



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Identificación del sitio de inserción del transgén  
en los ratones  $\Delta$ -202**

Tesis que presenta  
**Merit Mendoza Torres**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**  
**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**  
**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2004.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 006 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de agosto del año 2004, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

|   |                   |               |
|---|-------------------|---------------|
| <b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>   | <b>Presidente</b> | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dr. Carlos Barajas López</b>         | <b>Secretario</b> | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b> | <b>Sinodal</b>    | <b>IPICYT</b> |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Merit Mendoza Torres**

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación del sitio de inserción del transgén en los ratones delta-202*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**  
**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 12:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes agosto de 2004.

  
**Dr. Marcial Bonilla Mañá**  
Secretario Académico

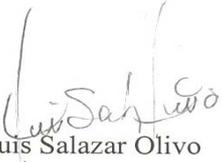


  
**Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Merit Mendoza Torres y aprobada el 6 de agosto de 2004 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Rubén López Revilla



Dr. Luis Salazar Olivo



Dr. Carlos Barajas López

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla. Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 172347).

## **DEDICATORIAS**

Esta tesis la dedico a mis Padres, a mi hermano Sinuhe y a mis tías Chava y Mary porque son lo más valioso que poseo. En la distancia siempre estuvieron conmigo, su recuerdo nunca dejó que me sintiera sola y su cariño me alentó a seguir adelante.

También se la dedico a mis amigos Víctor y Eloísa, que han estado conmigo en las buenas y en las malas, los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rubén López Revilla por el apoyo y por todas las enseñanzas que compartió conmigo. Y sobre todo por dirigirme en este camino de la investigación; sus consejos son invaluable y sé que me acompañarán por siempre.

A la Biól. Mireya Sánchez Garza, porque siempre estuvo ahí de gran ayuda, siempre amiga, siempre amable, siempre con una idea para solucionar un problema, muchas gracias.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont porque sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A las compañeras del Laboratorio 3, sobre todo a Cytllalic y Adriana.

A la MC Magdalena Rodríguez, cuyo trabajo fue la base para el desarrollo del mío.

Al IPICYT por todo el apoyo para continuar mis estudios.

Al CONACYT por la beca que me permitió subsistir durante estos dos años.

## ÍNDICE

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Hoja de aprobación de la tesis | 2  |
| Dedicatorias                   | 4  |
| Agradecimientos                | 5  |
| <br>                           |    |
| Lista de tablas                | 7  |
| Lista de Figuras               | 8  |
| Resumen                        | 9  |
| Abstract                       | 10 |
| <br>                           |    |
| Introducción                   | 11 |
| Material y Métodos             | 15 |
| Resultados                     | 18 |
| Discusión                      | 20 |
| Referencias                    | 21 |
| <br>                           |    |
| Tablas                         | 23 |
| Figuras                        | 26 |
| Anexos                         | 42 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| 1. Parejas de oligonucleótidos utilizadas | 23 |
| 2. Vectores con los insertos clonados     | 24 |
| 3. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas     | 25 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| 1. Mapa de la construcción $\Delta 202$   | 26 |
| 2. Ratón macho de 101 días afectado con el síndrome neurológico   | 27 |
| 3. Secuencia de 797 pb obtenida por Magdalena Rodríguez   | 28 |
| 4. Características de la secuencia de 797 pb determinada por Magdalena Rodríguez  | 29 |
| 5. Uso de la PCR inversa para amplificar las secuencias que flanquean una secuencia conocida o transgén   | 30 |
| 6. Enzimas de restricción usadas y productos de PCRi esperados con DNA $\Delta 202$ como molde  | 31 |
| 7. Amplificación mediante PCRi anidada en tres etapas   | 32 |
| 8. Montaje de la PCRi con pSV $\Delta 202$ linearizado y recircularizado amplificado con la pareja de oligos MR9-1 y MR9-2  | 33 |
| 9. Reacción 1 de PCRi 1, con DNA genómico de ratones $\Delta 202$ fragmentado con <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI o <i>Xba</i> I y amplificado con la pareja de oligos 1 | 34 |
| 10. Reacción 2 de PCRi, anidada con la pareja de oligos 2 usando como molde los productos generados en la Reacción 1  | 35 |
| 11. Reacción 3 de PCRi, anidada con la pareja de oligos 3 y usando como molde los productos de la Reacción 2  | 36 |
| 12. Secuencia de 823 pb determinada con el inserto 2X (Clona MM105)   | 37 |
| 13. Secuencia de 542 pb determinado con el inserto 3X (Clona MM108)   | 38 |
| 14. Alineación de las secuencias de 823 pb y 543 pb   | 39 |
| 15. Secuencia consenso obtenida a partir de ambas secuencias  | 40 |
| 16. Alineación del extremo izquierdo de la secuencia consenso con el extremo izquierdo del transgén   | 41 |
| 17. Alineación del extremo derecho de la secuencia consenso con el extremo derecho del transgén   | 42 |
| 18. Alineación de los flancos del transgén con la secuencia de 797 pb obtenida por Magdalena Rodríguez  | 43 |
| 19. Estrategia de obtención de las secuencias de 542 y 823 pb   | 44 |

## RESUMEN

Los astrocitos constituyen el tipo celular más abundante y los astrocitomas son el cáncer más frecuente del sistema nervioso central (SNC). La línea murina  $\Delta 202$  (modelo transgénico de astrocitoma desarrollado en nuestro grupo) fue obtenida a partir de un cigoto microinyectado con la construcción SV $\Delta 202$ . Los ratones homocigos para el transgén desarrollan un síndrome neurológico (SN) caracterizado por parálisis, atrofia y proliferación de astrocitos. Tres hipótesis alternativas pueden explicar la patogenia del SN: el transgén 1) inactiva un antioncogén astrocito-específico, 2) activa un protooncogén astrocito-específico o 3) genera un polipéptido de fusión oncogénico. Para poner a prueba estas hipótesis es necesario identificar primero el sitio de inserción del transgén en el genoma murino. Con este propósito empleamos la técnica de PCR inversa (PCRi), que permite amplificar las secuencias desconocidas que flanquean a una secuencia conocida o transgén. En un trabajo preliminar identificamos una secuencia de 797 pares de bases (pb) con homología del 98% al segmento chr3:36422278-36422935; como esta secuencia carecía de los extremos del transgén, no podía asegurarse que flanqueara al transgén. En este trabajo extendimos la estrategia de amplificación del transgén hacia los flancos genómicos mediante tres reacciones sucesivas de PCRi anidada, empleando tres parejas de oligonucleótidos localizadas cada vez más cerca de los extremos del transgén. Amplificamos DNA  $\Delta 202$  que había sido fragmentado con *Bam* HI (B), *Eco* RI (E) o *Xba* I (X) y obtuvimos seis productos que pudieron ser clonados y secuenciados. Las clonas derivadas de DNA digerido con E y B sólo permitieron identificar secuencias del transgén pero las derivadas de DNA digerido con X permitieron identificar los extremos derecho e izquierdo del transgén y las secuencias murinas que los flanquean, las cuales coincidieron con la secuencia de 797 pb. Nuestros resultados confirman el sitio de inserción del transgén en la región chr3:36422278-36422935, que interviene en la diferenciación de los astrocitos y el desarrollo del SNC.

## ABSTRACT

Astrocytes are the most abundant cell type and astrocytomas the most frequent cancer of the central nervous system (CNS). The  $\Delta 202$  mouse line (transgenic astrocytoma model developed by our group) was obtained from a zygote microinjected with the SV $\Delta 202$  construct. Mice homozygous for the transgene develop a neurologic syndrome (NS) characterized by paralysis, atrophy and astrocyte proliferation. Three alternative hypotheses might explain the pathogenesis of the NS: the transgene either 1) inactivates an astrocyte-specific antioncogene, 2) activates an astrocyte-specific protooncogene or 3) generates an oncogenic fusion polypeptide. To test these hypotheses the transgene insertion site in the mouse genome must be identified. To attempt this we used reverse PCR (rPCR), which allows amplification of the unknown sequences flanking a known sequence or a transgene. Our preliminary rPCR results had identified a 797 base pair (pb) sequence with 98% homology to the segment chr3:36422278-36422935 of chromosome 3, lacking the transgene ends and thus unable to assure that the sequence flanked the transgene. In this work we extended the amplification strategy towards the genomic flanks using two successive nested rPCR reactions with three oligonucleotide pairs, each located closer to the transgene ends. From  $\Delta 202$  DNA fragmented with *Bam* HI (B), *Eco* RI (E) or *Xba* I (X) we obtained six amplification products that could be cloned and sequenced. The clones derived from DNA digested with E and B allowed the identification of transgene sequences only, whereas those derived from DNA digested with X allowed the identification of the right and left transgene ends as well as the mouse genomic sequences flanking them, which coincided with the 797 pb sequence. Our results confirm the transgene insertion site in the chr3:36422278-36422935 region, which is involved in astrocyte differentiation and CNS development.

## INTRODUCCIÓN

Los astrocitos son células gliales del sistema nervioso central (SNC), dentro del cual constituyen el tipo celular más abundante (Reilly y Jacks 2001, Hu et al 2004). Existen dos tipos de astrocitos: los protoplásmicos, localizados en la materia gris, con terminales que conectan sinapsis y vasos sanguíneos; y los fibrosos, localizados en la materia blanca, con terminales que se unen a nodos de Ranvier y vasos sanguíneos (Peters et al 1991, Fields y Stevens-Graham 2004).

Los astrocitos realizan diversas funciones en el SNC, incluyendo la regulación de la proliferación y la supervivencia de las neuronas, la guía de la migración celular y del crecimiento axonal durante el desarrollo neural, la promoción de la formación de sinapsis, la modulación de la transmisión sináptica y la organización de las respuestas inflamatorias e inmunitarias en infecciones y daño cerebral (Wechsler-Reya y Scott 2001, Takuma et al 2004, Gimsa et al 2004 ). En algunas regiones cerebrales los astrocitos comienzan a desarrollarse después de las neuronas y continúan apareciendo después de que las neuronas han dejado de proliferar (Wechsler-Reya y Scott 2001).

Los astrocitomas y gliomas son tumores del SNC derivados de astrocitos o sus precursores. Son la forma más común de cáncer cerebral humano y representan casi el 45% de todos los tumores primarios del cerebro (CBTRUS, 2002). A diferencia de las neuronas terminalmente diferenciadas, los astrocitos (o una subpoblación de ellos) son capaces de reingresar al ciclo celular y proliferar en respuesta al daño cerebral. Este potencial proliferativo podría estar relacionado con la alta incidencia de astrocitomas entre los tumores del SNC (Reilly y Jacks 2001).

La línea de ratones transgénicos  $\Delta 202$  fue obtenida por el grupo del Prof. Dieter Paul (Hannover, Alemania) a partir de un cigoto recién fertilizado que había

sido microinyectado con la construcción SV $\Delta$ 202 (derivada de la construcción SV202, de la cual se deletó el extremo 3' para inactivar la hormona de crecimiento), que permite expresar la región temprana de SV40 bajo control del enhancer de la metalotioneína 1 murina (Fig. 1) y consta de 4552 pb (Anexo 1).

Los ratones  $\Delta$ 202 heterocigos para el transgén desarrollan tumores en el hígado, el timo y el tejido adiposo (López-Revilla et al 2004). Los ratones  $\Delta$ 202 homocigos para el transgén desarrollan un síndrome neurológico (SN) caracterizado por parálisis flácida y atrofia progresivas acompañadas de proliferación difusa de astrocitos en el SNC. La parálisis y atrofia de las patas traseras acompañadas de pérdida de peso corporal empiezan a ser evidente a los 35 días de edad y progresan de manera que a los 60 días de edad los miembros posteriores están flexionados e inmóviles (Fig. 2). Los ratones afectados se desplazan arrastrándose con las patas delanteras y mueren alrededor de los 90  $\pm$  30 días de edad. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos muestran que los ratones homocigos para el transgén desarrollan anaplasia difusa de astrocitos (López-Revilla et al 2004). Este modelo ha sido registrado en la base de datos de los Modelos Murinos de Cáncer del National Cancer Institute (MMHCC 2004).

Los modelos transgénicos de tumores de astrocitos se basan en la sobreexpresión de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores y han proporcionado datos sobre los pasos que conducen a la oncogénesis (Reilly y Jacks 2001). Hay dos modelos murinos de astrocitoma, basados en la *sobreexpresión de oncogenes* controlados por el promotor de la proteína fibrilar acídica glial (específica de astrocitos). El primero poco conveniente por ser difícilmente reproducible, consiste en ratones transgénicos generados con una construcción que codifica el antígeno T del virus SV40 y aparece precozmente en animales microinyectados con el transgén que no han madurado sexualmente y por lo tanto no permite establecer una línea murina transgénica (Danks et al 1995). El segundo expresa el transgén v-src y manifiesta astrogliosis pero es muy variable en el momento de su inicio y en la progresión de la enfermedad (Weissenberger et al 1997).

El modelo de enfermedad neurológica de la línea transgénica murina  $\Delta 202$  descrita por López-Revilla et al (2004) tiene las siguientes ventajas sobre los modelos transgénicos de astrocitoma que han sido descritos por otros autores: (1) La colonia  $\Delta 202$  se mantiene mediante cruza de animales silvestres con los que portan el transgén en estado heterocigoto que no desarrollan el SN y sobreviven alrededor de 300 días; (2) las cruza de padres y madres  $\Delta 202$  heterocigotos generan animales normales, heterocigotos y homocigotos para el transgén, en proporciones 1:2:1; (3) en los ratones  $\Delta 202$  homocigotos para el transgén la penetrancia del SN es del 100% (i.e., todos son afectados), la evolución de la enfermedad es reproducible (inicio, progresión, muerte) y suficientemente lenta para permitir el estudio fisiológico y patológico de los individuos afectados. Los ratones  $\Delta 202$  homocigotos para el transgén podrían emplearse para estudiar la proliferación, la diferenciación y la tumorigénesis de los astrocitos, así como para establecer líneas celulares  $\Delta 202$  inmortalizadas de astrocitos y otras estirpes celulares.

La aparición del SN en los ratones  $\Delta 202$  podría deberse a que el transgén está insertado en secuencias génicas que por analogía con los modelos transgénicos pudiesen estar provocando: (1) la inactivación de un antioncogén específico de astrocitos, o (2) la activación de un protooncogén astrocito-específico, o (3) la generación de un polipéptido de fusión oncogénico.

Para tratar de determinar la base genética del SN de los ratones  $\Delta 202$  decidimos emplear la técnica de PCR inversa (PCRi) utilizando como molde el DNA genómico para obtener productos que (1) muestren las secuencias de los extremos derecho e izquierdo del transgén, (2) las secuencias que lo flanquean en el genoma y (3) la relación estructural del transgén con las secuencias vecinas.

Magdalena Rodríguez (estudiante de doctorado en el CINVESTAV-DF) inició este enfoque y obtuvo un producto de PCRi de 797 pb amplificando el DNA genómico de ratones  $\Delta 202$  que había sido restringido con *Xba* I y empleando una pareja de oligonucleótidos que empiezan a amplificar a 41 y 4521 pb de los flancos del transgén (Figs. 3 y 4) la comparación de esta secuencia con el genoma murino mostró una homología del 98% con el segmento **chr3:36422278-36422935**

del cromosoma 3 del ratón. Sin embargo, como la secuencia comparada no contenía los extremos del transgén, no permitió asegurar que efectivamente flanquea al transgén ni determinar su relación estructural con el sitio de inserción del transgén en el genoma de los ratones  $\Delta 202$ .

Por esta razón decidí extender el trabajo de Magdalena Rodríguez empleando parejas de oligonucleótidos adicionales que iniciaran la amplificación del transgén en regiones más alejadas de sus extremos derecho e izquierdo para que los productos de PCRi incluyesen tanto los extremos del transgén como las secuencias genómicas vecinas de los flancos derecho e izquierdo del transgén.

Para este propósito utilicé tres parejas de oligonucleótidos para PCRi localizadas en regiones más internas del transgén que la pareja de Magdalena Rodríguez. Además utilicé las enzimas de restricción *Bam* HI, *Eco* RI y *Xba* I para digerir el DNA genómico de los ratones  $\Delta 202$  que serviría como molde en las reacciones de amplificación cuyos productos de PCRi incluirían el flanco derecho y el izquierdo.

Primero usando la pareja de oligonucleótidos MR9-1/MM8-2 (localizados a 1267 pb y 2831 pb de los flancos izquierdo del transgén) amplifiqué mediante PCRi del DNA genómico de un ratón afectado con el SN restringido alternativamente con *Bam* HI, *Eco* RI y *Xba* I. Empleando dos parejas de oligonucleótidos: MM8-1/MR9-2 (localizados a 847 y 3639 pb de los extremos derecho e izquierdo del transgén) y MM4-1/ MR10-2 (localizados a 419 y 4521 pb de los de los extremos derecho e izquierdo del transgén), a partir del producto de la primera reacción obtuve los seis productos de PCRi anidada, que luego cloné en el vector pCR4TOPO. De esta manera obtuve seis clonas con insertos que pudieron ser secuenciados. El análisis de las secuencias mostró que: (1) las clonas provenientes de DNA genómico  $\Delta 202$  digerido con *Eco* RI y *Bam* HI sólo permitieron identificar secuencias del transgén; (2) las clonas derivadas de DNA genómico  $\Delta 202$  digerido con *Xba* I permitieron identificar tanto los extremos derecho e izquierdo del transgén como las secuencias murinas que los flanquean y coinciden con la secuencia de 797 pb obtenida por Magdalena Rodríguez.

Estos resultados confirman y amplían las características del sitio de inserción del transgén en la región **chr3:36422278-36422935** del cromosoma 3 de ratón y esperamos que sirvan para definir la base genética del SN de los ratones  $\Delta 202$ .

## MATERIAL Y MÉTODOS

### PCR inversa

Se emplea para amplificar las secuencias de DNA desconocidas que flanquean a una secuencia conocida que puede ser un gen silvestre o un transgén (Ochman et al 1988, Schneider et al 2000). El DNA genómico se digiere con una enzima de restricción que genere extremos cohesivos y no corte la secuencia conocida o transgén. Los fragmentos lineales se sellan con ligasa para obtener moléculas circulares, que se usan como molde en una PCR inversa (PCRi) con oligos diseñados para amplificar a partir de un punto dado de la secuencia conocida hacia los flancos con secuencias desconocidas (Fig. 5).

### *PCRi con el plásmido pSV $\Delta$ 202*

Con el fin de montar el método de amplificación de la PCRi desarrollada previamente por Magdalena Rodríguez, utilicé como molde 1  $\mu$ g de DNA plasmídico (pSV $\Delta$ 202 7122 pb) que había sido digerido con *Eco* RI (Invitrogen) por 3 h a 37°C. Trescientos-ng del plásmido digerido se recircularizaron con 1 U de ligasa de T4 (Invitrogen) incubando a 16°C durante toda la noche. Para llevar a cabo la PCRi utilizamos como molde 50 ng de pSV $\Delta$ 202 (intacto, linearizado o recircularizado) con los oligos MR9-1 y MR9-2 (diseñados por Magdalena Rodríguez y localizados a 1267 y 3639 pb de los extremos izquierdo y derecho del transgén) y polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen). Las mezclas de reacción fueron incubadas en el termociclador Touchgene Gradient (Techne) a 95°C durante 5 min, seguidas por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 68°C por 4 min, para terminar con un ciclo de 68°C por 10 min. Esperaba un producto de amplificación de 4750 pb con 2180 pb de los extremos derecho (1267 pb) e izquierdo (913 pb) del transgén y 2570 pb de los flancos del transgén en el plásmido.

### *PCRI anidada con DNA de la línea murina $\Delta 202$*

Para asegurar que el producto de amplificación de la PCRI contuviese las secuencias con los extremos derecho e izquierdo del transgén llevé a cabo la PCRI anidada en tres reacciones sucesivas con seis oligonucleótidos ubicados en diferentes regiones del transgén (Tabla 1, Anexo 1). Usé la pareja de oligos 1 (la más alejada de los extremos del transgén) para la primera reacción de PCRI (Reacción 1), con la cual esperaba un producto con los flancos y 2988 pb de los extremos derecho e izquierdo del transgén. Para la segunda reacción (Reacción 2), primera anidada, utilicé la pareja de oligos 2 cuyo producto de amplificación contendría 1761 pb del transgén y sería 1227 pb más corto que el de la primera reacción. Para la tercera reacción de PCRI, segunda anidada (Reacción 3) use la pareja de oligos 3, cuyo producto sería 1311 pb más corto que el de la segunda reacción y contendría 450 pb del transgén (Fig. 6).

Decidí digerir el DNA genómico  $\Delta 202$  alternativamente con *Bam* HI, *Eco* RI y *Xba* I, porque el único sitio *Bam* HI se encuentra en el extremo izquierdo del transgén y el único sitio *Eco* RI se encuentra en el extremo derecho del transgén. La restricción con estas dos enzimas generaría fragmentos lineales que contendrían el extremo correspondiente y un solo flanco, mientras que la restricción con *Xba* I generaría fragmentos lineales que contendrían secuencias de los dos flancos del transgén (Fig. 7).

Cuatro- $\mu$ g de DNA puro extraído de un ratón  $\Delta 202$  afectado con el SN fueron digeridos con 1 U de *Bam* HI, *Eco* RI o *Xba* I (Invitrogen) durante 3 h a 37°C. Los fragmentos lineales obtenidos con cada enzima de restricción fueron circularizados con 1 U de ligasa de T4 (Invitrogen) mediante incubación a 16°C durante toda la noche y empleados como molde para la Reacción 1 de PCRI con la pareja de oligos 1 (los más internos del transgén) con Elongase Enzyme Mix (Invitrogen). Las mezclas incubadas 5 min a 94°C, fueron seguidas por 40 ciclos a 94°C, 1 min a 60°C, y 8 min a 68°C, para concluir con un ciclo de 8 min a 68°C.

Las mezclas con los productos de la PCRI obtenidos con DNA genómico  $\Delta 202$  que había sido digerido con cada una de las tres enzimas y la pareja de

oligos 1 (Reacción 1) fueron diluidas 1:50 para usarlas como molde en la Reacción 2, anidada con la pareja de oligos 2; el mismo procedimiento fue repetido para la Reacción 3, anidada con la pareja de oligos 3. Los ciclos de incubación fueron como los usados con pSV $\Delta$ 202.

### **Clonación y secuenciación de los productos de PCRi**

Utilicé el TA cloning kit (Invitrogen) para clonar en el plásmido pCR4TOPO (Anexo 3) los productos de las tres reacciones de PCRi obtenidos por amplificación de los fragmentos del DNA genómico  $\Delta$ 202 circularizados después de la digestión con *Bam* HI, *Eco* RI o *Xba* I y la pareja de oligos 2. De la misma manera amplifiqué los tres productos generados con la pareja de oligos 3 con Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen) para asegurar que los tuviesen extremos cohesivos. Obtuve seis plásmidos que contenían cada uno de los productos amplificados (Tabla 2).

Utilicé células competentes de *Escherichia coli* TOP10 para obtener transformantes de los seis plásmidos mediante choque térmico. Seleccioné las colonias transformantes con ampicilina y obtuve clones de cada transformante mediante dos pases sucesivos en agar LB con ampicilina y las caractericé con el método ultrarrápido (DBM-IPICYT 2003). Purifiqué DNA plasmídico de las clones transformantes con el UltraClean 6 minute Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio Laboratories Inc). Los insertos de los vectores clonados fueron secuenciados por un método automático en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México utilizando el oligo T3 como iniciador.

## RESULTADOS

### Montaje de la PCRi con pSV $\Delta$ 202

Empleando pSV $\Delta$ 202 como molde y la pareja de oligos MR9-1 y MR9-2 traté de generar el producto que había obtenido Magdalena Rodríguez. El experimento fue controlado tanto con pSV $\Delta$ 202 linearizado con *Eco* RI, donde no se generó el producto, como con pSV $\Delta$ 202 linearizado y recircularizado con el cual sí se obtuvo el producto esperado de 4750 pb (Fig. 8).

### PCRi con DNA genómico de ratones $\Delta$ 202

*Mezclas de Reacción 1.* Luego de restringir el DNA genómico murino  $\Delta$ 202 con *Bam* HI, *Eco* RI o *Xba* I, llevé a cabo la PCRi con la pareja de oligos 1 y no observé una banda principal del producto de amplificación, sino un aumento del fondo a lo largo de todos los carriles en los que analicé la mezcla de reacción (Fig. 9).

*Mezclas de Reacción 2.* Con las Mezclas de Reacción 1 hice diluciones 1:50 para emplear los productos potenciales como molde para la Reacción 2, anidada con la pareja 2 de oligos. El análisis de los productos de PCR de la mezcla con DNA genómico  $\Delta$ 202 restringido con *Bam* HI (2B) mostró una banda nítida de  $\approx$  1800 pb. Con la mezcla que contenía DNA genómico  $\Delta$ 202 digerido con *Eco* RI (2E) obtuve una banda nítida de  $\approx$  1850 pb, mientras que con la mezcla que contenía DNA D202 digerido con *Xba* I (2X) obtuve una banda nítida de  $\approx$  1900 pb (Fig. 10).

*Mezclas de Reacción 3.* Obtuve diluciones 1:50 de las Mezclas de Reacción 2 para emplearlas como moldes en la Reacción 3, anidada con la pareja de oligos 3. Esperaba (1) que el tamaño de los productos amplificados disminuyese 1311 pb

por la localización en el transgén de la pareja de oligos empleada para la amplificación y (2) que los productos contuviesen 450 pb del transgén.

El producto 3B fue de  $\approx 500$  pb por lo que probablemente contiene  $\approx 50$  pb del flanco izquierdo del transgén. El producto de amplificación 3E fue de  $\approx 550$  pb por lo cual podría contener  $\approx 100$  pb del flanco derecho del transgén. El producto 3X de  $\approx 600$  pb contendría  $\approx 150$  pb con las secuencias de ambos flancos del transgén (Fig. 11).

### **Clonación de los productos de PCRi con DNA genómico $\Delta 202$**

Los seis productos del DNA  $\Delta 202$  digerido con *Bam* HI, *Eco* RI y *Xba* I y luego circularizado y amplificado en las reacciones anidadas 2 y 3 fueron clonados en pCR4TOPO (Tabla 2).

Los seis vectores fueron luego utilizados para obtener transformantes de *E. coli* TOP10 seleccionadas con ampicilina y confirmadas por detección ultrarrápida. Después de ser caracterizadas, las seis cepas bacterianas fueron criopreservadas (Tabla 3).

### **Análisis de las secuencias de los insertos**

Los insertos obtenidos con los productos de amplificación del DNA  $\Delta 202$  digerido con *Bam* HI y *Eco* RI (2B, 3B, 2E y 3E) sólo permitieron determinar secuencias del transgén, pero no las de los flancos de su inserción en el genoma murino.

En contraste, los insertos obtenidos con DNA genómico  $\Delta 202$  digerido con *Xba* I y amplificado en las reacciones 2 y 3 (2X y 3X) permitieron determinar tanto secuencias del transgén como de los flancos de su inserción en el genoma murino.

El inserto 2X permitió determinar una secuencia híbrida de 823 pb con 689 pb del transgén y 130 pb que tenían un alto grado de homología con la secuencia de 797 pb de Magdalena Rodríguez (Fig. 12).

El inserto obtenido de la Reacción 3 con DNA genómico  $\Delta 202$  digerido con *Xba* I y amplificado con la pareja de oligos 3 (3X) permitió determinar una secuencia de 542 pb con 408 pb del transgén (387 pb del flanco izquierdo y 21 pb

del extremo derecho) y 133 pb (Fig. 13) que también resultó homóloga a la secuencia de 797 pb de Magdalena Rodríguez.

Al alinear las secuencias derivadas de los insertos 2X y 3X pudimos obtener la secuencia consenso (Figs. 13 y 14).

#### *Alineación de las secuencias híbridas*

Una vez identificado el sitio de corte *Xba* I, mediante la alineación de los extremos del transgén (Figs. 16 y 17) como de las secuencias murinas homólogas a la de Magdalena Rodríguez (Fig. 18), identificamos las secuencias de los extremos derecho e izquierdo del transgén y las del genoma murino en los flancos derecho e izquierdo del transgén.

## DISCUSIÓN

Como la secuencia de 797 pb no contenía secuencias del transgén, nos propusimos obtener productos de PCRi híbridos (i.e., que contuvieran tanto secuencias del transgén como las secuencias murinas vecinas en el sitio de inserción). Para iniciar el trabajo requeríamos montar la PCRi y repetir los resultados previos usando como molde a pSV $\Delta$ 202 (intacto, linearizado y recircularizado) y la pareja de oligos MR9-1/MR9-2; de esta manera confirmamos las condiciones y los resultados previos: obtuvimos la banda esperada de 4750 pb con pSV $\Delta$ 202 intacto y recircularizado pero no con pSV $\Delta$ 202 linearizado.

La determinación de las secuencias de los flancos en el sitio de inserción del transgén mediante PCRi demanda que los productos de amplificación (1) sean híbridos y (2) las secuencias del transgén sean suficientemente largas para obtener datos no ambiguos. Para lograrlo diseñamos un experimento de PCRi anidada en tres reacciones sucesivas, con parejas de oligonucleótidos localizadas en regiones cada vez más cercanas a los extremos del transgén y empleando como molde DNA genómico de la línea murina  $\Delta$ 202 restringido con tres enzimas que no cortan el transgén.

Digerimos el DNA genómico con *Bam* HI, *Eco* RI o *Xba* I. Para las dos primeras hay sitios de corte en el extremo izquierdo y derecho de la construcción  $\Delta$ 202, respectivamente. En el caso de que ambos sitios fuesen conservados en el sitio de inserción del transgén, la digestión con estas enzimas generaría fragmentos lineales que tendrían sólo el extremo correspondiente, mientras que *Xba* I generaría fragmentos lineales que contendrían secuencias de ambos flancos del transgén.

El DNA  $\Delta$ 202 fragmentado con cada una de las tres enzimas sirvió de molde para la Reacción 1 de PCRi. Empleamos los productos obtenidos como

molde en la Reacción 2 y los productos de ésta a su vez para la Reacción 3. Así obtuve seis productos de PCRi anidada (tres de la Reacción 2 y tres de la Reacción 3) que luego cloné en el vector pCR4TOPO. De esta manera obtuve seis clonas con insertos que pudieron ser secuenciados.

Los cuatro productos derivados de DNA  $\Delta$ 202 digerido con *Eco* RI y *Bam* HI sólo permitieron identificar secuencias del transgén, mientras que los dos derivados de DNA digerido con *Xba* I en las reacciones 2 y 3 (2X y 3X) permitieron identificar tanto secuencias murinas como de los extremos del transgén. Así obtuve una secuencia consenso de 823 pb que contiene 444 pb del extremo izquierdo del transgén, 246 pb del extremo derecho del transgén y 133 pb que alinean con la secuencia de 797 pb.

En la secuencia de 133 pb localicé el sitio de corte de *Xba* I, a partir del cual pude identificar los flancos: (1) 125 pb del flanco izquierdo y (2) 8 pb del flanco derecho. La alineación con la secuencia de 797 pb fue casi perfecta y confirma la ubicación del flanco izquierdo junto al extremo izquierdo del transgén. El sitio de inserción del transgén por lo tanto corresponde a la región **chr3:36422278-36422935**, localizada en el cromosoma tres.

En la secuencia consenso se han perdido los sitios *Eco* RI y *Bam* HI localizados originalmente en los extremos de la construcción que permitió obtener la línea transgénica. Este dato implica que los fragmentos genómicos generados con estas enzimas deben tener los sitios de restricción a cierta distancia de los extremos del transgén.

La identificación del sitio de inserción del transgén en la línea murina  $\Delta$ 202 lograda con este trabajo constituye una base firme para tratar de aislar, secuenciar y caracterizar la región genómica vecina al sitio de la inserción. El trabajo futuro podría también ayudar a definir la expresión y la función de esta región genómica ligada a la diferenciación y tumorigénesis de los astrocitos y al desarrollo del sistema nervioso central.

## REFERENCIAS

- CBTRUS (2002) 2002 Annual Report by Central Brain Tumor Registry of the United States, [www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org)
- Danks RA, Orian JM, Gonzales MF, Tan S-S, Alexander B, Mikoshiba K, Kaye AH. Transformation of astrocytes in transgenic mice expressing SV40 T antigen under the transcriptional control of the glial fibrillary acidic protein promoter. *Cancer Res* 55:4302-4310, 1995
- DBM–IPICT. Manual del Curso de Practicas del Laboratorio de Biología Molecular. 2003
- Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron glia communication. *Science* 298:556-562, 2002
- Gimsa U, Oren A, Pandiyan P, Teichmann D, Bechmann I, Nitsch R, Brunner-Weinzierl MC. Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J Mol Med* 82:364-372, 2004
- Hu B, Sun S, Tong E. NMDA and AMPA receptors mediate intracellular calcium increase in rat cortical astrocytes 1. *Acta Pharmacol Sinica*, 2004
- López-Revilla R, Soto-Zárate C, Ridaura C, Chávez-Dueñas L, Paul D. Progressive paralysis associated with diffuse astrocyte anaplasia in delta 202 mice homozygous for a transgene encoding the SV40 T antigen. *Neuropathology* 2430-2437, 2004
- MMHCC Cancer Models Database: <http://cancermodelsstage.nci.nih.gov/mmhcc/searchResultsDetail.jsp?modelId=2256&modelName=delta+202+>
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-623, 1988

- Peters A, Palay SL, Webster HF. The fine structure of the nervous system. New York: Oxford University Press 1991
- Reilly KM and Jacks T. Genetically engineered mouse models of astrocytoma: GEMs in the rough? *Sem Cancer Biol* 11:177-190, 2001
- Schneider D, Duperchy E, Coursange E, Lenski RE, Blot M: Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* 156:477-88, 2000
- Takuma K, Babab A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progr in Neurobiol* 72:111-127, 2004
- Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Ann Rev Neurosci* 24:385-428, 2001
- Weissenberger J, Steinbach JP, Malin G, Spada S, Rüllicke T, Aguzzi A. Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene* 14:2005-2013, 1997

**Tabla 1. Parejas de oligonucleótidos utilizadas**

| Pareja | Nombre | Secuencia (5'→3')        | Posición en el transgén | Tm (°C) |
|--------|--------|--------------------------|-------------------------|---------|
| 1      | MR9-1  | CAAAAACCATATGCCAACAGG    | 1267                    | 58.0    |
|        | MM4-2  | ATGATGTTCCACACGTCACATG   | 2831                    | 60.8    |
| 2      | MM8-1  | AGGATGTAAAGGGCACTGGA     | 848                     | 60.4    |
|        | MR9-2  | AGGAGGAGACTAAGGAGCTCAGG  | 3639                    | 66.3    |
| 3      | MM4-1  | ATGAAGTTTAATGTGGCTATGGGA | 419                     | 59.4    |
|        | MR10-2 | TGCTTGGCACTGTCCTCTCA     | 4521                    | 62.5    |

**Tabla 2. Vectores con los seis Insertos clonados en pCR4TOPO<sup>a</sup>**

| Vector | Inserto |
|--------|---------|
| pMM103 | 2B      |
| pMM104 | 2E      |
| pMM105 | 2X      |
| pMM106 | 3B      |
| pMM107 | 3E      |
| pMM108 | 3X      |

<sup>a</sup> Invitrogen

**Tabla 3. Cepas de *E. coli* utilizadas**

| Cepa  | Descripción                       |
|-------|-----------------------------------|
| MM100 | <i>E. coli</i> Top10 <sup>a</sup> |
| MM101 | MM100 con pSV $\Delta$ 202        |
| MM103 | MM100 con pMM103                  |
| MM104 | MM100 con pMM104                  |
| MM105 | MM100 con pMM105                  |
| MM106 | MM100 con pMM106                  |
| MM107 | MM100 con pMM107                  |
| MM108 | MM100 con pMM108                  |

<sup>a</sup> Obtenida de Salvador Ambriz

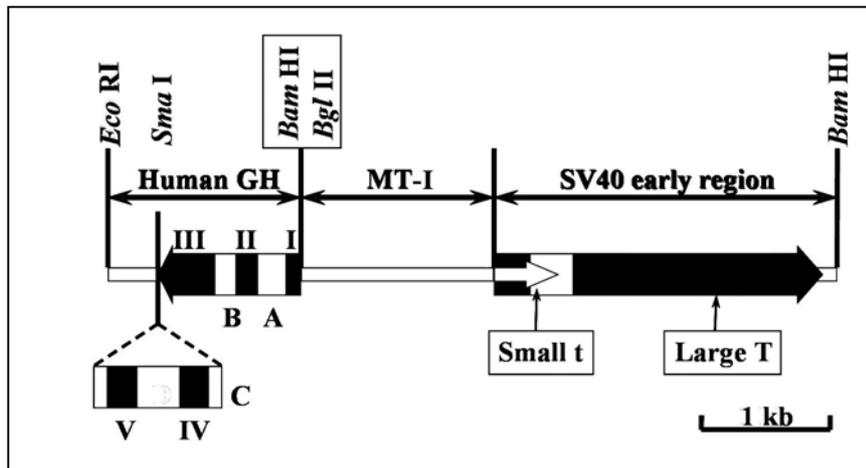


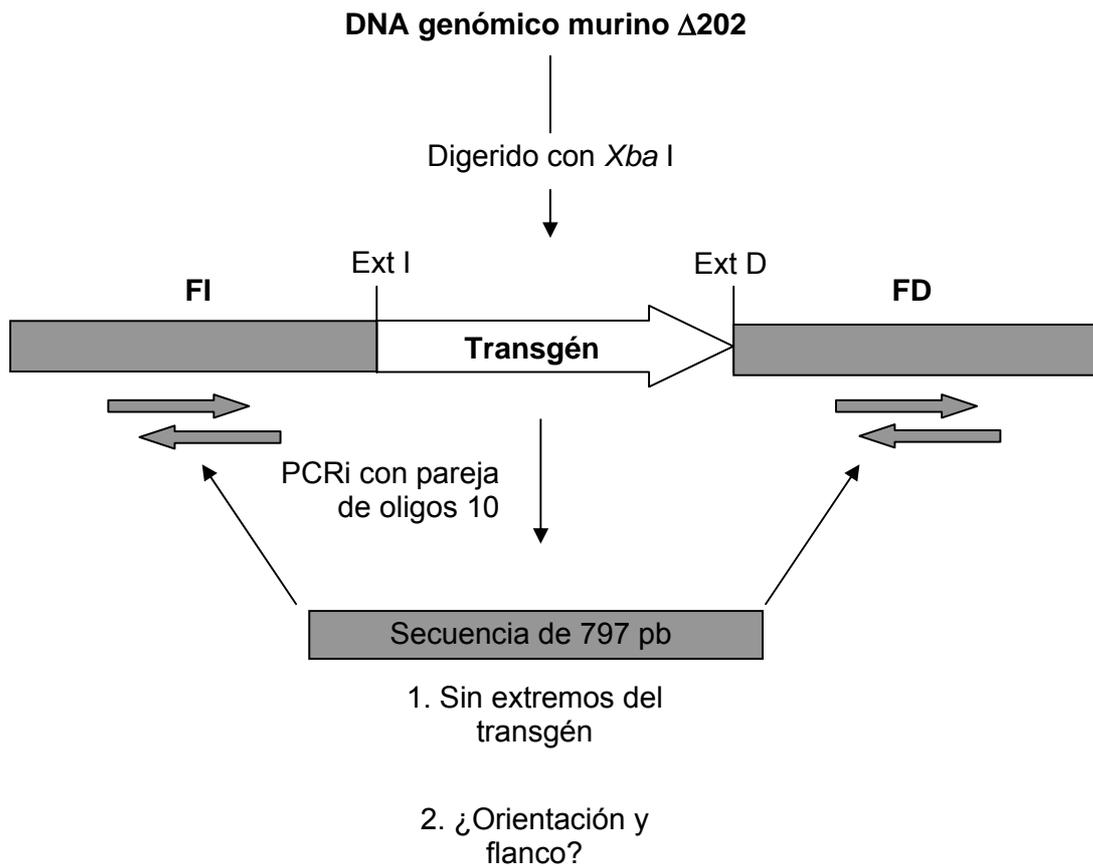
Fig. 1. Mapa de la construcción  $\Delta 202$ .



**Fig. 2. Ratón macho de 101 días afectado con el síndrome neurológico (Tomado de López-Revilla et al, 2004).**

|  |    |    |    |    |     |
|--|----|----|----|----|-----|
| 1  | 10 | 20 | 30 | 40 |     |
| GCCCAGGNTTACGGCCANGNNGANAANAACCCCTCNCTAAAGGGNGGAGN |    |    |    |    | 50  |
| NCCGGNNGGGGAAACGAANTCGGCCNTGGAATTGGCNCGGGNCTCTCAC  |    |    |    |    | 100 |
| ANACACACTCTATTTACACACACACTTTGTNTGTGNACACACACACACA  |    |    |    |    | 150 |
| CCATCTTTCACACATACTCTTTACACACACACGCACACACACACTCTCT  |    |    |    |    | 200 |
| CTCTCTNACACACATAAACTCTTTACACACACACACTCTTTGTATCTCA  |    |    |    |    | 250 |
| CATACTCTCTCACACACATGCTCTCTCTATCTCACACACACNCTCTNT   |    |    |    |    | 300 |
| ATCTCACACACACTCTCTCTCACACACACTCTCTCTATCTCACACACA   |    |    |    |    | 350 |
| CACTCACACACACTCTCTCTCTCACACACACTCTCTCTCCACACACACTC |    |    |    |    | 400 |
| TCACCCACACACACTCTCTCTCTCTCTCACACACACTCTCGCNCACAC   |    |    |    |    | 450 |
| ACACACTCTCTCTCACACACACTCTATATACACACACACTCTCTTTCT   |    |    |    |    | 500 |
| CTCACACACACTCTCACACACACACATAACACACTCTCTCTCTCACA    |    |    |    |    | 550 |
| CACACACACACTCTCTCTCCCTCACACACACTCTCACACACACTCTCA   |    |    |    |    | 600 |
| CACACTCTCACACACACTCTCTCTCACACACACACTCTCTCTCTCA     |    |    |    |    | 650 |
| CACACTCTCACACATACTCTCTCACACACACTTTCTCACACTCA       |    |    |    |    | 700 |
| CACACACACATAACACACACTCTCTCTCTCTCACACACACACATGAG    |    |    |    |    | 750 |
| AGAGCAGTGCGAATTCAAAGGGNGAATTCGCGGCCGCTAAATCAAAA    |    |    |    |    | 797 |

**Fig. 3. Secuencia de 797pb obtenida por Magdalena Rodríguez por amplificación del DNA genómico  $\Delta 202$  restringido con *Xba* I y amplificado por PCRi con la pareja de oligos MR10-1 y MR10-2.**



**Fig. 4. Características de la secuencia de 797 pb determinada por Magdalena Rodríguez, antecedente directo de este trabajo.** (FI) Flanco izquierdo, (FD) Flanco derecho, (Ext I) Extremo izquierdo del transgén, (Ext D) Extremo derecho del transgén

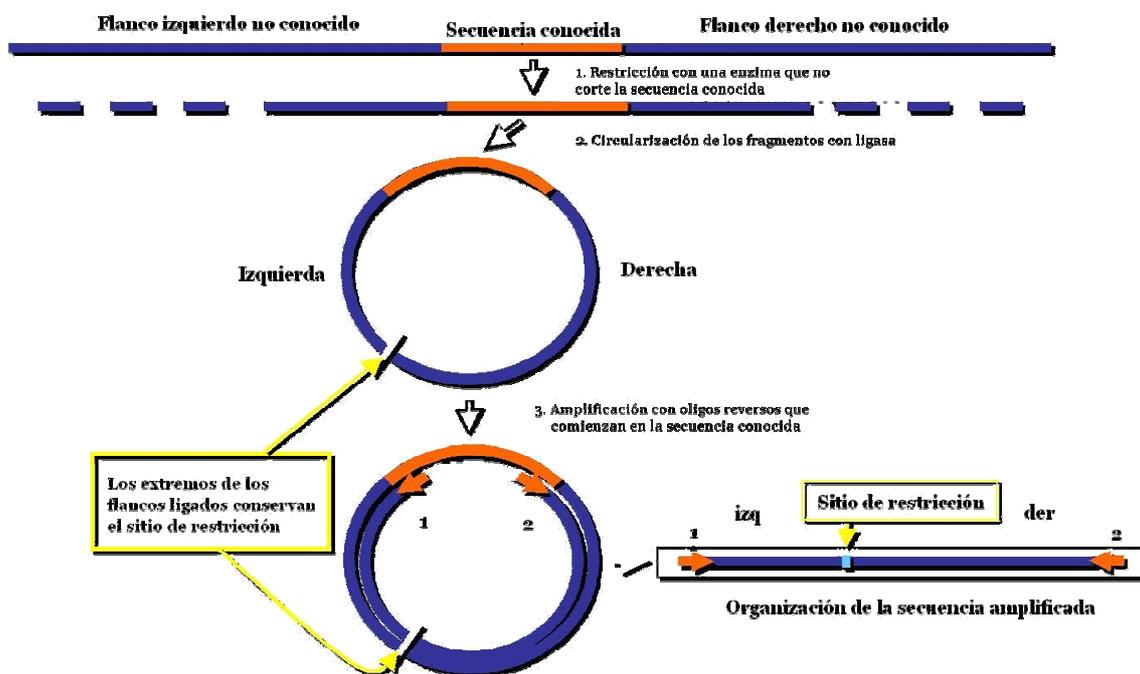


Fig. 5. Uso de la PCR inversa para amplificar las secuencias que flanquean una secuencia conocida o transgén.

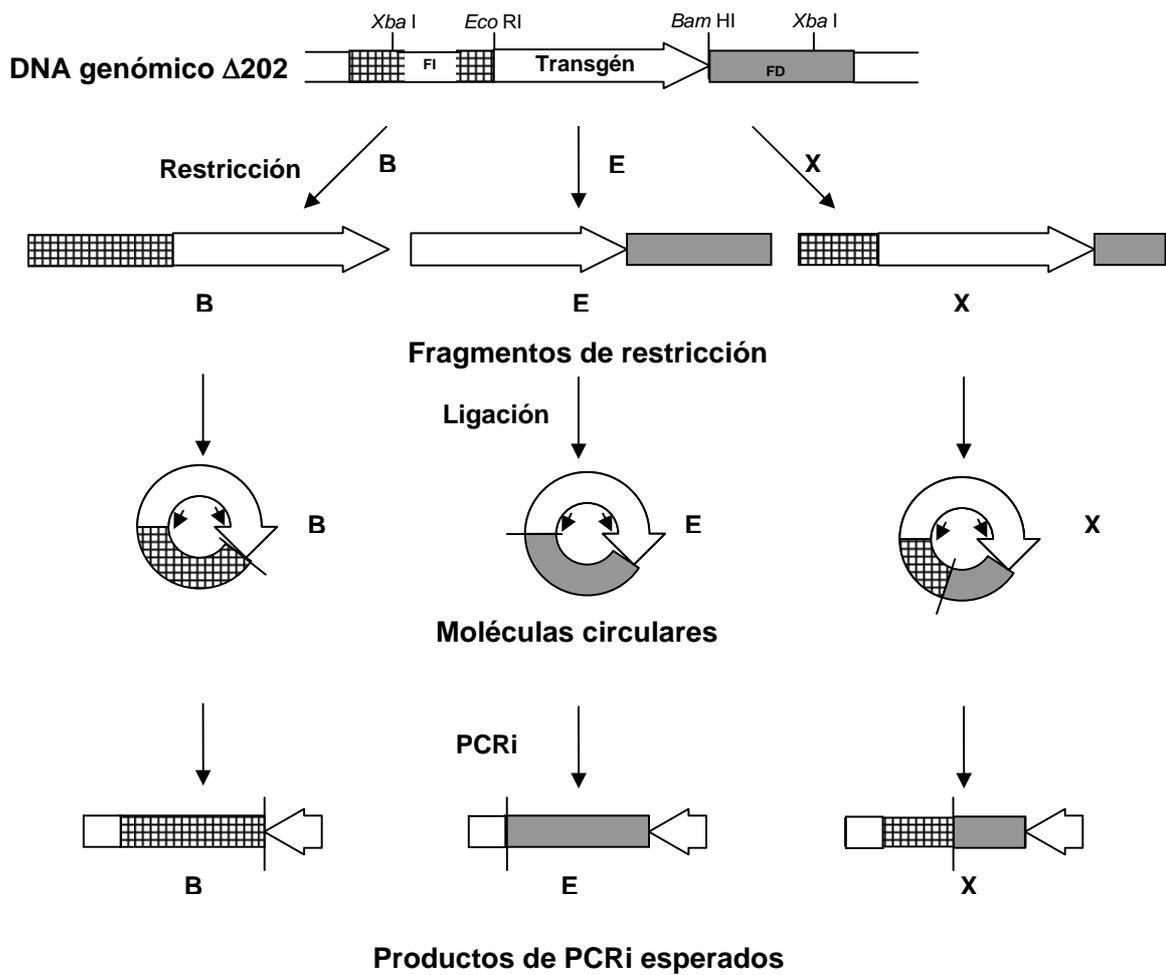
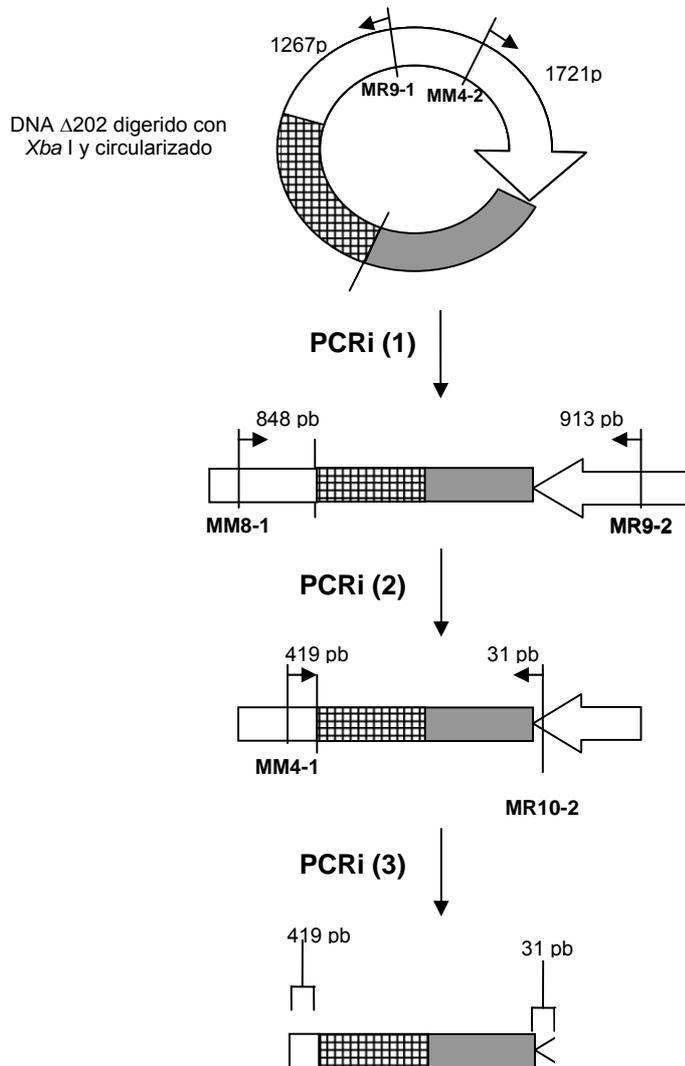
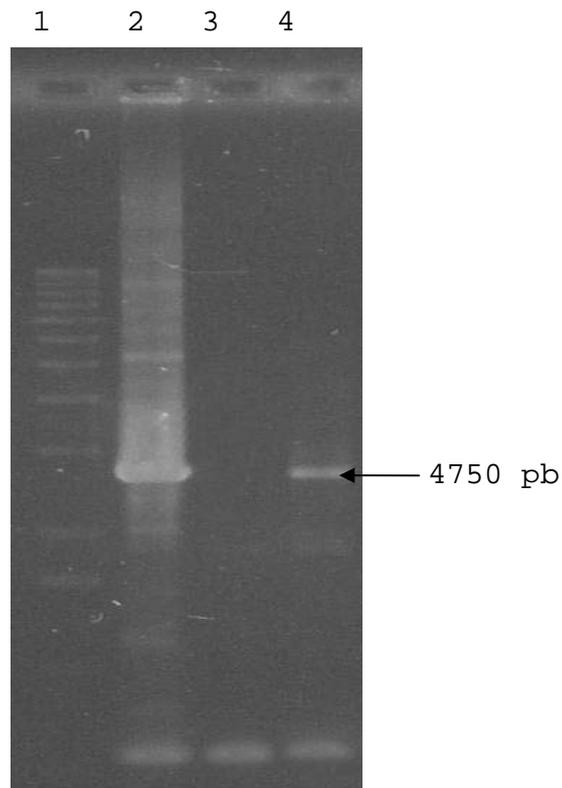


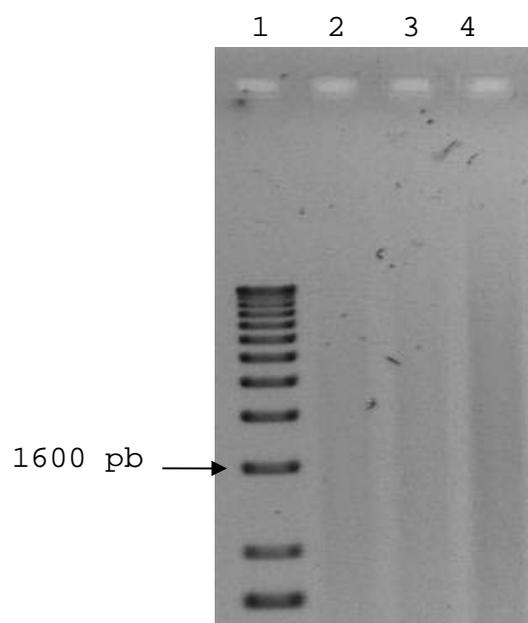
Fig. 6. Enzimas de restricción usadas y productos de PCRi esperados con las diferentes moléculas circulares de DNA genómico  $\Delta 202$  generadas y empleadas como molde.



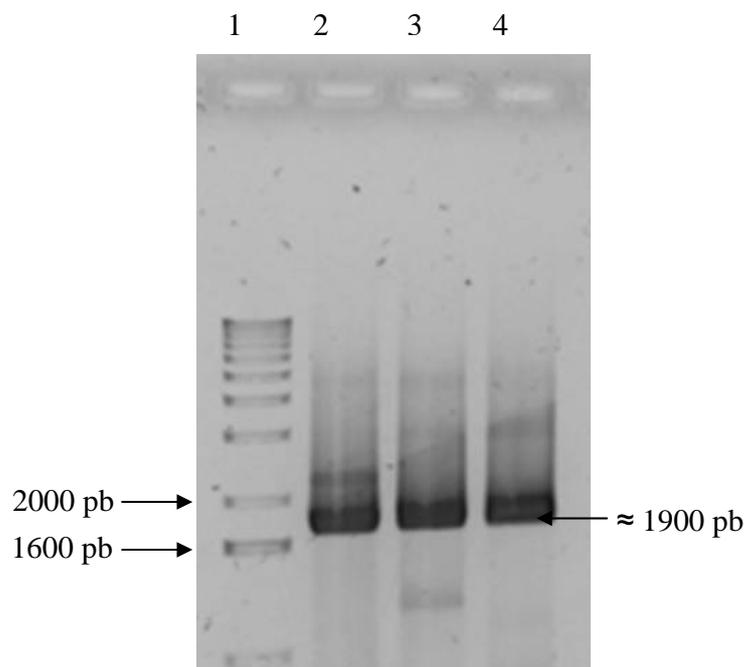
**Fig. 7. Amplificación mediante PCRi anidada en tres etapas, empleada en este trabajo.** El diagrama modela las moléculas circulares de DNA obtenidas por restricción con *Xba* I y los productos correspondientes esperados en las tres reacciones de PCRi sucesivas. Por la ubicación de los oligonucleótidos usados, en la Reacción 1 el producto obtenido tendría 2988 pb correspondientes al transgén (1267 pb FI y 1721 pb FD); en la Reacción 2, el producto tendría 1761 pb del transgén (848 pb FI y 913 pb FD) y en la Reacción 3, tendría 450 pb del transgén (419 pb FI y 31 pb FI).



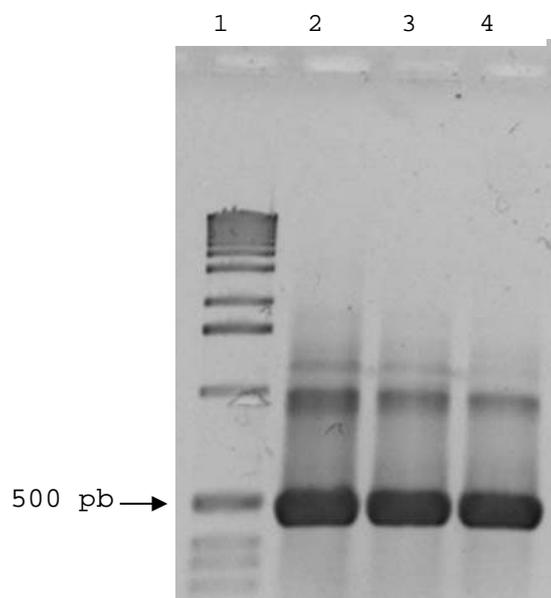
**Fig. 8. Montaje de la PCRi con pSV $\Delta$ 202 intacto linearizado y recircularizado, amplificado con la pareja de oligos MR9-1 y MR9-2. Carril 1, 1kb ladder. Carril 2, PCRi con pSV $\Delta$ 202 intacto con una banda principal de 4750 pb. Carril 3, PCRi con pSV $\Delta$ 202 linearizado con *Eco* RI; no se observa la banda de 4750 pb. Carril 4, PCRi con pSV $\Delta$ 202 linearizado y recircularizado con ligasa; se observa la banda de 4750 pb.**



**Fig. 9. Mezclas de la Reacción 1 de PCRi con DNA genómico de ratones  $\Delta 202$  fragmentado con *Bam* HI (B), *Eco* RI (E) o *Xba* I (X) y amplificados con la pareja de oligos 1. Carril 1, 1kb ladder. Carril 2 (Reacción 1X), DNA  $\Delta 202$  digerido con *Xba* I. Carril 3 (Reacción 1E), DNA  $\Delta 202$  digerido con *Eco* RI. Carril 4 (Reacción 1B), DNA  $\Delta 202$  digerido con *Bam* HI.**



**Fig. 10. Mezclas de la Reacción 2 de PCRi usando como molde los probables generados en la Reacción 1 anidados con la pareja de oligos 2. Carril 1, 1kb ladder. Carril 2 (2B), se observa una banda principal de  $\approx 1800$  pb. Carril 3 (2E), se observa una banda principal de  $\approx 1850$  pb. Carril 4 (2B), con una banda principal de  $\approx 1900$  pb.**



**Fig. 11. Mezcla de la Reacción 3 de PCRi usando como molde los productos de la Reacción 2 anidados con la pareja de oligos 3. Carril 1, 1 kb ladder. Carril 2 (3X), con una banda principal de  $\approx$  600 pb. Carril 3 (3E), con una banda principal de  $\approx$  550 pb. Carril 4 (3B), con una banda principal de  $\approx$  500 pb.**

|   | 1   | 10 | 20 | 30 | 40  |     |
|---|---|----|----|----|-----|-----|
| EI  | TACNTCNAATTACANNGANACCCTNNAANCTCANATCNTNACCGANNTCT  |    |    |    |     | 50  |
|   | TTNTCANTACTACTACNACTTCTGTCGGTCCNTNTTACGACTATTTTNACN |    |    |    |     | 100 |
|   | TCTACCATCCCTCNTNNTGTACCTTCTGAGTCCCNTACTTNGTCCGTAAC  |    |    |    |     | 150 |
|   | TAAGTGTCAGGGTNCCGAGTAAAGTNCGGGGAGTCAGNNGTGTCAGACNA  |    |    |    |     | 200 |
|   | GTACTAGTNTTAGTCGNATGGTGNAANGATGCTCCAAAANNAACGANAT   |    |    |    |     | 250 |
|   | TTTTTGGANGGTGTGGAGGNGGACNTGGACTTTGTANNTTACTTACGTTN  |    |    |    |     | 300 |
|   | ACAAAANAATTGAACAANTAACGTGGAATATNACCAATGTTTATTTTCGTT |    |    |    |     | 350 |
|   | ATCGTAGTGTTTAAAGTGNTTATTTTCGTAAAANAAGTGNACNTAGATCAA |    |    |    |     | 400 |
|   | NNCCAAACAGGTTTGAGTAGTNNNATAGAATANTACAGACCTAGNACTCT  |    |    |    |     | 450 |
|   | CTCTCTCTCACACACACACATGGCCCAGGCTTACGGCCANGNNGANAANN  |    |    |    |     | 500 |
| AACCCTCNCTAAAGGGGGGAGNTCCGNNNGGGGAAACGAANNCGGCCNT |   |    |    |    | 550 |     |
| GGAATTGGCNCGGGNCCTANACAACACGTTGTCCNTAGANGACTCANNT |   |    |    |    | 600 |     |
| ED  | GGGTTGCNTACTCTCNTGTACCGGTTNNTTCGTTGAGTNTACAGNGTGGC  |    |    |    |     | 650 |
|   | CAACCNGGTACCGTCNATCNGATACGACNNNGACCTGCAGGANGACGACC  |    |    |    |     | 700 |
|   | NTATNNATAAAATTNNAGTCTTCCTNTCCCTNCCCTCNTCACCAAGTNCG  |    |    |    |     | 750 |
|   | GACATTAGGNNCGTTNAACCCCTNNGNTTCCANNCATCTAGNNGACTCTAN |    |    |    |     | 800 |
|   | TCCTCNNCNTCTNNTCNGACNGG                             |    |    |    |     | 823 |

**Possible sitio de corte Xba I**

Flancos del transgén 133 pb

**Fig. 12. Secuencia de 823 pb determinada con el inserto 2X (Clona MM105).** 117 N, 14% de ambigüedad. Extremo izquierdo (EI) 444 pb, Extremo derecho (ED) 298 pb.

|    | 1   | 10 | 20 | 30 | 40 |     |
|----|---|----|----|----|----|-----|
| EI | TACNACTACTACTNCTGTCGGTCCNNTTACGNCTANTTTTANNTCTACCA  |    |    |    |    | 50  |
|    | NCCCTCNTNNTGTACCTTNTNAGTCCCGTACTTTGTCCNTAACTAAGTGT  |    |    |    |    | 100 |
|    | CAGGGTTCNGAGTAAGTCCGGGGAGNCAGGNGTGTGACACNAGTACTAGT  |    |    |    |    | 150 |
|    | NTTAGTCGNNATGGTGNAANGATGCTCCAAAANNAACGANATTTTTTTGGA |    |    |    |    | 200 |
|    | NGGTGTGGAGNGGACNTGGACTTTGTANNTTACTTACGTTNACAACAAN   |    |    |    |    | 250 |
|    | AATTGAACAANTAACGTCGAATATNACCAATGTTTATTTTCGTTATCGTAG |    |    |    |    | 300 |
|    | TGTTTAAAGTGNTTATTTTCGTAAAANAAGTGACNTAAGATCAANACCAA  |    |    |    |    | 350 |
|    | CAGGTTTGAGTAGTTANATAGAATANTACAGACCNNGCACTCTCTCTCTC  |    |    |    |    | 400 |
|    | TCACACACACACATGGCCCAGGNTTACGGCCANGNNGANAANAACCCCTC  |    |    |    |    | 450 |
|    | NCTAAAGGGNGGAGNCCGGNNGGGGAAACGAANTCGGCCNTGGAATTG    |    |    |    |    | 500 |
|    | GCNCGGGNCTCTAGNNACACNNTGTCCGNGATGNCTCACCN           |    |    |    |    | 542 |

**Possible site of Xba I cut**  
 Flancos del transgén 133 pb

ED

**Fig. 13. Secuencia de 542 pb determinado con el inserto 3X (Clona MM108), (67 N, 12% de ambigüedad) Extremo izquierdo (EI) 385 pb, Extremo Derecho (ED) 21 pb**

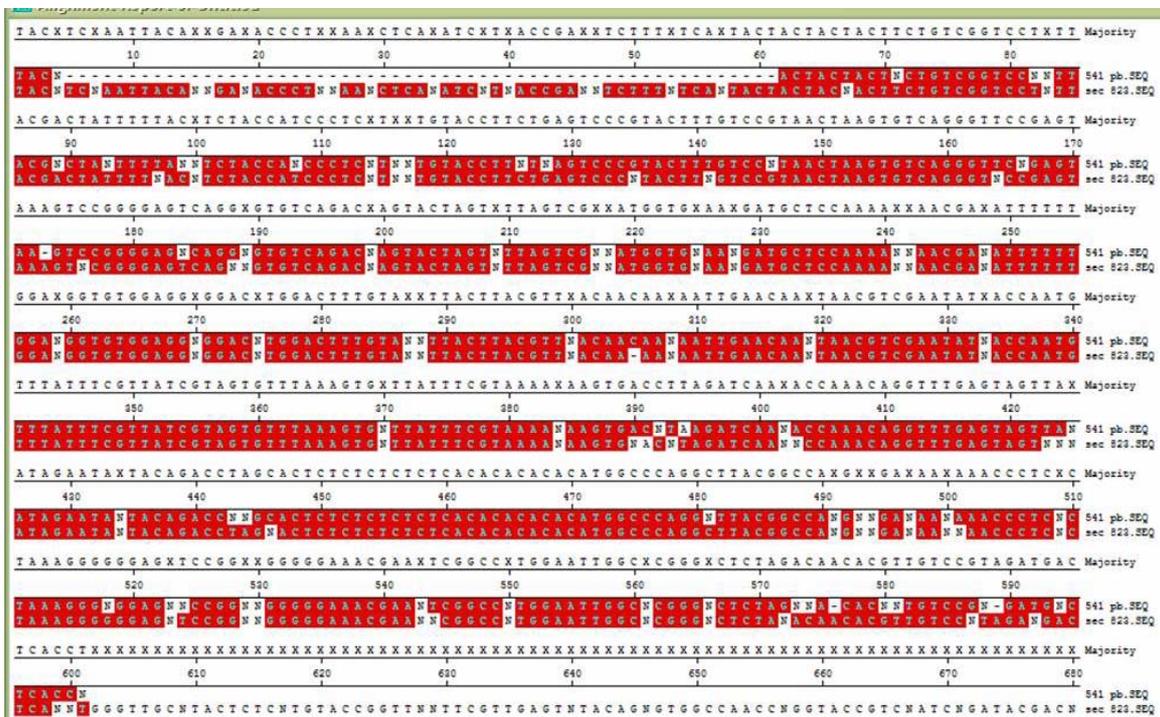


Fig. 14. Alineación de las secuencias de 823 pb y 543 pb.

|   | 1  | 10 | 20 | 30 | 40  |     |
|---|--|----|----|----|-----|-----|
| EI  | TACNTCNAATTACANNGANACCCTNNAANCTCANATCNTNACCGANNTCT         |    |    |    |     | 50  |
|   | TTNTCANTACTACTACNACTTCTGTCTGGTCCCTNTTACGACTATTTTNACN       |    |    |    |     | 100 |
|   | TCTACCATCCCTCNTNNTGTACCTTCTGAGTCCCNTACTTNGTCCGTAAC         |    |    |    |     | 150 |
|   | TAAGTGTGAGGGTNCAGTAAAGTNCGGGGAGTCAGNNGTGTGAGACNA           |    |    |    |     | 200 |
|   | GTACTAGTNTTAGTCGNNATGGTGNAANGATGCTCCAAAANNAACGANAT         |    |    |    |     | 250 |
|   | TTTTTGGANGGTGTGGAGGNGGACNTGGACTTTGTANNTTACTTACGTTN         |    |    |    |     | 300 |
|   | ACAAAANAATTGAACAANTAACGTGCAATATNACCAATGTTTATTTTCGTT        |    |    |    |     | 350 |
|   | ATCGTAGTGTTTAAAGTGNTTATTTTCGTAAAANAAGTGAACCTAGATCAA        |    |    |    |     | 400 |
|   | NACCAAACAGGTTTGAGTAGTTANATAGAATANTACAGACCTAGC <b>ACTCT</b> |    |    |    |     | 450 |
|   | <b>CTCTCTCTCACACACACACATGGCCCAGGCTTACGGCCAAGNNGANAANN</b>  |    |    |    |     | 500 |
| <b>AACCCTCNCTAAAGGGGGGAGNTCCGGNNGGGGAAACGAANTCGGCCNT</b>  |  |    |    |    | 550 |     |
| <b>GGAATTGGCNCGGGNCCTAGACAACAC</b> GTTGTCCGTAGANGACTCANNT |  |    |    |    | 600 |     |
| ED  | GGGTGTCNTACTCTCNTGTACCGGTTNNTTCGTTGAGTNTACAGNGTGGC         |    |    |    |     | 650 |
|   | CAACCNGGTACCGTCNATCNGATACGACNNNGACCTGCAGGANGACGACC         |    |    |    |     | 700 |
|   | NTATNNATAAAATTNNAGTCTTCCTNTCCCTNCCCTCNTCACCAAGTNCG         |    |    |    |     | 750 |
|   | GACATTAGGNNCGTTNAACCCCTNNGNTTCCANNCATCTAGNNGACTCTAN        |    |    |    |     | 800 |
|   | TCCTCNNCNTCTNNTCNGACNGG                                    |    |    |    |     | 823 |

**Fig. 15. Secuencia consenso de los flancos del sitio de inserción derivada de las secuencias de 823 pb y 543 pb.**

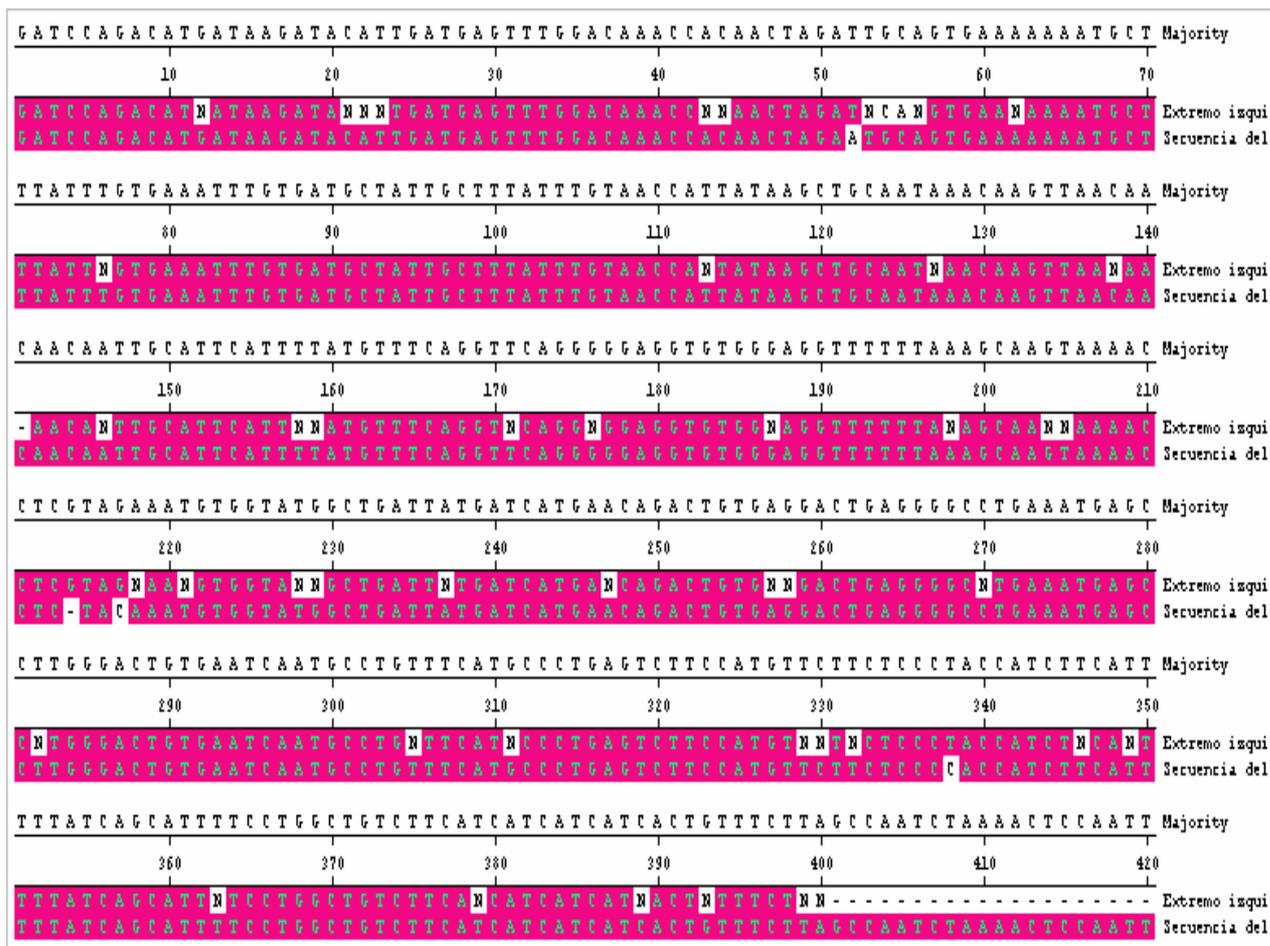


Fig. 16. Alineación del extremo izquierdo de la secuencia consenso obtenida de los flancos del sitio de inserción con el extremo izquierdo del transgén.

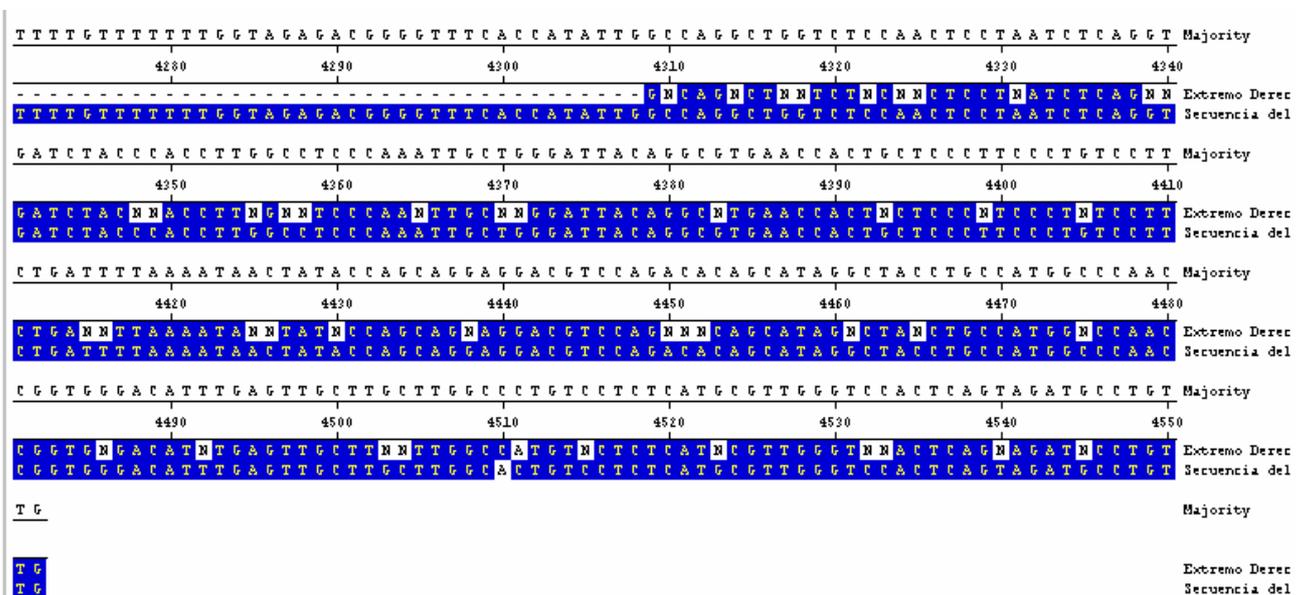
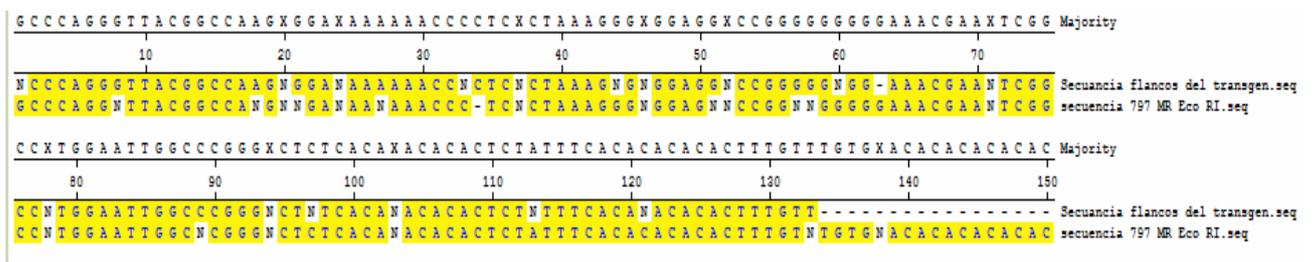


Fig. 17. Alineación del extremo derecho de la secuencia consenso del sitio de inserción con el extremo derecho del transgén.



**Fig. 18. Alineación de los flancos del transgén con la secuencia de 797 pb obtenida por Magdalena Rodríguez**

DNA  $\Delta 202$  digerido con *Xba* I v circularizado

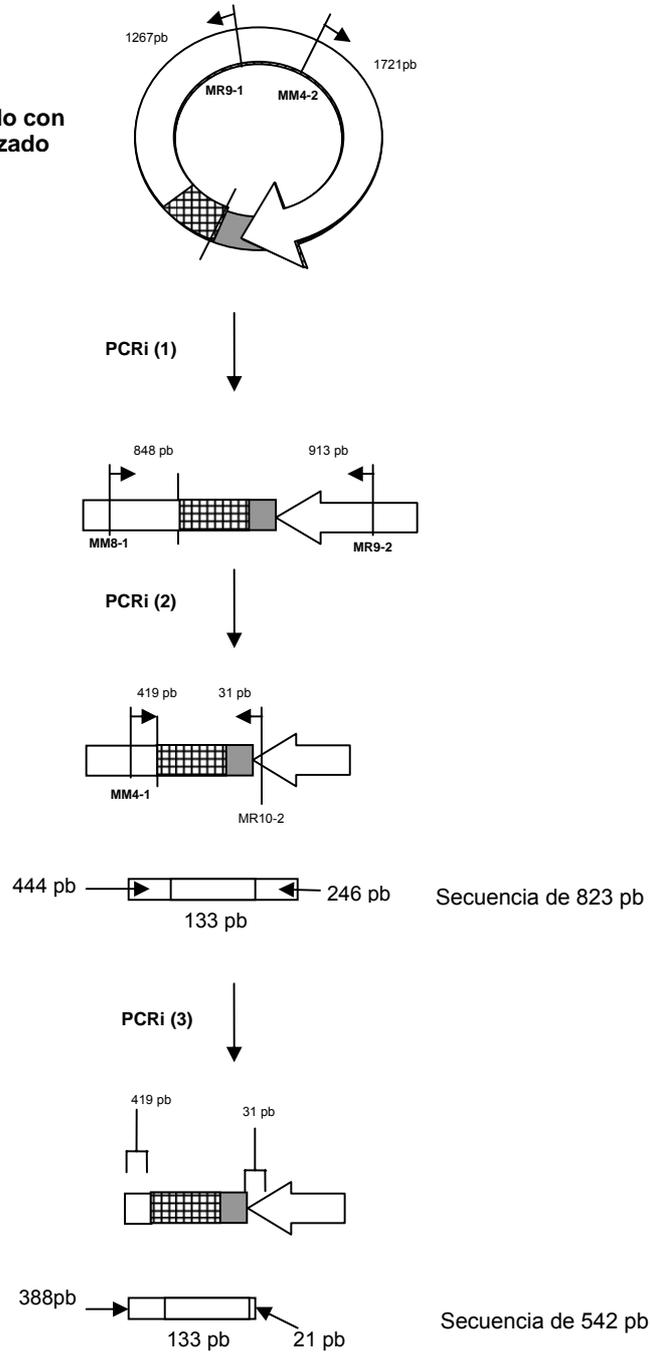
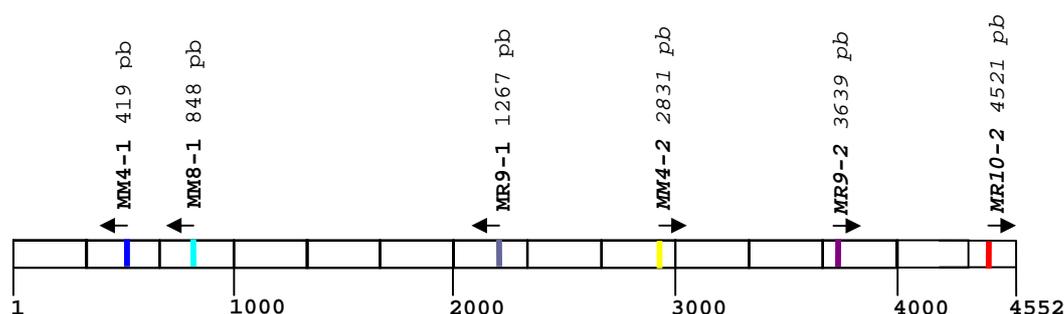


Fig. 19. Resumen del trabajo. Productos de PCRi de las reacciones 1X, 2X Y 3X y secuencias derivadas de los insertos 2X Y 3X.

## Anexo 1

Secuencia de la construcción  $\Delta 202$  y ubicación de los oligonucléotidos en el transgén



EI

```

1      10      20      30      40      50      60
GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTGAAAAAATGCT      70
TTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAA      140
CAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAAC      210
CTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCATGAACAGACTGTGAGGACTGAGGGCCTGAAATGAGCC      280
TTGGGACTGTGAATCAATGCCCTGTTTCATGCCCTGAGTCTTCCATGTTCTTCTCCCACCATCTTCATTT      350
TTATCAGCATTTCCTGGCTGTCTTCATCATCATCATCACTGTTTCTTAGCCAATCTAAAACCTCAATTC      420
CCATAGCCACATTAACCTTCATTTTTTGATACACTGACAAACTAAACTCTTTGTCCAATCTCTCTTTCCA      490
CTCCACAATTCTGCTCTGAATACTTTGAGCAAACCTCAGCCACAGGTCTGTACCAAATTAACATAAGAAGC      560
.....
ACACTGCCATCCAAATAATCCCTTAAATTTGTCAGGTTATTAATTCCTTGACCTGAAGGCAAATCTCTGG      840
ACTCCCCTCCAGTGGCCTTTACATCCTCAAAACTACTAAAACTGGTCAATAGCTACTCCTAGCTCAAA      910
GTTCAGCCTGTCCAAGGGCAAATTAACATTTAAAGCTTTCCCCCACATAATTCAGCAAAGCAGCTGCT      980
.....
AATCTGTTTGTAAACATTTGTCTCTAGTTAATTGTAGGCTATCAACCCGCTTTTGTAGCTAAAACAGTAT      1260
CAACAGCCTGTTGGCATATGGTTTTTTTGGTTTTTGTCTGTCAGCAAATATAGCAGCATTTGCATAATGCTT      1330
.....
CTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCTGCATAAAAT      2730
AAAAAAATTAGTCAGCTGAGTTCTCGTAAACTCCAGAGCAGCGATAGGCCGTAATATCGGGGAAAGCAC      2800
TATAGGGACATGATGTTCCACACGTCACATGGGTCGTCCTATCCGAGCCAGTCGTGCCAAAGGGGCGGTC      2870
CCGCTGTGCACACTGGCGCTCCAGGGAGCTCTGCACTCCGCCGAAAAGTGCGCTCGGCTCTGCCAAGGA      2940
.....
CGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGTAAAGCTCTTGGGGAATGGGTGCG      3570
CATCAGGGGTGGCAGGAAGGGGTGACTTTCCCCCGCTGGAATAAGAGGAGGAGACTAAGGAGCTCAGGG      3640
TTTTTCCCGACCGGAAAATGCAGGCAGATGAGCACACGCTGAGCTAGGTTCCCAGAAAAGTAAAATGGG      3710
AGCAGGTCTCAGCTCAGACCTTGGTGGGCGGTCTTCTCCTAGGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAG      3780
.....
CTGATTTTAAAATAACTATAACCAGCAGGAGGACGTCAGACACAGCATAGGCTACCTGCCATGGCCCAAC      4480
CGTGGGACATTTGAGTTGCTTGCTTGGCACTGTCTCTCATGCCTTGGGTCCACTCAGTAGATGCCTGT      4550
TG
    
```

ED

## Anexo 2

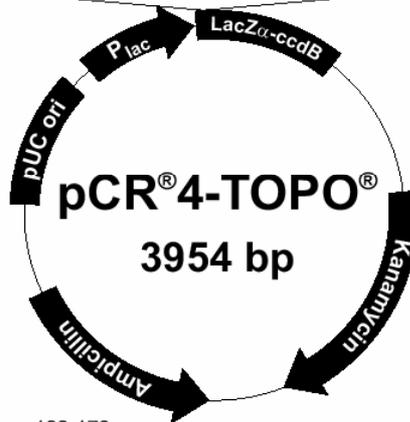
### Mapa del plásmido pCR4TOPO

#### Map of pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>

**pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> Map** The map below shows the features of pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> and the sequence surrounding the TOPO<sup>®</sup> Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. **The complete sequence of pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> is available for downloading from our Web site ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) or by contacting Technical Service (page 28).**

```

                LacZα initiation codon
                M13 Reverse priming site | T3 priming site
201 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTCA GAATTAACCC TCACTAAAGG
    GTGTGCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTTTCGAGT CTTAATTGGG AGTGATTCC
    Spe I      Pst I      Pme I      EcoR I
261 GACTAGTCCT GCAGGTTTAA ACGAATTTCG CCTT PCR Product AAGGGC GAATTCGCGG
    CTGATCAGGA CGTCCAAATT TGCTTAAGCG GGA A TTCCCG CTTAAGCGCC
                T7 priming site | M13 Forward (-20) priming site
311 CCGCTAAATT CAATTGCGCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC
    GGCGATTTAA GTTAAGCGGG ATATCACTCA GCATAATGTT AAGTGACCGG CAGCAAAATG
    
```



#### Comments for pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> 3954 nucleotides

*lac* promoter region: bases 2-216  
 CAP binding site: bases 95-132  
 RNA polymerase binding site: bases 133-178  
 Lac repressor binding site: bases 179-199  
 Start of transcription: base 179  
 M13 Reverse priming site: bases 205-221  
 LacZ $\alpha$ -*ccdB* gene fusion: bases 217-810  
     LacZ $\alpha$  portion of fusion: bases 217-497  
     *ccdB* portion of fusion: bases 508-810  
 T3 priming site: bases 243-262  
 TOPO<sup>®</sup> Cloning site: bases 294-295  
 T7 priming site: bases 328-347  
 M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370  
 Kanamycin promoter: bases 1021-1070  
 Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953  
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2309-3061 (c)  
 Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3062-3158 (c)  
 pUC origin: bases 3159-3832  
 (c) = complementary strand

### Anexo 3

Secuencias obtenidas con los productos de amplificación 2B, 2E, 3B Y 3E

|   |    |    |    |    |     |
|---|----|----|----|----|-----|
| 1   | 10 | 20 | 30 | 40 |     |
| GTTTAACGAATTCGCCCTTAGGATGTAAAGGGCACTGGACTCATGGAGTT  |    |    |    |    | 50  |
| GGCATTACAAATGGTTGGGGGTAGCAGGCTGCTAGAAAATTGAACTTGGGT |    |    |    |    | 100 |
| CCTCAGTGAGAGCCACAAGTGTTAAAACCACGGAGCCATCTCTCCAGCAC  |    |    |    |    | 150 |
| CTGGTTTGGGTTACTTTGAGTGTCTCAAGTAGGTCACACTAGTTTTATAC  |    |    |    |    | 200 |
| TCTCTCAGTATCCAGTAGCTAGACCTGAGCTCCTTAGTCTCCTCCTAAGG  |    |    |    |    | 250 |
| GCGAATTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAC  |    |    |    |    | 300 |
| AATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGT |    |    |    |    | 350 |
| TACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTA |    |    |    |    | 400 |
| ATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTA   |    |    |    |    | 450 |
| TACGTACGGCAGTTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCG  |    |    |    |    | 500 |
| TCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGA  |    |    |    |    | 550 |
| TGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCCCGT |    |    |    |    | 600 |
| GAACTTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGAC  |    |    |    |    | 650 |
| CACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGA  |    |    |    |    | 700 |
| TCTCAGCCACCGCGAAAATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCT  |    |    |    |    | 750 |
| GGGGAATATAAATGTCAGGCATGAGATTATCAAAAGGATCTNCNCCTAGA  |    |    |    |    | 800 |
| TCCTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAAAAACGGNGCTGACCCNNGGANA |    |    |    |    | 850 |
| ATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGANAGGAAAACCAAGCGCA           |    |    |    |    | 892 |

**Anexo 3.1 Secuencia de 892 pb determinada con el inserto 2B (Clona MM103).**

|   |    |    |    |    |     |
|---|----|----|----|----|-----|
| 1   | 10 | 20 | 30 | 40 |     |
| CTGNCCTGCANGTTTACGAATTCGCCCTTAGGATNNNNTNAGGAGGGNAA  |    |    |    |    | 50  |
| NGGTTTTTNCCGANTNCNANATGAGGGCAGTGAAGCGCACNCTGAGTGTG  |    |    |    |    | 100 |
| GTTCCCAGAAAANNNACAATGGGGAGCTNCCTCTCTCAGCCGTAGTACCT  |    |    |    |    | 150 |
| TGGAAGGGCNGNCCTTCTCCTNGNAAGAAGCNTATATNCCAAAGGAACAG  |    |    |    |    | 200 |
| AAGGATTCATTCCTGNANAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTC  |    |    |    |    | 250 |
| TATCCGACNCCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCGTGAGTG   |    |    |    |    | 300 |
| GATGCCTTCTCCCCAGGCGGGNGATGGNGGAGACCTGTAGTCAGAGNCCC  |    |    |    |    | 350 |
| CGGGANGGNATCCCTGTGANCCCTCCNCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAA  |    |    |    |    | 400 |
| GNTGCCACTCCAGTGCCCTTTACATCCTAAGGGCGAATTCGCGGCCGCTA  |    |    |    |    | 450 |
| AATCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTT   |    |    |    |    | 500 |
| TTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCT |    |    |    |    | 550 |
| TGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGNCCGCA  |    |    |    |    | 600 |
| CCGATTGNCCTTNCCAACAGNTGNGCAGCCTATNCGNACNGNAGNTTAAG  |    |    |    |    | 650 |
| GNTTACNCCTATNAAANANAGANCCNNTNTCGNCTGNTTNNGGATGNANN  |    |    |    |    | 700 |
| NANNGTNTTNTTGANNCCCNGGNNNACNGANGGNGANNCCCNTGGNC     |    |    |    |    | 750 |
| AGGGNNCNTNTNNTTNNAAAAANNNTCCNGNAANTTTNCCGGGGGNNTT   |    |    |    |    | 800 |
| TNGGNATNAAA   |    |    |    |    | 811 |

**Anexo 3.2 Secuencia de 811pb determinada con el inserto 2E (Clona MM104).**

|   |    |    |    |    |     |
|---|----|----|----|----|-----|
| 1   | 10 | 20 | 30 | 40 |     |
| CTCAAGTAGGTCACACTAGTTTTATACTCTCTCAGTATCCAGTAGCTAGA  |    |    |    |    | 50  |
| CCTGAGCTCCTTAGTCTCCTCCTAAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTC  |    |    |    |    | 100 |
| AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACA  |    |    |    |    | 150 |
| ACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAGTAAATCGCCTTGACAG |    |    |    |    | 200 |
| CACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT  |    |    |    |    | 250 |
| CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTACGGCAGTTTAAGGTTTA  |    |    |    |    | 300 |
| CACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTG  |    |    |    |    | 350 |
| ATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCA  |    |    |    |    | 400 |
| CGTCTGCTGTCAGATAAAG                                 |    |    |    |    | 419 |

**Anexo 3.3 Secuencia de 419 pb determinada con el inserto 3B (Clona MM106).**

|   |    |    |    |    |     |
|---|----|----|----|----|-----|
| 1   | 10 | 20 | 30 | 40 |     |
| TCTGCANGGTTTAAACGAAATTCGCCCTTAGGTATGCCNAGTGGCNCATGG |    |    |    |    | 50  |
| CAGTGGNNNCTTTCCAGAGNTCCANGAATGAGGCGACTGATGGAAGGCGC  |    |    |    |    | 100 |
| CNCTGAGTNTGGCANCCCGAGGAANATCTNCACTAGGGGANCTNCCCCTC  |    |    |    |    | 150 |
| TCCCCGNAGTNGCTTNGAAGGGANNCNCTTCTCCNNTNNNGAAGCNTATA  |    |    |    |    | 200 |
| TNCCNATGGAACAGGAANGATTCATTCCTGNANAACCCCCAGACCTCCCT  |    |    |    |    | 250 |
| CTGTTTCTCAGAGTCTATNCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAAC  |    |    |    |    | 300 |
| AGAAATCCGTGAGTGGATGCCTTCTCCCCAGGCGGGGATGGGGGAGACCT  |    |    |    |    | 350 |
| GTAGTNNAGTCCCCNTTTTGGTNATCENNNTGTGACCCCNCTNNAAGTGT  |    |    |    |    | 400 |
| ATTCANCTNGTNCTTTNNNGNTGTTTTTCCATNNNNCNTTCANTTTCTAT  |    |    |    |    | 450 |
| NANTTANAATTANNNC                                    |    |    |    |    | 466 |

**Anexo 3.4 Secuencia de 466 pb determinada con el inserto 3E (Clona MM107).**