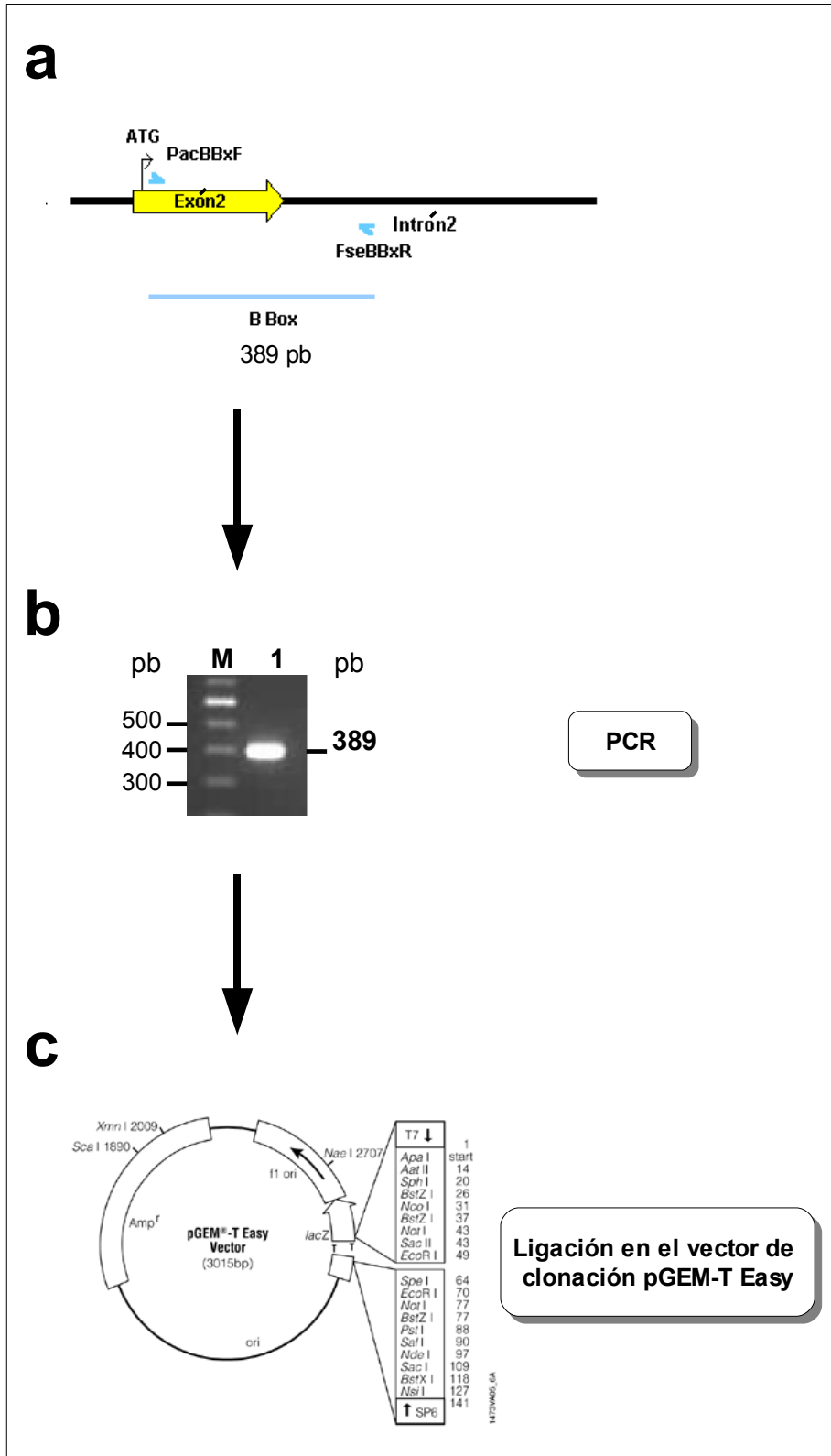


Figura 14: Síntesis por PCR de la región de homología 3' B Box y ligación en el vector de clonación pGEM-T Easy. (a) Estructura genómica de la región blanco del gen de Na_x donde se muestra la región B Box amplificada por PCR (barra azul) y los oligonucleótidos PacBBxF y FseBBxR usados para su síntesis (flechas azules); se indica el exón 2, el intrón 2 y el codón de inicio de la traducción. **(b)** Comprobación de la síntesis de la región de homología B Box de 389 pb (1); M: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb. **(c)** Mapa del vector de clonación pGEM-T Easy donde se ligó la región de homología B Box.

de 400 pb (figura 15a). Este plásmido se denominó pGEM-Bbox.

Posteriormente, se cortó el plásmido pGEMBbox que contiene la región de homología B Box con la enzima EcoR I. Se separó y purificó el fragmento de 0.4 kb y se reparó con la enzima *Klenow* para producir extremos romos. Posteriormente se ligó en el sitio Pac I reparado con *Pfu* del plásmido pLDAbx. De la ligación se obtuvieron 209

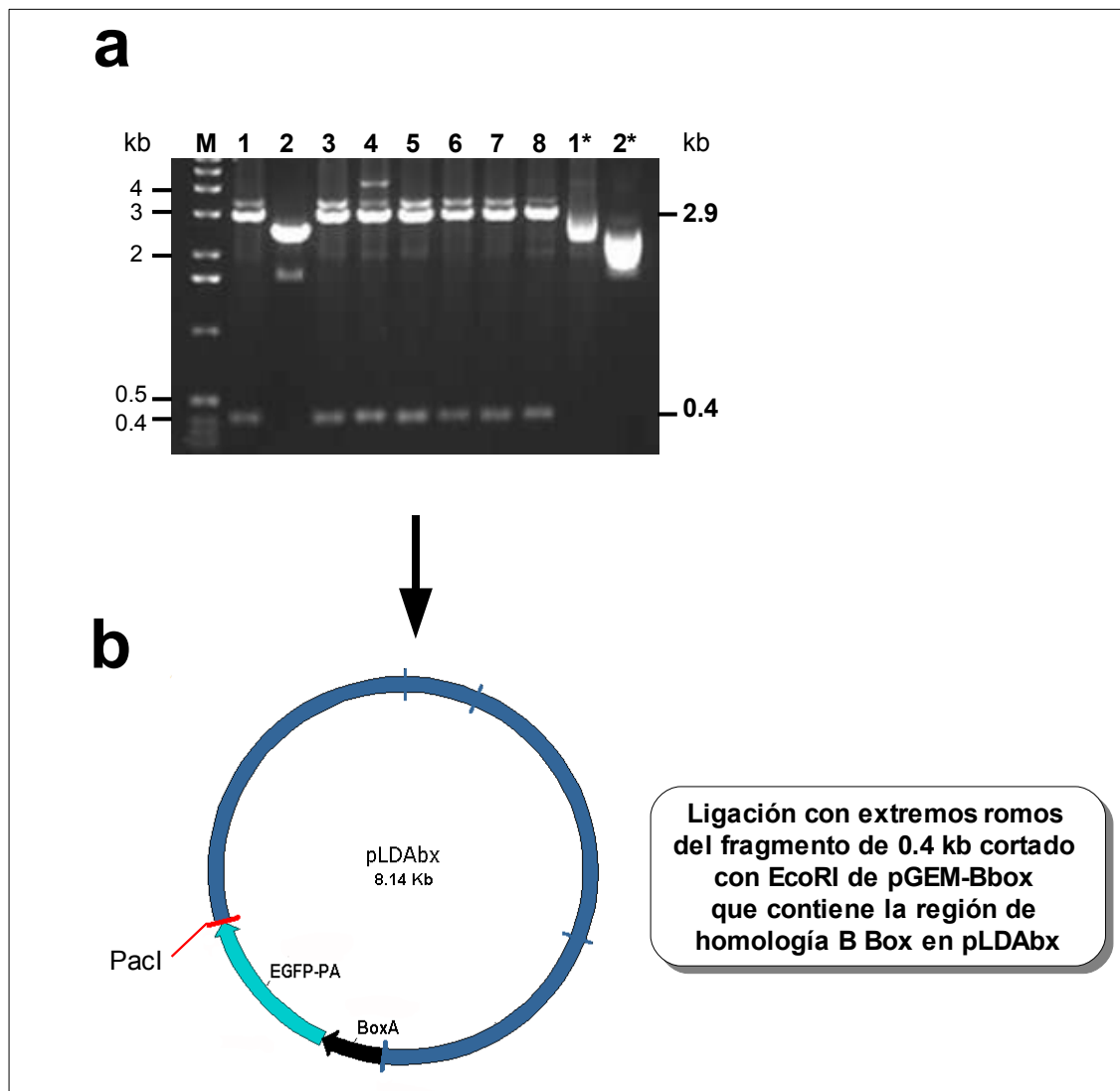


Figura 15: Verificación de la inserción de B Box en pGEM-T Easy y ligación con extremos romos en pLDAbx. (a)

Patrón electroforético de 8 clonas resultantes de la ligación de la región de homología B Box en pGEM-T Easy digeridas con EcoR I, de las cuales, las clonas 1 y 3-8 presentan el patrón esperado para la inserción correcta de B Box. Del lado derecho se observa los peso moleculares de las bandas observadas 2.9 y 0.4 kb correspondientes a la

ligación correcta de B Box. M: Marcador de peso molecular, escalera de 1 kb; 1*, 2*: DNA plasmídico superenrollado de las clonas 1 y 2 respectivamente (b) Mapa del plásmido pLDAbx, se indica en rojo el sitio Pac I donde se ligó con extremos romos el fragmento de 0.4 kb cortado con EcoR I de pGEM-Bbox observado en (a) que contiene la región de homología B Box (ver texto).

colonias, de las cuales se analizaron 5 dirigiéndolas con la enzima BamH I. Como se observa en la figura 16a las clonas 1, 4 y 5 presentaron el patrón de restricción esperado para la inserción de B Box, tres fragmentos, de 5, 2.3 y 1.2 kb, en comparación con los dos fragmentos observados para el plásmido pLDAbx, de 5.8 y 2.3 kb.

Debido a que la ligación de B Box en pLDAbx se realizó utilizando extremos romos, el fragmento se pudo haber ligado en las dos orientaciones posibles. Para conocer si el fragmento se ligó en la dirección deseada, es decir, en el mismo sentido de la transcripción del gen reportero EGFP, se digirieron las muestras 1 y 4 con las enzimas Asc I y Pac I. El sitio para la enzima Pac I original del plásmido pLDAbx se perdió en el proceso de clonación al ser reparado con la polimerasa *Pfu*, sin embargo, se añadió otro sitio de corte para Pac I que se incluyó en la síntesis por PCR del fragmento de homología B Box. Ya que este sitio se encuentra al extremo 5' de B Box nos permitió conocer la orientación en la que se ligó la región B Box. En la figura 16b se pueden observar en los carriles 1 y 4 un fragmento de 7 kb y uno de 1.5 kb, lo que indica que ambas clonas presentan el fragmento B Box en la orientación deseada. Al plásmido resultante de esta ligación se denominó pRNxE y fue usado como vector de recombinación para los ensayos de recombinación homóloga mediados por RecA.

6.2.2 *Ensayo de recombinación homóloga mediada por RecA.*

Una vez construido el vector pRNxE, se electroporó en bacterias DH10B/83A3 para realizar el ensayo de recombinación homóloga.

La selección de co-integrados se llevó a cabo cultivando las bacterias en medio líquido con ampicilina y cloranfenicol durante toda la noche, posteriormente se realizó una dilución 1:1000 y se cultivaron durante 8 horas y después se realizó una segunda dilución 1:5000 y se incubaron durante toda la noche, como se indica en Materiales y Métodos. Las diluciones se realizaron con la intención de reducir el número de bacterias que no fueron transformadas con el vector pRNxE y que pueden crecer acompañando a las que sí fueron transformadas. Finalmente se sembró 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , y 5×10^{-4} del total del cultivo en agar con ambos antibióticos y se dejó incubando durante toda la noche.

Al día siguiente se tomaron 5 colonias de cada caja con agar (un total de 15

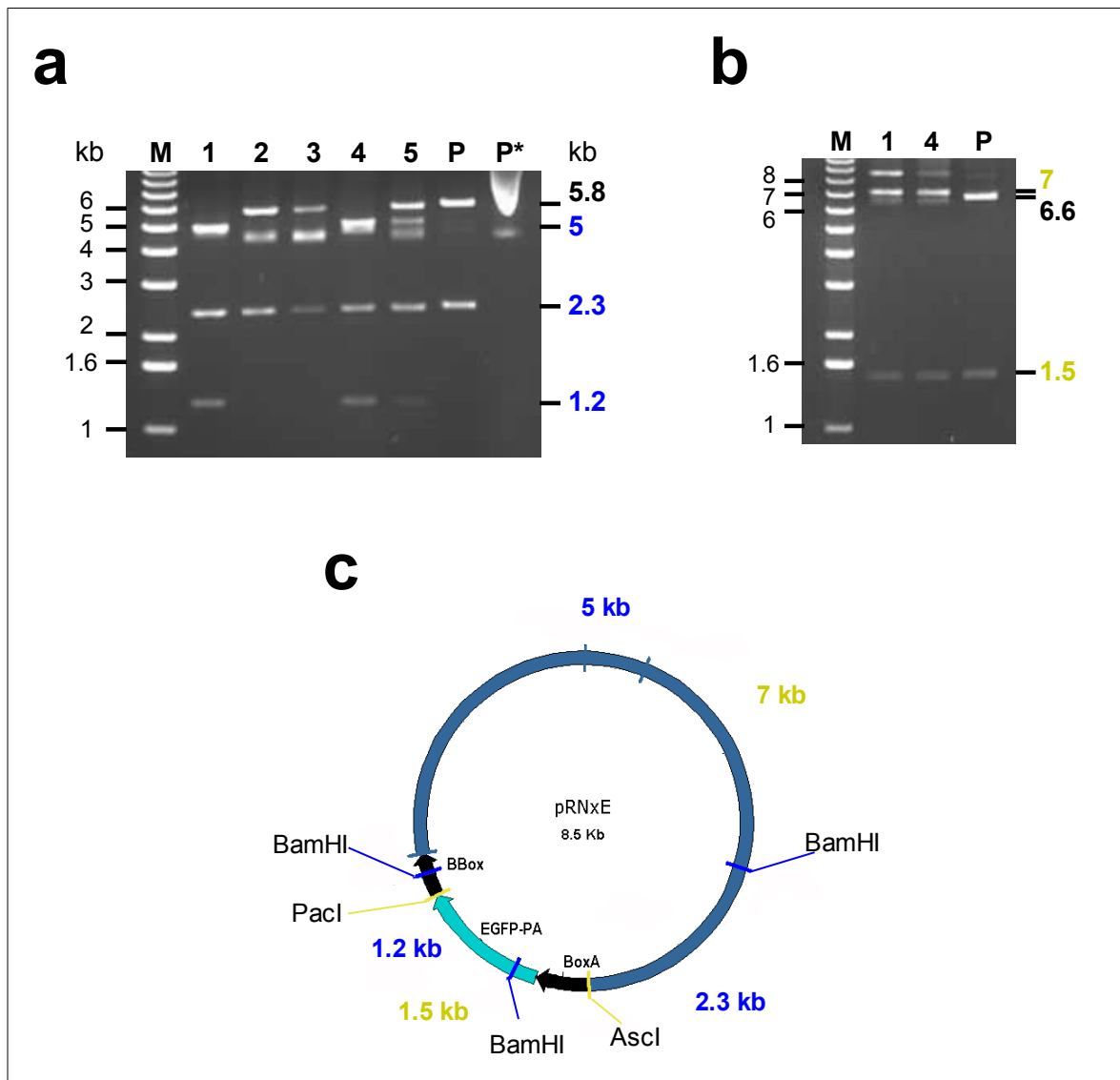


Figura 16: Verificación de la inserción y orientación de B Box en el plásmido pLDAbx. (a) Patrón electroforético de 5 clonas independientes resultantes de la ligación de B Box en pLDAbx digeridas con BamHI, se observa que las clonas 1, 4 y 5 presentan el patrón de restricción correspondiente a la ligación de B Box. Del lado derecho se indica el peso molecular de las bandas observadas, se muestran en azul las bandas de 5, 2.3 y 1.2 kb correspondientes a la ligación de B Box en pLDAbx. M: marcador de peso molecular escalera de 1 kb; P: plásmido pLDAbx cortado con BamHI; P*: plásmido pLDAbx superenrollado (b) Patrón electroforético de las clonas 1 y 4 cortadas con PacI y AscI para determinar la orientación de B Box ambas presentan la dirección deseada. del lado derecho se indican el peso molecular de los fragmentos observados y se muestran en amarillo las bandas de 1.5 y 7 kb correspondientes a la orientación deseada de B Box. M: marcador de peso molecular escalera de 1 kb; P: plásmido pLDAbx cortado con PacI y AscI. (c) Mapa del vector de recombinación pRNxE, se indican en azul los sitios de corte con BamHI y el tamaño de los fragmentos producidos y en amarillo los sitios de corte para PacI y AscI y los fragmentos producidos.

colonias) para analizarlas por PCR para confirmar la formación del co-integrado. Se usó un lisado de las bacterias de cada colonia como templado y los oligonucleótidos RecAprimer y FseBbxR. Como se indica en la figura 17a, en caso de que el vector

pRNxE recombinara en la región de homología A Box se observaría un fragmento de 1.1 kb, por otro lado, si la recombinación ocurriera en B Box, se obtendría un fragmento de 2.2 Kb.

En la figura 17b, se muestran 5 de las 15 muestras analizadas, en donde se observa que la PCR hecha directamente del lisado de bacterias produce varios fragmentos inespecíficos debido a la secuencia de RecA del cromosoma bacteriano. Sin embargo, también se observa una banda de aproximadamente 2.2 kb en la mayoría de las muestras que no se encuentra en el control negativo DH10B/83A3 que no se sometió a la recombinación (carril C-, figura 17b), lo que indica aparentemente que la recombinación sucedió en B Box.

Para tratar de eliminar la amplificación de fragmentos inespecíficos, se realizó una segunda PCR directamente de 5 nuevas colonias (independientes a las 15 anteriores) incrementando la temperatura de alineamiento (condiciones indicadas en Materiales y Métodos). En la figura 17c, se muestra el resultado de esta PCR, en donde podemos observar que la intensidad de los fragmentos inespecíficos se reduce o bien, desaparecen, y que el fragmento de 2.2 kb persiste en las 5 muestras analizadas sugiriendo una posible recombinación en B Box.

Posteriormente se buscó confirmar los resultados obtenidos por PCR realizando una hibridación tipo Southern con el DNA de clonas BAC de 10 nuevas colonias independientes resistentes a cloranfenicol y ampicilina. Se aisló el DNA de las clonas BAC y se cortó con la enzima BamH I usando una ribosonda marcada radiactivamente correspondiente a la secuencia de B Box. En la figura 18a se indican los sitios de corte para la enzima BamH I y los lugares donde hibrida la ribosonda. En caso de que el vector pRNxE recombinara en A Box, se observaría en la autoradiografía un fragmento de 1.2 kb y uno de 2.3 kb; por el otro lado, si la recombinación ocurriera en B Box, se podrían identificar un fragmento de 1.2 kb y uno de 1.8 kb. En cualquier caso, si se llevó a cabo la recombinación en la clona BAC, se observarían dos fragmentos de DNA, en contraste con el fragmento único de 1.8 kb que se observaría si la clona BAC no hubiera sufrido modificación alguna.

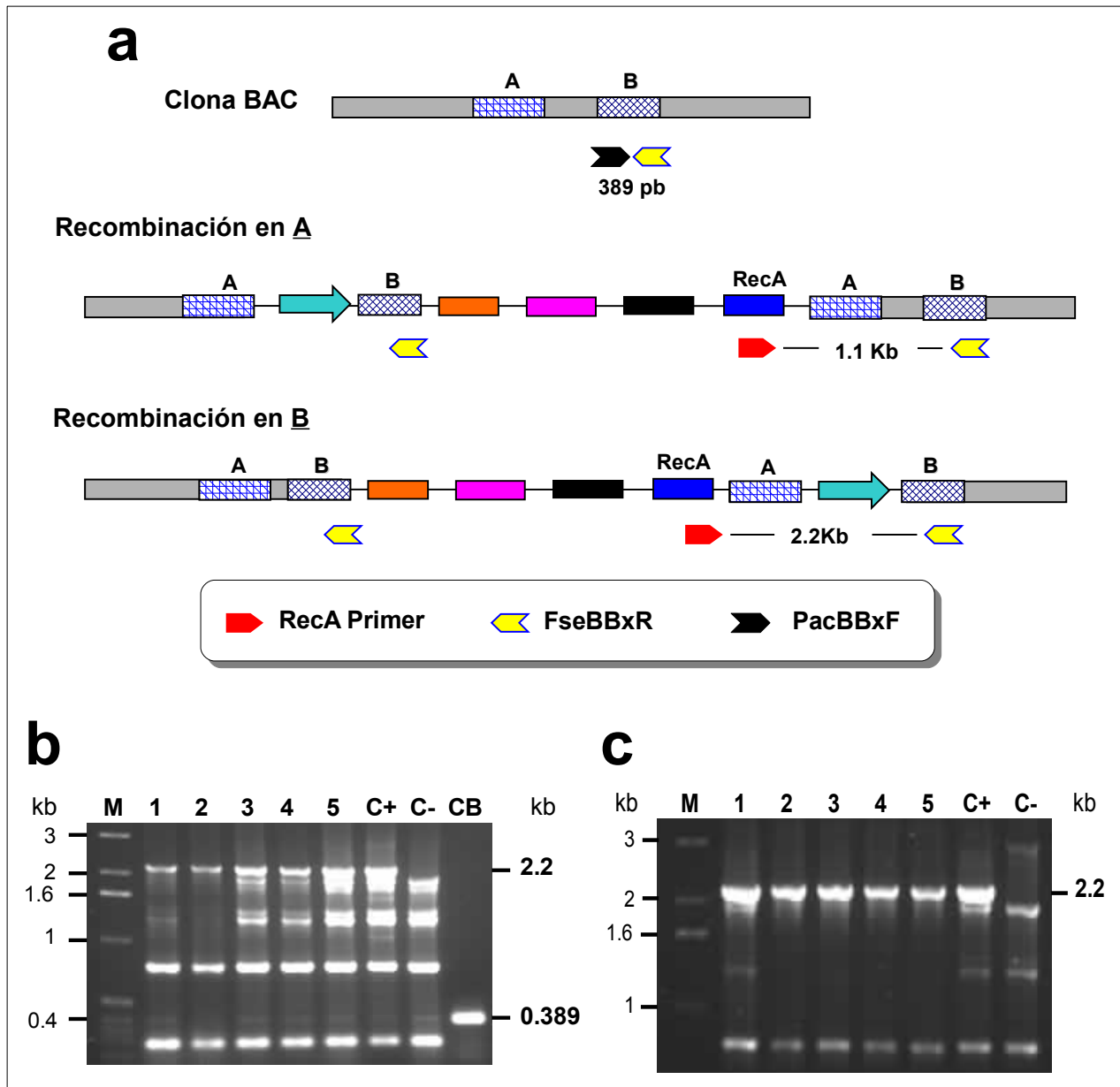


Figura 17: Verificación de la formación de co-integrados por PCR. (a) Mapas de la clona BAC sin modificar, si la recombinación ocurre en A Box (A) y si la recombinación ocurre en B Box (B). Se esquematiza el lugar donde hibridan los oligonucleótidos RecA primer (flecha roja), FseBBxR (flecha amarilla) y PacBBxF (flecha negra) y los fragmentos que se producirían en la PCR si el vector pRNxE recombinara en A (1.1 kb), o en B (2.2 kb). **(b)** Resultados de la PCR de 5 de 15 colonias que presentan un fragmento de 2.2 kb consistente con la recombinación en B y un conjunto de bandas inespecíficas. **(c)** Resultados de la segunda PCR de 5 colonias independientes donde se aumentó la temperatura de alineamiento. Se observa una reducción de las bandas inespecíficas y se observa la banda de 2.2 kb mas intensa. C+: control positivo realizado con bacterias Pir2/pRNxE y los oligonucleótidos RecA primer y FseBbxR, en donde se esperaba un fragmento de 2.2 kb; C-: control negativo realizado con DH10B/83A3 y los oligonucleótidos RecA primer y FseBbxR donde no se esperaba encontrar ninguna banda; CB: control positivo donde se utilizaron las bacterias DH10B/83A3 y los oligonucleótidos PacBBxF y FseBbxR, donde se esperaba un fragmento de 389 pb correspondiente a la región de homología B Box. M: Marcador de peso molecular, escalera de 1 kb.

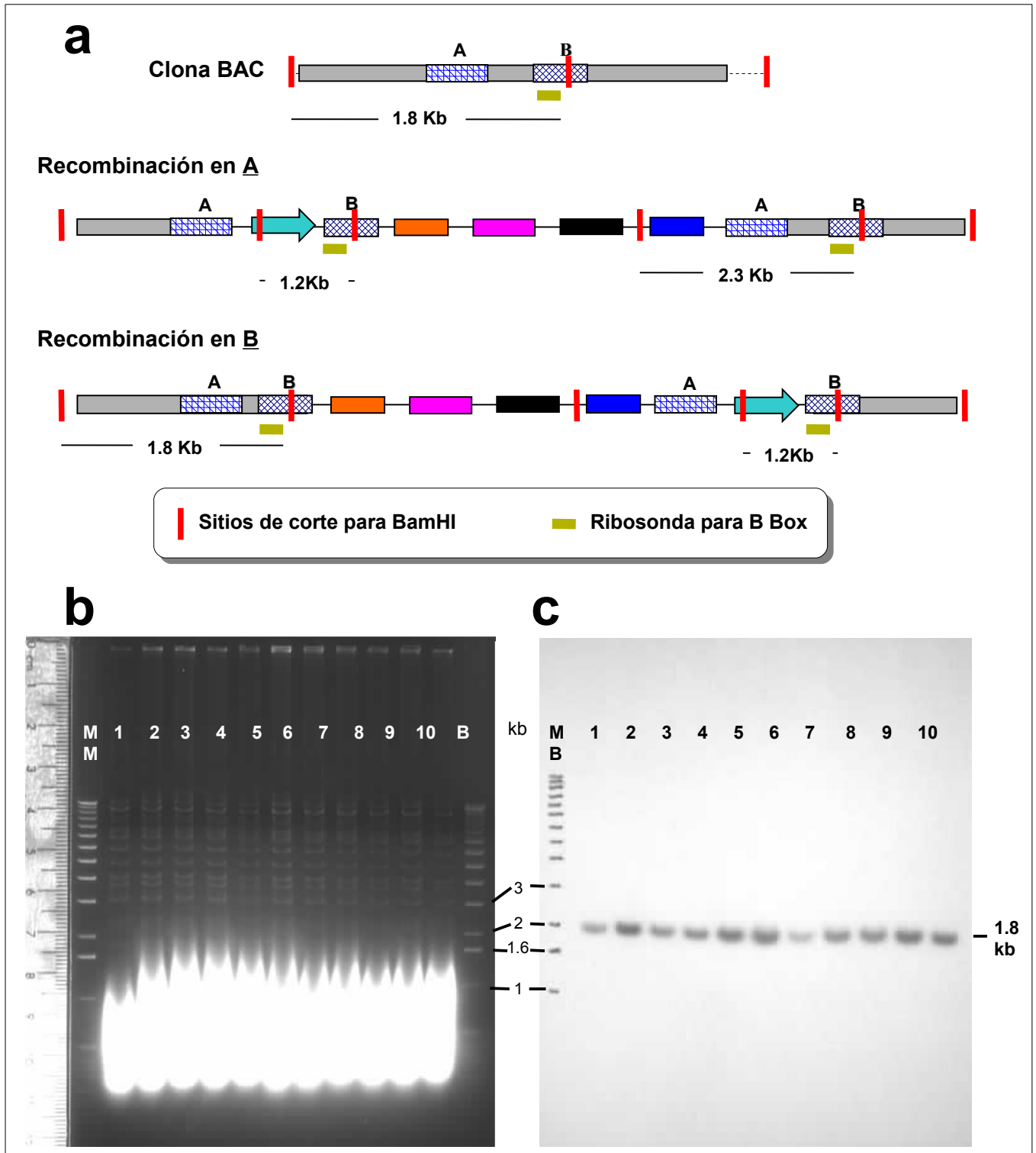


Figura 18: Verificación de la formación de co-integrado por hibridación tipo Southern. (a) Mapas de la clona BAC sin modificar, si la recombinación ocurre en A Box (A) y si la recombinación ocurre en B Box (B). Se indican los sitios de corte para la enzima BamHI (barras rojas) y los sitios donde hibrida la ribosonda para B Box (barras amarillas), también se indica el tamaño de los fragmentos que se observarían si la recombinación ocurre en A Box o en B Box. (b) Gel que se transfirió a la membrana de nylon para realizar la hibridación tipo Southern. (c) Autoradiografía, donde se puede identificar un fragmento de 1.8 kb en las 10 muestras y en el control que no se sometió a recombinación, lo cual indica que la recombinación no ocurrió en la clona BAC. Tiempo de exposición: 16 horas. M: Marcador de peso molecular, escalera de 1 kb.

Según los resultados obtenidos por la PCR, el DNA de las clonas BAC analizadas debieron recombinar en B Box, por lo tanto, se esperaba encontrar en la hibridación tipo southern la señal radiactiva de dos fragmentos de DNA (1.2 y 1.8 kb), sin embargo, los resultados observados en la autoradiografía (figura 18c) no concuerdan con la PCR, en cambio, se observa en las 10 muestras analizadas, una única señal correspondiente a un fragmento de 1.8 kb, lo cual implica que el vector pRNxE no recombinó en la clona BAC.

Al analizar cuidadosamente los datos nos dimos cuenta que existe otra posibilidad para los resultados observados. El vector pRNxE en realidad tiene tres regiones de homología, A Box, B Box y RecA. Aunque la cepa DH10B es *recA*⁻, aún tiene la secuencia del gen de RecA. Entonces, si el vector pRNxE recombinara en la secuencia de RecA en el cromosoma bacteriano (figura 19) obtendríamos bacterias capaces de crecer en ampicilina y cloranfenicol, y un producto de PCR de 2.2 kb al utilizar los oligonucleótidos RecA primer y FseBBxR como el que se observó en los experimentos de las figuras 17b y 17c. Adicionalmente observaríamos una única banda de 1.8 kb en la hibridación tipo Southern realizada con DNA de clonas BAC, tal y como se observa en la figura 18c. Entonces, la recombinación en el cromosoma es congruente con nuestros resultados.

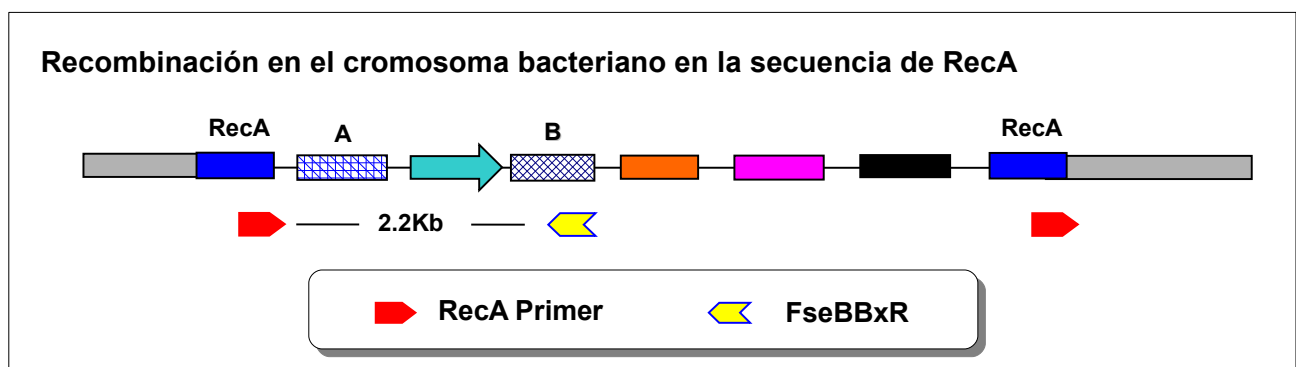


Figura 19: *Recombinación del vector pRNxE en la secuencia de RecA del cromosoma bacteriano. Se indica el lugar donde hibridan los oligonucleótidos ReAprimer (flecha roja) y FseBBxR (flecha amarilla) y el fragmento de 2.2 kb que se observa en la PCR (figura 17).*

6.2.2.1 Variaciones a los ensayos de recombinación homóloga mediada por RecA.

Se realizó un segundo ensayo de recombinación, en el cual, se trató de eliminar el

RESULTADOS

fondo producido por la recombinación en el cromosoma. En este experimento se electroporó el vector pRNxE en bacterias DH10B/83A3 y se siguió el protocolo de selección mencionado anteriormente. Se extrajo el DNA de clona BAC del primer cultivo de toda la noche, y de la dilución 1:5000 de toda la noche.

Posteriormente se electroporó 5 μ l de DNA de clonas BAC (al rededor del 15% del total de DNA extraído) en bacterias DH10B ajustando el aparato de electroporación a 2.3 kv, se sembraron en agar LB con ampicilina y cloranfenicol y se incubaron durante toda la noche para seleccionar únicamente las clonas BAC que formaran el co-integrado, sin embargo, no se observó crecimiento de colonias bacterianas en ninguna de las cajas con agar, lo cual podría implicar que la recombinación no ocurre, que ocurre a un frecuencia muy baja, o que las bacterias DH10B electrocompetentes no presentan la suficiente eficiencia de electroporación para ser transformadas por moléculas de DNA muy grandes como lo son las clonas BAC.

Para descartar esta última posibilidad y para comprobar que la recombinación se puede llevar a cabo probablemente en el cromosoma bacteriano sin las regiones de homología A Box y B Box, se realizó un tercer ensayo de recombinación.

En este ensayo se electroporó de manera independiente los plásmidos pRNxE y pLD53.SCA-E-B en bacterias DH10B/83A3 y DH10B/Nax1 y se cultivaron en medio LB con cloranfenicol y ampicilina durante toda la noche. La primer observación que se obtuvo de este experimento es que los cuatro cultivos se encontraban saturados al día siguiente, es decir, los cuatro cultivos fueron resistentes a ambos antibióticos, lo cual indica que el plásmido pLD53.SCA-E-B es capaz de recombinar en algún replicón sin la necesidad de tener las regiones de homología A Box o B Box.

Posteriormente se extrajo el DNA de las clonas BAC de los cultivos a los cuales se les electroporó el vector de recombinación pRNxE y se electroporaron 5 μ l en bacterias DH10B que se sembraron en agar LB con ampicilina y cloranfenicol. Por otro lado, se electroporaron independientemente las clonas BAC 83A3 y Nax1 para confirmar que las bacterias DH10B electrocompetentes eran capaces de recibir moléculas grandes, estas bacterias se sembraron en agar LB con cloranfenicol.

En esta fase del experimento se realizaron dos observaciones; la primera, fue que las bacterias electrocompetentes fueron capaces de recibir las clonas BAC 83A3 y Nax1, con 44 y 268 colonias respectivamente; y la segunda observación, fue que nuevamente, no se obtuvieron colonias resistentes a ampicilina y cloranfenicol indicando que no hubo recombinación entre el vector pRNxE y las clonas BAC.

Debido a las dificultades que se presentaron en los ensayos de recombinación homóloga mediada por RecA, se planteó como alternativa usar una estrategia basada en el sistema de recombinación homóloga *RED*.

6.3 Modificación de clonas BAC con secuencias del gen de Nax por recombinación homóloga con el sistema *RED*.

El sistema de recombinación homóloga *RED*, basado en enzimas del fago λ , se ha considerado como una estrategia que en poco tiempo será de rutina para realizar modificaciones genéticas, debido a su relativa sencillez y al poco tiempo que se requiere para su realización (Copeland, *et al*, 2001).

Esta estrategia implica a grandes rasgos, la generación de un fragmento lineal de DNA denominado cassette de recombinación, el cual permite que se lleve a cabo la recombinación al electroporarse en una cepa bacteriana hospedera del sistema de recombinación *RED* y de la clona BAC que se desea modificar (Lee, *et al*, 2000). Este cassette incluye dos regiones de homología a la secuencia blanco de 50 nucleótidos o más que deben flanquear un gen de selección además de la modificación que se pretende realizar en la clona BAC, como puede ser una sustitución, una delección o la inserción de un gen reportero.

Swaminathan y colaboradores (2001) reportan que el sistema de recombinación *RED* es tan eficiente que se puede eliminar la necesidad de usar un gen de selección; reportan que para la inserción de un fragmento de DNA, 1 de cada 130 colonias presentan el inserto, y por lo tanto se pueden encontrar las bacterias recombinantes analizando unas cuantas colonias diferentes. En base a esta observación, se diseñó el experimento de recombinación homóloga con el sistema *RED* para modificar las clonas

BAC que contienen regiones del gen de Nax , utilizando un cassette de recombinación sin gen de selección.

6.3.1 Ensayo con el sistema de recombinación homóloga RED.

Se generó un cassette lineal de recombinación de 1.9 kb cortando el fragmento Asc I – Fse I del plásmido pRNxE. Este cassette se denominó A-EGFP-B. El cual contiene el gen de EGFP flanqueado por las regiones de homología A Box y B Box de 450 y 389 pb respectivamente. Con la ayuda de este cassette se debería realizar la inserción del gen EGFP por recombinación homóloga entre las secuencias de A Box y B Box en la clona BAC (Figura 20).

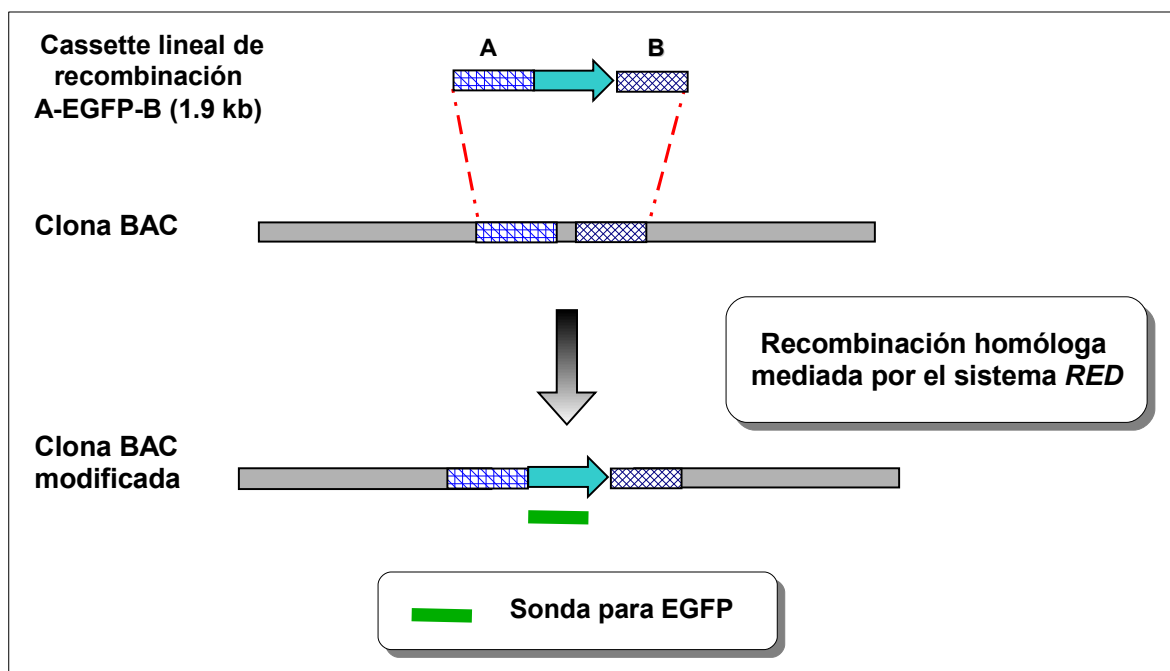


Figura 20: Esquema del ensayo de recombinación mediada por el sistema RED. Usando el cassette de recombinación A-EGFP-B (1.9 kb) que contiene el gen de EGFP flanqueado por A Box y B Box, la clona BAC sería modificada en un único evento de recombinación. Se indica la sonda de EGFP de 800 pb que se marcó radioactivamente con ^{32}P -dCTP para identificar las recombinantes deseadas.

Se cultivaron bacterias EL250/83A3 y EL250/Nax1 hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente se indujo la expresión del sistema de

RESULTADOS

recombinación RED como se indica en Materiales y Métodos. Por otro lado, se separaron alícuotas de bacterias sin inducir como control. Se electroporó el cassette de recombinación y posteriormente se sembraron las bacterias en agar LB con cloranfenicol. En este ensayo también se realizó un segundo control en el cual se electroporó únicamente con agua.

Las colonias que crecieron en la cajas de agar LB con cloranfenicol se transfirieron a membranas de nylon, se lisaron y se fijó el DNA a la membrana con luz UV.

La selección de bacterias recombinantes se hizo por hibridación tipo Southern utilizando una sonda para EGFP de 800 pb marcada radioactivamente con ^{32}P -dCTP (figura 20). Con esta estrategia se esperaba encontrar señal radioactiva en las autoradiografías de los cultivos en donde se indujo la expresión del sistema de recombinación y que se electroporaron con el cassette de recombinación en contraste con los controles donde no debería observarse señal.

Se analizaron más de 3 000 colonias después de inducir la recombinación, en tres cajas petri de cada una de las clonas BAC, y como se puede observar en la figura 21, no hubo señal radioactiva en ninguna de las autoradiografías, lo cual indica que la recombinación no sucedió, o que la eficiencia de recombinación es sumamente baja, menor a 1 de cada 3 000 colonias.

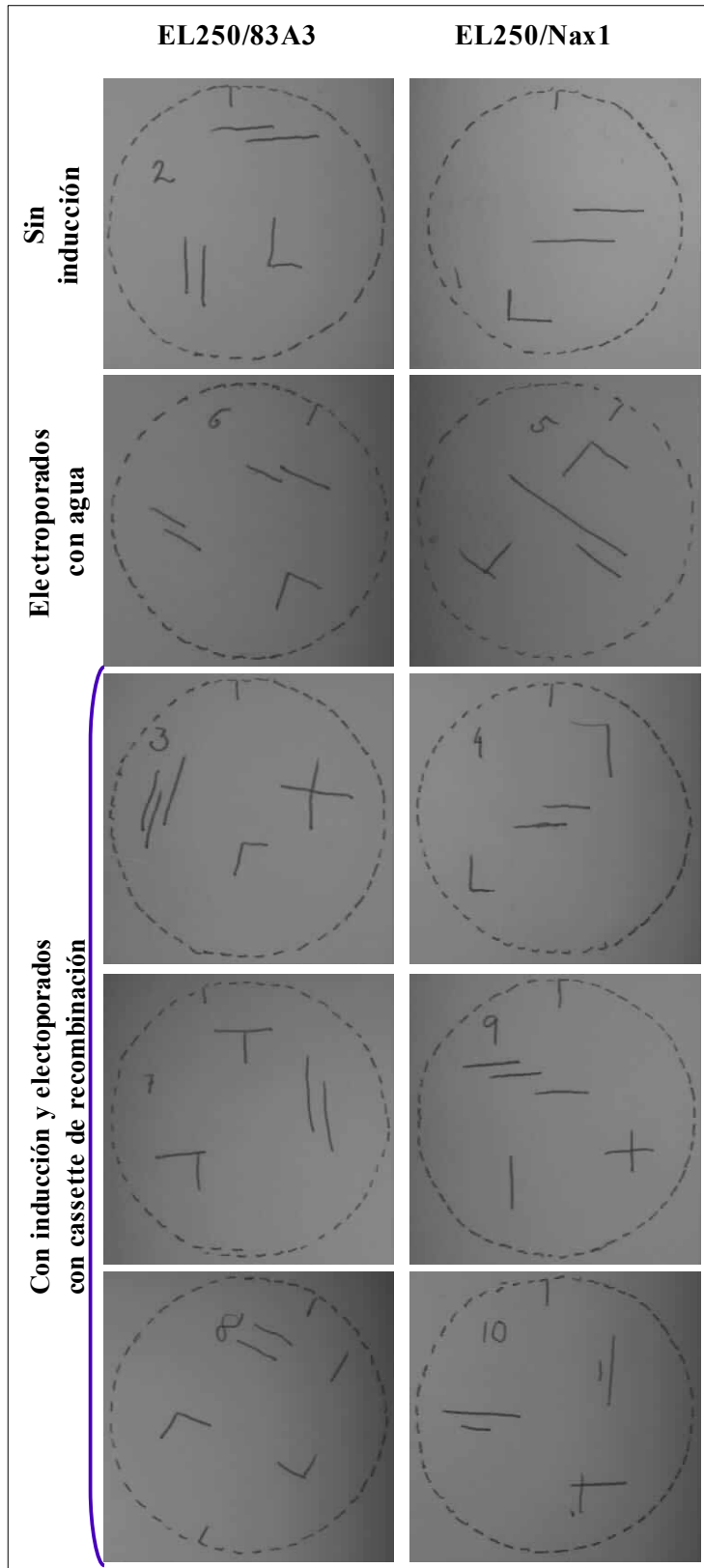


Figura 21: Autoradiografías de la hibridación en colonia del ensayo de recombinación con el sistema RED. Se muestran las fotos de las autoradiografías de los controles sin inducción, los controles electroporados únicamente con agua y las tres cajas petri analizadas de cada clona BAC. La hibridación se realizó con una sonda que contiene 800 pb de EGFP. Exposición: 72 horas.

7 DISCUSIÓN

El estudio de las secuencias de DNA que pudieran estar involucradas en la regulación transcripcional de un gen de eucariontes siempre implica la validación funcional de estas secuencias. Esta validación se hace frecuentemente con diferentes construcciones plasmídicas en las cuales se clonan las secuencias probablemente involucradas en la transcripción al extremo 5' de un gen reportero. De esta manera el gen reportero queda bajo la regulación transcripcional de las secuencias que se están estudiando. Sin embargo, los sistemas plasmídicos convencionales no son capaces de incluir todos los elementos de DNA que están involucrados en la regulación transcripcional de un gen. Es por esto que el uso de vectores de alta capacidad como los cromosomas artificiales de bacteria (clonas BAC), capaces de almacenar cientos de kb es una herramienta muy útil para estudiar la regulación transcripcional en un contexto genético mas completo (Heintz, 2001).

El uso de moléculas que contienen secuencias tan grandes de DNA genómico de eucariontes limita ampliamente la capacidad de modificarlas por los métodos convencionales de corte con enzimas de restricción y ligación *in vitro*. La forma de solventar este problema es el uso de metodologías basadas en la recombinación homóloga *in vivo*, que además tienen la ventaja teórica de poder hacer cualquier tipo de modificación en casi cualquier secuencia (Court, *et al*, 2002).

Con el fin de realizar estudios sobre la regulación transcripcional de los genes de los canales de sodio Na_x y $Na_v1.7$ se intentó en nuestro laboratorio insertar un gen reportero en clonas BAC que contienen regiones de estos genes con el método de recombinación homóloga *RED* basado en recombinasas del fago λ , sin embargo, se presentaron dificultades que evitaron que se pudieran obtener las clonas BAC con las modificaciones deseadas (López-Juárez, 2004). Es por esto que se planteó para este

trabajo la modificación de clonas BAC con regiones del gen del canal de sodio Na_x utilizando un sistema de recombinación basado en la proteína RecA de *E. coli* (Gong, et al, 2002) para insertar un gen reportero bajo el control transcripcional del gen de Na_x .

Este sistema implica en primera instancia construir un vector de recombinación con las secuencias de homología que permitirán llevar a cabo la recombinación en la secuencia blanco. Posteriormente se realizan los ensayos de recombinación para obtener las clonas BAC modificadas con la inserción del gen reportero.

7.1 Construcción del vector de recombinación pRNxE.

Se sintetizaron por PCR las regiones de homología al gen de Na_x A Box y B Box y se clonaron en el plásmido pLD53.SCA-E-B construyendo el vector de recombinación pRNxE.

Los oligonucleótidos utilizados para sintetizar las regiones de homología fueron diseñados de tal forma que el gen de EGFP sustituyera el codón ATG de inicio de la traducción de Na_x . Por lo tanto, EGFP desplazaría la región codificante de Na_x y quedaría sometido a la regulación del promotor de este canal. De esta manera se podría observar el funcionamiento de los elementos de regulación que se pudieran encontrar río arriba de la región promotora o dentro del intrón 1, sin introducir ninguna secuencia foránea de DNA que pudiera interrumpir el contexto genético natural.

7.2 Ensayo de recombinación homóloga mediada por RecA.

Se realizó el ensayo de recombinación homóloga con diferentes variaciones, y se observó que la recombinación que permitía sobrevivir a las bacterias en medio con ampicilina (marcador de la presencia del vector pRNxE) y cloranfenicol (marcador de la presencia de las clonas BAC) no estaba sucediendo en la molécula de las clonas BAC. El vector de recombinación pRNxE no puede replicarse por sí solo en la cepa DH10B debido a su origen de replicación R6K γ , por lo cual, los resultados sugieren que el grueso de los eventos de recombinación sucedieron en el cromosoma bacteriano, posiblemente en la secuencia de RecA. Aunque la cepa bacteriana DH10B tiene un fenotipo *recA*⁻

contiene toda la secuencia del gen de RecA.

Es posible que la eficiencia de la reacción se haya reducido en alto grado debido a la saturación de la reacción. En los ensayos que se realizaron en este trabajo se usaron 500 ng de vector de recombinación para cada muestra en contraste con 1 μ g que es lo que proponen Gong y colaboradores (2002).

Yang y colaboradores (1997) reportaron la primera versión de este sistema de recombinación para modificar el gen *RU49* y obtuvieron una eficiencia de recombinación para la formación de co-integrados del 10% de las colonias analizadas resistentes al antibiótico; posteriormente Gong y colaboradores (2002), quienes reportaron la segunda versión de este sistema modificando varios genes, obtuvieron eficiencias que van del 15 al 50% cuando usaron dos regiones de homología (como en este trabajo) y eficiencias del 40 al 100% cuando usaron una única región de homología.

En este trabajo se analizaron un total de 25 colonias independientes por PCR y 10 colonias independientes por hibridación tipo Southern en el primer experimento y al rededor del 15% de las clonas BAC producidas de cada uno de 4 cultivos independientes de toda la noche del segundo y tercer experimento, sin observar la formación de ningún co-integrado. Aunque no se realizó una búsqueda exhaustiva de las clonas BAC recombinantes, es probable que se hubiera observado al menos un evento de formación de co-integrado debido al gran número de clonas BAC que se analizó en el segundo y tercer experimento, en los cuales se extrajo DNA extracromosomal de clonas BAC sometidas a los ensayos de recombinación y se electroporó en bacterias DH10B para seleccionar únicamente la formación de co-integrados y no la recombinación en el cromosoma bacteriano.

R. García-Villegas (comunicación personal) intentó modificar clonas BAC que contiene regiones del gen de *Na_v1.7* por recombinación homóloga mediada por RecA con el sistema descrito por Yang y colaboradores (1997) y observó que la recombinación era en extremo ineficiente. Para solventar el problema aumentó el tamaño de las regiones de homología de cientos de pares de bases a más de 1 kilobase, obteniendo de esta manera una Clona BAC con la inserción del gen reportero *lacZ*.

Una opción para poder modificar las clonas BAC con regiones de N_{ax} , sería seguir esta misma estrategia, cambiando las regiones de homología A Box y B Box por regiones mucho más grandes, esperando aumentar de esta manera la frecuencia de la recombinación.

Otra opción que se puede seguir para aumentar la eficiencia de recombinación en las clonas BAC, es la eliminación de la secuencia de RecA del cromosoma de la cepa DH10B. Esta cepa es *recA*⁻, sin embargo la secuencia sigue en el cromosoma, es por esto que si eliminamos la secuencia de RecA, eliminaríamos la secuencia blanco en donde probablemente está ocurriendo la recombinación del vector pRNxE que produce el fondo de bacterias resistentes a ampicilina y cloranfenicol que se seleccionaron y que no corresponden a la formación de co-integrados.

La eliminación de la secuencia de RecA en el cromosoma puede realizarse por recombinación homóloga mediada por el sistema *RED* (Lee, *et al*, 2001) o por el sistema RecE/T (Narayanan, *et al*, 1999). Se generaría un cassette lineal de recombinación por PCR, que contuviera un gen de selección flanqueado por dos regiones de homología de 50 nucleótidos a las regiones adyacentes del gen de RecA en el cromosoma bacteriano, para sustituir la secuencia de RecA por la secuencia del gen de selección (resistencia a algún antibiótico).

Finalmente, se repetiría el ensayo de recombinación en la nueva cepa bacteriana carente de la secuencia de RecA con el vector de recombinación pRNxE para seleccionar únicamente las bacterias que recombinen en la clona BAC ya que no habrá otra región de homología en el cromosoma.

7.3 Ensayo de recombinación homóloga mediada por el sistema *RED*.

El sistema de recombinación homóloga *RED* del fago λ , es considerado por sus autores como la mejor opción para hacer modificaciones al cromosoma bacteriano y a las clonas BAC, debido a la rapidez con la que se puede realizar, ya que no necesita la construcción de plásmidos especiales y solo requiere la síntesis por PCR de cassettes lineales de recombinación en donde se deben incluir regiones de homología de tan solo

50 nucleótidos; además de que la presencia de las proteínas encargadas de la recombinación es fácilmente controlada sin sobreexpresarlas innecesariamente (Copeland, *et al.*, 2001; Court, *et al.*, 2002). Incluso se ha denominado “recombingeniería” a la ingeniería genética por recombinación homóloga mediada, específicamente, por proteínas del fago λ (Copeland, *et al.*, 2001).

Lee y colaboradores (2001) al modificar una clona BAC que contiene el gen *Eno2* de ratón con el sistema de recombinación *RED*, observaron que alrededor del 100% de las colonias resistentes a kanamicina analizadas presentaron la inserción correcta del gen reportero EGFP; mientras que Swaminathan y colaboradores (2001) reportan que usando cassettes de recombinación de cadena sencilla menores de 200 pb, fue posible hacer deleciones, modificaciones puntuales o inserciones de “etiquetas” de 24 pb al gen *Brca2* de ratón sin necesidad de usar genes de selección, obteniendo una eficiencia promedio de 1 clona BAC modificada de cada 130 clonas analizadas.

Considerando la alta eficiencia de recombinación que puede tener este sistema, es intrigante observar tantas dificultades en nuestro laboratorio para modificar clonas BAC con regiones de los canales de sodio $Na_v1.7$ (López-Juárez, 2004) y Na_x (López-Juárez, 2004; y el presente trabajo).

En sus experimentos para insertar un gen de selección en una clona BAC con regiones del gen de $Na_v1.7$, López-Juárez (2004) aumentó el tamaño de las regiones de homología (de 50 pb a 286 en el extremo 5' del cassette y 812 al extremo 3'), cambió de gen de selección (del gen de resistencia a tetraciclina al gen de resistencia a ampicilina en conjunto con el gen *SacB*) y cambió de región de recombinación (del exón 1 al exón 2), sin obtener resultados positivos.

Por otro lado, cuando intentó modificar la clona BAC con secuencias del gen de Na_x logró introducir en el exón 2 el gen de resistencia a ampicilina y el gen de *SacB* con una eficiencia de 6 de 9 colonias analizadas, sin embargo, cuando intentó sustituir el gen de resistencia por el gen reportero *lacZ* no se obtuvieron clonas BAC con la modificación deseada, e incluso, se observaron rearrreglos en el DNA de las clonas BAC en varias clonas.

En este trabajo, no se usó gen de selección y se usaron secuencias de homología mayores a 300 pb, por lo que se esperaba alrededor de 1 colonia por cada 100 o 200 con la modificación deseada. Se analizaron aproximadamente 6000 colonias por hibridación en colonia (aproximadamente 3000 para cada clona BAC) sin observar ningún evento de recombinación.

Es probable que se haya reducido la eficiencia de recombinación al grado de no poder observar ningún evento de recombinación en miles de colonias debido a la desnaturalización previa del cassette utilizado en los ensayos de recombinación.

Se ha observado que el uso de cassettes lineales de recombinación de algunos cientos de pares de bases aumenta su eficiencia de recombinación si el DNA es desnaturalizado previamente, ya que la recombinación con el sistema *RED* es mas eficiente con DNA de cadena sencilla (Swaminathan, *et al*, 2001; Copeland, *et al*, 2001). Sin embargo en una revisión del mismo grupo de investigación mencionan como datos no publicados que la recombinación con DNA de cadena sencilla de cassettes de recombinación mayores a 1 kb reduce su eficiencia dramáticamente (Court, *et al*, 2002).

Este dato no se tomó en cuenta al momento de realizar el ensayo de recombinación mediado por el sistema de recombinación *RED*, y probablemente se trató de un factor determinante que evitó que se pudieran observar eventos de recombinación en las clonas BAC, teniendo como antecedente que esta misma región del DNA se ha modificado con éxito usando el sistema de recombinación *RED*, insertando el gen de resistencia a ampicilina y el gen *SacB* (López-Juárez, 2004).

7.4 La recombinación homóloga y el gen del canal Na_x.

Las clonas BAC y las tecnologías de recombinación homóloga diseñadas para su modificación están tomando fuerza como herramientas importantes para realizar estudios funcionales y de regulación genética (Heintz, 2001; Court, *et al*, 2002).

Mortlock y colaboradores (2003) encontraron y validaron funcionalmente elementos de regulación transcripcional a distancia del gen *Gdf6* de ratón con ayuda de un conjunto de clonas BAC y de estrategias para modificarlas. Primero insertaron un gen reportero en

la región 5' no traducida del gen con ayuda del sistema de recombinación mediado por RecA; y posteriormente identificaron una región conservada y la eliminaron usando el sistema de recombinación *RED* para validar su función experimentalmente.

Más recientemente, Yang y colaboradores (2006) están realizando una serie de clonas BAC con la inserción del gen reportero EGFP por recombinación homóloga mediada por RecA en al rededor de 100 clonas BAC que contienen diferentes genes del pez cebra, *Danio rerio*, con el objetivo de hacer peces transgénicos y realizar un atlas de expresión para cada uno de los genes contenidos en las clonas BAC.

Estos trabajos en conjunto con los reportes de los diferentes métodos de recombinación diseñados (Yang, *et al*, 1997; Yu, *et al*, 2000; Lee, *et al*, 2001; Swaminathan, *et al*, 2001; Gong, *et al*, 2002; Warming, *et al*, 2005), muestran que estos sistemas funcionan y en una gran variedad de genes, sin reportar ningún contratiempo, incluso, D. Court, uno de los autores del método de recombinación homóloga mediada por el sistema *RED*, dice que nunca había observado algo como lo que está sucediendo con el gen de Na_x (R. García-Villegas, comunicación personal).

Por otro lado, más acorde con lo que sucede en el caso del gen de Na_x, L. Montoliu tuvo problemas para modificar clonas BAC con el gen de la tirosinasa de humano. Utilizó el sistema de recombinación *RED*, y el sistema mediado por RecA sin obtener resultados satisfactorios. Finalmente pudo modificar las clonas BAC usando el sistema de recombinación RecE/T (R. García-Villegas, comunicación personal).

Juntando estos trabajos, resulta poco común (o poco reportado) que los sistemas de recombinación no sean lo suficientemente eficientes como para generar las clonas BAC modificadas. Como estrategia alternativa se puede plantear el uso del sistema de recombinación RecE/T (Narayanan, *et al*, 1999), que finalmente funciona de manera homóloga al sistema *RED* (Court *et al*, 2002), con la diferencia de que las recombinasas del sistema de recombinación *RED* son de origen viral (del fago λ), mientras que las recombinasas del sistema RecE/T son de origen bacteriano (*E. Coli*).

Por otro lado, se puede cambiar la secuencia blanco, tratando de insertar el gen reportero en el final del gen del canal de sodio Na_x en la región 5' no traducida en lugar

del inicio de la región codificante.

La causa por la cual la recombinación no sucede de manera eficiente no queda clara, y con los datos con los que disponemos no se puede dar una explicación concreta de lo que esta sucediendo.

Ya que en bacterias el DNA no se asocia con histonas, lo mas probable es que el elemento determinante de la baja eficiencia de recombinación sea una característica propia del DNA, en particular de la secuencia. Probablemente la composición de nucleótidos y por lo tanto, la energía necesaria para liberar o unir las cadenas, limite de alguna manera la capacidad de las recombinasas de aparear las regiones homólogas. Por otro lado, también sería plausible que la presencia de múltiples repetidos en las clonas BAC favorezca la recombinación entre regiones internas de la molécula de DNA generando deleciones o rearrreglos moleculares como los que observó López-Juárez (2004), de igual forma la presencia de repetidos podría generar estructuras secundarias que impidieran la acción de las proteínas de recombinación. En la figura 22 se muestra la comparación de la secuencia de DNA de la clona BAC RP23-83A3 contra sí misma. Se puede observar una línea diagonal que atraviesa la gráfica de esquina a contraesquina y que representa la comparación directa de la clona BAC contra sí misma, sin embargo la gráfica está repleta de líneas diagonales que indican la presencia de repetidos con mas de un 50% de identidad en los cuales probablemente pueden ocurrir eventos de recombinación dentro de la misma secuencia. Mas aventuradamente, quizás la secuencia que pretendemos modificar es reconocida por alguna proteína bacteriana que limita la unión de las recombinasas al DNA.

Para poder conocer si la secuencia exacta que pretendemos modificar es la responsable de los problemas de recombinación, es necesario realizar nuevos experimentos de recombinación variando la secuencia blanco, tratando de hacer los ensayos de recombinación lo mas eficientes posible.

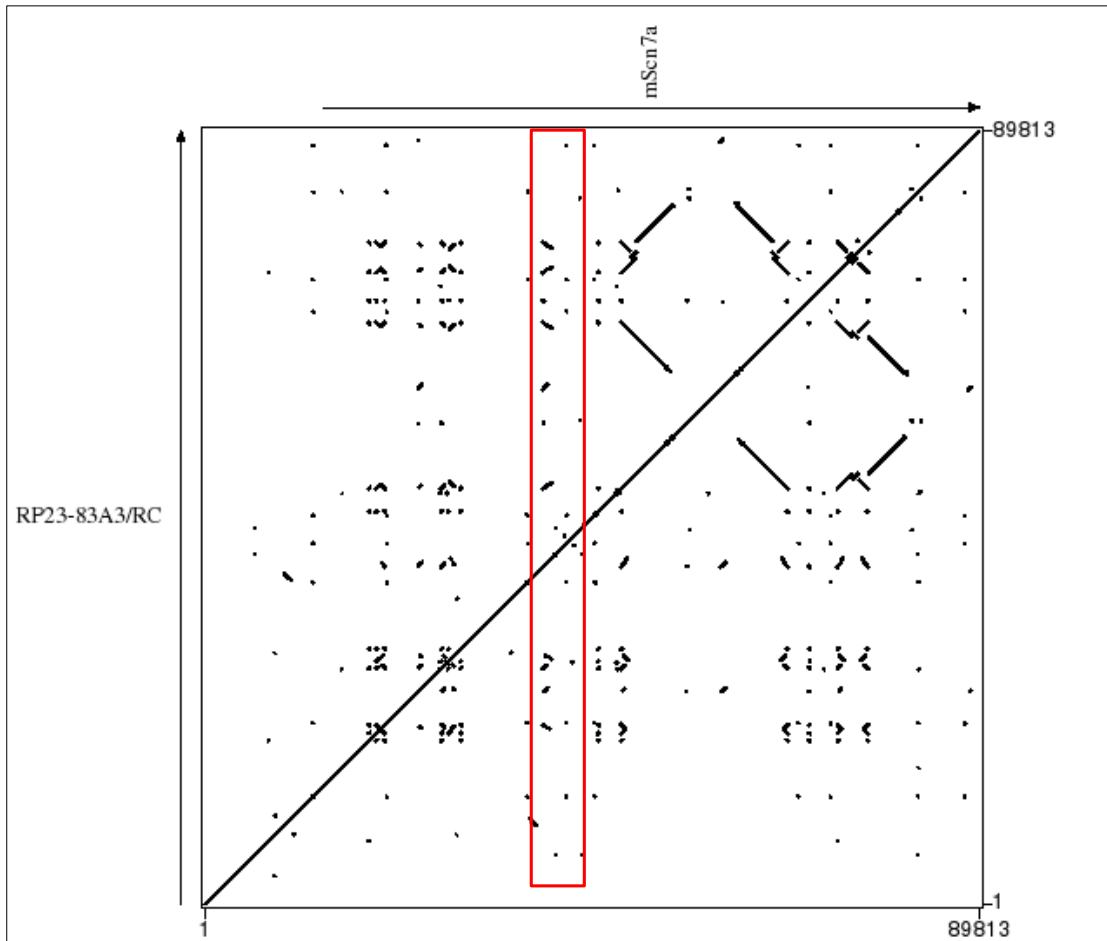


Figura 22: Matriz de puntos donde se compara secuencia de la clona BAC RP23-83A3 contra sí misma. Se puede observar una línea diagonal que atraviesa la gráfica de esquina a contraesquina, que representa la comparación directa de la clona BAC contra sí misma. Se observa una gran cantidad de líneas que representan regiones con más de 50% de identidad de la secuencia de nucleótidos que se repiten a lo largo de la clona BAC, si la línea diagonal tiene una pendiente positiva, el repetido es en el mismo sentido, y si la pendiente es negativa, el repetido es en sentido contrario. En la parte superior se indica con una flecha la región que corresponde al gen *Scn7a* que codifica para Na_x . En un recuadro rojo se indica la región aproximada donde se intentó insertar el gen reportero EGFP. La imagen fue hecha con el programa PipMaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>) (Schwartz, et al, 2000).

7.5 Alternativas para estudiar los elementos de regulación del promotor de Na_x .

Otras estrategias como el mapeo de sitios hipersensibles a DNasa I o el ensayo de *footprinting* de DNA pueden ser usadas para encontrar las regiones de DNA que pueden estar involucradas en la transcripción del gen de Na_x . El *footprinting* DNA nos permitiría conocer las regiones de DNA genómico de la vecindad del promotor del gen del canal de

sodio Na_x que interactúan con proteínas ya que la interacción DNA-proteína protege al DNA de la degradación por la DNasa I. De esta manera se puede inferir que los sitios protegidos a la degradación con DNasa I pueden estar interactuando con factores de transcripción (Sambrook y Russell, 2001b; eg. Poiraud, *et al*, 1999). Por su parte, el mapeo de sitios hipersensibles a DNasa I nos podría indicar las regiones de DNA importantes en la transcripción ya que se ha observado que dichas regiones por lo general son mas sensibles a la degradación con DNasa I (Sambrook y Russell, 2001b; eg. Gautron, *et al*, 2001).

Adicionalmente se puede hacer uso de herramientas bioinformáticas para comparar secuencias de DNA genómico de diferentes mamíferos como el humano y el ratón. Usando los programas de análisis de secuencias PipMaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/pipmaker/>, Schwartz, *et al*, 2000) o VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>, Mayor, *et al*, 2000) se pueden realizar alineamientos entre pares de secuencias de decenas de kb. Se puede comparar la secuencia de DNA genómico de una región de 30 o 40 kb que contenga el promotor de Na_x de ratón y compararla con la región correspondiente en el humano. De esta forma podríamos identificar secuencias conservadas entre el ratón y el humano. Las secuencias que se conservan a lo largo de la evolución y que no son parte de la región codificante de la proteína, podrían tener una importancia funcional para la transcripción del gen de Na_x .

Una vez identificadas las secuencias de DNA que puedan estar involucradas en la regulación transcripcional del canal de sodio Na_x es necesario validar funcionalmente su efecto sobre el promotor. Estas secuencias pueden ser clonadas en las construcciones plasmídicas que contienen diferentes regiones del promotor de Na_x en fase con un gen reportero (luciferasa, lacZ o EGFP). Estas construcciones pueden ser transfectadas en líneas celulares o cultivos primarios (en células que expresen el gen de Na_x de manera natural y en células que no lo expresen) para observar el efecto que tienen las regiones de DNA identificadas sobre la transcripción de las diferentes construcciones del promotor de Na_x .

Sin embargo, el uso de estas estrategias para buscar y estudiar los elementos de

regulación no elimina la necesidad de producir clonas BAC con diferentes modificaciones, en primera instancia, por el gran tamaño del gen de Na_x de ratón (>100 kb) en el cual, tan solo el intrón 1 mide 27.6 kb, lo cual es demasiado grande para poder clonarlo en un plásmido convencional. Por otro lado el contexto de la secuencia de DNA genómico es sumamente importante para la expresión de un gen y tener en una construcción posiblemente todos los elementos que regulan su expresión, sería una herramienta muy útil para estudiar su regulación.

Las clonas BAC permiten tener un contexto genético mas completo del gen que se desea estudiar, y es por eso que es necesario poder modificar las clonas BAC que contiene regiones del gen de Na_x para poder estudiar su expresión en un sistema mas parecido a lo que sucede de manera natural.

En resumen y considerando los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir lo siguiente:

1. Eliminar la secuencia del gen de RecA del cromosoma bacteriano y utilizar nuevamente el sistema de recombinación mediado por RecA.
2. Utilizar regiones de homología de 1 a 3 kb y utilizar el sistema de recombinación mediado por RecA.
3. Intentar introducir el gen reportero en el extremo 3' del gen del canal de sodio Na_x , utilizando el sistema de recombinación *RED*, o el sistema mediado por RecA.

8 CONCLUSIONES

- Se construyó el vector de recombinación pRNxE a partir del plásmido pLD53.SCA-E-B, con el cual se realizaron los ensayos de recombinación homóloga mediados por RecA.
- No se pudo insertar el gen de EGFP en las clonas BAC BNax1 y RP23-83A3 por recombinación homóloga mediada por RecA. Probablemente los eventos de recombinación sucedían en el cromosoma bacteriano con mucha mayor eficiencia que en las clonas BAC.
- No se pudo insertar el gen de EGFP en las clonas BAC BNax1 y RP23-83A3 por recombinación homóloga mediada por el sistema *RED*, probablemente se redujo la eficiencia de recombinación debido a que se desnaturalizó el DNA del cassette de recombinación antes de realizar los ensayos de recombinación.
- De acuerdo a otros reportes, es poco común que se presenten problemas al intentar modificar clonas BAC, y las causas por lo que esto sucede en las clonas BAC que contiene el gen de Nax no están claras, pero puede ser el resultado de alguna característica intrínseca de a la secuencia de DNA que se quiere modificar (eg. la presencia de secuencias repetidas).
- Existen otras estrategias con las cuales se pueden buscar y estudiar las regiones de DNA que puedan estar involucradas en la regulación transcripcional del gen de Nax , sin embargo, no sustituyen la necesidad de producir clonas BAC con diferentes modificaciones.

9 REFERENCIAS

1. Aidley, D.J. y P.R. Stanfield. 1998. Ion channels, molecules in action. Cambridge. Reino Unido. 307 pp.
2. Akopian, A.N., V. Souslova, L. Sivilotti y J.N. Wood. 1997. Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *FEBS*. 400:183-187.
3. Catterall, W.A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26:13-25.
4. Catterall, W.A., A.L. Goldin y S.G. Waxman. 2003. International union of pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: Sodium channels. *Pharmacol. Rev.* 55(4):575-578.
5. Cooper, G.M. y R.E. Hausman. 2004. The cell, a molecular approach. 3ra Ed. ASM Press-Sinauer. Washington, USA. 713 pp.
6. Copeland, N.G., N.A. Jenkins y D.L. Court. 2001. Recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 2:769-779.
7. Court, D.L., J.A. Sawitzke y L.C. Thomason. 2002. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Genet.* 36:361-388.
8. Felipe, A. T.J. Knittle, K.L. Doyle y M.M. Tamkun. 1994. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J. Biol. Chem.* 269(40):30125-30131.
9. Felts, P.A., J.A. Black, S.D. Dib-Hajj y S.G. Waxman. 1997a. NaG: A sodium channel-like mRNA shared by Schwann cells and other neural crest derivatives. *Glia*. 21:269-276.
10. Felts, P.A., S. Yokohama, S. Dib-Hajj, J.A. Black y S.G. Waxman. 1997b. Sodium Channel α -Subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): Different Expression Patterns in Developing Rat Nervous System. *Mol. Brain Res.* 45:71-82.
11. García-Villegas, M. R., S. Arni, M. Morales y A. López-Juárez. 2002. 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.
12. Gautron S., G. Dos Santos, D. Pintos-Henrique, A. Koulakoff, F. Gros y Y. Berwald-Netter. 1992. The glial voltage-gated sodium channel: Cell- and tissue-specific mRNA expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:7272-7276.

REFERENCIAS

13. Gautron, S., C. Gruszczynsky, A. Koulakoff, E. Poiraud, S. Lopez, H. Cambier, G. Dos Santos y Y. Berwald-Netter. 2001. Genetic and epigenetic control of the Na-G ion channel expression in glia. *Glia*. 33:230-240.
14. George, A.L. Jr, T.J. Knittle y M.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.
15. Goldin, A.L., R.L. Barchi, J.H. Caldwell, F. Hofmann, J.R. Howe, J.C. Hunter, R.G. Kallen, G. Mandel, M.H. Meisler, Y.B. Netter, M. Noda, M.M. Tamkun, S.G. Waxman, J.N. Wood y W.A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 28:365-368.
16. Goldin, A.L. 2001a. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol*. 205:575-584.
17. Goldin, A.L. 2001b. Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.* 63:871-894.
18. Gong, S., X.W. Xiangdong, C. Li y N. Heintz. 2002. Highly efficient modification of bacterial artificial chromosomes (BACs) using novel shuttle vector containing R6K ϕ origin of replication. *Genome*. 12:1992-1998.
19. Goodrich, J.A., G. Cutler y R. Tijan. 1996. Contacts in context: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell*. 84:825-830.
20. Heintz, N. 2001. BAC to the future: The use of BAC transgenic mice for neuroscience research. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:861-870.
21. Hille, B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3ra Ed. Sinauer. Massachusetts, EUA. 814 pp.
22. Hiyama, T.Y., E. Watanabe, K. Ono, K. Inenaga, M.M. Tamkun, S. Yoshida y M. Noda. 2002. Na_x channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci*. 5(6):511-512.
23. Hiyama, T.Y., E. Watanabe, H. Okado y M. Noda. 2004. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na_x sodium channels for the control of salt-intake behavior. *J. Neurosci*. 24(42):9276-9281.
24. Hunkapiller, T., H. Huang, L. Hood y J.H. Campbell. 1982. The impact of modern genetics in evolutionary theory. En "Perspectives on evolution". R. Milkman (Ed). Sinauer. Massachusetts, EUA. pp. 164-189.
25. Jessen, J.R., A. Meng, R.J. McFarlane, B.H. Paw, L.I. Zon, G.R. Smith y S. Lin. 1998. Modification of bacterial artificial chromosome through Chi-stimulated homologous recombination and its application in zebrafish transgenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:5121-5126.
26. Kodonaga, J.T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell*. 116:247-257.
27. Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA 3: Integral software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163.
28. Lee, E-C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins y N.

REFERENCIAS

- G. Copeland. 2001. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*. 73:56-65.
29. Lopreato, G.F., Y. Lu, A. Southwell, N.S. Atkinson, D.M. Hills, T.P. Wilcox y H.H. Zakon. 2001. Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *PNAS*. 58(13):7588-7592.
30. Lewin, B. 2004. Genes VIII. Prentice Hall. New Jersey, EUA. 1056 pp.
31. López-Juárez, A. 2004. Modificación de clonas BAC que contienen a los genes de los canales de sodio Na_v1.7 y Na_x. Tesis de licenciatura. FES Iztacala UNAM. Tlalnepantla, Edo de México. 87 pp.
32. Mayor, C., M. Bruno, J.R. Schwartz, A. Paliakov, E.M. Rubin, K.A. Frazer, L. S. Pachter y I. Dubchak. 2000. VISTA: visualizing global DNA sequences alignments of arbitrary length. *Bioinformatics*.16:1046-1047.
33. Morales-Buendía, M.A. 2004. Caracterización funcional de gen Scn7A de ratón que codifica para el canal de sodio Na_x. Tesis de licenciatura. FES Iztacala UNAM. Tlalnepantla Edo de México. 68 pp.
34. Mortlock, D.P., C. Guenther y D.M. Kingsley. 2003. A general approach for identifying distant regulatory elements applied to the *Gdf6* gene. *Genome Res*. 13:2069-2081.
35. Narayanan, K., R. Williamson, Y. Zhang, A.F. Stewart y P.A. Ioannou. 1999. Efficient and precise engineering of a 200 kb b-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Ther*. 6(3):442-447.
36. Noda, M y T.Y. Hiyama. 2005. Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. *Chem. Senses*. 30(supl.1):i44-i45.
37. Noda, M. 2006. The subfornical organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. *Neuroscientist*. 12(1): 80-91.
38. Novak, A.E., M.C. Jost, Y. Lu, A.D. Taylor, H.H. Zakon y A.B. Ribera. 2006. Gene duplications and evolution of vertebrate voltage-gated sodium channels. *J. Mol. Evol*. 63:208-221.
39. Novarovic, S., R. Eglén y J. Hunter. 2001. Regulation of Na⁺ channel distribution in the nervous system. *Trends Neurosci*. 24:473-8.
40. Pierce, B.A. 2003. Genetics, a conceptual approach. W.H. Freeman and company. New York, EUA. 709pp.
41. Poiraud, E. C. Gruszczynski, A. Porteu, H. Cambier, M. Escurat, A. Koulakoff, A. Kahn, Y. Berwald-Netter y S. Gautron. 1999. The Na-G ion channel is transcribed from a single promoter controlled by distinct neuron- and Schwann cell-specific DNA elements. *J. Neurochem*. 73(6):2575-2585.
42. Ogata, N y Y. Ohishi. 2002. Molecular Diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na⁺ Channels. *Jpn. J. Pharmacol*. 88:365-377.

REFERENCIAS

43. Orphanides, G. y D. Reinberg. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell*. 108:439-451.
44. Osoegawa, K., M. Tateno, P.Y. Woon, E. Frengen, A.G. Mammoser, J.J. Catanese, Y. Hayashizaki y P.J. de Jong. 2006. Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res*. 10:116-128.
45. Raymond, C.K., J. Castle, P. arrett-Engel, C.D. Armour, Z. Kan, N. Tsinoremas y J.M. Johnson. 2004. Expression of alternatively spliced sodium channel α -subunit genes. *J. Biol. Chem.* 279(44):46234-46241.
46. Sambrook J. y D.W. Russell. 2001a. Molecular cloning, A laboratory manual, Volumen 1. 3ra Ed. Cold Spring Harbor.
47. Sambrook J. y D.W. Russell. 2001b. Molecular cloning, A laboratory manual, Volumen 3. 3ra Ed. Cold Spring Harbor.
48. Schwartz, S., Z. Zhang, K.A. Frazer, A. Smit, C. Riemer, J. Bouck, R. Gibbs, R. Hardison y W. Miller. 2000. PipMaker – A web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Res*. 10(4):577-586.
49. Shizuya, H. B. Biren, U.J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri y M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 89:8794-8797.
50. Swaminathan, S., H.M. Ellis, L.S. Waters, D. Yu, E-C. Lee, D.L. Court y S.K. Sharan. 2001. Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides. *Genesis*. 29:14-21.
51. Warming, S., N. Constantino, D.L. Court, N.A. Jenkins y N.G. Copeland. 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using *galK* selection. *Nucleic Acid Res*. 33(4):e36.
52. Watanabe, E., A. Fujikawa, H. Matsunaga, Y. Yasoshima, N. Sako, T. Yamamoto, C. Saegusa y M. Noda. 2000. Na_v2/NaG is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *J Neurosci*. 20(20):7743-7751.
53. Watanabe, E., T.Y. Hiyama, R. Kodama y M. Noda. 2002. Na_x sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. *Neurosci. Lett*. 330:109-113.
54. Watanabe, E., T.Y. Hiyama, H. Shimizu, R. Kodama, N. Hayashi, S. Miyata, Y. Yanagawa, K. Obata y M. Noda. 2006. Sodium-level-sensitive Sodium Channel Na_x is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 290:R568-R576.
55. Watanabe, U., T. Shimura, N. Sako, J. Kitagawa, T. Shingai, E. Watanabe, M. Noda y T. Yamamoto. 2003. A comparison of voluntary salt-intake behavior in Na_x-gene deficient and wild-type mice with reference to periferal taste inputs. *Brain Res*. 967:247-256.
56. Yang, X.W., P. Model y N.Heintz. 1997. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. biotechnol*. 15:859-865.
57. Yang, Z., H. Jiang, T. Chachainasakul, S. Gong, X.W. Yang, N Heintz y S. Lin. 2006. Modified

REFERENCIAS

- bacterial artificial chromosomes for zebrefish transgenesis. *Methods*. 39:183-188.
58. 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.
59. Yu, F.H. y W.A. Catterall. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*. 4(3):207.

10 ANEXO A: Composición de medios de cultivo y soluciones.

Medios de cultivo y agar .

Medio líquido LB (1 litro)

- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g
- H₂O a 1 litro

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 N y esterilizar por autoclave.

Medio líquido NZCYM (1 litro)

- NZ amina 10 g
- NaCl 5 g
- Extracto de levadura 5 g
- Casaminoácidos 1 g
- MgSO₄ · 7H₂O 2 g
- H₂O a 1 litro

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5 N y esterilizar por autoclave.

ANEXO A: Composición de medios de cultivo y soluciones.

Agar LB (1 litro)

- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g
- BACTO agar 15 g
- H₂O a 1 litro

Esterilizar por autoclave.

Soluciones para extracción de DNA por el método de lisis alcalina.

Solución de lisis alcalina I

- Glucosa 50 mM
- Tris-Cl (pH 8) 25 mM
- EDTA (pH 8) 10 mM

Esterilizar por autoclave y guardar a 4°C

Solución de lisis alcalina II

- NaOH 0.2 N
- SDS 1% (p/v)

Prepara en el momento de uso.

Solución de lisis alcalina III

- Acetato de potasio 5 M 60 ml
- Ácido acético glacial 11.5 ml
- Aforar a 100 ml con H₂O

Concentración final: 3 M de K y 5 M de acetato. Esterilizar por autoclave y guardar a 4°C

Soluciones para hibridación tipo Southern.

Solución de prehibridación

- SSPE 20x 1.5x
- SDS 10% (p/v) 1%
- Leche descremada 10% (p/v) 0.5%
- DNA de esperma de salmón 200 µg/ml
- H₂O

Debe prepararse en el momento, el DNA de esperma de salmón se debe desnaturalizar previamente (hirviendo durante 10 minutos).

Solución de hibridación

- SSPE 20x 1.5x
- SDS 10% (p/v) 1%
- Leche descremada 10% (p/v) 0.5%
- DNA de esperma de salmón 200 µg/ml
- Sonda marcada radiactivamente 1x10⁶ cpm/ml
- H₂O

Debe prepararse en el momento, el DNA de esperma de salmón y la sonda deben desnaturalizarse previamente.

SSC 20x

- NaCl 3 M
- Citrato de sodio 0.3 M

Ajustar el pH a 7 con HCl diluído y esterilizar por autoclave.

SSPE 20x

- NaCl 3 M
- NaH₂PO₄ 0.2 M
- EDTA 0.02 M

Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar por autoclave.

Transferencia de colonias bacterianas a una membrana de nylon.

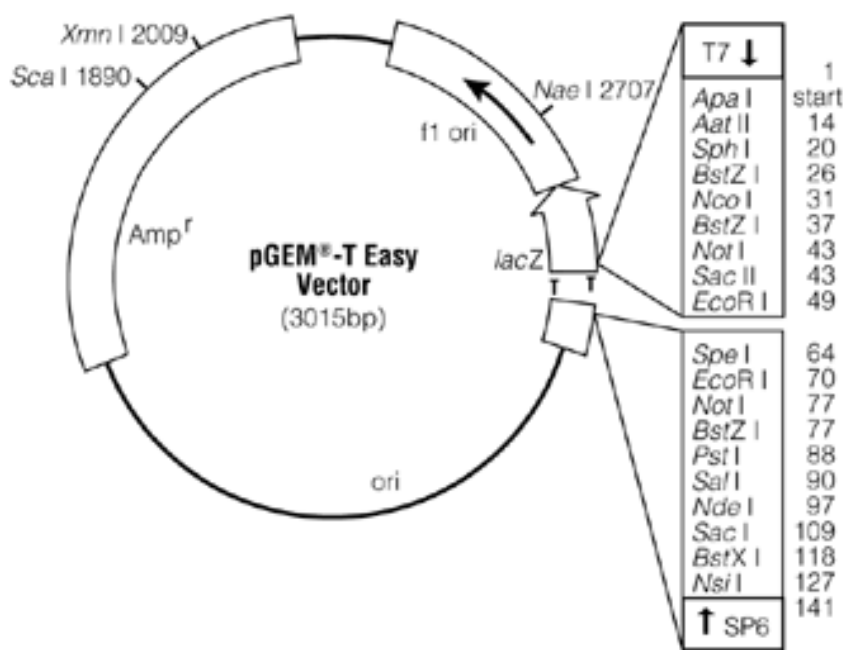
Solución desnaturalizante

- NaOH 0.5 M
- NaCl 1.5 M

Solución neutralizante

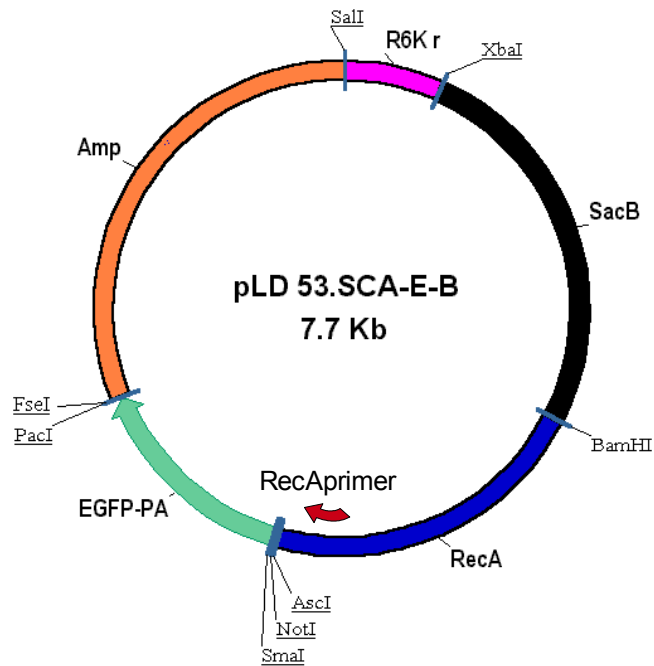
- NaCl 1.5 M
- Tris-HCl (pH 7.5) 1 M

11 ANEXO B: Mapas de plásmidos.

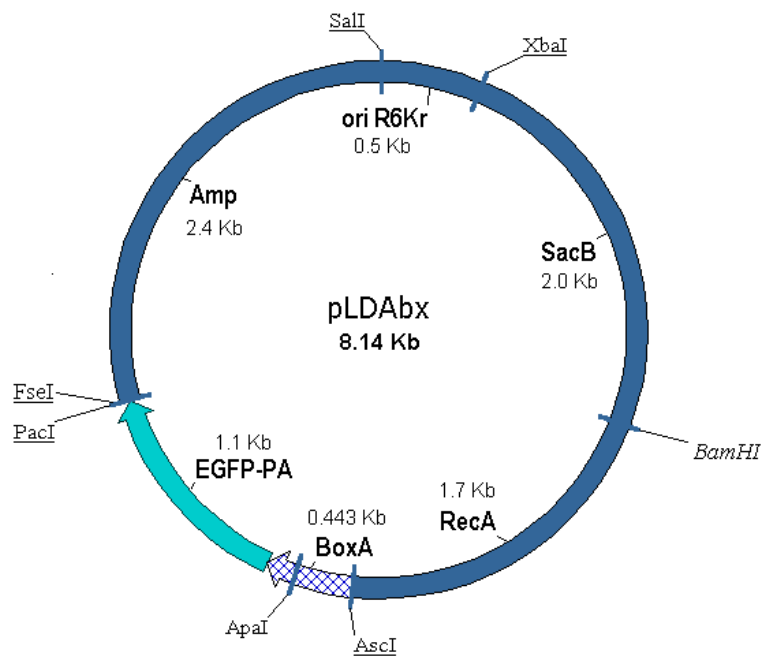


1473VA05_0A

Mapa 1: pGEM-T Easy Vector (Promega)

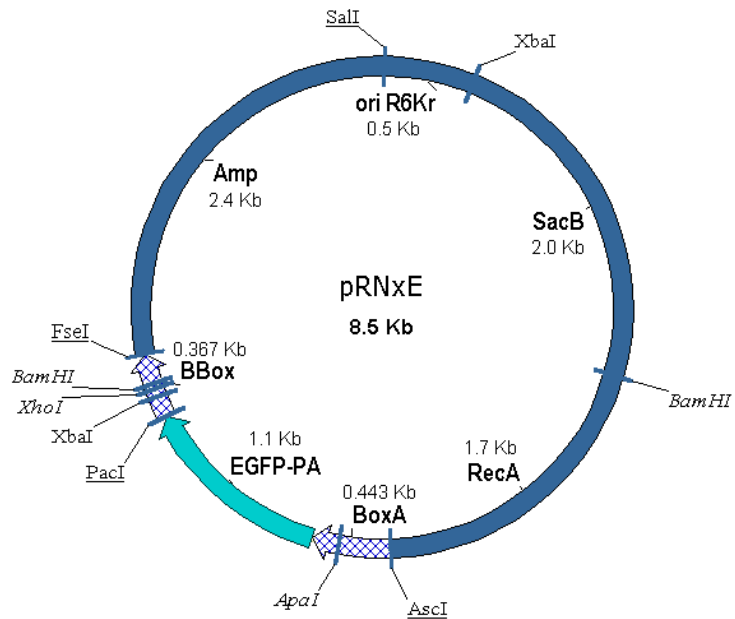


Mapa 2: pLD53.SCA-E-B. Donado por S. Gong de The Rockefeller University. La flecha roja indica el sitio de unión del oligonucleótido RecAprimer.

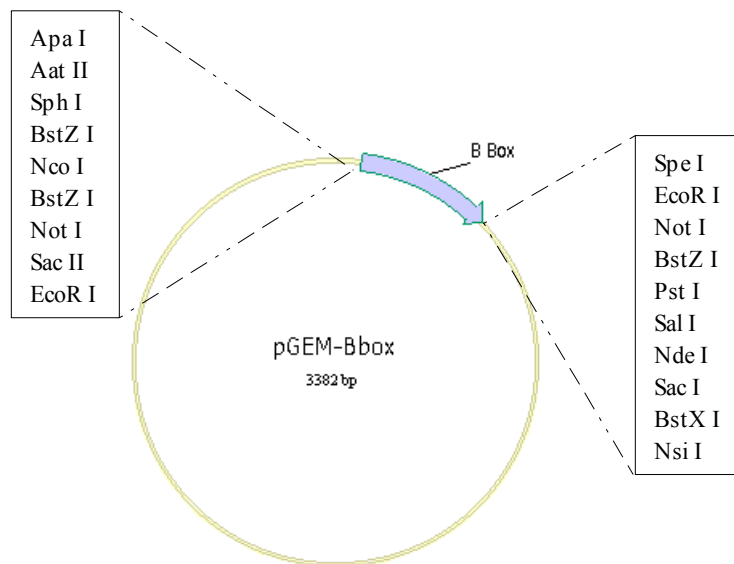


Mapa 3: pLDAbx. Fragmento "A Box" de Na_x de 443 pb con un sitio Asc I en el extremo 5', clonado en los sitios Asc I – Sma I* de pLD53.SCA-E-B

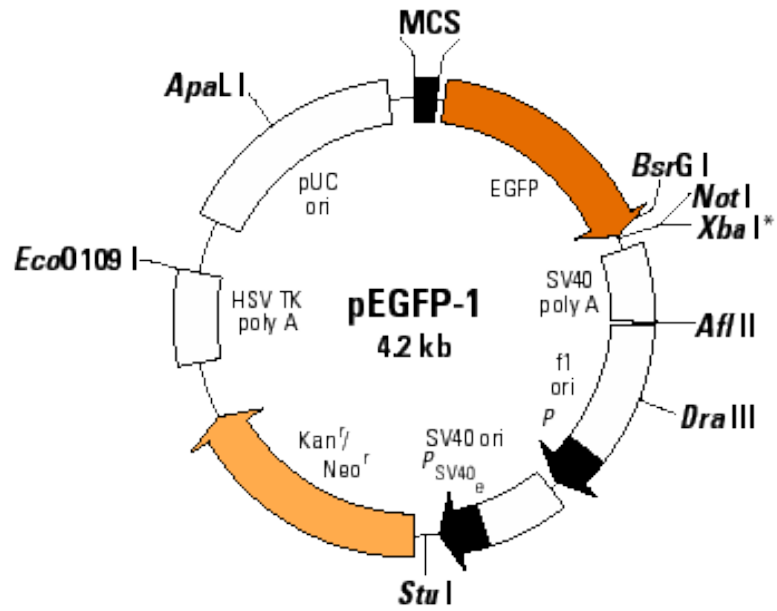
ANEXO B: Mapas de plásmidos.



Mapa 4: pRNxE. Fragmento *EcoR I* de *pGEMBBBox* reparado con *Klenow*, clonado en el sitio *Pac I* reparado con *Pfu* de *pLDAbx*.



Mapa 5: pGEM-Bbox. Fragmento "B Box" de Nax de 389 pb clonado en el vector de clonación *pGEM-T Easy*



Mapa 6: pEGFP-1 (Clontech)