



**¿ES EL GEN HUMANO hPL-1 UN PSEUDOGEN?
ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN IN VIVO
USANDO TÉCNICAS DE INGENIERÍA
GENÉTICA Y CULTIVO CELULAR**

TESIS

**PRESENTADA A MAESTROS Y ESTUDIANTES
DE LA ESCUELA DE GRADUADOS DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRIA EN CIENCIAS

POR

BIOL. RAMIRO RAMIREZ SOLIS

**MONTERREY, N. L.
OCTUBRE DE 1989**

TM

Z6658

FM

1989

R35

MEDICI

. 269



1020091095

1957
MAY 15 1957
MAY 15 1957

¿ Es el gen humano hPL-1 un pseudogen ?. Análisis de su expresión in vivo usando técnicas de Ingeniería Genética y Cultivo Celular.

TESIS

Presentada a Maestros y Estudiantes
de la Escuela de Graduados de la
Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Como requisito parcial para obtener
el grado de:

MAESTRIA EN CIENCIAS

Por

Biól. Ramiro Ramírez Solís

Monterrey, N.L.
Octubre de 1989

TM
26550
F 11
1051
133



FONDO TESIS

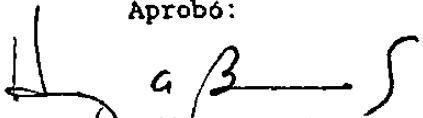
63113

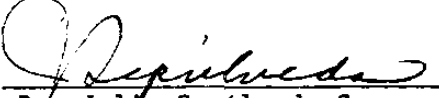
¿ Es el gen humano hPL-1 un pseudogen ? Análisis de su expresión in vivo usando técnicas de Ingeniería Genética y Cultivo Celular

Por


Ramiro Ramírez Solís

Aprobó:



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña


Dr. Julio Sepúlveda S.


Dra. Herminia Gpe. Martínez


Dra. Myrthala Moreno S.

Aprobó:


Dr. Mario César Salinas Carmona
Subdirector de Ciencias Básicas
de la Escuela de Graduados de
la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. con la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

INDICE

Indice	i
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
INTRODUCCION	1
Antecedentes generales	2
Antecedentes particulares	4
Objetivos del trabajo	4
Estrategia general para abordar el problema	4
MATERIAL Y METODOS	5
Origen de los reactivos y material biológico	5
Construcción y subclonación del gen hPL-1 reparado en pSV2gpt...	5
Construcción y subclonación del gen hPL-3 mutado en pSV2gpt	8
Crecimiento a gran escala de los plásmidos	8
Caracterización de los plásmidos crecidos a gran escala	10
Verificación del intercambio de los segmentos homólogos entre los genes hPL-1 y hPL-3	10
Transfección de células HeLa con los plásmidos	14
Extracción de RNA a partir de células HeLa transfectadas	14
Electroforesis desnaturizante en gel de agarosa-urea ácido ...	15
Electroforesis de RNA desnaturizado con glioxal y transferen- cia.....	15
Marcaje radiactivo de phPL815 por movimiento de la muesca.....	17
Hibridización de tipo "northern"	17
Cotransfección con pSV2CAT.....	18
Construcción de pAVE	19
Subclonación de los genes hPL en pAVE	20
Extracción de RNA total con isotiocianato de guanidina-LiCl.....	21
Marcaje radiactivo de phPL815 por síntesis de DNA dirigida por oligonucleótidos al azar	22
RESULTADOS	23
Verificación del intercambio de los segmentos por digestión con <u>AluI</u>	23
Verificación del intercambio de la mutación por secuenciamiento de nucleótidos	24
Introducción de DNA a células HeLa y aislamiento de RNA total ..	24
Verificación de la integridad del RNA	24
Electroforesis de RNA desnaturizado con glioxal y DMSO	24
Marcaje radiactivo de phPL815	25
Hibridización y autorradiografía	25
Surge el primer problema	25
Transfección en células COS-7, aislamiento de RNA total y marca- je de phPL815 con oligonucleótidos al azar.....	26
Hibridización y autorradiografía	27
DISCUSION.....	27
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	30
REFERENCIAS	31

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Sr. Ramiro Ramírez Dávila, Sra. Ma. del Refugio Solís, Sr. Américo Valdez Reyna y Sra. Juana Espinoza de Valdez, por su confianza, mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio: Diana, Diego, Ramón, Herminia, Felipe, Paty, Roberto, Odila, Eddy, Julie, Tomás, con quienes compartí no sólo las cuestiones de trabajo, sino también parte de mi vida personal, porque se han convertido en mis amigos.

Al Dr. Alfredo Delgado, la M.Sc. Rosa Blanca Montemayor y al L.C.B. Isidro Valle Aguilar, quienes sucesivamente han fungido como jefes del Departamento de Bioquímica desde que llegué, muchas gracias por su apoyo.

A los Drs. Grady F. Saunders y M. Tien Kuo, por permitirme realizar en sus laboratorios algunas de las técnicas que utilicé en esta tesis.

A la Sra. Yolanda Barrera, por la ayuda siempre generosa y desinteresada que me dió cuando fui extranjero.

A todos los compañeros del laboratorio del Dr. Saunders, Duane, Willie, Carl, Cathy, Jim, Susan, Maurizio, Hisachi, Lian, Ruby y Rose por todos los consejos técnicos que me dieron.

Al Depto. de Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.N.L., en particular al Dr. Oscar Torres por facilitarme el uso de rotores para la ultracentrífuga.

Al CONACyT por el apoyo económico que me otorgó para permitirme terminar los estudios de maestría.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña porque aprendí mucho durante nuestra interacción y por el apoyo que siempre me brindó.

A mi esposa, porque ha cumplido exitosamente la difícil tarea de comprenderme.

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos, Pedro y Trinidad, quienes se fueron antes de que les pudiera dar esta satisfacción, y a la salud de mis abuelos Modesto y Eulalia, que iluminan la vida de nuestra familia.

Al Profr. Raúl Cantú, pilar fortísimo en mi formación personal, fuente inagotable de consejos y ejemplo.

A mis padres, Sr. Ramiro Ramírez Dávila y Sra. María del Refugio Solís de Ramírez, quienes comprendiéndome o no, siempre me apoyaron. Por su ejemplo, desvelo y generoso sacrificio.

A mi esposa, Araceli, fuente de inspiración y fortaleza, de un modo muy especial, por su comprensión y apoyo.

Por supuesto también a mis hermanazos Norma, Gabriela, Américo y Jorge.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ATP	Adenosin trifosfato
°C	Grados centígrados
cbp	cuanto baste para
Ci/mMol	.	Curies por milimol
cm	centímetro
CoA	Acetil coenzima A
cpm	cuentas por minuto
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiamin tetracético
g	gramo(s)
h	hora
hGH	hormona de crecimiento humana
hPL	hormona lactogénica placentaria
IPTG	isopropiltiogalactósido
kb	kilobases
M	Molar
mA	miliamperes
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrómetro
N°	nucleótido
ng	nanogramo
nm	nanómetro
pb	pares de bases
pH	logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
S	unidades Svedverg
SDS	Lauryl sulfato de sodio
UV	ultravioleta
V	voltios
Xg	veces la gravedad

RESUMEN

Los genes que codifican para las hormonas lactogénica placentaria y del crecimiento humanas pertenecen a una familia que evolucionó de un ancestro común. Actualmente la familia se constituye de 5 genes que se encuentran en la región q22-24 del cromosoma 17, todos ordenados en el mismo sentido transcripcional. De 5' a 3' el arreglo de los genes en el grupo es : 5'*hGH-N * hPL-1 * hPL-4 * hGH-V * hPL-3 * 3'.

La expresión de los genes de la familia ha sido detectada de manera específica de tejido en hipófisis y placenta. Todos los genes expresan RNA mensajeros, pero las proteínas de los genes hPL-1 y hGH-V no han sido detectadas. El gen hPL-1 ha sido secuenciado y en el análisis de su secuencia se observó que el intrón II comienza con el dinucleótido AT. La mayoría de los genes eucarióticos poseen en el extremo 5' de sus intrones el dinucleótido GT, y cambios en esta secuencia provocan inactivación de la expresión génica en algunos mutantes naturales que se han encontrado. En este trabajo, intercambiamos la mutación G - A del gen hPL-1, a un gen homólogo normal, el hPL-3, y observamos que su nivel de expresión disminuyó. Asimismo la región homóloga del gen hPL-3 fué intercambiada al gen hPL-1 y observamos una recuperación parcial en su capacidad de formar un RNA mensajero del tamaño adecuado comparado con el RNA mensajero del gen hPL-3 en experimentos de tipo "northern".

Además, durante este trabajo creamos un vector de expresión eucariótico sumamente potente para expresar genes clonados en ensayos de expresión transitoria en células de mamífero. De la disponibilidad del mismo, dependió el alcanzar los objetivos que nos propusimos en este proyecto.

INTRODUCCION

Los genes son segmentos de DNA que llevan, en su secuencia nucleotídica, la información necesaria para dirigir la síntesis de un polipéptido. La mayor parte de los organismos procariotas (bacterias y cianobacterias) poseen genes continuos. En cambio casi todos los genes eucariotas (hongos, plantas, animales, etc..) son discontinuos, salvo muy raras excepciones⁽¹⁾.

Un gen posee polaridad, es decir sus extremos son estructural y funcionalmente diferentes. El extremo 5' es aquél por el cual se empieza a sintetizar el RNA (Figura 1). Los genes se dividen en dos regiones: la reguladora y la estructural. En términos generales, en los genes que originan RNA mensajero (RNAm), la región reguladora posee una secuencia altamente conservada (en términos evolutivos), cuyo modelo es "TATAA" que forma parte del promotor. Su función es dictar el sitio exacto de la iniciación de la síntesis de RNA (transcripción). En ocasiones se encuentran secuencias importantes mas "hacia arriba" (alejándose del sitio de iniciación pero hacia el lado opuesto de donde se encuentra la región estructural) cuya función es dictar la especificidad de tejido de la expresión del gen, así como la eficiencia de la transcripción. Estas secuencias son llamadas amplificadores o potenciadores⁽²⁾. Hacia el extremo 3', ("hacia abajo"), del sitio de iniciación de la transcripción, se encuentra la región estructural, la cual se halla dividida en segmentos codificantes o exones y segmentos no codificantes o intrones. Finalmente el extremo 3' del gen, posee otra secuencia muy conservada que se llama señal de poliadenilación, y cuyo modelo es "AATAAA". La función de esta secuencia es definir la edición del extremo 3' del RNA transcrito primario y dirigir la adición en este extremo, de un segmento de residuos de adenilato por una poli A polimerasa.

La transcripción se lleva a cabo por una RNA polimerasa dependiente de DNA, la cual, dirigida por el promotor, reconoce el sitio de iniciación de la síntesis de RNA. La RNA polimerasa copia toda la información del DNA, incluyendo los intrones. Este es un proceso nuclear y antes de que el RNA pase al citoplasma, debe sufrir un proceso de maduración que consiste en tres fenómenos principales:

- a) Protección del extremo 5' con un nucleótido de guanosina modificado por metilación.
- b) Remoción de los intrones y unión de los exones.
- c) Edición del extremo 3' y adición de un segmento de 100-200 residuos de adenilato₍₃₎.

Para los propósitos de esta tesis, lo que explicaremos es el segundo inciso. La remoción de los intrones y unión de los exones, es conocido como "splicing" (le llamaremos de esta forma por carecer de una traducción práctica en el español, y para evitar confusiones)^(4,5,6). Este fenómeno es necesario para que la información codificante, los exones, pueda ser traducida con exactitud por los ribosomas. Es un proceso muy preciso, ya que un error por pequeño que sea altera la fase de lectura del RNAm hacia el extremo 3' y conduce a la síntesis de una proteína aberrante.

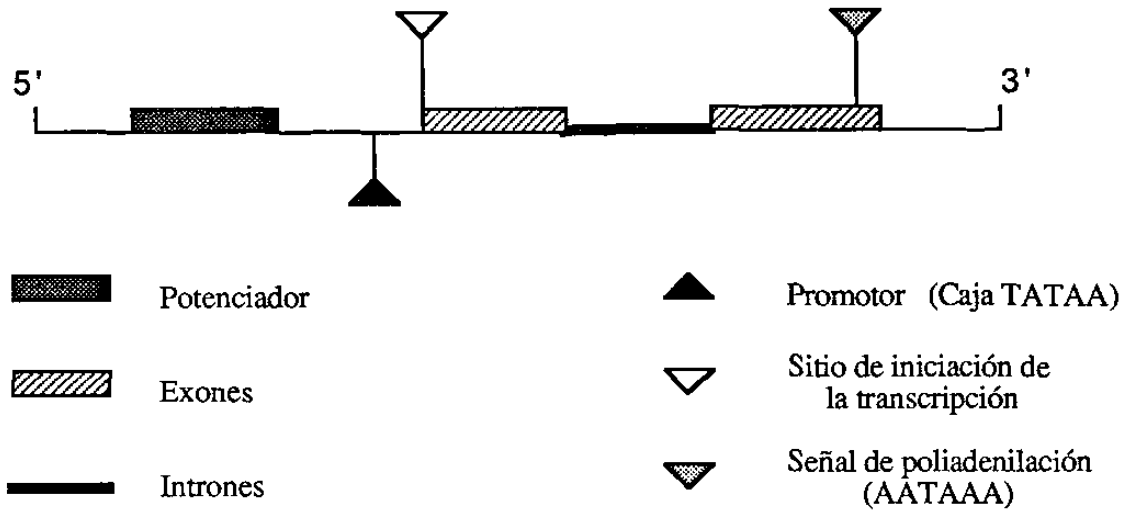


Figura 1.- ESTRUCTURA GENERAL DE UN GEN EUCARIOTICO

Esquema de las principales características estructurales de un gen eucariótico. La transcripción empieza a partir del extremo 5' del gen y es regulada por el promotor y el (los) potenciador (es). El complejo de la RNA polimerasa transcribe toda la información incluyendo exones e intrones, pero los intrones son removidos por la maquinaria enzimática del "splicing" antes de pasar al citoplasma, donde los exones ya contínuos serán traducidos por los ribosomas.

En los extremos de los intrones existen secuencias que señalan el sitio donde debe ocurrir el corte y determinan la eficiencia del "splicing"⁽⁴⁴⁾. A partir de una comparación de las uniones exón-intrón de muchos genes de secuencia conocida se han delimitado estas secuencias, siendo el modelo: AG:GUAAGU en el extremo 5' del intrón y (C/U)₁₁NCAG:G en el extremo 3'. De estas, solo los dinucleótidos GU y AG, al inicio y al final del intrón respectivamente, deben estar estrictamente conservados para permitir un "splicing" correcto. Mutaciones en los demás nucleótidos pueden causar una disminución en la eficiencia, pero no evitan el "splicing". De este hecho surge una generalización que enuncia: "Todos los intrones comienzan con el dinucleótido GU y terminan con AG"⁽⁷⁾.

Hasta ahora no se conocen otras secuencias del intrón que posean una función importante en el "splicing", con la única excepción de la secuencia en el sitio de ramificación que explicaremos más adelante⁽⁸⁾.

A la fecha se describen dos pasos en el "splicing" de los pre-RNAm en eucariotas superiores (Figura 2). En la primera etapa, el pre-RNAm es cortado en el extremo 5' del intrón, el cual es unido covalentemente por medio de un enlace 5'-2' a un residuo de adenina que se encuentra a unos 30-40 nucleótidos antes del extremo 3' del intrón^(9,10). La unión se efectúa en el llamado punto de ramificación y da origen a un nuevo tipo de RNA en forma de "lazo"⁽¹¹⁾. La secuencia nucleotídica que rodea al residuo de adenina se encuentra mediana pero no estrictamente conservada en organismos superiores. En la segunda etapa del "splicing" ocurre el corte en el extremo 3' del intrón y los exones se unen covalentemente. El intrón es liberado como un RNA "en lazo" que es degradado en el núcleo⁽¹²⁾. Existen mutantes naturales en los sitios de "splicing" de algunos genes de β -globina, y entre las consecuencias que provocan, está el uso de sitios crípticos, es decir, sitios que normalmente no son usados en el "splicing", lo que conduce a la formación de RNAs aberrantes con información diferente a la normal, provocando la inactivación de la expresión génica y la manifestación clínica de una β -talasemia^(13,14,15,16,17).

Así, cambios de una sola base nucleotídica pueden conducir a la falta de expresión de una secuencia génica. Si la secuencia en cuestión posee una copia activa en el genoma, se le clasifica como un pseudogen.

El gen hPL-1 es el menos caracterizado dentro de la familia de genes que codifican para las hormonas de crecimiento y lactogénica placentaria humanas, y como mencionaremos adelante, posee una mutación en el sitio donador del procesamiento del segundo intrón, que lo convierte en candidato para ser un pseudogen.

Antecedentes generales

La placenta es un órgano transitorio que cumple numerosas funciones relacionadas con el desarrollo ontogenético de los mamíferos que la poseen. Entre las varias actividades que lleva a cabo, destaca de manera especial su función como órgano endócrino⁽¹⁸⁾. En el ser humano, la placenta secreta varias hormonas, entre ellas: la tirotrópina coriónica (hCT), la hormona coriónica estimulante del folículo (hCFSH), la gonadotropina coriónica (hCG) y el lactógeno placentario (hPL), siendo las dos últimas las que han acaparado la mayor atención⁽¹⁹⁾.

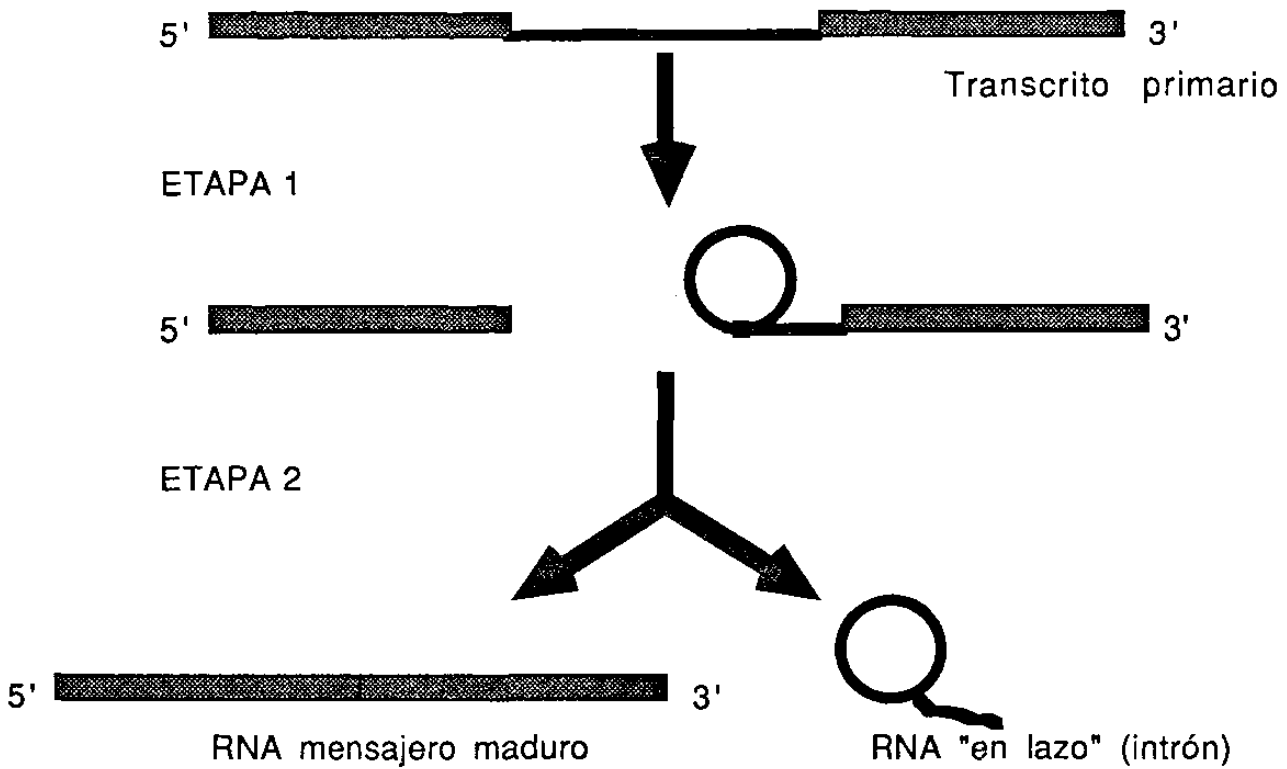


Figura 2.- ETAPAS DEL "SPLICING" EN ORGANISMOS EUCARIOTICOS

En la Etapa I, el pre-RNA mensajero es cortado en el extremo 5' del intrón, el cual es ligado a un residuo de adenina que se encuentra 30 - 40 nucleótidos antes del extremo 3' del intrón. La unión ocurre en el punto de ramificación y origina un RNA "en lazo". En la Etapa II ocurre el corte del extremo 3' del intrón y los exones son covalentemente unidos para formar un RNA mensajero maduro. El RNA "en lazo" permanece en el núcleo donde es degradado mientras que el RNAm es translocado al citoplasma.

El lactógeno placentario (hPL) o somatomotropina coriónica humana, fué caracterizado como una sustancia polipeptídica presente en extractos de placenta humana a término y en sangre retroplacentaria, que exhibe una actividad lactogénica potente y reacción inmunológica de identidad parcial con la hormona de crecimiento₍₂₀₎.

El lactógeno placentario es un polipéptido de 191 aminoácidos que posee valina y fenilalanina en los extremos amino y carboxilo terminal respectivamente. Posee dos enlaces disulfuro y no contiene carbohidratos ni lípidos₍₁₉₎.

Su secuencia aminoacídica tiene una similitud de al menos 80 % con la hormona de crecimiento₍₂₁₎.

La síntesis de hPL ocurre en el sincitiotrofoblasto₍₂₂₎ conforme avanza el período de gestación, alcanzando al término del embarazo la velocidad de 1 g/día. Su enorme velocidad de síntesis, su producción autónoma por la placenta y su corta vida media, se combinan para hacer de valor práctico la medición de los niveles séricos de hPL para evaluar clínicamente el estado funcional de la placenta_(23,24,25).

Destacan tres funciones entre las que se le han adjudicado a hPL: a) influencia sobre el metabolismo intermediario materno, b) efectos mamotróficos y c) efectos luteotróficos_(26,27). Existe sin embargo gran polémica acerca de su significado biológico real. Se ha sugerido₍₂₈₎ que las funciones propuestas para hPL deben ser reexaminadas, y se han reportado incluso casos con deficiencia severa o ausencia total de hPL_(29,30) en los que el embarazo ha transcurrido de manera normal.

Los genes que codifican el lactógeno placentario forman una familia con los de la hormona de crecimiento y la prolactina₍₃₁₎. Aparentemente estos genes evolucionaron a partir de un ancestro común por eventos de duplicación génica_(21,32).

Los genes que codifican para hGH y hPL se encuentran agrupados en las bandas q 22-24 del cromosoma 17_(33,34), son cinco y se disponen en el siguiente orden: 5' * hGH-N * hPL-1 * hPL-4 * hGH-V * hPL-3 * 3' (Figura 3), en tanto que el gen que codifica para prolactina se localiza en el cromosoma 6₍₃₅₎.

Todos estos genes son semejantes estructuralmente, son pequeños, de aproximadamente 1600 pb de largo, de las cuales aproximadamente 800 forman parte de secuencias codificantes distribuidas en 5 exones separados por 4 intrones_(36,37).

Los genes hPL-4 y hPL-3 son responsables de la síntesis de la hormona lactogénica placentaria₍₃₈₎; el gen hGH-N codifica para la hormona de crecimiento circulante y su expresión es específica de tejido, circunscribiéndose a la adenohipófisis₍₃₉₎. La expresión del gen hGH-V ha sido obtenida en un sistema de cultivo celular₍₄₀₎, usando vectores de expresión basados en el virus de simio 40, y en fecha reciente su transcrito ha sido detectado en la placenta en concentraciones aproximadamente 2 a 3 órdenes de magnitud menores que las correspondientes al lactógeno placentario₍₄₁₎ (Figura 4). La expresión del gen hPL-1 ha sido detectada en la placenta, usando oligonucleótidos específicos para los transcritos de este gen en el tamizaje de bancos de DNA complementario a los RNAm de placenta a término₍₄₁₎.

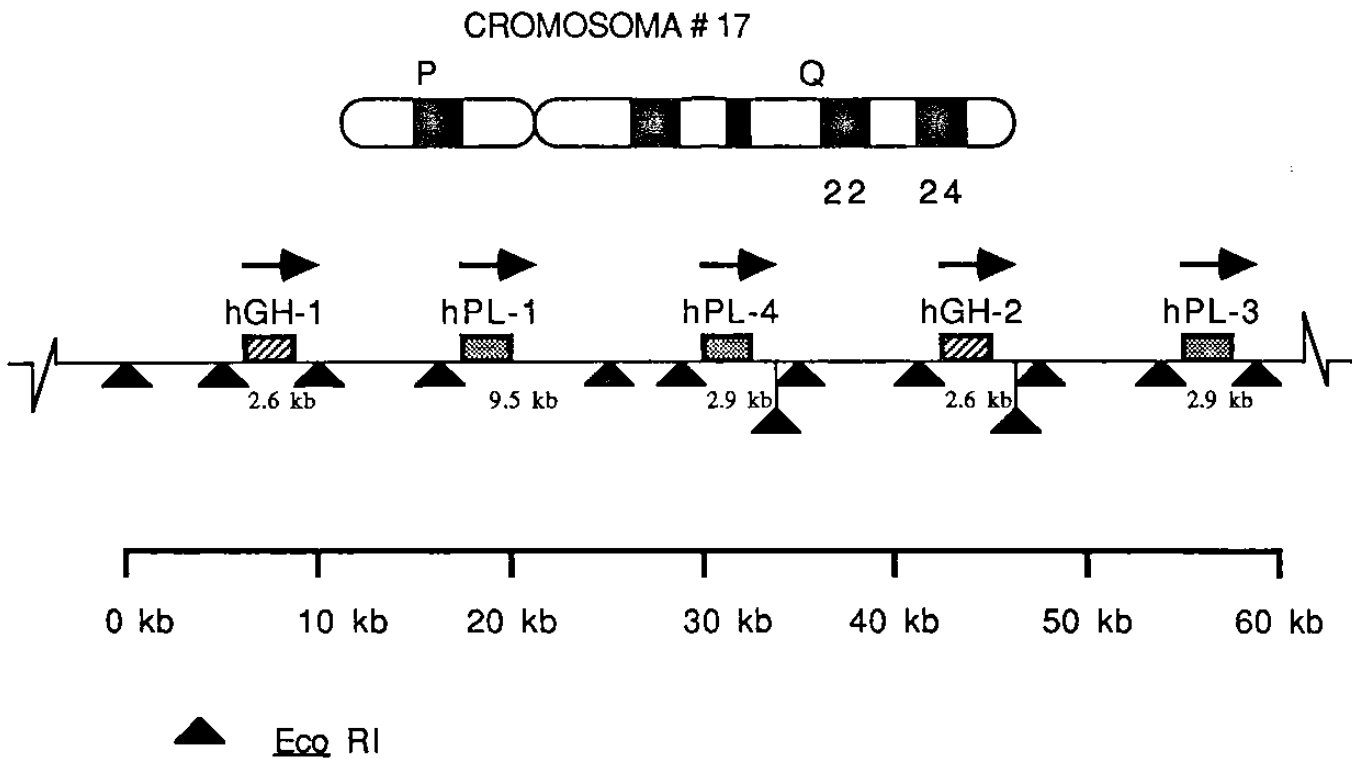


Figura 3.- LOCALIZACION DEL COMPLEJO hGH-hPL EN 17 q 22-24

La familia de genes hGH-hPL está constituida por 5 genes, los cuales forman un grupo en las bandas q22-24 del cromosoma 17. Todos los genes poseen la misma orientación transcripcional (ver flechas), y de 5' a 3' son: hGH-1, hPL-1, hPL-3, hGH-2 y hPL-4.

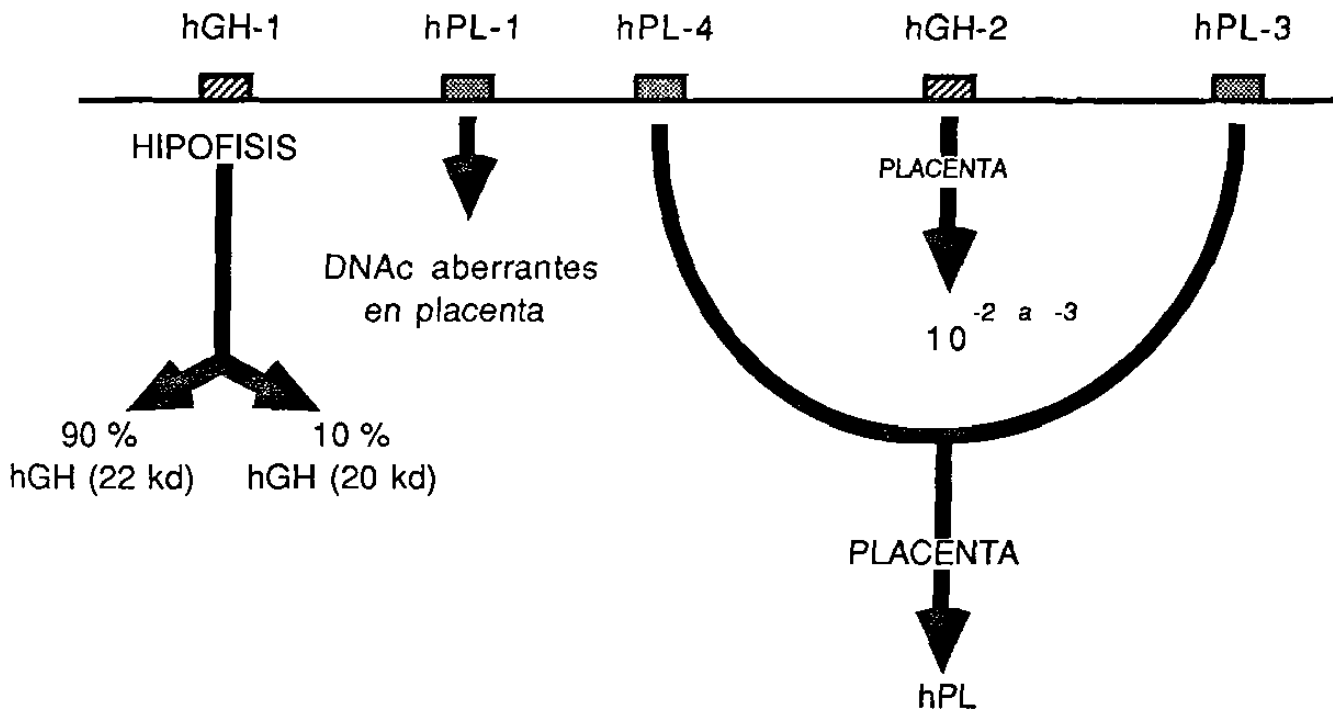


Figura 4.- EXPRESION ESPECIFICA DE TEJIDO DE LOS GENES hGH-hPL

La expresión del gen hGH-1 ha sido detectada unicamente en hipófisis. El transcrito primario sufre dos clases de "splicing" cada uno de los cuales produce un RNA mensajero que da origen a diferentes proteínas. La hormona 22 kd constituye el 90 % y la variante 20 Kd, el restante 10 % de la producción total de hGH. El gen hGH-2 es transcrito en la placenta a niveles de 2 a 3 órdenes de magnitud menores que hPL-3 y hPL-4. Estos últimos genes, codifican para el hPL, siendo hPL-4 aproximadamente 6 veces mas activo que hPL-3. Los transcritos de hPL-1 han sido detectados en la placenta, pero el patrón de "splicing" es diferente al de los otros cuatro genes.

Antecedentes particulares

El gen hPL-1 ha sido secuenciado^(41,42), y por comparación de su secuencia con la del gen hPL-3 se observa que comparte una estructura molecular semejante, ya que posee regiones correspondientes a los 5 exones y 4 intrones, un promotor y una señal de poliadenilación normales. La funcionalidad del promotor ha sido verificada mediante ensayos de transcripción *in vitro*⁽⁴³⁾.

A partir de la secuencia se observa que el segundo intrón comienza con el dinucleótido AT. Esto es notable, porque como mencionamos antes, las uniones exón-intrón presentan secuencias altamente conservadas durante la evolución, en las cuales invariablemente los dos primeros nucleótidos del intrón son GT⁽⁷⁾.

Además, ha sido posible aislar clonas representativas del gen hPL-1 a partir de un banco de DNA complementario a los RNA mensajeros obtenidos de placenta a término⁽⁴¹⁾, y dichos RNAm son diferentes a los de los demás genes de esta familia, lo que implica que tal gen produce RNA mensajeros aberrantes. La proteína no ha sido identificada aún.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Objetivo General: Contribuir al conocimiento de la biología molecular del complejo génico codificante para las hormonas lactogénica placentaria y del crecimiento humanas.

Objetivo Particular: Aclarar el efecto de la mutación en el sitio donador del procesamiento del segundo intrón del gen hPL-1, en la posible falta de expresión del mismo.

HIPOTESIS: LA MUTACION PRESENTE EN EL SITIO DONADOR DEL PROCESAMIENTO DEL INTRON II DEL GEN hPL-1, QUE ALTERA EL DINUCLEOTIDO GT, CAMBIANDOLO POR AT, ES RESPONSABLE DE SU FALTA DE EXPRESION.

ESTRATEGIA GENERAL PARA ABORDAR EL PROBLEMA

La mutación del gen hPL-1 se encuentra en un segmento de aproximadamente 115 pb, limitado por sitios para las enzimas de restricción PvuII y SacI (Figura 5). Esta región es muy similar a la correspondiente del gen hPL-3, la cual no posee la mutación. Con excepción de la mutación en cuestión, existen sólo tres diferencias entre ambos fragmentos: un par de transiciones (T - C) y una delección o inserción puntual de un residuo de G que se encuentra en hPL-1 y no en hPL-3. Las tres diferencias están en lugares que no son considerados de importancia en el proceso de remoción de los intrones.

Por lo tanto, la estrategia general (Figura 6), consistió en intercambiar estos segmentos entre los genes hPL-1 y hPL-3. Lo que se obtuvo fueron dos genes hPL-1, uno de ellos con la mutación (silvestre) y el otro con el segmento normal proveniente del hPL-3 (reparado).

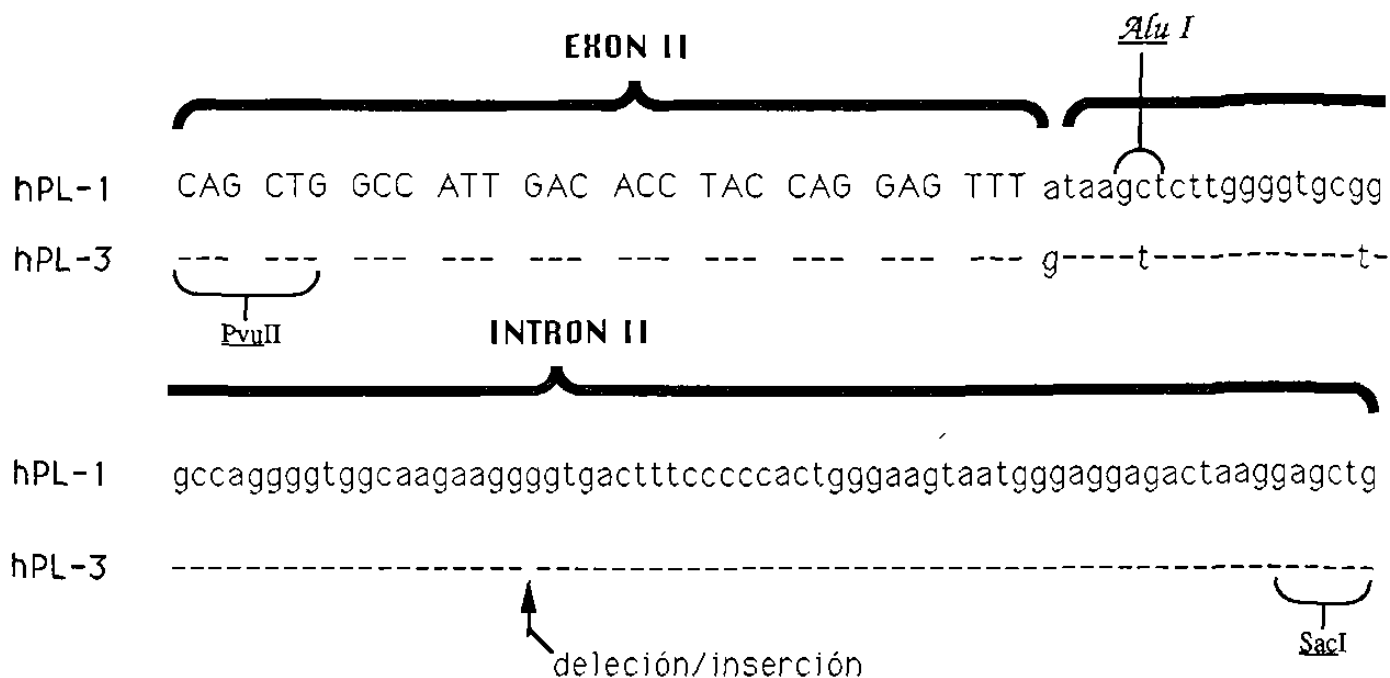


Figura 5.- COMPARACION DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS EN LA REGION PvuII- SacI ENTRE LOS GENES hPL-1 Y hPL-3.

La secuencia nucleotídica entre los sitios PvuII y SacI muestra pocas diferencias cuando es comparada entre los genes hPL-1 y hPL-3. Una de estas diferencias corresponde a la transición G - A en el inicio del intrón II y otra altera un sitio de corte para la enzima de restricción AluI. Ninguno de los cambios, excepto la transición citada, son de importancia para el "splicing" correcto del RNAm.

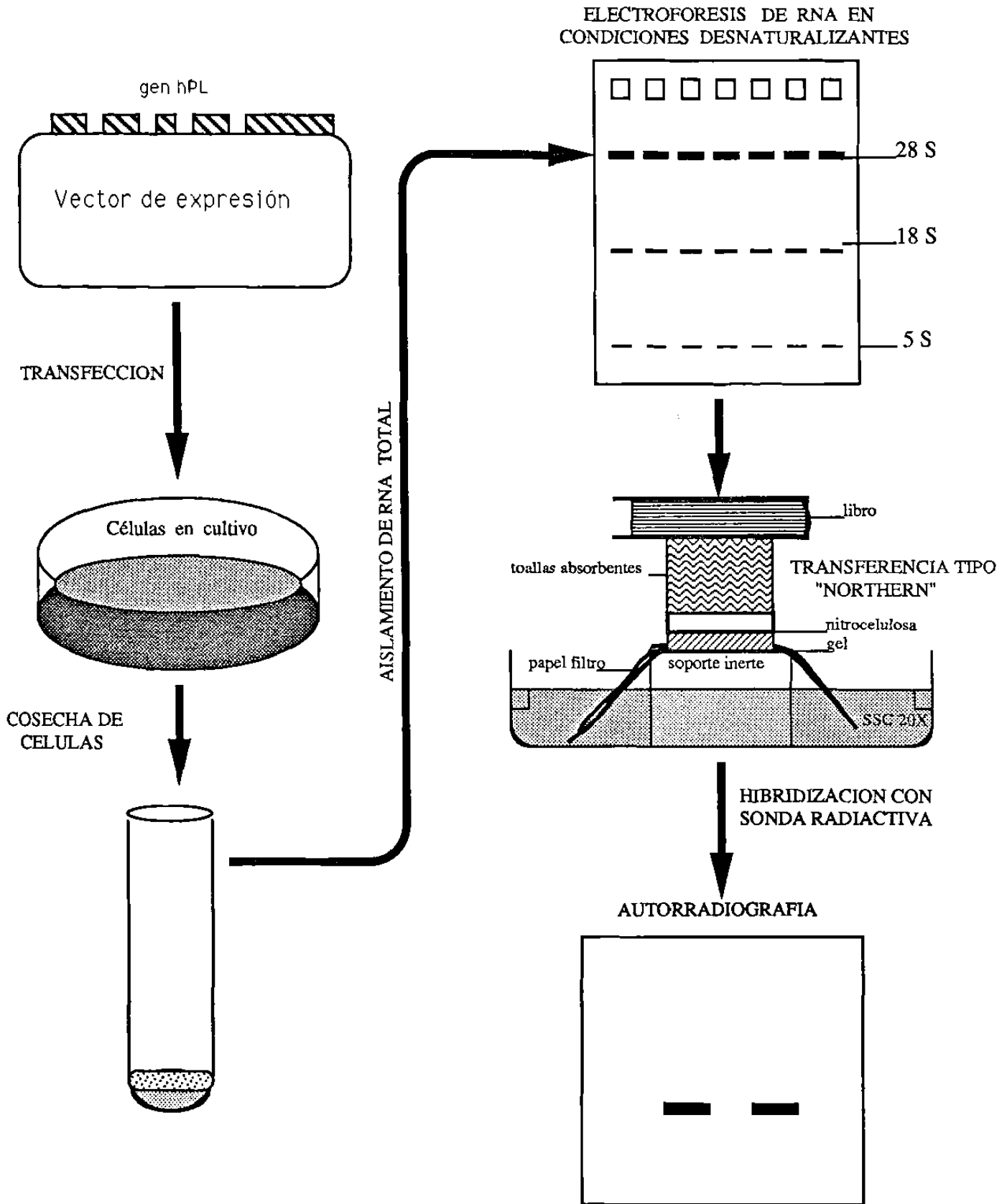


Figura 6.- ESTRATEGIA GENERAL PARA EL ANALISIS DE LA EXPRESION *in vivo*. Para analizar la expresión de los genes hPL, transfectamos el DNA en células en cultivo y extrajimos RNA total. Separamos el RNA en condiciones desnaturalizantes (glioxal) y lo transferimos por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa. Después lo hibridizamos con una sonda radiactiva específica para los genes hPL. Luego de lavar, exponer y revelar, detectamos los transcritos de estos genes.

También se obtuvieron los recombinantes inversos, dos genes hPL-3, uno de los cuales es normal (silvestre) y el otro tiene la mutación proveniente del gen hPL-1 (mutado).

Las manipulaciones de intercambio de los cuatro genes fueron hechas en vectores plasmídicos que permiten y estimulan su expresión cuando son introducidos en células eucariotas. Después de la introducción del DNA a células en cultivo (transfección), se permitió que se expresara la información contenida en los plásmidos. Posteriormente se verificó la capacidad de los diferentes genes para producir RNAm maduro.

Esto nos permitiría saber si al eliminar la mutación del gen hPL-1, éste sería capaz, por lo demás, de codificar un RNAm normal, y si la misma mutación, introducida en el gen hPL-3, sería capaz de inactivarlo.

MATERIAL Y METODOS

Origen de los reactivos

Las enzimas que usamos fueron de Boehringer Mannheim Biochemicals y New England Biolabs. Los demás reactivos fueron de Sigma Chemical Company, excepto el sistema de "Geneclean" que obtuvimos de Biol01. El ^{32}P -dCTP y el ^{14}C -Cloranfenicol fueron de Amersham International.

Origen del Material Biológico

Las células HeLa (carcinoma cervical humano) fueron donadas por el Dr. Grady F. Saunders, del Depto. de Bioquímica y Biología Molecular del Hospital e Instituto del Tumor M.D. Anderson en Houston, Texas, y las células COS-7 fueron donadas por el Dr. M. Tien Kuo, del Depto. de Patología Experimental del mismo hospital.

Las cepas de Escherichia coli: C600, HB101, RR1 y JM101 fueron obtenidas del cepario de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (U.L.I.E.G.) del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. Los plásmidos pSV2gpthPL-1 silvestre, pSV2gpthPL-3 silvestre y pSV2CAT fueron obtenidos del laboratorio del Dr. Grady F. Saunders. Los plásmidos phPL-1 y pUC 19 fueron obtenidos de la colección de plásmidos de la U.L.I.E.G.. El plásmido pCMVCAT fué donado por el Dr. Hans Hofsteeter.

Construcción y subclonación del gen hPL-1 reparado en pSV2gpt₍₄₅₎

Para construir pSV2gpthPL-1 reparado, seguimos esta estrategia (Figura 7). Digerimos 10 μg de pSV2gpthPL-3 silvestre con SacI y PvuII siguiendo las instrucciones de la casa proveedora de las enzimas, en un volumen de 100 μl . Verificamos la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa₍₄₆₎. Para esto, preparamos una solución de agarosa al 1 % en TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M) y la calentamos a ebullición. Enfriamos la solución a 50 °C y la vertimos en un molde.

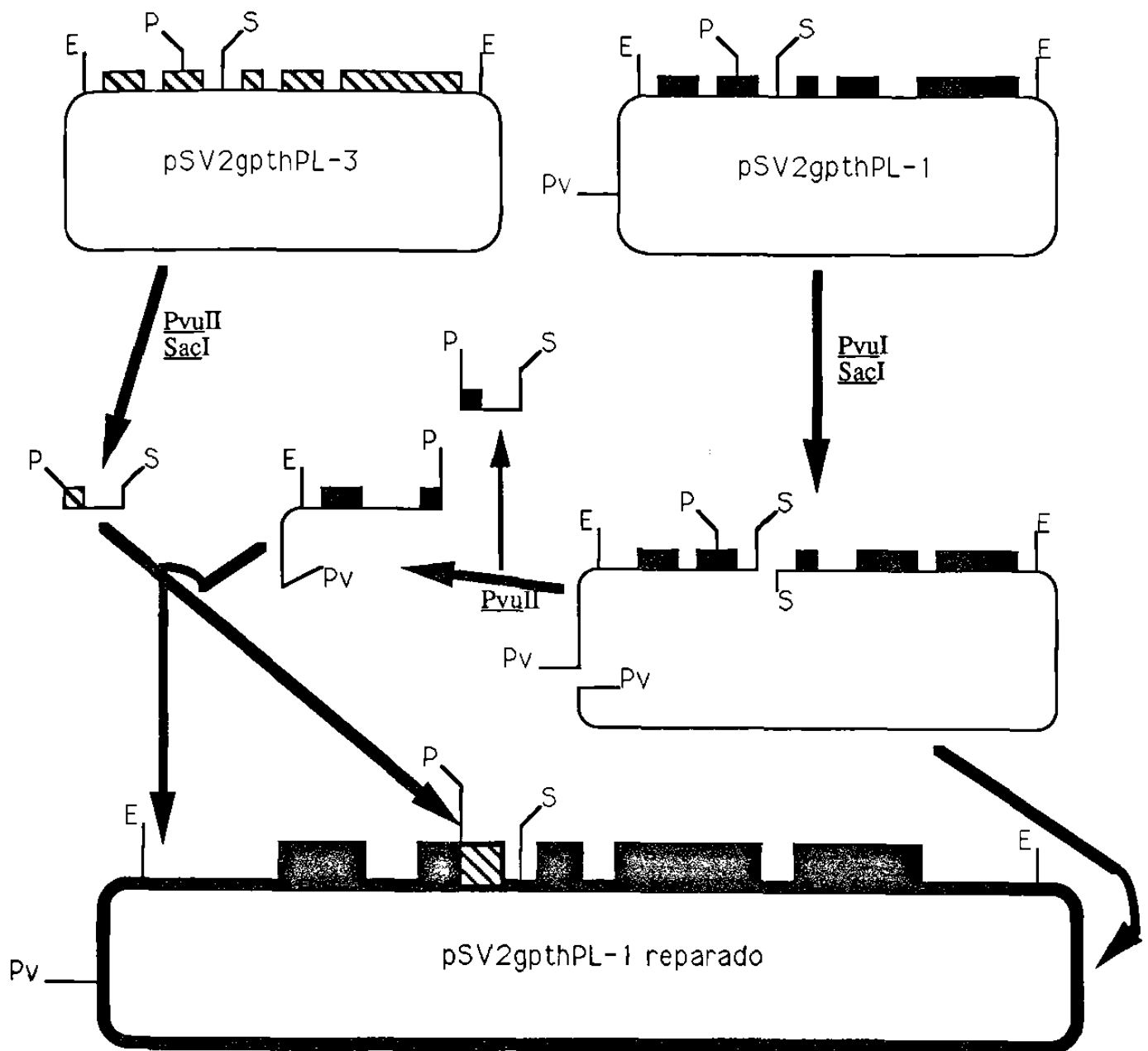


Figura 7.- ESTRATEGIA PARA LA CONSTRUCCION DE pSV2gpthPL-1 REPARADO

pSV2gpthPL-3 fué cortado con PvuII (P) y SacI (S), para liberar el fragmento de ~ 115 pb; en paralelo pSV2gpthPL-1 fué cortado con PvuI (Pv) y SacI. El fragmento que contiene el extremo 5' del gen fué recortado con PvuII. Este paso adicional fué necesario debido a la presencia de mas sitios de restricción para PvuII hacia el extremo 3' del gen, después del sitio SacI. Finalmente las tres piezas fueron ligadas para formar pSV2gpthPL-1 reparado. Los sitios para EcoRI (E) separan las secuencias de los genes de las del vector.

Montamos el gel en la cámara de electroforesis y usamos TAE 1X como tampón de corrida. Obtuvimos 200 ng de DNA de la digestión y agregamos 8 μ l de TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA 1 mM) y luego 2 μ l de jugo azul 6X (Glicerol al 30 %, xilencianol al 0.25 %, azul de bromofenol al 0.25 %). Corrimos la electroforesis a 40 V hasta que las muestras entraron al gel, después aumentamos a 100 V. Al terminar la corrida, sumergimos el gel durante 10 min en una solución de bromuro de etidio en agua (0.5 μ g/ml). Enjuagamos el gel con agua y visualizamos las bandas por iluminación con luz UV. Separamos los fragmentos PvuII-SacI por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4 % y usamos una lámpara de luz UV de onda larga para localizar la banda de interés. Cortamos la banda con una hoja de bisturí, y trituramos el gel con la punta redondeada de una pipeta Pasteur en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Agregamos 0.5 ml de tampón de elución (NaCl 0.5 M, Tris-HCl pH 8.0 0.1 M, EDTA 5 mM)⁽⁴⁷⁾, e incubamos a 37 °C toda la noche en un baño agitador. Centrifugamos la muestra durante 5 min y colectamos el sobrenadante sin restos de poliacrilamida. Agregamos 250 μ l de tampón de elución a la pastilla de poliacrilamida, la resuspendimos e incubamos por 1 h a 37 °C con agitación. Centrifugamos y combinamos los dos sobrenadantes. Eliminamos los restos de poliacrilamida al pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 μ m y lavamos el filtro con 200 μ l de tampón de elución. Ajustamos la concentración de acetato de sodio a 0.3 M y agregamos 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C. Dejamos reposar toda la noche a -20 °C y centrifugamos durante 15 min, eliminamos el sobrenadante y disolvimos el DNA en 200 μ l de TE. Agregamos 25 μ l de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol. Dejamos reposar 2 h a -20 °C, centrifugamos, eliminamos el sobrenadante y lavamos la pastilla con etanol al 70 %, frío. Secamos la pastilla y la resuspendimos en 30 μ l de agua bidestilada.

Digerimos pSV2gpthPL-1 silvestre con SacI y PvuI y separamos los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % y los recuperamos por extracción con fenol⁽⁴⁸⁾. Para esto, disolvimos la agarosa de bajo punto de fusión a 70 °C en TAE 1X y la enfriamos a 37 °C. Ajustamos el bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/ml y pusimos el gel a 4 °C para que solidificara. Corrimos la electroforesis a 4 °C y cuando terminó, visualizamos el DNA con luz UV de onda larga y cortamos la banda de interés. Agregamos 5 volúmenes de Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM, y calentamos a 65 °C durante 5 min. Agregamos 1 volumen de fenol saturado con TE al volumen de la muestra, agitamos en el vórtex durante 1 min, y centrifugamos durante 2 min. Transferimos la fase acuosa a otro tubo, agregamos medio volumen de fenol saturado con TE y medio volumen de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1), agitamos en el vórtex durante 1 min y centrifugamos durante 2 min. Transferimos la fase acuosa a otro tubo y agregamos un volumen de SEVAG. Agitamos en el vórtex durante 1 min y centrifugamos durante 2 min. Pasamos la fase acuosa a otro tubo y agregamos 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol a -20 °C. Dejamos reposar la muestra toda la noche a -20 °C. Centrifugamos durante 20 min y descartamos el sobrenadante. Lavamos la pastilla con etanol al 70 % a -20 °C y la secamos. La resuspendimos en 20 μ l de agua destilada.

Digerimos el fragmento PvuI-SacI que posee el extremo 5' del gen hPL-1 con PvuII. Recuperamos el fragmento PvuI-PvuII a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y unimos los tres segmentos con DNA ligasa del fago T4, ATP y el tampón recomendado por el proveedor de la enzima, en un volumen de 20 μ l y a 14-16 °C.

Verificamos la ligación por electroforesis de una alícuota en gel de agarosa al 1 %. Con el resto de la muestra, transformamos bacterias Ca^{++} -competentes (Escherichia coli C600)^(49,50,51), que preparamos como sigue: inoculamos 125 ml de medio LB (bactotripton a al 1 %, extracto de levadura al 0.5 %, cloruro de sodio al 1 %) e incubamos toda la noche a 37 °C con agitación. Tomamos 1 ml del cultivo de toda la noche e inoculamos 50 ml de medio LB. Pusimos a agitar a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ de 0.350. Enfriamos en hielo durante 10 min y centrifugamos a 7000 Xg durante 10 min a 4 °C. Descartamos el sobrenadante, eliminamos el exceso de líquido y resuspendimos la pastilla en 20 ml de CaCl_2 0.1 M estéril y enfriado a 0 °C. Dejamos reposar en hielo durante 20 min, y centrifugamos como antes. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla en 1 ml de CaCl_2 0.1 M en un tubo de microcentrifuga. Transferimos 100 μ l de bacterias Ca^{++} -competentes a otro tubo de microcentrifuga, estéril y frío, y agregamos el DNA producto de la ligación. Mezclamos e incubamos durante 1 h en hielo con agitación suave cada 10 min. Incubamos durante 2 min a 37 °C y luego durante 10 min en hielo. Agregamos 200 μ l de medio LB precalentado a 37 °C e incubamos durante 30 min a 37 °C. Extendimos las bacterias transformadas con un asa de vidrio en cajas de LB-Agar-Ampicilina (agar al 1.5 % y ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en LB) e incubamos toda la noche a 37 °C.

Hicimos minilizados alcalinos⁽⁵²⁾ de las colonias resistentes a ampicilina. Para esto, inoculamos cada colonia resistente en un tubo de ensaye de 18 X 150 con 4 ml de medio LB con ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incubamos durante 18 h a 37 °C con agitación constante. Transferimos 3 ml del cultivo a un tubo de microcentrifuga mediante 2 centrifugaciones sucesivas de 1 min cada una y descartamos el sobrenadante. Eliminamos todo el sobrenadante de la última centrifugación. Congelamos las pastillas a -20 °C durante 1 h. Descongelamos las pastillas y las resuspendimos en 100 μ l de solución I (Tris-HCl pH 8.0 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, lisozima 2 mg/ml). Incubamos en hielo durante 30 min. Agregamos 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1 %), mezclamos y dejamos reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Agregamos 150 μ l de solución III (acetato de potasio 3 M, ácido acético 2 M), mezclamos por inversión y dejamos reposar durante 1 h en hielo. Centrifugamos durante 5 min y transferimos 400 μ l del sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga. Agregamos 200 μ l de fenol saturado con TE, mezclamos con vórtex durante 1 min, agregamos 200 μ l de SEVAG y mezclamos de igual manera. Centrifugamos por 2 min. De aquí en adelante, las manipulaciones se efectuaron con reactivos e incubaciones a temperatura ambiente, a menos que indiquemos de otra manera. Transferimos 400 μ l de la fase acuosa a otro tubo y le agregamos 1 ml de etanol absoluto, mezclamos suavemente por inversión y lo dejamos reposar por 2 min. Centrifugamos durante 2 min, descartamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla en 100 μ l de solución IV (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, acetato de sodio 0.1 M). Agregamos 200 μ l de etanol absoluto, mezclamos por inversión, dejamos reposar 2 min y centrifugamos durante otros 2. Lavamos la pastilla con etanol al 70 % y la secamos en el evaporador centrífugo de vacío. Resuspendimos la pastilla en 18 μ l de agua bidestilada y le agregamos 2 μ l de una solución de RNasa A a 1 mg/ml. Incubamos durante 30 min a 37 °C.

Construcción y subclonación del gen hPL-3 mutado en pSV2gpt

Obtuvimos este recombinante con esta estrategia, (Figura 8): cortamos phPL-1 con PvuII y SacI, y purificamos el fragmento de 115 pb a partir de un gel de poliacrilamida por electroelución⁽⁴⁶⁾. Para esto, pusimos tampón TBE 2X en la cámara de electroelución y una solución de TBE 0.1X y SDS al 0.005 % en la copa de electroelución (TBE 1X = Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M). Usamos membranas de diálisis de colodión en el extremo de la copa que funciona como compartimiento de colecta y membranas de diálisis normales en el extremo donde se coloca el gel. Colocamos la banda del gel que poseía el fragmento de 115 pb en el cátodo de la copa de electroelución y pusimos 20 μ l de TE con xilencianol al 0.25 % en el extremo de colecta. Conectamos la corriente a 150 V (5-10 mA) y la mantuvimos así, hasta que el DNA había migrado al compartimiento de colecta. Invertimos la polaridad de la cámara y mantuvimos el mismo voltaje durante 1 min. Sacamos la copa de la cámara de electroelución y la colocamos sobre la mesa. Eliminamos el tampón lentamente hasta que dejamos 300 μ l, con los cuales lavamos el compartimiento de colecta y los transferimos a un tubo de microcentrífuga. Lavamos el extremo de colecta con 100 μ l adicionales de TE y los pasamos al tubo donde teníamos los 300 μ l iniciales. Colocamos la copa de electroelución sobre una superficie de agua destilada estéril, de tal modo que la membrana de colodión estuviera en contacto con el líquido, y la dejamos reposar al menos 1 h en la oscuridad. Agregamos el agua que se acumuló en el compartimiento a los 400 μ l que habíamos colectado. Hicimos una extracción con fenol-cloroformo 1:1, otra con SEVAG, ajustamos la concentración de NaCl a 0.2 M y agregamos 1 ml de etanol. Dejamos reposar a -70 °C durante 30 min, centrifugamos durante 5 min, resuspendimos la pastilla en 200 μ l de acetato de sodio 0.3 M y agregamos 500 μ l de etanol absoluto. Centrifugamos y lavamos la pastilla con 1 ml de etanol al 70 %. La secamos en el evaporador centrífugo de vacío y la resuspendimos en TE.

En paralelo, cortamos pSV2gpthPL-3 silvestre con SacI y HindIII, separamos y purificamos los fragmentos producto de esta digestión por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y extracción fenólica como describimos antes. Digerimos el fragmento HindIII-SacI que porta el extremo 5' del gen hPL-3 con PvuII y purificamos el fragmento HindIII-PvuII por electroforesis. Unimos los tres fragmentos de la manera antes descrita. Verificamos la ligación por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y usamos el material ligado para transformar E. coli C600 Ca⁺⁺-competentes. Hicimos minilizados alcalinos a 12 clonas resistentes a ampicilina.

Crecimiento a gran escala de los plásmidos pSV2gpt, pSV2gpthPL-1 silvestre, pSV2gpthPL-1 reparado, pSV2gpthPL-3 silvestre y pSV2gpthPL-3 mutado

Para obtener suficiente DNA, inoculamos cada uno de los plásmidos en un tubo de ensaye con 4 ml de medio LB con ampicilina a 100 μ g/ml y los incubamos toda la noche a 37 °C con agitación.

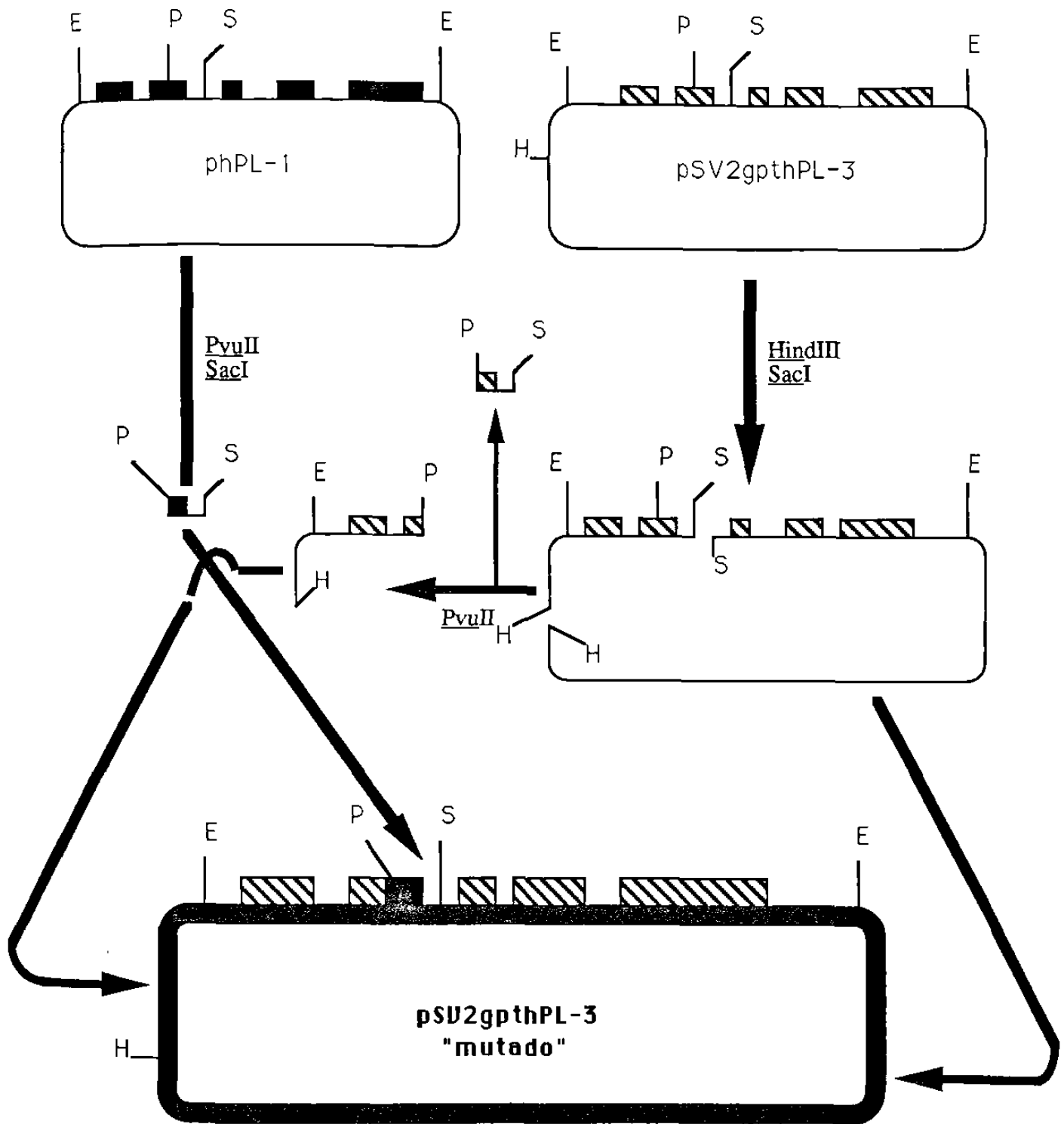


FIGURA 8.- ESTRATEGIA PARA LA CONSTRUCCION DE pSV2gpthPL-3 MUTADO.

phPL-1 fue cortado simultaneamente con **PvuII (P)** y **SacI (S)**, liberando el fragmento de ~ 115 pb que porta la mutación (G -- A). En paralelo, pSV2gpthPL-3 fue cortado con **HindIII (H)** y **SacI**, y el fragmento conteniendo el extremo 5' del gen fue recortado con **PvuII** por las razones mencionadas en la figura 7. Finalmente, los 3 fragmentos: el 5' del gen hPL-3, el de ~ 115 pb de hPL-1 y el del 3' de hPL-3 fueron ligados para formar pSV2gpthPL-3 mutado.

Agregamos el cultivo de toda la noche a un litro de medio LB e incubamos con agitación a 230 rpm a 37 °C. Registramos la DO_{600} . Cuando la DO_{600} era 0.35, agregamos 200 mg de cloranfenicol y agitamos durante 12 h. Centrifugamos a 7000 Xg durante 10 min a 2 °C, descartamos el sobrenadante por decantación y eliminamos el líquido residual con una pipeta Pasteur. Limpiamos el interior de las botellas con una toalla absorbente y congelamos las pastillas a -20 °C durante 30 min. Descongelamos las pastillas y colocamos las botellas en hielo. Agregamos 6.5 ml de sacarosa al 25 %, Tris-HCl pH 8.0 50 mM y resuspendimos las bacterias con una pipeta de 10 ml. Agregamos 1.5 ml de lisozima (2 mg/ml en la solución anterior). Agitamos continuamente en baño de hielo durante 5 min. Agregamos 1.25 ml de Na_2EDTA 0.5 M, pH 8.0. Agitamos durante 2 min. Agregamos rápidamente, y sin dejar de agitar la botella, 10 ml de solución Tritón (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, EDTA 62.5 mM, Tritón X-100 al 0.01 %). Después de 15 min, centrifugamos durante 30 min a 25000 rpm en un rotor 60 Ti de Beckman. Decantamos el sobrenadante a un tubo Falcon de 50 ml, evitando arrastrar DNA cromosómico al dejar un poco de líquido sobre la pastilla. Agregamos TE al lisado para incrementar el volumen a 20 ml. Agregamos 0.95 g de CsCl/ml de lisado, y lo disolvimos completamente con agitación suave. Agregamos 1 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml) e introdujimos la mezcla en un tubo de ultracentrifuga de sellado rápido, para el rotor VTi50 de Beckman. Llenamos el tubo con aceite mineral, lo balanceamos y sellamos. Centrifugamos a 44000 rpm durante 20 h. Usamos freno lento para detener la centrifuga. Sacamos el tubo del rotor y visualizamos el DNA con luz UV. Observamos dos bandas, y tomamos la inferior (plásmido). Perforamos el tubo con una aguja en la parte superior para generar una entrada de aire. Introdujimos una aguja 18G en el tubo, justo por debajo de la banda inferior, pusimos vaselina en el sitio de entrada y colectamos el plásmido con una jeringa de 5 ml conectada a la aguja. Eliminamos el bromuro de etidio por extracción con alcohol isoamílico. Dializamos la fase acuosa contra TE durante 2 h. Para preparar las bolsas de diálisis, cortamos el tubo de membrana a una longitud de 15 cm y lo hervimos en un litro de bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 mM. Enjuagamos el tubo con agua destilada, lo hervimos durante 10 min en agua destilada y lo enfriamos. Hicimos dos nudos seguidos en un extremo del tubo y verificamos que no tenía fugas. Pusimos la muestra de DNA en el interior, eliminamos el exceso de aire y cerramos la parte superior con hilo. Pusimos el tubo en un recipiente con 4 litros de TE. Después de la diálisis, pasamos la muestra a un tubo de polipropileno de 15 ml, e hicimos un tratamiento con RNAsa (20 μ g/ml) durante 30 min a 37 °C. Hicimos un tratamiento con Proteínasa K (100 μ g/ml) durante 1 h a 37 °C, seguido por una extracción con fenol, otra con fenol-SEVAG y una con SEVAG. Transferimos la fase acuosa a otro tubo, ajustamos la concentración de NaCl a 0.2 M y agregamos 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Dejamos reposar durante 2 h a -20 °C. Centrifugamos a 10000 Xg durante 30 min, descartamos el sobrenadante y resuspendimos el plásmido en 0.4 ml de acetato de sodio 0.3 M. Agregamos 1 ml de etanol absoluto enfriado a -20 °C, mezclamos bien y centrifugamos durante 5 min. Lavamos la pastilla con etanol al 70 %, eliminamos las trazas de etanol por evaporación, evitando la completa desecación. Resuspendimos el DNA en TE durante 24 h a 4 °C. Determinamos la concentración del DNA mediante la lectura de la absorbancia de la solución a 260 nm. ($1.0 D.O._{260} = 50 \mu$ g/ml).

Caracterización de los plásmidos crecidos a gran escala

Caracterizamos los plásmidos obtenidos por digestión con EcoRI y SacI siguiendo las instrucciones del proveedor. Analizamos los productos por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Verificación del intercambio de los segmentos homólogos entre los genes hPL-1 y hPL-3

Verificamos el intercambio de los segmentos PvuII-SacI entre los genes hPL-1 y hPL-3 mediante dos estrategias que describimos a continuación:

A) Digestión con AluI. Se fundamenta en que una de las diferencias que hay entre los segmentos de 115 pb crea un sitio AluI en el gen hPL-1 que no se encuentra en el gen hPL-3. Este sitio de restricción es diagnóstico del fragmento de hPL-1. Digerimos el DNA de los plásmidos con AluI y separamos los productos de la digestión por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 %. Visualizamos las bandas por iluminación con luz UV.

B) Secuenciamiento de nucleótidos⁽⁵³⁾. Permite la verificación directa del intercambio de la mutación puntual G - A. Para llevarla a cabo, subclonamos los fragmentos PvuII-SacI de los cuatro genes, en los sitios SacI-SmaI del vector fágico M13mp10. Purificamos los fragmentos PvuII-SacI por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4 % y elución pasiva como describimos antes. Obtuvimos el DNA de M13mp10 digerido con SmaI y fosfatado, por lo que lo cortamos con SacI. PvuII y SmaI dejan extremos compatibles para la ligación. Como testigo, ligamos también el vector solo. Hicimos la ligación en un volumen de 20 μ l. Para obtener bacterias competentes, inoculamos 80 ml de caldo 2YT (NaCl al 0.5 %, bactotripton a al 1.6 % y extracto de levadura al 1 %) con una colonia aislada de E. coli JM101 y crecimos el cultivo hasta una D.O.₆₀₀ de 0.4 a 0.6. Centrifugamos 60 ml del cultivo a 7000 Xg durante 5 min y conservamos en hielo los restantes 20 ml como bacterias no competentes. Resuspendimos la pastilla en 30 ml de CaCl₂ 50 mM y dejamos reposar en hielo durante 40 min. Centrifugamos a 7000 Xg durante 5 min y resuspendimos en 6 ml de CaCl₂ 50 mM. Separamos alícuotas de 300 μ l en tubos de microcentrifuga estériles enfriados en hielo. Agregamos 2 μ l de cada mezcla de ligación a cada alícuota de células competentes y los otros 18 μ l a otra, y las dejamos reposar en hielo durante 40 min. Transformamos con M13mp10 sin digerir y con los testigos de la ligación. Incubamos las células a 42 °C durante 2 min y luego en hielo otros 2 min. Pusimos los tubos a temperatura ambiente y agregamos 10 μ l de solución de IPTG (IPTG 100 mM), 50 μ l de solución de X-Gal (X-Gal 20 mg/ml en dimetilformamida) y 300 μ l de células no competentes. Agregamos la mezcla anterior a 3 ml de agar blando 2 YT (agar al 0.6 % en 2YT) fundido en baño María y equilibrado a 46 °C, mezclamos, y extendimos sobre placas de LB. Cuando el agar blando se solidificó, invertimos las cajas y las incubamos toda la noche a 37 °C.

A partir de las placas blancas de crecimiento lento que aparecieron sobre el "césped" de bacterias no competentes, preparamos el DNA monocatenario del fago recombinante que serviría de molde para secuenciamiento de la siguiente manera: inoculamos 2 ml de caldo 2YT con *E. coli* JM101 obtenidas de un cultivo en fase logarítmica y con bacterias de las placas de lisis. Una placa por tubo. Inoculamos 12 tubos de cada templado diferente, es decir 48 tubos, e incubamos toda la noche a 37 °C. Transferimos 1.4 ml a un tubo de microcentrifuga y centrifugamos durante 5 min. Pusimos 1.2 ml de sobrenadante en otro tubo y agregamos 300 µl de NaCl 2.5 M, polietilenglicol al 20 %. Mezclamos por inversión y dejamos reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Centrifugamos durante 5 min y eliminamos el sobrenadante por aspiración. Agregamos 200 µl de TE y calentamos durante 5 min a 55 °C, agitando para disolver la pastilla. Agregamos 100 µl de fenol saturado con TE y agitamos con vórtex. Adicionamos 100 µl de cloroformo, agitamos fuertemente y dejamos reposar durante 5 min. Agitamos de nuevo y centrifugamos durante 5 min. Transferimos 190 µl de la fase acuosa a otro tubo y repetimos la extracción dos veces, transfiriendo primero 180 µl y luego 160 µl de la fase superior. Agregamos 20 µl de acetato de sodio 1 M y 400 µl de etanol absoluto. Congelamos en hielo seco durante 5 min, centrifugamos durante 5 min y descartamos el sobrenadante. Agregamos 1 ml de etanol al 70 % y lo eliminamos sin agitar. Secamos la pastilla y la resuspendimos en 15 µl de TE.

Antes de comenzar las reacciones de secuenciamiento, preparamos el gel de la siguiente manera: lavamos las placas con detergente y las enjuagamos. Usamos guantes para mantener limpias las superficies, colocamos cada placa sobre una superficie, las limpiamos con etanol y las secamos con papel absorbente. Extendimos 3 ml de solución de silicón sobre una de las placas. Ensamblamos el molde para el gel colocando 2 piezas de plástico al final de los espaciadores en el fondo del molde. Pusimos una tira continua de cinta, alrededor de los lados y el fondo del molde. Pusimos una pieza extra de cinta alrededor de cada esquina del fondo para prevenir las fugas. Pusimos 3 pinzas de cada lado. Para hacer el gel, mezclamos 24 g de urea, 20.5 ml de agua destilada estéril y 5 ml de TBE 10X en un frasco y lo calentamos para mantenerlo a temperatura ambiente. Después agregamos 6.3 ml de poliacrilamida al 40 % y 0.4 ml de persulfato de amonio al 10 %. Filtramos a través de una membrana con poros de 0.45 µm. Agregamos 20 µl de TEMED, mezclamos bien y tomamos la solución con una jeringa de 60 ml sin aguja, tapando la salida con un dedo. Colocamos el molde para el gel apoyándose sobre una de las esquinas del fondo en una posición casi horizontal, y vaciamos el gel usando el émbolo para controlar el flujo. Insertamos el peine 3 mm en la parte superior, usando el lado plano para formar un carril único y ancho. Permitimos polimerizar el gel durante 1.5 h. Antes de proceder a secuenciar las cuatro bases, preparamos las siguientes soluciones:

	G°	A°	T°	C°
dGTP 0.5 mM	20 µl	200 µl	200 µl	200 µl
dATP 0.5 mM	200 µl	20 µl	200 µl	200 µl
dTTP 0.5 mM	200 µl	200 µl	20 µl	200 µl
Tampón de Reacción 10X	<u>100 µl</u>	<u>100 µl</u>	<u>100 µl</u>	<u>140 µl</u>
	520 µl	520 µl	520 µl	740 µl

Tampón de reacción 10X = Tris-HCl pH 7.6 70 mM, NaCl 550 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, EDTA 1 mM.

Hicimos soluciones al 10 mM de didesoxinucleósidos trifosfatados y con ellas, preparamos las siguientes soluciones:

	Mezcla ddG	Mezcla ddA	Mezcla ddT	Mezcla ddC
N°	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100.0 μ l
ddNTP 10 mM	8 μ l	10 μ l	10 μ l	1.5 μ l
ddH ₂ O	<u>92 μl</u>	<u>90 μl</u>	<u>90 μl</u>	<u>98.5 μl</u>
	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l

Posteriormente, hicimos un secuenciamiento de citosinas(C). Para esta prueba inicial, elaboramos una mezcla de oligonucleótido cebador para cada juego de 4 reacciones, siguiendo esta receta:

*Oligonucleótido 17 mer	1.0 μ l
Tampón de reacción 10X	1.5 μ l
MgCl ₂ 70 mM	1.5 μ l
³² P-dCTP 2000-3000 Ci/mmol	2.0 μ l
dCTP 20 μ M	2.0 μ l
H ₂ O	<u>3.0 μl</u>
	11.0 μ l

En un tubo de microcentrifuga, unimos 1 μ l de DNA molde y 2.5 μ l de la mezcla anterior. Calentamos a 55 °C durante 5 min para alinear el oligonucleótido (*) cebador y luego pusimos los tubos en una microcentrifuga a temperatura ambiente y centrifugamos durante 5 s. Para cada juego de 4 reacciones, mezclamos 8 μ l de la mezcla de ddC y 0.5 μ l de la enzima de Klenow (5 U/ μ l). Abrimos los tubos (que permanecieron en la centrifuga) y agregamos 2 μ l de la mezcla de enzima de Klenow/ddC en la esquina de la tapa de cada tubo. Tapamos los tubos y centrifugamos durante 5 s para empezar todas las reacciones al mismo tiempo. Incubamos durante 15 min a temperatura ambiente. A los 10 min de incubación, abrimos los tubos y agregamos 1 μ l de una solución de dATP 2.5 mM, dCTP 2.5 mM, dGTP 2.5 mM, dTTP 2.5 mM. Pusimos esta solución en las tapas y cerramos los tubos. A los 15 min de incubación, centrifugamos durante 5 s para bajar la solución que estaba en las tapas e incubamos durante 15 min a temperatura ambiente. A los 10 min de la segunda incubación, agregamos 6 μ l de una mezcla de formamida/colorante (formamida al 96 %, xilencianol al 0.1 %, azul de bromofenol al 0.1 % y EDTA 10 mM) a las tapas de los tubos y los volvimos a cerrar. Cuando la incubación terminó, centrifugamos durante 5 s. Calentamos durante 3 min a 100 °C cada muestra para desnaturalizarla, luego las enfriamos en hielo. Centrifugamos para bajar las gotas al fondo del tubo y cargamos 2 μ l de cada muestra en el gel.

Para secuenciar las 4 bases, preparamos la siguiente mezcla:

Cebador 17 mer de M13	1.0 μ l
Tampón de reacción 10 X	1.5 μ l
MgCl ₂ 70 mM	1.5 μ l
³² P-dCTP 2000-3000 Ci/mmol	2.0 μ l
dCTP 20 μ M	2.0 μ l
H ₂ O	<u>3.0 μl</u>
	11.0 μ l

Luego, agregamos 3 μ l de cada DNA molde a 11 μ l de la mezcla anterior en un tubo de microcentrífuga, incubamos durante 5 min a 55 °C para alinear, pusimos los tubos en la microcentrífuga y centrifugamos durante 5 s. Agregamos 1 μ l de la enzima de Klenow a cada tubo de DNA molde diferente, dividimos esta mezcla en cada uno de 4 tubos (marcados G,A,T y C) y los colocamos en la microcentrífuga. Agregamos 2 μ l de la mezcla ddG en la tapa del tubo "G", 2 μ l de ddA en la del "A", 2 μ l de ddT en la del "T" y 2 μ l de ddC en la del "C". Cerramos las tapas y centrifugamos durante 5 s para comenzar las reacciones. Incubamos durante 15 min a 30 °C. Durante esta incubación, mezclamos 4.5 μ l de solución de desoxinucleótidos con 0.5 μ l de MgCl₂ por cada 4 reacciones. A los 10 min de incubación, transferimos los tubos a la microcentrífuga y centrifugamos durante 5 s. Pusimos 1 μ l de la mezcla de desoxinucleótidos/MgCl₂ en la tapa de cada tubo. Al terminar la incubación, centrifugamos durante 5 s e incubamos durante 15 min a 30 °C. A los 10 min de incubación, transferimos los tubos a la microcentrífuga y centrifugamos durante 5 s. Agregamos 6 μ l de la mezcla de formamida/colorante en la tapa de cada tubo y los cerramos. Al terminar la incubación, centrifugamos durante 5 s para detener las reacciones. Calentamos a 100 °C durante 3 min y enfriamos rápidamente en hielo.

Hicimos electroforesis a los productos de la reacción en el gel que montamos antes de comenzar las reacciones de secuenciamiento. Eliminamos la cinta que estaba alrededor del gel y sujetamos una placa de aluminio a la parte central del mismo. Montamos este aparato en la cámara de electroforesis y quitamos el peine. Agregamos tampón de corrida (TAE 1X) a los reservorios y lavamos la urea del carril. Durante la primera incubación de 15 min, encendimos la fuente de poder y precorrimos el gel a 1700 V. Antes de cargar el gel, desconectamos la fuente de poder y limpiamos nuevamente el carril. Insertamos el peine con los dientes presionando un poco al gel para formar los carriles. Usamos una jeringa Hamilton para cargar las muestras. Enjuagamos la jeringa en tampón de corrida, llenándola y vaciándola de 10 a 20 veces. Eliminamos las burbujas de aire de la jeringa y llenamos y vaciamos la jeringa 3 veces a un nivel de 2 μ l. Llenamos la jeringa a un nivel de 1.5 μ l y los cargamos en un carril. Enjuagamos la jeringa 8 veces en un recipiente con 50 ml de tampón de corrida, repetimos 8 veces en otro recipiente con el mismo tampón. Cargamos el resto de las muestras en una forma similar. Cargamos las G,A,T,y C en ese orden y dejamos un carril vacío entre diferentes DNAs molde. Conectamos la fuente de poder y corrimos la electroforesis a 1700 V.

Cuando la corrida terminó, tomamos el aparato del gel, quitamos la placa de aluminio y lo colocamos horizontalmente con la placa que tiene silicón hacia arriba. Insertamos una espátula entre las placas de vidrio y levantamos lentamente la placa siliconizada. Cortamos una pieza de papel filtro Whatman 3MM de un tamaño ligeramente mayor que el gel. Alineamos un extremo del papel filtro con el fondo del gel y lentamente dejamos caer el papel sobre el gel, comenzando por el fondo y siguiendo hacia la parte superior. Presionamos firme y uniformemente el papel conforme iba tocando al gel. Presionamos fuerte una de las esquinas del filtro para asegurarnos que el gel se adhería al papel y lo levantamos lentamente con el gel unido. Secamos el gel, lo cubrimos con plástico y expusimos una película de rayos X al gel toda la noche a -70°C .

Transfección de células HeLa con los plásmidos

Cultivamos células HeLa en medio de Ham suplementado con suero fetal bovino al 10 % y penicilina-estreptomicina. Ajustamos la atmósfera húmeda a 5 % de CO_2 . Dejamos crecer las células hasta una confluencia de 50 % y procedimos a la transfección. Para llevarla a cabo, utilizamos el método del coprecipitado de CaPO_4 -DNA₍₅₄₎ en dos cajas T-150 (FALCON) para cada plásmido. Primero, cambiamos el medio de cultivo 4 h antes de la transfección. Usamos 5 ml por caja de 100 mm. Hicimos la siguiente mezcla en un tubo de microcentrífuga para cada plásmido que transfectamos:

DNA (5 μg)	5 μl
CaCl_2 2M	62.5 μl
TE estéril	432.5 μl

Pasamos esta mezcla gota a gota y con leve agitación a un tubo que contenía 500 μl de HBS 2X. Observamos la formación de un precipitado muy fino y lo dejamos reposar durante 40 min. Eliminamos el medio de cultivo de las cajas y agregamos la mezcla del precipitado de DNA- Ca^{++} a cada caja. Movimos la caja para que el precipitado cubriera las células, dejamos reposar la caja durante 8 min, y agregamos medio de cultivo. Incubamos durante 5 h a 37°C . Eliminamos el medio de cultivo por aspiración, lavamos con medio de cultivo sin suero precalentado a 37°C , descartamos dicho medio y agregamos medio nuevo completo. Incubamos a 37°C durante 48 h y procedimos a aislar el RNA total.

Extracción de RNA a partir de células HeLa transfectadas

Aislamos RNA por medio del método de isotiocianato de guanidina- CsCl ₍₅₅₎. Para llevar a cabo la extracción, desprendimos las células de las cajas de cultivo con un "policía" y las pasamos a un tubo de 15 ml, de policarbonato y de fondo cónico. Lavamos las células, resuspendiéndolas en solución salina y centrifugándolas de nuevo.

Agregamos 4 ml de tampón de lisis (isotiocianato de guanidina 6 M, citrato de sodio pH 7.0 5 mM, β -mercaptoetanol 0.1 M y sarcosil al 0.5 %) y homogenizamos en el vórtex. Pusimos 4 ml de CsCl 5.7 M en tubos de ultracentrífuga de 10 ml para el rotor SW41 de Beckman y vertimos el lisado celular en su superficie. Llenamos los tubos con el tampón de lisis para que no se colapsaran. Centrifugamos a 174000 Xg durante 21 h a 20 °C y al final de la corrida, eliminamos el sobrenadante por aspiración. Descartamos los últimos 200-400 μ l con una micropipeta y secamos las paredes de los tubos sin tocar la pastilla. Resuspendimos la pastilla en 200 μ l de acetato de sodio 0.3 M, pH 6.0 y transferimos la muestra a un tubo de microcentrífuga. Lavamos el tubo de ultracentrífuga con 100 μ l de acetato de sodio 0.3 M y los transferimos al mismo tubo. Agregamos 300 μ l de fenol saturado con TE y 300 μ l de cloroformo, agitamos en el vórtex y centrifugamos durante 1 min. Transferimos la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga, agregamos 750 μ l de etanol absoluto, congelamos en CO₂ sólido durante 10 min y centrifugamos durante 10 min. Descartamos el sobrenadante, agregamos 300 μ l de etanol al 80 %, mezclamos y centrifugamos durante 2 min a 4 °C. Descartamos el sobrenadante, secamos la pastilla en el evaporador centrífugo de vacío y la resuspendimos en 100 μ l de H₂O tratada con dietilpirocabonato.

Determinamos la cantidad de RNA mediante espectrofotometría de luz UV a una longitud de onda de 260 nm (1 U.A.₂₆₀ = 40 μ g/ml) y las muestras fueron almacenadas a -70 °C.

Electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa-urea ácido

Verificamos la calidad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa urea ácido⁽⁵⁶⁾. Preparamos el gel un día antes y de la siguiente manera: pesamos 2 g de agarosa y los disolvimos en 60 ml de urea 10 M, 10 ml de citrato de sodio 0.25 M y 30 ml de agua. Calentamos a ebullición, enfriamos y vertimos el gel entre dos placas verticales de vidrio. Dejamos que solidificara toda la noche. Preparamos la muestra, mezclando 10 μ g de RNA en 20 μ l agua, con 30 μ l de tampón de carga. El tampón de corrida fué citrato de sodio 0.025 M. Hicimos la electroforesis a 40 V hasta que las muestras entraron al gel y luego aumentamos a 80 V. Dejamos que el azul de bromofenol migrara 4/5 partes del gel y teñimos el gel durante 30 min en bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Enjuagamos con agua y visualizamos el RNA con luz UV.

Electroforesis de RNA desnaturalizado con glíoxal y transferencia⁽⁵⁷⁾

Desnaturalizamos las muestras de RNA (10 μ g), de acuerdo al esquema que se muestra en la siguiente hoja:

Fuente	RNA + DEPH ₂ O + NaH ₂ PO ₄ (μl)	0.1M	DMSO	GLIOXAL
1.hPL-1	3.03	11.77	6.4	32 10.8
2.hPL-1 reparado	10.15	4.65	6.4	32 10.8
3.hPL-1 reparado	5.38	9.42	6.4	32 10.8
4.pSVgpt	5.15	9.65	6.4	32 10.8
5.hPL-3	3.57	11.23	6.4	32 10.8
6.hPL-3 mutado	5.07	9.73	6.4	32 10.8
7.RNA total de placenta humana	12.5	2.3	6.4	32 10.8

Incubamos las muestras de RNA a 50 °C durante 1 h e hicimos un gel vertical de agarosa al 1.2 % en tampón de fosfatos 0.01 M. Enfriamos las muestras a 20 °C y agregamos 4 μl de tampón de carga estéril (Glicerol al 50 %, NaH₂PO₄ pH 7.0 0.01 M y azul de bromofenol al 0.4 %). Hicimos la electroforesis a 40 V hasta que el colorante entró al gel, y aumentamos luego a 60 V. En ese momento pusimos a recircular el tampón de corrida. Permitimos que el azul de bromofenol migrara 4/5 partes del gel. Utilizamos la muestra número 3 para cortar el carril y teñirlo con bromuro de etidio, para observar la apariencia del RNA separado en el gel de glioxal, antes de la transferencia.

Transferimos por capilaridad el RNA de los otros 5 carriles a papel filtro de nitrocelulosa⁽⁵⁸⁾ de la siguiente manera: vertimos en una cuba hidroneumática SSC 20X (NaCl al 17.53 % y citrato de sodio al 8.82 %, pH 7.0) e introdujimos un bloque de material inerte que sobresalía de la superficie del líquido. Colocamos una tira de papel filtro Whatman 3MM previamente humedecida con SSC 20X y eliminamos las burbujas de aire que se formaban entre el papel y el bloque, con una pipeta como rodillo. Colocamos el gel sobre el papel filtro e hicimos la misma operación con la pipeta, cuidando de no deformar el gel. Colocamos sobre el gel una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en agua y en SSC 20X. La membrana era unos milímetros mas grande que el gel. Eliminamos las burbujas con la pipeta y colocamos sobre la membrana de nitrocelulosa 3 capas de papel filtro Whatman 3MM del mismo tamaño y después una cantidad abundante de toallas de papel absorbente. Colocamos un objeto pesado sobre las toallas y permitimos la transferencia durante 15 h. Desmontamos el aparato y permitimos que la membrana de nitrocelulosa se secase al aire, protegida entre dos hojas de papel filtro. Horneamos la membrana de nitrocelulosa durante 2 h a 80 °C en una estufa con vacío. Tratamos el gel por otra parte con NaOH 50 mM durante 30 min y lo teñimos con bromuro de etidio (0.5 μg/ml) durante 15 min para observar el RNA que no se transfirió.

Marcaje radiactivo de phPL815 por el método de movimiento de la muesca₍₅₉₎.

Utilizamos como sonda el plásmido phPL815, que consiste de un DNAC del gen hPL-3 de longitud casi total, clonado en el sitio PstI del plásmido pBR322. Hicimos este marcaje de la siguiente manera:

Tampón "nick translation" 10X-----	5 μ l
dNTP's 100 μ M -----	10 μ l
DNA (1 μ g)-----	2 μ l
³² P-dCTP -----	10 μ l
H ₂ O-----	21 μ l
DNA polimerasa I -----	<u>2 μl</u>
	50 μ l

Incubamos la reacción durante 2 h a 13 °C. Durante estas 2 h, preparamos una columna de Sephadex G-50 en una pipeta de 5 ml. Colocamos un tapón de fibra de vidrio esterilizada por autoclave en la punta de la pipeta, cortamos la pipeta a la altura del "0" y la mantuvimos vertical en un soporte mientras agregábamos el sephadex G-50 equilibrado en tampón TE con una pipeta Pasteur. Agregamos gel hasta que el nivel llegó al "0.5 ml" y lavamos con TE. Después de las 2 h de la reacción, agregamos 2.5 μ l de EDTA 0.2 M y 5 μ l de SDS al 10% para detenerla. Pasamos el producto final de la reacción (57.5 μ l) a través de la columna. Colectamos 8 fracciones de 500 μ l en tubos de microcentrífuga. Tomamos 5 μ l de cada fracción y los disolvimos en 2 ml de líquido de centelleo. Determinamos el número de cuentas radiactivas que el DNA marcado emitía por minuto (cpm).

Hibridización de la sonda con el RNA unido a la matriz de nitrocelulosa₍₆₀₎.

Para hibridizar la sonda radiactiva con el RNA unido a la matriz de nitrocelulosa, preparamos una solución de prehibridización siguiendo esta receta:

Formamida desionizada -----	50 %
SSC -----	5 X
Solución de Denhart -----	5 X
Fosfato de sodio, pH 8.0 -----	50 mM
SDS -----	0.1 %
Agua -----	c.b.p.10 ml

Colocamos la membrana de nitrocelulosa dentro de una bolsa de plástico, agregamos la solución de prehibridización, eliminamos las burbujas de aire y prehibridizamos durante 5 h a 42 °C en un baño de agua con agitación lenta. Durante este lapso, preparamos la solución de hibridización de acuerdo a la receta que se muestra enseguida:

Formamida desionizada -----	50 %
SSC -----	5 X
Solución de Denhart -----	1 X
Fosfato de sodio pH 8.0 -----	20 mM
SDS -----	0.1 %
Dextrán sulfato -----	10 %

más la sonda radiactiva (10 000 000 cpm), previamente calentada a ebullición durante 5 min y enfriada en hielo durante 5 min. Al terminar la prehibridización, cortamos una esquina de la bolsa y descartamos la solución de prehibridización. Agregamos la solución de hibridización, eliminamos las burbujas de aire, sellamos la bolsa, e hibridizamos toda la noche a 42 °C en un baño de agua. Al terminar la hibridización cortamos una esquina de la bolsa y descartamos la solución de hibridización. Extrajimos la membrana y la lavamos 3 veces con 400 ml de SSC 2X, SDS al 0.1 % a temperatura ambiente por 15 min cada vez. Lavamos 3 veces con 400 ml de SSC 0.1X, SDS al 0.1 % a 50 °C durante 30 min cada vez. Enjuagamos la membrana en SSC 0.1X y la secamos al aire entre dos hojas de papel filtro Whatman 3 MM. Envolvimos el filtro con plástico y expusimos una película de rayos X al mismo durante toda la noche a -70 °C. Revelamos la película al día siguiente.

Cotransfección con pSV2CAT

Al no obtener señal, hicimos otra transfección, pero esta vez cotransfectamos el plásmido pSV2CAT₍₆₁₎, el cual lleva la información genética para la cloranfenicol acetil-transferasa de *E. coli* (CAT) bajo la dirección del promotor-amplificador de la región temprana de SV40. Esta cotransfección tuvo como objetivo verificar que la transfección fué eficiente técnicamente. Para esto hicimos ensayos para CAT con sobrenadantes de las células cotransfectadas de la siguiente manera: cosechamos las células transfectadas 48 h después de la transfección y las lisamos mediante 3 ciclos de congelación-descongelación en hielo seco-etanol. Entonces, preparamos la siguiente mezcla:

20 μ l de sobrenadante celular
139 μ l de Tris pH 7.8 0.25 M
1 μ l de ¹⁴ C-Cloranfenicol (0.1-0.2 μ Ci)
<u>20 μl</u> de Acetil CoA 4 mM
180 μ l

y la incubamos a 37 °C durante 1 h. Detuvimos la reacción agregando 0.5 ml de acetato de etilo y 0.5 ml de Tris pH 7.8 0.25 M frío. Agitamos en vórtex por 1 min, centrifugamos durante 2 min y transferimos la fase superior a otro tubo. Secamos el acetato de etilo en el evaporador centrífugo al vacío y en ese momento secamos una placa para cromatografía en capa fina durante 10 min a 80 °C y con vacío. Resuspendimos el contenido desecado de los tubos en 15 μ l de acetato de etilo y con una micropipeta colocamos la muestra, gota a gota, en la placa de cromatografía de capa fina. Corrimos la cromatografía durante 30 min, con una mezcla de cloroformo 95 %- metanol 5% como eluyente. Secamos la placa al aire y expusimos una película de rayos X durante 24 h a -80 °C. Revelamos la película al día siguiente.

Otra forma de aumentar la transcripción de los genes transfectados era aumentar la cantidad de DNA molde que sirviera para la transcripción. Para esto, hicimos la transfección en células COS-7₍₆₂₎. Estas son células de riñón de mono verde africano (CV1), transformadas con el genoma del virus de simio 40 defectuoso en el origen de replicación. Las células COS-7 son productoras de antígeno T, el cual promueve la replicación de moléculas de DNA que tengan el origen de replicación del virus de simio 40. Los plásmidos pSV2gpt poseen este origen de replicación y por lo tanto es posible que se repliquen.

Otra manera de incrementar la cantidad de RNA a un nivel detectable era aumentando la potencia del promotor. Para elegir el promotor que dirigiera la transcripción de los genes, realizamos un par de transfecciones, una con el plásmido pSV2CAT y la otra con pCMVCAT₍₆₃₎ en el cual el gen CAT esta bajo la dirección de la unidad promotor-amplificador del gen principal inmediato temprano del citomegalovirus humano (hCMV). Cuarenta y ocho horas después de realizar las transfecciones hicimos el ensayo de CAT, y evaluamos los resultados.

Construcción de pAVE, un vector de expresión para genes eucarióticos

Digerimos el plásmido pCMVCAT con EcoRI y HindIII simultáneamente (Figura 9) y verificamos la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En paralelo, digerimos el plásmido pUC 19 con las mismas enzimas y verificamos la digestión de la misma manera. Separamos los fragmentos producto de las digestiones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 4 % y los recuperamos mediante dos técnicas diferentes. Recuperamos el fragmento proveniente de pCMVCAT por electroelución y el fragmento proveniente de pUC 19 por elución pasiva, como describimos antes. Verificamos la calidad y cantidad del DNA recuperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y procedimos a la ligación de ambos fragmentos, haciendo uso de la DNA ligasa del fago T4. Revisamos la ligación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a partir de una alícuota. Usamos el resto de los productos de la ligación para transformar E. coli RR1 Ca^{++} -competentes. Hicimos la transformación como explicamos anteriormente, excepto que ahora extendimos 1/10 de las bacterias transformadas en una caja y los otros 9/10 en otra.

Para rebajar el número de colonias a ser analizadas por el método de los minilisados alcalinos, hicimos un análisis rápido de los plásmidos superenrollados de 12 clonas₍₆₄₎. Para llevar a cabo esta técnica, procedimos de la siguiente manera: con el extremo del asa bacteriológica levantamos media colonia (2-3 mm de diámetro), la sembramos por punción en una caja numerada y disolvimos el resto de la colonia en 15 μ l de tampón de lisis (NaOH 50 mM, Glicerol al 5 %, SDS al 0.5 %, EDTA 5 mM y azul de bromofenol al 0.1 %) en un tubo de microcentrífuga. Agitamos en el vórtex para disolver la pastilla e incubamos a 65 °C durante 15 min. Centrifugamos durante 5 min, tomamos el sobrenadante, le agregamos 2 μ l de jugo azul 6X y cargamos la muestra en un gel de agarosa al 1 %.

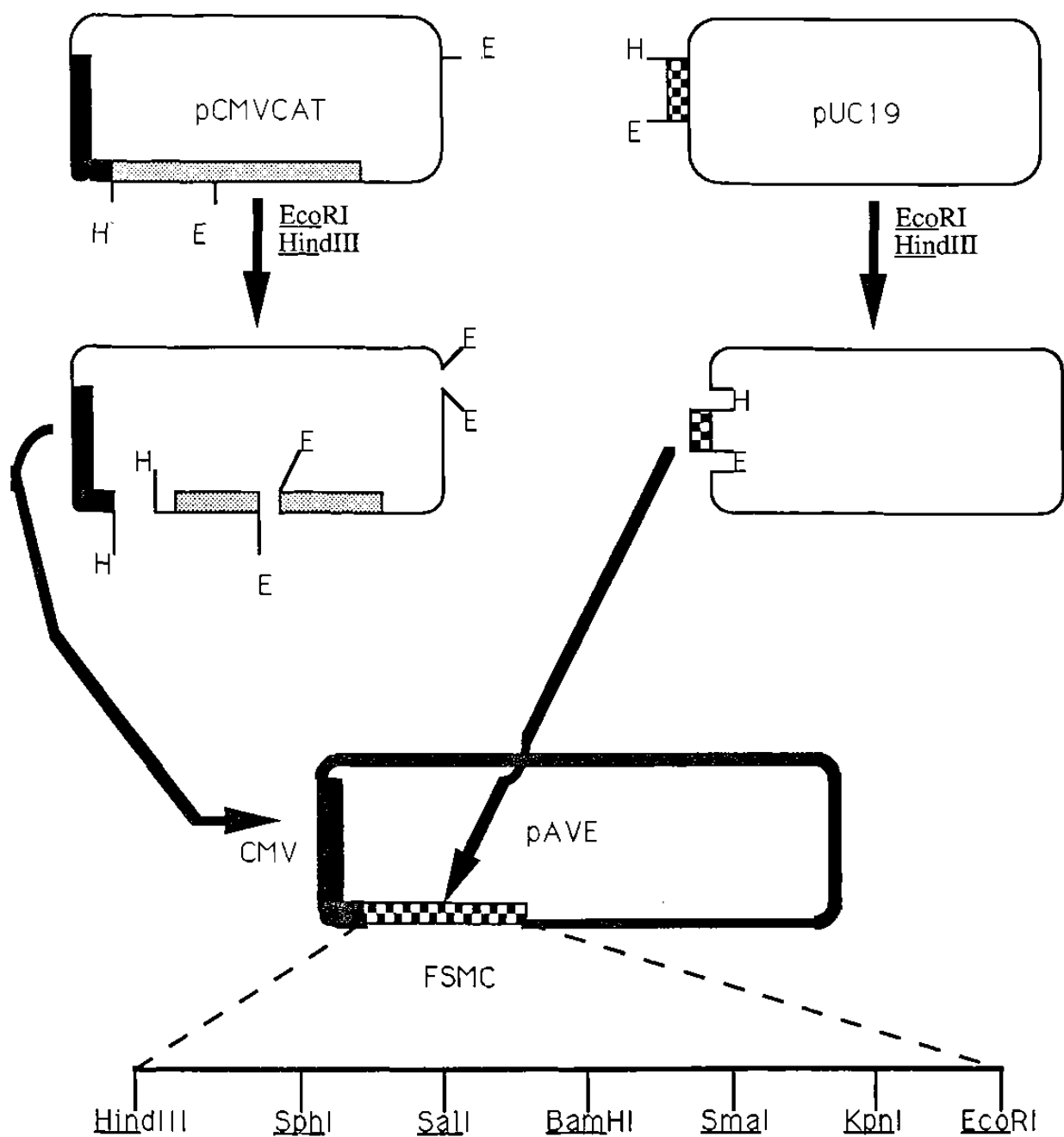


Figura 9.- ESTRATEGIA PARA LA CONSTRUCCION DE pAVE

pCMVCAT fué cortado simultaneamente con HindIII (H) y EcoRI (E), y el fragmento conteniendo el promotor de hCMV fué recuperado para ligarlo a un fragmento de sitios múltiples de clonación (FSMC) proveniente de una digestión similar de pUC19, dando origen a pAVE.

Teñimos el gel en bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en TAE durante 15 min con agitación ocasional y desteñimos durante 15 min en ddH_2O . Después de seleccionar las clonas que portaban el plásmido del tamaño esperado, procedimos al análisis por minilizados alcalinos y digestiones de restricción de tres de ellas. Cuando verificamos la identidad e integridad de los nuevos plásmidos, inoculamos una de las clonas en 12 tubos con 4 ml de medio LB cada uno y realizamos un minilizado alcalino como describimos antes. El propósito de esto fué contar con DNA suficiente para manipularlo con el fin de introducir los genes hPL en este vector. Llamamos pAVE al nuevo plásmido.

Subclonación de hPL-1 silvestre, hPL-1 reparado, hPL-3 silvestre y hPL-3 mutado, en pAVE

Subclonamos los genes hPL-3 silvestre y hPL-3 mutado en pAVE de la siguiente manera (Figura 10): digerimos pAVE con BamHI y EcoRI y separamos el fragmento correspondiente al vector por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4 %. Lo recuperamos por electroelución, como describimos antes. En paralelo, digerimos pSV2gpthPL-3 silvestre y pSV2gpthPL-3 mutado con las mismas enzimas y purificamos los fragmentos producidos. Ligamos los fragmentos y obtuvimos las clonas que portaban los plásmidos requeridos. Crecimos dichos plásmidos a gran escala y los usamos para hacer una transfección piloto que nos indicara la factibilidad de utilizar la unidad promotor-amplificador de hCMV para dirigir la transcripción de los genes hPL, de tal manera que fuera posible detectar los transcritos.

Se presentó el problema de que los genes hPL-1 silvestre y hPL-1 reparado no poseen ningún sitio BamHI con el cual subclonarlos en nuestro vector. Para resolver esto, modificamos la estrategia general. El cambio consistió en sustituir la región 5' de los genes hPL-1 por su homóloga del gen hPL-3, construyendo dos genes diferentes, uno de los cuales posee la mutación del gen hPL-1 y el otro la región normal del gen hPL-3. Para llevar a cabo tales construcciones, digerimos pAVEhPL-3 silvestre con BamHI y EcoRI y verificamos la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En paralelo, digerimos pSV2gpthPL-1 silvestre con SacI y EcoRI y verificamos de la misma manera. Al mismo tiempo, digerimos pSV2gpthPL-3 silvestre y pSV2gpthPL-3 mutado con BamHI y SacI. Separamos los fragmentos producidos en estas digestiones por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % y recuperamos el DNA de las bandas de interés por el método de yoduro de sodio-sílica que describimos a continuación: cortamos la banda del gel de agarosa de bajo punto de fusión y agregamos 2.5 volúmenes de una solución saturada de yoduro de sodio. Incubamos durante 5 min a 50 °C para disolver la agarosa y agregamos 5 μl de una suspensión de sílica finamente molida en agua e incubamos durante 5 min. Centrifugamos el complejo sílica-DNA durante 5 s y descartamos el sobrenadante. Lavamos la pastilla 3 veces con tampón NEW (la fórmula exacta de este reactivo, que forma parte del estuche "GENECLEAN" de la compañía BIO101 no está disponible) resuspendiéndola y reprecipitándola sucesivamente. Eluimos el DNA con agua destilada estéril, centrifugamos nuevamente y transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo para descartar la sílica.

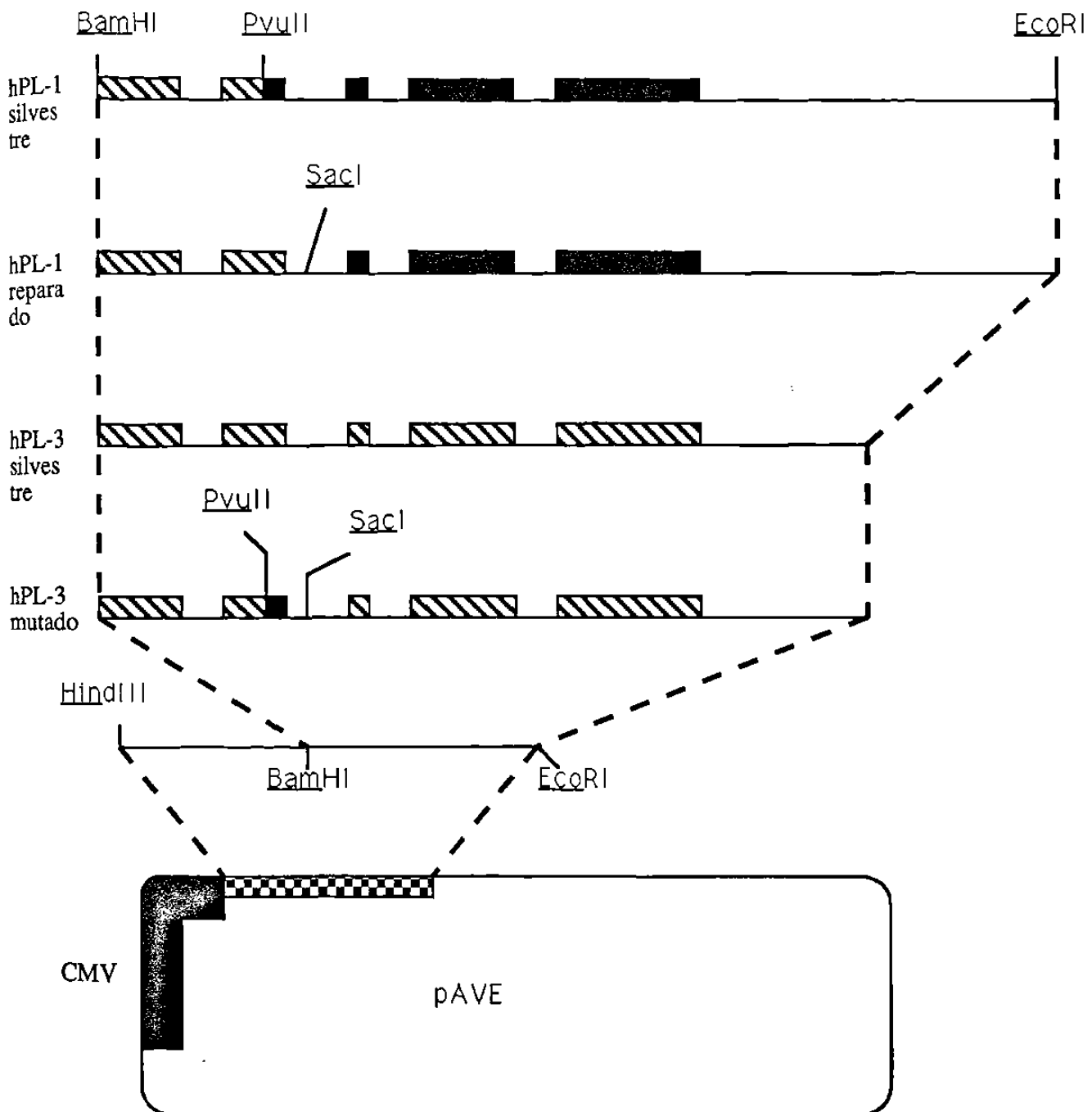


Figura 10.- ESTRATEGIA PARA SUBCLONAR LOS GENES hPL EN pAVE.

Los genes hPL-3 fueron subclonados en pAVE desde el sitio BamHI al inicio del primer exón hasta el sitio EcoRI en el extremo 3'. Los genes hPL-1 no poseen el sitio BamHI, por lo que la estrategia general fué modificada sustituyendo el extremo 5' del gen hPL-1 por la región correspondiente del gen hPL-3. El gen hPL-1 silvestre incluye el extremo 5' del gen hPL-3 pero conserva la mutación al inicio del intrón II, el gen hPL-1 reparado contiene el extremo 5' del gen hPL-3 desde BamHI hasta SacI, y carece por lo tanto de la mutación. El vector recibió los genes en los sitios BamHI y EcoRI por lo que se encuentran directamente bajo la influencia del promotor del citomegalovirus (CMV).

Ligamos los fragmentos de la siguiente manera:

a) pAVEBamHI-EcoRI + hPL-3 BamHI-SacI + hPL-1SacI-EcoRI.

b) pAVEBamHI-EcoRI + hPL-3mutBamHI-SacI + hPL-1SacI-EcoRI.

Identificamos las clonas que poseían los plásmidos de interés y los crecimos a gran escala de la manera ya descrita.

Transfección de células COS-7 con pAVEhPL-1 silvestre, pAVEhPL-1 reparado, pAVEhPL-3 silvestre y pAVEhPL-3 mutado.

Realizamos la transfección por el método antes descrito y de acuerdo al siguiente esquema:

pAVEhPL-1 silvestre + pSV2CAT -----	3 botellas T-150
pAVEhPL-1 reparado + pSV2CAT -----	" " " "
pAVEhPL-3 silvestre + pSV2CAT -----	" " " "
pAVEhPL-3 mutado + pSV2CAT -----	" " " "
pSV2CAT -----	" " " "

Dos días después de la transfección, cosechamos las células e hicimos un ensayo de CAT a una sexta parte de ellas y aislamos RNA a partir de las otras cinco sextas partes, usando el protocolo que describimos a continuación.

Extracción de RNA total por el método de isotiocianato de guanidina-cloruro de litio

Para llevar a cabo la extracción, procedimos de la siguiente manera⁽⁶⁵⁾: descartamos el medio de las cajas de cultivo. Lavamos las células con salina y descartamos la solución. Agregamos 1 ml de tampón de lisis (isotiocianato de guanidina 5 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 7.5 50 mM, β -mercaptoetanol 8 %) a la primera botella y lo extendimos. Transferimos el lisado a la siguiente botella y así sucesivamente. Repetimos el procedimiento 2 veces, usando 0.5 ml de tampón de lisis por vez. Al final teníamos 2 ml de cada juego de botellas en tubos COREX de 30 ml horneados. Agregamos 10 ml de cloruro de litio 4 M, mezclamos y dejamos reposar a 4 °C durante 20 h. Centrifugamos a 11000 Xg durante 90 min a 4 °C y descartamos el sobrenadante. Resuspendimos la pastilla en cloruro de litio 3 M, mezclando en el vórtex y centrifugamos como en el paso anterior, pero solo 60 min. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla de RNA en tampón de solubilización (SDS al 0.1 %, EDTA 1 mM, Tris-HCl pH 7.5 10 mM) agitando en el vórtex durante 20 s cada 10 min durante 50 min. Extrajimos con un volumen igual de fenol, centrifugamos y recuperamos la fase acuosa. Extrajimos con un volumen de cloroformo, centrifugamos y recuperamos la fase acuosa.

Agregamos 0.05 volúmenes de acetato de amonio saturado, 2 volúmenes de etanol y precipitamos a -20°C toda la noche. Centrifugamos a 14000 Xg durante 20 min y lavamos la pastilla con etanol al 90 % para eliminar el LiCl. Resuspendimos en $100\ \mu\text{l}$ de ddH_2O tratada con dietilpirocarbonato y verificamos la calidad del RNA por electroforesis en gel de agarosa-urea ácido. Posteriormente, desnaturalizamos $15\ \mu\text{g}$ de RNA con glioxal y lo separamos en un gel de agarosa al 1.2 % en tampón de fosfatos 0.01 M y lo transferimos a un papel filtro de nitrocelulosa. Horneamos el papel filtro durante 2 h a 80°C con vacío.

Marcaje radiactivo de phPL815 por síntesis de DNA dirigida por oligonucleótidos al azar⁽⁶⁶⁾

Para llevar a cabo este marcaje usamos la sonda que mencionamos anteriormente (phPL815). Marcamos 250 ng de la siguiente manera: pusimos 50-100 μCi de ^{32}P -dCTP ($10\ \mu\text{l}$) en un tubo de microcentrífuga estéril y los secamos en el evaporador centrífugo de vacío. Agregamos $11.4\ \mu\text{l}$ de solución LS y $1\ \mu\text{l}$ de BSA 10 mg/ml. Pusimos $6\ \mu\text{l}$ de DNA ($25\ \text{ng}/\mu\text{l}$) en otro tubo que contenía $12.2\ \mu\text{l}$ de agua destilada estéril. Calentamos el tubo con el DNA a 100°C durante 5 min, y lo colocamos inmediatamente en un baño con hielo. Agregamos $12.1\ \mu\text{l}$ de la mezcla DNA/agua a la mezcla de reacción en hielo. Agregamos $1\ \mu\text{l}$ (2.5 U) de la enzima de Klenow, mezclamos y centrifugamos brevemente para coleccionar el volumen en el fondo del tubo. Incubamos a temperatura ambiente durante 3 h y agregamos $50\ \mu\text{l}$ de tampón para detener la reacción (EDTA 10 mM, SDS al 1 %). Mientras transcurría la incubación, montamos una columna de filtración en gel como describimos anteriormente. Después de la reacción, separamos la sonda por cromatografía de filtración en gel, esta vez en una jeringa de 1 ml. Obtuvimos fracciones de $300\ \mu\text{l}$, $250\ \mu\text{l}$, $100\ \mu\text{l}$ y $100\ \mu\text{l}$, de las cuales tomamos una alícuota de $5\ \mu\text{l}$ para determinar las cpm, en el contador de centelleo líquido. Posteriormente, repetimos la hibridización, lavado y exposición como describimos antes.

RESULTADOS

A partir de los resultados de los minilizados alcalinos, seleccionamos 2 clonas de cada uno de los plásmidos: pSV2gpthPL-1 reparado y pSV2gpthPL-3 mutado y las crecimos a gran escala. Crecimos también pSV2gpt, pSV2gpthPL-1 silvestre y pSV2gpthPL-3 silvestre, obteniendo los siguientes resultados:

PLASMIDO	ABS ₂₆₀	ABS ₂₈₀	PUREZA	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	TOTAL (mg)
pSV2gpthPL-1 A	0.902	0.468	1.93	4.51	4.51
pSV2gpthPL-1 B	0.940	0.487	1.93	4.70	4.70
pSV2gpthPL-1rep A	0.446	0.233	1.91	2.23	2.23
pSV2gpthPL-1rep B	0.611	0.311	1.96	3.06	3.06
pSV2gpt A	0.958	0.489	1.96	4.79	4.79
pSV2gpt B	0.723	0.368	1.96	3.62	3.62
pSV2gpthPL-3 A	0.431	0.225	1.91	2.16	2.16
pSV2gpthPL-3 B	0.576	0.301	1.91	2.88	2.88
pSV2gpthPL-3mut A	0.452	0.241	1.87	2.26	2.26
pSV2gpthPL-3mut B	0.438	0.234	1.87	2.19	2.19

Posteriormente, verificamos la identidad de los plásmidos por digestión con EcoRI y SacI (Figura 11). La digestión con EcoRI liberó los genes hPL que estaban clonados en el sitio EcoRI único del vector. Se produjeron dos fragmentos, el mayor de los cuales es igual en todos los recombinantes y corresponde al vector pSV2gpt. Este último migra a la misma altura que la banda del pSV2gpt linearizado con HindIII. El otro fragmento es diferente entre las digestiones de los plásmidos que portan los genes hPL-1 y los que portan los hPL-3. Dicha banda corresponde a los genes mismos. El gen hPL-1 es de mayor tamaño (3.6 kb) que el gen hPL-3 (2.9 kb). Los tamaños de los fragmentos son los indicados de acuerdo con el marcador de peso molecular (DNA del fago lambda digerido con HindIII). Mediante la digestión con SacI verificamos que éste sitio, el cual estuvo involucrado en la manipulación, no fué alterado. La ausencia de digestión del pSV2gpt con SacI, descarta que la linearización de los plásmidos recombinantes se deba a un sitio en el vector.

Verificación del intercambio de los segmentos por digestión con AluI

Cuando analizamos la digestión con AluI, observamos que los genes hPL-1 silvestre y hPL-3 mutado mostraban la ausencia de la banda de 115 pb y la presencia concomitante de una banda de 80 pb. Por otro lado, los genes hPL-1 reparado y hPL-3 silvestre presentaron la banda de 115 pb (Figura 12). Esto nos proporcionó una prueba directa de que habíamos intercambiado el segmento PvuII-SacI y una prueba indirecta de que habíamos intercambiado la mutación del sitio donador del procesamiento del segundo intrón.

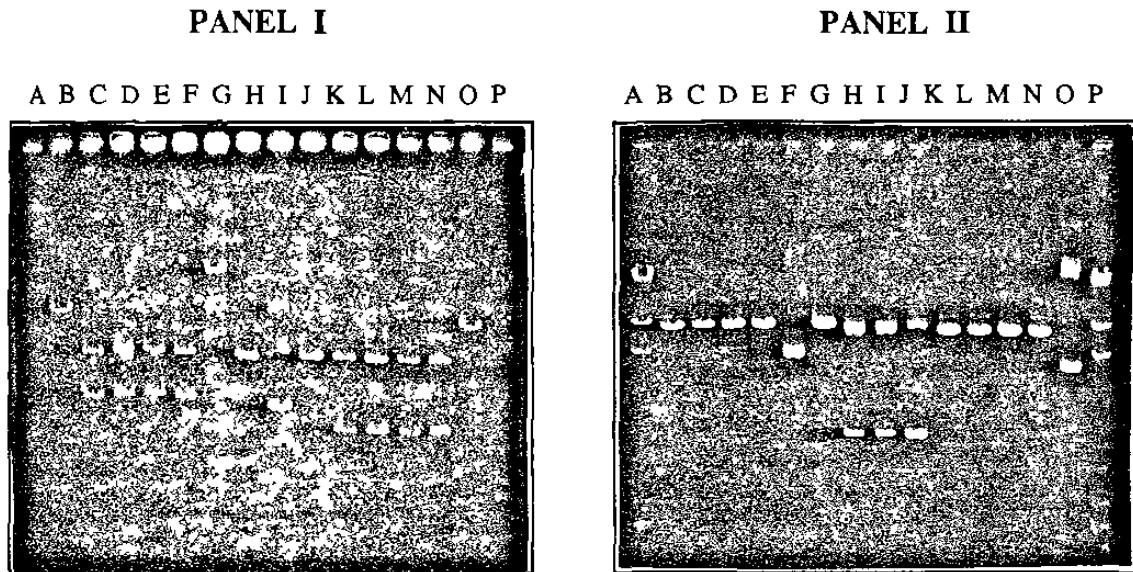


Figura 11.- CARACTERIZACION DE LOS PLASMIDOS pSV2gpthPL-1 REPARADO Y pSV2gpthPL-3 MUTADO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EcoRI y SacI.

Los plásmidos fueron cortados con las enzimas de restricción EcoRI y SacI y los fragmentos producidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En el **Panel I** se muestran los productos del corte con EcoRI. Carriles: A, G y P son marcadores de peso molecular (DNA de fago lambda digerido con HindIII), B es pSV2gpthPL-1 linearizado, C y D son pSV2gpthPL-1 silvestre, E y F son pSV2gpthPL-1 reparado, H y J son pSV2gpt linearizado, I es pSV2gpt superenrollado, K y L son pSV2gpthPL-3 silvestre, M y N son pSV2gpthPL-3 mutado y O es pSV2gpthPL-3 linearizado. En el **Panel II**, se muestran los productos de la digestión con SacI. Carriles: A y P son los marcadores de peso molecular. B y C son pSV2gpthPL-1 silvestre, D y E son pSV2gpthPL-1 reparado, F es pSV2gpthPL-1 superenrollado, G es pSV2gpthPL-1 linearizado, H y J son pSV2gpt con SacI, I es pSV2gpt superenrollado, K y L son pSV2gpthPL-3 silvestre, M y N son pSV2gpthPL-3 mutado y O es pSV2gpthPL-3 superenrollado.

A B C D E F G H I J K L M N

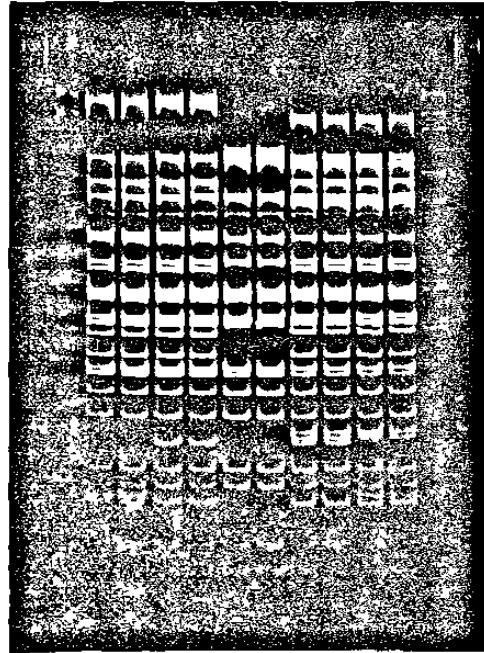


Figura 12.- VERIFICACION DEL INTERCAMBIO DE SEGMENTOS CON AluI.

Los plásmidos fueron cortados con AluI, y los productos de la digestión separados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Carriles: A y N, son un marcador de peso molecular de 123 pb, B y M son DNA del fago Phi-X 174 cortado con HaeIII, C y D son pSV2gpthPL-1 silvestre, E y F son pSV2gpthPL-1 reparado, G y H son pSV2gpt, I y J son pSV2gpthPL-3 silvestre, K y L son pSV2gpthPL-3 mutado.

Verificación del intercambio de la mutación por secuenciamiento de nucleótidos

Recurrimos a una técnica mas fina para verificar el intercambio de la mutación (Figura 13). Al revisar la información obtenida del gel de secuenciamiento, observamos que al inicio del segundo intrón habíamos intercambiado la mutación. Así verificamos el intercambio de segmentos hasta el nivel mas fino, y concluimos que poseíamos los cuatro genes que deseábamos probar en el sistema de expresión in vivo: hPL-1 silvestre, hPL-1 reparado, hPL-3 silvestre y hPL-3 mutado.

Introducción del DNA a células HeLa y aislamiento de RNA total

Después de transfectar células HeLa con los plásmidos construidos, aislamos RNA total y obtuvimos los siguientes datos:

Fuente	260	280	260/280	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1. hPL-1	1.540	0.745	2.06	6.16
2. hPL-1rep A	0.494	0.263	1.87	1.97
3. hPL-1rep B	0.930	0.497	1.87	3.72
4. pSV2gpt	0.970	0.517	1.87	3.88
5. hPL-3	1.400	0.749	1.87	5.60
6. hPL-3mut	0.986	0.528	1.86	3.94

Verificación de la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa-urea ácido

Corrimos una alícuota de 10 μg de RNA total por electroforesis en gel de agarosa-urea ácido y observamos que estaba integro, sin señal alguna de degradación (Figura 14). Corroboramos esto, observando que la banda de RNA ribosomal 28 S, emitía aproximadamente el doble de fluorescencia que la del 18S. Además las bandas se observaron nítidas y no existía fluorescencia hacia abajo del RNA 5 S que estuviera siendo emitida por productos de degradación.

Electroforesis de RNA desnaturalizado con glioxal y dimetilsulfóxido

Después de correr la electroforesis, teñimos un carril con bromuro de etidio para observar el aspecto del RNA antes de la transferencia. Observamos bandas prominentes correspondientes a los RNA ribosomales 28 S, 18 S y 5 S. Después de permitir la transferencia durante 15 h, teñimos el gel para observar el RNA después de la misma y verificar la eficiencia, comparando la intensidad de la fluorescencia emitida antes y después (Figura 15). El RNA mensajero del lactógeno placentario migra aproximadamente la misma distancia abajo del RNA 18 S que la que separa a éste último del 28 S, por lo tanto la transferencia en la región donde se encontraba el RNAm del lactógeno placentario fué muy eficiente.

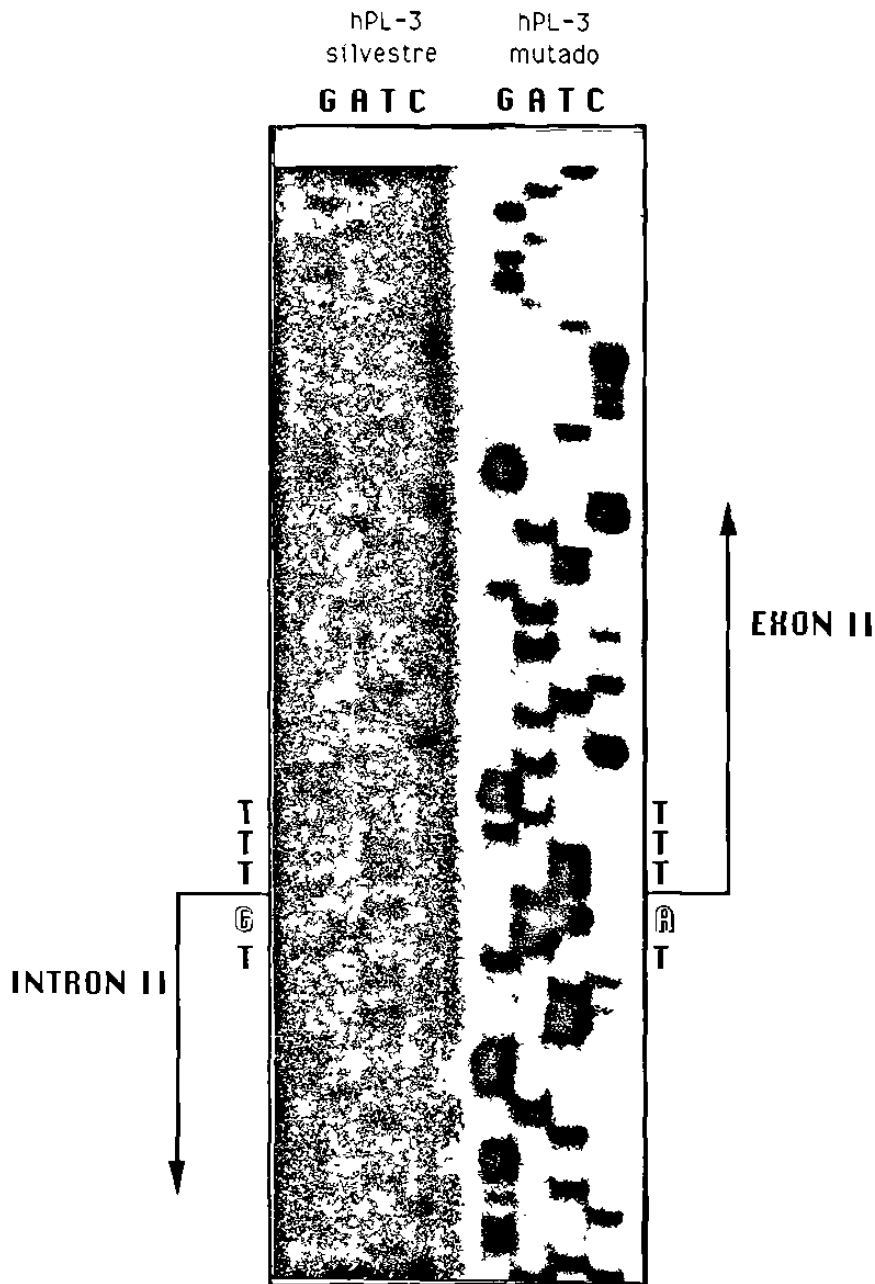


Figura 13.- VERIFICACION DEL INTERCAMBIO DE LA MUTACION POR SECUENCIAMIENTO DE NUCLEOTIDOS EN LA UNION EXON II- INTRON II.

Se muestra una porción del gel de secuenciamiento donde se comprueba que el gen hPL-3 mutado posee una adenina (A) en lugar de guanina (G) al inicio del intrón II. La parte correspondiente a la secuencia del gen hPL-3 silvestre fué sobreexpuesta para demostrar las bandas con claridad. Resultados similares se obtuvieron para el gen hPL-1 (datos no mostrados).

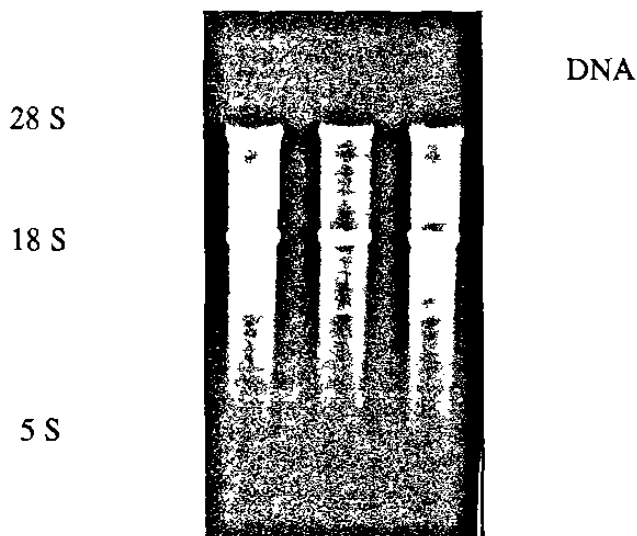


Figura 14.- VERIFICACION DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

Gel de agarosa urea ácido al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio que muestra el RNA separado para verificar su integridad. Se observan las bandas características de los RNA 28, 18 y 5 S. El aspecto es típico de RNA no degradado. Se observa una pequeña cantidad de DNA contaminante en la parte superior de los carriles.

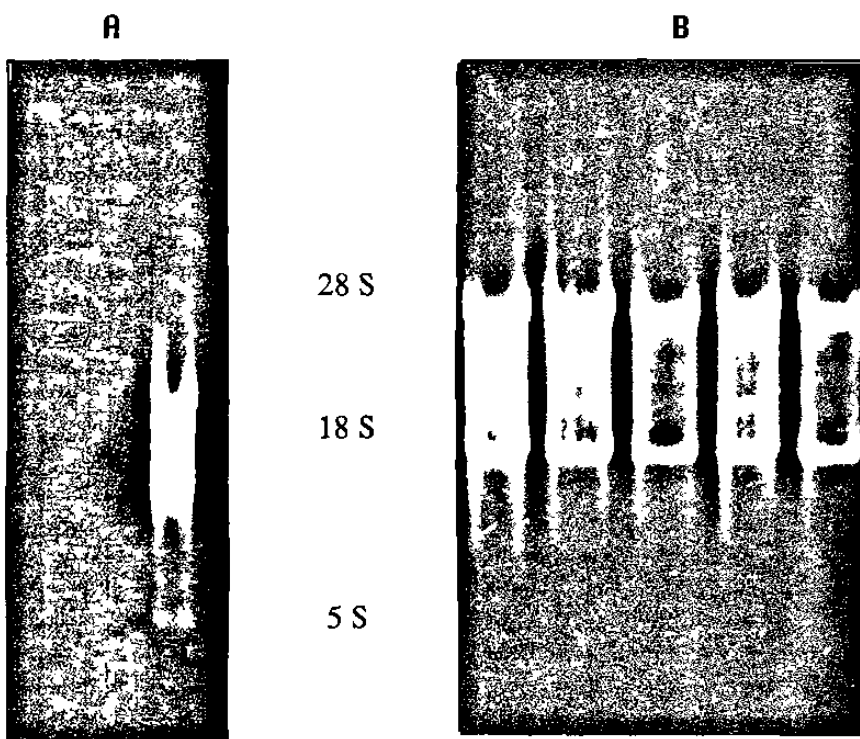


Figura 15.- VERIFICACION DE LA EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA

Geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio para mostrar el RNA glioxilado antes (A) y después (B) de la transferencia. Se observa la presencia de las características bandas 28 y 18 S, en ambas fotografías. La banda 5 S y la fluorescencia por debajo de la banda 18 S se observan solamente antes de la transferencia, lo que indica que la transferencia en esta región del gel fué eficiente.

Marcaje radiactivo de phPL815 por el método de movimiento de la muesca:

Abajo se muestran los datos que obtuvimos del contador de centelleo líquido:

Fracción #	cpm
1	24
2	22
3	34
4	1162449
5	18428
6	5642
7	30837
8	208144

Hibridización y autorradiografía

Después de obtener la sonda radiactiva, procedimos a hibridizarla con el RNA que habíamos transferido a la membrana de nitrocelulosa. Al revelar la película (Figura 16), observamos que el único RNA que dió señal positiva, fué el de placenta humana (generosamente donado por el Q.F.B. Diego Enrique Rincón Limas). Este testigo indicó que la técnica desde la electroforesis con glioxal hasta la autorradiografía se llevó a cabo correcta y eficientemente.

Surge el primer problema

Ninguno de los RNAs provenientes de las transfecciones dió señal, aún después de exponer la película al filtro por largos períodos de tiempo. Por lo tanto el problema ocurrió antes de, o durante la transfección. El resultado anterior podía explicarse de dos maneras: 1) el DNA de los plásmidos nunca entró a las células debido a un procedimiento técnico ineficiente, o 2) el DNA de los genes no estaba siendo transcrito o lo estaba siendo a niveles por abajo de nuestro límite de sensibilidad, debido a requerimientos de su promotor en cuanto a especificidad de tejido. Para eliminar la primera posibilidad realizamos otra transfección, esta vez usando un testigo del procedimiento. Para tal propósito cotransfectamos los plásmidos recombinantes con pSV2CAT. Esto nos permitió saber, mediante un ensayo enzimático a un extracto de células transfectadas, que la técnica de transfección era eficiente (Figura 17). Sin embargo, cuando repetimos la extracción de RNA, electroforesis, transferencia e hibridización, los resultados permanecieron negativos. Por lo tanto, la información genética de los plásmidos estaba siendo introducida pero no expresada a un nivel detectable.

Hicimos la transfección en células COS-7, pero observamos resultados similares a los que obtuvimos cuando hicimos la transfección en células HeLa (datos no mostrados). Por lo tanto, decidimos cambiar el promotor de nuestros genes por otro de potencia reconocida y que fuera activo en células COS-7.

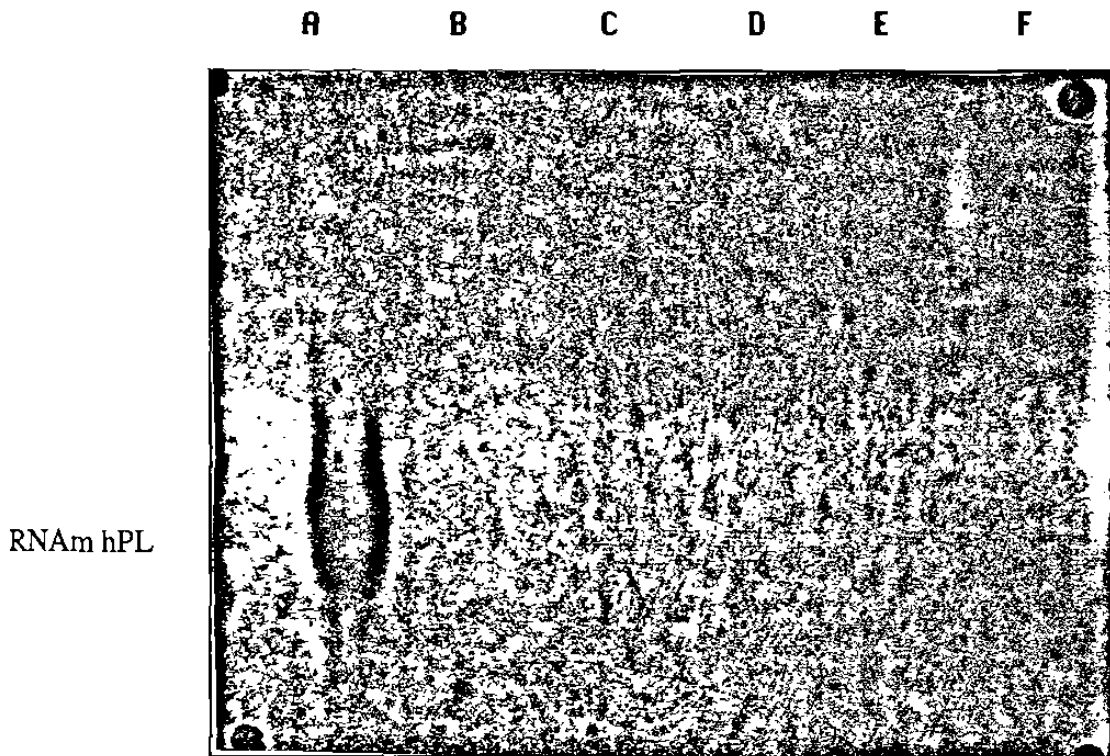


Figura 16.- ANALISIS DE TIPO "NORTHERN" DE LOS RNA_m DE LOS GENES hPL. Autorradiografía que muestra en el carril (A) la señal proporcionada por el testigo positivo (RNA total de placenta humana), indicando que no hubo ningún problema técnico después de la transfección. En los demás carriles no se observa señal, aún con largos períodos de exposición. Las muestras de los carriles B a F corresponden a RNA de transfecciones con los diferentes genes hPL.

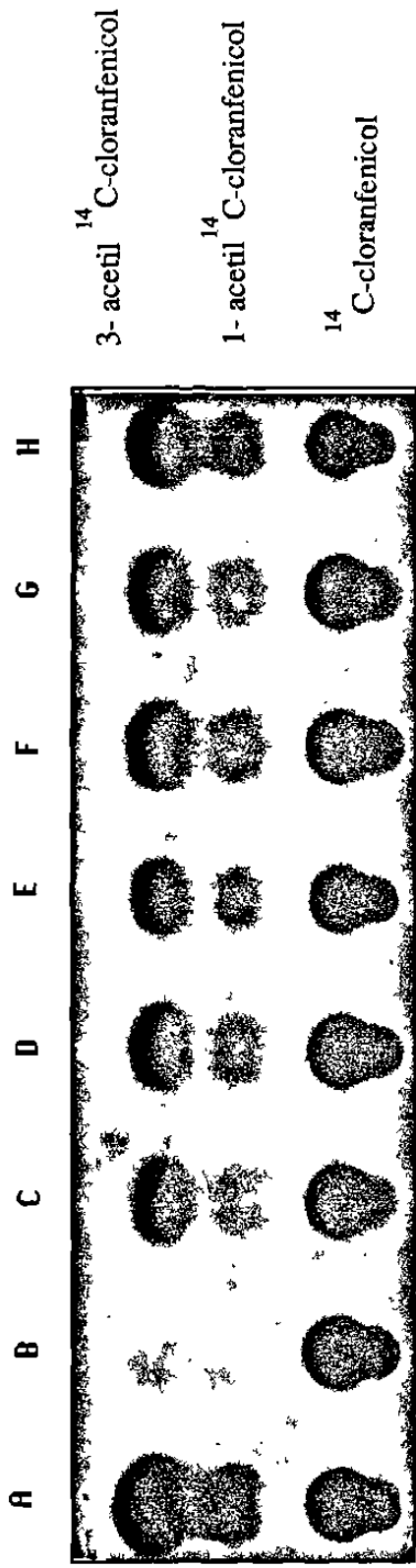


Figura 17.- ENSAYO DE CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA

Cotransfectamos cada uno de los plásmidos con pSV2CAT. Después de 48 h, cosechamos las células y usamos una sexta parte para ensayar la actividad de CAT. Separamos los productos acetilados por cromatografía en capa fina y expusimos la placa a una película de rayos X. El experimento muestra que la transfección fue eficiente. Carriles: A : CAT comercial purificada de *E. coli*, B : testigo negativo (pSV2gpt), C y D : pSV2gpthPL-1silvestre, E : pSV2gpthPL-1 reparado, F : pSV2gpthPL-3 silvestre, G y H : pSV2gpthPL-3 mutado.

En la tarea de elegir el promotor apropiado, encontramos dos candidatos:

- a) promotor-amplificador del gen inmediato temprano de SV40.
- b) promotor-amplificador del gen principal inmediato temprano del citomegalovirus humano (hCMV).

Dado que poseíamos ambos promotores, comparamos su potencia usando el sistema de la cloranfenicol acetil-transferasa. Observamos que, como estaba reportado, la unidad promotor-amplificador del hCMV es mas potente que la del SV40 y por lo tanto fué la indicada para dirigir la transcripción de nuestros genes (Figura 18).

Transfección a células COS-7 y aislamiento de RNA total

Después de construir pAVE, subclonamos los genes de interés según la estrategia delineada en la sección de métodos y después de crecer los plásmidos a gran escala, los transfectamos en células COS-7 y aislamos RNA total después de permitir que la información se expresara. Los datos del aislamiento de RNA, se muestran a continuación:

Experimento con:	Abs ₂₆₀	Abs ₂₈₀	Abs _{260/280}	µg/µl
pAVEhPL-1 silvestre	0.195	0.136	1.4	0.78
pAVEhPL-1 reparado	0.084	0.069	1.2	0.34
pAVEhPL-3 silvestre	0.197	0.138	1.4	0.79
pAVEhPL-3 mutado	0.109	0.082	1.3	0.44
pSV2CAT	0.195	0.136	1.4	0.78

Después del procedimiento rutinario de revisión de la integridad por electroforesis en gel de agarosa-urea ácido, electroforesis en condiciones desnaturalizantes, transferencia y horneado, preparamos nuevamente sonda radiactiva, esta vez por la técnica de síntesis de DNA dirigida por oligonucleótidos al azar. Los datos que obtuvimos de este marcaje, se muestran a continuación:

Fracción #	cpm
1	236791
2	847347
3	146506
4	401177

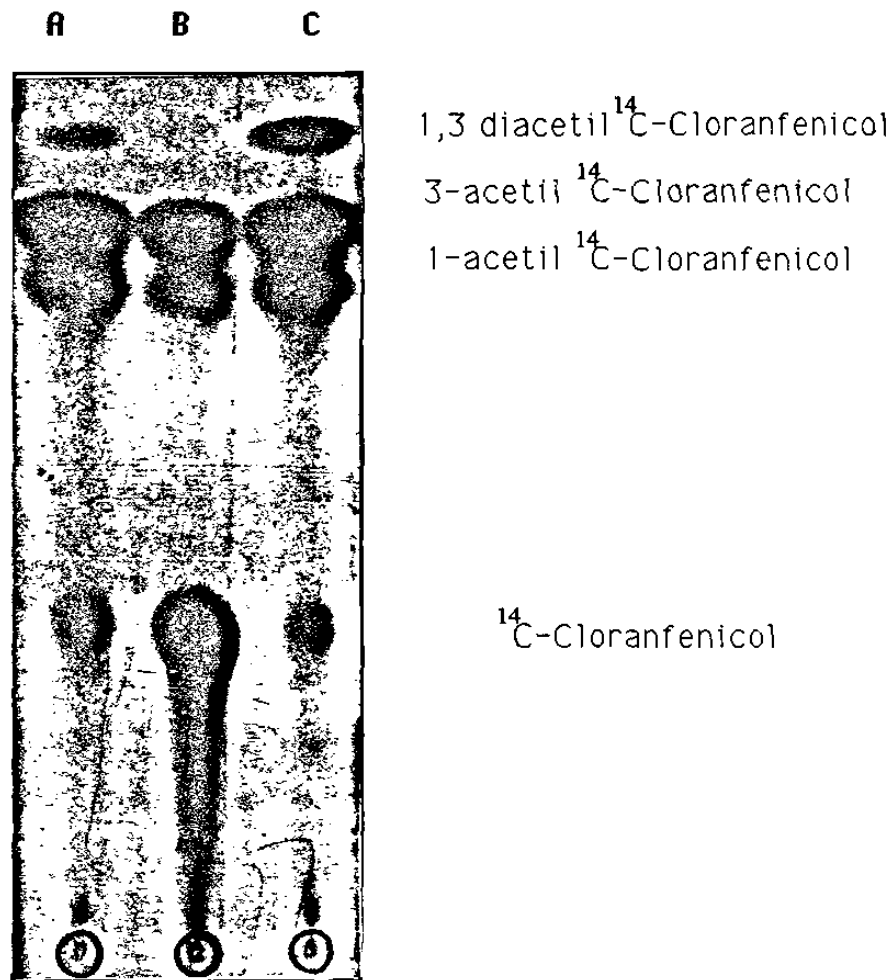


Figura 18.- COMPARACION DE LA EFICIENCIA DE TRANSCRIPCION ENTRE LAS UNIDADES PROMOTOR-POTENCIADOR DE pSV2CAT Y pSCMVCAT

Transfectamos los plásmidos pSV2CAT (Carril B) y pCMVCAT (Carril C), en células COS-7 en condiciones semejantes y al mismo tiempo. La fotografía muestra que pCMVCAT produce una mayor cantidad de acetilación y por ende una mayor cantidad de CAT que pSV2CAT. El carril A muestra el testigo positivo usando CAT comercial purificada a partir de E. coli.

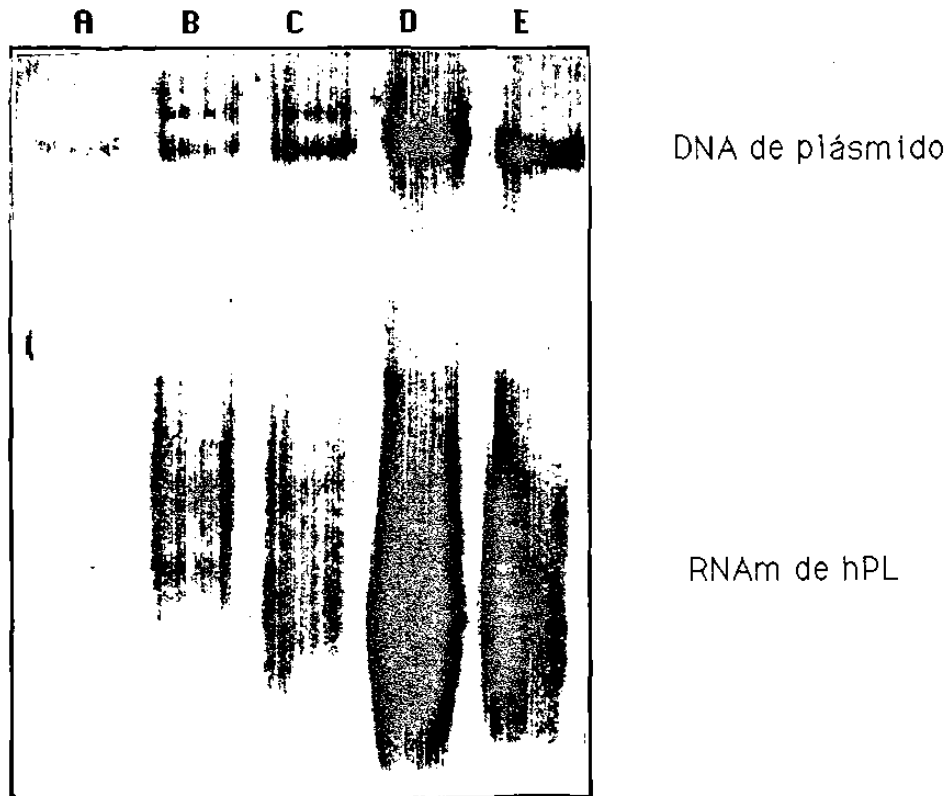


Figura 19.- ANALISIS TIPO "NORTHERN" DEL RNA DE LAS CELULAS COS-7 TRANSFECTADAS CON LOS GENES hPL SUBCLONADOS EN pAUE

Los carriles muestran RNA proveniente de las transfecciones con: A.- pSV2gpt (testigo negativo), B.- pSV2gpthPL-1 silvestre, C.- pSV2gpthPL-1 reparado, D.- pSV2gpt hPL-3 silvestre y E.- pSV2gpthPL-3 mutado. El RNAm del gen hPL-3 da una señal muy intensa, pero con un tiempo de exposición menor provee un indicador del tamaño normal de los transcritos. En el carril del hPL-1 silvestre, no se observa nada a esta altura, pero en el carril del gen hPL-1 reparado, una banda empieza a aparecer. El gen hPL-3 mutado parece haber disminuido en su capacidad de sintetizar transcritos, pero no al mismo grado que el hPL-1 silvestre.

Hibridización y autorradiografía

Después de seguir el procedimiento de rutina de hibridización y lavados, revelamos la película (Figura 19), y observamos que el gen hPL-3 silvestre (testigo positivo) dió una señal intensa. La forma de delimitar la altura a la que se encontraba la banda fué revelar una película con un tiempo muy corto de exposición (1 hora) y volver a exponer para delimitar las posiciones de las demás bandas. El RNA procedente de la transfección con el gen hPL-3 mutado también dió una señal fuerte, pero menor que la del hPL-3 silvestre. Estas observaciones son consistentes con otras previas, cuando hicimos una transfección piloto con los genes hPL-3 silvestre y mutado. En el carril del RNA de la transfección con el gen hPL-1 silvestre, observamos varias bandas, pero ninguna a la altura de la del RNAm del gen hPL-3. En el carril del gen hPL-1 reparado, fué posible distinguir la presencia de una banda a la altura del RNA mensajero de hPL-3, que sin embargo no tiene la misma intensidad que el control positivo.

DISCUSION

Las técnicas modernas de ingeniería genética nos permitieron analizar la expresión de los genes hPL a nivel de los RNA mensajeros y observar el efecto de la mutación G - A al inicio del intrón II del gen hPL-1 sobre su expresión. En nuestro primer enfoque, introdujimos los genes hPL-1 silvestre, hPL-1 reparado, hPL-3 silvestre y hPL-3 mutado dirigidos por sus promotores naturales en células HeLa, aislamos el RNA total y buscamos la presencia de transcritos de los genes introducidos. No detectamos señal. El hecho de que el RNA de placenta humana dió señal positiva eliminó la posibilidad de un problema técnico a partir de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes con glioxal, que fué cuando empezamos a usar este testigo. Por lo tanto, existía la posibilidad de que la transfección había sido ineficiente. Para investigar esto, hicimos otra transfección, pero esta vez usando un testigo del procedimiento. Este testigo consistió en cotransfectar nuestros genes con el plásmido pSV2CAT y probar la actividad de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa en los extractos de las células transfectadas. Este procedimiento tiene su racional en que las células de mamífero no poseen actividad enzimática de CAT, por lo tanto la presencia de esta enzima en los extractos indica que la información de pSV2CAT entró a las células y fué expresada₍₆₁₎. Con estos experimentos demostramos que el procedimiento técnico de la transfección se llevó a cabo correctamente, sin embargo, cuando buscamos los transcritos de nuestros genes no los detectamos. Todo el procedimiento técnico fué eficiente y por lo tanto la imposibilidad de detectar los transcritos debe haberse originado en la incapacidad misma de los genes para producir RNA mensajero en cantidades que pudiéramos detectar.

Después tratamos de incrementar el número de transcritos incrementando la cantidad de DNA molde. Para hacer esto, usamos células COS-7₍₆₂₎, pero ni aún así detectamos los RNA mensajeros. Esto pudo deberse a que los genes definitivamente no se expresaron o a que los plásmidos no se replicaron por efecto de las llamadas "secuencias venenosas" presentes en ellos₍₆₇₎.

En las construcciones originales los genes hPL estaban bajo la dirección de sus promotores naturales. Normalmente los promotores poseen información en "cis" que interactúa con proteínas para permitir y/o aumentar la transcripción. Dichas proteínas (factores en "trans")₍₆₈₎, determinan la especificidad de tejido de la expresión del gen. Los genes hPL son expresados en la placenta humana y por lo tanto es probable que en otro tipo celular no haya los factores necesarios para su transcripción, o existan factores inhibitorios de la misma, ya que se ha mostrado que en eucariotes superiores la regulación de la expresión génica puede ser negativa, un fenómeno llamado extinción₍₆₉₎.

Nuestro plan entonces fué cambiar las regiones de los genes que dictan la especificidad de tejido, es decir los promotores. Existían disponibles dos diferentes promotores para sustituir a los naturales. Un promotor del SV40 y el otro del hCMV. Hicimos una prueba de la potencia de ambos y determinamos que el hCMV es más fuerte que el de SV40, como se había descrito₍₆₃₎. Habiendo determinado que el promotor de hCMV era más potente, construimos un nuevo vector llamado pAVE. En este vector, pusimos un fragmento de múltiples sitios de clonación proveniente de pUC19 que nos permitió subclonar los genes hPL para ponerlos bajo la influencia del promotor de hCMV.

Posteriormente, repetimos el procedimiento de introducción del DNA a células COS-7, esta vez con los genes hPL bajo la dirección del promotor de hCMV y ahora sí detectamos la señal. Estos resultados sugieren que efectivamente un factor específico de tejido que permite la expresión de los genes hPL en placenta no se encuentra en células HeLa o COS-7. Existe también la posibilidad que un factor inhibidor que no se encuentra en placenta exista en las células que utilizamos por la razón que mencionamos antes.

Como puede observarse de los resultados obtenidos por el análisis de los RNAs mensajeros, la mutación G - A en el sitio donador del procesamiento posee un efecto que es eliminado, al menos parcialmente cuando el fragmento mutado del gen hPL-1 es sustituido por el normal del gen hPL-3. Estos resultados están en concordancia con otros^(13,14,15,16), en cuanto a que una transición de este tipo, en esta posición del gen, conduce a la inactivación de la expresión del mismo.

Otros investigadores⁽⁴⁴⁾ han mostrado, en experimentos con mutagénesis dirigida sobre varias de las posiciones individuales en las uniones exón-intrón del segundo intrón de β -globina, que una mutación del tipo de la que afecta al gen hPL-1 provoca el uso de sitios crípticos de "splicing" *in vivo*. El empleo de estos sitios conduce a la síntesis de un RNAm aberrante que puede ser inestable o produce una proteína mutada si es traducido por los ribosomas. Recientemente se han encontrado RNAm aberrantes para el gen hPL-1 en bancos de DNAc a RNAm de placenta a término, usando como sonda oligonucleótidos específicos para este gen⁽⁴⁸⁾. La proteína no ha sido identificada aún.

El significado biológico que la hormona lactogénica placentaria tenga en la fisiología del embarazo es una área de polémica en la que existen varios hechos interesantes por mencionar. Se han informado varios casos clínicos de ausencia de hPL inmunorreactiva, en los cuales el embarazo ha transcurrido de manera normal. En uno de estos casos⁽³⁰⁾, una paciente presentó ausencia total de hPL inmunorreactiva, y el embarazo, el parto y el producto fueron normales. Cuando se analizó al nivel molecular el complejo génico hormona de crecimiento-lactógeno placentario, se detectó una delección de 35 kb de los genes hPL-4, hGH-V y hPL-3⁽⁷⁰⁾. Los únicos genes que quedaron intactos fueron hGH-N y hPL-1. Originalmente, como mencionamos, se reportó ausencia total de hPL, luego se reportó el hallazgo de una forma atípica de hPL en el mismo tejido usando otros anticuerpos⁽⁷¹⁾. Los únicos genes que pudieron dar origen a esta proteína son hGH-N y hPL-1. Esta proteína no era hGH, lo que permite especular si es el producto correspondiente a alguno de los RNAm aberrantes que mencionamos anteriormente. Existe sin embargo la posibilidad de que fuera el producto de un gen rearrreglado por recombinación entre diferentes miembros del grupo.

El dogma biológico general impide pensar que el lactógeno placentario no posea una función sujeta a presión de selección natural. La conservación de las secuencias nucleotídicas entre hPL-3 y hPL-4 no estarían justificadas sin selección natural. Sin embargo las deficiencias, al menos aparentes, de hPL no conducen a ninguna modificación del embarazo o de la salud del feto. La única manera de conciliar estos hechos es que la hormona lactogénica tuvo una función que ha dejado de ser necesaria, o que existe otro factor que la puede llevar a cabo. De ser cierta la última posibilidad, el producto potencial de hPL-1 sería un candidato de tal proteína. Si, sin embargo, hPL-1 no posee ninguna función le clasificaríamos como un pseudogen que es transcripcionalmente activo. La existencia de pseudogenes transcripcionalmente activos han sido reportada⁽⁷²⁾.

En cuanto al sistema de expresión usado para la expresión transitoria de nuestros genes, empezamos utilizando los promotores naturales de los genes en células HeLa, pero no detectamos la señal de los RNAs mensajeros. Por este tiempo se reportó⁽⁶³⁾ que la unidad amplificador-promotor del gen principal inmediato temprano del citomegalovirus humano (hCMV) es muy eficiente para dirigir la transcripción de genes heterólogos en varias líneas celulares. Después de conseguirlo, lo comparamos con el del virus SV40 y corroboramos su mayor potencia. Construimos un nuevo vector, pAVE, deletando la información para la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) y las señales de "splicing" y poliadenilación de SV40 e insertando en su lugar el fragmento de sitios múltiples de clonación (FSMC) proveniente de pUC 19.

Este nuevo vector posee las siguientes características: a) un origen de replicación bacteriano que permite su amplificación en bacterias, b) un gen de β -lactamasa que proporciona resistencia a ampicilina y facilita por lo tanto la selección de las clonas portadoras, c) la unidad promotor-amplificador de hCMV para dirigir la transcripción eficiente de genes clonados, y d) el FSMC que proporciona varios sitios de restricción únicos en una posición que permite la influencia del promotor sobre los genes clonados.

En este vector, la transcripción empieza en el sitio de iniciación del gen de hCMV, continúa a través del FSMC y luego dentro del gen clonado, en nuestro caso, los genes hPL. El RNA formado a partir del segmento de hCMV no posee ningún sitio de iniciación de la traducción (ATG), pero el FSMC posee un sitio SphI que es único y porta una secuencia ATG, la cual podría señalar el inicio de la traducción. En pAVE no debe interferir con la expresión de los genes clonados, de acuerdo con los trabajos de Kozak⁽⁷³⁾ que señalan el requerimiento de una secuencia modelo alrededor del ATG para que el ribosoma lo reconozca como el verdadero sitio de iniciación. El ATG de nuestro vector no posee ningún nucleótido igual a los de esta secuencia modelo. Por lo tanto pAVE debe ser capaz de expresar proteínas a partir de genes clonados.

Verificamos la capacidad de estos vectores para dirigir la expresión de genes clonados mediante la detección de RNA mensajeros específicos y resultaron ser efectivos. Actualmente pAVE constituye el prototipo a partir del cual se están creando nuevos vectores de la misma serie.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como resultado de este trabajo concluimos que:

- 1.- La mutación presente en el sitio donador del procesamiento del intrón II del gen hPL-1 no permite la formación de un RNA mensajero típico de los genes hPL, ejemplificados por el gen hPL-3.
- 2.- Deben existir requerimientos específicos de tejido que en su ausencia ocasionan que los promotores de los genes hPL no sean capaces de dirigir eficientemente la transcripción in vivo cuando son transfectados en células HeLa o COS-7. Aunque menos probable, no podemos descartar la posibilidad de que existan factores inhibitorios de la expresión de hPL en células HeLa o COS-7.
- 3.- El vector pAVE dirige eficientemente la transcripción de genes clonados en su versátil FSMC, a juzgar por los RNA detectados en el ensayo de tipo "northern".

La naturaleza exacta del cambio causado por la mutación no puede ser dilucidada mediante las técnicas que empleamos en esta tesis. Un ensayo cuantitativo con nucleasa S₁(⁷³), o con RNasa A(⁷⁴), es la metodología adecuada para detectar a un nivel mas fino el defecto exacto durante el procesamiento del RNA.

De la función biológica de la hormona lactogénica placentaria, podremos discutir con mas datos cuando se caracterice la proteína semejante a hPL que existe en el caso que se mencionó anteriormente(³⁰). También el estudio de la proteína que se generará del gen hPL-1 reparado creado en este trabajo aportará nuevos datos para evaluar el significado biológico de una hormona que llega a sintetizarse a la extraordinaria velocidad de 1 gramo por día, el lactógeno placentario.

REFERENCIAS

- 1.- Watson, J.D. et. al. (1987) Molecular Biology of the Gene. Volume I 4th Edition The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. pp. 222
- 2.- Darnell, J. et. al. (1986) Molecular Cell Biology. Scientific American Books, Inc. pp. 267-367
- 3.- Stryer, L. (1988) Biochemistry 3rd Edition W.H. Freeman and Company New York pp. 650-728
- 4.- Padgett, R.A. et. al. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. Ann. Rev. Biochem. 55: 1119-1150
- 5.- Sharp, P.A. (1987) Splicing of messenger RNA precursors. Science 235: 766-771.
- 6.- Crick, F. (1979) Split genes and RNA splicing. Science 204: 264-271.
- 7.- Breathnach, R. y Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50:349-383.
- 8.- Rautmann, G. y Breathnach, R. (1985) A role for branchpoints in splicing in vivo. Nature 315: 430-432.
- 9.- Reed, R. y Maniatis, T., (1985) Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. Cell 41: 95-105.
- 10.- Konarska, M.M. et. al. (1985) Characterization of the branch site in lariat RNAs produced by splicing of mRNA precursors. Nature 313: 552-557.
- 11.- Keller, W. (1984) The RNA lariat: A new ring to the splicing of mRNA precursors. Cell 39: 423-425.
- 12.- Ruskin, B. et. al. (1984) Excision of an Intact Intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. Cell 38: 317-331.
- 13.- Baird, M. et. al. (1981) A nucleotide change at a splice junction in the human β -globin gene is associated with β -thalassemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4218-4221.
- 14.- Treisman, R. et. al. (1982) A single-base change at a splice site in a β^0 -thalassaemic gene causes abnormal RNA splicing. Cell 29: 903-911.
- 15.- Treisman, R. et. al. (1983) Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassaemia genes. Nature 302: 591-596.
- 16.- Wieringa, B. et. al. (1983) Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit β -globin gene. Nature 301: 38-43.
- 17.- Kantor, J. A. et. al. (1980) Beta Thalassemia: Mutations which affect processing of the β -globin mRNA precursor. Cell 21: 149-157.
- 18.- Beaconsfield, P. et. al. (1980) The Placenta Sci. Am. (August) pp. 80-89
- 19.- Chatterjee, M. y Munro, H.N. (1977) Structure and Biosynthesis of Human Placental Peptide Hormones. Vitamines Hormones 35: 149-208.
- 20.- Josimovich, J.B. y MacLaren, J.A. (1962) Presence in human placenta and term serum of highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. Endocrinology 71: 209-220.
- 21.- Niall, H.D., et. al. (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: Evolution from a primordial peptide by gene reduplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 866-869.

- 22.- Sciarra, J.J. et. al. (1963) Localization of anti-human growth hormone serum within the placenta: evidence for a human chorionic "growth hormone-prolactin". *Nature* 199: 1005-1006.
- 23.- Spellacy, W.N. et. al. (1967) Human placental lactogen levels as a measure of placental function. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 97: 560-561.
- 24.- Simpson, E.R. y MacDonald, P.C. (1981) Endocrine Physiology of the Placenta. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 163-188.
- 25.- Saxena, B.N. et. al. (1969) Serum placental lactogen (hPL) levels as an index of placental function. *N. Engl. J. Med.* 281: 225-231.
- 26.- Porter, D.G. (1980) Feto-maternal Relationships: The actions and the control of certain Placental Hormones. *Placenta* 1: 259-274.
- 27.- Grumbach, M.M. et. al. (1968) Chorionic growth hormone prolactin (CGP): secretion, disposition, biologic activity in man and postulated function as the "growth hormone" of the second half of pregnancy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148: 501-531.
- 28.- Waters, M.J. et. al. (1985) An examination of the proposed roles of placental lactogen in the ewe by means of antibody neutralization. *J. Endocr.* 106: 377-386.
- 29.- Hubert, C. et. al. (1983) Plasma human chorionic somatomammotropin deficiency in a normal pregnancy is the consequence of low concentration of messenger RNA coding for human chorionic somatomammotropin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147: 676-678.
- 30.- Nielsen, P.V. (1979) Absence of human placental lactogen in an otherwise uneventful pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135: 322-325.
- 31.- Cooke, N.E. et. al. (1981) Human Prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J. Biol. Chem.* 256: 4007-4016.
- 32.- Frantz, A.G. (1976) Prolactin, growth hormone and human placental lactogen. En "Peptide Hormones" Ed. J.A. Parsons University Park Pren. Baltimore, Maryland pp. 199-230.
- 33.- George, D.L. et. al. (1981) The genes for growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of human chromosome 17 in the region q21-ter. *Hum. Genet.* 57: 138-141.
- 34.- Harper, M.E. et. al. (1982) Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 227-234.
- 35.- Owerbach, D. et. al. (1981) The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* 212: 815-816.
- 36.- Barrera-Saldaña, H.A. et. al. (1982) Transcriptional products of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem.* 257: 12399-12404.
- 37.- Kidd, V.J. et. al. (1983) The human Growth hormone and placental lactogen gene complex. En "Perspectives on genes and the Molecular Biology of Cancer" Ed. D.L. Robberson y G.F. Saunders. Raven Press, pp. 143-167.
- 38.- Barrera-Saldaña, H.A. et. al. (1983) Two structurally different genes produce the same secreted placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.* 258: 3787-3793.

- 39.- Copenhaver, W.M. (1981) Tratado de Histología 17a. Edición Edit. Interamericana pp. 675-687.
- 40.- Pavlakis, G.N. et. al. (1981) Expression of two human growth hormone genes in monkey cells infected by simian virus 40 recombinants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7398-7402.
- 41.- Ellson, Y. Chen, et. al. (1989) The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology and evolution. Genomics 4, 479-497.
- 42.- Hirt, H. et. al. (1987) The human growth hormone gene locus: Structure, evolution and allelic variations. DNA 6: 59-70.
- 43.- Selvanayagam, C.S. et. al. (1984) Multiple origins of transcription for the human placental lactogen genes. J. Biol. Chem. 259: 14642-14646.
- 44.- Aebi, M. et. al. (1986) Sequence requirements for splicing of higher eucaryotic nuclear pre-mRNA. Cell 47: 555-565.
- 45.- Mulligan, R.C. y Berg, P. (1981) Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyl transferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076.
- 46.- Maniatis, T. et. al. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 149-178.
- 47.- Maxam, A.M. y W. Gilbert (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560.
- 48.- Weislander, L. (1979) A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. Anal. Biochem. 98: 305-
- 49.- Mandel, M. y Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 159-162.
- 50.- Norgard, M.V. et. al. (1978) Factors affecting the transformation of Escherichia coli strain 01776 by pBR322 plasmid DNA. Gene 3: 279-292.
- 51.- Dagert, M. y Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6: 23-28.
- 52.- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.
- 53.- Sanger, F. et. al. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- 54.- Graham, F.L. y Van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52: 456-467.
- 55.- Chirgwin, J.M. et. al. (1979) Isolation of Biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18: 5294-5299.
- 56.- Rosen, J.M. et. al. (1978) Preparation and Preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the Hen oviduct. Biochemistry 14: 69-78.
- 57.- McMaster, G.K. y Carmichael, G.G. (1977) Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4835-4838.
- 58.- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503.
- 59.- Rigby, P.W.J. et. al. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237 - 251

- 60.- Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205.
- 61.- Gorman, C. M. et. al. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2(9): 1044- 1051.
- 62.- Gluzman, Y. (1981) Sv-40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23: 175-182.
- 63.- Foecking, M. K. y Hofstetter, H. (1986) Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. Gene, 45: 101-105.
- 64.- Barnes, W.M. (1977) Plasmid detection and sizing in single colony lysates. Science 195: 393.
- 65.- Cathala, G. et. al. (1983) A new method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. DNA 2: 329-335.
- 66.- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.
- 67.- Lusky, M. y Botchan, M. (1981) Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 sequences. Nature, 293: 79-81.
- 68.- Dynan, W.S. (1989) Modularity of promoters. Cell 58: 1-4.
- 69.- Killary, A.M. y Fournier, R.E. (1984) A genetic analysis of extinction: trans-dominant loci regulate expression of liver-specific traits in hepatoma hybrid cells. Cell 38 (2): 523-534.
- 70.- Wurzel, J.M. et. al. (1982) A gene deletion is responsible for absence of human chorionic somatotropin. DNA 1: 251-257.
- 71.- Frankenne, F. et. al. (1986) a gene deletion in the hGH/hCS gene cluster could be responsible for the placental expression of hGH and/or hCS like molecules absent in normal subjects. Abstract # 388 del 68° Congreso de la Sociedad de Endocrinología. Anaheim, California. June 25-27.
- 72.- Fotaki, M. E. y Iatrou, K. (1988) Identification of a transcriptionally active pseudogene in the chorion locus of the silkworm Bombyx mori. Regional sequence conservation and biological function. J. Mol. Biol. 203(4): 849-860.
- 73.- Berget, S.M. et. al. (1978) Spliced segments at the 5' termini of adenovirus-2 late mRNA: a role for heterogeneous nuclear RNA in mammalian cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 523-529.
- 74.- Gibbs, R.A. y Caskey, C.T. (1987) Identification and localization of mutations at the Lesch-Nyhan locus by ribonuclease A cleavage. Science 236: 303-305.

FAC.
No