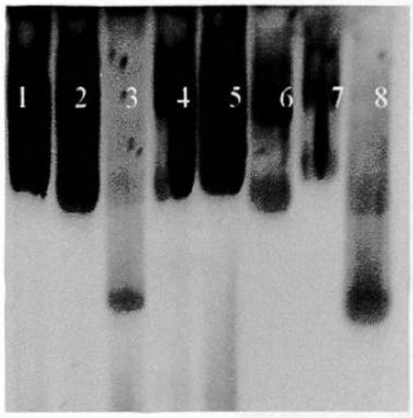
5.2 Clonación de las regiones intergénicas en vector comercial.

Una vez obtenidas las regiones intergénicas, éstas se clonaron con el kit comercial de clonación TOPO®. De las colonias que crecieron, se extrajo el ADN plasmídico para analizarlo. En la figura 15 se muestra un gel que contiene varios vectores candidatos (con retraso en la migración respecto al TOPO® original, 3.5kb) que pudieron haber recibido como inserto alguna de las regiones intergénicas.



1-2. Clonas candidatas
3. Clona sin retraso
4-7. Clonas candidatas
8. Vector TOPO® (3.5kb)

Figura 15. Clonas obtenidas a partir de las regiones intergénicas. Los plásmidos de las clonas candidatas obtenidas con el kit de clonación TOPO® se analizaron en un gel de agarosa al 0.8%. Los que pudieran contener alguna de las regiones intergénicas amplificadas presentan una migración retrasada en comparación con la del vector sin inserto.

La caracterización enzimática (ver más adelante) de estos plásmidos recombinantes, permitió determinar que el tamaño del inserto era aproximadamente de 6-7kb, es decir, correspondían a las regiones intergénicas cortas. Solamente las regiones intergénicas cortas, que son el producto amplificado mayoritario, como se ve en la figura 15, fueron clonadas en esta ocasión. A éstas clonas se les hicieron caracterizaciones posteriores para determinar su tamaño de manera más precisa y verificar si todas ellas correspondían al mismo inserto.

5.2.1. Caracterización de la región intergénica corta tipo I.

El inserto de las clonas candidatas fue amplificado con IGPIV-Prim. Se obtuvieron productos amplificados de un tamaño semejante en todos los casos. Estos productos fueron caracterizados con las enzimas *Pst*I, *Eco*RV, *Xba*I y *Sma*I (figura 16). La caracterización arrojó el mismo resultado para todas las clonas, por lo tanto un solo inserto se había

clonado. Este inserto se denominó región intergénica corta tipo I y su vector correspondiente, IntC1ch.

El producto amplificado con IGPIV-Prim, que además de la región intergénica incluye unos 900pb de los genes flanqueantes, mide unos 6900pb, a juzgar por los fragmentos que arrojaron las distintas digestiones con las enzimas de restricción: *Pst*I (2800, 2800, 800pb), *Eco*RV (6400, 500pb), *Xba*I (2500, 2100, 1500, 800) y *Sma*I (3900, 3000pb), (figura 16).

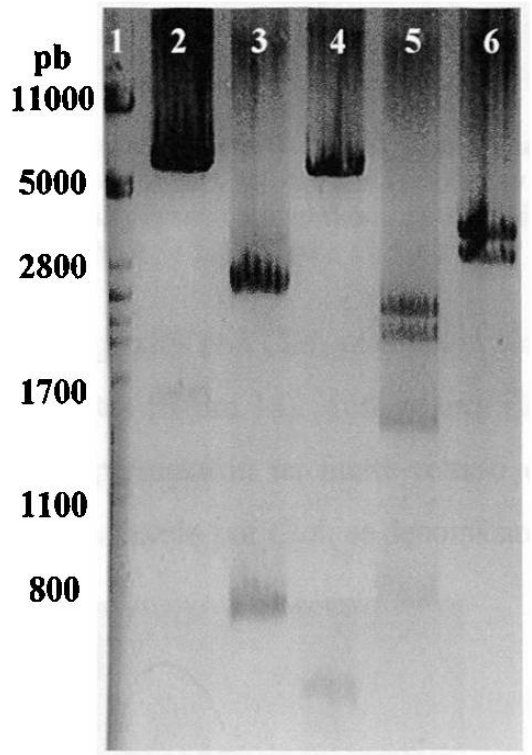


Figura 16. Caracterización de la región intergénica corta I. Se muestra el producto amplificado IGPIV-Prim de las clonas tipo I, de unos 6900pb (carril 2) y las digestiones de éste con las enzimas *Pst*I (carril 3), *Eco*RV (carril 4), *Xba*I (carril 5) y *Sma*I (carril 6). Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%. El marcador de peso molecular fue λ + *Pst*I (carril 1).

5.2.2 Caracterización y clonación de la región intergénica corta tipo II.

Como ya se mencionó, entre las regiones intergénicas amplificadas, las dos más cortas se encontraban en mayor proporción. Se encontró que la enzima *Cla*I cortaba la región intergénica de las clonas tipo I (figura 17). Por tanto, se sometieron a digestión las regiones amplificadas a partir de ADN genómico (se distinguen las dos principales) y se observó que una de ellas no cortaba con esta enzima.

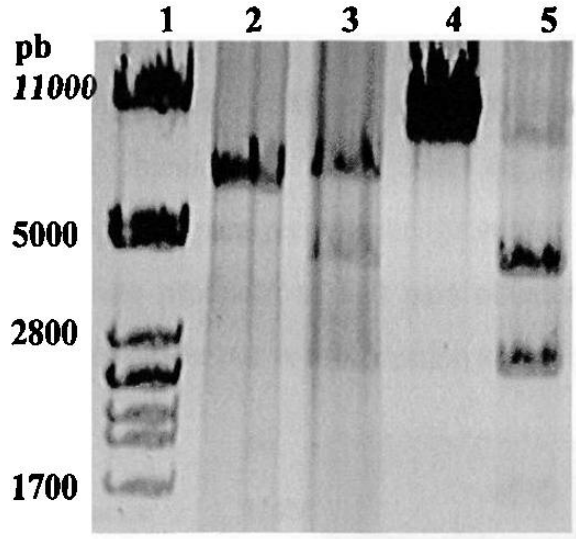


Figura 17. Caracterización de la intergénica corta tipo II. Las regiones intergénicas amplificadas con IGPIV-Prim se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% antes (carril 2) y después (carril 3) de ser digeridas con la enzima *Cla*I (carril 3). El mismo producto amplificado correspondiente a la clona IntC1ch se utilizó como control antes (carril 4) y después de su digestión con *Cla*I (carril 5).

Los productos amplificados, digeridos con *Cla*I, se clonaron en TOPO®, y se seleccionaron nuevamente las clonas candidatas (figura 18). Aunque esta clonación no fue tan eficiente, se obtuvieron plásmidos que presentaron un fuerte retraso en su migración. Las clonas candidatas, cuyo inserto no fue cortado por *Cla*I, se denominaron IntC2ch.

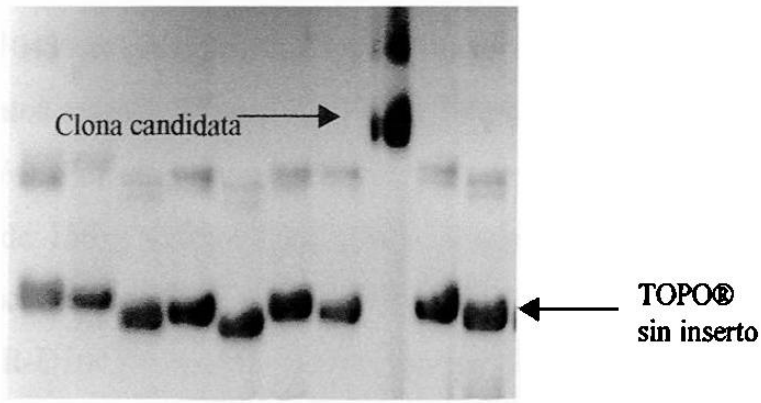


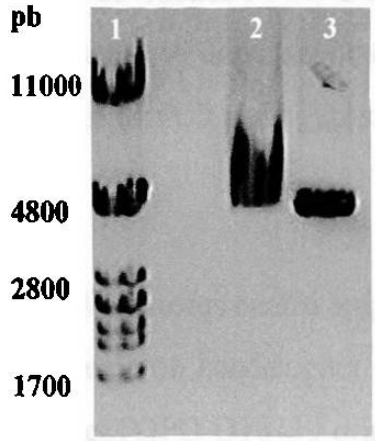
Figura 18. Intergénica tipo II clonada en TOPO®. La selección de las clonas se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de sus plásmidos. En la figura se señalan la clona candidata de la región intergénica tipo II y el vector TOPO® original (3.5kb).

5.3 Clonación por recombinación homóloga en TOPO®.

Al observar que por medio del vector comercial sólo se habían clonado las regiones intergénicas cortas, se construyó un vector que permitiera clonar las regiones restantes por medio de recombinación homóloga.

5.3.1 Obtención del vector para recombinación homóloga (TOPO®).

Se amplificó con los iniciadores D10 y 430 uno de los vectores obtenidos con la clonación de las regiones intergénicas, obteniéndose un producto de 4430pb, conteniendo al vector TOPO en el centro y las regiones para recombinar (promotor y parte final del gen) en los extremos (ver figura 19). Este producto se ligó para obtener el plásmido vectrecTOPO-D10430, que se utilizaría para clonar por recombinación a las regiones intergénicas.



1. Marcador λ + *Pst*I
2. Ligación de carril 3
3. P. Amplificado D10-430 (4430pb) a partir de una clona de la región intergénica corta

Figura 19. Amplificación y ligación para obtener el vector para recombinación. La figura muestra la amplificación de una clona conteniendo una región intergénica con D10-430 y la posterior ligación del producto amplificado, para formar el plásmido vectrecTOPO-D10430, resuelto en un gel de agarosa al 0.8%.

5.3.2 Subclonación en vector pBR.

El vectrecTOPO-D10430 original poseía 4330pb (figura 13) y al ser digerido con *Hind*III y *Eco*RV, los fragmentos resultantes tendrían 3440 y 990pb (este último contiene las regiones homólogas de interés). Por su parte el pBR original, de 4361pb, tras la misma digestión, genera fragmentos de 156 y 4205pb (este último contiene los genes de bajo número de copias y de resistencia a ampicilina, y es el de interés). Al ligar los fragmentos el vector esperado (vecrecpBR-D10430) tendría 5195pb, en vez de 4361pb del pBR original. En la fig. 20 se muestran clonas candidatas comparadas con un vector pBR original.

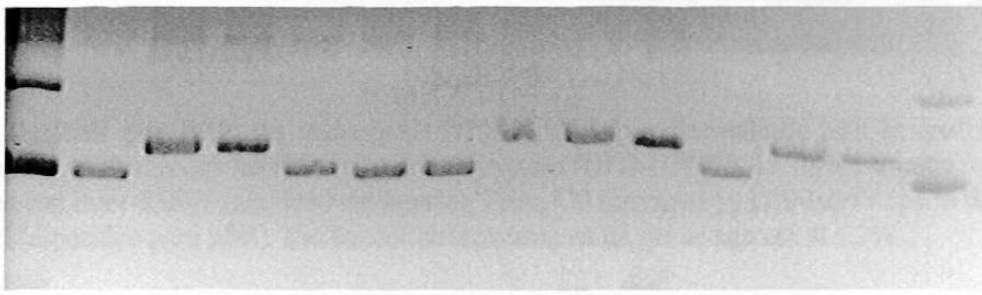


Figura 20. Subclonación del vector para la recombinación en un vector pBR. La figura muestra un plásmido pBR 322 (4361pb) y algunas de las clonas candidatas, cuyo tamaño esperado es de 5195pb. Las bandas se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%.

Los vectores de las clonas candidatas fueron amplificados por PCR para verificar el éxito de la subclonación. Se utilizaron cuatro juegos de iniciadores, esperando obtener, respectivamente sus productos amplificados: para Prim-IGPIV un producto de 900pb, para Prim-430, uno de 375pb, para D10-IGPIV, uno de 550pb, y para PcxI-B314, un producto de 1160pb.

El juego de iniciadores PcxI-B314 sólo se alinea sobre el vector pBR, por tanto, este producto no se debería obtener en el caso de vectrecTOPO-D10430 original, pero sí en vectrecpBR-D10430, y los otros tres productos se deberían obtener en ambos casos. Así podríamos asegurar, la obtención por medio de PCR del vectrecpBR-D10430 subclonado de la manera correcta.

En la figura 21 se puede observar el resultado de estas cuatro amplificaciones para el vector en TOPO y el subclonado en pBR. Se obtuvieron bandas para todos los productos en el caso del vecrecpBR-D10430, y para el vecrecTOPO-D10430 original se observa que no se obtuvo la banda de 1160pb (B314-PcxI) propia del vector pBR, como se esperaba, comprobando la correcta subclonación del vecrecpBR-D10430.

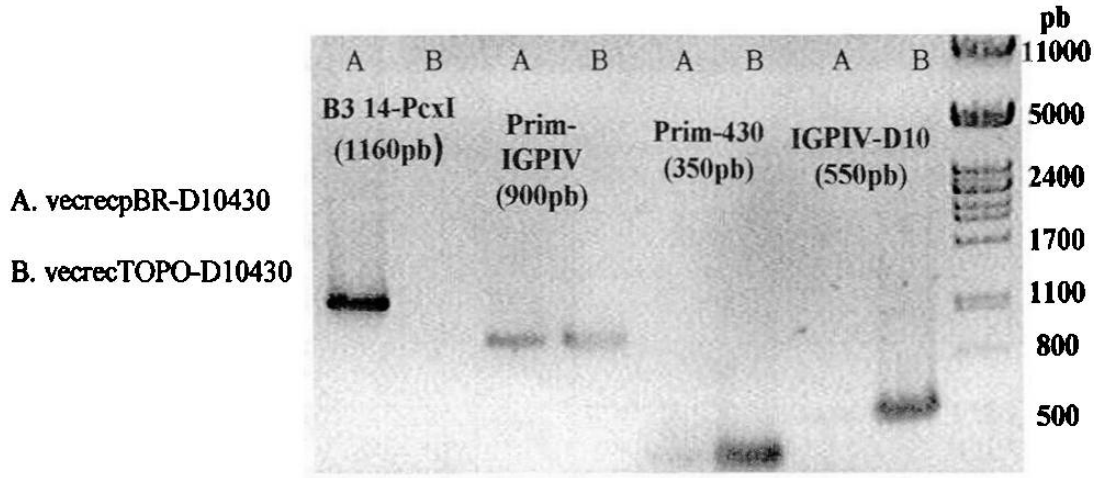


Figura 21. Análisis por PCR del vecrecpBR-D10430. El vector derivado de pBR se analizó por PCR comparando los resultados con los del vector original vecrecTOPO-D10430. La figura muestra los productos amplificados con Prim-IGPIV (totalidad del inserto), Prim-430 (promotor) y D10-IGPIV (parte final del gen) y B314-PcxI (específico para pBR). Las bandas se separaron en un gel de agarosa al 1.2%.

5.3.3 Condiciones de la transformación de bacterias BJ5183 calcio-competentes.

Se determinó que la densidad óptica para la transformación de las bacterias BJ5183 es óptima en el rango de 0.3-0.4. En el caso de bacterias XL1-blue, esta densidad ya había sido previamente determinada entre 0.4 y 0.5.

Tras comprobar la correcta construcción del plásmido vectrecpBR-D10430, se hicieron algunos ensayos para llevar a cabo la recombinación de este vector con las regiones intergénicas. Los ensayos de transformación con diferentes cantidades de ADN (relación molar vector: inserto constante) y con una misma cantidad de vector (variando la cantidad de inserto) arrojaron los datos que se observan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Transformación de bacterias recombinantes variando la cantidad de ADN.

ADN Total	Vector	Reg. Intergénica	Colonias
350ng	100ng	250ng	31
35ng	10ng	25ng	8
3.5ng	1ng	2.5ng	0

Tabla 9. Transformación de bacterias BJ5183 variando la relación molar inserto:vector.

Relación Molar V:I	Vector	Reg. Intergénica	Colonias
1:0	100ng	0ng	7
1:1	100ng	125ng	29
1:2	100ng	250ng	14
1:5	100ng	625ng	41
0:1	0ng	100ng	0

Por los ensayos, se puede observar que hay recombinación del vector sobre sí mismo (7 colonias en el caso de 100ng de vector solo) y que la región intergénica no puede formar colonias, como era de esperarse.

Sin embargo, observamos que el segundo ensayo no dio resultados consistentes, el número de colonias no fue proporcional a la relación vector: inserto. En el caso del primer ensayo en el que conservamos la relación molar vector: inserto constante, el número de colonias obtenidas sí fue proporcional a la cantidad de ADN. Se analizaron las colonias transformadas a partir de 350ng de ADN, con 1 mol de vector por 2 moles de región intergénica para evaluar la recombinación.

5.3.4 Verificación de la recombinación por medio del vector desarrollado.

Para verificar la recombinación, se amplificaron los plásmidos de estas clonas con 5Ed2-Prim, que amplifica el promotor de 1100pb. El resultado de estas amplificaciones se muestra en la figura 22. Los controles positivos generaron bandas de 1100pb (clona de región intergénica) y de 1300pb (pBShPL3-enh), se sabía que ambas clonas contienen este promotor. El vector para recombinar original no amplificó (control negativo), pues no contiene al promotor de 1100pb completo. En el caso de las clonas candidatas, un 75% de las mismas amplificaron la banda esperada de 1100pb, es decir se generó el promotor completo por recombinación entre el vector (Prim) y la región intergénica (5Ed2), lo que nos indica que hubo una buena eficiencia en la recombinación homóloga.

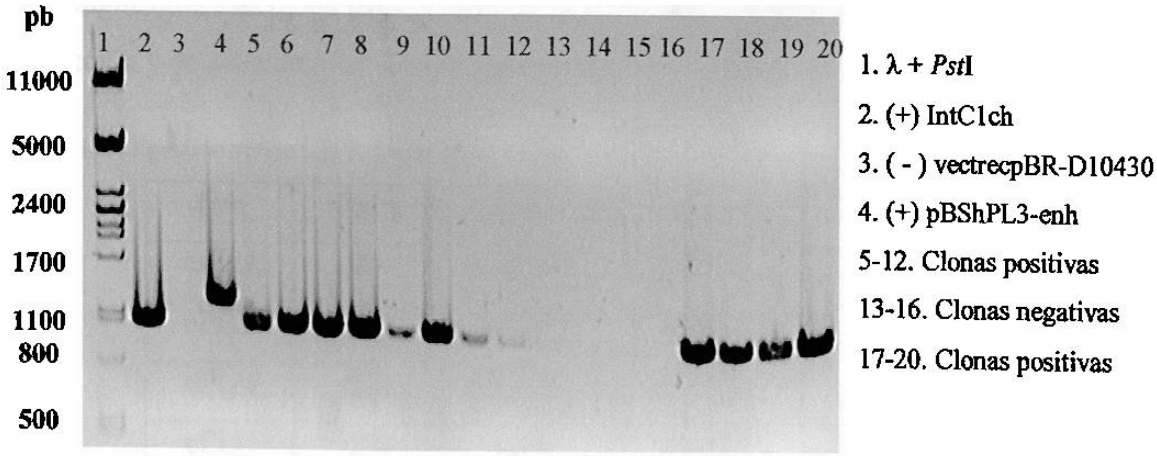


Figura 22. Verificación de la recombinación por medio de PCR. Se muestra la amplificación con 5Ed2-Prim, de las clonas (5-20) obtenidas por recombinación. También se muestran el control negativo y los controles positivos usados en el experimento. El producto amplificado de 1100pb se obtiene únicamente cuando se genera el promotor completo por recombinación.

5.4 Caracterización de la región promotora y la región final del gen en las clonas.

Una vez obtenidos los dos tipos de clonas que contienen las regiones intergénicas cortas tipo I y II, se amplificaron y caracterizaron tanto la región final de los genes que anteceden, como los promotores proximales de los genes que siguen a estas dos regiones, para comprobar que se tenían dos tipos de clonas y además para conocer la identidad de estos dos genes.

En la tabla 10 se enlistan los fragmentos esperados (pb), para la digestión del promotor, según la secuencia reportada de los genes del chimpancé, de acuerdo a la enzima utilizada.

Tabla 10. Digestión virtual del promotor proximal de los genes del chimpancé.

Gen	*Ban*I	*Bgl*I	*Bst*NI	*Mnl*I
cGHN	302/72	325/49	181/125/68	165/69/45/26
cGHV	299/75	322/51	184/72/54/34	72/54/44/37/26
cPLC	300/75	375	182/125/68	165/114/77/26
cPLD	375	375	181/126/68	166/114/61/26
cPLB	302/72	325/49	181/125/34	132/69/45/33/21
cPLA	303/75	326/42	241/68/60	166/88/69/45

Los fragmentos esperados para el caso de la parte final del gen, según el tipo de enzima de restricción y de acuerdo a las secuencias reportadas se enlistan en la tabla 11.

Tabla 11. Digestión virtual de la parte final de los genes del chimpancé.

Gen	*Bgl*II	*Rsa*I	*Msp*I	*Ava*II
cPLD	650	364/282	414/232	107/539
cPLA	650	364/282	414/183/50	107/532
cPLB	650	364/282	414/232	107/51/488
cPLC	650	650	414/?*	107/542
cGHV	425/225	650	414/182/50	107/542
cGHN	425/225	650	414/182/50	107/51/492

* La secuencia reportada para el gen cPLC no está completa, y no se sabe si hay un sitio de restricción *Msp*I o dos (414/232 ó 414/182/50).

Tras amplificar el promotor (aprox. 375pb) de las clonas IntC1ch (tipo I), los productos amplificados se caracterizaron con las enzimas *Ban*I, *Bgl*I, *Bst*NI y *Mnl*I (figura 23). Las caracterizaciones hechas a estas clonas sólo mostraron un único patrón de corte para las siguientes enzimas: *Ban*I: 300,75pb; *Bgl*I: 325,50pb; BstNI: 180,125, 65pb y *Mnl*I: 165pb y otras. Con estos datos sólo se pudo determinar que el gen que seguía a la intergénica corta I y al cual correspondían estos patrones de corte en el promotor, es cPLB.

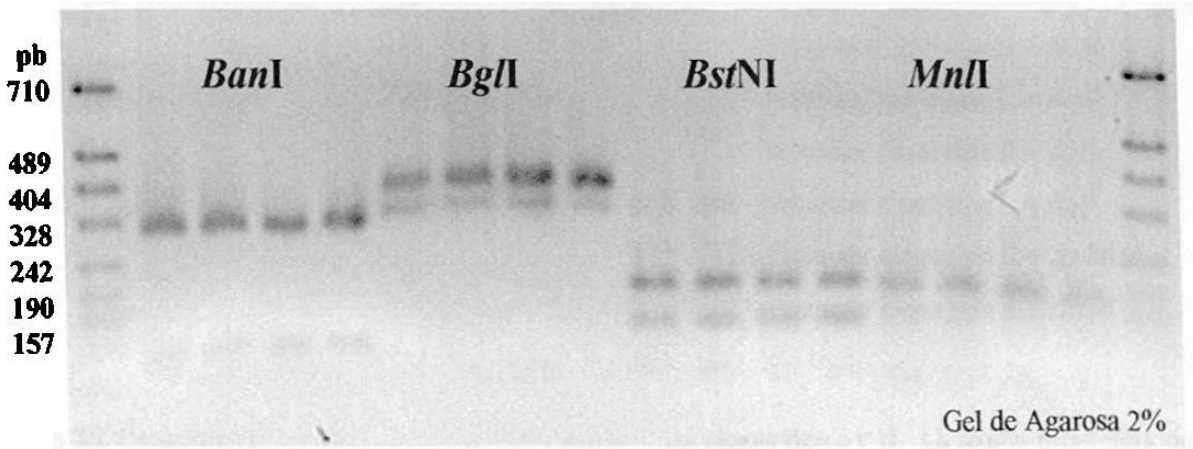


Figura 23. Caracterización del promotor (430-Prim) de las clonas tipo I. Se presentan los patrones de corte para el promotor de 375pb con las enzimas *Ban*I, *Bgl*I, *Bst*NI y *Mnl*I para cuatro clonas tipo I.

Una vez amplificada la parte correspondiente al final del gen (650pb) en las clonas tipo I, ésta se caracterizó con tres enzimas, dando los siguientes patrones de corte: *Bgl*II: 425,225pb; *Msp*I: 414,182, 50pb y *Ava*II: 492,107,51pb (figura 24). Según estos tamaños, el gen que precede a la región intergénica corta I es cGHN.

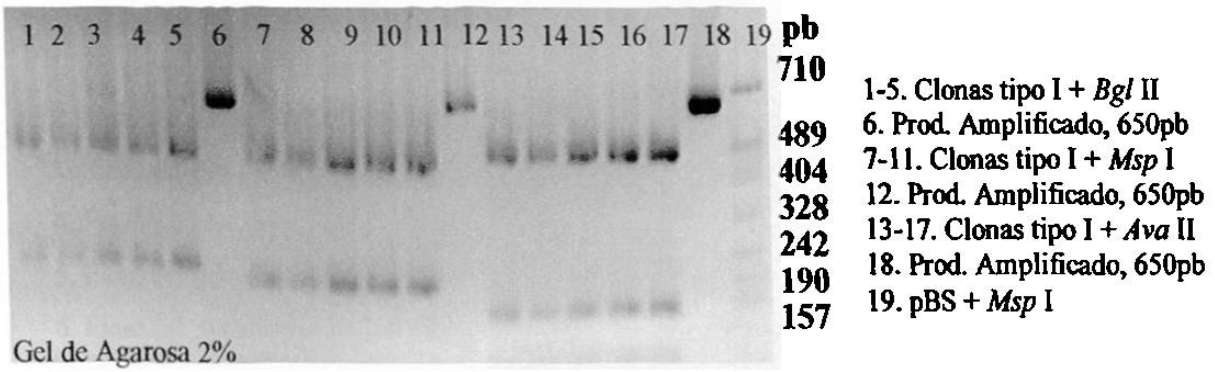
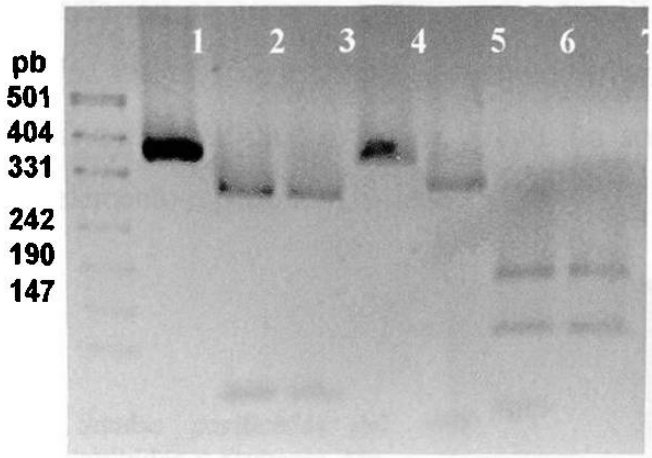


Figura 24. Caracterización de la parte final del gen (IGPIV-403) de las clonas tipo I. Se presentan los patrones de corte para esta región de 650pb con las enzimas *Bgl* II, *Msp* I y *Ava* II para cinco clonas tipo I.

Para las clonas tipo II también fueron amplificadas tanto la región final del gen que antecede, como la del promotor del gen. El promotor amplificado (375pb) se caracterizó con las enzimas *Ban*I, *Bgl*I y BstNI (figura 25). Las caracterizaciones se hicieron

comparativamente a clonas tipo I y II, y se encontraron diferencias en los cortes de la enzima *Bgl*I. Las clonas tipo II sólo mostraron un único patrón de corte para las tres enzimas: *Ban*I: 300,75pb; *Bgl*I: 375pb (no cortó) y *BstN*I: 180,125, 65pb. Según los tamaños de estas bandas, el gen que seguía a la intergénica corta II y al cual correspondían estos patrones de corte en el promotor, es cPLD.



1. Promotor sin cortar (375pb)
2. Promotor clona tipo II + *Ban*I
3. Promotor clona tipo I + *Ban*I
4. Promotor clona tipo II + *Bgl*I
5. Promotor clona tipo I + *Bgl*I
6. Promotor clona tipo II + *Bst*NI
7. Promotor clona tipo I + *Bst*NI

Figura 25. Caracterización del promotor (430-Prim) de las clonas tipo I y II. La región promotora de las clonas se amplificó con 430-Prim y el producto amplificado se caracterizó con diferentes enzimas en un gel de agarosa al 2%..

Tras amplificar la parte correspondiente al final del gen (650pb), esta región se caracterizó también para la clona tipo II, verificándose un patrón distinto para la enzima *Ava*II (figura 26). Los patrones de corte para la clona tipo II fueron: *Bgl*II: 425,225pb; *Rsa*I: 650pb (no cortó), *Msp*I: 414,182, 50pb y *Ava*II: 542,107pb. Según estos tamaños, el gen que precede a la región intergénica corta tipo II es el cGHV.

1. Final del gen clona tipo II + *Bgl*I
2. Final del gen clona tipo I + *Bgl*I
3. Final del gen clona tipo II + *Rsa*I
4. Final del gen clona tipo I + *Rsa*I
5. Final del gen clona tipo II + *Msp*I
6. Final del gen clona tipo I + *Msp*I
7. Final del gen clona tipo II + *Ava*II
8. Final del gen clona tipo I + *Ava*II
9. Final del gen sin cortar (650pb)

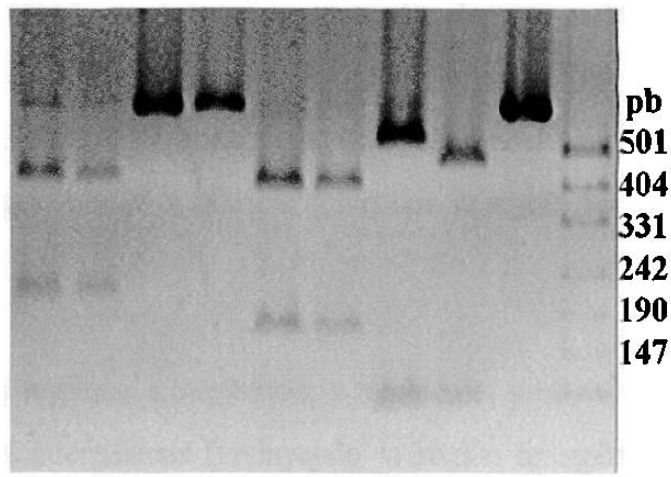


Figura 26. Caracterización de la parte final del gen (IGPIV-403) de las clonas tipo I y II. Se comparan las digestiones de la región amplificada con IGPIV-403 (650pb) para los dos tipos de clonas (I y II) con las enzimas *Bgl*II, *Rsa*I, *Msp*I y *Ava*II en un gel de agarosa al 2%..

En ambos tipos de clonas (I y II) los extremos de las regiones intergénicas se secuenciaron, para comprobar la identidad de los dos genes que las flanquean.

5.5 Obtención de sondas Alu, del potenciador e inhibidor, para la hibridación.

Para la hibridación se generaron tres sondas por PCR como se describió en Material y Métodos. Una vez purificadas, éstas se corrieron en un gel de agarosa (figura 27). La sonda para el inhibidor, tiene un tamaño de 578pb. La sonda del elemento potenciador es de 424pb y el elemento repetitivo Alu tiene 252 pb.

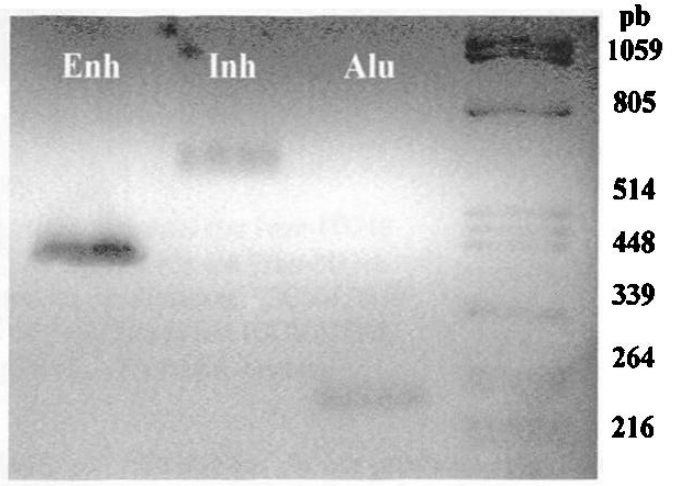
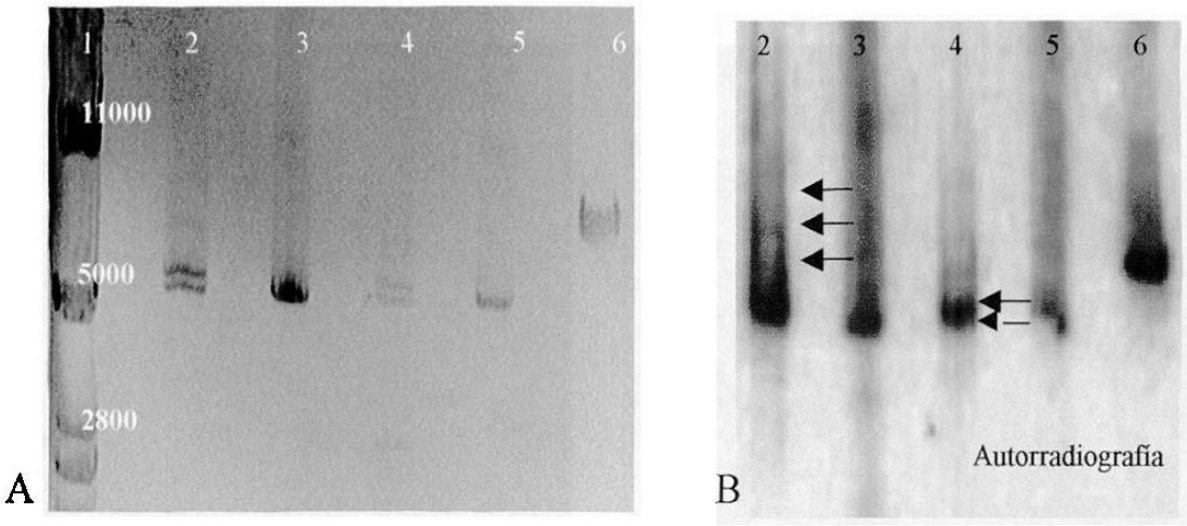


Figura 27. Sondas purificadas del potenciador, inhibidor y elemento Alu. En un gel de agarosa al 2.5% se analizaron las sondas del potenciador (424pb), del inhibidor (578pb) y del elemento repetitivo Alu (252pb).

5.6 Identificación de secuencias inhibidoras en el locus GH-PL del chimpancé.

En un gel de agarosa al 0.8% (figura 28A) se colocaron un marcador de peso molecular, las regiones intergénicas amplificadas y el producto amplificado de la clona IntC1ch. También en el gel se colocó la clona pBShPL3-*Nhe*I-*Cla*I linearizada, un control positivo del cual se obtuvo la sonda del inhibidor. Este gel se puso a hibridar junto con la sonda del inhibidor (figura 28B).

Se encontró el inhibidor en las cinco regiones intergénicas, y también el positivo dio señal para esta sonda. Todas las regiones intergénicas (incluyendo la región intergénica corta clonada) dieron señal para el inhibidor. El marcador de peso molecular (que se utilizo como control negativo) no dio señal, lo que indicó que la hibridación fue específica.



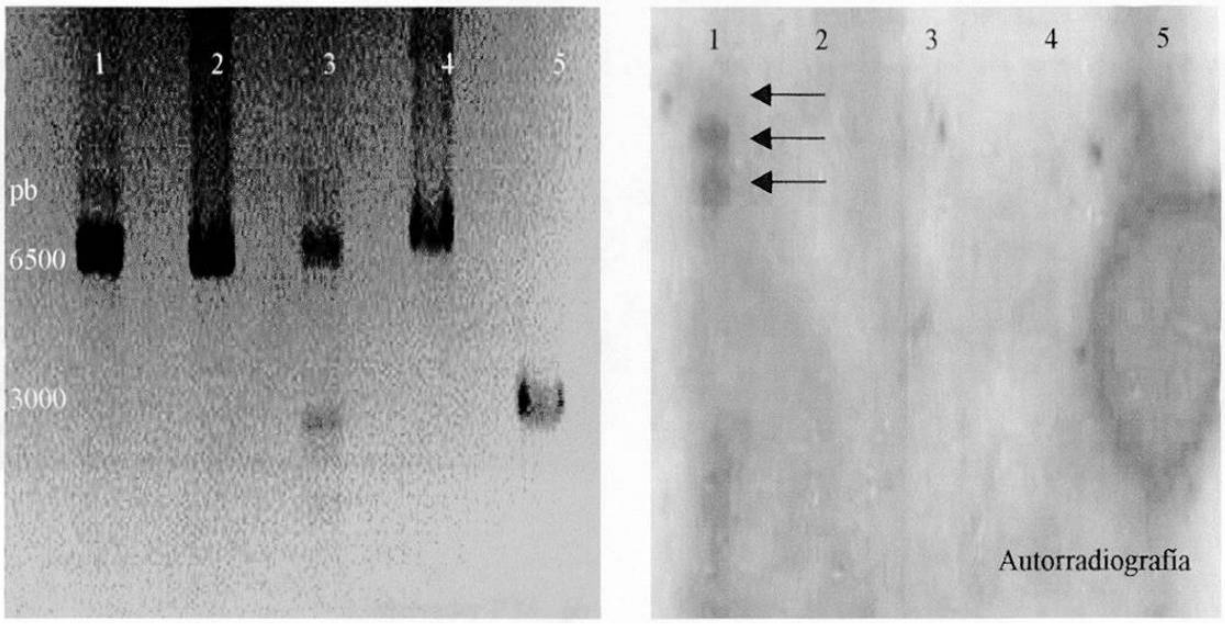
1. Marcador P.M., pb
2. Reg. Intergénicas, obtenidas con Prim-ITG10
3. Clona IntC1ch, amplificada con Prim-ITG10
4. Reg. Intergénicas, obtenidas con IGCV-ITG10
5. Clona IntC1ch amplificada con IGCV-ITG10
6. (+) Clona pBShPL3-*Nhe*I-*Cla*I humano

Figura 28. Identificación del elemento inhibidor por hibridación. A. Los productos amplificados de las regiones intergénicas del locus GH-PL, así como el producto amplificado de la clona IntC1ch se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%. B. Se muestra la autorradiografía del gel hibridado con la sonda del inhibidor.

5.7 Identificación de secuencias potenciadoras en el locus GH-PL del chimpancé.

Por otro lado, en un gel de agarosa al 0.8% se colocaron las regiones intergénicas amplificadas y el producto amplificado de la clona IntC1ch (ver figura 29A). En este gel se colocó también, linearizada, la clona pBShPL3-enh, control positivo a partir del cual se obtuvo la sonda del potenciador.

Este gel se puso a hibridar junto con la sonda del potenciador (figura 29B). Se encontró el potenciador sólo en las tres regiones intergénicas largas, y el positivo dio señal para esta sonda. Las regiones intergénicas cortas (incluyendo la región intergénica corta tipo I, clonada) no dieron señal para el potenciador.



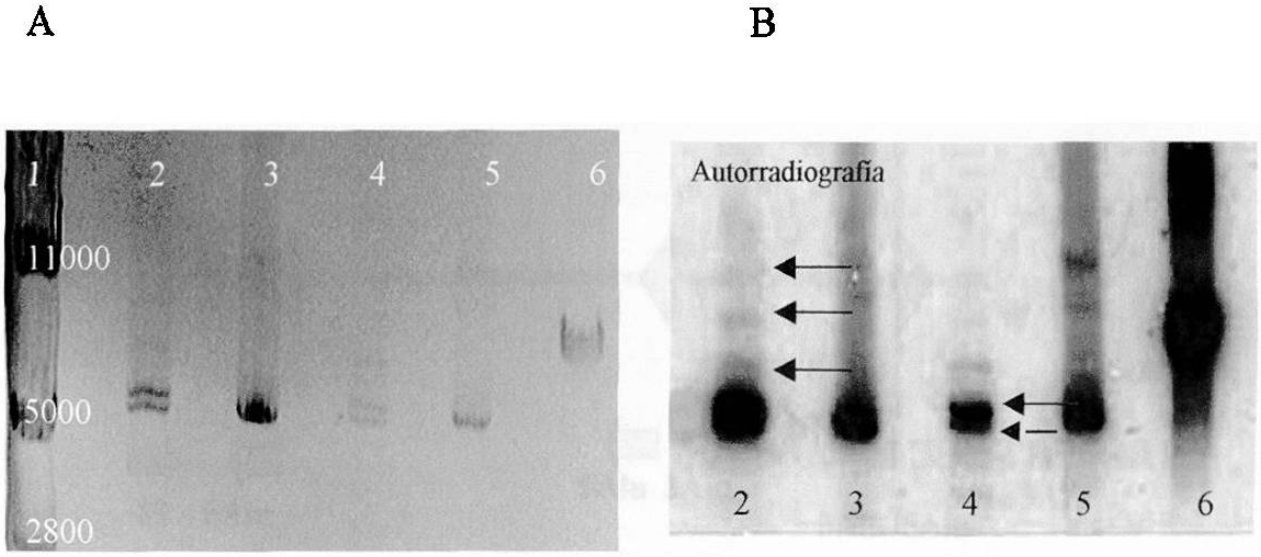
A B

1. Reg. Intergénicas, obtenidas con Prim-ITG10
2. Clona IntC1ch, amplificada con Prim-ITG10
3. Reg. Intergénicas, obtenidas con IGC V-ITG10
4. Clona IntC1ch amplificada con IGCV-ITG10
5. (+) Clona pBShPL3-enh humano

Figura 29. Identificación del elemento potenciador por hibridación. A. Los productos amplificados de las regiones intergénicas del locus GH-PL, así como el producto amplificado de la clona IntC1ch se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%. B. Se muestra la autorradiografía del gel hibridado con la sonda del potenciador.

5.8 Identificación de secuencias Alu en el locus GH-PL del chimpancé.

La identificación del elemento Alu se realizó también por hibridación (figura 30). Se encontró el elemento repetitivo Alu en todas las regiones intergénicas, el control positivo dio señal para esta sonda. Las cinco regiones intergénicas (incluyendo la región intergénica corta clonada) dieron señal para este elemento.



1. Marcador P.M., pb
2. Reg. Intergénicas, obtenidas con Prim-ITG10
3. Clona IntC1ch, amplificada con Prim-ITG10
4. Reg. Intergénicas, obtenidas con IGC V-ITG10
5. Clona IntC1ch amplificada con IGCV-ITG10
6. (+) Clona pBShPL3-*Nhe I-Cla I* humano

Figura 30. Identificación del elemento repetitivo Alu por hibridación. A. Los productos amplificados de las regiones intergénicas del locus GH-PL, así como el producto amplificado de la clona IntC1ch se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%. B. Se muestra la autorradiografía del gel hibridado con la sonda del elemento repetitivo Alu.

5.9 Distribución de elementos Alu en las clonas tipo I y II.

Como se indicó en Material y Métodos, se hizo una amplificación virtual con el programa Amplify utilizando combinaciones de los iniciadores 5Alu y 3Alu y además los iniciadores 88ExIV y Prim, sobre las regiones intergénicas cortas del locus humano reportadas en el GenBank. A estas regiones intergénicas se les denominó 1 y 2, según su orden en el locus de 5' a 3'.

En las figuras 31 y 32 se muestran los sitios de alineamiento de los iniciadores así como las amplificaciones efectuadas sobre las regiones intergénicas cortas 1 y 2 del humano, con los