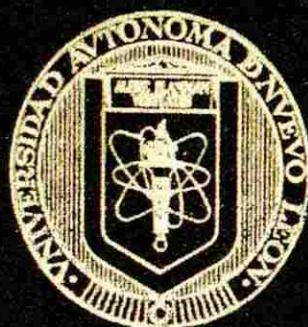


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**"ESTUDIO DE LAS REGIONES INTERGENICAS
DEL LOCUS GH-PI EN EL CHIMPANCE (*Pan troglodytes*)"**

Tesis que presenta

L.Q. ARIANA GRICEL TEISSIER GARCIA

como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Marzo 2005

TM

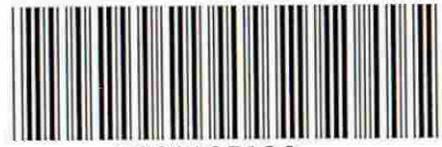
QH366

.2

.T4

2005

e.1



1080127139



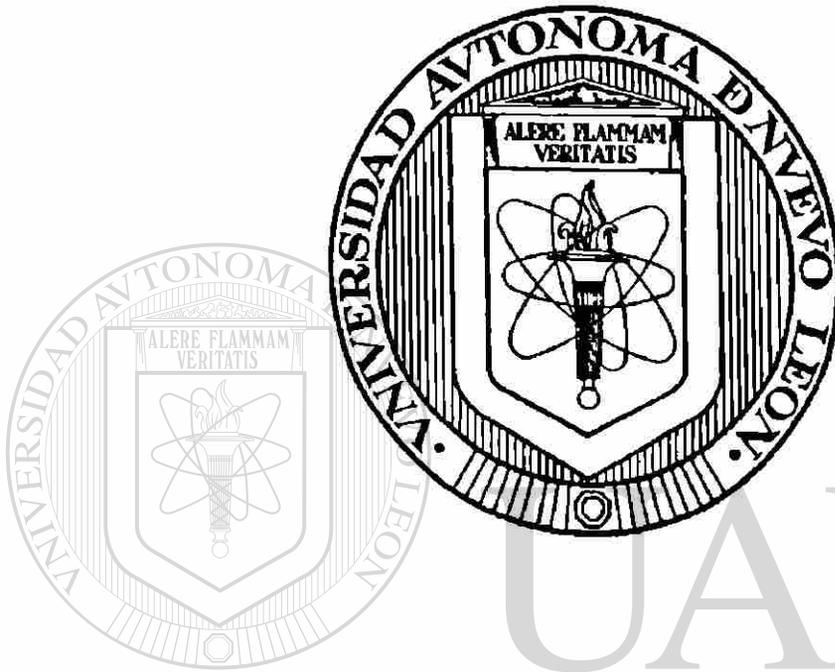
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Facultad de Medicina



**“ESTUDIO DE LAS REGIONES INTERGÉNICAS
DEL LOCUS GH-PL EN EL CHIMPANCÉ (*Pan troglodytes*)”**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tesis que presenta

L.Q. ARIANA GRICEL TEISSIER GARCÍA

como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

**ESTUDIO DE LAS REGIONES INTERGÉNICAS DEL LOCUS GH-PL
EN EL CHIMPANCÉ (*Pan troglodytes*)**

Aprobación de la Tesis:



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Director de Tesis

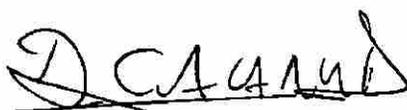


DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Miembro de la Comisión de Tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado



**Este trabajo de tesis se realizó
en el Laboratorio de Biología Molecular
del Departamento de Bioquímica
en la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León,
bajo la asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza
y la co-asesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Agnès por todo el esfuerzo compartido, su paciencia y sobre todo su amistad.

A los integrantes de la comisión, el Dr. Hugo Barrera y el Dr. Augusto Rojas, por el tiempo dedicado a este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y su programa de Becas Nacionales para programas de excelencia, por el apoyo para la realización de esta tesis.

A todos los profesores del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y a los profesores de otros departamentos que impartieron su cátedra durante el curso de esta maestría.

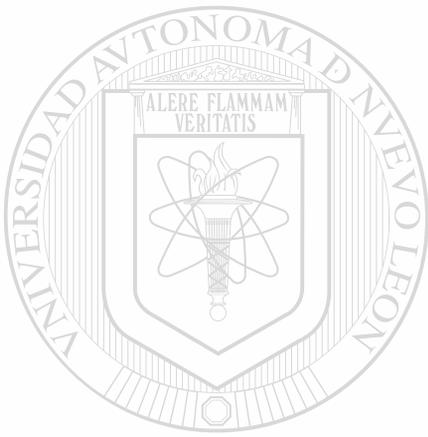
Al personal del Departamento de Bioquímica por todos los servicios que día con día realizaron y fueron de gran ayuda para la culminación de este trabajo.

A todos los compañeros de clase y laboratorios, por sus consejos, apoyo y amistad.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mi familia por su amor y apoyo incondicionales.

*para Andrea y Alejandro,
por su amor e infinita paciencia...*



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xii
RESUMEN	xiii
CAPÍTULO PRIMERO. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Origen y evolución de nuestra especie	1
1.2 Variación y evolución en los genomas	3
1.3 Familias multigénicas: modelo de estudio de la evolución de los genomas	5
1.4 La familia multigénica GH-PL en los primates	6
1.5 El locus GH-PL humano	9
1.6 Regulación de la expresión del locus humano GH-PL	11
1.7 Los genes del locus GH-PL en el chimpancé	13
1.8 Justificación	14
CAPÍTULO SEGUNDO. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos	15
CAPÍTULO TERCERO. ESTRATEGIA GENERAL	16
CAPÍTULO CUARTO. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1 Material	17
4.1.1 Origen de los reactivos	17
4.1.2 Material biológico	19
4.2 Equipo	19

4.3 Métodos	21
4.3.1 Obtención y cuantificación del ADN	21
4.3.1.1 Extracción de ADN genómico	21
4.3.1.2 Extracción de ADN plasmídico	22
4.3.1.3 Electroforesis y cuantificación del ADN	23
4.3.2 Amplificación por PCR larga de las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé	25
4.3.2.1 Condiciones óptimas de amplificación para la PCR-larga	25
4.3.3 Clonación de las regiones intergénicas	27
4.3.3.1 Clonación por medio de un kit TOPO® para productos de PCR larga	27
4.3.3.1.1 Selección de las clonas recombinantes	29
4.3.3.2 Desarrollo de un vector para clonación por recombinación homóloga	29
4.3.3.2.1 Obtención del vector en TOPO®	29
4.3.3.2.2 Subclonación en vector pBR	31
4.3.3.2.3 Preparación de células BJ5183 calcio-competentes	33
4.3.3.2.4 Ensayos de transformación de las células BJ5183 competentes	34
4.3.3.2.5 Selección de las clonas recombinantes	35
4.3.4 Caracterización enzimática de las regiones intergénicas clonadas	35
4.3.5 Obtención y caracterización de la región promotora y la región final del gen	36
4.3.6 Identificación de secuencias potenciadoras, inhibidoras, Alu y Kpn en el locus GH-PL del chimpancé	37
4.3.6.1 Obtención de sondas	37
4.3.6.1.1 Sonda del inhibidor	37
4.3.6.1.2 Sonda del potenciador	38
4.3.6.1.3 Sonda del elemento Alu	38
4.3.6.2 Marcaje de las sondas	38
4.3.6.3 Condiciones de hibridación	39
4.3.6.4 Estudio de la distribución de elementos Alu en las clonas del chimpancé	40
4.3.7 Análisis de la región promotora distal de las regiones intergénicas clonadas	40
4.3.8 Secuenciación nucleotídica de los extremos de las regiones intergénicas clonadas	41

CAPÍTULO QUINTO. RESULTADOS	42
5.1 Obtención de las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé	42
5.2 Clonación de las regiones intergénicas en vector comercial	43
5.2.1. Caracterización de la región intergénica corta tipo I	43
5.2.2 Caracterización y clonación de la región intergénica corta tipo II	44
5.3 Clonación por recombinación homóloga en TOPO®	45
5.3.1 Obtención del vector para recombinación homóloga (TOPO®)	46
5.3.2 Subclonación en vector pBR	46
5.3.3 Condiciones de la transformación de bacterias BJ5183 calcio-competentes	48
5.3.4 Verificación de la recombinación por medio del vector desarrollado	49
5.4 Caracterización de la región promotora y la región final del gen en las clonas	50
5.5 Obtención de sondas Alu, del potenciador e inhibidor, para la hibridación	53
5.6. Identificación de secuencias inhibidoras en el locus GH-PL del chimpancé	53
5.7 Identificación de secuencias potenciadoras en el locus GH-PL del chimpancé	54
5.8 Identificación de secuencias Alu en el locus GH-PL del chimpancé	55
5.9 Distribución de elementos Alu en las clonas tipo I y II	56
5.10 Identificación de la secuencia Kpn en el locus GH-PL del chimpancé	60
5.11 Orden de la regiones intergénicas tipo I y II en el locus GH-PL del chimpancé	61
<hr/>	
CAPÍTULO SEXTO. DISCUSIÓN	63
6.1 Las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé	64
6.2 Análisis detallado de las regiones intergénicas del chimpancé	66
6.3 Evolución del locus GH-PL entre el chimpancé y el humano	68
CAPÍTULO SÉPTIMO. CONCLUSIONES	69
CAPÍTULO OCTAVO. BIBLIOGRAFÍA	70
ANEXOS	77

LISTA DE TABLAS

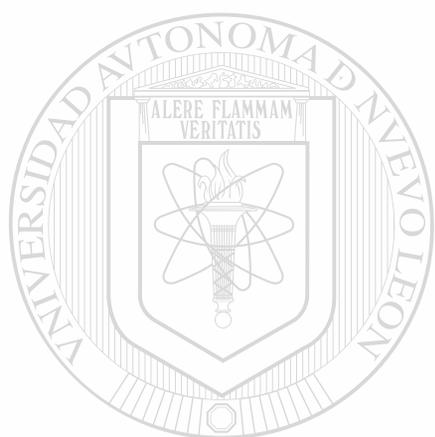
Tabla 1. Iniciadores para PCR utilizados en el proyecto	18
Tabla 2. Programa de PCR larga utilizado para la obtención de las regiones intergénicas	26
Tabla 3. Condiciones óptimas para la reacción de PCR larga	26
Tabla 4. Preparación de inserto A	27
Tabla 5. Condiciones de amplificación	30
Tabla 6. Programa de PCR para la amplificación	31
Tabla 7. Condiciones de digestión enzimática de los insertos clonados	36
Tabla 8. Transformación de bacterias recombinantes variando la cantidad de ADN	48
Tabla 9. Transformación de bacterias BJ5183 variando la relación molar inserto:vector	48
Tabla 10. Digestión virtual del promotor proximal de los genes del chimpancé	50
Tabla 11. Digestión virtual de la parte final de los genes del chimpancé	50
Tabla 12. Comparación de los productos obtenidos con las clonas tipo I y II.	59
Tabla 13. Comparación de las secuencias obtenidas para la clona I vs. las reportadas	61
Tabla 14. Comparación de las secuencias obtenidas con la clona II vs. las reportadas	62

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación general de los primates	2
Figura 2. Recombinación homóloga	4
Figura 3. Formación de los genes ancestrales tipo GH y PRL	6
Figura 4. Evolución de los loci GH-PL	7
Figura 5. El locus GH-PL humano	9
Figura 6. Elementos repetitivos en el locus GH-PL humano	11
Figura 7. Elementos reguladores de la expresión en el locus GH-PL	12
Figura 8. Análisis filogenético de los loci GH-PL en el chimpancé y el hombre	13
Figura 9. Estrategia General	16
Figura 10. Regiones de alineamiento para los iniciadores usados en PCR larga	25
Figura 11. Clonación por recombinación	29
Figura 12. Obtención del vector para recombinación	30
Figura 13. Subclonación de vector vectrecTOPO-D10430 a vectrecpBR-D10430	32
Figura 14. Regiones intergénicas del chimpancé	42
Figura 15. Clonas obtenidas a partir de las regiones intergénicas	43
Figura 16. Caracterización de la región intergénica corta I	44
Figura 17. Caracterización de la intergénica corta tipo II	45
Figura 18. Intergénica tipo II clonada en TOPO®.	45
Figura 19. Amplificación y ligación para obtener el vector para recombinación	46
Figura 20. Subclonación del vector para la recombinación en un vector pBR	46
Figura 21. Análisis por PCR del vectrecpBR-D10430.	47
Figura 22. Verificación de la recombinación por medio de PCR	49
Figura 23. Caracterización del promotor (430-Prim) de las clonas tipo I	51
Figura 24. Caracterización de la parte final del gen (IGPIV-403) de las clonas tipo I	51
Figura 25. Caracterización del promotor (430-Prim) de las clonas tipo I y II	52
Figura 26. Caracterización de la parte final del gen (IGPIV-403) de las clonas tipo I y II	52
Figura 27. Sondas purificadas del potenciador, inhibidor y elemento Alu	53
Figura 28. Identificación del elemento inhibidor por hibridación	54

Figura 29. Identificación del elemento potenciador por hibridación	55
Figura 30. Identificación del elemento repetitivo Alu por hibridación	56
Figura 31. Análisis de la distribución de los elementos Alu en la clona tipo I	57
Figura 32. Análisis de la distribución de los elementos Alu en la clona tipo II	58
Figura 33. Amplificaciones de los promotores distal, medio y proximal	60



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

[]	Concentración	μl	Microlitros
°C	Grados centígrados	mM	Concentración milimolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico	μM	Concentración micromolar
A	Absorbancia	mQ	MiliQ
ADNc	ADN complementario	N	Concentración normal
<i>Amp^r</i>	Resistente a la ampicilina	ng	Nanogramos
ARN	Ácido ribonucleico	nm	Nanómetros
ARNm	ARN mensajero	pb	Pares de bases
ATP	Adenosintrifosfato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BSA	Albúmina sérica bovina	pH	-log[H ⁺]
cbp	Con bastante para	PL	Lactógeno placentario
dATP	Desoxiadenosina trifosfato	PRL	Prolactina
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato	recA1	Cepa con gen no recombinante
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	recBC	Cepa con gen recombinante
GH	Hormona del crecimiento	rpm	Revoluciones por minuto
h	Horas	s	Segundos
<i>Kan^r</i>	Resistente a kanamicina	<i>Str^r</i>	Resistente a estreptomicina
kDa	Kilodaltones	<i>Tet^r</i>	Resistente a tetraciclina
kpb	Kilopares de bases	U	Unidades
λ	Longitud de onda	UV	Ultravioleta
M	Concentración molar	X	Veces la concentración
mg	Miligramos		
μg	Microgramos		
min	Minutos		
ml	Mililitros		

RESUMEN

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

L. Q. Ariana Gricel Teissier García

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Título de la tesis: ESTUDIO DE LAS REGIONES INTERGÉNICAS DEL LOCUS GH-PL DEL CHIMPANCÉ (*Pan troglodytes*).

Número de páginas: 77

Objetivos: El locus GH-PL es una región muy dinámica del genoma que nos permite hacer estudios sobre su evolución, especialmente en el caso de los primates. En el locus humano existen cinco genes y cuatro regiones intergénicas ampliamente descritas. Para el chimpancé, en cambio, se han descrito seis genes, y éstos se han comparado con los de la especie humana. Hasta ahora no existen modelos que expliquen cómo ocurrió la evolución del locus GH-PL del chimpancé (*Pan troglodytes*), puesto que faltan elementos para trazar dichos eventos con precisión.

En este trabajo, se propuso como objetivo el describir las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé, para así tener información que nos permitiera hacer una descripción más completa sobre la evolución de este locus.

Resultados y conclusiones: Durante el estudio se amplificaron las cinco regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé por PCR larga. Se observó que existen dos regiones cortas (aprox. 6000p) y tres regiones largas (más de 8000pb). Las dos regiones cortas se clonaron por medio de un vector comercial y además se desarrolló un vector para realizar la clonación por recombinación homóloga del resto de las regiones intergénicas.

Sobre las regiones obtenidas del chimpancé, se identificaron elementos inhibidores y potenciadores de la transcripción, así como elementos repetitivos Alu, presentes y distribuidos de la misma manera que en nuestra especie. Se detectó la presencia del elemento Kpn en la región intergénica corta número dos y el elemento fue secuenciado.

Por todos los hallazgos logrados con este trabajo, se ha deducido que la evolución del locus GH-PL entre el chimpancé y el hombre sucedió de manera independiente, puesto que se encontraron regiones muy conservadas entre los dos loci y otras regiones más variables, cuya evolución fue diferente en cada especie.



Dra. Agnès Revol de Mendoza
Asesor



Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Co-asesor

CAPÍTULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

La evolución biológica se refiere a los cambios o modificaciones que las especies han sufrido a lo largo del tiempo. A través de la simple observación, se pueden apreciar diferencias entre las distintas especies que habitan el planeta y también reconocer variabilidad dentro de una misma especie.

Existen numerosas herramientas que proporcionan evidencia para entender cómo es que han evolucionando los organismos biológicos (Vilsee, 1996). Algunas de éstas son la paleontología, la taxonomía, la embriología, la biogeografía, la morfología, la inmunología, la bioquímica comparada y, más recientemente, la genética, la biología molecular y la genómica comparativa.

Con el surgimiento del Proyecto Genoma Humano y la publicación de nuevas secuencias genómicas de diversas especies, se pueden hacer estudios comparativos entre genomas para hacer el intento de entender cual es la información biológica clave que nos distingue como seres humanos y nos diferencia de otras personas (Griffiths y cols., 2000).

1.1 Origen y evolución de nuestra especie.

Existe un interés particular hacia el estudio del origen del *Homo sapiens* como especie. Para tratar de conocer cómo surgió la especie humana y los cambios que ésta ha sufrido a través de las épocas, resulta de gran utilidad saber cómo han evolucionado los primates, orden de mamíferos al cual pertenecemos y con el cual compartimos muchas semejanzas.

Los estudios paleontológicos y morfológicos de los primates realizados hasta la fecha han dibujado un panorama acerca de cómo han evolucionado estos organismos y cómo se fue modelando la especie humana. Sin embargo, aún en nuestros días, faltan por realizarse más estudios bioquímicos, genéticos y de otro tipo para aumentar y hacer más certeras las evidencias acerca del desarrollo de este orden de mamíferos (Villegas, 1996).

Todo indica que los primates proceden de un tipo de musaraña arbórea, organismo intermedio entre los insectívoros y los primates modernos (ver figura 1).

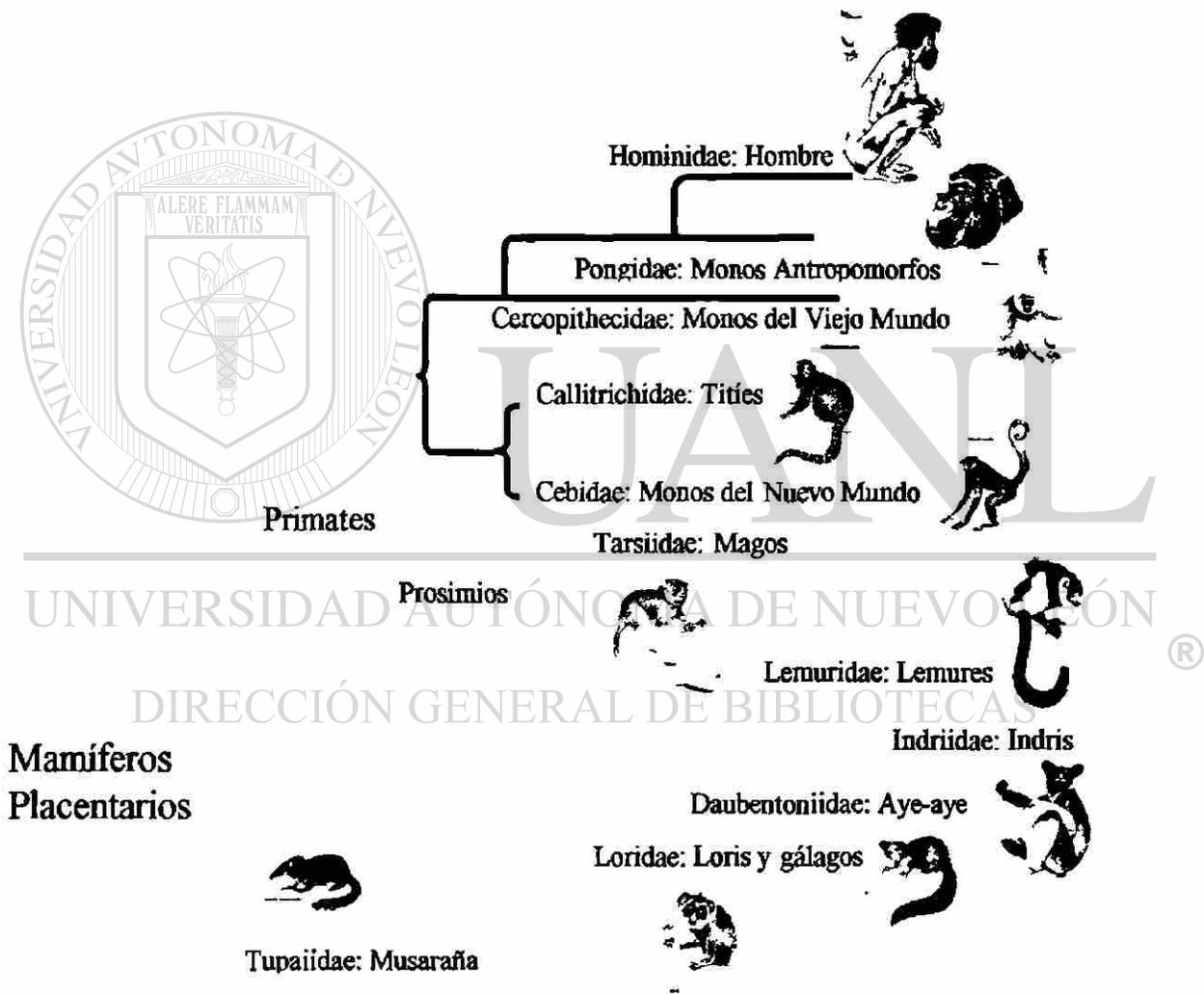


Figura 1. Clasificación general de los primates. Se muestra como se clasifican los primates según su evolución a partir de un ancestro común. (Museo Smithsonian de Historia Natural.)

Posteriormente, en el paleoceno (hace unos 65 millones de años), surgió el grupo de los prosimios y comenzó a distribuirse en Norteamérica y Europa (aún unidas). Algunos descendientes de estos primates primitivos existen aún en la actualidad, como los lemures,

magos y gálagos. En el oligoceno, hace unos 38 millones de años, se separaron dos grupos principales de primates: los cébidos o monos del Nuevo Mundo y los cercopitecos o monos del Viejo Mundo. Más recientemente, hace unos 23 millones de años, como se observa en la figura 1, surgieron los homínidos.

Los monos del nuevo mundo se encuentran distribuidos en América Central y Sudamérica. Algunos ejemplos de estos monos son el tití, el mono capuchino y el mono araña. Los monos del viejo mundo comprenden un grupo más amplio, entre los cuales se encuentran los macacos, mandriles, babuinos, langures y otros. Por último, los homínidos incluyen al hombre y a los miembros de la familia Pongidae: gibón, orangután, gorila y chimpancé.

El chimpancé (*Pan troglodytes*) es la especie más cercana al ser humano: sus secuencias génicas son idénticas entre un 98 y un 99%. En estudios recientes (Wildman y cols., 2003) al comparar sitios funcionalmente importantes (no sinónimos), se ha encontrado una similitud de hasta un 99.4%, lo que inclusive ha llevado a proponer el incluir al chimpancé dentro del género *Homo*. De aquí la importancia de una comparación más profunda entre estas dos especies para saber cuál es la información genética que nos define biológicamente como humanos (Fujiyama y cols., 2002).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.2 Variación y evolución en los genomas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La información que se requiere para construir y hacer funcionar a un organismo se encuentra en el ADN. Esta información se va transfiriendo a la descendencia pero no de una forma invariable. La mayor parte de dicha información genética se hereda de manera intacta, pero existen ocasiones en que puede sufrir cambios. Estos cambios, dependiendo de algunas variables, como las condiciones ambientales, a veces dan ventajas a los individuos, y al irse acumulando, son capaces hasta de crear una nueva especie. Pero si son adversos, pueden causar la extinción de la misma. Finalmente, estos cambios en el contenido de los genomas a través del tiempo son responsables de la variación genética y han dado pie a la diversidad biológica en nuestro planeta (Alberts, 1998).

La primera fuente de variación genética, la más simple, es la introducción de mutaciones. Existen diversas clases de mutaciones: las mutaciones puntuales, en las que una sola base nucleotídica cambia; y también las inserciones y/o deleciones de varios pares de base que modifican al ADN (Griffiths y cols., 2000).

Estas mutaciones pueden tener varios efectos, según donde estén ocurriendo. Hay mutaciones silenciosas, llamadas así ya que ocurren fuera de los genes o producen un mismo aminoácido a la hora de ser traducidas. Otras son las sustituciones sinónimas, que cambian un aminoácido por otro similar y que por eso, no generan cambios realmente importantes en la proteína. Pero también existen mutaciones que pueden afectar la función de las proteínas, o que simplemente producen proteínas no funcionales. Algunas de éstas son las mutaciones de cambio de fase, las mutaciones sin sentido o las mutaciones generadas por sustituciones no sinónimas (en que un aminoácido es sustituido por otro muy distinto químicamente).

Las mutaciones se generan de varias formas. Pueden originarse por la presencia de mutágenos que actúan sobre el ADN, como la luz ultravioleta. También se dan de manera espontánea aunque esporádica, cuando hay errores en la replicación del ADN. Y por último, pueden surgir de daños sobre la estructura química del ADN, como los procesos de oxidación y desaminación.

El ADN también puede sufrir rearrreglos de sus secuencias mucho más extensos que una o pocas bases. Estos rearrreglos pueden ser causados por mecanismos como la recombinación homóloga, en la que secuencias de ADN de doble cadena muy similares entre sí, se entrecruzan (ver figura 2) y generan nuevas secuencias, sobre todo cuando hay un entrecruzamiento desigual.



Figura 2. Recombinación homóloga . Mecanismo de recombinación entre secuencias de ADN semejantes.

Los elementos transponibles o transposones, son secuencias de ADN que pueden escindirse de éste por sí mismos, y luego se insertan en otro lugar del genoma. Estos elementos también pueden generar variación en las secuencias génicas de los organismos, y lo hacen a través de intermediarios de ADN o de ARN, como en el caso de los retrotransposones. Por último, una fuente importante de variación genética es la reproducción sexual, en la que se hereda a la descendencia una combinación de los genomas de ambos progenitores.

1.3 Familias multigénicas: modelo de estudio de la evolución de los genomas.

Existen algunos genes con secuencias muy similares que se encuentran repetidos en varias ocasiones en el genoma. Estas copias de secuencias semejantes constituyen las familias génicas (Alberts y cols., 1998). Se cree que estas familias se generan a partir de una copia ancestral, la cual se duplicó en una primera etapa por recombinación entre dos cromosomas homólogos en un genoma diploide, o por otro mecanismo. El resto de las copias se genera a través de posteriores duplicaciones o recombinaciones homólogas. Una de las copias de estas familias multigénicas usualmente conserva intacta su secuencia, y por consecuencia, su función. Pero el resto de las copias puede sufrir más frecuentemente mutaciones. Estas mutaciones pueden inactivar a las copias, o darles nuevas funciones a los genes y así una ventaja evolutiva a los organismos.

Así, el estudio de las familias multigénicas permite profundizar acerca de la evolución de los genomas y en consecuencia, conocer más acerca de la evolución de las especies que han poblado o que viven en nuestro planeta.

1.4 La familia multigénica GH-PL en los primates.

Un ejemplo de familia multigénica lo constituye la familia GH-PL. Entre sus miembros se encuentran genes altamente relacionados, como las hormonas del crecimiento (GHs), los lactógenos placentarios (PLs), la prolactina (PRL) y otros (Walker y cols., 1991).

Se cree que la familia GH-PL inició su formación hace unos 450 millones de años, al surgir los primeros vertebrados (Barsh y cols., 1983), con la duplicación de un gen ancestral. Este gen dio origen a dos precursores, uno tipo hormona del crecimiento (GH) y otro tipo prolactina (PRL), como se observa en la figura 3.

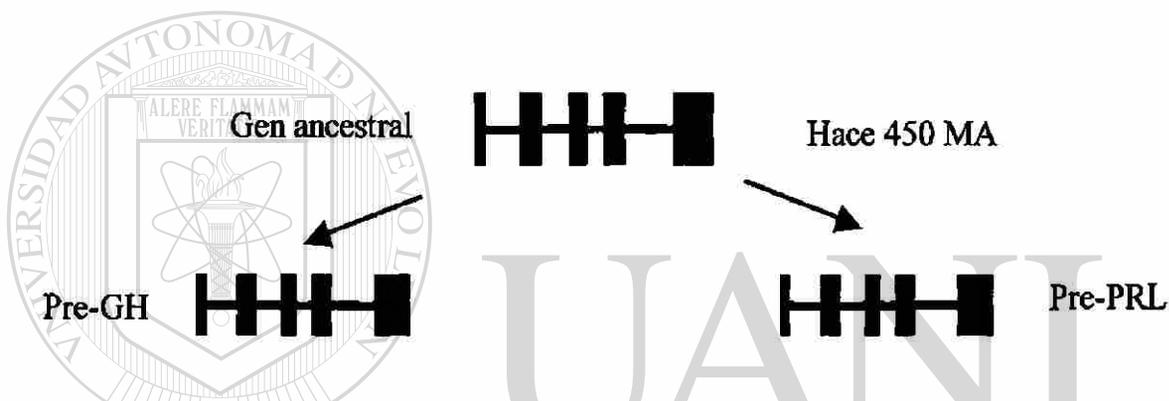


Figura 3. Formación de los genes ancestrales tipo GH y PRL. Se plantea la formación inicial de dos tipos de genes en la familia GH-PRL.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

Estos dos genes predecesores evolucionaron de manera independiente durante el desarrollo temprano de los vertebrados (Wallis, 1981). En el caso del ser humano, por ejemplo, se segregaron hacia dos cromosomas distintos: al 6, el gen de la PRL y al 17, el de la GH. En otros vertebrados, incluyendo a algunos peces, estos genes también se encuentran por separado.

El gen tipo GH se conservó sin grandes cambios hasta surgir los mamíferos, incluyendo a los prosimios, codificando para la GH de los primates primitivos. Esta hormona es más semejante a la hormona de la mayoría de los mamíferos, que a la de otros primates más evolucionados (Adkins y cols., 2001; Wallis y cols., 2001).

Sin embargo, en el linaje de los primates, se ha sugerido que tras divergir estos dos genes tipo GH y tipo PRL, hubo una expansión del locus GH por duplicaciones sucesivas (ver figura 4). Estos eventos de duplicación se propiciaron por la presencia de secuencias repetitivas tipo Alu que se encuentran en una alta densidad en el locus humano (Chen y cols., 1988).

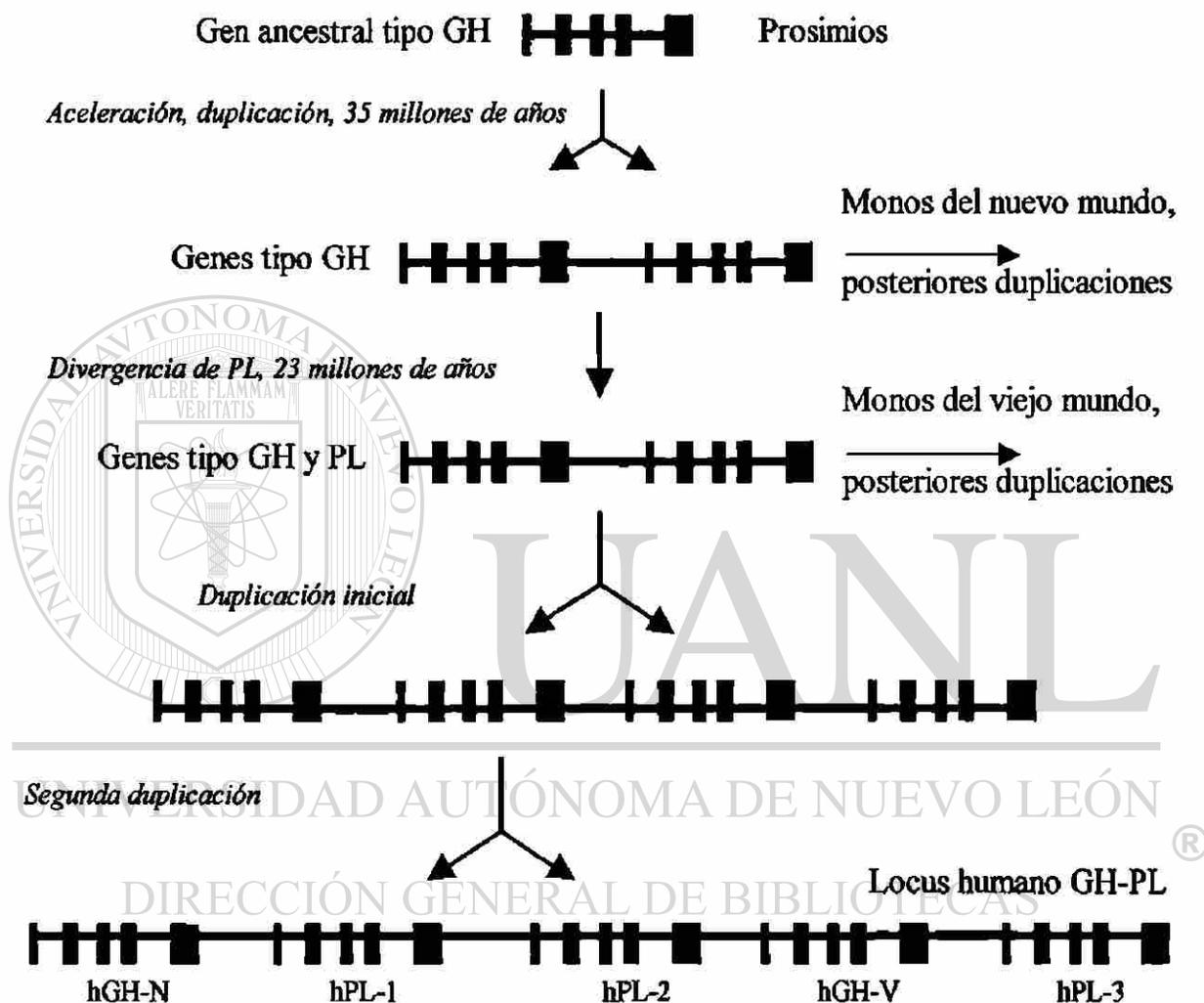


Figura 4. Evolución de los loci GH-PL. Hipótesis acerca de la formación de los loci GH-PL en los primates y el ser humano.

Los elementos Alu surgieron hace unos 31 millones de años, 20 millones de años después de que los prosimios se separaran del resto de las ramas de los primates (Adkins y cols., 2001). Debido a la presencia de elementos transponibles como Alu en los loci GH de los primates más evolucionados, se cree que éstos han creado un ambiente que propicia eventos de recombinación entre estas secuencias. Se piensa que éstos fueron los responsables de la duplicación generadora del locus de dos genes y de las posteriores duplicaciones.

Al parecer, tras ocurrir la primera duplicación del gen ancestral tipo GH y formarse un locus de dos genes, se dio la divergencia entre la rama de los monos del nuevo mundo y la rama de los monos del viejo mundo/hominidos. Este locus sufrió una evolución independiente en estos dos grupos. En los monos del nuevo mundo, posteriores duplicaciones originaron loci con mayor número de genes. Se han reportado loci de ocho genes tipo GH (de los cuales 5 son pseudogenes) para el tití común (*Callitrix jacchus*) (Wallis y cols., 2002) y de cinco regiones intergénicas (6 genes) tipo GH para el mono araña (*Ateles geoffroyi*), (Esquivel-Escobedo, 1999).

Por otra parte, en la rama de los monos del viejo mundo/hominidos una aceleración en la evolución de uno de los dos genes del locus, generó un locus con un precursor tipo GH por un lado y un antecesor tipo PL por otro, hace unos 23 millones de años (Revol y cols., 2001).

Tras la formación de este locus con un antecesor GH y otro PL, se dio la divergencia entre los monos del viejo mundo y los homínidos, y hubo una evolución independiente del locus para cada rama. Para los monos del viejo mundo se han reportado, en el caso del macaco (*Macaca mulata*) cinco secuencias de ADNc, de las cuales dos son tipo GH y tres tipo PL (Golos y cols., 1993). Mientras que en el caso del mono verde (*Cercopithecus aethiopsis*) la descripción del locus revela cinco regiones intergénicas (Corrales-Félix, 2000) y seis genes (López-Rodríguez, 2002). Aún así, todavía no se ha descrito por completo un modelo que explique los eventos de duplicación que dieron origen a estos loci.

En los homínidos, se tiene la evidencia de seis genes en el locus del chimpancé (*Pan troglodytes*), dos tipo GH y cuatro tipo PL, aunque tampoco se ha reportado un modelo que explique la formación del mismo (Revol y cols., 2004).

El locus humano GH-PL es el más ampliamente estudiado. Consta de cinco genes: dos tipo GH y tres tipo PL. Se ha sugerido (otra vez siguiendo duplicaciones y/o recombinaciones flanqueadas por elementos Alu) que este locus surgió, como ya se ha explicado, por una

primera duplicación sobre el ancestro tipo GH, seguida de una aceleración que produjo dos clases de genes: GH y PL. Una segunda duplicación generó un locus preliminar de cuatro genes: el gen hGH-N, hPL₁/hPL₂, hGH-V y hPL₃. Por último, hace unos 5 millones de años, una duplicación sobre hPL₁/hPL₂ produjo el locus que se conoce hoy en día: hGH-N, hPL₁, hPL₂, hGH-V y hPL₃ (Chen y cols., 1988).

Aún así, hay datos que no corroboran esta teoría: los genes hPL₁ y hPL₂ son menos parecidos entre sí que hPL₂ y hPL₃. Además, el gen hPL₃ posee una región codificante muy similar a la de hPL₂, por lo que se ha sugerido que tras ocurrir la última duplicación, hubo una recombinación entre estos dos genes.

1.5 El locus GH-PL humano.

El locus GH-PL humano se encuentra en el cromosoma 17, en la región q24.2, y se extiende a lo largo de 50kpb. Contiene cinco genes que se encuentran en la misma orientación, a saber: 5'- hGH-N (normal), hPL₁, hPL₂, hGH-V (variante) y hPL₃ -3' (Chen y cols., 1988).

Los cinco genes del locus presentan la misma estructura de cinco exones y cuatro intrones, y están separados por cuatro regiones intergénicas, la primera de 6, la segunda y tercera de 13, y la cuarta de 6.5kpb respectivamente, tal y como se observa en la figura 5. Las secuencias nucleotídicas de los cinco genes son similares entre un 91 y un 99%.

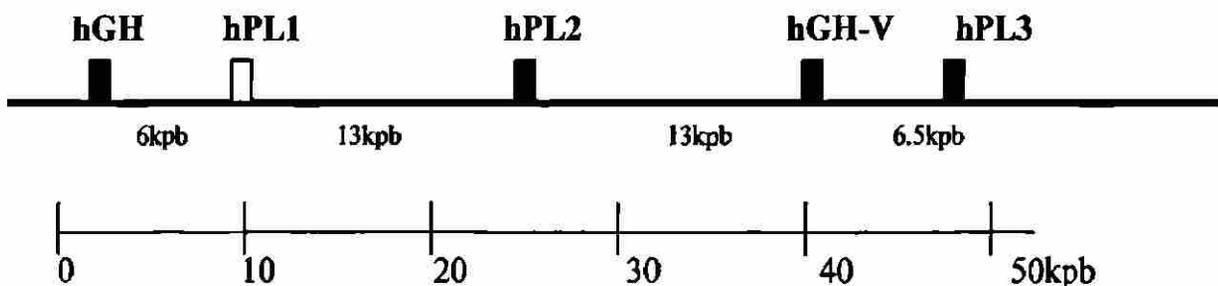


Figura 5. El locus GH-PL humano. Se muestran los genes que conforman el locus, su tamaño y el tamaño de las regiones que los separan.

El gen hGH-N produce la hormona del crecimiento humana (HGH), que se expresa principalmente en las células somatotróficas y lactosomatotróficas de la hipófisis anterior. Esta hormona es responsable del crecimiento somático y además tiene propiedades lactogénicas. También puede actuar sobre el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, e interviene en la síntesis de ADN y ARN (Walker y cols., 1991, Su y cols., 2000). Un procesamiento alternativo del transcrito primario del gen hGH-N genera dos ARNm, que codifican, el más abundante (90%) una isoforma de 22kDa y el otro una de 20kDa, las cuales presentan propiedades fisiológicas ligeramente distintas (De Noto y cols., 1981; Cooke y cols., 1988).

Los otros genes del locus GH-PL se expresan primordialmente en la capa de sincitiotrofoblastos de la placenta (Walker y cols., 1991). El gen hPL₁ ha sido considerado como un pseudogen por contener una mutación que evita un procesamiento semejante al de los transcritos del resto de los genes del locus y por tanto no se expresa, o su expresión es apenas detectable (Chen y cols., 1988, Walker y cols., 1991).

El gen hGH-V produce una HGH variante (HGH-V) también con varias isoformas, donde las principales son las de 22 y 26kDa. La producción de HGH-V aumenta a la par del desarrollo placentario, y la hormona reemplaza a la HGH-N en la regulación del metabolismo materno para la 2ª mitad del embarazo (Frankenne y cols., 1988).

Los genes hPL₂ y hPL₃ codifican para la misma proteína madura (PL). El lactógeno placentario se produce durante el embarazo. Al parecer tiene efecto sobre el crecimiento fetal, como consecuencia de la regulación del metabolismo materno (Forsyth, 1994). También estimula la proliferación celular en las glándulas mamarias e incrementa la lipólisis en el tejido adiposo.

El locus contiene además de estos genes, distintas secuencias reguladoras y de otro tipo localizadas en las regiones intergénicas. Por ejemplo, contiene 48 secuencias repetitivas de la familia Alu, en ambas orientaciones (figura 6). Éstas han servido para trazar la historia evolutiva del locus, tratando de entender los patrones que presentan los distintos tipos de

secuencias Alu que se diseminan a lo largo del locus, y que pudieron expandirse al llevarse a cabo distintos eventos de recombinación dentro de la misma región.

También existe un elemento repetitivo Kpn, que se encuentra precediendo al gen hPL₃. Se piensa que este elemento puede participar en la regulación de la transcripción de este gen de alguna manera (Chen, 1988, ver figura 6).

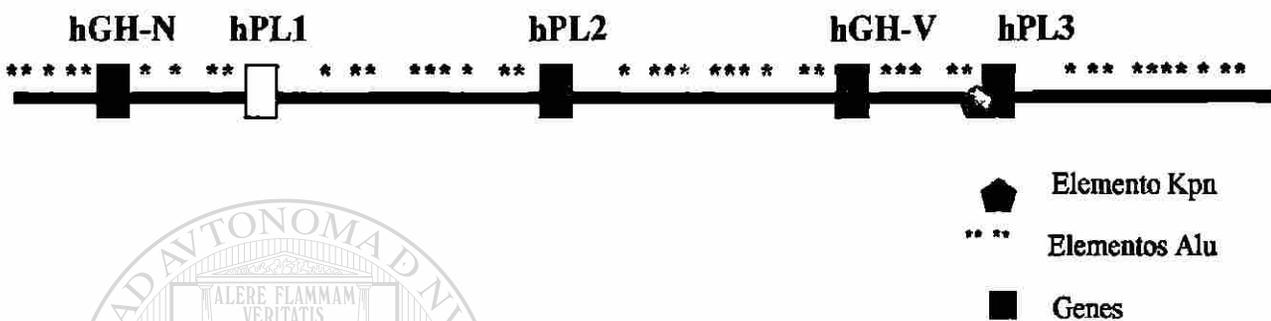


Figura 6. Elementos repetitivos en el locus GH-PL humano. Se muestra la distribución de los distintos elementos Alu y del elemento Kpn.

1.6 Regulación de la expresión del locus humano GH-PL.

Dada la alta similitud entre los genes del locus, debe existir un mecanismo de regulación muy preciso para controlar la expresión de los mismos.

Existe una región promotora proximal que contiene algunos elementos de regulación, y que se localiza en los 300pb que preceden al inicio de cada gen. Ésta es responsable en gran parte de la expresión basal de los genes de este locus. En esta región se encuentra la caja TATA a -30 pb de este sitio de inicio de la transcripción. Además, a ella se unen varios factores de transcripción que regulan la expresión de los genes, como Pit-1 (GHF-1), que tiene dos sitios de unión: entre las posiciones -55 y -90pb, el más próximo, y entre -106 y -131pb, el más distal (Walker y cols., 1991).

Otros sitios de unión para factores transcripcionales en este promotor proximal son: para Sp1 (de -131 a -140pb), para USF/MLTF (-237 a -267pb) y por último, y compitiendo por el sitio entre sí están los sitios para el factor AP-2 y para NF-1/CTF (ver la figura 7).

La región promotora distal se extiende de -2000 a -500pb frente a cada gen de este locus y participa también en la regulación de su transcripción. A esta región, se unen elementos inhibidores que evitan la unión de Pit-1 sobre los promotores de los genes de expresión placentaria (hGH-V y hPLs). Ya que Pit-1 es un factor que se presenta sólo en el tejido hipofisiario, estos elementos evitan que estos genes placentarios se activen en la pituitaria.

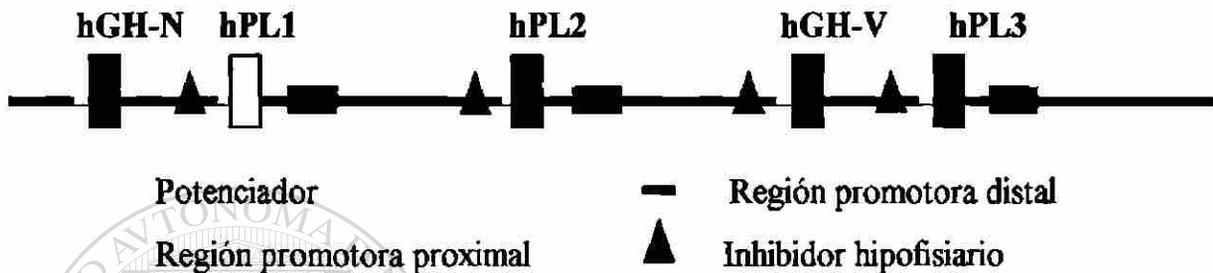


Figura 7. Elementos reguladores de la expresión en el locus GH-PL. Se muestra la localización de elementos potenciadores e inhibidores, así como de los promotores en el locus.

Aunado a esto, existe un elemento potenciador, 2kpb río abajo de los tres genes hPLs. Estos elementos tienen una longitud de 1000pb y son los responsables de la expresión específica en el tejido placentario. Las secuencias potenciadoras que se han encontrado río abajo de los genes hPL₁ y hPL₂ poseen una similitud del 95% con la correspondiente al gen hPL₃ y responden también a proteínas placentarias, sin embargo su actividad es mucho menor a la de hPL₃ (Walker y cols., 1991).

No se ha detectado potenciador que corresponda al gen hGH-V, por lo que se puede así explicar su baja expresión en la placenta, comparada con las de los genes hPL₂ y hPL₃.

Por último, se ha descrito la existencia de una región de control de locus (LCR), que se encuentra de -32kpb a -14.5kpb con respecto al promotor de hGH-N. Se cree que este LCR tiene relación con la activación y la expresión de los genes del locus, pues en ratones transgénicos que contenían el LCR y la mayor parte del locus GH-PL humanos, los genes se expresaron de manera apropiada, en el tejido correspondiente (Su y cols., 2000).

1.7 Los genes del locus GH-PL en el chimpancé.

Como se mencionó, en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL, se tiene evidencia de la existencia de seis genes en el locus GH-PL del chimpancé. Estos seis genes han sido aislados, clonados y secuenciados, y sus secuencias se han comparado con los genes de otras especies de primates, y en especial con los genes propios del humano (ver figura 8), que es la especie más cercana evolutivamente hablando. Algunos de estos genes del locus del chimpancé, como lo son cGHN, cGHV y cPLB, tienen un gen ortólogo en el locus humano (hGHN, hGHV y hPL1, respectivamente). Pero existen tres genes tipo placentario más, el cPLA, cPLD y cPLC, que no tienen su gen ortólogo en el humano.

Por lo tanto, el análisis comparativo de las secuencias en los genes de los loci GH-PL del humano y chimpancé, no permite por sí mismo trazar la evolución de esta región del genoma entre las dos especies.

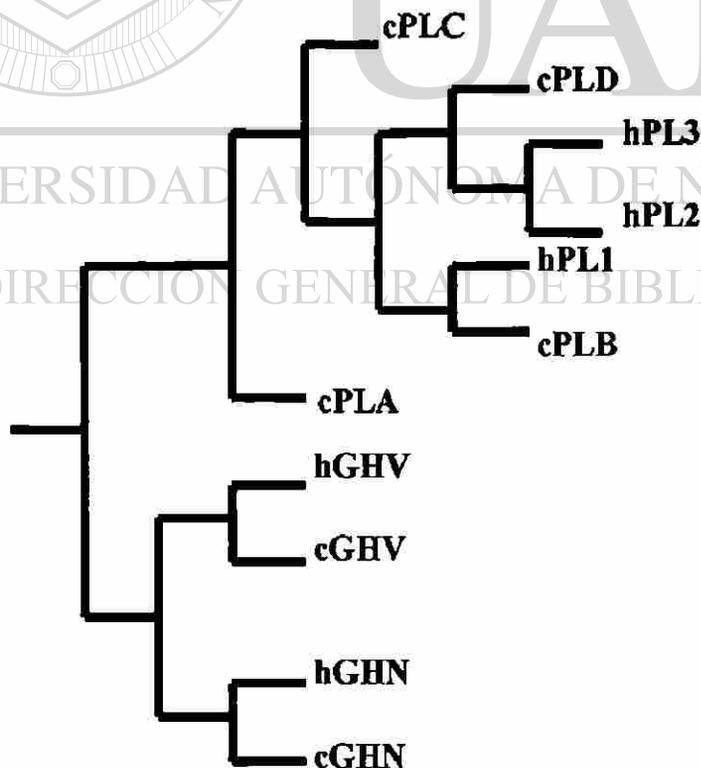
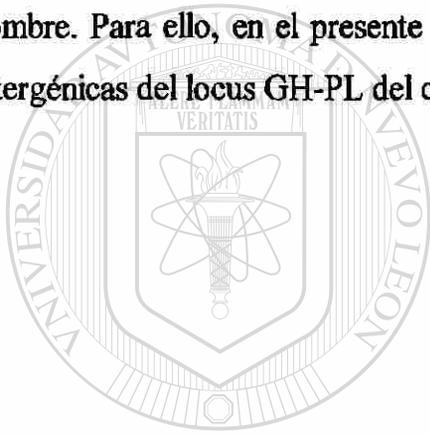


Figura 8. Análisis filogenético de los loci GH-PL en el chimpancé y el hombre. Se observan tres pares de genes ortólogos entre loci: hGHN-cGHN, hGHV-cGHV, hPL1-cPLB y otros genes que no están relacionados directamente entre sí: hPL2 y hPL3 en el humano, y cPLA, cPLC y cPLD en el chimpancé.

1.8 Justificación.

El locus GH-PL presenta una organización diferente entre las especies de primates, por lo cual su evolución es de particular interés en este orden de mamíferos. Los modelos que se han propuesto hasta ahora para explicar la evolución del locus GH-PL en el ser humano, no sustentan algunas de las observaciones que se han hecho sobre los genes del locus, ni la información parcial que se posee en el caso del chimpancé. Por ende, es importante y necesario aportar nuevos elementos que lleven a dilucidar el origen y la evolución del locus GH-PL en el caso de los primates superiores, específicamente en el caso del chimpancé y el hombre. Para ello, en el presente trabajo se abordó el estudio comparativo de las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO SEGUNDO

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Describir las regiones intergénicas del locus GH-PL en el chimpancé (*Pan troglodytes*).

2.2 Objetivos específicos.

- Amplificar por PCR- larga las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé, a partir de ADN genómico.
- Desarrollar un vector que facilite la clonación de dichas regiones intergénicas, basándose en la técnica de recombinación homóloga.
- Obtener las secuencias parciales de las regiones intergénicas clonadas y deducir su posición en el locus GH-PL del chimpancé.
- Detectar la presencia de secuencias potenciadoras e inhibidoras, así como de secuencias repetitivas Alu y Kpn en las regiones intergénicas.
- Comparar el locus del chimpancé y su organización con su contraparte humana, e inferir acerca de la evolución del mismo.

CAPÍTULO TERCERO

ESTRATEGIA GENERAL

Para lograr los objetivos anteriormente planteados, se diseñó la estrategia general que se muestra a continuación (ver figura 9).

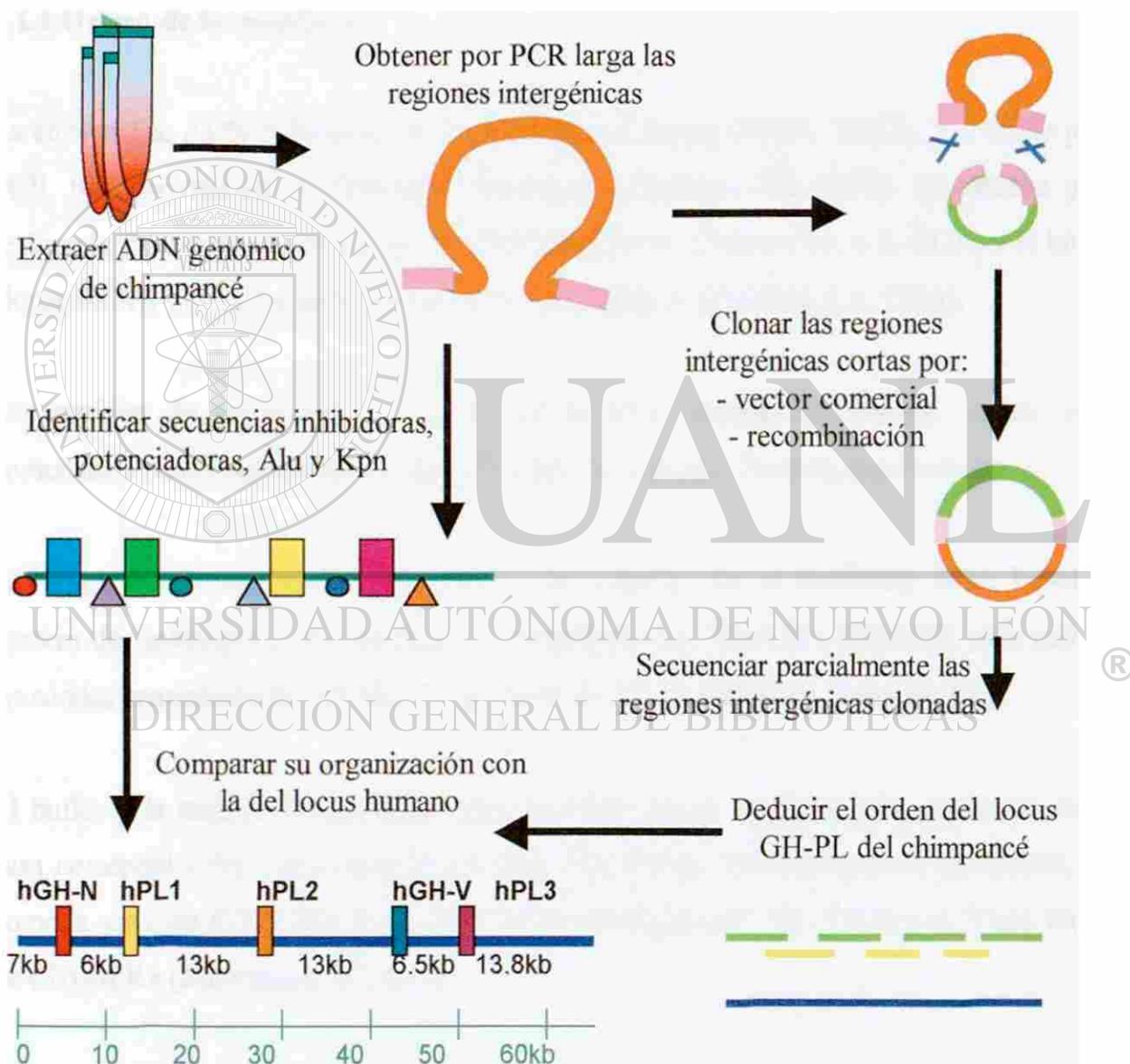


Figura 9. Estrategia General. Se muestran los pasos de la estrategia seguida en el desarrollo de este proyecto: extracción de ADN, obtención de regiones intergénicas por PCR larga, clonación mediante un kit comercial y por recombinación, secuenciación, traslape, identificación de secuencias de interés y comparación general vs. el locus humano.

CAPÍTULO CUARTO

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material.

4.1.1 Origen de los reactivos.

La enzima Taq ADN Polimerasa, la T4 ADN ligasa, cinasa, dNTPs, MgCl₂, y el buffer para PCR 10X provinieron de Promega Corporation (Madison, WI, EUA). El estuche para realizar la PCR-larga se obtuvo de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) y el kit de clonación XL TOPO fue de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

Las enzimas de restricción que se usaron en este proyecto pertenecen a las casas comerciales New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EUA), Invitrogen y Promega.

El kit para construir sondas para hibridación utilizado fue el RadPrime DNA Labeling System de Invitrogen y los nucleótidos radiactivos ([α -³²P]dATP) utilizados para marcar las sondas provinieron de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido).

El buffer y la enzima Thermo Sequenase utilizados en la secuenciación, provenían de la casa comercial USB Corporation (Cleveland, OH, EUA), los terminadores IRDye800, así como la solución STOP IR2 de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, EUA) y el Vivid Violet de CHIMERx (Milwaukee, WI, EUA).

Los reactivos menos especializados, usados para preparar geles, amortiguadores, soluciones diversas y medios de cultivo, provenían de las compañías Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) y Productos Químicos Monterrey (Monterrey, N.L. México).

Los diversos iniciadores utilizados para las reacciones de PCR provinieron de la oligoteca del Departamento de Bioquímica en algunos casos y en otros fueron diseñados específicamente para este proyecto. Las secuencias de estos oligonucleótidos, así como sus nombres se señalan en la tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores para PCR utilizados en el proyecto.

Iniciador	Secuencia	Orientación	Alinea en
Prim	gactagtcggggagtgggccttgggat	Antisentido	Promotor de los genes del locus
ITG10	catggtcgacggcagctgtgggtcta	Sentido	Fin de los genes del locus
88ExIV	ctgctgctcatccagtcatgg	Sentido	Exón IV de los genes del locus
430	ggggtctcgaggactggctatc	Sentido	Inicio de los genes del locus
403	ccgaattccaggagaggcactggga	Antisentido	Fin de los genes del locus
D10	gaagcaggagagcagcccgtagtt	Antisentido	Exón V de los genes del locus
5Ed2	ctgaggtagctcatgcaatcagctctctga	Sentido	Promotor intermedio
5Ed2r	ctgattgcatgagctacctcagcc	Antisentido	Promotor intermedio
5Ed1	aacagaaagtggagaggtgagaggagacact	Sentido	Promotor distal
3Alu	cgtgttgggattacaggcgtgag	Antisentido	Hacia fuera de elementos Alu
5Alu	catgccactgccctccagc	Sentido	Hacia fuera de elementos Alu
111	ggtctcatctttgcggtaccttaaca	Antisentido	Potenciador
114	ggtggtctcgagatataactgaactgc	Sentido	Potenciador
IGP IV	aacgtagaaccgcaccgcatctccctgc	Sentido	Exón IV de los genes del locus
IGCV	caccgctcgcctgttccaggagctagg	Antisentido	Exón II de los genes del locus
M13Fwd	gtaaaacgacggccagtg	Antisentido	Plásmido pCR-XL-TOPO
M13Rev	ggaaacagctatgaccatg	Sentido	Plásmido pCR-XL-TOPO
Pcx 1	cactatcgactacgcgatca	Sentido	Plásmido pBR 322
B3 14	caactccgcgggtcct	Antisentido	Plásmido pBR 322

4.1.2 Material biológico.

Las muestras de sangre de chimpancé (macho y hembra) fueron donadas por el parque zoológico Africam Safari localizado en Valsequillo, Puebla, México, y a partir de éstas se extrajo el ADN genómico.

Los plásmidos utilizados en la clonación fueron el plásmido pCR-XL-TOPO (*Kan^r*) comercial de Invitrogen y el plásmido pBR 322 (*Amp^r*, *Tet^r*), que pertenecía a la plasmidoteca del departamento de Bioquímica.

La bacteria utilizada para la recombinación homóloga fue *Escherichia coli*, cepa BJ5183-AD-1 (*recBC*, *Str^r*) y la cepa que se usó para clonación y propagación fue la XL1-Blue (*recA1*, *Tet^r*), ambas de Stratagene (La Jolla, CA, EUA).

Además se utilizaron los vectores pBShPL3-*NheI-ClaI* y pBShPL3 *enh*, desarrollados en el departamento de Bioquímica y resguardados en su plasmidoteca.

4.2 Equipo.

A continuación se enlista el equipo que se utilizó durante la realización de este proyecto:

- a. Termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems)
- b. Termociclador Hybaid PCR Express (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA)
- c. Termociclador Robocycler 96 (Stratagene)
- d. Cámaras de electroforesis diversos modelos, Fotodyne (Fotodyne, Inc., Hartland, WI, EUA)
- e. Documentador de geles Gel Doc 1000 de Biorad (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA)
- f. Fuentes de poder ISCO 494 (ISCO, Lincoln, NE, EUA), E-C 600 (E-C Apparatus Co., New Haven, CT, EUA), y BRL250 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA)

- g. Parrilla con agitación Corning modelo 320 (Corning Inc. Life Sciences, Acton, MA, EUA)
- h. Congeladores -70°C So-Low, modelo vertical y horizontal (So-Low Environmental Equipment, Cincinnati, OH, EUA)
- i. Congelador -20°C Tor-rey modelo CV14 (TOR-REY, San Nicolás de los Garza, N.L., México)
- j. Refrigerador 4°C GE Excell (General Electric Company, Louisville, KY, USA)
- k. Horno de microondas LG modelo MS-701C (LG Electronics, San Jose, CA, EUA)
- l. Secuenciador automático dNA Sequencer Long Reader 4200 (LI-COR Biosciences)
- m. Agitador de tubos Barnstead Thermolyne modelo MaxiMix (Barnstead International, Dubuque, IA, EUA)
- n. Baño de agua giratorio NBSC (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, EUA)
- o. Baño de agua Precision 188 (Precision, Winchester, VA, EUA)
- p. Placa agitadora Midwest modelo 3520 (Midwest Scientific, St. Louis, MO, EUA)
- q. Potenciómetro Beckman modelo 320 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA)
- r. Centrífugas Eppendorf modelo 5402 y 5415 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)
- s. Centrífuga con refrigeración Allegra 21R (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA)
- t. Balanza analítica Ohaus modelo AP110S (OHAUS, Pine Brook, NJ, EUA)
- u. Balanza granataria Ohaus modelo TS4KD (OHAUS, Pine Brook, NJ, EUA)
- v. Secador de geles Labconco (Labconco, Co., Kansas City, MI, EUA)
- w. Evaporador con vacío y centrífuga Labconco (Labconco, Co., Kansas City, MI, EUA)
- x. Electroporador de micropulso Biorad (BIO-RAD)
- y. Espectrofotómetro UV Beckman DU70 (Beckman Coulter)
- z. Incubadora rotatoria Robbins para hibridación modelo 310 (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, EUA)
- aa. Termoagitador Eppendorf modelo 5436
- bb. Campana con luz UV CBS modelo P-036-02 (CBS Scientific Co., Del Mar, CA, EUA)

El procesamiento de los datos se realizó en equipo de cómputo con plataforma PC, utilizando distintos programas: Microsoft Word, Power Point y Excel en sus versiones 2000 y millenium (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA), Adobe Acrobat Reader versión 5.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA), Corel Photo Paint versión 8, (Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada), también se utilizó el escáner HP scanjet 7450c y su paquete de aplicación (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EUA).

También se utilizaron los navegadores Internet Explorer versión 5.5 y el MSN Explorer versión 6.0 (ambos de Microsoft Corporation).

Para el análisis se utilizaron los siguientes programas para Biología Molecular: Amplify versión 1.2b (Univ. de Winsconsin, Madison, WI, EUA), ClustalW v.1.8 (EMBL, Heidelberg, Alemania), DNA Strider v. 1.1, (Institut de Recherche Fondamentale-CEA-France), BLAST (NCBI, NLM, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), RestrictionMapper v.2, BCM Search Launcher (Baylor College of Medicine, Houston, TX, EUA).

4.3 Métodos.

4.3.1 Obtención y cuantificación del ADN.

4.3.1.1 Extracción de ADN genómico.

Se extrajo ADN genómico a partir de coágulo sanguíneo de muestras de sangre periférica de chimpancé. Esta extracción se hizo por dos técnicas: una técnica para extracción de ADN de tejido (Gross-Bellard, y cols., 1973) y otra para extracción a partir de coágulo utilizada en química forense (Sambrook, y cols., 1990).

La primera técnica se hizo de la siguiente manera. Se pesó el coágulo y se molió en un mortero frío y estéril (conservado a -70°C hasta su uso). Posteriormente se adicionó 1.2 ml de buffer de lisis (NaCl 0.1M, Tris-HCl pH 8 0.01M, EDTA pH 8 0.025M, SDS 0.5%, y

Proteinasa K 0.1mg/ml) por cada 100mg de tejido. Una vez mezclados, se incubaron a 50°C por toda la noche, con agitación lenta. Al término de la incubación, se hizo una extracción añadiendo medio volumen de fenol y medio volumen de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1), se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. Una vez hecho esto, se extrajo una vez mas sólo con medio volumen de SEVAG y se volvió a centrifugar por 15 min a 5000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se precipitó con dos volúmenes de etanol al 100% conservado a -20°C hasta su uso y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M. Se mezcló e incubó a -20°C por una hora y se centrifugó por 15 min a 14000 rpm. Tras hacer esto, se descartó el sobrenadante y se añadió etanol al 70% para quitar el exceso de sales, después se centrifugó una vez más, a 14000 rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire y a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en agua mQ.

La extracción de ADN a partir de coágulo con la técnica forense se realizó como sigue. Se cortó el coágulo (de aproximadamente 100µl) en pequeños pedazos en una caja Petri y se resuspendió en 500µl de DLB (buffer de lisis desnaturalizante: Tris-HCl pH 7.4 0.01M, NaCl 0.01M, EDTA pH 8 0.01M). Se añadieron entonces 50µl de SDS al 10% y 5µl de proteinasa K 20 mg/ml. Una vez mezclados, se incubaron a 56°C toda la noche con agitación suave. Tras concluir la incubación, se hizo una extracción añadiendo 20µl de NaCl 5M y 575µl de fenol-SEVAG (1:1), mezclando por inversión tras la adición de cada reactivo. Una vez añadidos estos reactivos, se centrifugó a 14000rpm por 15 min. Se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, se añadió 1 ml de etanol al 96% y se guardó a -20°C por dos horas. Se centrifugó nuevamente por 15min a 14000 rpm. Se decantó el etanol, se lavó con etanol al 70% y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Por último se resuspendió la pastilla en agua mQ y se guardó a -20°C hasta su utilización.

4.3.1.2 Extracción de ADN plasmídico.

Se levantó una colonia de las bacterias que contenían el plásmido y se cultivó por toda la noche en tubos con 4 ml de medio LB estéril (10g bactotripton, 10g NaCl y 5g de extracto de levadura en un litro de agua destilada). De éstos, se tomaron 1.5 ml y se colocaron en un

tubo Eppendorf de 2 ml, y se centrifugaron por 2 min a 14000 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante por aspiración. Se le añadieron a la pastilla 100 µl de la solución I (glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl pH 8 25mM), se agitó el tubo hasta resuspender la pastilla y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron al tubo 200 µl de la solución II (SDS 1% y NaOH 0.2N), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min. Una vez concluido el tiempo, se añadieron 150 µl de la solución III (acetato de amonio 7.5M), se agitó por inversión y se incubó en hielo por 10 min. Tras este tiempo se centrifugó el tubo a 14000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml y se desechó la pastilla. Se hizo una extracción con medio volumen de fenol y medio volumen de SEVAG. Se invirtió varias veces y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se añadió medio volumen de SEVAG, se centrifugó una vez más, por 15 min a 14000 rpm. Una vez hecho esto, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml y se añadieron dos volúmenes de etanol frío al 100% (conservado a -20°C) y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M. Se dejó precipitar el ADN a -20°C por una hora y terminado este tiempo se centrifugó el tubo a 14000 rpm por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de etanol al 70% para lavar bien la pastilla. Se centrifugó una vez más por 15 min a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se añadieron de 20 a 50 µl de agua mQ, según el tamaño de la pastilla.

4.3.1.3 Electroforesis y cuantificación del ADN.

El ADN (genómico, plasmídico y obtenido por PCR) se analizó por medio de la técnica de electroforesis en gel, utilizando geles de agarosa de concentración variable, dependiendo del tamaño del fragmento, yendo desde 0.7-0.8% para plásmidos, ADN genómico y fragmentos mayores a 3000pb, entre 1.0 y 1.5% para fragmentos entre 3000 y 500pb y hasta 2-2.5% para ADN de tamaño menor a 800pb.

Los geles se prepararon pesando la cantidad necesaria de agarosa (en gramos) y disolviéndola con el volumen necesaria de TBE 1X (0.09M Tris, 0.09M ácido bórico, EDTA 0.002M, ajustado a pH 8.3) para alcanzar el porcentaje según la resolución

requerida. Tras disolver la agarosa, las soluciones se calentaron en el horno de microondas de uno a dos min y se colocaron en los moldes correspondientes hasta solidificar.

Una vez listos los geles, se colocaron en cámaras de electroforesis y se cubrieron por completo con buffer TBE 1X. Las muestras de ADN se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%) y se depositaron en el gel, junto con algún marcador de peso molecular o ADN de referencia, según el tamaño de ADN a analizar. Se inició la electroforesis aplicando un voltaje inicial de 60-70V hasta que las muestras entraron por completo al gel, y posteriormente aplicando un voltaje mayor (no más de 120V, según la cámara) hasta obtener la migración deseada para el análisis.

Tras correr el ADN en el gel, este último se depositó en una solución de bromuro de etidio (2µg/ml) por 10 min, se lavó para eliminar el exceso de bromuro, se observó y analizó bajo luz UV y la imagen se registró con el programa Molecular Analyst del Gel Doc.

La cuantificación de ADN se hizo por medio de espectrofotometría UV. Se utilizó la lámpara de luz UV a longitudes de onda de 260 y 280 nm y celdas de cuarzo para depositar las muestras. Las muestras se diluyeron 1000 o 500 veces, para hacer más precisas las lecturas, y también se hicieron lecturas a tres diluciones distintas.

Se hizo el cálculo de la concentración del ADN con la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}]_{\text{ng}/\mu\text{l}} = A_{260} * 50 * \text{F.d. ADN}$$

Donde $[\text{ADN}]_{\text{ng}/\mu\text{l}}$ es la concentración de ADN en nanogramos por microlitro, A_{260} es la lectura de absorbancia a 260nm y F.d. es el factor de dilución de la muestra.

Por otro lado la razón de A_{260}/A_{280} es el índice de pureza de la muestra, siendo la óptima mayor a 1.75, por lo que se trataron de utilizar muestras con esta pureza en la mayoría de los casos.

4.3.2 Amplificación por PCR larga de las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé.

A partir de ADN genómico de chimpancé se amplificaron las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé. La amplificación se realizó por medio del kit TOPO® comercial para PCR larga. Se utilizaron los iniciadores 88ExIV, ITG10 y Prim que ya existían en la oligoteca del departamento de Bioquímica y se diseñaron dos iniciadores nuevos: IGC-V e IGP IV para amplificar estas regiones. En la figura 10 se muestran las regiones en las que se alinean los iniciadores antes descritos.

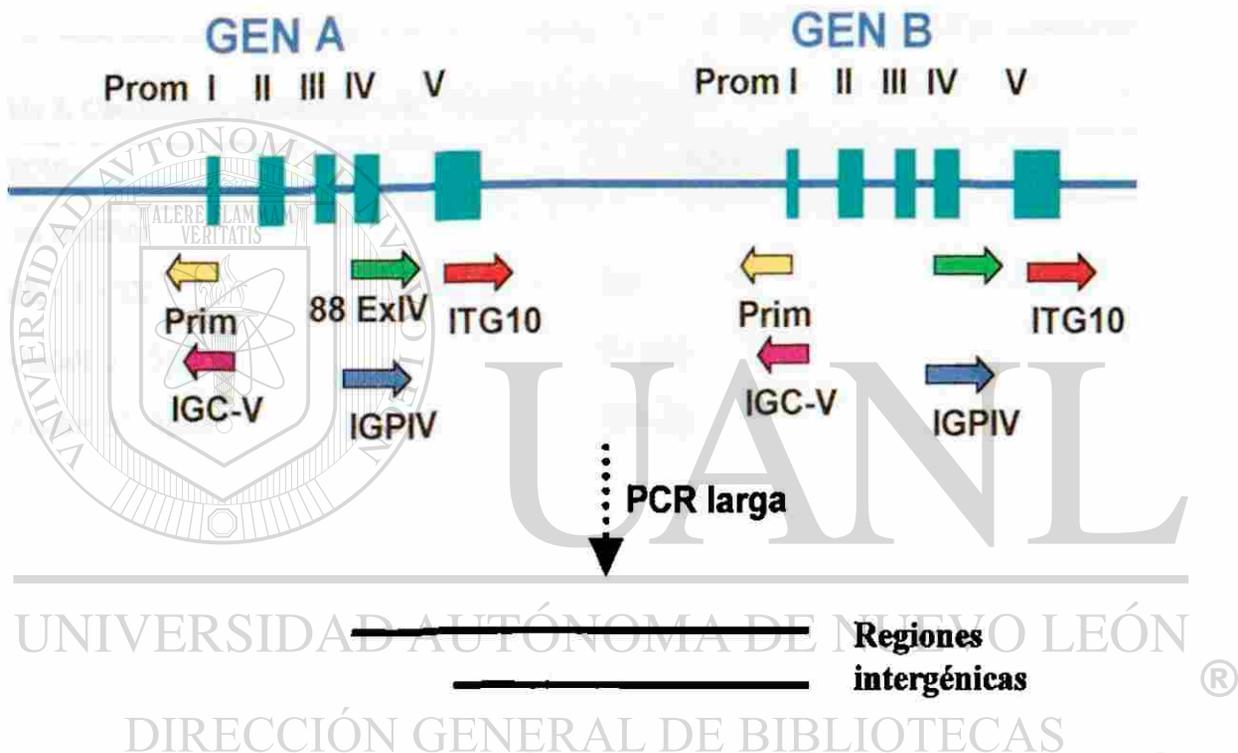


Figura 10. Regiones de alineamiento para los iniciadores usados en PCR larga. Se muestran las regiones en las que se alinean los iniciadores utilizados para la PCR larga: los iniciadores 88ExIV e IGPIV alinean sobre el exón IV de los genes del locus y el ITG10 se alinea al final del exón V. El iniciador Prim se alinea sobre el promotor y el IGC-V sobre el intrón I de los genes del locus.

4.3.2.1 Condiciones óptimas de amplificación para la PCR-larga.

Se estandarizó la reacción de PCR larga en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 con los distintos juegos de iniciadores que se mencionaron, para amplificar así las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé. A continuación se presenta el programa utilizado (ver tabla 2), así como la composición final de la reacción de PCR larga con la que se obtuvieron las regiones intergénicas (ver tabla 3).

Tabla 2. Programa de PCR larga utilizado para la obtención de las regiones intergénicas.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización previa (capa inferior)	80°C	5 min
Desnaturalización inicial	94°C	30 s
16 ciclos	94°C	30 s
	64°C	10 min
12 ciclos	94°C	30 s
	64°C	10 min, incrementando 15s/ciclo
Extensión final	72°C	15 min

Tabla 3. Condiciones óptimas para la reacción de PCR larga.

Reactivo	Concentración final
Capa Inferior	
Buffer 3.33X	1X
Iniciador 3', 5µM	0.4µM
Iniciador 5', 5µM	0.4µM
Mg(OAc) ₂ , 25mM	1.1mM
dNTPs, 10mM	200µM
Agua mQ estéril cbp	10 µl
Se añadió una perla de cera a estos reactivos y se realizó la desnaturalización previa	
Capa Superior	
Buffer 3.33X	1X
RTth/Vent ADN Polimerasa, 2U/µl	0.128U
ADN genómico, 250ng/µl	10 ng/µl
Agua mQ estéril cbp	15 µl
Se colocó sobre la perla tras desnaturalización previa y se corrió el resto del programa. El volumen final fue de 25 µl.	

Los productos obtenidos de la PCR-larga se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.7-0.8%, teñidos posteriormente con bromuro de etidio. Por medio de un marcador de peso molecular se estimó el tamaño de los productos que se amplificaron.

4.3.3 Clonación de las regiones intergénicas.

4.3.3.1 Clonación por medio de un kit TOPO® para productos de PCR larga.

Las regiones intergénicas obtenidas fueron clonadas por medio del kit de clonación de PCR-larga TOPO®, de la manera que a continuación se describe. Los productos amplificados fueron precipitados directamente añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto frío, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 1 μ l de Vivid Violet y se colocaron a -20°C por una hora. Posteriormente el tubo se centrifugó por 15 min a 14000 rpm, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 15 min a 14000 rpm. Tras este tiempo, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 5 μ l de agua mQ.

Una vez purificados los productos amplificados, se procedió a añadir adenilatos (A) a sus extremos para hacerlos complementarios a los timidilatos de los extremos del vector TOPO®. Esto se hizo colocando en un tubo de PCR los reactivos enlistados en la tabla 4, para tener un volumen final de 50 μ l, y posteriormente se incubó a 72°C por dos horas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 4. Preparación del inserto A.

Reactivo	Volumen
ADN purificado	5 μ l
Taq ADN polimerasa, 5U/ μ l	1.25 μ l
MgCl ₂ , 25mM	3 μ l
dATP, 10mM	1 μ l
Buffer 10X	5 μ l
Agua mQ cbp	50 μ l

Una vez añadidas las A, el ADN se volvió a precipitar de la forma antes mencionada, para purificarlo. El inserto A se conservó a -20°C hasta su uso.

Para clonar los productos amplificados, se siguió el siguiente protocolo. Se colocaron de 3 a 4 μl de inserto (producto amplificado + A) a temperatura ambiente y se le adicionó 1 μl de vector TOPO®, mezclando bien. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 5 min y posteriormente se le añadió 1 μl de solución STOP del kit. 5 μl de reacción sirvieron para transformar 100 μl de bacterias electrocompetentes (conservadas en hielo durante el proceso) incluidas en el kit. La electroporación se llevó a cabo con un pulso de corriente (200/500 Ω , 25 μF , 2.5 V) e inmediatamente se añadieron a la celda 0.45 ml de medio SOC (para un litro: 20g triptona, 5g extracto de levadura, 0.5g NaCl, se esteriliza en autoclave y antes de usar se añaden 10 ml de MgCl_2 1M, 10 ml de MgSO_4 1M y 1 ml de glucosa 2M esterilizada por filtración). El medio y las bacterias se transfirieron a un tubo Eppendorf nuevo y se incubaron por una hora a 37°C con agitación.

Concluido este tiempo, 50-100 μl de las bacterias se plaquearon en cajas Petri con medio LB-agar estéril (10g NaCl, 10g bactotripton, 5g extracto de levadura, 15g bactoagar, para un litro) y kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las placas se incubaron a 37°C por toda la noche.

A la par de esta clonación, las secuencias reportadas para las dos regiones intergénicas cortas del locus humano se analizaron para encontrar algunas enzimas de restricción que pudieran diferenciar entre ambas, y por homología diferenciar las dos regiones intergénicas cortas en el chimpancé, que eran las mayoritarias en la amplificación. Se encontró que la enzima *Cla* I en el caso del ser humano, presenta un sitio de corte en una de las regiones intergénicas cortas y en la otra no se encuentra. Las regiones intergénicas mayoritarias (2 cortas) del chimpancé se digirieron con la enzima *Cla* I. Tras la digestión se hizo una purificación, adición de A, otra purificación más y finalmente se clonó con el vector TOPO®, de la misma manera en que se describió anteriormente.

4.3.3.1.1 Selección de las clonas recombinantes.

Las colonias seleccionadas en ambas clonaciones se crecieron en tubos conteniendo 4 ml de medio LB estéril con kanamicina 50µg/ml a 37°C con agitación por 16h. Se hizo a estos cultivos extracción de ADN plasmídico y posteriormente los plásmidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7-0.8%, comparándose con un plásmido TOPO® sin inserto (3.5kpb). Solamente aquellos plásmidos que presentaban un tamaño mayor al original (retraso en la migración con respecto a TOPO®) fueron considerados para una caracterización más profunda.

4.3.3.2 Desarrollo de un vector para clonación por recombinación homóloga.

La clonación por recombinación ha estado tomando auge en los últimos años, ya que permite introducir grandes fragmentos de manera específica (Castro y Villarreal, 2000). Se desarrolló un vector que facilitara la clonación por recombinación homóloga introduciendo regiones homólogas a los extremos de las regiones intergénicas (Figura 11).

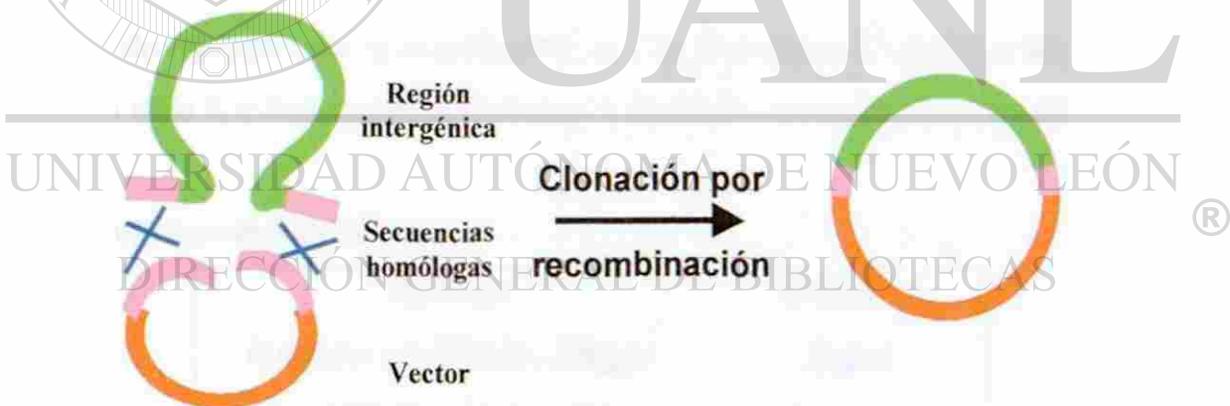


Figura 11. Clonación por recombinación. El vector debe contener secuencias homólogas a los extremos de las regiones intergénicas, para hacer factible la clonación por recombinación homóloga, además de un(os) sitio(s) único(s) de restricción, que permita(n) linearizarlo.

4.3.3.2.1 Obtención del vector en TOPO®.

Para obtener el vector que sólo contuviera regiones homólogas a los extremos de las regiones intergénicas, era necesario eliminar gran parte de la región intergénica y conservar sólo sus extremos. Al no conocer la secuencia completa de la región intergénica y por tanto,

no poder utilizar enzimas de restricción para esta subclonación, se analizaron los iniciadores que pudieran amplificar la región que necesitábamos conservar en estas clonas.

Los iniciadores D10 y 430 (ver figura 12) se alinean en los extremos de la región intergénica y amplifican un producto que contiene el esqueleto del vector topo flanqueado por los extremos de las regiones intergénicas.

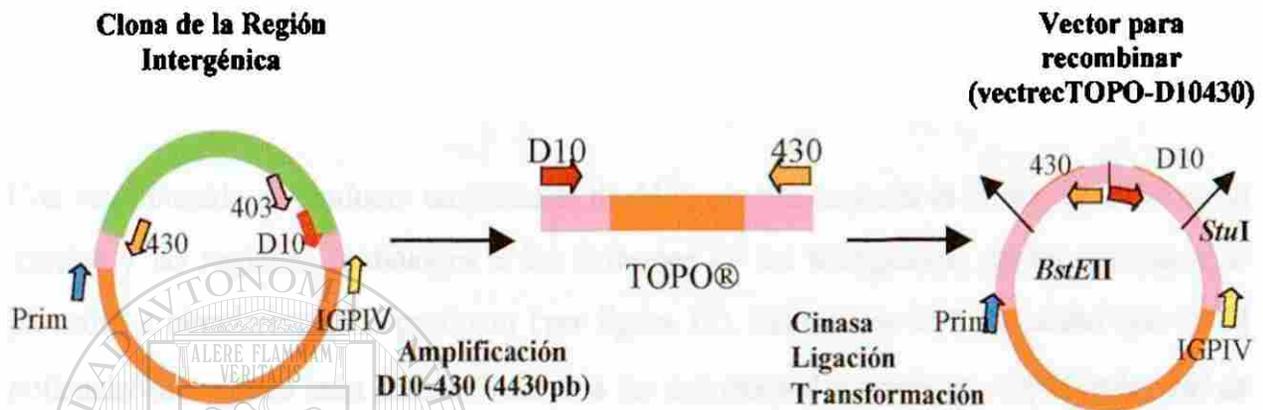


Figura 12. Obtención del vector para recombinación. Se amplificó la clona con la región intergénica por medio de los iniciadores D10-430. Posteriormente el producto se ligó para obtener el nuevo vector para recombinación.

La mezcla de reacción para la amplificación con los iniciadores D10-430 se hizo como se indica en la tabla 5, y el programa para el termociclador Robocycler está en la tabla 6.

Tabla 5. Condiciones de amplificación.

Reactivo	Conc. final
Producto amplificado, 50ng/μl	2ng/μl
Taq ADN Polimerasa, 5U/μl	0.1U/μl
MgCl ₂ , 25mM	2mM
DNTPs, 10mM	0.3mM
Buffer 10X	1X
Iniciador 5', 5μM	0.5μM
Iniciador 3', 5μM	0.5μM
Agua mQ estéril cbp	25μl

Tabla 6. Programa de PCR para la amplificación.

Paso	Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
30 ciclos		
Desnaturalización	94°C	30 s
Alineamiento	58°C	30 s
Extensión	72°C	4 min
Extensión final	72°C	5 min

Una vez obtenido el producto amplificado de 4430 pb que contenía el vector TOPO® en su interior y las regiones homólogas a los extremos de las intergénicas en los extremos, se procedió a circularizar este producto (ver figura 12). Primero se hizo un cóctel con la T4 polinucleótido cinasa para añadir fosfatos a los extremos del producto amplificado: 5µl de producto D10-430, 1µl de cinasa, 1µl de buffer 10X que contenía ATP y agua miliQ para completar 10µl. Se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente se añadieron 2µl de T4 ligasa que es compatible con el buffer de la cinasa y se incubó a 16°C por toda la noche. Una vez ligado el vector, éste se utilizó para transformar bacterias calcio-competentes (ver sección 4.3.3.2.3) y así poder propagarlo.

El vector resultante, vectrecTOPO-D10430, tiene dos sitios únicos de corte (*BstEII* y *StuI*) que pueden ser utilizados para su posterior linearización (ver figura 12), antes de la transformación.

4.3.3.2.2 Subclonación en vector pBR.

En reportes que se han hecho acerca de la clonación por recombinación (Castro-Peralta y Villarreal, 2000), se menciona que los vectores de bajo número de copias son más eficientes en este tipo de sistemas. Por lo tanto, decidimos subclonar los fragmentos homólogos que ya teníamos en un vector TOPO® (de alto número de copias) en un vector de bajo número de copias. Se seleccionó para este fin el pBR 322 que se encontraba disponible en el laboratorio.

La subclonación se realizó entre los sitios *EcoRV* y *HindIII* que son únicos para ambos vectores: TOPO y pBR 322. El sitio *EcoRV* es romo y el sitio *HindIII* cohesivo, por tanto, al cortar con ambas enzimas ningún vector se podría religar consigo mismo (Figura 13).

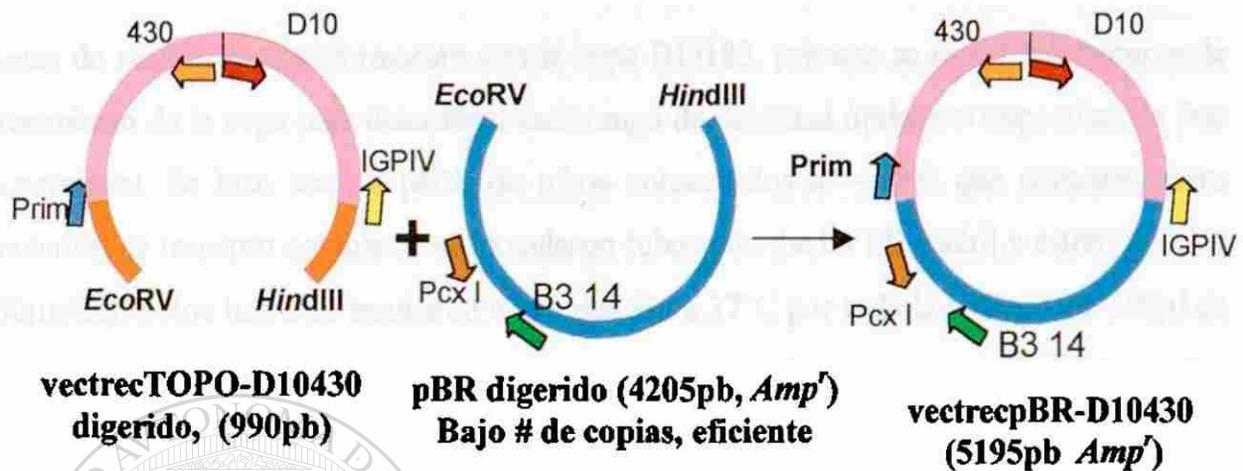


Figura 13. Subclonación de vector vectrecTOPO-D10430 a vectrecpBR-D10430. Se digirieron vectrecTOPO-D10430 y pBR322 con *EcoRV* y *HindIII*, y se ligaron, esperando obtener el vectrecpBR-D10430 de 5195pb, con el gen de resistencia hacia ampicilina y las secuencias homólogas de interés.

Las digestiones se hicieron por separado, colocando 5µl del vector (pBR322 ó vectrecTOPO-D10430), 1µl de *HindIII*, 1µl de *EcoRV*, 1µl de Buffer 2 de NEB, 0.1µl de BSA y agua para completar 20µl. Se incubaron a 37°C por toda la noche, se verificó que se hubieran linearizado ambos vectores, y posteriormente se purificaron y ligaron. La purificación se hizo co-precipitando los vectores (mismo procedimiento que en la sección 4.3.3.1) y tras resuspender la pastilla, se añadió ligasa (1µl) y su buffer, hasta tener un volumen final de 10µl, se incubó a 16°C toda la noche y posteriormente se introdujo la ligación en bacterias calcio-compentes (Ver 4.3.3.2.3). De las colonias seleccionadas se extrajo el ADN plasmídico, para determinar por migración, cortes enzimáticos (*HindIII* y *EcoRV*) y PCR, cuáles eran las colonias positivas para la subclonación.

Para verificar, no sólo por tamaño, el éxito de la subclonación, se hicieron varias amplificaciones tanto en el vector original como en las clonas candidatas. Se hicieron las mezclas de reacción para 4 juegos de iniciadores (figura 13): Prim-IGPIV, Prim-430, D10-

IGPIV y PcxI-B314 según el procedimiento y el programa de la sección 4.3.3.2.1, pero el tiempo de extensión fue de 1.5min y la temperatura de alineamiento de 56°C.

4.3.3.2.3 Preparación de células BJ5183 calcio-competentes.

Antes de realizar la transformación con la cepa BJ5183, primero se estableció la curva de crecimiento de la cepa para determinar cuál rango de densidad óptica correspondía a la fase exponencial. Se hizo esto, a partir de tubos conservados a -70°C que contenían estas bacterias, se tomaron colonias y se inocularon tubos con medio LB estéril y estreptomicina (50µg/ml). Estos tubos se incubaron con agitación a 37°C por toda la noche. Con 500µl de estos tubos, se inocularon matraces conteniendo 50 ml de LB y estreptomicina (50µg/ml) y se incubaron a 37°C con agitación. Se leyó la densidad óptica del cultivo en el espectrofotómetro a 600nm cada media hora, hasta que ésta permaneció constante. Una vez que se obtuvieron los valores, se trazó una curva y se determinó la densidad óptica óptima para la transformación.

El procedimiento utilizado para preparar las bacterias calcio-competentes en las cepas recombinante (BJ5183) y no recombinante (XL1-blue) se describe a continuación. Se tomaron colonias de la cepa en cuestión, conservadas a -20°C ó -70°C y se inocularon tubos conteniendo medio LB (XL1-blue) o LB más estreptomicina (BJ5183). Estos tubos se incubaron a 37°C por toda la noche con agitación. Una vez terminado este tiempo, se tomaron 0.5 ml del tubo para inocular un matraz con 50 ml de LB(XL1-blue) o LB más estreptomicina (BJ5183). Se siguió el crecimiento del cultivo a 600nm en el espectrofotómetro hasta lograr la densidad óptica adecuada para cada cepa.

Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada, el matraz conteniendo el cultivo se colocó en hielo por 10 min y una vez concluido el tiempo, el cultivo se pasó a un tubo Falcon de 50 ml, frío y estéril. Se centrifugó a 5000 rpm por 5min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla suavemente en 20 ml de CaCl₂ 0.1M frío. Esto se incubó en hielo por 20 min y luego se centrifugó a 5000 rpm por 5min. Por último se resuspendió la pastilla

en 1 ml de CaCl_2 0.1M frío y se conservaron las células en hielo hasta su transformación (máximo unos 3 ó 4 días).

Para la transformación de las células competentes (de ambas cepas), se utilizó el mismo procedimiento, con algunas variantes que se describen a continuación. Se tomaron 100 μl de las células calcio-competentes y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml frío y estéril. Todo el manejo se hizo con puntillas frías, conservadas a -20°C . Posteriormente se adicionaron de 1 a 5 μl del vector (XL1-blue) o de los fragmentos (en el caso de las células recombinantes BJ5183) que se iban a introducir a las células. Se cerraron los tubos y se conservaron en hielo por 30 min (XL1-blue) o 45 min (BJ5183). Posteriormente se realizó un choque térmico, se colocaron los tubos a 42°C exactamente por 90 s y se volvieron a colocar en hielo por 2 min. Concluido este tiempo a los tubos se les adicionó 0.8 ml de medio LB (en el caso de XL1-blue) o medio SOC (BJ5183). Se incubaron con agitación a 37°C por 1 h (XL1-blue) o por 30 min (BJ5183).

Los tubos se centrifugaron por 2 min a 14000 rpm. Se quitó casi todo el sobrenadante y se resuspendieron las células en unos 200 μl del medio. Se colocaron unos 150 μl de estas células en placas Petri que contenían LB-agar estéril y distintos antibióticos, según el vector que se estaba transformando. Se distribuyeron las células en toda la superficie con un asa bacteriológica estéril, se taparon las cajas, se esperó 5 min y posteriormente se invirtieron las cajas, e incubaron a 37°C por toda la noche.

4.3.3.2.4 Ensayos de transformación de las células BJ5183 calcio-competentes.

Con las células BJ5183 competentes y el vector para recombinar pBRrec, se hicieron varios ensayos para probar el funcionamiento del vector. Estos ensayos se hicieron con la región intergénica corta tipo I reamplificada a partir de las clonas antes mencionadas, como se indica en la sección 4.3.2.1 y por otro lado con el vector linearizado (obtenido al amplificar vectrecpBR-D10430 con D10 y 430) según lo indicado en la sección 4.3.3.2.1.

En un primer ensayo se mantuvo constante la relación molar entre el vector y la región intergénica, que fue de 1:2, y varió la cantidad de ADN total, yendo desde los 3.5ng hasta los 350ng totales. Con estas condiciones se transformaron las células BJ5183 competentes.

En un segundo ensayo, variando la relación molar vector: región intergénica, desde 1:1 hasta 1:5, y manteniendo una base constante de 100ng de ADN del vector linearizado, también se transformaron células BJ5183. Se incluyeron además dos controles: el vector linearizado sólo, para calcular el “ruido” que pudiera hacer una recombinación sobre sí mismo, y otro que únicamente contenía la región intergénica.

4.3.3.2.5 Selección de las clonas recombinantes.

Después de transformar las células BJ5183 competentes, las colonias resultantes fueron examinadas por medio de PCR. A las colonias candidatas se les hizo un “estudio rápido”. Primero cada una de las colonias se disolvió en 10µl de agua miliQ, de éstos 5µl se conservaron a 4°C para poderlos sembrar en medio LB posteriormente y 5µl se sometieron a un tratamiento para lisar las bacterias. Este tratamiento consistió en poner dentro de un tubo de PCR los 5µl de bacterias con una gota de aceite mineral, y someter los tubos al programa siguiente: 5min a 94°C, 1.5min a 50°C, 1.5min a 94°C, 1.5min a 45°C, 1min a 94°C y 1min a 40°C en el Robocycler. Una vez lisadas las bacterias, a los tubos de PCR se les adicionaron los reactivos suficientes (como se indica en el apartado 4.3.3.2.1) para hacer una amplificación con los iniciadores 5Ed2-Prim. La reacción se llevó a cabo a 58°C y con un tiempo de extensión de 1.5min.

Se añadieron dos controles positivos, la clona que contenía una región intergénica del chimpancé, que generaría una banda de 1100pb y una clona humana (pBShPL3-enh), que generaría una banda de 1300pb, y además un control negativo, el vectrecpBR-D10430 que no debería generar bandas. Los productos de amplificación fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa.

4.3.4 Caracterización enzimática de las regiones intergénicas clonadas.

Las clonas que contenían un inserto fueron reamplificadas con los iniciadores que las generaron: IGPIV-Prim e IGPIV-88ExIV, y los productos obtenidos fueron caracterizados por medio de digestiones con enzimas de restricción. En la tabla 7 se muestran las distintas condiciones de reacción para las enzimas *Pst*I, *Eco*RV, *Xba*I y *Sma*I.

Tabla 7. Condiciones de digestión enzimática de los insertos clonados.

Temperatura	37°C	37°C	37°C	25°C
Enzima NEB	<i>Pst</i> I, 1µl	<i>Eco</i> RV, 1µl	<i>Xba</i> I, 1µl	<i>Sma</i> I, 1µl
Buffer NEB	#3, 1µl	#3, 1µl	#2, 1µl	#4, 1µl
Prod. Amplificado	4µl	4µl	4µl	4µl
Agua mQ	3.9µl	3.9µl	3.9µl	4µl
BSA	0.1µl	0.1µl	0.1µl	-
Vol. Final	10µl	10µl	10µl	10µl

4.3.5 Obtención y caracterización de la región promotora y la región final del gen.

Los insertos clonados se caracterizaron también por medio de PCR. Se amplificaron la secuencia 5' correspondiente a la parte final del gen, con los iniciadores IGPIV-403, y la secuencia 3' que corresponde a la región promotora del siguiente gen, con los iniciadores 430-Prim. Ambas amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador Robocycler, con una temperatura de alineamiento de 58°C, utilizando un tiempo de extensión de 1 minuto, según las condiciones y el programa descritos en la sección 4.3.3.2.1.

Una vez obtenidas la región promotora y la región final del gen de las regiones intergénicas clonadas, se procedió a caracterizar cada una con diferentes enzimas de restricción. Lo anterior con el fin de diferenciarlas entre sí por una parte y además para relacionarlas con los patrones de corte ya identificados para cada uno de los genes clonados y secuenciados que ya existían en el laboratorio.

La parte del promotor se caracterizó con las enzimas *BanI*, *BglII*, *BstNI* y *MnII* y la parte final del gen con *BglII*, *RsaI*, *MspI* y *AvaII*. En todos los casos se preparó un cóctel con 4 μ l del producto amplificado, 1 μ l de enzima, 1 μ l de buffer 10X correspondiente, 0.1 μ l de BSA para las enzimas *MnII* y *BstNI*, y agua miliQ hasta completar 10 μ l.

Las digestiones se llevaron a cabo a la temperatura óptima señalada para cada enzima de restricción. Una vez concluido el tiempo de digestión (12-16h) se analizaron los fragmentos por medio de electroforesis en gel de agarosa.

4.3.6 Identificación de secuencias potenciadoras, inhibidoras, Alu y Kpn en el locus GH-PL del chimpancé.

Las secuencias potenciadoras, inhibidoras y Alu se detectaron por medio de hibridación, y la secuencia Kpn se detectó con PCR y secuenciación, como se describe a continuación.

4.3.6.1 Obtención de sondas.

Se obtuvieron las sondas para el potenciador, inhibidor y la secuencia repetitiva Alu a partir de clonas con ADN de origen humano que pertenecían al departamento de Bioquímica.

4.3.6.1.1 Sonda del inhibidor.

La sonda para el inhibidor se obtuvo a partir de la clona pBShPL3-*NheI-ClaI*, amplificando con los iniciadores 5Ed1-3Alu (según la reacción y el programa descritos en 4.3.3.2.1). La temperatura de alineamiento fue de 56°C y el tiempo de extensión de 1min. Se obtuvo un fragmento de 1075pb. Este fragmento se digirió con la enzima *BanI*, y los productos de digestión se separaron por medio de un gel de agarosa al 2.5%. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y de todas las bandas se seleccionó la de 578pb que contenía el inhibidor.

Esta banda se purificó cortándola con un bisturí estéril, y posteriormente purificando el ADN por medio de fibra de vidrio. El proceso fue el siguiente: una vez seccionada la banda, ésta se cortó en pequeños pedazos y se colocó en un tubo Eppendorf estéril

perforado que contenía fibra de vidrio siliconizada. La agarosa conteniendo ADN se centrifugó a 14000 rpm por 15min, posteriormente se le hicieron dos lavados con agua miliQ estéril seguidos cada uno de una centrifugación de 14000 rpm por 10 min. Se recuperó todo el buffer y el agua que contenían el ADN, se corrió en un gel para comprobar su purificación y se conservó a -20°C hasta su utilización.

4.3.6.1.2 Sonda del potenciador.

La sonda del potenciador se obtuvo directamente de la amplificación del vector pBShPL3-enh, con los iniciadores 111-114, (según la reacción y el programa descritos en 4.3.3.2.1). La temperatura de alineamiento fue de 58°C y el tiempo de extensión de 1min. El tamaño de banda esperada era de 424pb y ésta solamente se purificó por precipitación (descrita en la sección 4.3.3.1).

4.3.6.1.3 Sonda del elemento Alu.

La sonda del elemento repetitivo Alu también se obtuvo del vector pBShPL3-*NheI-ClaI*. Se amplificó una región de 752pb con los iniciadores 5Alu-5Ed2r (según la reacción y programa en 4.3.3.2.1). El tiempo de extensión fue de 1 min y la temperatura de alineamiento de 58°C . El fragmento se digirió con las enzimas *BanI* y *NciI*, y de las bandas resultantes se seleccionó y purificó, como se hizo con el inhibidor, la de 252 pb.

4.3.6.2 Marcaje de las sondas.

Para marcar radiactivamente las sondas se utilizó el kit RadPrime DNA Labeling System y dATP radioactivo. Se desnaturalizaron 25ng de la sonda correspondiente por 5 min a 94°C , se pasó inmediatamente a hielo y luego se le añadió lo siguiente: dCTP, dTTP y dGTP, $500\mu\text{M}$, 1 μl de cada uno; random primers, 2.5X, 20 μl ; [α - ^{32}P]dATP, 3000 Ci/nmol, de 1 a 4 μl y agua miliQ para completar 49 μl . Se mezcló bien lo anterior y se añadió 1 μl del fragmento Klenow, para tener un volumen final de reacción de 50 μl .

Una vez que se mezclaron los reactivos, se incubó a 37°C por dos horas y al término se adicionaron 5µl de solución STOP. Se hizo posteriormente una precipitación añadiendo 5µl de acetato de sodio 3M, 1µl de Vivid Violet y 100µl de etanol absoluto frío. Se conservó 30min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 14000 rpm por 30min. Una vez precipitada la sonda se procedió a hacer la hibridación.

4.3.6.3 Condiciones de hibridación.

Las regiones intergénicas separadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% se hibridaron con cada sonda purificada. Cada gel contenía, además de las regiones intergénicas amplificadas, la región intergénica corta tipo I ya clonada, además de un control positivo, que era el vector linearizado del cual procedía la sonda en cuestión y por último, un marcador de peso molecular.

Cada gel se tiñó con bromuro de etidio, se registró en el documentador, y se colocó en el secador de vacío por 30min a temperatura ambiente y luego por otros 30min a 60°C (Lueders-Fewell, 1994). Posteriormente el gel seco se incubó con agitación lenta y durante 30 min con las tres soluciones siguientes: solución de depuración (HCl 0.1N), solución de desnaturalización (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M) y solución de neutralización (NaCl 1.5M y Tris-HCl 0.5M, pH 7.5).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una vez concluido este tiempo, cada gel se colocó en 7.5 ml de la solución de pre-hibridación por 1h a 58°C. Esta solución contenía 6X de SSC (Solución 20X: 87.65g NaCl, 44.1g de citrato de sodio aforados a 500 ml, pH 7), 5X de reactivo de Denhardt's (Solución 100X: 2g Ficoll, 2g BSA, 2g Polivinilpirrolidina, aforados a 100 ml, esterilizada por filtración y conservada a -20°C) y 0.5% de SDS.

Tras esta hora, se eliminó la solución y se añadieron otros 7.5 ml de la misma solución de pre-hibridación que esta vez contenían la sonda marcada. La sonda había sido resuspendida

en 5μl de agua miliQ y desnaturalizada por 5min a 94°C, se conservó en hielo hasta su adición a la solución de hibridación. La hibridación se llevó a cabo toda la noche a 58°C.

Al día siguiente se eliminó la solución de hibridación y se hicieron dos lavados de 25 ml cada uno con una solución 2X SSC, 0.1% SDS, por 5min cada uno. Otros dos lavados de 25 ml cada uno con la solución 1X SSC, 0.1% SDS a 58°C por 10 min cada uno y uno o dos lavados, según se necesitó, con 25 ml de la solución 0.1XSSC, 0.1% SDS, a 65°C.

Tras los lavados, el gel se colocó sobre papel filtro y se expuso a película ultrasensible a -70°C, por tiempo variable, según la intensidad del marcaje. La película se reveló y se identificaron los distintos elementos regulatorios y/o repetitivos.

4.3.6.4 Estudio de la distribución de elementos Alu en las clonas del chimpancé.

La distribución de las secuencias repetitivas Alu en las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé clonadas se determinó por PCR, comparando el patrón obtenido con el esperado en el caso del locus humano reportado en el GenBank.

En el departamento de Bioquímica se tienen los iniciadores 5Alu y 3Alu que se alinean en los extremos de los elementos Alu y amplifican las secuencias presentes entre los elementos repetitivos Alu o "secuencias Inter.-Alu". Distintas reacciones de PCR se realizaron con las clonas obtenidas utilizando los juegos de iniciadores: 88-5Alu, 88-3Alu, 3Alu-5Alu, 3Alu-Prim, 5Alu-Prim, para comparar las bandas obtenidas con la PCR virtual. Las reacciones se hicieron según se indica en 4.3.3.2.1, la temperatura de alineamiento fue de 58°C y el tiempo de extensión de 3min. Los productos se analizaron en geles de agarosa para determinar su tamaño.

4.3.7 Análisis de la región promotora distal de las regiones intergénicas clonadas.

Las regiones promotoras del locus GH-PL se pueden analizar por PCR mediante diferentes juegos de iniciadores: 5Ed1-Prim, 5Ed2-Prim y 430-Prim. Estos tres pares de

oligonucleótidos amplifican respectivamente el promotor distal, medio y proximal presentes en las regiones intergénicas.

Se realizaron, por tanto, reacciones de PCR con las clonas que contenían las regiones intergénicas del chimpancé. Las reacciones se realizaron según se indica en 4.3.3.2.1, la temperatura de alineamiento fue de 56°C y el tiempo de extensión de 3min para el promotor distal (5Ed1-Prim), 58°C y 1.5min para el promotor medio (5Ed2-Prim) y 58°C y 45s para el promotor proximal (430-Prim). Las bandas obtenidas se analizaron en geles de agarosa al 1% y 2%.

4.3.8 Secuenciación nucleotídica de los extremos de las regiones intergénicas clonadas.

Para hacer la secuenciación de las clonas se realizó una extracción de ADN plasmídico de buena calidad, el cual se purificó hasta obtener una concentración de aproximadamente 2µg/µl y una pureza al espectrofotómetro de 1.7-1.8 ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$).

Una vez obtenido el ADN, se realizó la reacción de secuenciación en un termociclador Hybaid PCR Express, utilizando el método de Sanger, y los terminadores de LI-COR, así como la sequenasa y buffer de USB. La reacción se llevó a cabo con el iniciador 5Ed2, a 56°C, con 30 ciclos y un tiempo de extensión de 45s y también a 58°C, con los iniciadores M13Fwd y M13Rev, propios del vector TOPO® y los iniciadores Prim, IGPIV y 88-ExIV, que generaron las clonas. Tras realizarse la reacción, se precipitó con Vivid Violet el producto amplificado y éste se corrió en un gel de poliacrilamida en un secuenciador LI-COR.

Una vez que se obtuvieron las secuencias de un extremo y otro, se introdujeron al programa BLAST para conocer a cuales secuencias reportadas correspondían. Además se compararon directamente con las secuencias del promotor y la parte final reportadas para los 6 genes del locus GH-PL del chimpancé por medio del programa ClustalW, para conocer con precisión cuáles genes flanqueaban las regiones intergénicas clonadas.

CAPÍTULO QUINTO

RESULTADOS

5.1 Obtención de las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé.

Se amplificaron 5 regiones intergénicas por medio de la PCR-larga con los iniciadores IGPIV-Prim; cuatro de ellas se pueden observar en el gel de la figura 14. La quinta región se detectó por medio de las hibridaciones del elemento Alu y el potenciador (ver secciones 5.7 y 5.8). Con los iniciadores 88-Prim, ITG10-Prim e ITG10-IGC V también se obtuvieron algunas de estas regiones, pero sólo con el juego de iniciadores IGPIV-Prim se pudieron amplificar todas las regiones intergénicas del locus.

Estas regiones miden aproximadamente 6kb, 6.5kb, 8kb, 10kb y 12kb. Los tamaños se determinaron, en el caso de las regiones cortas, por cortes enzimáticos y en el caso de las regiones largas, por su comparación con el marcador de peso molecular $\lambda + PstI$.

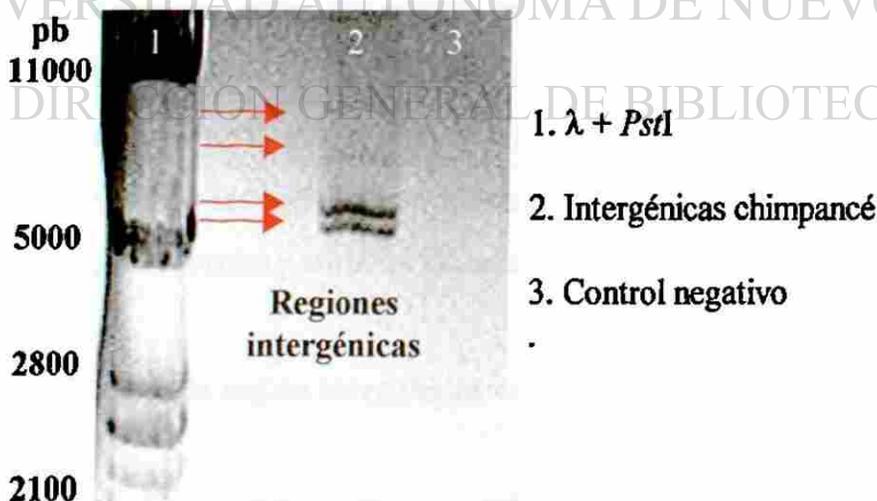
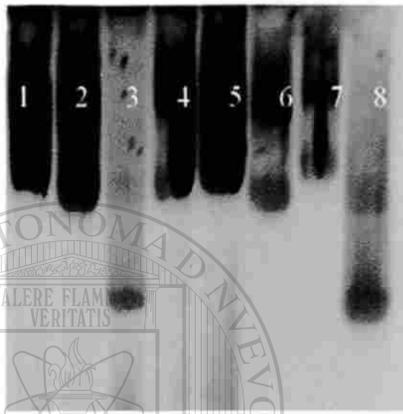


Figura 14. Regiones intergénicas del chimpancé. Se muestran las regiones intergénicas del chimpancé amplificadas por PCR-larga con los iniciadores IGPIV-Prim, resueltas en un gel de agarosa al 0.7%.

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).

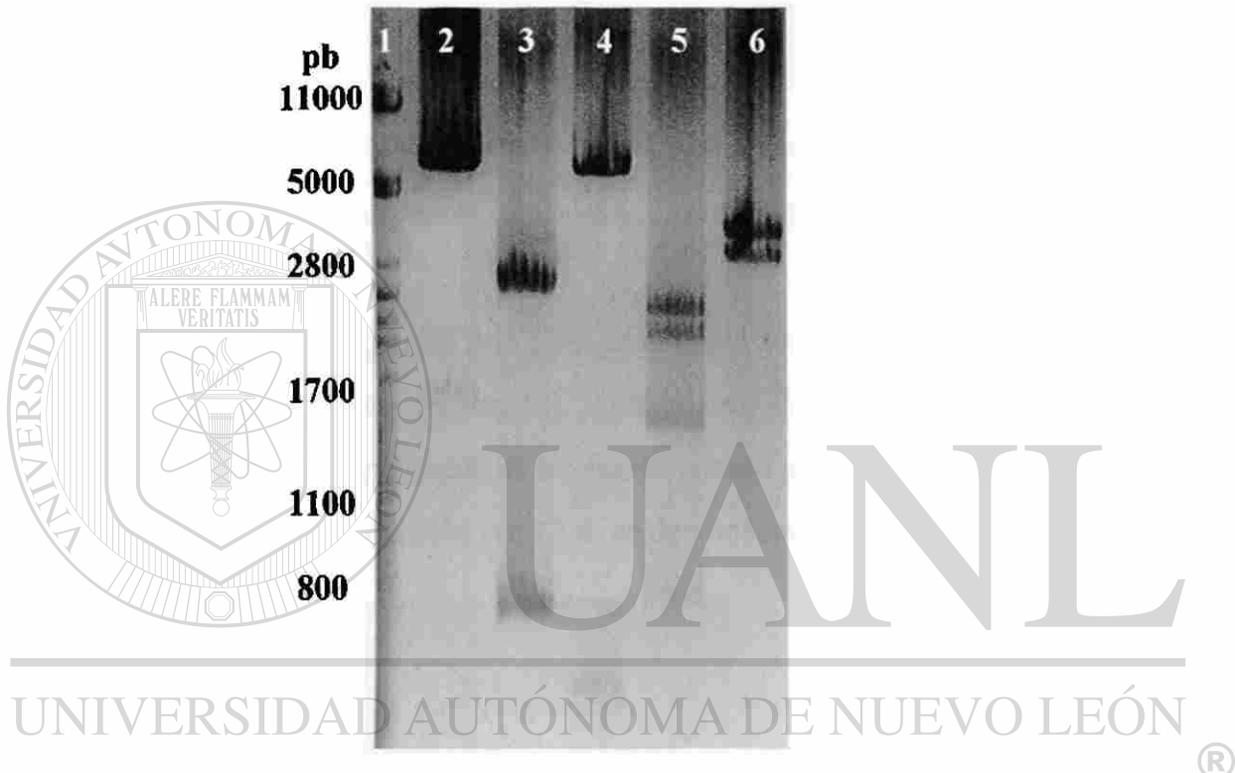


Figura 16. Caracterización de la región intergénica corta I. Se muestra el producto amplificado IGPIV-Prim de las clonas tipo I, de unos 6900pb (carril 2) y las digestiones de éste con las enzimas *Pst*I (carril 3), *Eco*RV (carril 4), *Xba*I (carril 5) y *Sma*I (carril 6). Las muestras se corrieron 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 *Clal* 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.

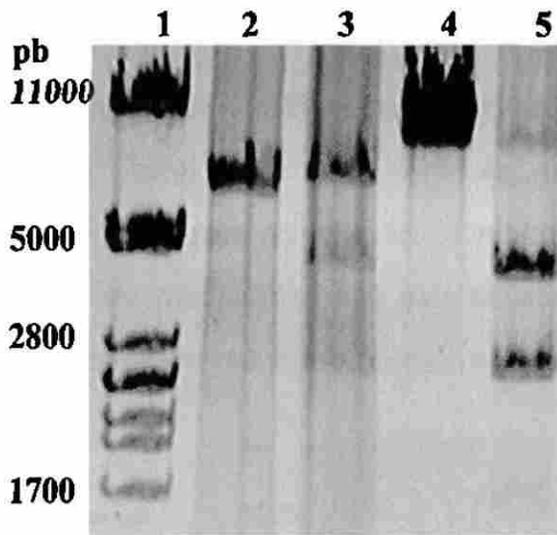


Figura 17. Caracterización de la intergénica corta tipo II. Las regiones intergénicas amplificadas con IGPIV-Prim se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% antes (carril 2) y después (carril 3) de ser digeridas con la enzima *ClaI* (carril 3). El mismo producto amplificado correspondiente a la clona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

Los productos amplificados, digeridos con *ClaI*, 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 *ClaI*, se denominaron IntC2ch.

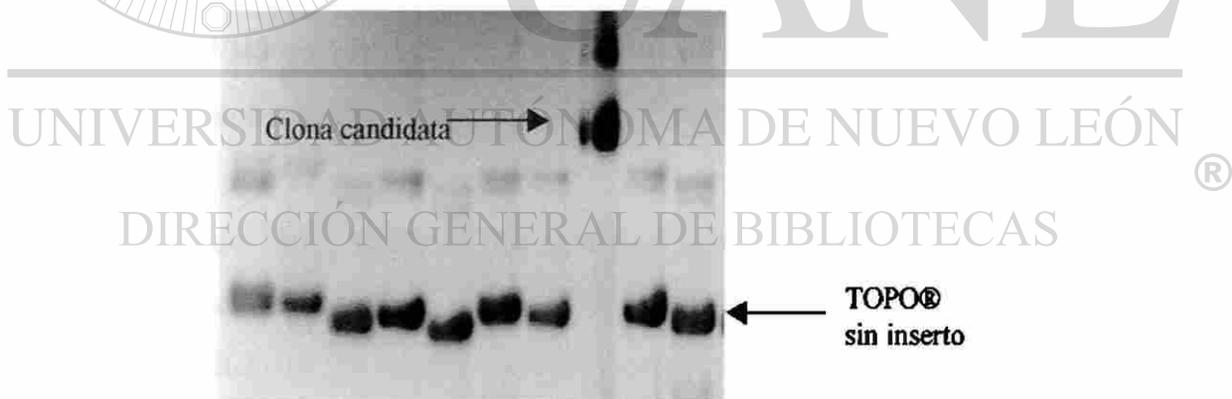


Figura 18. Intergénica tipo II clonada en TOPO®. La selección de las clonas se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de sus plásmidos. En la figura se señalan la clona candidata de la región intergénica tipo II y el vector TOPO® original (3.5kb).

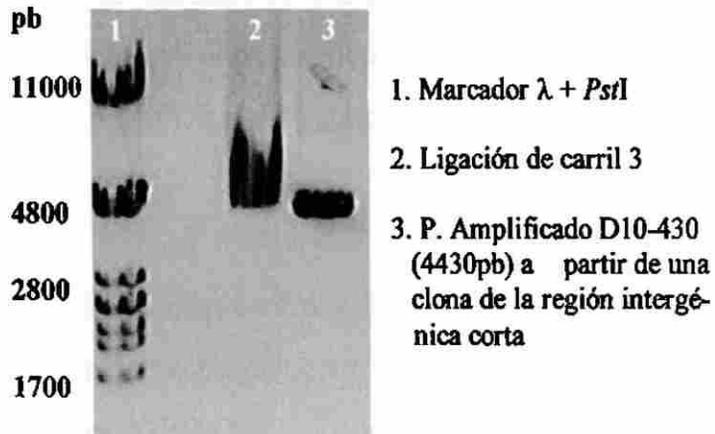
5.3 Clonación por recombinación homóloga en TOPO®.

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.

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 vectrecpBR-D10430, y para el vectrecTOPO-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 vectrecpBR-D10430.

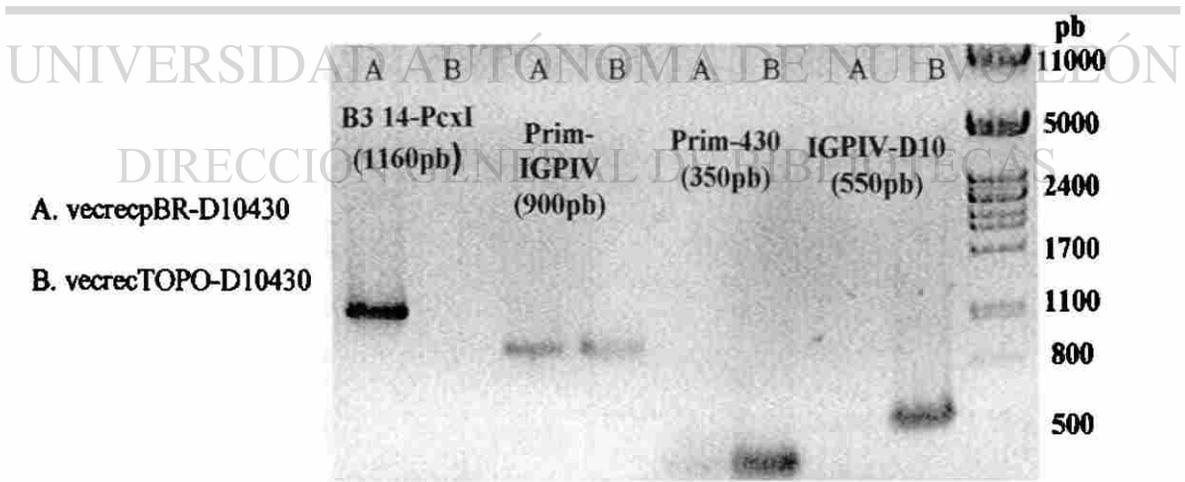


Figura 21. Análisis por PCR del vectrecpBR-D10430. El vector derivado de pBR se analizó por PCR comparando los resultados con los del vector original vectrecTOPO-D10430. La figura muestra los productos amplificados con Prim-IGPIV (totalidad del inserto), Prim-430 (promotor) y D10-IGPIV (parte final del 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.

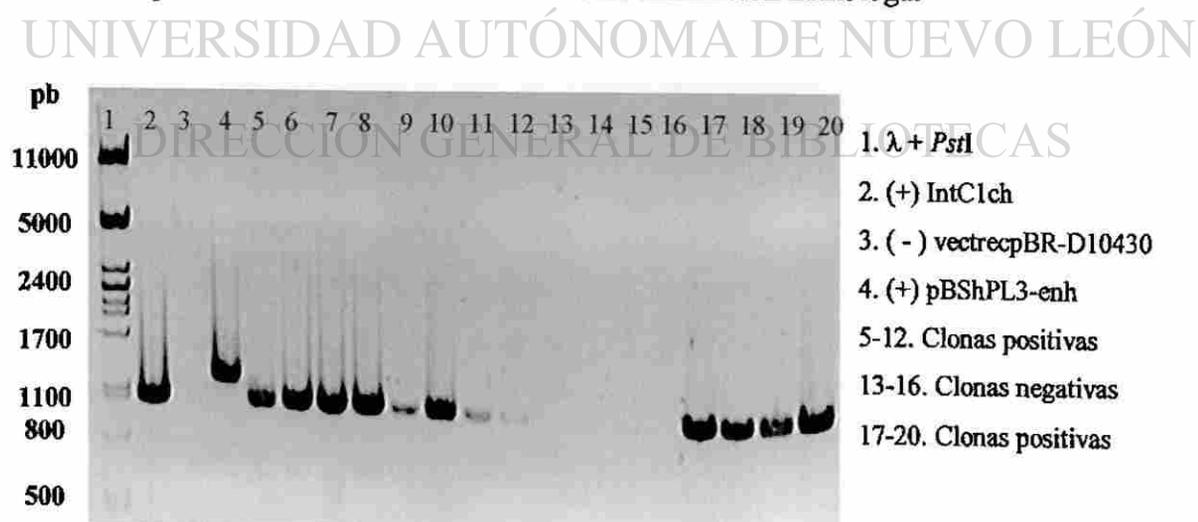


Figura 22. Verificación de la recombinación por medio de PCR. Se muestra la amplificación con 5Ed2-Prim, de las clonas (5-20) obtenidas por recombinación. También se muestran el control negativo y los controles positivos usados en el experimento. El producto amplificado de 1100pb se obtiene únicamente 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	<i>Ban</i> I	<i>Bg</i> II	<i>Bst</i> NI	<i>Mn</i> II
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	<i>Bg</i> II	<i>Rsa</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Ava</i> 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 *BanI*, *BglII*, *BstNI* y *MnII* (figura 23). Las caracterizaciones hechas a estas clonas sólo mostraron un único patrón de corte para las siguientes enzimas: *BanI*: 300,75pb; *BglII*: 325,50pb; *BstNI*: 180,125, 65pb y *MnII*: 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.

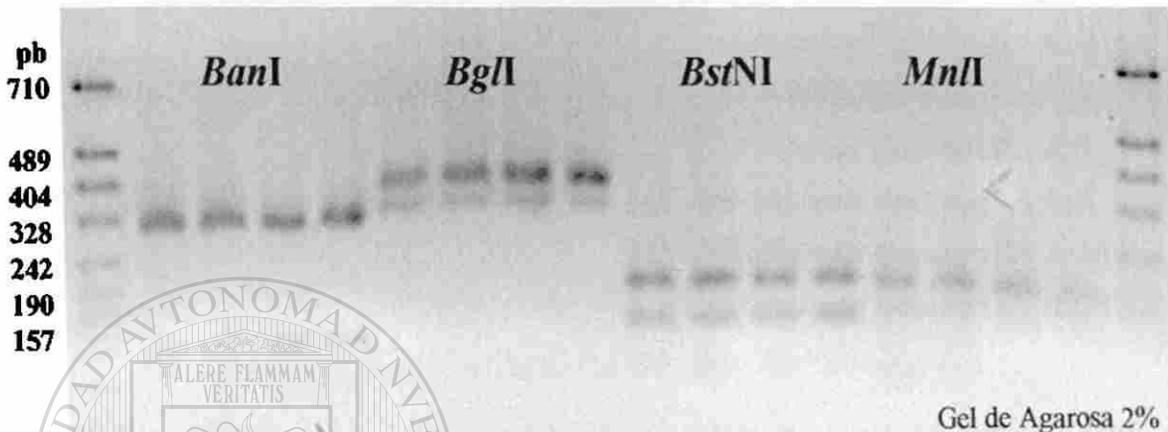


Figura 23. Caracterización del promotor (430-Prim) de las clonas tipo I. Se presentan los patrones de corte para el promotor de 375pb con las enzimas *BanI*, *BglII*, *BstNI* y *MnII* para cuatro clonas tipo I.

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: *BglII*: 425,225pb; *MspI*: 414,182, 50pb y *AvaII*: 492,107,51pb (figura 24). Según estos tamaños, el gen que precede a la región intergénica corta I es cGHN.

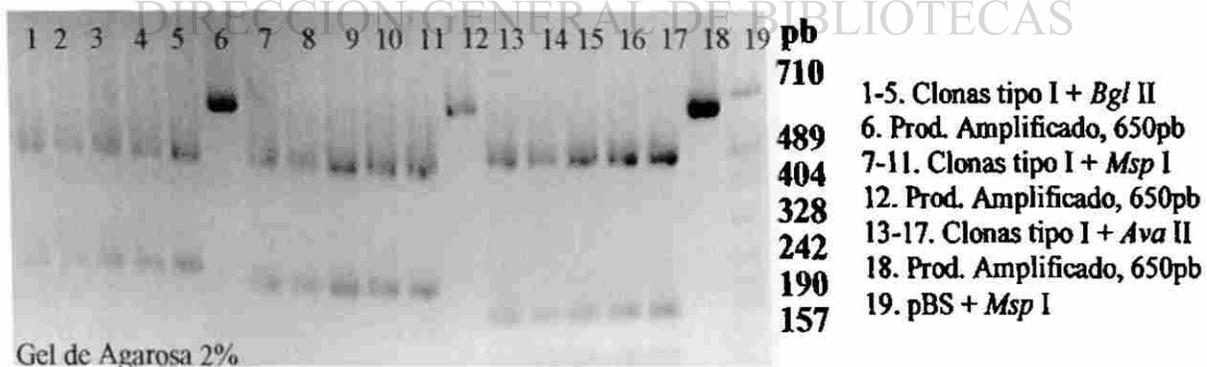


Figura 24. Caracterización de la parte final del gen (IGPIV-403) de las clonas tipo I. Se presentan los patrones de corte para esta región de 650pb con las enzimas *BglII*, *MspI* y *AvaII* para cinco clonas tipo I.

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 *BanI*, *BglII* 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 *BglII*. Las clonas tipo II sólo mostraron un único patrón de corte para las tres enzimas: *BanI*: 300,75pb; *BglII*: 375pb (no cortó) y *BstNI*: 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.

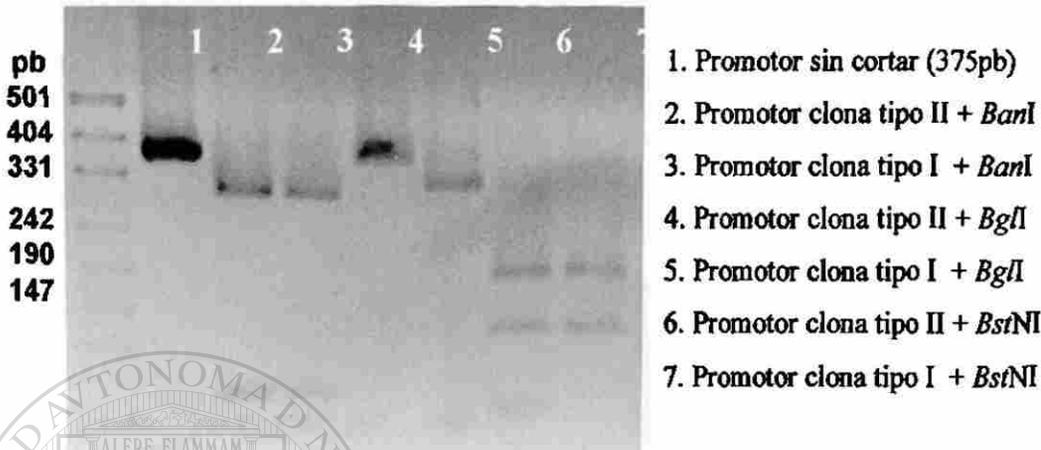


Figura 25. Caracterización del promotor (430-Prim) de las clonas tipo I y II. La región promotora de las clonas se amplificó con 430-Prim y el producto amplificado se caracterizó con diferentes enzimas en un gel de agarosa al 2%..

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 *AvaII* (figura 26). Los patrones de corte para la clona tipo II fueron: *BglII*: 425,225pb; *RsaI*: 650pb (no cortó), *MspI*: 414,182, 50pb y *AvaII*: 542,107pb. Según estos tamaños, el gen que precede a la región intergénica corta tipo II es el cGHV.

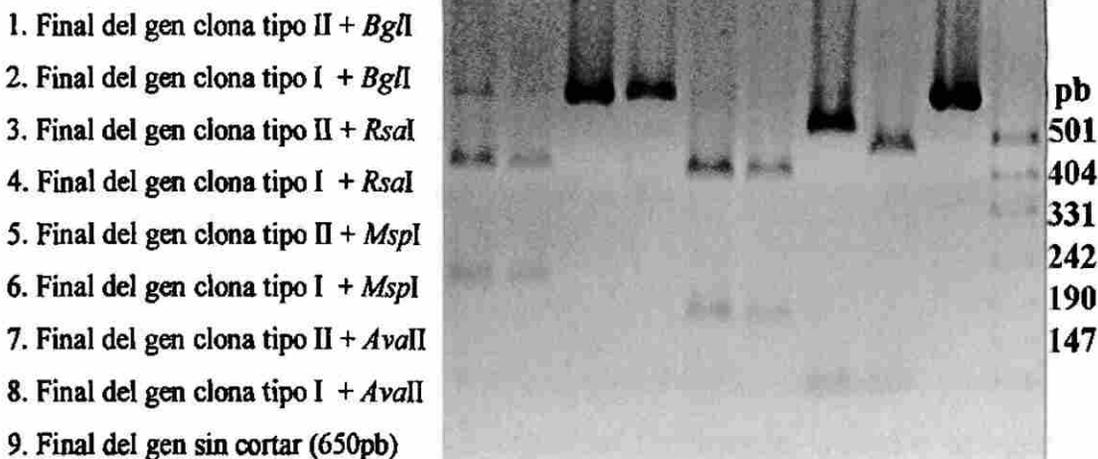


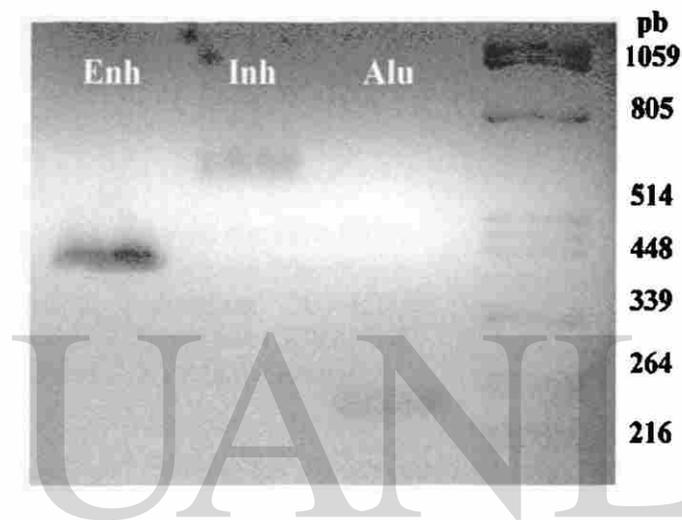
Figura 26. Caracterización de la parte final del gen (IGPIV-403) de las clonas tipo I y II. Se comparan las digestiones de la región amplificada con IGPIV-403 (650pb) para los dos tipos de clonas (I y II) con las enzimas *BglII*, *RsaI*, *MspI* y *AvaII* en un gel de agarosa al 2%..

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.

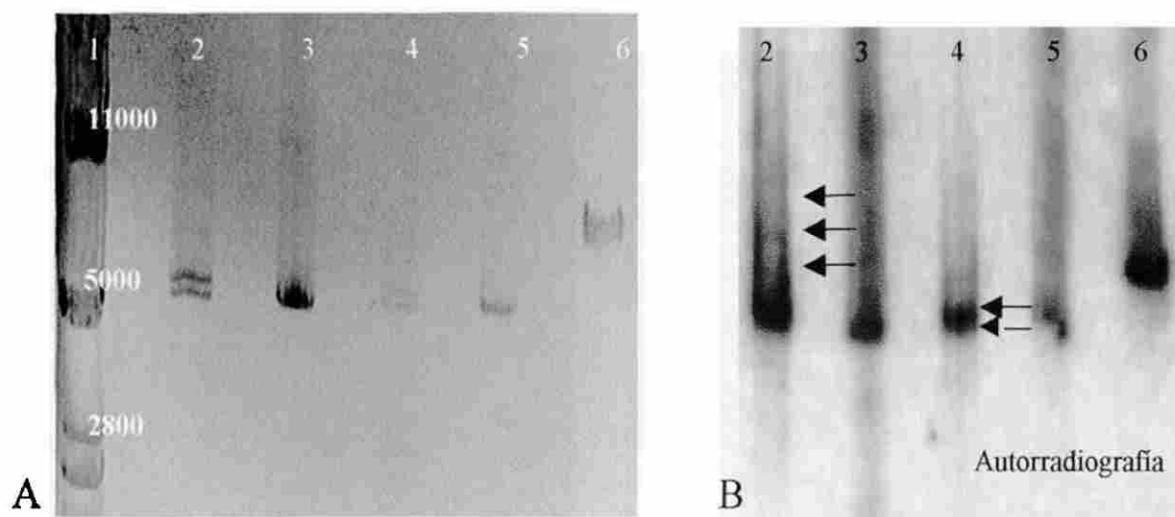
Figura 27. Sondas purificadas del potenciador, inhibidor y elemento Alu. En un gel de agarosa al 2.5% se analizaron las sondas del potenciador (424pb), del inhibidor (578pb) y del elemento repetitivo Alu (252pb).



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-*NheI*-*ClaI* 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 utilizó 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-*NheI-ClaI* 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

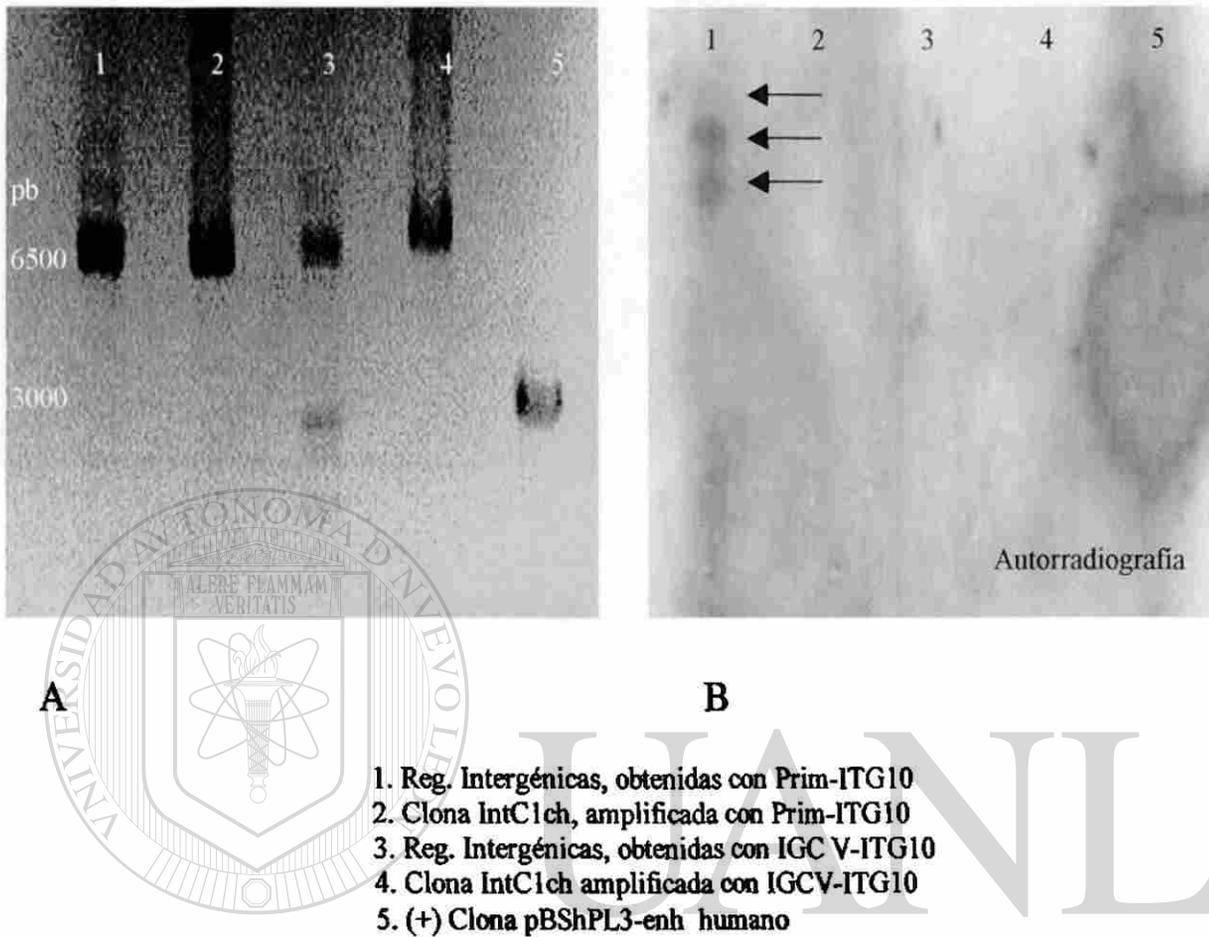
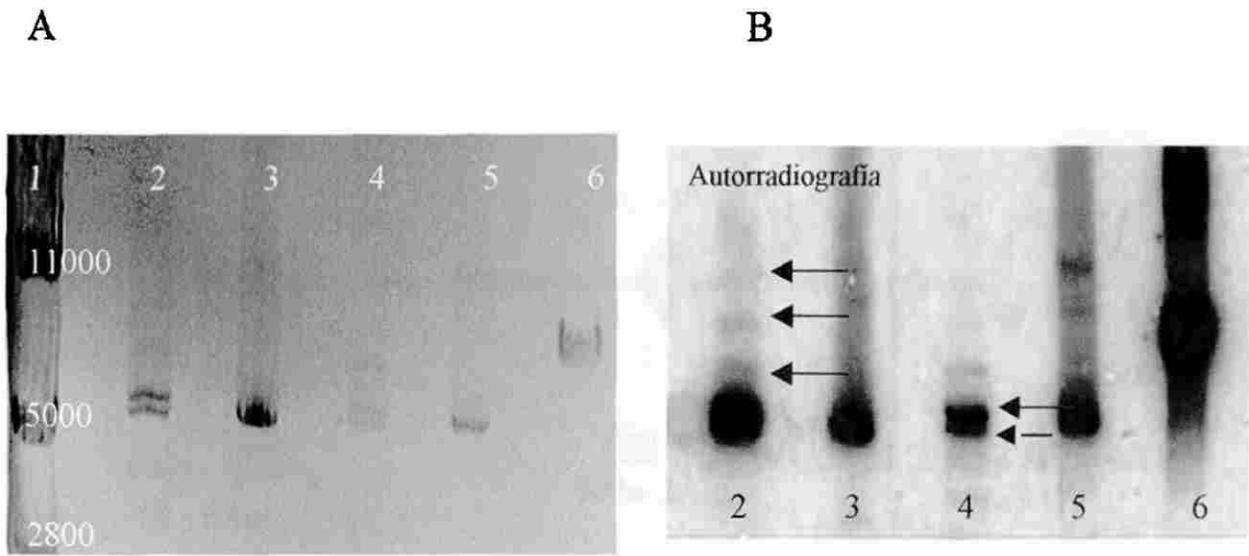


Figura 29. Identificación del elemento potenciador por hibridación. A. Los productos amplificados de las regiones intergénicas del locus GH-PL, así como el producto amplificado de la clona IntC1ch se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%. B. Se muestra la autorradiografía del gel hibridado con la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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

4 iniciadores antes mencionados. Estas amplificaciones se realizaron también sobre las clonas tipo I y II. En estas figuras (31 y 32) se muestran los geles que contienen los resultados de dichas amplificaciones, para ambas clonas.

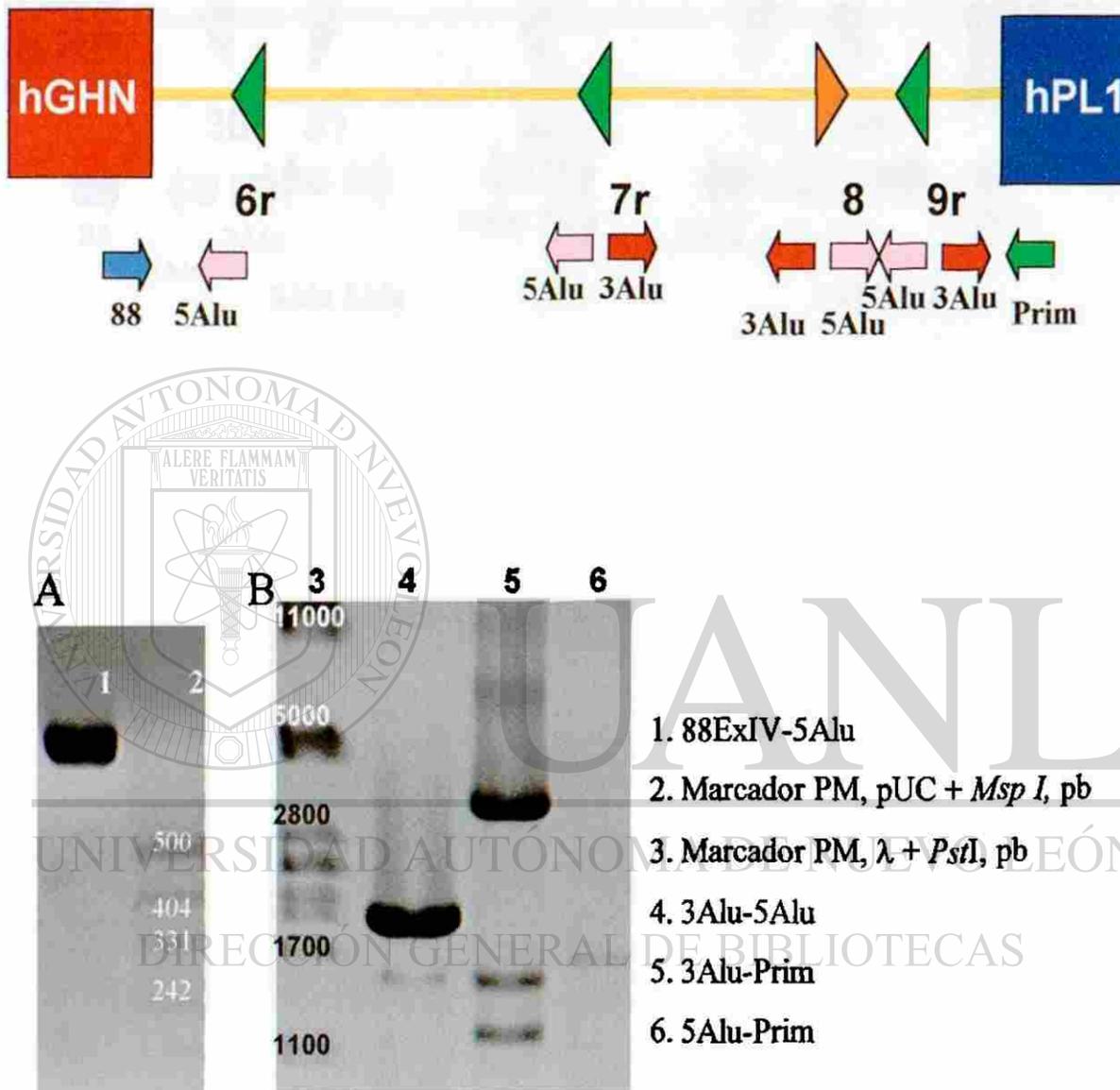
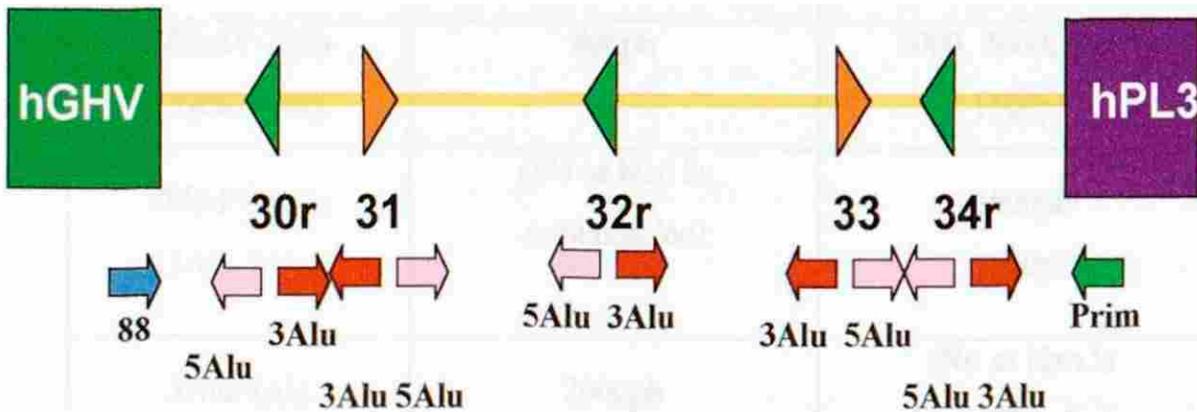


Figura 31. Análisis de la distribución de los elementos Alu en la clona tipo I. Se muestra la localización de los elementos Alu (6r, 7r, 8 y 9r) y los sitios de alineamiento de los iniciadores 88, 5Alu, 3Alu, y Prim, sobre la intergénica corta humana No. 1. También se analizaron en un gel de agarosa al 2% (A) y en otro al 0.8% (B) los productos amplificados a partir de la clona IntCch1, utilizando los juegos de iniciadores 88ExIV-5Alu (carril 1), 3Alu-5Alu (carril 4), 3Alu-Prim (carril 5) y 5Alu-Prim (carril 6), para conocer la distribución de elementos Alu en la intergénica corta tipo I del chimpancé.



1. Marcador PM, λ + *Pst*I, pb
2. 5Alu-Prim
3. 3Alu-Prim
4. 88ExIV-5Alu
5. 88-ExIV-3Alu

Figura 32. Análisis de la distribución de los elementos Alu en la clona tipo II. Se muestra dónde están localizados los elementos Alu (30r, 31, 32r, 33, 34r) y los sitios de alineamiento de los iniciadores 88, 5Alu, 3Alu, y Prim sobre la intergénica corta humana No. 2. Los productos amplificados a partir de la clona IntCch2 utilizando los iniciadores 5Alu-Prim (carril 2), 3Alu-Prim (carril 3), 88ExIV-5Alu (carril 4) y 88ExIV-3Alu (carril 5) se analizaron en un gel de agarosa al 1.2%.

También en la tabla 12 se hace un resumen de los tamaños de las bandas obtenidas para cada juego de iniciadores en ambas clonas: tipo I y II.

Tabla 12. Comparación de los productos obtenidos con las clonas tipo I y II.

Iniciadores	Bandas obtenidas con la clona tipo I	Bandas obtenidas con la clona tipo II
88ExIV-5Alu (5Alu-5Alu)	800pb	5000, 3000, 800pb 1500pb
88ExIV-3Alu (3Alu-3Alu)	(No se hizo la amplificación)	1600pb 1500pb
3Alu-5Alu (3Alu-3Alu)	2000pb 1600pb	(No se hizo la amplificación)
3Alu-Prim (3Alu-3Alu)	3600, 1200pb 1600pb	3700, 1500pb 3700, 1500pb
5Alu-Prim (5Alu-5Alu)	1770pb	2000pb 1500pb

Al hacer las amplificaciones sobre la clona tipo I se obtuvieron todas las bandas que dio como resultado la PCR virtual con la intergénica humana corta número 1. Esto indicó que la intergénica corta tipo I en el chimpancé al parecer posee 4 elementos Alu homólogos a los 4 elementos presentes en la región intergénica corta humana no. 1 (6r, 7r, 8 y 9r). Por otro lado, y como se observa, para la clona tipo II se obtuvieron los productos que se esperaban según la PCR virtual de la región intergénica humana número 2. Según parece, la región intergénica corta tipo II del chimpancé tiene 5 elementos Alu que corresponden a los elementos 30r, 31, 32r, 33 y 34r de la región intergénica corta número 2 del humano.

5.10 Identificación de la secuencia Kpn en el locus GH-PL del chimpancé.

El elemento repetitivo Kpn es una secuencia que se encuentra en la región intergénica corta 2 en el locus GH-PL humano. Esta inserción de 200pb se puede evidenciar en el ser

humano por medio de PCR, al amplificar los promotores distales y medio de los genes hPL3 y hPL1.

Al realizar la PCR sobre las clonas tipo I y II con los iniciadores 5Ed1-Prim, 5Ed2-Prim y 430-Prim, que amplifican respectivamente el promotor distal, medio y proximal, se observó una inserción que pudiera corresponder al elemento Kpn en las amplificaciones para los promotores distal y medio de la clona tipo II (figura 33). También se observó que los promotores proximales de ambas clonas (430-Prim) no mostraban diferencias de tamaño (figura 33).

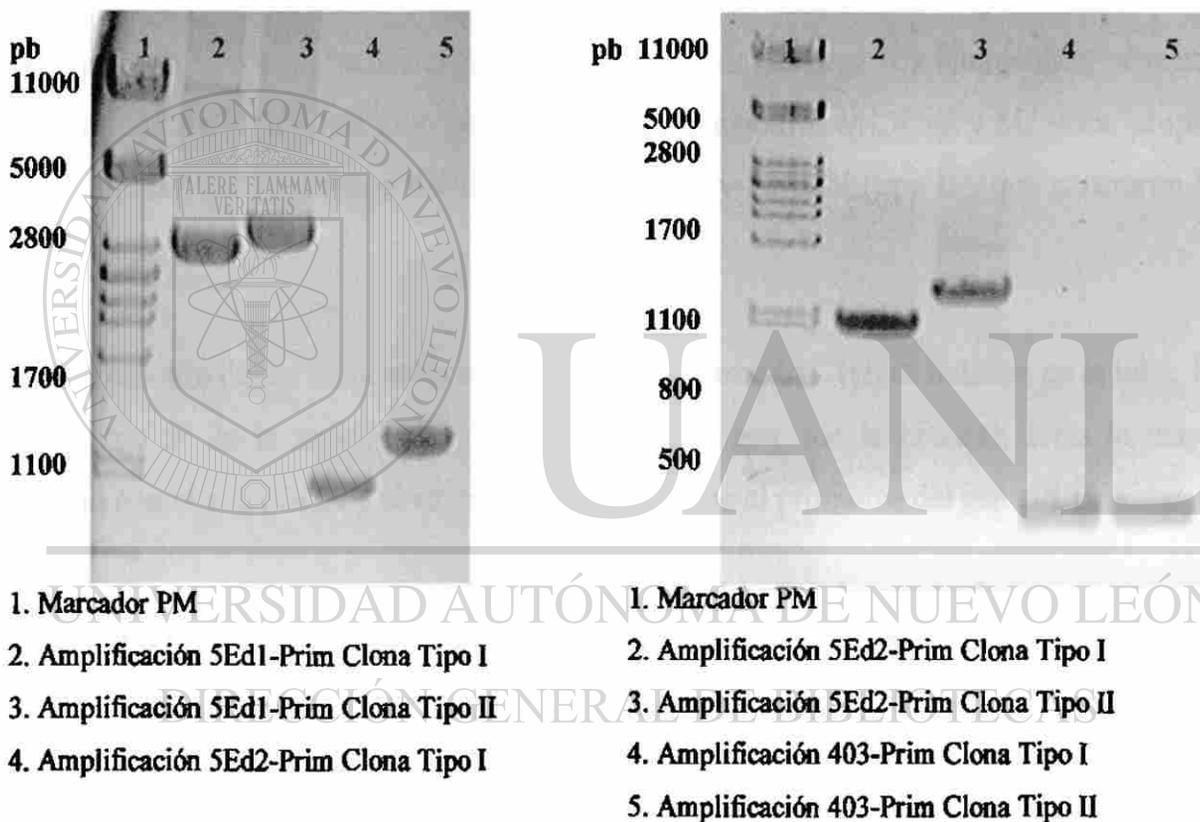


Figura 33. Amplificaciones de los promotores distal, medio y proximal. En la figura se muestran las bandas resultantes de la amplificación del promotor distal (5Ed1-Prim), medio (5Ed2-Prim) y proximal (403-Prim). Se puede observar una inserción de unos 200pb en el promotor distal y medio de la clona tipo II, con respecto a la clona tipo I. Las bandas se resolvieron en geles de agarosa al 1 y 1.8%, respectivamente.

Una vez que se detectó la presencia de una inserción en la clona tipo II, cuyo tamaño aproximado era de 200pb, se procedió a secuenciar el promotor medio de esta clona para comprobar si la inserción correspondía al elemento Kpn que se encuentra en el caso del locus humano.

Las secuencias obtenidas se compararon entre sí, y con las secuencias reportadas para el locus humano, mediante los programas BLAST y ClustalW. Este análisis corroboró que la clona tipo II contiene una inserción de aproximadamente 200pb (ver Anexo 1), correspondiente al elemento Kpn. Esta secuencia Kpn del chimpancé tiene un 96-97% de similitud con el elemento repetitivo Kpn que se encuentra en el locus GH-PL humano, según los datos arrojados por los programas antes mencionados.

5.11 Orden de las regiones intergénicas tipo I y II en el locus GH-PL del chimpancé.

Se realizó también la secuenciación de los extremos de las regiones intergénicas presentes en las clonas IntC1ch e IntC2ch, por medio de los iniciadores M13Fwd y M13Rev, propios del vector TOPO® y Prim e IGPIV (tipo I) o Prim y 88ExIV (tipo II), que generaron las regiones intergénicas.

La comparación de las secuencias obtenidas para la clona IntC1ch se muestra en la tabla 13. El extremo 5' de la región intergénica, es decir el gen que la precede, tenía la mayor similitud con el gen cGHN y el extremo 3' representaba al promotor del gen cPLB.

Tabla 13. Comparación de las secuencias obtenidas para la clona I vs. las reportadas.

Gen	Final del gen	Promotor
cGHN	98%	95%
cGHV	93%	93%
cPLC	91%	93%
cPLB	92%	97%
cPLA	91%	90%
cPLD	92%	93%

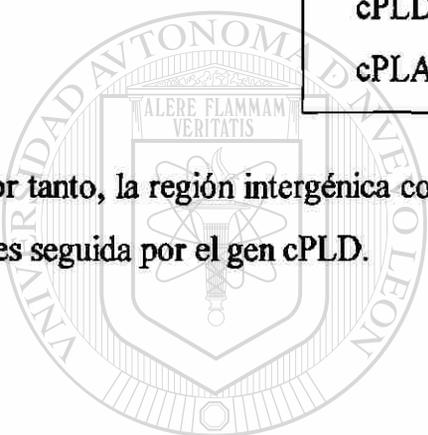
En resumen, la región intergénica corta tipo I del chimpancé está precedida por el gen cGHN y es seguida por el gen cPLB.

Así mismo, la comparación de las secuencias obtenidas para la clona IntC2ch se muestran en la tabla 14. El extremo 5' de la región intergénica, correspondía al gen cGHV y el extremo 3', representaba al promotor del gen cPLD.

Tabla 14. Comparación de las secuencias obtenidas con la clona II vs. las reportadas.

Gen	Final del gen	Promotor
cGHV	99%	91%
cGHN	92%	88%
cPLC	89%	94%
cPLB	90%	91%
cPLD	89%	99%
cPLA	89%	92%

Por tanto, la región intergénica corta tipo II del chimpancé está precedida por el gen cGHV y es seguida por el gen cPLD.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO SEXTO

DISCUSIÓN

El estudio de los genomas de diferentes especies y su comparación, da información acerca de la historia evolutiva de los seres vivos. Al analizar ciertas regiones génicas de otras especies y compararlas con regiones del genoma humano, que es el más ampliamente estudiado, se pueden hacer modelos que permitan explicar cómo han cambiado durante la evolución, los distintos genomas de las especies que conocemos hoy en día.

El hombre pertenece al orden de los primates y en este grupo se encuentran los organismos cuyos genomas son, evolutivamente hablando, los más cercanos o parecidos al humano. Por ejemplo, hay estudios que han registrado hasta un 99.4% de semejanza en ciertos sitios de los genomas del humano y del chimpancé.

Una de las formas en que se han estudiado los genomas es a través de las familias multigénicas, las cuales están constituidas por grupos de genes que comparten un ancestro común y que se distribuyen a lo largo de los genomas. Los distintos genes de estas familias pueden estar distribuidos en sitios tan lejanos que se presentan hasta en cromosomas distintos. En otros casos, los genes pertenecientes a estas familias se encuentran en sitios muy cercanos, formando grupos o locus, lo que indicaría que su evolución es más reciente.

La familia multigénica GH-PRL incluye varios miembros, como el gen de la GH y el de la PRL, que se encuentran en los genomas de vertebrados tan distintos al ser humano como los peces. El locus GH-PL forma también parte de esta familia multigénica. Esta región presenta en los primates un gran dinamismo, y permite hacer estudios evolutivos muy interesantes, que llevarán a una mejor comprensión de los fenómenos que dieron origen al genoma humano.

Las secuencias génicas de los seis miembros del locus GH-PL del chimpancé han sido reportadas y se han comparado con las de los cinco genes que forman el locus humano (Revol y col., 2004). Aunque el locus humano ha sido ampliamente estudiado, las teorías que han surgido en cuanto a su formación no son todavía definitivas.

Este trabajo se realizó con el objeto de tener mayor información acerca del locus en el chimpancé (*Pan troglodytes*), que permitiera explicar de una manera más precisa y completa los sucesos evolutivos que llevaron a la evolución del locus GH entre los grandes monos y el ser humano.

6.1 Las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé

Se obtuvieron cinco regiones intergénicas para el locus del chimpancé, dos cortas (de aprox. 6000pb) y tres largas (de unos 8, 10 y entre 12 y 13kb, respectivamente). En comparación, el locus humano presenta también dos regiones intergénicas cortas de tamaño similar, pero en el caso de las regiones largas el genoma humano posee sólo dos regiones intergénicas largas de aproximadamente 13kb cada una.

La amplificación de las regiones intergénicas no ocurrió con igual eficiencia para todas las regiones: cuando se evidenció la obtención de estas regiones por medio de geles de agarosa, se pudieron observar bandas muy intensas para las dos regiones cortas; mientras que las regiones largas se amplificaron pobremente. De hecho, sólo las de 8 y 10kb se pudieron observar en los geles de agarosa y la región de 12kb sólo se pudo evidenciar durante los ensayos de hibridación posteriores. Estas diferencias en la amplificación de las regiones intergénicas se pudieran explicar por: 1) el uso de iniciadores consenso que no se alinean de manera igual con las secuencias y 2) la diferencia de tamaño de los productos.

Una vez que se obtuvieron las regiones intergénicas, se realizó su clonación por medio de un vector comercial. Sólo tuvimos éxito con las regiones intergénicas cortas, y en particular con la que fue el producto mayoritario en la amplificación. Por lo tanto el resultado de la

clonación reflejo: 1) el tamaño de las regiones (las secuencias largas, arriba de 8kb quizá sobrepasaron la capacidad del vector) y 2) la eficiencia de la amplificación.

Para clonar la otra región corta se tuvo que hacer un cambio en la estrategia, seleccionando una enzima de restricción (*Cla* I), que diferenciaba las dos secuencias intergénicas amplificadas del chimpancé (cortando la que ya estaba clonada). Los dos tipos de clonas fueron caracterizados con más detalle posteriormente.

Al observar que la clonación por medio de vector comercial de las regiones intergénicas largas no se pudo lograr, se decidió intentar la clonación por medio de la recombinación homóloga. Esta técnica requería de un vector con regiones homólogas a los extremos de las regiones intergénicas, el cual se derivó de las clonas que contenían a una de las regiones intergénicas cortas.

Una vez producido el vector, mediante ensayos de clonación de un producto amplificado derivado de las regiones intergénicas cortas, se comprobó su efectividad y funcionalidad. Este vector podrá utilizarse para clonar las regiones intergénicas largas, que no se pudieron clonar por medio del vector comercial, también se podrán hacer estudios a partir de mezclas de productos amplificados para observar el funcionamiento diferencial del vector con cada uno de ellos.

Otra de las posibles aplicaciones de este vector es que teóricamente podría facilitar la clonación de regiones intergénicas de los loci GH-PL de cualquier especie de primates.

6.2 Análisis detallado de las regiones intergénicas del chimpancé

La caracterización de las regiones intergénicas cortas del locus GH del chimpancé dio indicios de cuáles genes la flanquean. Estos resultados se confirmaron mediante secuenciación parcial de los extremos de las clonas. La región intergénica corta I está precedida por el gen cGHN y en el otro extremo está flanqueada por el gen cPLB, mientras que la II se encuentra entre los genes cGHV y cPLD. Por lo tanto, los genes que flanquean

a ambas regiones cortas son ortólogos a los que flanquean a su vez las regiones cortas del locus humano. En efecto, los genes cGHV y hGHV, cGHN y hGHN, cPLB y hPL1 y por último, cPLD y hPL3 son los genes más cercanos entre sí al hacer las comparaciones filogenéticas entre los genes del humano y el chimpancé, (ver figura 8), y además se encuentran flanqueando las regiones cortas de la misma forma en ambos loci.

Aparte de la organización del locus GH del chimpancé, en este trabajo se trató de indagar un poco más sobre su funcionalidad. El locus humano tiene la particularidad de estar integrado por genes que se expresan en tejidos diferentes, principalmente en la pituitaria y la placenta, además de incluir un gran número de secuencias repetitivas del tipo Alu que han sido involucradas en la formación de esta región (Chen y cols., 1989; Revol y cols., 2004). Por lo tanto, se hizo el análisis de la distribución de los elementos reguladores y repetitivos a lo largo del locus del chimpancé para compararla con la del locus humano y así hacer inferencias sobre la conservación de los mecanismos de regulación génica en estas dos especies.

La hibridación fue la técnica que se escogió para este primer análisis, además permitió evidenciar la amplificación de tres regiones intergénicas largas. Todas las regiones intergénicas del chimpancé, tanto las dos regiones cortas como las tres largas, dieron señal para el inhibidor. De la misma manera, en el ser humano este elemento se presenta en todas las regiones intergénicas (Walker y cols., 1991). A diferencia de esto, se encontró el potenciador sólo en las tres regiones intergénicas largas, y no en las cortas. Por lo tanto, ambos elementos reguladores presentan la misma distribución que en el locus humano (Chen y col., 1988). Sin embargo, cabe remarcar que los experimentos de hibridación no permiten concluir sobre la funcionalidad de estas secuencias. De hecho en el humano los tres potenciadores no presentan la misma actividad: mientras que el potenciador en la región 3' de hPL3 es totalmente funcional, los dos otros (atrás de hPL1 y hPL2) tienen poca actividad (Walker y cols., 1991). La secuenciación de estos elementos y experimentos de funcionalidad permitirán completar este estudio. Sin embargo, la conservación de la distribución de estos elementos sugiere que los mecanismos de regulación de la expresión de los genes se conservaron entre los grandes monos y el humano. Probablemente, se inhibe

la transcripción en el tejido pituitario de los genes distintos a los GH-N, mientras que los factores transcripcionales presentes en el tejido placentario, por el contrario, podrían activar estos genes como ocurre en la especie humana, pero con la diferencia de que todos los genes en el caso del chimpancé parecen ser funcionales y podrían presentar transcritos y productos proteicos. En cambio, el ser humano presenta un "pseudogen": el hPL-1. (Walker y cols., 1991).

Por otra parte, los elementos repetitivos Alu están distribuidos a lo largo del locus GH del chimpancé. Las cinco regiones intergénicas de este locus dieron señal para este elemento, de la misma manera que se observa en nuestra especie. Los elementos repetitivos se encuentran ampliamente distribuidos en los genomas de los primates y se esperaba encontrar una presencia fuerte de los mismos en el locus GH-PL del chimpancé, como también la tienen en el locus humano.

La distribución de los elementos Alu en las regiones intergénicas cortas del locus GH del chimpancé, fue estudiada más detalladamente mediante PCR. Se compararon los resultados de las amplificaciones virtuales sobre esta región del genoma humano, con los obtenidos al hacer las amplificaciones sobre las regiones intergénicas clonadas del chimpancé. En la comparación se pudo observar que los productos de ambas amplificaciones (utilizando los mismos juegos de iniciadores) son muy parecidos, por lo que podemos asumir que los elementos Alu presentan una distribución muy semejante en las regiones intergénicas cortas de los loci humano y del chimpancé.

El elemento Kpn presente en la región intergénica corta dos del locus humano, también se encontró en la respectiva región intergénica corta del chimpancé. Además, se obtuvo la secuencia del elemento para el chimpancé, se comparó con el elemento humano y ambos resultaron sumamente parecidos.

6.3 Evolución del locus GH-PL entre el chimpancé y el humano

Resumiendo, la comparación general de los loci GH-PL del chimpancé y el humano nos indica que existen 6 y 5 genes para cada locus, respectivamente, así como 5 y 4 regiones intergénicas en cada uno. Estas regiones intergénicas se presentan en distintos tamaños: las regiones cortas son muy semejantes en su tamaño en ambas especies (unos 6kb), pero las tres largas del locus GH del chimpancé, además de diferir de las humanas en número (el locus humano sólo presenta dos regiones largas) presentan tamaños distintos, pues según la hibridación, las regiones largas del chimpancé miden unos 8, 10 y 12kb y las regiones largas del humano miden cerca de 13kb (ambas).

La distribución de las secuencias Alu en las regiones cortas del locus del chimpancé y también la presencia de una secuencia Kpn en la misma posición que en el locus humano, refuerzan la idea de que las regiones intergénicas cortas en ambos loci tienen una estructura interna muy parecida.

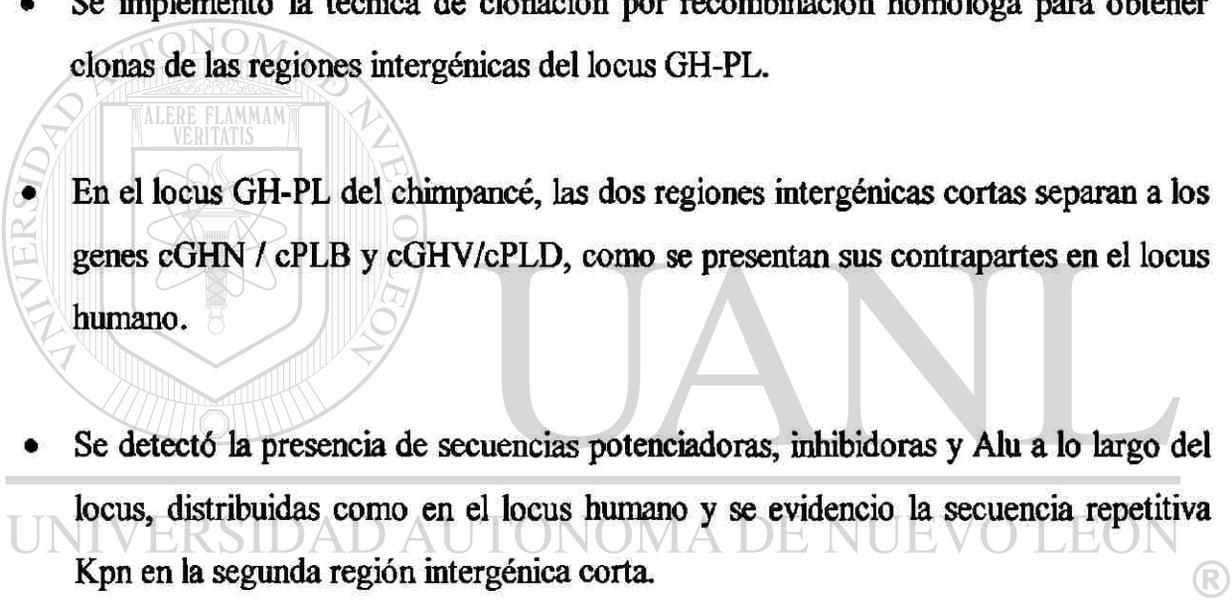
Por lo tanto, las regiones intergénicas cortas en ambos loci GH están muy conservadas: presentan similar estructura y están flanqueadas por genes que son claramente ortólogos entre sí.

Sin embargo, las regiones intergénicas largas del locus del chimpancé presentan características más variables. Su número y tamaño son distintos, y los genes tipo PL restantes del locus no presentan una contraparte directa con los genes PL del locus humano. Por lo tanto, esta región interna del locus GH-PL del chimpancé tuvo una evolución distinta a la del locus humano.

CAPÍTULO SÉPTIMO

CONCLUSIONES

- Cinco regiones intergénicas integran el locus GH-PL del chimpancé: 2 cortas y 3 largas, las cuales se amplificaron por PCR- larga. En este estudio se realizó la clonación y la descripción de las dos regiones cortas.
- Se implementó la técnica de clonación por recombinación homóloga para obtener clonas de las regiones intergénicas del locus GH-PL.
- En el locus GH-PL del chimpancé, las dos regiones intergénicas cortas separan a los genes cGHN / cPLB y cGHV/cPLD, como se presentan sus contrapartes en el locus humano.
- Se detectó la presencia de secuencias potenciadoras, inhibidoras y Alu a lo largo del locus, distribuidas como en el locus humano y se evidenció la secuencia repetitiva Kpn en la segunda región intergénica corta.
- Con los hallazgos anteriores se puede asumir que la evolución del locus GH-PL entre el chimpancé y el humano ocurrió de manera independiente, ya que en esta región del genoma se encontraron regiones muy conservadas y otras muy dinámicas y variables.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

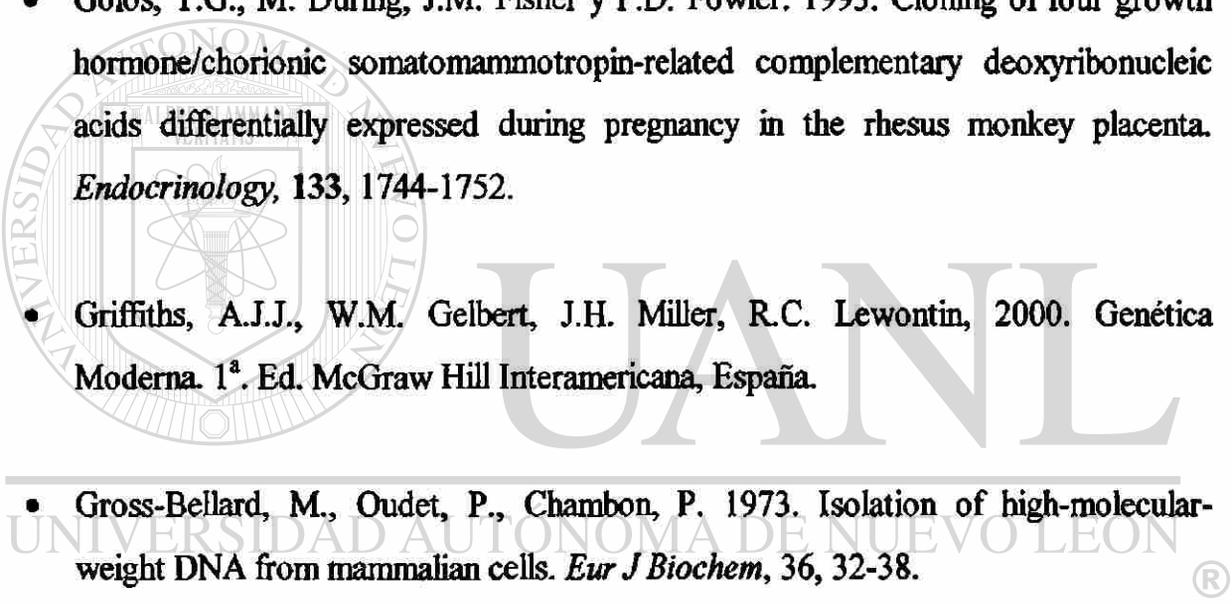
CAPÍTULO OCTAVO

BIBLIOGRAFÍA

- Adkins, R.M., A. Nekrutenko y W.-H. Li. 2001. Bushbaby growth hormone is much more similar to nonprimate growth hormones than to rhesus monkey and human growth hormones. *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 55-60.
- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 1998. *Essential Cell Biology*. 1ª. Edición. Garland Publishing Inc. , E.U.A.
- Barsh, G.S., P.H. Seeburg y R.E. Gelinas. 1983. The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acid Res.*, **11**, 3939.
- Bohinski, R.C. 1991. *Bioquímica*. 5ª. Edición. Addison-Wesley Iberoamericana, México.
- Britten, R.J. 1994. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 5992-5996.
- Castro-Peralta, F. y L.P. Villarreal. 2000. The use of oligonucleotide directed cleavage of DNA and homologous recombination in the production of large recombinant adenoviral vectors. *Gene Ther.*, **7**, 583-586.
- Cooke, N.E., J. Ray, M.A. Watson, P.A. Estes, B.A. Kuo y S.A. Liebhaber. 1988. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest.*, **82**, 270-275.

- Corrales Félix, G.L., 2000. Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Chartier, C., E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterlé, A. Pavirani y M. Mehtali. 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.*, **70**, 4805-4810.
- Chen, E.Y., Y.-Ch. Liao, D.H. Smith, H.A. Barrera-Saldaña, R.E. Gelinas y P.H. Seeburg. 1988. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics*, **4**, 479-497.
- Chuzhanova, N.A., M. Krawczak, L.A. Nemytikova, V.D. Gusev y D.N. Cooper. 2000. Promoter shuffling has occurred during the evolution of the vertebrate growth hormone gene. *Gene*, **254**, 9-18.
- DeNoto F.M., D.D. Moore y H.M. Goodman. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, **9**, 3719-3730.
- Esquivel-Escobedo, D.C., 1999. Organización del locus del complejo GH-PL en el mono araña (*Ateles geoffroyi*). Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Forsyth, I.A. 1986. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone and placental lactogen. *J. Dairy Sci.*, **69**, 886-903.
- Forsyth, I.A. 1994. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **102**, 244-251.

- Frankenne, F., Closset, J., Gómez, F., Scippo, M.L., Smal, J., Hennen, G. 1988. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab*, 66, 1171-1180.
- Fujiyama, A., H. Watanabe, A. Toyoda, T. D. Taylor, T. Itoh, S.-F., Tsai, H.-S. Park, M.-L Yaspo, H. Lehrach, Z. Chen, G. Fu, N. Saitou, K. Osoegawa, P.J. de Jong, Y. Suto, M. Hatrori, e Y. Sakaki. 2002. Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Science*, 295, 131-134.
- Golos, T.G., M. Doring, J.M. Fisher y P.D. Fowler. 1993. Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. *Endocrinology*, 133, 1744-1752.
- Griffiths, A.J.J., W.M. Gelbert, J.H. Miller, R.C. Lewontin, 2000. *Genética Moderna*. 1ª. Ed. McGraw Hill Interamericana, España.
- Gross-Bellard, M., Oudet, P., Chambon, P. 1973. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem*, 36, 32-38.
- Harrison, L.M. y R. Carrington (Eds.). 1973. *Atlas del mundo animal*. 1ª. Ed., Selecciones del Reader's Digest, México.
- Hayashida, T., S.W. Farmer y H. Papkoff. 1975. Pituitary growth hormones: further evidence for evolutionary conservatism based on immunochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 4322-4326.
- Johnson, M.E., L. Viggiano, J.A. Balley, M. Abdul-Rauf, G. Goodwin, M. Rocchi y E.E. Eichler. 2001. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature*, 413, 514-518.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



- Kay, R.F., C. Ross, B.A. Williams. 1997. Anthropoid Origins. *Science*, **275**, 797-804.
 - Krawczak, M., N.A. Chuzhanova y D.N. Cooper. 1999. Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. *Gene*, **237**, 143-151.
 - Liu, J.-Ch., K.D. Makova, R.M. Adkins, S. Gibson y W.-H. Li. 2001. Episodic evolution of growth hormone in primates and emergence of the species specificity of human growth hormone receptor. *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 945-953.
 - López-Rodríguez, A.M., 2002. Obtención de los genes de la hormona del crecimiento en el mono verde (*Cercopithecus aethiopsis*), especie representativa de los monos del viejo mundo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
 - Lueders K.K. y J.W. Fewell. 1994. Hybridization of DNA in dried gels provides increased sensitivity compared with hybridization to blots. *Biotechniques*, **16**, 66-67.
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- Messier, W. y C.-B. Stewart. 1997. Episodic adaptive evolution of primate liozymes. *Nature*, **385**, 151-154.
 - Moreno Rocha, J.C. 1993. Biología molecular de los genes del lactógeno placentario humano: análisis computacional y transcripción en un sistema procariote. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
 - Moreno Rocha, J.C. 1997. Biología molecular del complejo multigénico hGH-hPL: potencial transcripcional de sus genes en un sistema de transcripción *in vitro*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Novacek, M.J. 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*, **356**, 121-125.
- Ohkubo, T., A. Tsukada, M. Tanaka y K. Nakashima. 1998. Cloning and expresión of pigeon growth hormone receptor cDNA in COS-7 monkey kidney cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **120**, 449-455.
- Revol de Mendoza, A., D. Esquivel-Escobedo, D. Santiago-Alarcón y H. Barrera-Saldaña. 2001. Independent duplication of the growth hormone gene in three anthropoidean lineages. *J. Endoc. Genet.*, **2**, 151-159.
- Revol de Mendoza, A., D. Esquivel-Escobedo, I. Martínez Dávila y H. Barrera-Saldaña. 2004. Expansion and divergence of the GH locus between New World monkeys and anthropoideans. *Gene*, **336**, 185-193.
- Rey, P. 1967. Las hormonas. 1ª. Ed, Editorial Diana, México.
- Richardson, B.D., R.A. Langland, C.J. Bachurski, R.G. Richards, C.A. Kessler, Y.-H. Cheng y S. Handwerker. 2000. Activator protein-2 regulates human placental lactogen gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **160**, 183-192.
- Sambrook, S., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1990. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA.
- Sifuentes Rincón, A.M. 2000. Estudio de la familia génica GH-PL en el gato doméstico (*Felis catus*): un modelo molecular para precisar la evolución de los carnívoros. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

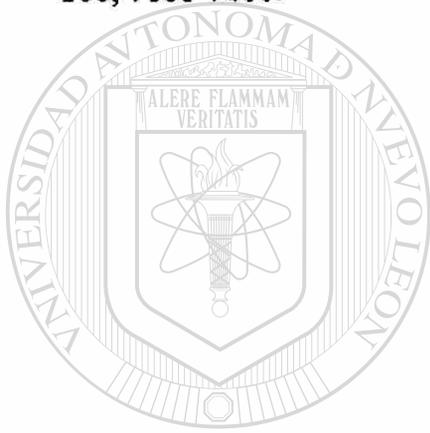
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

- Su, Y., S.A. Liebhaber y N.E. Cooke. 2000. The human growth hormone gene cluster locus control region supports position independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7902-7909.
- Toda, Y., M. Tomita. 1997. Alu elements as an aid in deciphering genome rearrangements. *Gene*, **205**, 173-176.
- Treviño Alvarado, V. M., 1999. Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento en vertebrados. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Villee, C.A., 1996. Biología. 8ª. Edición. McGraw Hill Interamericana. México.
- Walker, W.H., S.L. Fitzpatrick, H.A. Barrera-Saldaña, D. Resendez-Perez y G.F. Saunders. 1991. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr. Rev.*, **12**, 316-328.
- Wallis, M. 1981. The molecular evolution of pituitary growth hormone prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J. Mol. Evol.*, **17**, 10-18.
- Wallis, M. 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *J. Mol. Evol.*, **38**, 619-627.
- Wallis, O.C., y M. Wallis. 1995. Cloning and characterization of the rabbit growth hormone-encoding gene. *Gene*, **163**, 253-256.
- Wallis, M. 1996. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. *J. Mol. Evol.*, **43**, 93-100.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- Wallis, O.C., Y.P. Zhang y M. Wallis. 2001. Molecular evolution of GH in primates: characterization of the GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change. *J. Mol. Endocrinol.*, 26, 249-258.
- Wallis, O.C. y M. Wallis. 2002. Characterisation of the GH gene cluster in a new-world monkey, the marmoset (*Cakutrix jacchus*). *J. Mol. Endocrinol.* 29, 89-97.
- Wildman, D. E., Uddin M., Liu G., Grossman L.I. y Goodman M. 2003. Implications of natural selection in shaping 99.4% nonsynonymous DNA identity between humans and chimpanzees: Enlarging genus *Homo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 7181-7188.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



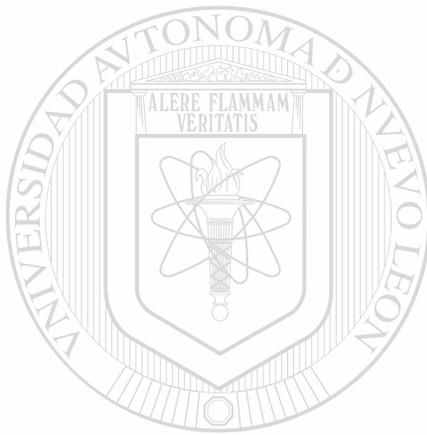
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXOS

Anexo 1.

Secuencia del elemento Kpn de la clona tipo II (IntC2ch) del chimpancé.

TCTTTTTTTAATTATTATTATTATTTTACTTTAAGTTTTAGGGTACATGTGCACA
ATGTGCAGGTTAGTTACATGTGTATaCCTGTGCCATGCTGGTGTGCTGCACCCAT
TAACTTGTCATTTAGCATTAGGTATATCTCCTAAAGCTaTCCCTCCCCCCTCCCC
CAACCCACAACAGTCCCCAGAgTGTGATGTTCCCCTGAGACTCAA

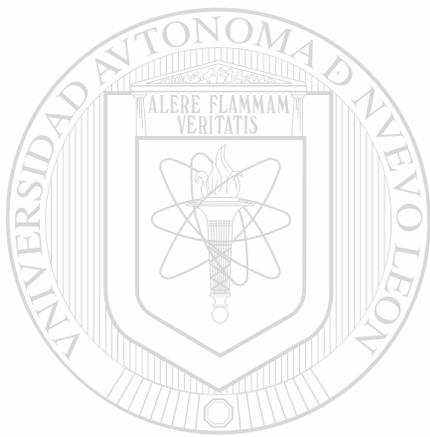


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



