



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante
Dr. Jaime Figueroa V.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

CLONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SECUENCIA GÉNICA DEL PEZ *CYPRINUS CARPIO*

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado
de ***Licenciado en Bioquímica*** y al
Título profesional de ***Bioquímico***

**ANDREA ALEJANDRA HIDALGO FIGUEROA
VALDIVIA – CHILE**

2003

Cristo el principio de todo.

El es la imagen del Dios que no se puede ver,

y para toda criatura es el Primogénito,

porque en él fueron creadas todas las cosas,

en el cielo y la tierra.

Todo fue hecho por medio de él y para él.

El existía antes que todos, y todo se mantiene en él.

*A mis padres Gregoria y Alfonso, por estar siempre
conmigo, por enseñarme tantas cosas...*

A mi hermana, Carolina, por su fortaleza y compañía...

Y... a todos mis verdaderos amigos.

Agradecimientos

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mi familia, en especial a mis padres, por su cariño incondicional y por instarme siempre a seguir adelante, a mi hermana Carolina por su compañía, y a mi abuelita Ana por su apoyo y cariño.

Al Dr. Jaime Figueroa, de la Universidad Austral de Chile, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, guiarme y apoyarme en esta importante etapa de mi formación profesional.

A la Dra. Gudrum Kausel, por sus consejos, apoyo y disponibilidad durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Carlos Figueroa, por aceptar formar parte de la comisión de mi tesis.

En general a todos mis compañeros del laboratorio, en especial a Carlos Flores y Jessica Molina por su ayuda durante la primera etapa del trabajo de esta tesis. A Marcelo Zalazar por su constante apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

A mis mejores amigas, Anita Canales, Kattina Zavala y Nadya Baéz. por nuestra amistad a lo largo de estos años. También un agradecimiento cariñoso a Carolina Álvarez y Paula Zalazar. Además agradezco a Claudia R., Andrea L. Cecilia C, Damaris V. y Verito por su constante apoyo y amistad. Un agradecimiento muy especial a todos mis amigos de la Parroquia Catedral, en especial al padre Tibaldo Zolezzi por sus consejos y apoyo en los momentos oportunos. A César por su amistad, compañía y apoyo incondicional en mis buenos y malos. No puedo dejar de nombrar a Mauricio B., Doris B., y Pauly por entregarme su amistad durante este año.

A mi tía Mary....

Esta tesis fue financiada por el proyecto 1990710 del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONDECYT.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE CONTENIDOS	I
INDICE DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1 Materiales	12
3.1.1 Reactivos	12
3.1.2 Animales de experimentación	12
3.1.3 Oligonucleótidos	13
3.3 Métodos	13
3.3.1 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	14
3.2.2 Marcaje radiactivo de la sonda	15
3.2.2.1 Marcaje por PCR	15
3.2.2.2 Medición de la radiactividad incorporada	16
3.2.3 Cultivo de fago lambda en medio sólido	16
3.2.4 Rastreo biblioteca genómica: Primera ronda	17
3.2.4.1 Rondas sucesivas del rastreo de la biblioteca genómica	19
3.2.5 Preparación de DNA viral por el método CTAB	19

3.2.6	Cuantificación del DNA	21
3.2.7	Digestiones del DNA con enzimas de restricción	21
3.2.8	Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa	20
3.2.9	Subclonamiento de fragmentos de DNA en un vector plasmidial	22
3.2.10	Preparación de células competentes	23
3.2.11	Transformación de células competentes	24
3.2.12	Preparación de DNA plasmidial por lisis alcalina	25
3.2.13	Southern blot en membrana de nylon	26
3.2.14	Hibridación de DNA con una sonda radiactiva	26
3.2.15	Preparación de RNA total de varios tejidos de carpa	27
3.2.16	Fraccionamiento de RNA en geles denaturantes de agarosa con Formaldehido	28
3.2.17	Northern blot en membrana de nylon	29
4.	RESULTADOS	30
4.1	Obtención de la sonda GK-310	30
4.2	Rastreo de la biblioteca genómica de carpa	30
4.3	Caracterización de los clones lambda por digestiones con enzimas de restricción	33
4.4	Subclonamiento de los clones lambda	49
4.4.1	Subclonamiento del clon λ cGK423	49
4.4.2	Subclonamiento del clon λ cGK1012	51

4.4.3	Mapa físico de los subclones de calicreína glandular de carpa	51
4.4.3.1	Caracterización del subclon pcGK423 ₂₂₀₀ por digestiones con enzimas de restricción	51
4.4.3.2	Análisis de la secuencia del subclon pcGK423 ₂₂₀₀	57
4.4.4	Obtención de una sonda específica para Northern blot	64
4.4.4.1	Análisis de Northern blot	64
5.	DISCUSIÓN	70
6.	BIBLIOGRAFÍA	80

INDICE DE FIGURA

	Página
Figura 1	31
Secuencia sonda GK310	
Figura 2	32
Fraccionamiento de del fragmento de 310pb usado como sonda.	
Figura 3	34
Análisis de Southern blot de digestiones simples de λ cGK423.	
Figura 4	37
Análisis de Southern blot de digestiones dobles de λ cGK423.	
Figura 5	40
Análisis de Southern blot de digestiones simples de λ cGK814	
Figura 6	42
Análisis de Southern blot de digestiones dobles de λ cGK814	
Figura 7	45
Análisis de Southern blot de digestiones simples de λ cGK1012	
Figura 8	47
Análisis de Southern blot de digestiones dobles de λ cGK1012	
Figura 9	50
Subclones pcGK423 ₂₂₀₀	

Figura 10	52
Subclones pcGK1012 ₄₀₀₀ .	
Figura 11	54
Análisis por Southern blot del fraccionamiento con enzimas de restricción del subclon pcGK423 ₂₂₀₀	
Figura 12	56
Caracterización del subclon pcGK423 ₂₂₀₀	
Figura 13	58
Mapa de restricción del subclon pcGK423 ₂₂₀₀ .	
Figura 14	59
Secuencia subclon pcGK423 ₂₂₀₀ .	
Figura 15	63
Alineamiento de la secuencia del pcGK423 ₂₂₀₀ con el cDNA de α -tubulina de <i>Oncorhynchus keta</i> (Salmón chum).	
Figura 16	66
Alineamiento de la secuencia del fragmento de 2200pb del subclon pcGK423 ₂₂₀₀ con la sonda GK310	
Figura 17	67
Amplificación del fragmento de 2200pb del subclon pcGK423 ₂₂₀₀ 2200pb del subclon pcGK423	

Figura 18

69

Análisis por Northern blot con un fragmento de 2200pb del pcGK423₂₂₀₀ de distintos tejidos de carpa.

Figura 19

77

Alineamiento de la secuencia aminoacídica para la putativa α -tubulina de carpa con varias especies mamíferas y peces

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1:	49
Características de los fragmentos de DNA a subclonar	

LISTAS DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
CG	Calicreína glandular
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
EDTA	ácido etiléndiamino tetracético
EtBr	bromuro de etidio
Kb	kilobases (1000 pares de bases)
LB	medio de cultivo Luria Bertani
L	Litro
MOPS	ácido 3-[N-2-morfolino] propano sulfónico
nm	nanómetro
mRNA	RNA mensajero
pb	pares de bases
PCR	reacción de polimerización de DNA en cadena
pfu	unidad formadora de placa
POPOP	p-bis[2-(5-feniloxazolil)]- benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
PRL	Prolactina
RNA	ácido ribonucleico

S	unidad Sverdberg
SM	solución Murray
SMC	sitio de múltiple clonamiento
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSC	citrato de sodio salino
SSPE	ácido etiléndiamino tetracético de fosfato diácido de sodio salino
TAE	tampón Tris-acetato; EDTA
TCA	ácido tricloro acético
TE	tampón Tris-HCl; EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	unidad o unidades
V	Volt
UV	ultravioleta

1. RESUMEN

Calicreína glandular (CG) es una serina-proteasa que al igual que otras proteínas de este tipo tiene una amplia distribución en diferentes tejidos, jugando un rol vital en variados procesos biológicos. CG está presente en todos los mamíferos, donde forma parte de una gran familia génica. Actualmente sólo se conocen las secuencias génicas de diversas CG de mamíferos, no existiendo ningún antecedente al respecto en organismos no mamíferos, como anfibios o peces. A partir del alineamiento de secuencias génicas de CG conocidas, se generó una sonda CG específica de 310pb, se rastrearon alrededor de 500.000 recombinantes de una genoteca de carpa y se obtuvieron 19 clones. El alto número de clones obtenidos sugiere que CG en carpa también forma parte de una gran familia génica. Estos clones presentaron diferentes intensidades de hibridación. Tres de ellos: λ cGK423 (moderada), λ cGK814 (fuerte) y λ cGK1012 (moderada) fueron analizados por Southern blot. Se caracterizó y subclonó un fragmento genómico de 2200pb de λ cGK423 (*Xba*I), en el vector plasmidial pBluescript SK+. El subclon pcGK423₂₂₀₀ se secuenció en su totalidad y analizó comparativamente con los bancos de datos. Este análisis reveló que pcGK423₂₂₀₀ tiene un inserto de 2259pb, que posee un 88% de identidad con el cDNA de α -tubulina de *Oncorhynchus keta* (salmón chum). Sin embargo, los clones restantes si podrían contener secuencias génicas de calicreína-like presentes en la carpa que permitieran estudiar el sistema calicreína en teleósteos. Análisis por Northern-blot usando como sonda pcGK423₂₂₀₀ con RNA total de diversos órganos de carpa, reveló una intensa expresión en riñón e hígado y más débil intensidad en agallas, músculo e hipófisis. La secuencia del gen putativo de α -tubulina permite estudiar que este gen se comporta como un gen constitutivo durante la aclimatización de carpa.

SUMMARY

Glandular kallikrein (GK) is a serine-protease that as other proteins of this type has a wide tissue distribution, playing a vital role in varied biological processes. GK is present in the mammals where it forms part of a numerous gene family. CG specific gene sequences are only known from mammals, lacking evidence from no-mammalian organisms, such as amphibios or fishes. From the alignment of existing sequences, a probe of 310pb was generated. Screening of approximately 500.000 recombinants from a carp genomic library resulted in 19 positive clones. The high number of clones obtained suggests that GK in carp may also form part of a gene family. These clones presented different intensity of hibridation. Three clones, λ cGK423 (medium), λ cGK814 (strong), λ cGK1012 (medium) were analyzed by Southern blot. λ cGK423 was characterized and a fragment of 2200pb (*Xba*I) was subcloned in the plasmid vector pBluescript SK+. The subclone was fully sequenced and analyzed comparatively with the data bases. This sequence analysis revealed that the subclone pcGK423₂₂₀₀ contains an insert of 2259pb and presents 88% identity at the nucleotide level with cDNA of α -tubulin from *Oncorhynchus keta* (chum salmon). However, the other λ -clones could contain CG specific sequences which would allow further insight in the kallikrein system in carp. Northern-blot analyses using the 2200pb insert of the subclone pcGK423₂₂₀₀ with total RNA from diverse carp organs, revealed an intense expression in kidney and liver and weaker intensity in gills, muscle and pituitary. The sequence of the putative α -tubulin gene permits to study if this gene behaves as constitutive gene during the acclimatization of the carp.

2. INTRODUCCION

Las calicreínas son un grupo de serinas proteasas tipo tripsina, que se encuentran en diversos tejidos y fluidos biológicos (Yousef et al., 2001). Las serinas proteasas pertenecen a un grupo de enzimas que digieren otras proteínas, reconociendo una secuencia de corte de Met-Lys y Arg-Ser en la proteína blanco (Powers et al., 1993; Clements et al., 1998) y jugando un rol importante en diversos procesos fisiológicos (Yousef et al., 2001).

El término calicreína fue introducido en 1930 por Werle et al, quienes encontraron originalmente altos niveles de esta proteasa en el páncreas (Yousef et al., 2001). El término calicreína es utilizado entonces para describir a una enzima que actúa sobre una molécula precursora (cininógeno) para liberar péptidos bioactivos (cininas). Otro término que es frecuentemente utilizado para describir a estas enzimas es “cininogenasas” (Yousef et al., 2001).

Las calicreínas actualmente se dividen en dos categorías: calicreína plasmática y calicreína glandular (CG) o de tejido. Estas dos categorías de calicreína difieren significativamente en su peso molecular, especificidad de sustrato, características inmunológicas, estructura génica, y tipo de cinina liberada (Yousef et al., 2001).

Calicreína plasmática humana o factor Fletcher (símbolo oficial KLKB1) está codificada por un solo gen, el cual se encuentra localizado sobre el cromosoma 4q35 (Yousef et al., 2001). Este gen está constituido por 15 exones y codifica una enzima que libera péptidos bioactivos, como bradicinina, desde moléculas precursoras de alto peso molecular (cininógeno) producido por el hígado (Yousef et al., 2001). La calicreína del plasma es exclusivamente expresada en células del hígado (Yousef et al., 2001). La función de la calicreína plasmática (KLKB1) incluye su participación en la coagulación sanguínea y fibrinólisis y por medio de la liberación de

bradiginina, en la regulación del tono vascular y reacciones inflamatorias (Yousef et al., 2001). El gen que codifica para calicreína plasmática no tiene semejanza con el gen que codifica para calicreína glandular y claramente, no pertenece a la familia multigénica de las calicreínas glandulares (Yousef et al., 2001).

Calicreína glandular (CG) pertenece a una gran familia multigénica exhibiendo una considerable semejanza génica y proteica (Harvey et al., 2000; Yousef et al., 2001). Pertenece a un subgrupo de serinas proteasas altamente conservadas a través de algunas especies. Está involucrada en el procesamiento post-traducciona l de los polipéptidos en su formas bioactiva e inactiva, función muy importante y fundamental en muchos eventos biológicos (Clements et al., 1997; Yousef et al., 2001). Calicreína glandular pancreática/renal (codificada por KLK1), desde la cual deriva su nombre genérico, en mamíferos, hidroliza cininógeno para liberar (lys)-bradiginina (Clements et al., 1989; Clements et al., 1997), un péptido multifuncional involucrado en la regulación del flujo sanguíneo local, hipotensor y capaz de incrementar la permeabilidad vascular (Bhoola et al., 1992). Además esta cinina actúa en el balance de sodio, inflamación y proliferación celular en muchos tejidos (Bhoola et al., 1992). Otro miembro de la familia de las calicreínas incluye enzimas que actúan en el procesamiento de factores de crecimiento, tales como la proteína que se une al factor de crecimiento epidérmico de ratón (Shimojo et al., 1987; Powers et al., 1990; Powers et al., 1993; Richards et al., 1997a; Harvey et al., 2000), factor de crecimiento γ del nervio, y enzimas que generan péptidos vasoactivos tales como, la enzima convertidora de pro-renina de ratón, γ -renina y tonina de rata (Clements et al., 1989). En humano, las dos enzimas muy bien caracterizadas, antígeno prostático específico (PSA) (Shimojo et al., 1987; Powers et al., 1990; Powers et al., 1993; Richards et al., 1997a;) codificado por KLK3 (Riegman et al., 1989) y el hK2, codificado por KLK2 (Schedlich et al., 1987) actúan sobre

sustratos completamente diferentes (Harvey et al., 2000). Puesto que KLK2 y KLK3 son expresadas en altos niveles principalmente en el epitelio secretorio de conductos prostáticos, han sido implicadas en funciones prostáticas normales, y además en la progresión de cáncer (Rittenhouse et al., 1998). Calicreína glandular, por medio de sus roles multifuncionales, está involucrada en la (pato)fisiología del riñón, cerebro y en los conductos respiratorios, gastrointestinal y reproductivos (Bhoola et al., 1992). En humanos, hasta ahora se han identificado dos serinas proteasas KLK, como son Proteasa M (Anisowicz et al., 1996; Little et al., 1997) y epitelio normal célula-específico 1 (NES-1) (Liu et al., 1996), ambas son altamente expresadas en cerebro y mamas, por lo que se ha sugerido que estarían involucradas en la enfermedad de Alzheimer's y cáncer de mamas, respectivamente (Little et al., 1997; Goyal et al., 1998).

En mamíferos, calicreína es una proteasa muy abundante en glándula salival y páncreas exocrino, pero esos órganos poseen muy poco cininógeno, y en su secreción rica en calicreína, ésta no tiene acceso a la molécula de cininógeno plasmático, con lo cual se propuso que esta proteasa podría tener además otros sustratos (Richards et al., 1997b).

En humanos, los genes KLK1, KLK2 y KLK3 se encuentran agrupados dentro de una región que abarca 60 kb sobre el cromosoma 19q13.3-13.4 (Riegman et al., 1989). La familia génica de KLK de rata y ratón (13-24 genes), está agrupada en un sólo locus (Evans et al., 1987; Southard-Smith et al., 1994). En ratón se sabe que existen 24 genes de los cuales al menos 14 se codifican como proteínas activas, y se ubican en el cromosoma 7 organizados de similar manera al del humano. Análisis de Southern blot de una biblioteca genómica humana, utilizando un cDNA de KLK de mono con 92-95 % de homología al cDNA de KLK humano (Lin et al., 1993), indicaron que pueden existir hasta 19 genes de KLK humano o más (Murray et al., 1990). Sin

embargo, Diamandis et al., (2000) reportaron la existencia de 15 genes de calicreína en el cromosoma 19, ubicados en forma lineal, cuyo orden de telómero a centrómero de los genes es: KLK1, KLK15, KLK3 KLK2 siguiendo en forma correlativa hasta el KLK14, señalándose que la localización de estos 15 genes de calicreína es un fragmento de aproximadamente 300 kb del cromosoma 19q13.3-q13.4 en humanos (Diamandis et al., 2000). Entre estos genes existe una similitud en la región conservada de histidina, ácido aspártico y serina, característica de las serinas proteasas, llevando a la idea que pertenecen a la misma familia multigénica. Además, al comparar las secuencias génicas de KLK de rata, indican una evolución conservada de la familia resultando en una secuencia homogénea de todos los miembros de la familia (Wines et al., 1991). En suma, existe una clara conservación de la organización genómica con 5 exones codificantes para todos los genes de KLK, conteniendo alguno de estos genes en forma adicional uno o más exones no traducidos (Schedlich et al., 1987; Evans et al., 1987; Riegman et al., 1989; Anisowicz et.al, 1996; Liu et al., 1996; Yousef et al., 1999).

Todas las proteínas codificadas por estos genes son inicialmente sintetizadas como pre-pro-enzimas que son entonces procesadas proteolíticamente para producir una pro-enzima por perdida del péptido señal, seguido por la activación y maduración, también por proteólisis, generando formas enzimáticamente activas de la proteína (Yousef & Diamandis, 2001).

Se ha detectado que el sistema Calicreína–Cininas, que actúa en el riñón y vasos sanguíneos, puede tener incidencia en la aparición de patologías como: nefropatía diabética (daño renal) y macroangiopatía (arteriosclerosis). El sistema Calicreína–Cininas en condiciones normales puede regular la presión arterial, bajando sus niveles, pero al presentarse la diabetes cambia su efecto, y en particular el de una de las hormonas que produce, pues el aumento en su concentración afectaría directamente a las células del músculo liso vascular y a las células

mesangiales del glomérulo renal (Velarde et al., 2001). Se ha comprobado que ambos tipos de células tienen propiedades que son similares, entonces ante ciertos estímulos se comportan en forma parecida. Al aumentar la acción del sistema Calicreína–Cinina, se da una proliferación acelerada de las células del músculo liso vascular, o de las células mesangiales, y además aumenta la síntesis de proteínas de matriz extracelular. La combinación de ambas características termina causando el engrosamiento de la pared arterial, lo que finalmente provoca la arteriosclerosis, engrosando la membrana basal en los capilares y ocupando el espacio del glomérulo en el caso de la glomerulosclerosis, impidiendo así, que la sangre se filtre adecuadamente, y provocando finalmente el daño renal (Velarde et al., 2001).

Ciertos aspectos asociados a este sistema se revierten hasta cierto punto utilizando inhibidores del sistema Calicreína–Cininas, y antagonistas del receptor de bradicinina involucrado. Los trabajos de investigación apuntan a determinar qué pasa en el organismo cuando la bradicinina está aumentada y de qué manera tiene efecto en la multiplicación del número de células del riñón y de los vasos sanguíneos, además de estudiar su efecto en la secreción de proteínas de matriz (Velarde et al., 2001).

Las calicreínas glandulares más estudiadas son las renales, las cuales han sido asociadas con la regulación de los fluidos a través de los riñones, el balance de agua y electrolitos, y la patogénesis de los desórdenes renales, la hipertensión arterial como la principal enfermedad y otras patologías (Fuller et al., 1986). La precalicreína renal por acción de un activador, da origen a calicreína activa que actúa sobre el cininógeno convirtiéndolo en calidina (lys-bradicinina) que luego, por acción de una aminopeptidasa, es transformada en bradicinina. Las cininas son rápidamente inactivadas por las enzimas llamadas cininasas I y II. La cininasa II también se conoce con el nombre de Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) en mamíferos, y ha sido

observada también en tejido de peces, destacando en riñón y agallas (Galardy et al., 1984; Lipke et al., 1987).

El principal sitio de expresión génica de calicreína en rata es la glándula submaxilar (Swift et al., 1982; Ashley et al., 1985), si bien el mRNA de calicreína-like, también ha sido demostrado en muchos otros tejidos, incluyendo páncreas, riñón, bazo, próstata, pituitaria y cerebro (Swift et al., 1982; Chao et al., 1983; Ashley et al., 1985; Fuller et al., 1985; Chen et al., 1988; Chao & Chao et al., 1987; Pritchett et al., 1987; Clements et al., 1988; Brady et al., 1989).

En rata, CG se localiza en las cisternas del Golgi y gránulos secretorios de las células prolactínicas, lo que permite sugerir un rol importante en el procesamiento de prohormonas (Powers et al., 1993).

Tanto en mamíferos como en otros vertebrados de menor complejidad evolutiva, se ha encontrado esta proteasa en órganos tan diversos como son: pituitaria, pineal, corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo (Richards et al., 1997b). Se ha demostrado que existe la presencia de precursores de pro-calicreína en músculo esquelético de rata (Shimojo et al., 1987).

Calicreína glandular ha sido identificada y purificada bioquímicamente en vertebrados de menor complejidad evolutiva, tales como ranas y cocodrilos, adjudicándosele un rol funcional muy importante a través de la evolución (Richards et al., 1997a, 1997b).

Richards et al. (1997a), purificaron calicreína del pez *Centropristis striata*, la cual usaron para generar anticuerpos policlonales. Con estos anticuerpos generaron los primeros hallazgos respecto de esta proteína en especies no mamíferas (Richards et al., 1997b). En anfibios y peces se conoce su mecanismo de acción frente a determinados sustratos (Lipke y Olson et al., 1990; Powers et al., 1993) observándose como productos enzimáticos la presencia de cininas y otros productos del sistema calicreína- cinina, firmemente sugerido en una especie de trucha

Oncorhynchus mykiss (Lipke & Olson, 1990), no existiendo información de secuencias de génicas de calicreína en dichas especies, y que solamente se han caracterizado genes de calicreína glandular en rata, ratón (Evans et al., 1987; Southard-Smith et al., 1994) y humano (Harvey et al., 2000), siendo este trabajo de investigación muy importante en este sentido.

La calicreína, además es estimulada por estrógenos (1-100 $\mu\text{g}/4\text{-}7$ días) y reprimida por dopamina, existiendo diferencias por sexo; generalmente es más abundante en hembras que en machos, pero depende de la localización órgano específica (Clements et al., 1986; Hatala et al., 1989).

Por muchos años, prolactina (PRL) fue considerada como una hormona polipeptídica no modificada. Sin embargo, ahora se sabe por procesamientos post-traduccionales que PRL puede ser fosforilada (Oetting et al., 1986; Brooks et al., 1990), glicosilada (Lewis et al., 1984) y heterogéneamente digerida en forma proteolítica (Oetting et al., 1985; Sinha et al., 1985; Clapp et al., 1994).

En la glándula pituitaria, calicreína glandular se encuentra exclusivamente en las células lactotropas productoras de prolactina (Chao et al., 1987; Vio et al., 1990). Calicreína glandular es coordinadamente expresada y regulada con prolactina en células lactotropas de pituitaria de rata (Vio et al., 1990) y humano (Clements et al., 1986; Jones et al., 1990). La localización subcelular de calicreína en estas células, sugiere que su función principal es el procesamiento de prolactina, para formar péptidos de menor peso molecular probablemente con actividad biológica.

La función de PRL en la osmoregulación ha sido muy bien establecida (Nicoll, 1981; Avella et al., 1991; Bern, 1993; Hirano, 1996; Poncelet et al., 1997).

En los peces, la respuesta compensatoria adaptativa a los cambios del medio ambiente implica la modificación de la expresión de algunos genes a nivel transcripcional y traduccional en

diversos tejidos (Figuroa et al., 1994, 1997; Kausel et al., 1998, 1999; Krauskopf et al., 1988; Vera et al., 1993, 2000).

El pez euritermal *Cyprinus carpio*, presenta cambios dramáticos en la expresión de PRL en las células lactotropas de la glándula pituitaria como respuesta a las variaciones medioambientales como son la temperatura y el fotoperíodo (Figuroa et al., 1994). Este último particularmente, parece constituir en un relevante modulador en la cascada endocrina que activa la transcripción de PRL (Figuroa et al., 1997), hormona de crecimiento (Figuroa et al., 1999), y otros genes, supuestamente calicreína glandular.

Basados en los antecedentes bibliográficos entregados, proponemos como hipótesis **la posible presencia de genes de calicreína en el pez *Cyprinus carpio*, sobre todo en la glándula pituitaria**, debido a la relación proteica que existe entre prolactina y calicreína dentro de los gránulos secretorios de las células lactotropas de esta glándula, visualizados en experimentos de inmunodetección (Figuroa et al., 2002).

Como objetivo principal de esta tesis se pretende **obtener las primeras secuencias génicas de calicreína glandular en el pez *Cyprinus carpio***.

Por lo tanto, los objetivos específicos de la presente tesis son:

- 1. Generar una sonda específica de calicreína glandular para el rastreo de una biblioteca genómica de carpa.**
- 2. Obtener el (los) clones de calicreína glandular de carpa.**
- 3. Caracterizar, subclonar y secuenciar el (los) clones de calicreína glandular obtenidos.**

- 4. Obtener secuencias totales o parciales de uno o varios de los clones generados y establecer un análisis comparativo con las secuencias de calicreína existentes en los bancos de datos.**
- 5. Realizar experimentos de *Northern blot* para establecer la expresión de calicreína en diversos órganos de carpa.**

Además, desde el punto de vista evolutivo, hace aún más interesante la búsqueda de genes de calicreína, ya que analizando las secuencias de dichos genes podríamos conocer la conservación de regiones muy características dentro de la familia multigénica de las calicreínas. Esto último, considerando además que *Cyprinus carpio* es una especie tetraploide (Wolf et al., 1969; Ferris & Whitt, et al., 1977), y la expresión de este gen en un organismo de estas características, hace más atrayente vislumbrar el número de genes presentes y las probables variaciones de expresión tejido específico.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos:

Los reactivos EDTA, bromuro de etidio, citrato de sodio, RNAsa, DNAsa, azul de bromofenol fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. En NEN se adquirió [$\alpha^{32}\text{P}$] – dCTP (3000 Ci/mmol, 1 mCi/ml). Films radiográficos, solución reveladora y fijadora Kodak.

De Merk (Alemania), fueron adquiridos glicerol, cloruro de sodio, ácido tricloroacético, alcohol isoamílico, cloroformo, tolueno, maltosa, gelatina, formamida, carbón activado.

Del proveedor Gibco-BRL se adquirieron las enzimas de restricción *EcoRI*, *NotI*, *Sall*, *SacI*, *XbaI*, los estándares de peso molecular para DNA, λ *HindIII* y DNA ladder de 100 pb, Taq polimerasa con su correspondiente tampón 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4; KCl 500 mM), MgCl₂ 50 mM, además de proteinasa K, peptona y extracto de levadura.

Las células XL-1 Blue MRAP2 y la biblioteca genómica construida en el vector λ FIX II, a partir de DNA de hígado de carpa se adquirieron en Stratagene.

El agar-agar se adquirió de Winkler. El POPOP se adquirió en Amersham, los filtros de nitrocelulosa (0,45 μm) se adquirieron de Gibco-BRL. El papel 3MM en Whatman. El “kit GeneClean” en BIO101. De Promega se adquirió dNTPs, T₄ DNA ligasa y su correspondiente tampón T₄ DNA ligasa 5X (Tris-HCl 0,2 M pH 7.6; MgCl₂ 0,1 M; DTT 0,1 M).

3.1.2 Animales de experimentación

Los ejemplares del pez *Cyprinus carpio* fueron capturados en ríos colindantes a la ciudad manteniéndose vivos en una jaula de 3x2x4 m, localizada en el río “Cau-Cau”, Valdivia.

3.1.3 Oligonucleótidos

Los oligos cGK4 y cGK5, correspondientes a la región de consenso de todos los genes de calicreína de diferentes especies, se usaron para generar una sonda de rastreo de una biblioteca genómica de carpa:

cGK-4: 5' –TGG GTG ATC ACA GCT GCT CA- 3'

cGK-5: 5' –GGT TCG ATG CTG CCC CAG CC- 3'

Los oligonucleótidos fueron deducidos de regiones consenso luego del alineamiento múltiple entre secuencias de calicreínas de mamíferos.

La sonda se generó a partir de la amplificación por PCR, de cDNA de riñón de rata, otorgando como producto un fragmento cuyo tamaño estimado fue de 310 pb.

3.2 METODOS

3.2.1 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Para el rastreo de la biblioteca genómica de carpa se utilizó una sonda correspondiente a un producto de PCR de 310pb, generada con los partidores cGK4-cGK5. Para obtener estos partidores, fue necesario realizar un alineamiento de secuencias génicas de calicreína glandular de diferentes especies. De este alineamiento se construyeron cinco juegos de partidores correspondiente a las secuencias consenso más conservadas de los genes de calicreína glandular, pertenecientes a los exones 2 y 3 de calicreínas de mamíferos.

Para realizar la reacción de PCR se utilizaron las siguientes concentraciones finales para cada uno de los reactantes: oligonucleótidos resuspendidos en tampón TE (Tris HCl 10mM pH 7.4, EDTA 1mM pH 8,0) cada uno a una concentración de 0.5 μ M, el DNA utilizado como templado fue cDNA de riñón de rata y cDNA de hipófisis de carpa, cada uno a una concentración de 20 ng. Los desoxirribonucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP a una concentración de 1.25 μ M, MgCl₂ 1.5 μ M, tampón Taq- DNA polimerasa 10X (tampón Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), Taq- DNA polimerasa 1.5 U y para concluir, vaselina, con el fin de evitar la evaporación de la mezcla de reacción por efecto del aumento de la temperatura en la reacción de PCR. Luego los tubos de reacción, incluyendo el control negativo, el cual no contiene templado de DNA, se colocaron en el termociclador (MinicycleTM) con el siguiente programa de reacción: 94°C por 1 minuto, para la correspondiente denaturación del DNA templado, 55°C por 35 segundos, con el fin de que los partidores logren unirse a sus secuencias complementarias ubicadas en el DNA templado y 72°C para la etapa de extensión, con la repetición de cada uno de estos pasos 30 veces (ciclos).

3.2.2 Marcaje radiactivo de la sonda

3.2.2.1 Marcaje por PCR

En esta reacción de PCR se incorporó un nucleótido marcado radiactivamente correspondiente a [α - ^{32}P]- dCTP, protocolo basado en lo descrito por Matathias y Komro (1990). La sonda fue construida a partir de una mezcla de cDNA de riñón de rata y cDNA de hipófisis de carpa clonados en el vector pGEM-T-Easy (Invitrogen). El programa utilizado para la fabricación de la sonda marcada radiactivamente por PCR fue el siguiente: 94°C por 1 minuto para la fase de denaturación, 55°C por 35 segundos para fase de apareamiento de los “primers” (annealing) y, 72°C por 1 minuto para la extensión, cuyos pasos se repitieron por 30 ciclos. Luego, se midió la actividad específica al producto de PCR para posteriormente ser utilizado en el rastreo de la biblioteca genómica de carpa disponible en el laboratorio.

Luego de ser subclonado el fragmento de 2200pb correspondiente al producto de la digestión del clon λ cGK423, se fabricó una sonda específica de este fragmento para observar y analizar transcritos del gen de CG en distintos tejidos del pez *Cyprinus carpio*. Para esto se realizó una reacción de amplificación del DNA del subclon secuenciado pcGK423₂₂₀₀ obteniéndose el fragmento esperado de aproximadamente 2200 pb, utilizándose como partidores los oligonucleótidos T3 y T7 del vector pBluescript SK+ a una concentración final de reacción de 0.5 μg y 0.6 μg , respectivamente. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto 30 segundos para el apareamiento (annealing) de los partidores, y a 72°C por 1 minuto para la extensión, además con una fase de término de 4°C que el equipo mantiene constante durante un tiempo requerido.

3.2.2.2 Medición de la radiactividad incorporada

La cuantificación de la incorporación del nucleótido marcado en la sonda, se realizó por el método de cuentas precipitables. Con este fin se aplicó el método de precipitación con TCA (Sambrook et al., 1989). A una alícuota (1 μ l) de la reacción de marcaje se agregaron 5 ml de TCA 10% frío utilizando como coprecipitador DNA de timo de ternera fragmentado y denaturado a una concentración final de 1 μ g. La reacción de precipitación se incubó en hielo por 15 minutos y posteriormente se filtró en una membrana de nitrocelulosa (0,45 μ m) con vacío. La membrana se lavó con la misma solución de TCA frío y etanol al 96%, para posteriormente secarlas. La cuantificación se realizó en un contador de centelleo líquido Packar Tri-Carb 1600TR, utilizando una mezcla de PPO-POPOP (PPO 4g/lit y POPOP 0,1 g/lit en tolueno) la cual es cuantificada en el contador de centelleo líquido como cuentas por millón (1.3×10^7 cpm).

3.2.3 Cultivo de fago lambda en medio sólido

Este método fue realizado según Sambrock et al. (1989), y descrito inicialmente por Manfioletti (1988). Para el cultivo de fago en medio sólido, se inoculó una colonia de células XL1 Blue MRAP₂, en un medio que contiene LB líquido, además de MgCl₂ 10 mM y maltosa al 10% dejándose en agitación constante por alrededor de tres horas a 37°C. Luego se procedió a verificar la turbidez de crecimiento óptimo de 0.5, la cual se midió en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 600 nm. Las células fueron sedimentadas a 3000 x g por 10 minutos, siendo luego resuspendidas a un volumen en el cual se conservará su concentración de crecimiento ($DO_{600nm}=0.5$) en una solución MgSO₄ 10 mM.

Las células anteriormente resuspendidas se conservaron como stock a 4°C para posteriores experimentos. Se mezclaron 25 μ l de una dilución de un stock de fagos con un título de

10^{-9} pfu/ml con 600 μ l de células XL1 Blue MRAP2 en tubos falcon de 15 ml, incubándose a temperatura ambiente por 5 minutos y a 37°C por 15 minutos. En general se usa una dilución de fagos 1/1000 para obtener aproximadamente 50.000 pfu en placa de 13.9 cm de diámetro. Luego, se agregó 6,5 ml de LB Top agar, previamente fundido y temperado a 50°C, esparciéndose, sobre la placa de LB agar sólido igualmente temperada a 37°C. Las placas se incubaron a 37°C por aproximadamente 12 horas (toda la noche).

3.2.4 Rastreo biblioteca genómica: Primera ronda

La biblioteca genómica de carpa se encuentra construida en el vector λ Fix II, el cual se define como un vector de reemplazo, presentando dos regiones conocidas como brazos del vector, uno largo de 20 Kb y otro corto de 9 Kb, con dos sitios de múltiple clonamiento (SMC), al cual se une el inserto de DNA foráneo en el sitio *Xba*I del vector viral.

La biblioteca genómica de carpa se rastreó con una sonda creada por PCR cuyo tamaño es de 310pb (rata y carpa), ya descrita en el punto 3.2.2.1.

Para comenzar el rastreo, se procedió a preparar placas Petri de vidrio de 13.9 cm de diámetro, conteniendo medio LB agar (LB con 8% agar-agar). Sobre la cual se aplicó LBTA (LB con 0.8% agar-agar) en una mezcla que contenía 100 μ l de una dilución 1/10.000 de la biblioteca (\approx 50.000 pfu/placa), 600 μ l de células hospedadoras XL1 Blue MRAP2, mezclándose e incubándose por 15 minutos a 37°C y luego se agregó 7,5 ml de medio LBTA a 50°C, se derramó toda esta mezcla sobre las placas de LB agar precalentadas a 37°C y se dejó solidificar a temperatura ambiente, y se incubó invertido a 37°C por 12 horas.

Se hicieron dos replicas de las placas con filtros de nitrocelulosa de equivalente tamaño que las placas. Estos filtros se depositaron sobre el medio top agar por 60 segundos la primera

replica y 90 segundos la segunda replica. Luego, los filtros se colocaron en una solución denaturante (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) por un minuto, luego en una solución neutralizante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,5 M pH 8.0) por un minuto, y por último se sumergieron en una solución 2X SET (NaCl 300 mM; EDTA 3 mM; Tris-HCl 300mM pH 7.5) por algunos minutos. Los filtros se secaron a 80°C en una estufa al vacío por dos horas para fijar el DNA a la membrana de nitrocelulosa. Para eliminar los restos celulares que pudieron haber quedado adherido a los filtros, éstos se lavaron con una solución de prelavado (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, SDS 0,1% p/v) a 37°C con agitación suave por una hora.

Los filtros fueron pre-hibridados en un vaso precipitado en aproximadamente 200 ml (hasta cubrir completamente los filtros) de una solución 6X SSC (NaCl 900mM, citrato de sodio 90mM pH 7.0), fosfato de sodio 50mM pH 6.8, Denhardt's 5X (ficoll 0,01% p/v, polivinilpirrolidona 0,01% p/v, BSA 0,01% p/v), 100 µg DNA de timo de ternera, por 1 hora a 65°C y luego se hibridaron en la misma solución de prehibridación a la cual se agregó la sonda de rastreo de 310pb marcada radiactivamente (7×10^7 cpm). Se hibridó a una temperatura de 42°C en un horno de hibridación con agitación rotatoria durante aproximadamente 12 horas. Terminada la hibridación, se lavaron los filtros con las siguientes soluciones en concentraciones decrecientes de SSC: 2X SSC, 0.1% SDS por 30 minutos a 37°C; 1X SSC, 0,1% SDS por 30 minutos a 37°C; 0,5X SSC, 0,1% SDS por 30 minutos a 37°C; 0,2X SSC, 0,1% SDS por 30 minutos a 37°C. Finalizada la etapa de lavado, los filtros de nitrocelulosa se expusieron con una película de rayos X (X-OMAT, XAR 5 de 30 x 40 cm (*Scientific Imaging Film* Kodak) dentro de cassettes autoradiográficos a -80°C por dos días.

3.2.4.1 Rondas sucesivas del rastreo de la biblioteca genómica

Se obtuvieron las pfu positivas desde la placa petri de 13.9 cm, dejándolas en tampón SM (NaCl 0,1M; MgSO₄ 0.2%; Tris-HCl 0,054 M pH 7.5, y gelatina 0,01%). Con estos posibles clones, se procedió a realizar la segunda ronda del rastreo. Para ello, cada pfu positiva se dejó eluir a 4°C con agitación suave y constante y luego se diluyó 1000 veces en buffer SM. Luego, de una dilución final de 1/10000 se tomó 1µl y se agregó a 200 µl de células XL1 Blue MRAP2 en MgSO₄ 10 mM. La mezcla se incubó a 37°C por 15 minutos, agregándose luego 5 ml de LB Top agar a 50°C, esparciendo el contenido de esta última mezcla sobre placa Petri de 9 cm de diámetro con LB agar. Las placas se incubaron a 37°C por aproximadamente 12 horas para permitir la lisis completa. Al igual que en el primer rastreo, se realizaron replicas en membrana de nitrocelulosa de cada una de las placas, se hibridaron con la misma sonda y se seleccionaron pfu positivos aislados.

Así, se realizaron sucesivos rastreos de los clones positivos obtenidos en el primer rastreo, hasta que todas las placas a partir de una pfu dieron varios clones positivos y de esos se purificaron 19 clones positivos a partir del rastreo de 500.000 recombinantes.

3.2.5 Preparación de DNA viral por el método CTAB

El método de extracción de DNA desde partículas víricas se basa por lo descrito por Manfioletti (1988). La extracción del DNA de la partícula vírica se realizó a partir del lisado que se obtuvo de cada una de las placas Petri que fueron infectadas con células y lisadas completamente por el fago lambda, agregando a cada placa 5 ml de medio SM, y dejándose con agitación constante a 4°C por 10-12 horas. Al otro día se recuperó el medio SM de las placas, el que contiene los fagos y restos celulares. Se centrifugó el lisado obteniendo un pellet (restos

celulares) y un sobrenadante que contiene los fagos. A 10 ml de este sobrenadante (lisado), se le agregó DNAsa (20 µg final), agitándose suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos, para eliminar el DNA bacteriano que quedó en el lisado. Luego, se agregó al lisado resina DE-52 (80% en LB azida 0.01%), en una proporción 1:1, agitándose el tubo por inversión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla es trasvasijada a una columna que contiene una “frita porosa”, recolectando el mayor volumen posible de eluido que contiene solamente partículas víricas, quedando retenida sobre la frita porosa la resina unida al DNA cromosomal bacteriano presente en el lisado.

Se procedió a romper la partícula viral, agregando EDTA pH 8.0 a una concentración final de 20mM y proteinasa K a una concentración final de 50 µg/ml. Luego de mezclar suavemente, se incubó a 45°C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución de 5% CTAB-NaCl 0.5M, para llegar a una concentración final de CTAB 0,1% y NaCl 6,3 mM. Luego de mezclar suavemente se incubó a 68°C por 15 minutos, agitando suavemente cada 3 minutos. Posteriormente, se dejó en hielo por 15 min. Esta solución de DNA del fago lambda, se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. El sedimento de DNA viral, se resuspendió en 500 µl de NaCl 1,2 M y se agregó 2 volúmenes de etanol 100%. Luego de precipitar toda la noche a -20 °C, se centrifugó a 14.000 x g por 10 min a 4° C. El sedimento de DNA, se lavó con 1 ml de etanol 75% y se volvió a centrifugar por algunos segundos eliminándose todo el sobrenadante. Se secó el DNA al aire por unos minutos con el fin de eliminar los restos de alcohol. Finalmente el DNA, se resuspendió en 4 µl de NaCl 1,2 M y 196 µl de tampón TE (10mM Tris, 1mM EDTA) y se incubó a 55°C para disolver completamente el DNA.

3.2.6 Cuantificación del DNA

Para conocer la concentración aproximada de DNA, se efectuó la medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203. Para determinar esta concentración se asume que 1 unidad de Absorbancia corresponde a 50 µg/ml para DNA de doble hebra (Sambrook *et al.* 1989).

3.2.7 Digestiones del DNA con enzimas de restricción

Tanto para el DNA plasmidial como DNA viral se realizó el mismo tratamiento con enzimas de restricción. Para digerir el DNA de fagos se requieren 16 µg mientras que para digerir DNA plasmidial se requiere solamente 3 µg. Luego a cada DNA se agregó el tampón de la enzima correspondiente a una concentración final de 1X, la enzima a una concentración final de 1U y agua para completar el volumen de reacción. Las digestiones se incubaron por 10 a 12 horas a 37°C (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.8 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa

Para separar los fragmentos de DNA luego de ser digeridos con las enzimas de restricción se utilizó geles al 1% de agarosa en tampón TAE 1X. Las corridas electroforéticas del DNA se realizaron en tampón TAE 1X y a un voltaje 5V/cm. Finalizada la electroforesis, se procedió a teñir el gel con EtBr (1 µg/ml en tampón TAE 1X), para visualizar los fragmento de DNA con luz UV en el gel. Para estimar los tamaños de los fragmentos de DNA separados en el gel de agarosa, se utilizaron estándares de tamaño molecular que se corrieron en la misma electroforesis paralelamente con el DNA digerido (Sambrook *et al.* 1989).

3.2.9 Subclonamiento de fragmentos de DNA en un vector plasmidial

Para subclonar fragmentos de DNA se utilizó el vector plasmidial pBluescript. Este vector fue digerido con la enzima correspondiente a los extremos del fragmento a subclonar el cual tiene una concentración final de 0.5 µg. Posteriormente, el vector linearizado fue desfosforilado. Para ello se realizó la siguiente reacción: a 0.25 µg del vector se le agregó 1X tampón de la fosfatasa alcalina (AP), 1U fosfatasa alcalina (CIAP) y agua desionizada – autoclavada para completar volumen de reacción. Esta mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos. Luego se agregó una alícuota más de enzima CIAP (1 µl) y se incubó por otros 30 minutos a 37 °C. Antes de extraer el DNA de esta mezcla se denaturó la fosfatasa alcalina a 70 °C por 5 minutos. Para extraer el DNA se agregó 1/2 volumen de fenol saturado en Tris y 1/2 volumen de HCl₃/IAA. Se agitó y centrifugó a 12.000 x g por 3 minutos. Se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) que corresponde al 90% del volumen original. Para precipitar el DNA se agregó a este sobrenadante 1/10 volumen de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 3 volúmenes de etanol 100%. Se dejó precipitando el DNA a -20 por toda la noche. Al otro día se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. El sedimento de DNA, se lavó con 1 ml de etanol 75% y se volvió a centrifugar por algunos segundos eliminándose todo el sobrenadante. Se secó el DNA al aire por unos minutos con el fin de eliminar los restos de alcohol. Finalmente el DNA, se resuspendió en 10 µl de agua desionizada-autoclavada obteniéndose un DNA plasmidial linearizado con una concentración de 0.125 µg./µl. Los tamaños de los fragmentos a subclonar fluctuaron entre 2000pb y 4000pb, los cuales provenían de digestiones simples del DNA del fago lambda correspondiente a tres de los 19 clones lambda obtenidos del rastreo de la biblioteca genómica para el (los) posible (s) gen (s) de calcitreína analizados en esta tesis. La reacción de ligación fue realizada utilizando tampón T₄ DNA ligasa 5X, 2 U de T₄ DNA ligasa, 100 ng de DNA viral correspondiente a la totalidad de los

productos de la digestión de los correspondientes clones lambda, digerido con su respectiva enzima de restricción, 100 ng del vector pBluescript[®] y ATP 1 mM, completando así un volumen de reacción de 10 µl. La reacción de ligación fue realizada a 4°C por toda la noche (Sambrook et al., 1989).

3.2.10 Preparación de células competentes

Se prepararon células competentes XL-1 Blue (Stratagene) de acuerdo al protocolo del electroporador E. Coli Pulser (Bio-Rad): Se inoculó una colonia XL1 Blue que fue seleccionada de una placa que contenía tetraciclina, en 3 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación constante por aproximadamente 12 horas. Luego, de este cultivo celular se sacó una alícuota necesaria para tener una dilución de 1/100 en 1lt de medio LB líquido. Se dejó con agitación constante a 37°C hasta que alcanzó una concentración de 0.5 a 600nm. Posteriormente, las células se enfriaron en hielo y el cultivo se transfirió a botellas estériles de 250 ml. Las células se centrifugaron por 15 min a 4.000 x g a 4°C. Se removió lo más posible el sobrenadante. Luego las células se resuspendieron suavemente en el mismo volumen (250 ml) con glicerol 10% frío. Nuevamente se centrifugaron a 4.000 x g por 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron suavemente las células en 1/2 del volumen inicial (125 ml) de glicerol 10% frío. Nuevamente se centrifugaron a 4.000 x g por 15 minutos a 4°C y se resuspendieron suavemente en 1/4 del volumen inicial (62,5 ml) de glicerol 10% frío. Finalmente, las células se peletearon y se resuspendieron en 1/100 del volumen inicial (2,5 ml) en una solución de glicerol 10% frío y se distribuyeron en alícuotas de 60–80 µl y se guardaron a –80°C como células competentes para electroporación.

3.2.11 Transformación de células competentes

La transformación de los productos de la ligación del vector pBluescript fue realizada en células XL1-Blue preparadas previamente según protocolo electroporador E. Coli Pulser (Bio-Rad). Además se prepararon con anterioridad placas LB agar con ampicilina (50 µg/ml), a las cuales también se les esparció sobre el agar 4 µl de IPTG (200 mg/ml) y 40 µl de X-gal (50mg/ml). El X-gal es un sustrato cromogénico de la β- galactosidasa, otorgando colonias azules en la placas, señal que nos indica que el vector plasmidial no posee inserto, expresándose el gen de la β- galactosidasa en las bacterias. Por otra parte las bacterias que si poseen el vector plasmidial se presentan como colonias blancas, no expresándose en ellas el gen de la β- galactosidasa ya que ha sido interrumpido por el inserto de DNA clonado.

Todo el protocolo de transformación de las células competentes se realiza en hielo. Los 10 µl de la reacción de ligación fueron adicionados a 60 µl de las células, mezclando suavemente. Luego esta mezcla fue introducida en una cubeta de 0,2 mm, aplicando a las células un shock eléctrico de 1,8 V en electroporador E. Coli Pulser (Bio-Rad). Rápidamente se agregó a las células 500 µl de medio SOC (Bacto-triptona 2%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 10mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM; MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM). Las células transformadas en medio SOC fueron agitadas a 225 x g por 1 hora a 37°C, centrifugadas por 10 segundos y resuspendidas en 100 µl del sobrenadante, cuyo volumen fue aplicado sobre la placa LB agar sólido conteniendo ampicilina 50µg/ml, IPTG 1 mM y Xgal 0,02%. Las placas se incubaron invertidas a 37°C por aproximadamente 12 horas.

3.2.12 Preparación de DNA plasmidial por lisis alcalina

Este método se realizó según descrito por Hardy and Kimber (1987); Sambrook et al., (1989). La extracción y purificación de DNA plasmidial se realizó a partir de las colonias blancas correspondientes a células transformadas con el vector que lleva el fragmento de DNA de interés. Estas colonias fueron inoculadas en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/ml). Las células inoculadas se colocaron en agitación constante a 37°C por toda la noche. Al día siguiente, se procedió a centrifugar las células en tubos Eppendorf de 1,5 ml por 20 segundos en una microcentrifuga, se eliminó todo el sobrenadante y el sedimento se resuspendió completamente en 100 µl de tampón TE pH 8.0 con 20 µg/ml de RNasa, dejándolas en reposo a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se agregó 200 µl de una solución de NaOH 0,2 M y SDS 0,1%, preparada algunos minutos antes, la cual es una solución denaturante que rompe las células en forma inmediata. Para favorecer la lisis completa de las células bacterianas, se dejó en hielo por 5 minutos. Luego se agregó 150 µl de acetato de potasio 2,55 M pH 5.5, mezclándose enérgicamente por 2 segundos para eliminar el DNA genómico bacteriano, dejándose con esta solución por 5 minutos en hielo. Al centrifugar por 1 min a temperatura ambiente, se obtuvo un sedimento con el DNA genómico de la bacteria y el sobrenadante donde se encuentra el DNA plasmidial, el que se trasvasijó a otro tubo Eppendorf de 1,5 ml. El DNA plasmidial se precipitó agregando 900 µl de isopropanol frío. Para ello se mezcló muy bien por inversión, y se dejó incubando por 15 minutos a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. El DNA se lavó con etanol 75% y se dejó secar al aire por algunos minutos para eliminar restos de alcohol. El DNA sedimentado, se resuspendió en 40 µl de tampón TE pH 8.0 con 20 µg/ml de RNasa y se volvió a precipitar agregando 20 µl de acetato de amonio 6 M y 120 µl de isopropanol frío, se mezcló bien y se dejó precipitando por 5 minutos

a -20°C . Luego fue centrifugado por 1 minuto a temperatura ambiente. El sedimento se lavó con etanol 75%, se dejó secar al aire por algunos minutos y posteriormente, fue resuspendido en $10\ \mu\text{l}$ de tampón TE pH 8.0 con RNAsa a una concentración final de $20\ \mu\text{g/ml}$.

3.2.13 Southern blot en membrana de nylon

La transferencia de los fragmentos de DNA separados en electroforesis en geles de agarosa se realizó a una membrana de nylon, procedimiento descrito por Southern et al., (1975) y modificado por Sambrook et al (1989). Antes del montaje de la transferencia, el gel de agarosa se incubó con una solución denaturante (NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M), con agitación suave por 30 minutos, luego se dejó el gel en una solución neutralizante (Tris-HCl 0,5 M pH 8.0 y NaCl 1,5 M) con agitación suave también por 30 minutos. Finalmente el DNA fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon con ayuda del tampón 20X SSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, ajustar a pH 7.0). Se dejó transfiriendo por toda la noche y finalizada la transferencia, la membrana se lavó con una solución de 1X SSC por 3 minutos. Luego de esto, se fijó el DNA a la membrana, secándola en una estufa con vacío a una temperatura de 80°C por 1 hora.

3.2.14 Hibridación de DNA con una sonda radiactiva

Según descrito por Sambrook et al (1989), la membrana de nylon que ya tiene fijado el DNA, se sometió a una etapa de prehibridación por 1 hora a 65°C con una solución que consta de SSC 6X, formamida 50%, Denhardt's 5X, SDS 0,5% y DNA denaturado de espermio de salmón $100\ \mu\text{g/ml}$. Luego de esta etapa de prehibridación, se le agregó la sonda marcada radiactivamente (descrita en punto 3.2.1), la cual se diluyó en la misma solución ocupada en la prehibridación. Se

híbrido con esta sonda durante toda la noche a 42°C con agitación suave en horno de hibridación. Luego de finalizada la etapa de hibridación, la solución que contiene la sonda se recuperó y la membrana se sometió a una serie de lavados a diferentes concentraciones de sal, las cuales se detallan a continuación: SSC 2X, SDS 0,1% por 30 minutos a 37°C; SSC 1X, SDS 0,1% por 30 minutos a 37°C; SSC 0,5X, SDS 0,1% por 30 minutos a 37°C; finalizada la etapa de lavado de la membrana, ésta se expuso con una película autorradiográfica a -80°C.

3.2.15 Preparación de RNA total de varios tejido de carpa

Se sacrificó una carpa de aproximadamente 2 Kg y se le extrajo los tejidos que se iban a utilizar para la extracción de RNA total. Según Sambrook et al (1989), se homogenizó 100mg de tejido fresco de carpa recién decapitada en 1 ml de Trizol[®]. Luego el tejido homogenizado se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se le adicionó 0,2 ml de cloroformo. Se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Producto de la centrifugación, se obtuvo tres fases, que de abajo hacia arriba son: fase orgánica, interfase y fase acuosa donde se encuentra el RNA. La fase acuosa se extrajo cuidadosamente a un tubo Eppendorf nuevo, dejando un 10% atrás para no contaminar el RNA con proteínas de la interfase. A este sobrenadante se le adicionó 0,5 ml de isopropanol frío para precipitar el RNA y se incubó las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se dejó precipitar el RNA por toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Se removió completamente el sobrenadante y se lavó el sedimento de RNA con 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó por 5 minutos, se eliminó toda la solución y el sedimento se dejó secar al aire por algunos minutos. Finalmente, el RNA se resuspendió con agua esterilizada libre de RNAsa.

Todos los tejidos utilizados en la extracción de RNA fueron tratados de igual forma, excepto hígado, el cual requirió de un paso adicional. El sedimento de RNA se resuspendió en 0,5 ml de agua libre de RNAsa y se le agregó 0.5 ml de LiCl 8 M, dejándose toda la noche a -20°C . Luego se centrifugó a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , se lavó con etanol 75%, se secó al aire y el RNA se resuspendió en 20 μl de agua esterilizada libre de RNAsa.

La cuantificación del RNA se realizó de la misma manera que la cuantificación de DNA midiendo absorbancia a 260 nm de longitud de onda, considerándose que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNA. Luego, para verificar si existe contaminación del RNA con proteínas se le midió la absorbancia a 280nm de longitud de onda. Inmediatamente, se calculó el cociente entre $A_{260\text{nm}}/A_{280 \text{ nm}}$, el cual otorgó como resultado un valor igual o mayor a 1,5.

3.2.16 Fraccionamiento de RNA en geles denaturantes de agarosa con formaldehído

Este gel de agarosa, a diferencia del gel de DNA, se realizó en condiciones denaturantes. Para ello, el gel se preparó a un porcentaje de agarosa del 1,5%, tampón de corrida 1X (MOPS), formaldehído 2,2 M, y agua libre de RNAsa para disolver la agarosa. El gel se recorrió en tampón de corrida 1X a 50 mA de intensidad de voltaje por 30 minutos. La precorrida del gel y posteriormente la electroforesis se realizó sobre hielo para evitar recalentamiento del tampón.

Las muestras de RNA fueron preparadas según Sambrock et al (1989), mezclando 20 μg de RNA de cada tejido, con 2,0 μl de tampón de corrida 5X (MOPS 0,1 M pH 7.0, acetato de sodio 40 mM, EDTA 5mM pH 8.0), 3,5 μl de formaldehído 37% y 10 μl de formamida desionizada. Luego, las muestras fueron incubadas a 65°C por 15 minutos, para denaturar el RNA y después puestas rápidamente en hielo. Para cargar el RNA al gel de agarosa, se les agregó 1 μl

de EtBr 1mg/ml y 2 µl de tampón de muestra para RNA (glicerol 50%, EDTA 1 mM pH 8.0, azul de bromofenol 0,25% y xylene cyanol 0,25%). Se mezcló en forma homogénea con la muestra y se cargó la totalidad del volumen al gel.

3.2.17 Northern blot en membrana de Nylon

La transferencia del RNA desde el gel de agarosa, se realizó sin tratamiento previo del gel Según descrito por Sambrook et al., (1989). Para ello se transfirió el RNA por capilaridad a la membrana de nylon con 20X SSPE (NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0,2 M y EDTA 1 M). Se transfirió por 10 horas y luego de finalizada la transferencia, la membrana se lavó con una solución de SSPE 1X por 3 min. Luego, se fijó el RNA a la membrana de Nylon con luz UV.

La membrana conteniendo el RNA, se prehibridó con una solución de SSPE 6X, formamida 50%, 5X Denhardt's, SDS 0,5% por 1 hora a 42°C. Luego de la prehibridación, se agregó la sonda marcada radiactivamente (descrita punto 3.2.2.1) la cual se diluyó en la misma solución ocupada en la prehibridación. Se hibridó con esta sonda durante toda la noche a 42°C. Luego se recuperó la sonda y la membrana se sometió a una serie de lavados a diferentes concentraciones de sal, las que se detallan a continuación: SSPE 2X, SDS 0.1% por 30 minutos a 37°C; SSPE 1X, SDS 0,1% por 30 minutos a 37°C; SSPE 0.5X, SDS 0,1% por 30 minutos a 37°C. Finalizada la etapa de lavado la membrana se expuso con una película autorradiográfica a – 80°C por un tiempo necesario dependiendo de la cantidad de radiactividad presente.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de la sonda GK-310

Para el estudio de los genes de calicreína, se comenzó con el rastreo de una biblioteca genómica de carpa, con el propósito de obtener secuencias génicas de esta serina proteasa de carpa. Por ello se requirió una sonda heteróloga complementaria a la región más conservada de calicreína muy bien caracterizada en especies mamíferas.

Previamente se realizó un alineamiento múltiple de secuencias génicas de calicreína en especies mamíferas para la deducción de la(s) región(es) más conservadas y características de este gen, generándose así los partidores que sirvieron para amplificar un fragmento de 310pb a partir de cDNA de riñón de rata y un cDNA de hipófisis de carpa los cuales se usaron como sonda en el rastreo de la biblioteca genómica de carpa y experimentos de Southern blot. El alineamiento de los partidores cGK-4 y cGK-5 con el cDNA de calicreína de riñón de rata se muestra en la figura 1. En la figura 2 se muestran los productos de amplificación a partir de cDNA de riñón de rata (carril 2) y cDNA de hipófisis de carpa (carril 3) cuyo tamaños son de 310pb. El carril 4 corresponde al control negativo de esta reacción de PCR, donde sólo se visualiza la banda correspondiente a los partidores.

La sonda específica para calicreína fue marcada radiactivamente en una reacción de PCR en la que se incorpora al nucleótido radiactivo [α -³²P]- dCTP.

4.2 Rastreo de la biblioteca genómica de carpa

El rastreo de una biblioteca genómica de carpa se realizó según el punto 3.2.4. Inicialmente se verificó el título de la biblioteca genómica de carpa, 5×10^9 pfu/ml

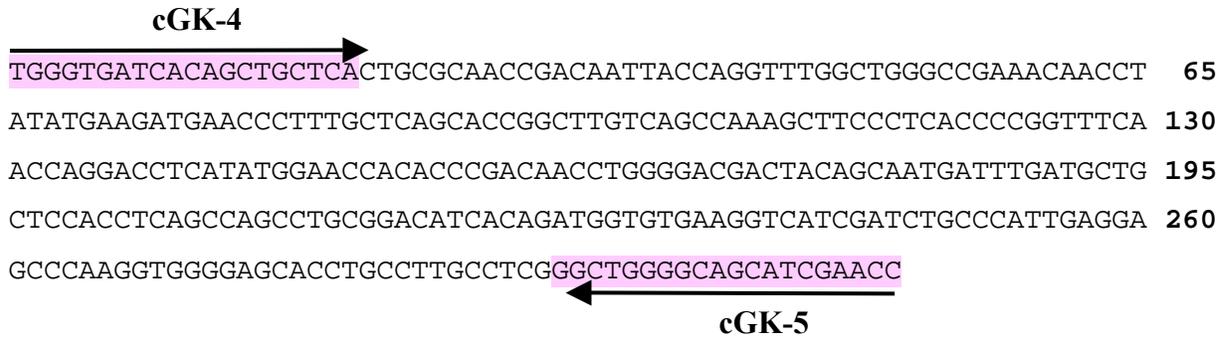


Figura 1: Secuencia sonda GK310. Las flechas indican la ubicación y orientación de los partidores **cGK-4:** 5'-TGGGTGATCACAGCTGCTCA-3' y **cGK-5:** 5'-GGTTCGATGCTGCCCCAGCC-3'

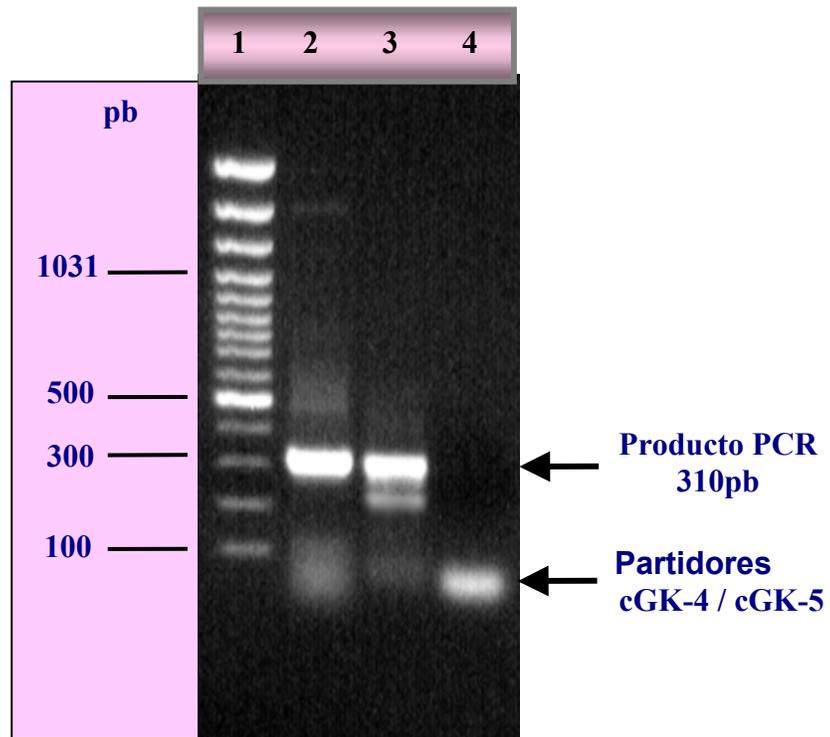


Figura 2: Fraccionamiento en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación del fragmento de 310pb usado como sonda. **Carril 1:** Estándar de tamaño molecular de 100 pb. **Carril 2:** Amplificación desde cDNA de riñón de rata. **Carril 3:** Amplificación desde cDNA de pituitaria de carpa. **Carril 4:** Control negativo.

(STRATAGENE). De un total de 500.000 recombinantes rastreadas se purificaron 19 clones que hibridaron con la sonda específica GK310 con diferente intensidad. Los clones escogidos para ser analizados en esta tesis presentaron diferentes intensidades de hibridación con la sonda GK310, detallándose a continuación: λ cGK423 (moderada), λ cGK814 (fuerte) y λ cGK1012 (moderada).

4.3 Caracterización de los clones lambda por digestiones con enzimas de restricción

De cada uno de los clones lambda aislados se preparó DNA, según el método de CTAB.

Para hacer un mapa físico parcial de cada uno de estos clones, se realizó con cada DNA, digestiones simples y dobles con distintas enzimas de restricción. Algunas de estas enzimas de restricción cortan dentro del sitio de múltiple clonamiento (SMC) del vector λ Fix II como son: *SacI*, *SalI*, *XbaI*, usándose además *EcoRI* y *HindIII*, que no cortan en el vector y tampoco en el SMC de este vector de reemplazo.

Los tres clones lambda analizados mostraron diferencias en los patrones de digestión, anticipándose ya a la hipótesis de que estos clones son diferentes entre sí.

En la figura 3, panel A, se muestra el perfil electroforético de las digestiones simples del clon λ cGK423. El DNA recombinante digerido con *NotI* (figura 3, carril 4), presenta dos bandas siendo una de ellas más intensa (20000pb), que debería corresponder al brazo largo del vector λ Fix II y la otra banda, de 9000pb que correspondería al brazo corto del vector lambda. *NotI* libera el inserto, siendo la banda correspondiente a éste, la que migra en forma simultánea y muy próxima a la banda del brazo largo del vector, no distinguiéndose una separación visible entre ellas en el gel, teniendo entonces el inserto un tamaño aproximado de 15500pb. Se observa en el panel B la hibridación con la sonda de la banda correspondiente al inserto. Al igual que *NotI*, las

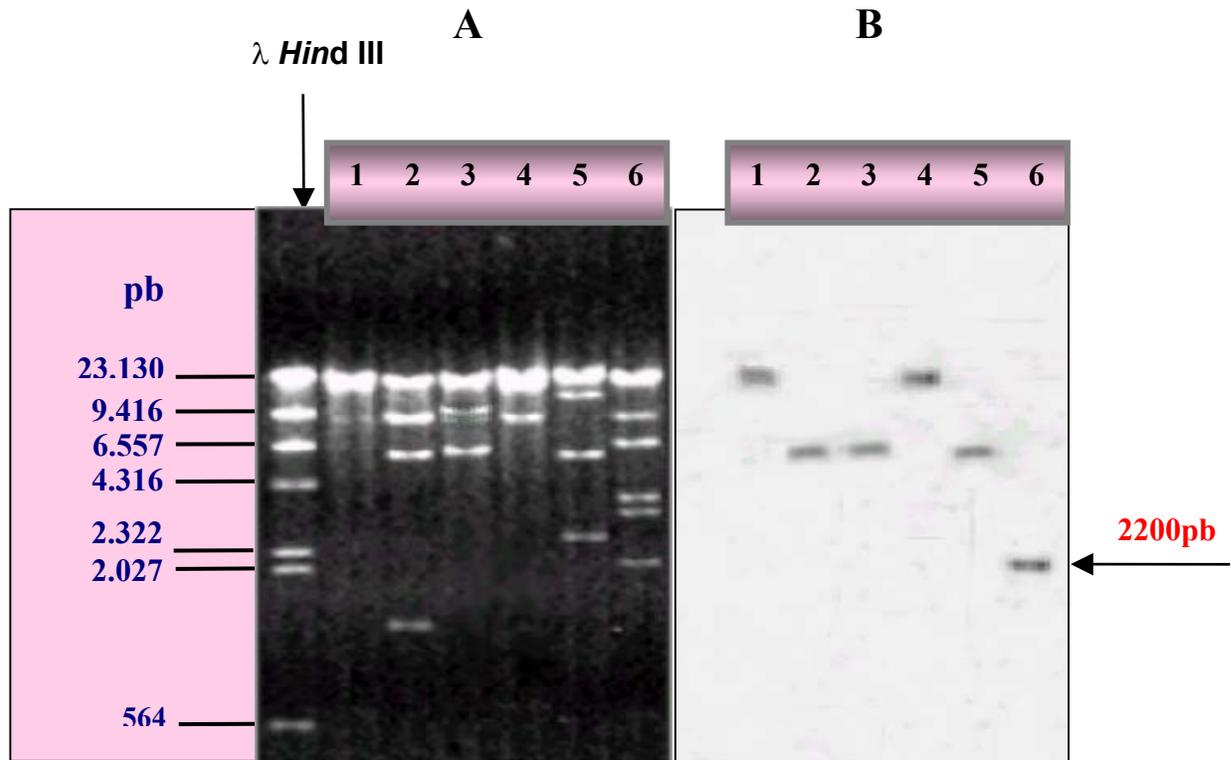


Figura 3: Análisis de Southern blot de digestiones dobles de λ cGK423.

(A) fraccionamiento del DNA del clon λ cGK423 con diferentes enzimas de restricción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **Carril (1)** *EcoR* I; **carril (2)** *Sac* I; **carril (3)** *Sal* I; **carril (4)** *Not* I; **carril (5)** *Hind* III; **carril (6)** *Xba* I.

(B) Southern blot del gel en (A) con la sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0.2X SSC-0.1% SDS por 30 minutos a 37°C. Tiempo de exposición 24 horas.

enzimas *SacI* y *SalI* (Figura 3, carril 2 y 3, respectivamente) también origina los fragmentos correspondientes a los brazos largo y corto del vector λ . La digestión del clon λ cGK423 con *SacI* (Figura 3, carril 2) originó cuatro bandas distinguibles en el gel, cuyos tamaños aproximados son de 20000pb y 9000pb que corresponderían a los brazos largo y corto del vector lambda, respectivamente. Las otras dos bandas poseen un tamaño aproximado de 5000pb y 1000pb, siendo la banda de 5000pb que hibrida con la sonda GK310 (Figura 3, panel B). La otra banda de aproximadamente 9500pb posiblemente migre en forma conjunta con la banda de 9000pb, no se logrando diferenciarla. También se realizó la digestión para este clon con la enzima *SalI* (Figura 3, carril 3), que generó cuatro bandas, una de tamaño cercano a los 9000pb que podría corresponder al brazo corto y otra de 20000pb que correspondería al brazo largo, entre estas dos bandas, y muy cercana a la banda correspondiente al brazo corto, hay una banda que sería de aproximadamente 9400pb, correspondiendo a una parte del inserto. La otra banda que se observa posee un tamaño aproximado a 6100pb, siendo ésta la que hibrida con la sonda GK310 (Figura 3, panel B). La enzima de restricción *HindIII* no corta dentro del SMC pero si en los brazos del vector λ Fix II. Sin embargo, la digestión del clon λ cGK423 (Figura 3, carril 5) genera cuatro bandas, cuyos tamaños aproximados son: 23000pb que correspondería al brazo largo del vector λ más un trozo del inserto, 13000pb que podría corresponder al brazo corto más un trozo del inserto, 6000pb, la cual hibrida con la sonda GK310 (Figura 3, panel B) y 2500pb que corresponderían a un trozo del inserto. Por último, este clon lambda fue digerido con la enzima *XbaI* (Figura 3, carril 6), la cual genera seis bandas, de las cuales las 20000pb y 9000pb corresponderían a los brazos largo y corto del vector λ , respectivamente. Las otras bandas que corresponderían al inserto poseen tamaños aproximados de 6500pb, 3500pb, 3300pb y 2200pb, siendo solamente esta última banda la que hibrida con la sonda. Dado las características de

tamaño e hibridación con la sonda con una moderada intensidad del fragmento cuyo tamaño aproximado es de 2200pb, generado luego de la digestión con *XbaI*, y que es señalado con una flecha en la figura 3B, fue el fragmento que se subclonó. Para la enzima *EcoRI* (Figura 3, carril 1) no se advierten bandas como producto de digestión para el clon λ cGK423, en comparación con las otras enzimas, cercana a 9000pb si se logra apreciar levemente una banda, que solamente podría deberse a que *EcoRI* tenga un sitio de corte dentro del inserto, muy cercano al brazo corto del vector, ya que esta enzima no posee sitios de restricción en el SMC del vector λ Fix. Una segunda explicación sería que esta enzima no posea sitios de restricción dentro del inserto y que esa banda observada levemente en el gel sea solamente un artefacto de éste. Por último, también podría corresponder a una digestión parcial del DNA recombinante, y por ende, no generando productos de digestión con esta enzima. La única banda más intensa, con un tamaño aproximado de 23000pb es la que hibrida con la sonda.

Para realizar un mapa parcial de los clones y poder elegir con mayor propiedad el fragmento de DNA de tamaño adecuado para subclonar, se realizaron digestiones dobles para cada uno de los tres clones lambda analizados en esta tesis.

El perfil electroforético de las digestiones dobles para el clon λ cGK423 se observan en la figura 4 (panel A). Para cada una de las combinaciones de enzimas de restricción utilizadas se observa en el gel las bandas correspondientes a los brazos largo (20000pb) y corto (9000pb) del vector λ . Las digestiones dobles del clon λ cGK423 en la figura 4 con *EcoRI-SalI* (carril 1) y *XbaI-SalI* (carril 2) y *SacI-XbaI* (carril 3), cada una generó un doblete de 3800pb y 3600pb aproximadamente. La digestión con *EcoRI-Sal I* (Figura 4, carril 1) generan además dos bandas, de aproximadamente 6300pb y 1800pb, siendo solamente la banda de 6300pb la que hibrida con la sonda GK310. En este caso si corta la enzima *EcoRI*, concordando entonces con lo señalado

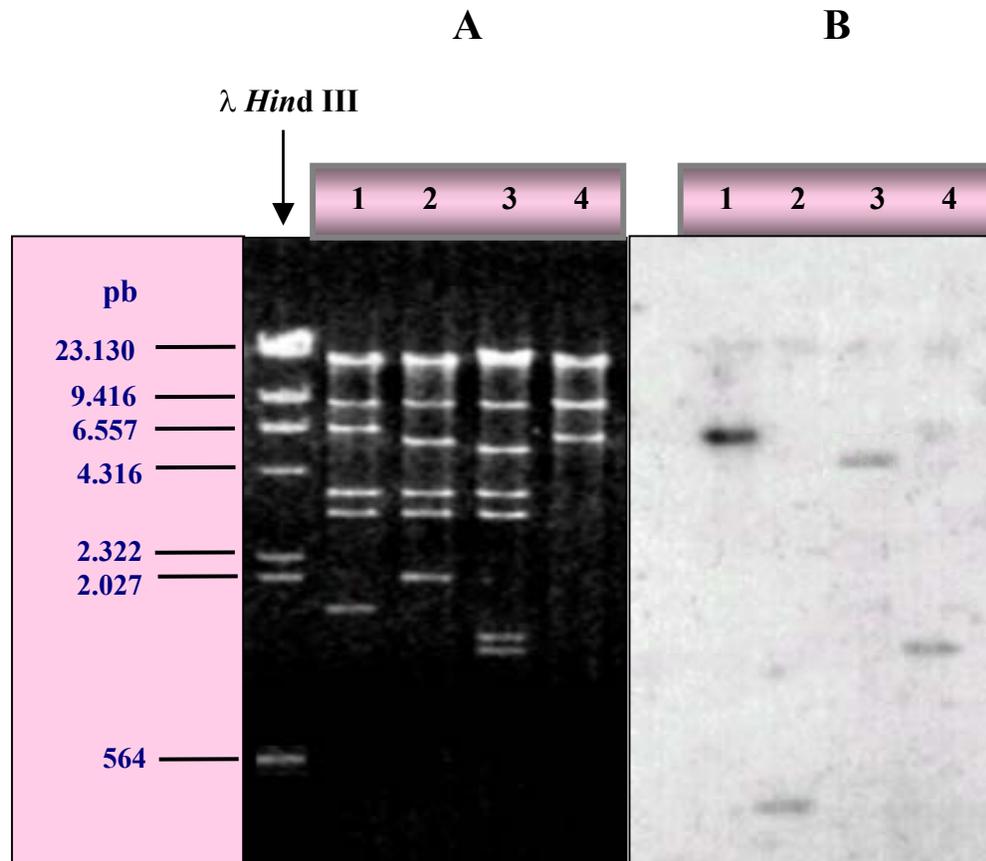


Figura 4: Análisis de Southern blot de λ cGK423

(A) fraccionamiento del clon λ cGK423 en digestiones dobles con diferentes combinaciones de enzimas de restricción en un gel de agarosa 1%. **Carril (1)** *EcoRI-SalI*; **carril (2)** *XbaI-SalI*; **carril (3)** *SacI-XbaI*; **carril (4)** *XbaI-EcoRI*.

(B) hibridación en Southern blot del gel en (A) con la sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,5X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos a temperatura ambiente. Tiempo de exposición 24 horas.

anteriormente en la digestión simple con *EcoRI*, existiendo una digestión parcial del DNA recombinante y que esta enzima posee sitios de restricción dentro del inserto, ya que *EcoRI* combinada con *SalI* genera mayor cantidad de fragmentos que con *SalI*. La digestión doble con las enzimas *XbaI-SalI* (Figura 4, carril 2) genera además dos bandas bien definidas, a parte de las correspondientes a las de los brazos del vector y al doblete señalado anteriormente, cuyos tamaños aproximados son de 5800pb y 2100pb, no hibridando ninguna con la sonda. Al parecer se generaría otra banda de un tamaño aproximado de 300pb, con una baja resolución del bromuro de etidio, pero si en Southern blot (Figura 4, panel B) de esta figura (carril 2) ya que hibrida con la sonda. La digestión doble con las enzimas *SacI-XbaI* (Figura 4, carril 3) además genera tres bandas, una cuyo tamaño aproximado es de 5700pb y un doblete de 1300pb y 1100pb, siendo la banda de aproximadamente 5700pb la que hibrida con la sonda observada en el panel B de la figura 4. Por último, la digestión doble con las enzimas *XbaI-EcoRI* (Figura 4, carril 4) genera solamente tres bandas visibles en el gel, cuyos tamaños son de 20000pb y 9000pb que corresponderían al brazo largo y corto del vector lambda, respectivamente y otra banda de aproximadamente 6500pb. Sin embargo, en la hibridación en Southern blot con la sonda GK310 de esta figura, hibrida una banda cuyo tamaño aproximado sería de 1000pb, no observable en el gel. Según lo observado en el carril 6 de la figura 3, correspondiente a este mismo clon con la enzima *XbaI*, ésta genera seis bandas, de las cuales en esta digestión doble se visualizan tres de ellas. Esto sugiere que las bandas realmente se encuentran en el gel pero baja la sensibilidad de detección con bromuro de etidio. Los tamaños aproximados de estas bandas son de 3600pb, 3400pb y dos bandas de 1000pb Sin embargo, la banda de 1000pb que hibrida con la sonda GK310 es entonces producto de la digestión del fragmento de 2000pb con la enzima *EcoRI*.

En la figura 5 se observa el análisis del clon λ cGK814.. La digestión con *NotI* (Figura 5, carril 4) origina una banda que correspondería al brazo largo del vector λ de 20000pb y otra banda de 9000pb que sería la correspondiente al brazo corto del mismo vector. La banda correspondiente el inserto migra muy cercana a la banda del brazo largo, cuyo tamaño aproximado sería de 15500pb, corroborándose en el panel B de esta figura, ya que es esta banda la que hibrida con la sonda. Si bien *EcoRI* no corta en el SMC del vector lambda, si genera productos de digestión para este clon observados en el carril 1 de esta figura, encontrándose por lo tanto sitios de restricción para esta enzima dentro del inserto. La digestión con la enzima *EcoRI* origina cinco bandas, cuyos tamaños aproximados son: 22000pb que correspondería al brazo largo del vector (20000pb) más un trozo del inserto de aproximadamente 2000pb. Otra de un tamaño aproximado de 11200pb la cual debiera corresponder al brazo corto del vector (9000pb) más un trozo del inserto (\approx 1200pb), y las otras bandas 5800pb, 3500pb y 3000pb las cuales corresponden a partes del inserto, siendo la banda de aproximadamente 3000pb, la única de las cinco bandas que hibrida con una fuerte intensidad con la sonda GK310 en el panel B (flecha roja). Por otro lado, la digestión simple con *SacI* del clon λ cGK814 (Figura 5, carril 2) al parecer cortó sólo a un lado del SMC (brazo largo) originando cuatro bandas, una correspondería al brazo largo de un tamaño cercano a los 20000pb, otra banda de aproximadamente 13000pb, que sería el brazo corto (9000pb) más un trozo del inserto con un tamaño aproximado de 4000pb, y si observamos el panel B, es la banda que hibrida con las sonda, siendo el trozo del inserto pegado al brazo corto del vector el que contiene la secuencia nucleotídica que reconoce la sonda GK310. Las otras bandas son de aproximadamente 7500pb y 4000pb, que serían parte del inserto. Las digestión con *SalI* (Figura 5, carril 3) genera visiblemente tres bandas, cuyos tamaños son de 20000pb que correspondería al brazo largo, la otra cercana a los 9000pb correspondiente la brazo

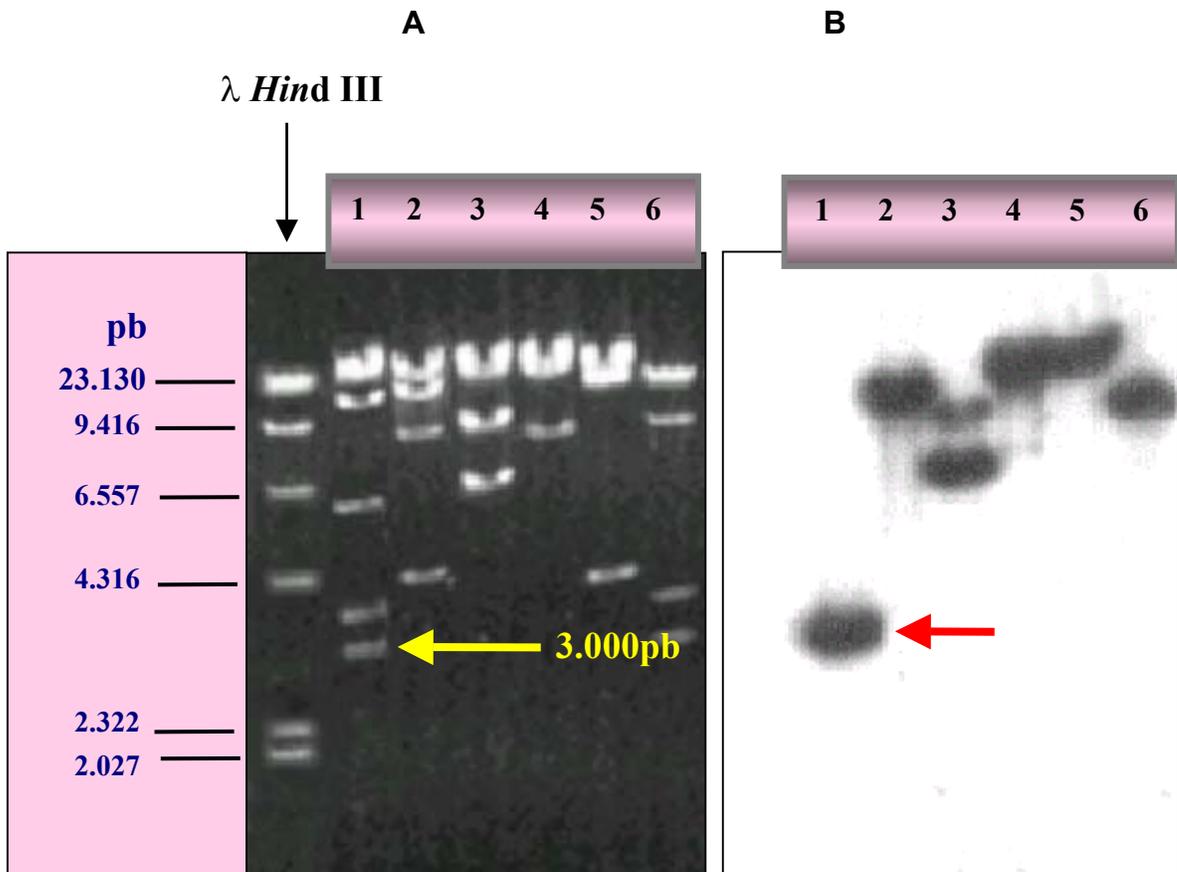


Figura 5: Análisis por Southern blot de λ GK814.

(A) electroforesis de digestiones simples del clon λ GK814 con diferentes enzimas de restricción en un gel de agarosa al 1%. Carril (1) *EcoRI*; carril (2) *SacI*; carril (3) *SalI*; carril (4) *NotI*; carril (5) *HindIII*; carril (6) *XbaI*.

(B) hibridación en Southern blot del gel en (A) con la sonda GK310. La flecha indica el fragmento de 3000pb obtenido de la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* observándose una fuerte intensidad de hibridación con la sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,2X SSC-0,1% SDS por 30 minutos a 37°C. Tiempo de exposición 24 horas.

corto y muy próxima a esta una banda de aproximadamente 8500pb, la cual hibrida con la sonda (Figura 5, panel B). La otra banda visible en el gel es de aproximadamente de 7000pb la cual sería parte del inserto, hibrida intensamente con la sonda. En el carril 5 observamos los productos de digestión del clon λ cGK814 con *HindIII*, la cual genera dos bandas, cuyos tamaños aproximados son de 25000pb que correspondería a los brazos del vector más un trozo del inserto (\approx 5000pb), y otra banda de 4500pb aproximadamente, que corresponde a otra parte del inserto. Muy próxima a la banda de 25000pb se encuentra otra banda de un tamaño aproximado de 15000pb que correspondería al brazo corto (9000pb) y un trozo del inserto de aproximadamente 6000pb. La banda que hibrida con la sonda y que observamos en el panel B de esta figura, corresponde a la de 15000pb, confirmando por un lado que la enzima de restricción *HindIII* no corta en SMC del vector lambda y por otro lado, que el inserto clonado en este vector viral posee un sitio de corte para esta enzima. Por último, la digestión de este clon lambda con *XbaI* generó cuatro bandas, de las cuales las de mayor tamaño, 20000pb y 9000pb, aproximadamente, corresponden al brazo largo y corto del vector, respectivamente. Las otras bandas poseen un tamaño aproximado de 3500pb y 3000pb pertenecientes al inserto y otra banda que migra conjuntamente con la banda del brazo corto del vector lambda Fix II, no diferenciándose ambas bandas en el gel. Según el resultado otorgado por el Southern blot (Figura 5, panel B), la banda que otorgó una señal radiactiva corresponde a la de 9000pb perteneciente al inserto y que migra en la misma posición a la del brazo corto del vector. A diferencia del clon λ cGK423, el clon λ cGK824 presenta una fuerte hibridación con la sonda del rastreo pcGK310 en los fragmentos de DNA que libera luego de las digestiones con las distintas enzimas de restricción.

Al igual que lo realizado con el clon λ cGK423, también el clon λ cGK814 fue sometido a digestiones dobles con las mismas combinaciones de enzimas de restricción (Figura 6). La

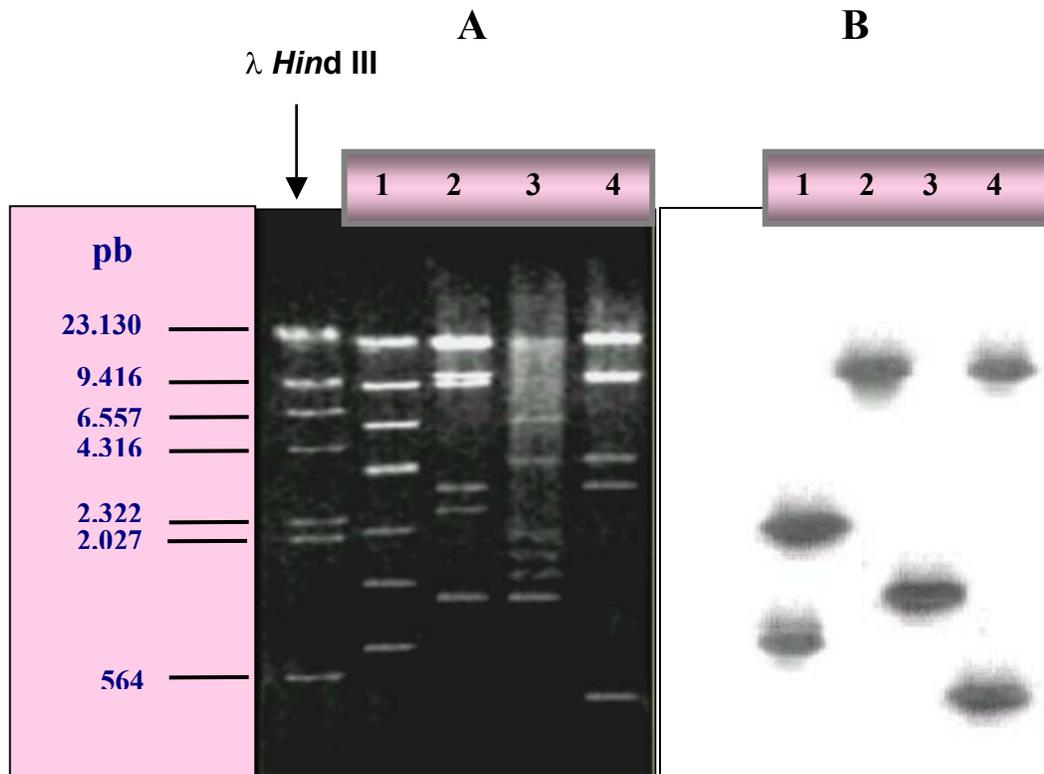


FIGURA 6: Análisis de Southern blot de Digestiones dobles de λ cGK814

(A) fraccionamiento de digestiones dobles clon λ cGK814 con diferentes combinaciones de enzimas de restricción, en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. Carril (1) *Eco*RI-*Sal*I; carril (2) *Xba*I-*Sal*I; carril (3) *Sac*I-*Xba*I; carril (4) *Xba*I- *Eco*RI.

(B) hibridación en Southern blot del gel en (A) con la sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,5X SSC-0,1% SDS por 15 minutos a temperatura ambiente. Tiempo de exposición 24 horas.

digestión de este clon lambda con las enzimas *EcoRI-SalI* (Figura 6, carril 1) genera siete bandas de DNA de distintos tamaños, incluyendo los fragmentos correspondientes a los brazos largo ($\approx 20000\text{pb}$) y corto ($\approx 9000\text{pb}$) del vector. Las bandas más importantes son las que tienen un tamaño de 2250pb y 950pb aproximadamente, que son las que presentan una fuerte intensidad de hibridación con la sonda GK310 (Figura 6, panel B). Las otras bandas tienen los siguientes tamaños aproximados: 6450pb , 4000pb y 1850pb . La otra digestión de este clon con *XbaI-SalI* (Figura 6, carril 2), originó seis bandas, de las cuales la de 20000pb y 9000pb corresponderían a los brazos largo y corto del vector lambda, respectivamente. La otra banda también con un tamaño aproximado de 9000pb y que migra muy próxima a la banda correspondiente al brazo corto pero que sin embargo logra diferenciarse, correspondería a una parte del inserto y es la que presenta hibridación con la sonda (Figura 6, panel B). Las otras tres bandas tienen tamaños aproximados de 2800pb , 2400pb y 1300pb . La digestión con *SacI-XbaI* (Figura 6, carril 3) generó múltiples bandas de distintos tamaños, en la que se destaca la banda cercana a los 1300pb , siendo la única que hibrida con la sonda (Figura 6, panel B). También se observan en esta digestión las bandas que corresponderían a los brazos largo y corto del vector (20000pb y 9000pb , respectivamente). Por otro lado, la digestión con *XbaI-EcoRI* (Figura 6, carril 4) originó cinco bandas, en las que se destacan las correspondientes a los brazos largo ($\approx 20000\text{pb}$) y corto ($\approx 9000\text{pb}$) del vector λ Fix II, una banda de aproximadamente 4000pb , otra banda cercana a los 3200pb , y por último una de aproximadamente los 300pb . Existe la posibilidad de que una banda de un tamaño aproximado de 8000pb que migra junto con el brazo corto del vector, no observándose bien definida en el gel pero que si se observa en el panel B de esta figura que es la banda que hibrida con la sonda GK310 y no la banda correspondiente al brazo corto, ya que la

enzima corta en los dos SMC en el vector viral. Además observamos en la misma figura la hibridación igualmente con una fuerte intensidad de la banda de 300pb.

El perfil electroforético de las digestiones con diferentes enzimas de restricción y su respectiva hibridación en Southern blot con la sonda GK310 correspondiente al clon λ cGK1012, se muestran en la figura 7. La digestión con *NotI* (Figura 7, carril 4), origina tres bandas, siendo una de ellas de 20000pb, que correspondería al brazo largo del vector, otra de 9000pb, que sería el brazo corto del vector y entre estas dos bandas, una que migra más cercana a la banda del brazo largo, que tendría aproximadamente 13000pb correspondiente al inserto. Esto se confirma en el Southern blot (Figura 7, panel B), observándose la hibridación de dicha banda con la sonda GK310. La digestión del DNA viral con *EcoRI* (Figura 7, carril 1), generó cuatro bandas, encontrándose una banda de un tamaño cercano a los 25000pb que sería el brazo largo del vector lambda más un trozo del inserto de un tamaño aproximado de 5000pb, otra banda de 10000pb que correspondería al brazo corto del vector (9000pb) más un segmento del DNA del inserto de aproximadamente 1000pb, y una banda cuyo tamaño aproximado es de 4000pb (señalado con una flecha, Figura 7), correspondiente a una parte del total del inserto, la cual hibrida con la sonda, observada en el panel B de esta figura. Como se ha señalado anteriormente para los otros clones, *EcoRI* no tiene sitios de restricción en el SMC, pero en este caso genera bandas lo que implica que dentro del inserto posee secuencias que sí reconoce esta enzima. El fragmento de DNA de aproximadamente 4000pb descrito anteriormente es el que se escogió para su posterior subclonamiento. La digestión con la enzima *SacI* (Figura 7, carril 2) generó tres bandas, de las cuales una correspondería al brazo largo del vector con un tamaño de 20000pb, aproximadamente, otra banda de aproximadamente 9000pb correspondiente al brazo corto del vector. Migrando en conjunto con la banda del vector se encuentra una banda de un tamaño

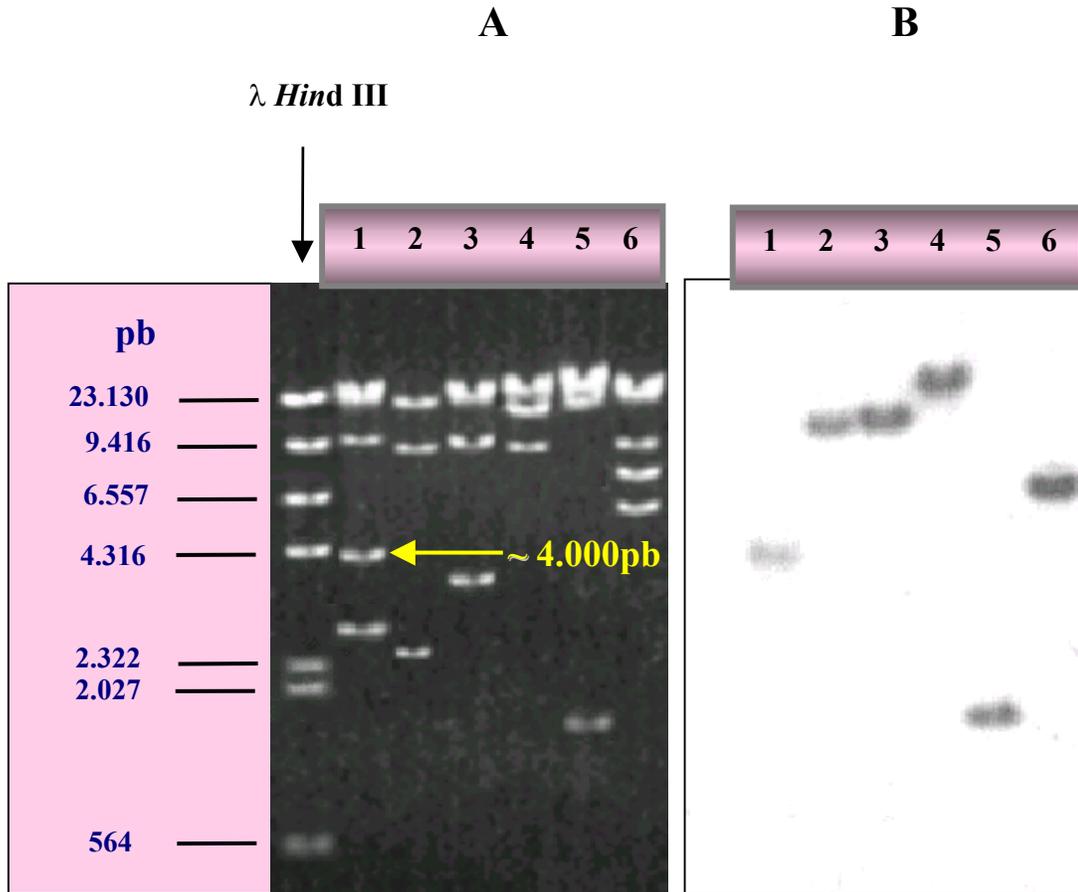


FIGURA 7: Análisis de Southern blot de digestiones simples de λ cGK1012.

(A) electroforesis del clon λ cGK1012 sometido a digestiones simples con diferentes enzimas de restricción en un gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** *Eco*RI; **carril 2:** *Sac*I; **carril 3:** *Sal*I; **carril 4:** *Not*I; **carril 5:** *Hind*III; **carril 6:** *Xba*I

(B) hibridación en Southern blot del gel en (A) con la sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0.2X SSC, 0.1% SDS por 30 minutos a 37°C.

Tiempo de exposición 24 horas.

aproximado de 10500pb, ya que *SacI* posee sitios de restricción en los SMC, tanto del brazo largo como corto del vector λ Fix II. Esto concuerda con el resultado otorgado en el Southern blot (Figura 7, panel B), en donde se observa una banda que hibrida en una posición muy cercana al brazo corto con el tamaño aproximado de 10500pb. Además esta digestión originó otra banda con un tamaño aproximado de 2500pb. *Sal I* (Figura 7, carril 3) otorgó como producto de digestión tres bandas, que en tamaños decrecientes son: 20000pb, correspondiente al brazo largo vector, 9000pb, correspondiente al brazo corto. En forma conjunta migra con la banda del vector una banda de aproximadamente 95000, la cual es la que hibrida con la sonda GK310 observada en el panel B de esta figura. También como producto de esta digestión se generó otra banda con un tamaño aproximado de 3500pb. La digestión del DNA viral con *HindIII* (Figura 7, carril 5) también originó tres bandas, cuyos tamaños son: 25000pb que correspondería al brazo largo del vector (≈ 20000) más un trozo del inserto de un tamaño aproximado de 5000pb, 15500pb, que correspondería al brazo corto (≈ 9000 pb) más un trozo de aproximadamente 6500pb y otra banda de 1500pb siendo esta última la que presentó hibridación con la sonda GK310. En el carril 7, Figura 7, se presentan las cuatro bandas que genera la digestión de este clon lambda con la enzima *XbaI*, una de un tamaño cercano a los 20000, lo que podría corresponder al brazo largo del vector, otra de 9000pb, que correspondería al brazo corto del vector, y las otras dos de aproximadamente 7000pb y 6000pb, siendo esta última la que hibrida con la sonda (Figura 7, panel B).

Al igual que los dos clones lambda anteriores, también este clon fue sometido a digestiones dobles con las combinaciones de enzimas que se describen en la figura 8. El carril 1

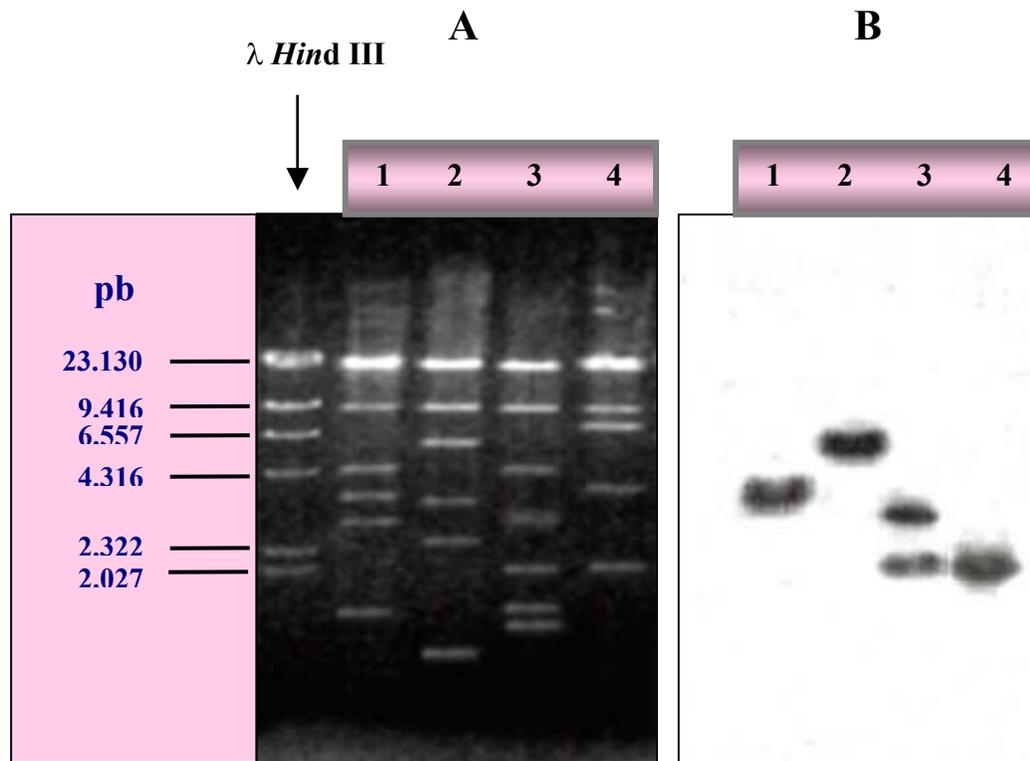


FIGURA 8. Análisis de Southern blot de digestiones dobles de λ cGK1012

(A) fraccionamiento de las digestiones dobles del clon λ cGK1012 con diferentes enzimas de restricción en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr.

Carril 1: *EcoRI-SalI*; **carril 2:** *XbaI-SalI*; **carril 3:** *SacI-XbaI*; **carril 4:** *XbaI-EcoRI*.

(B) análisis en Southern blot del gel en (A) con la sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,5X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos a temperatura ambiente. Tiempo de exposición 24 horas.

de esta figura muestra el fraccionamiento de los productos de la digestión del clon λ cGK1012 con las enzimas *EcoRI-SalI*, generando seis bandas, entre las cuales se encuentran las que corresponderían a los brazos largo y corto del vector 20000pb y 9000pb, respectivamente. Como se ha señalado anteriormente, la enzima de restricción *EcoRI* no corta en los SMC del vector lambda, es entonces la otra enzima la cual se combinó con *EcoRI* la que generó las bandas de los brazos del vector. Los tamaños aproximados de las otras bandas generadas de esta digestión en orden decreciente, son: 4400pb, 3900pb, 3000pb y 1700pb, entre las cuales se destaca la banda de 3500pb que es la que hibrida con la sonda GK310, observada en el panel B de la figura 8. Para todas las otras digestiones también se generaron, las dos bandas correspondientes a los brazos largo y corto del vector. En la digestión con *XbaI-SalI* (Figura 8, carril 2) se originaron seis bandas, cuyos tamaños aproximados son de 20000pb, 9000pb, 6000pb, 3800pb, 2400pb y 800pb, siendo solamente la banda de 6000pb la que hibrida con la sonda con una fuerte intensidad. En el carril 3, Figura 8 se muestran el fraccionamiento de las siete bandas generadas luego de la digestión con las enzimas *SacI-XbaI*, que en orden decreciente son: 20000pb, 9000pb, 4400pb, 3300pb, 2000pb, 1700pb y 1600pb aproximadamente. Las bandas que presentan señal positiva al ser hibridadas con la sonda son 3300pb y 2000pb (Figura 8, panel B). Por último, la digestión de este clon con las enzimas *XbaI-EcoRI* (Figura 8, carril 4), originaron solamente cinco bandas, en las que se cuentan las corresponden a los brazos del vector, más otras tres bandas cuyos tamaños aproximados son de 7000pb, 4000pb y 2000pb, siendo solamente esta última banda la que otorga una señal positiva con la sonda.

En la tabla 1 se resumen las características que poseen los fragmentos elegidos para subclonar que hibridan con la sonda GK310 de cada uno de los clones λ analizados:

Tabla 1: Características de los fragmentos de DNA a subclonar

Clon	Tamaño del fragmento a subclonar	Intensidad de Hibridación con sonda GK310	Extremos del fragmento
λ cGK423	2000pb	moderada	<i>XbaI</i>
λ cGK814	3000pb	fuerte	<i>EcoRI</i>
λ cGK1012	4000pb	moderada	<i>EcoRI</i>

A pesar de la completa caracterización de los tres clones lambda no es posible construir un mapa físico de cada uno de estos clones ya que es insuficiente para los sitios de restricción obtenidos. Además el tamaño del inserto de DNA que se encuentra clonado en este vector de reemplazo y el tamaño del vector mismo hace aun más difícil la construcción de un mapa físico.

4.4 Subclonamiento de los clones lambda

4.4.1 Subclonamiento del clon λ cGK423

Luego de haber analizado la hibridación en Southern blot de las digestiones simples y dobles del clon λ cGK423, se decidió subclonar el fragmento de aproximadamente 2200 pb del DNA recombinante digerido con *XbaI* que hibrida con la sonda del rastreo GK310 (figura 3, flecha).

Los subclones positivos, que contienen el fragmento de DNA de interés (2200pb) se muestran en la figura 9. El DNA plasmidial fue digerido con *XbaI* para liberar el inserto. En el gel (Figura 9, panel A) se observa las bandas correspondientes al fragmento suclonado de 2200pb y la banda que corresponde al vector plasmidial linearizado de 3000pb,

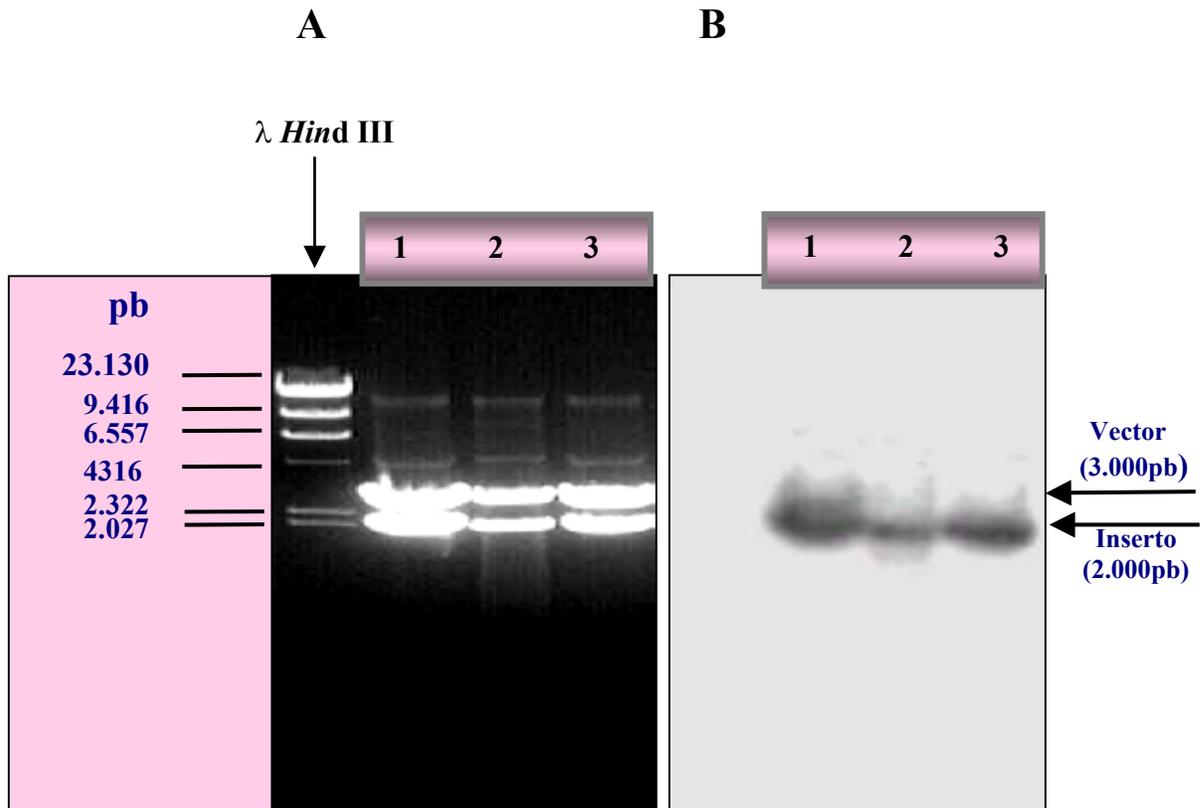


FIGURA 9: Subclones pcGK423₂₂₀₀.

(A) fraccionamiento de algunos de los subclones obtenidos digeridos con *XbaI* que libera el inserto de 2200pb. **Carril 1:** pcGK423₂₂₀₀-1; **Carril 2:** pcGK423₂₂₀₀-2; **Carril 3:** pcGK423₂₂₀₀-3

(B) análisis de Southern blot del gel en (A) con sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,2X SSC-0,1% SDS por 30 minutos a 37°C. Tiempo de exposición 24 horas.

aproximadamente. Uno de estos subclones (pcGK423₂₂₀₀-1) se secuenció y posteriormente se analizó la secuencia.

4.4.2 Subclonamiento del clon λ cGK1012

Del clon λ cGK1012 se subclonó un fragmento *EcoRI* (figura 7) de un tamaño aproximado de 4000pb. Al igual que en el subclonamiento del clon lambda descrito en el punto 4.4.1, el fragmento de 4000 pb fue ligado al vector pBluescript linearizado con *EcoRI* y transformado en las células XL1 Blue. El análisis de varios subclones de pcGK1012₄₀₀₀, digeridos fueron analizados por Southern blot con la sonda de rastreo GK310 (Figura 10, panel B). Se observan dos bandas de las cuales, una corresponde al inserto de 4000pb sublonado y la otra al vector pBluescript linearizado (3000pb). Claramente los tres subclones contienen el inserto esperado, un fragmento *EcoRI* de 4000pb que hibrida con la sonda GK310.

4.4.3 Mapa físico de los subclones de calicreína glandular de carpa

Para la caracterización de los posibles subclones de calicreína se realizaron digestiones simples y dobles con varias enzimas de restricción, para establecer mapas físicos parciales de cada secuencia génica.

4.4.3.1 Caracterización del subclon pcGK423₂₂₀₀ por digestión con enzimas de restricción

Primero fue necesario realizar una serie de digestiones con enzimas de restricción, seleccionándose las enzimas de restricción que tuvieran sitios de restricción dentro del SMC del vector plasmidial pBluescript donde se encuentra subclonado el fragmento de DNA de 2200 pb. Por lo tanto, se usó: *SacI*, *XbaI*, *PstI*, *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *Sall*. El fraccionamiento del

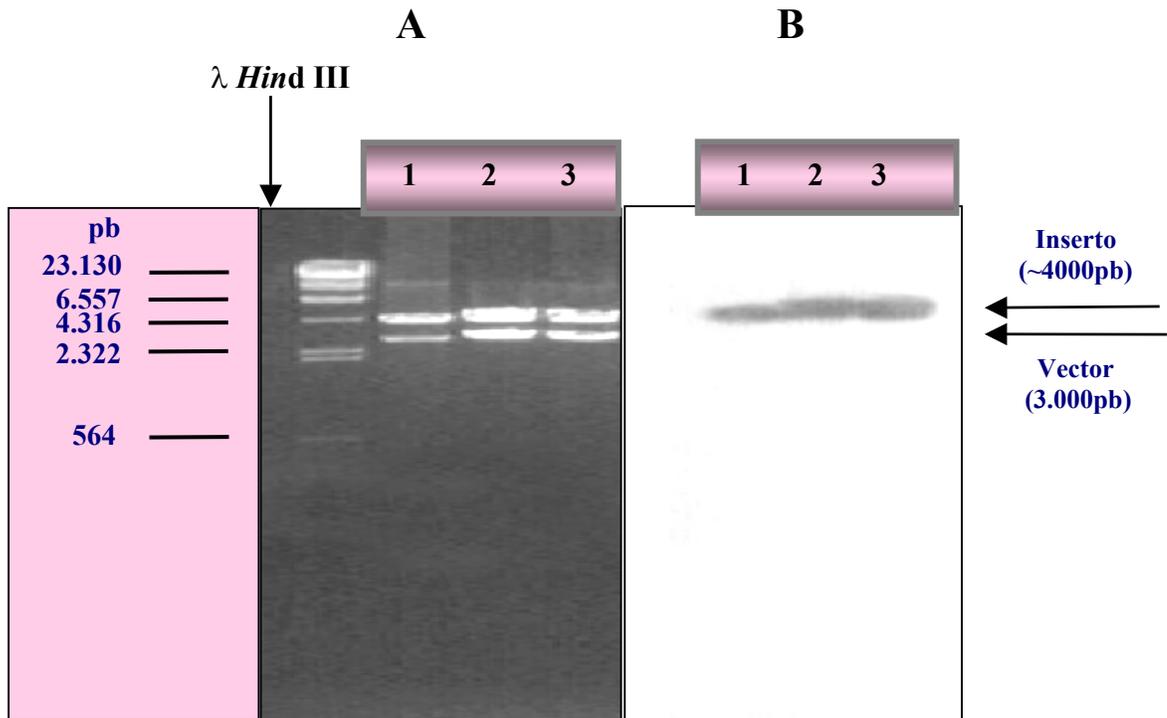


FIGURA 10: Subclones pcGK1012₄₀₀₀.

(A) fraccionamiento de algunos de los subclones obtenidos digeridos con *EcoRI*, que libera el fragmento de aproximadamente 4000pb. **Carril 1:** pcGK1012₄₀₀₀-1; **Carril 2:** pcGK1012₄₀₀₀-2; **Carril 3:** pcGK1012₄₀₀₀-3

(B) análisis de Southern blot del gel en (A) con sonda GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,2X SSC-0,1% SDS por 30 minutos a 37°C. Tiempo de exposición 24 horas.

subclon pcGK423 se observa en la figura 11. La digestión del DNA plasmidial recombinante con *SacI* (Figura 11, carril 1) genera dos bandas, una de un tamaño aproximado de 4400pb que correspondería al vector plasmidial más un trozo del inserto con un tamaño aproximado de 1400pb, y la otra banda de 800pb aproximadamente, corresponde a un segmento del inserto de DNA. Como se observa en el panel B, ambas bandas hibridaron con la sonda GK310, pero con una notable diferencia de intensidad. La generación de dos bandas nos indica que el inserto posee un sitio de restricción para la enzima *SacI* y que ambos fragmentos poseen una parte de la secuencia nucleotídica que es capaz de reconocer la sonda GK310. La digestión con *XbaI* (Figura 11, carril 2) originó dos bandas, siendo una de 3000pb correspondiente al vector pBluescript y la otra de 2200pb correspondiente al inserto de DNA subclonado, utilizado como control de tamaño del inserto y vector para una mejor comparación con los fragmentos de DNA generados en las otras digestiones. La digestión de este subclon con la enzima *PstI* (Figura 11, carril 3) generó tres bandas de las cuales, una de 3200pb que corresponde al vector más un trozo de inserto de aproximadamente 200pb, y las otras de aproximadamente 1800pb y 200 pb correspondientes a fragmentos del inserto. Solamente hibrida con la sonda la banda de 1800 pb (Figura 11, panel B). También se observa una hibridación más débil que es debido a la digestión parcial del DNA plasmidial. Si analizamos esta electroforesis, podemos visualizar que el subclon fue linearizado por *EcoRI*, *BamHI* e *HindIII* lo que significa que el inserto no posee secuencias de reconocimiento para estas enzimas. Con la enzima *SalI* se generaron dos bandas, una con un tamaño aproximado de 3300pb que correspondería al vector plasmidial más un trozo del inserto de un tamaño aproximado de 300pb y la otra de 1900pb aproximadamente, donde esta última hibrida con la sonda GK310. Con esta caracterización parcial de este subclon no podemos saber qué orientación posee el fragmento clonado dentro del vector. Para conocer esta interrogante, se

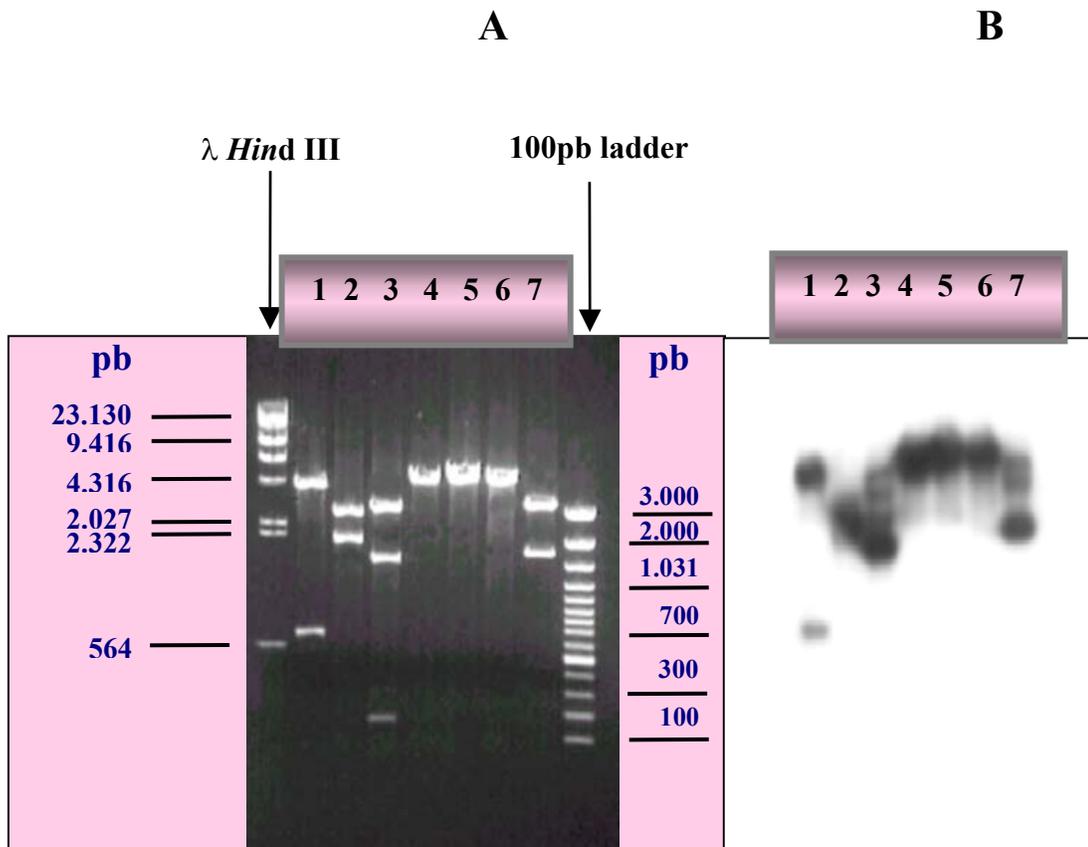


Figura 11: Análisis por Southern blot del fraccionamiento con enzimas de restricción del subclon pcGK423₂₂₀₀.

(A) fraccionamiento en un gel de agarosa al 1% de los productos de digestión del subclon pcGK423 digerido con distintas algunas enzimas de restricción que cortan en el SMC del vector pBluescript SK+. **Carril 1:** *SacI*; **carril 2:** *XbaI*; **carril 3:** *PstI*; **carril 4:** *EcoRI*; **carril 5:** *BamHI*; **carril 6:** *HindIII*; **carril 7:** *SalI*.

(B) hibridación en Southern blot del gel en (A) con la sonda de rastreo GK310. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0,2X SSC, 0,1% SDS por 30 minutos a 37°C. Tiempo de exposición 5 horas.

sometió este subclon a digestiones dobles. Para dichas digestiones se utilizaron las siguientes combinaciones de enzimas: *SacI-SalI*; *SacI-PstI*; *PstI-SalI*. El perfil electroforético para dichas digestiones se observa en la figura 12. En el panel A, muestra el fraccionamiento de los diferentes fragmentos de DNA generados luego de las digestiones simples y dobles. La digestión del subclon pcGK423₂₂₀₀ con las enzimas *SacI-SalI* (Figura 12, carril 2) generaron cuatro bandas cuyos tamaños aproximados son: 3000pb, correspondiente al vector plasmidial más un trozo del inserto, 1600pb, 350pb y 250pb las cuales corresponden al inserto. Esto nos señala que la banda originada con la enzima *SalI* (1900pb, aproximadamente) posee sitios de restricción para la enzima *SacI*. Las bandas que presentaron señal positiva al hibridar con la sonda GK310 fueron las 1600pb y 250pb. la banda correspondiente al vector linealizado (3000pb) hibridó debido a una digestión parcial del DNA plasmidial. La digestión con *SacI-PstI* (Figura 12, carril 4) originó cuatro bandas, una de aproximadamente 3000pb, que correspondería al vector, y las otras de 1700pb, 300pb y 200pb, siendo las bandas de 1700pb y 200pb las que hibridaron con la sonda (panel B). Comparando las digestiones del subclon con *SacI* y *PstI* (Figura 12, carril 3 y 5, respectivamente) tanto la banda de 4400pb (vector más inserto) como la de 800pb poseen sitios de restricción para *PstI*, lo que generó bandas de menor tamaño. Por otro lado, la digestión con las enzimas *PstI-SalI* (Figura 12, carril 6), solamente generó dos bandas, siendo una de ellas de 3400pb, que corresponderían al vector más un parte del inserto y las de 1800pb aproximadamente, que corresponde al inserto y que hibridó con la sonda con una fuerte intensidad. Al comparar las digestiones con *PstI* y *SalI* (Figura 12, carriles 5 y 7, respectivamente) la digestión con ambas liberan una parte del inserto más el vector, no generando fragmentos de menor tamaño.

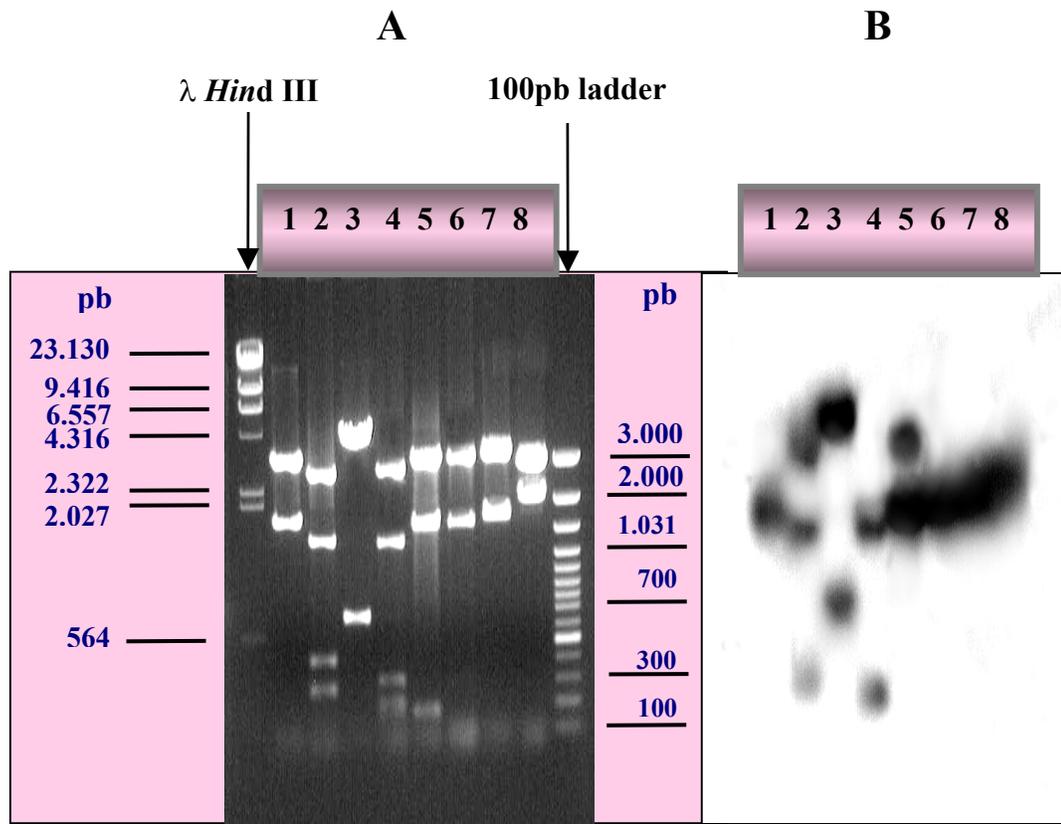


Figura 12: Caracterización del subclon pcGK423₂₂₀₀.

(A) fraccionamiento de los fragmentos del DNA plasmidial del subclon pcGK423 luego de las digestiones con diferentes combinaciones de enzimas. **Carril 1:** *SalI*; **carril 2:** *SacI-SalI*; **carril 3:** *SacI*; **carril 4:** *SacI-PstI*; **carril 5:** *PstI*; **carril 6:** *PstI-Sal I*; **carril 7:** *SalI*; **carril 8:** *XbaI*.

(B) hibridación en Southern blot del gel en (A) con GK310. el análisis sugiere la posible orientación del fragmento de DNA dentro del vector pBluescript SK+. La membrana en este Southern blot se lavó hasta 0.2X SSC-0.1% SDS por 30 minutos a 37°C. Tiempo de exposición 5 horas.

Con estos resultados del subclon pcGK423₂₂₀₀, se pudo generar un mapa físico parcial del inserto clonado, el cual se muestra en la figura 13. De este mapa físico se puede inferir que *Sall*, *PstI* y *SacI* tienen sitios de restricción dentro del inserto de 2200pb, dado por los fragmentos que se observan en la electroforesis de la figura 12. Los sitios de restricción posteriormente serán confirmados en el análisis de la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀.

4.4.3.2 Análisis de la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀

El subclon pcGK423₂₂₀₀ fue secuenciado y analizado por BLAST con las secuencias nucleotídicas que se encuentran disponibles en la base de datos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.html>). La secuencia nucleotídica correspondiente al subclon pcGK423 tiene un tamaño exacto de 2259pb (figura 14).

El resultado de este alineamiento nos permite pensar, y por ende, esclarecer cómo la sonda GK310 pudo hibridar con el subclon tan fuertemente, en los Southern Blot correspondientes. Claro está que como esta es una sonda heteróloga y por primera vez se rastrea el gen de calicreína en la carpa, debemos saber en qué sitio se pudo unir a la secuencia del subclon. Para conocer ésto, fue necesario realizar un análisis muy profundo de esta secuencia. Inicialmente se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀ con la secuencia de la sonda GK310, el cual se muestra en la figura 15. Como se observa, la sonda se alinea a la secuencia del subclon con un porcentaje de identidad de un 56%. En la discusión se detallan las causas por las cuales se pudo unir la sonda de calicreína a esta secuencia.

El alineamiento de la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀ se efectuó para conocer el grado de similitud con las secuencias génicas disponibles de calicreína glandular de todas o la gran mayoría de las especies mamíferas, siendo uno de los objetivos principales de esta tesis. Luego de

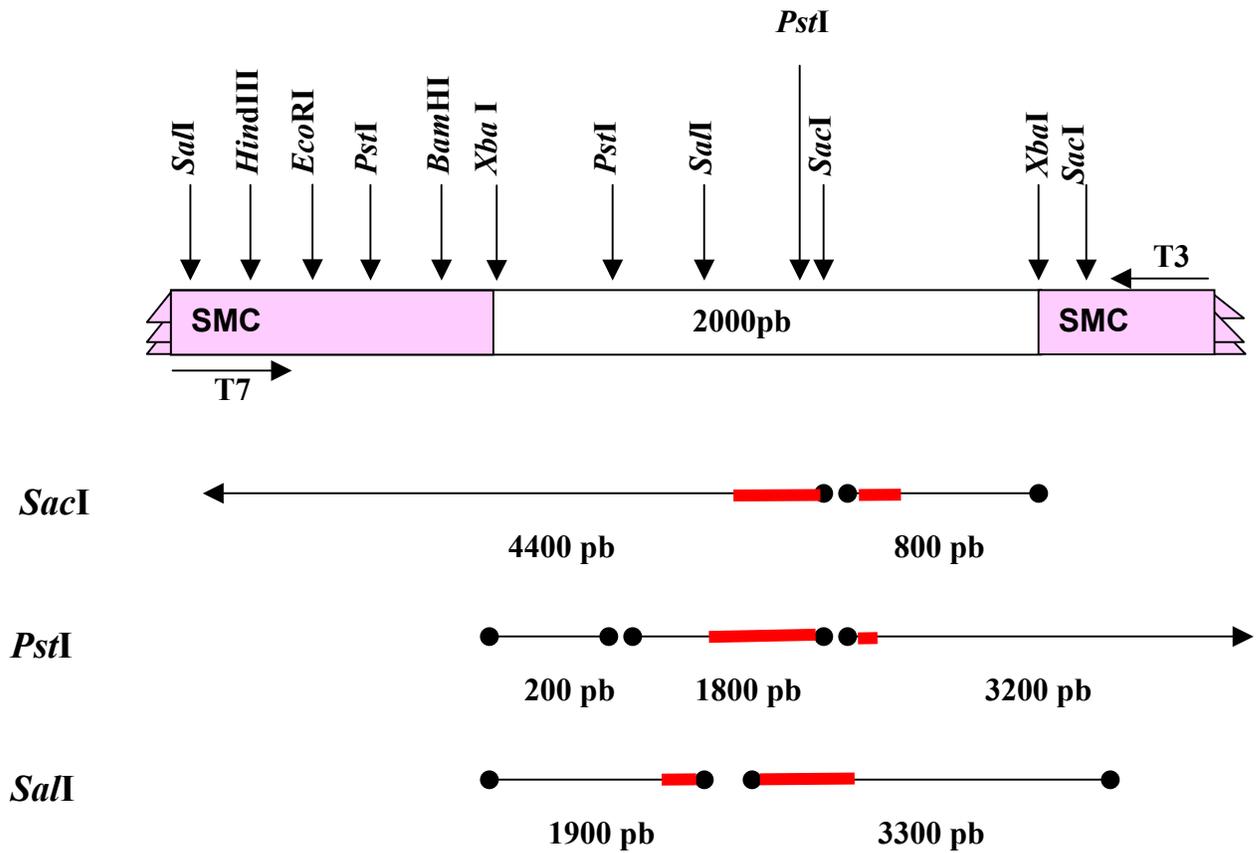


Figura 13: Mapa de restricción del subclon pcGK423₂₂₀₀.

Mapa físico parcial de la orientación del inserto de DNA de 2200pb dentro del vector pBluescript y de la ubicación de algunos sitios de restricción. En rojo se destaca las zonas que aproximadamente hibridan con la sonda GK310.

```

AATTATCTTAAAGGGACATTTTTGTCATTTAATTCAACAACCTGATGACACATGAACTGAT 60
CACGTTTCAAATTTCAATTTGGGTATAACATGATTTTAAACTTCAGGTCTGTGCAAGGCAT 120
GATGAAACAGACTTGACTGACTCATGATCTAAAGGCAGGCAAATTTGTGAATGTAAAACCTT 180
TTGTTGATTGCTTCCATGGCACCCCTTTCAGTGTTTCAGTTTCATTTGCATTCTCTTAGTCT 240
TCAGGCAGTCGAATTACAAAGACATTACACAAGCCGTCTTCAGGTGGCACAGAACCGCCC 300
AATTTTTTATTCTTACCCCAGAGCACTTAAACCAAGAAAACAAAAGCTGTTAGCACTGTG 360
GTTAGCGTGGTAACATTTAACCCTTTTAGTCACTATAGTAACTGTTGTTAGCAACCTGTT 420
ATCTTATTTGCTGATGAACTGTGTTTTATGACAGCCAACCTCAGTGGAATAGACAAACAAC 480
TAAAAAGTCAATATGAAGATATCACCTTAACCTTTATGGTCTGTACATGCACTTGGAGG 540
TTGGCCTTATGAGTCATGTGGATGATTTGCTCATATTCATACACTGAACATAGACAAATA 600
AAAACAACCTCCAATATCAATAACAAATATCAGTAAAATATAAGGGAAAAAAGCACGTA 660
AACTACATATCAAATACAGCTTTCAAATGAGCATAGGAAACATAAAAACAATATTTTGTTA 720
CAGTGACAATACTGTTGTGAAAGCTATCTGTGATGTTTCTTGACAAGATTATGTAGGGAT 780
TCCTTTAATACTCCTCTCCTTCTCCTCTCCTCTCCTCTCCTCGACGCTGTCTGTTCCACCT 840
CTTCGTAATCCTTCTCCAGGGCAGCCATGTCTTCTCTGGCCTCTGAGAACTCACCTCCT 900
CCATTCTTCACCCACATACCAATGAACAAAAGCTCTCTTGGCGTACATCAGGTGCAACT 960
TGTGATCCAGACGAGCCCAGGCTTCAGCGATGGCTGTGGTGTGCTCAGCATACATACAG 1020
CTCGCTGCACCTTAGCCAGGTCTCCTCCAGGAACCACGGTTGGTGGCTGGTAGTTGATGC 1080
CAACCTTGAATCCAGTGGGACACCAGTCCACAAACTGGATGGTACGCTTGGTCTTGATGG 1140
TTGCGATGGCAGAGTTGACGTCTTTGGGAACCACATCTCCACGGTACAGCAGACAGCAGG 1200
CCATGTACTTGCCGTGACGAGGGTTCGATTTTACCATCTGATTGGCTGGCTCAAAGCAAG 1260
CGTTGGTGATTTCTGCAACGGAGAGCTGCTCATGGTAGGCCTTCTCTGCGGAGATCACTG 1320
GGGCGTAGGTGGCCAGAGGGAAGTGGATACGTGGATACGGCACCAAGTTGGTCTGGAAC 1380
CGGTCAGATCTACATTCAGAGCTCCATCGAAACGCAGGGATGCTGTGATGGAGGAAACGA 1440
TCTGCCCGATCAGCCTGTTGAGGTTTGTGTAGGTGGGGCGCTCGATGTCGAGGTTTCTAC 1500
GGCAGATATCGTAGATGGCCTCGTTGTCCACCATGAAGGCACAGTCGGAGTGCTCGAGGG 1560
TGGTGTGGGTGGTAAGGATGGAGTTGTAGGGCTCCACCCTGCAGTGGACACTTGAGGAG 1620
CTGGATAAATGGCAAATTCCAATTTTGACTTCTTCCCCTAGTCGACAGACAGCCGTTCCA 1680
TTAGGAGAGAGGTGAACCCAGAGCCGGTGCACCACCAAAAACCTGTGGAAGATCAGGAAGC 1740
CCTGGAGCCCAGTGCACCTGATCAGCCTGCAGGATTACATGAGTTATTTCTGCAATCACTG 1800
GCCAGGATTGTTCTATTTTAGTTCTACTTTAGTTCTTTAGTTCTAGTGCAACACCCAAGA 1860
TAAAGCCAACTTTTGACCCCAAGATTTTCTTACCAGTTTGCAGTCTCTGTCAGCACCAG 1920
GTCAATGATCTCCTTGCCAATGGTGTAGTGCCACGAGCGTAGTTGTTGGCCGCATCTTC 1980
TTTACCAGTGATCAGTTGTTTCAGGGTGGAAACAGTTGGCGGTAGGTACCTGTGCGCACCTC 2040
ATCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAA 2100
TTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCA 2160
CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 2220
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCG 2259

```

Figura 14: Secuencia subclon pcGK423₂₂₀₀.

Secuencia nucleotídica correspondiente al fragmento subclonado de 2200pb.

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	ATTGGGTACCGGGCC	CCCCCTCGAGGTCGA	CGGTATCGATAAGCT	TGATATCGAATTCTCT	GCAGCCCGGGGGATC	CACTAGTTCTAGAAA		90
	2200							
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	TTATCTTAAAGGGAC	ATTTTTGTCATTTAA	TTCAACAACCTGATGA	CACATGAACTGATCA	CGTTTCAAATTTCAA	TTTGGTATAACATGA		180
	2200							
	181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	TTTTTAAACTTCAGGT	CTGTGCAAGGCATGA	TGAAACAGACTTGAC	TGACTCATGATCTAA	AGGCAGGCAAATTGT	GAATGTAAAACCTTTT		270
	2200							
	271	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	GTTGATTGCTTCCAT	GGCACCCCTTTTCAGTG	TTTCAGTTTTCATTTGC	ATTCTCTTAGTCTTC	AGGCAGTCGAATTAC	AAAGACATTACACAA		360
	2200							
	361	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	GCCGTCTTCAGGTGG	CACAGAACCGCCCAA	TTTTTTTATTCTTACC	CCAGAGCACTTAAAC	CAAGAAAACAAAAGC	TGTTAGCACTGTGGT		450
	2200							
	451	465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	TAGCGTGGTAACATT	TAACCCTTTTAGTCA	CTATAGTAACTGTTG	TTAGCAACCTGTTAT	CTTATTTGCTGATGA	ACTGTGTTTTATGAC		540
	2200							
	541	555 556	570 571	585 586	600 601	615 616	630	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	AGCCAACTCAGTGGA	ATAGACAAACAATA	AAAAGTCAATATGAA	GATATCACCTTAACC	TTTATGGTCTGTAC	ATGCACTTGGAGGTT		630
	2200							
	631	645 646	660 661	675 676	690 691	705 706	720	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0
pcGK423	GGCCTTATGAGTCAT	GTGGATGATTTGCTC	ATATTCATACTACTGA	ACATAGACAAATAAA	AACAACCTCCAATAT	CAATAACAAATATCA		720
	2200							

	721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810		
Sonda	-----												0	
pcGK423	GTAAAATATAAGGGA	AAAAAAGCACGTAAA	CTACATATCAAATAC	AGCTTTTCAAATGAGC	ATAGGAAACATAAAA	CAATATTTTGTGTTACA	810							810
	2200													
	811	825	826	840	841	855	856	870	871	885	886	900		
Sonda	-----												0	
pcGK423	GTGACAATACTGTTG	TGAAAGCTATCTGTG	ATGTTTCTTGACAAG	ATTATGTAGGGATTC	CTTTAATACTCCTCT	CCTTCTTCCTCTCCC	900							900
	2200													
	901	915	916	930	931	945	946	960	961	975	976	990		
Sonda	-----												19	
pcGK423	TCTTCTCCGACGCTG	TCTGTTCCACCTCT	TCGTAATCCTTCTCC	AGGGCAGCCATGTCT	TCTCTGGCCTCTGAG	AACTCACCCCTCTCC	990	-----TGGGTG ATCACAGC-TGCTC-						
	2200													
	991	1005	1006	1020	1021	1035	1036	1050	1051	1065	1066	1080		
Sonda	ACTGCGCAACCGACA	-----ATTACCAGGT	T-TGGCTGGGCCGAA	AC-----AACCTA	T-ATGAAGATGAACC	CTTTGCTCAGCACCG	95							
pcGK423	ATTCTTCACCCACA	TACCAATGAACAAAA	GCTCTCTTGGCGTAC	ATCAGGTGCAACTTG	TGATCCAGACGAGCC	CAGGCTTCAGCGATG	1080							
	2200													
	1081	1095	1096	1110	1111	1125	1126	1140	1141	1155	1156	1170		
Sonda	GCT-TG-----TC	AGC---CAAA-----	-GCTTC-CCTCACCC	CGGTTTCAACCAGGA	-CCTCATATGGAACC	AC--ACCCGA---CA	161							
pcGK423	GCTGTGGTGTGCTC	AGCATAACATACAGCT	CGCTGCACCTTAGCC	AGGTCTCCTCCAGGA	ACCACGGTTGGTGGC	TGGTAGTTGATGCCA	1170							
	2200													
	1171	1185	1186	1200	1201	1215	1216	1230	1231	1245	1246	1260		
Sonda	ACCTGGGGACGACT-	--ACAGCAATG----	-ATTTGATGCTGCTC	CACCTCAGCCAGCCT	GCGGACATCACAGAT	GGTGTGAAGGTCATC	243							
pcGK423	ACCTTGAATCCAGTG	GGACACCAGTCCACA	AACTGGATGGTACGC	TTGGTCTTGATGGTT	GCG-ATGGCAGAGTT	GACGTCTTTGGGAAC	1259							
	2200													
	1261	1275	1276	1290	1291	1305	1306	1320	1321	1335	1336	1350		
Sonda	GATCTGCCATTGAG	GAGCCCA-AGGTGGG	GA-GCACCTGCCTTG	CCTCGGGCTGGGG--	CAGCATC-----	-----	306							
pcGK423	CACATCTCCACGGTA	CAGCAGACAGCAGGC	CATGTACTTGCCGTG	ACGAGGGTCGCATTT	CACCATCTGATTGGC	TGGCTCAAAGCAAGC	1349							
	2200													
	1351	1365	1366	1380	1381	1395	1396	1410	1411	1425	1426	1440		
Sonda	-----												306	
pcGK423	GTTGGTGATTTCTGC	AACGGAGAGCTGCTC	ATGGTAGGCCTTCTC	TGCGGAGATCACTGG	GGCGTAGGTGGCCAG	AGGGAAGTGGATAACG	1439							
	2200													

	2161	2175	2176	2190	2191	2205	2206	2220	2221	2235	2236	2250	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	306
pcGK423	CAGCTTTTGTTCCT	TTAGTGAGGGTTAAT	TTCGAGCTTGGCGTA	ATCATGGTCATAGCT	GTTTCCTGTGTGAAA	TTGTTATCCGCTCAC							2249
	2200												
	2251	2265	2266	2280	2281	2295	2296	2310	2311	2325	2326	2340	
Sonda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	306
pcGK423	AATTCCACACAACAT	ACGAGCCGGAAGCAT	AAAGTGTAAGCCTG	GGGTGCCTAATGAGT	GAGCTAACTCACATT	AATTGCGTTGCGCTC							2339
	2200												
	2341	2355	2356	2370	2371	2385	2386	2400	2401	2415	2416	2430	
Sonda	-----	306											
pcGK423	ACTGCCCG	2347											
	2200												

Figura 15: Alineamiento de la secuencia del fragmento de 2200pb del subclon pcGK423₂₂₀₀ con la sonda GK310. El alineamiento entre la secuencia nucleotídica del subclon pcGK423₂₂₀₀ y la sonda GK310 otorgó un porcentaje de homología de 56%, entre los nucleótidos 962 y 1349 de la secuencia del subclon

este alineamiento se pudo comprobar que la secuencia de este subclon no corresponde a ningún tipo de secuencia génica de caliceína. Sorprendentemente, el alineamiento arrojó como resultado que la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀ tiene un 88% de identidad con el cDNA de la α -tubulina de *Oncorhynchus keta*, el cual se muestra en la figura 16.

4.4.4 Obtención de una sonda específica para Northern blot

Con el fin de visualizar la expresión de los posibles mRNA de la secuencia génica del subclon pcGK423₂₂₀₀ en diferentes tejidos de carpa. Se preparó el fragmento de 2200pb por PCR como sonda. La electroforesis de este producto de PCR se muestra en la figura 17. En esta amplificación se probaron los cuatro tipos de partidores correspondientes al vector pBluscript (M13+forward – M13+reverse y T3 – T7). Como se observa y se describe en la figura 17, ambos juegos de partidores, externos al inserto subclonado en el del vector plasmidial proporcionan un producto de amplificación de tamaño esperado de 2200 pb. Además como control positivo para este PCR se amplificó el fragmento de 310 pb, utilizando como templado cDNA de riñón de rata, el cual corresponde al utilizado para la fabricación de la sonda del rastreo de la biblioteca genómica de carpa y posteriores análisis. Las concentraciones de todos los elementos presentes en esta amplificación por PCR, tanto concentración de partidores y templado se describen en la sección 3.2.2.1 de material y métodos.

4.4.4.1 Análisis de Northern blot

De cinco tejidos diferentes de carpa se extrajo RNA total: Agallas (Ag), hígado (Hg), hipófisis (Hp), músculo (M) y riñón (R). Cabe señalar que el RNA total fue extraído de tejidos de carpas de invierno. El resultado de la electroforesis de los RNA totales de estos tejidos se observa

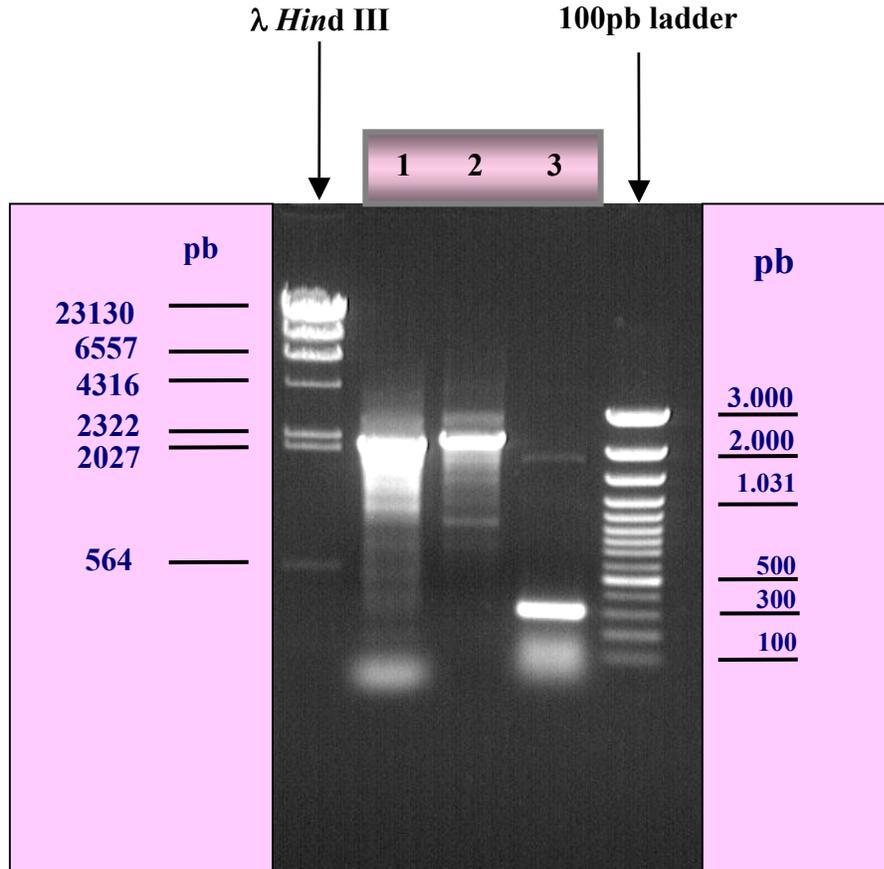


Figura 17: Amplificación del fragmento de 2200pb del subclon pcGK423₂₂₀₀. El producto de amplificación de 2200pb se utilizó como sonda específica para el análisis del Northern blot. **Carril 1:** producto de PCR de 2200pb usando partidores T3 y T7 del vector pBluescript. **Carril 2:** producto de PCR de 2200pb usando los partidores M13+forward y M13-reverse del vector pBluescript. **Carril 3:** control positivo sonda GK310.

en la figura 18. Se observan claramente en el gel los tres tipos de RNA ribosomal, 28S, 18S y 4S. El tamaño de la banda de 28S es de 4.9kb, 18S 4,5kb y de 4S 196pb (Leipoldt et al., 1984), ya que no se utilizó un marcador de tamaño molecular para RNA. Los resultados obtenidos luego de proceder a hibridar con la sonda radiactiva, se observan en la figura 18 B. En esta figura, se aprecia una banda muy marcada en hígado de un tamaño aproximado de 5,8Kb, no así en los tejidos correspondientes a agallas, músculo e hipófisis. En cambio en el RNA correspondiente a riñón se observan claramente tres bandas muy notorias y muy bien definidas. Con los datos de los tamaños de las distintas bandas de RNA dados anteriormente, se pudo estimar los tamaños de cada una de estas bandas observadas en riñón, siendo estas de 6kb, 2kb y 1kb, aproximadamente. Como la sonda con la cual se hizo el Northern es específica para el subclon pcGK423₂₂₀₀, luego del alineamiento se puede decir que estas bandas observadas en el Northern blot corresponden a un tipo de α - tubulina expresada en riñón de carpa.

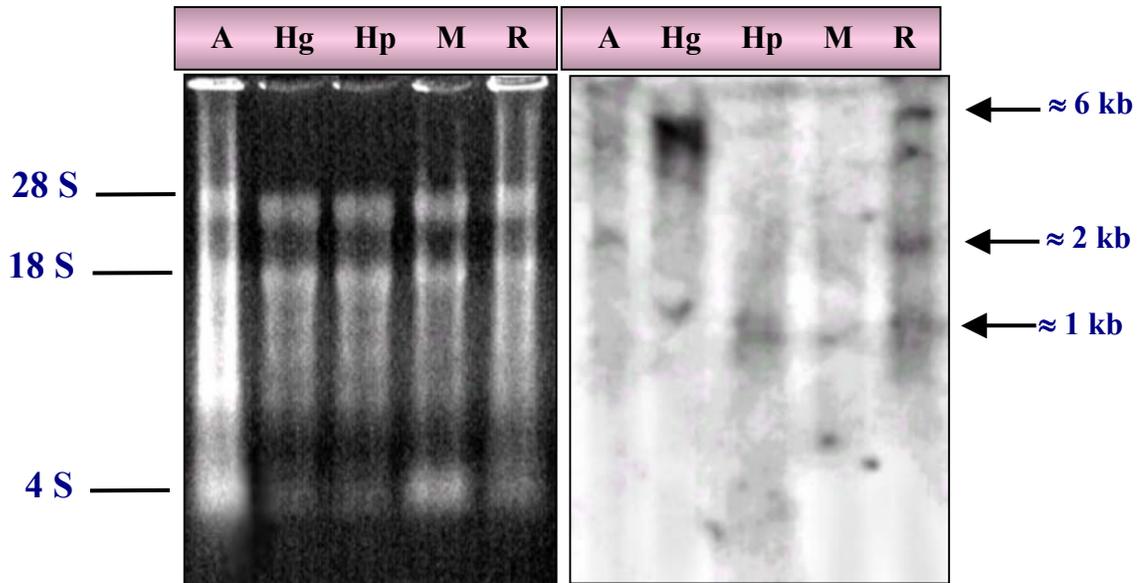


Figura 18: Análisis por Northern blot con un fragmento de 2200pb del pcGK423₂₂₀₀ de distintos tejidos de carpa.

(A) electroforesis en agarosa de RNA total de distintos tejidos.

Gel de agarosa al 1,5% para RNA en el cual se encuentran RNA total de los siguientes tejidos de carpa: (A) Agallas; (Hg) Hígado; (Hp) Hipófisis; (M) Músculo; (R) Riñón.

(B) Hibridación en Northern blot. Se utilizó como sonda específica un fragmento de 2200 pb amplificado por PCR a partir del subclon pcGK423₂₂₀₀. Las flechas indican los tamaños aproximados de los RNA mensajeros en riñón. La membrana se lavó hasta 0,1X SSC-0,1% SDS por 30 minutos a 55°C. Tiempo de exposición 1 semana.

5. DISCUSION

Calicreína glandular es miembro de una familia multigénica altamente conservada en todas las especies mamíferas hasta ahora caracterizadas, como son ratón (Swift, et.al., 1982; Mason et al., 1983; Evans et al., 1987; Drinkwater et al., 1987), rata (Ashley et al.,1985; Chen et al.,1988; Wines et al., 1989; Brady et al., 1989; Shai et al.,1989; Brady et al.,1990; Wines et al.,1991) y humano (Diamandis et.al., 2000). Todos estos antecedente nos llevaron a realizar como primera aproximación, un alineamiento múltiple de las secuencias génicas de calicreínas de especies mamíferas a partir de las cuales se dedujeron partidores específicos que pertenecen a regiones consenso, siendo todos los partidores 100% idénticos con la secuencia génica de calicreína de rata. Por lo tanto, estos partidores fueron utilizados para la fabricación de una sonda específica de 310pb, usando como templados cDNA de riñón de rata y cDNA de pituitaria de carpa tal como fue mostrado en la figura 2. El resultado obtenido en esta primera etapa nos permitió establecer como conclusión que se logró amplificar por PCR en pituitaria de carpa, un fragmento de tamaño semejante al obtenido a partir de cDNA de riñón de rata, el cual correspondería a una secuencia de algún tipo de calicreína en pituitaria de carpa. Este órgano es importante desde el punto de vista de la interrelación que existe con prolactina (PRL), cumpliendo así uno de los objetivos específicos de esta tesis cual era la de **generar una sonda específica de calicreína de carpa para ser utilizada en el rastreo de una biblioteca genómica de carpa**, teniendo como referencia que hasta el momento no existen secuencias de calicreínas para especies no mamíferas y que solamente se conoce algunas de las características de esta serina proteasa a nivel proteico en algunas especies no mamíferas (Richards et al. (1997a-b).

El rastreo de la biblioteca genómica de carpa en el vector lambda Fix II se realizó con la

sonda GK310. Los 19 clones obtenidos a partir del rastreo de 500.000 recombinantes, mostraron a lo largo del rastreo diferentes intensidades de hibridación con la sonda GK310.

De los 19 clones lambda obtenidos, para este trabajo se escogieron tres, λ cGK423, λ cGK814, λ cGK1012. El criterio de elección de estos clones fue la diversidad que poseía cada uno con respecto a la intensidad de hibridación con la sonda GK310 durante el transcurso del rastreo. Estas diferencias de intensidades de hibridación con la sonda GK310 como se ha señalado anteriormente se puede deber a distintas isoformas de la calicreína presentes en carpa. A nivel génico se podrían esperar múltiples clones porque calicreína pertenece a una familia multigénica. Además el pez *Cyprinus carpio* es una especie tetraploide (Schmidtke et al., 1976, Wolf et al. 1969), y podría acoger más copias de estos genes y tendría a lo menos en su genoma 4 copias del mismo gen.

Los análisis de Southern blot de los clones λ cGK423, λ cGK814, λ cGK423 observados en las figuras 3, 5 y 7 respectivamente, son comparativamente diferentes en los patrones de fraccionamiento de los productos de digestión con las enzimas utilizadas. Ciertamente esto nos indica que cada clon recombinante posee un inserto cuya secuencia génica de un gen putativo de calicreína de carpa sea diferente. Posiblemente también existan regiones similares en sus secuencias, dada porque la sonda reconoce a todos los clones en algún fragmento. Pero los fragmentos son de distinto tamaño y que además la secuencia nucleotídica de la sonda GK310 tenga una orientación y ubicación distinta dentro de cada uno de los clones lambda analizados. Antes de seleccionar los fragmentos de cada clon a subclonar, se realizó un análisis adicional efectuando un ensayo de digestiones dobles de cada clon lambda. Como se observó en las figuras 4, 6 y 8 para los clones λ cGK423, λ cGK814, λ cGK1012 respectivamente, en este ensayo se utilizaron diferentes combinaciones de enzimas de restricción. Si hacemos un análisis

comparativo de los Southern blot, los patrones de fraccionamiento de los productos de digestión de estos clones para cada combinación de enzimas de restricción utilizadas son diferentes para cada clon, otorgando hibridación bien definida de los fragmentos con la sonda GK310. Las diferencias de intensidades de hibridación con la sonda GK310 en los Southern blot para cada clon lambda, corroboran lo señalado con respecto a las intensidades de hibridación de estos clones durante el proceso del rastreo de la genoteca. Teniendo estos dos análisis se pudo realizar la selección de los fragmentos a subclonar (tabla 1). Los subclones obtenidos son: pcGK423₂₂₀₀ con un inserto cercano a 2200pb correspondiente al producto de la digestión con *Xba*I, pcGK1012₄₀₀₀ cuyo inserto es de aproximadamente 4000pb, correspondiente al producto de la digestión con *Eco*RI. Aún no se ha subclonado el fragmento de 3500pb correspondiente al producto de la digestión del clon λ cGK814 con la enzima *Eco*RI.

El subclon pcGK423₂₂₀₀ al ser sometido a digestiones simples y dobles, podríamos decir que la región del inserto de 2200pb que hibrida con la sonda está hacia el partidor T7 del vector pBluescript SK+ (figura 11). Los lavados realizados para estos Southern blot fueron realizados como se describió en material y métodos y en las respectivas figuras. Como se observó en las figuras 11 y 12, la intensidad de hibridación es mucho más fuerte comparativamente con la presentada por este mismo fragmento (\approx 2200pb) en las digestiones del correspondiente clon lambda, λ cGK423 que es moderada.

La secuencia genómica parcial del inserto de 2200pb del subclon pcGK423 otorgó como resultado un tamaño de 2259pb, la cual se sometió a un alineamiento múltiple con las secuencias nucleotídicas que se encuentran disponibles en las bases de datos Genbank. Este alineamiento arrojó como resultado que esta secuencia nucleotídica posee mayoritariamente una región de 956pb con 88% de identidad ininterrumpida con el cDNA de α -tubulina de *Oncorhynchus keta*

(Salmón chum). El cDNA de esta especie posee un tamaño de 1497pb, con lo que es significativamente importante el porcentaje de identidad que posee con la secuencia nucleotídica del subclon pcGK423₂₂₀₀, ya que éste tiene un tamaño de 2259pb. Dado los resultados obtenidos se podría decir que nuestra secuencia génica debería corresponder a un exón. Si bien es cierto que este resultado no corresponde al esperado para esta tesis, sí constituye un hecho importante desde el punto de vista genético de la carpa.

En relación con α -tubulina, podemos señalar que es un polipéptido que forma parte del heterodímero de tubulina. Tubulina es una subunidad proteica constitutiva de los microtúbulos. Los microtúbulos en las células eucarióticas juegan un rol principal en la morfología celular, división celular, cilios, flagelos y transporte axonal (Timasheff et al., 1980; Ginzburg et al., 1981; Sally et al., 1985). A diferencia de los microtúbulos citoplasmáticos de mamíferos, los microtúbulos citoplasmáticos en peces antárticos, son muy estables y muestran un movimiento lento a bajas temperaturas (Himes et al., 1989; Billger et al., 1994). Todos los genes de tubulina son probablemente derivados de una secuencia génica ancestral común. (Lemischka et al., 1982). Análisis de un gran número de genes de α y β tubulina en mamíferos usando secuencias de cDNA como sonda, han detectado 10 a 20 copias de cada uno por genoma (Cowan et al., 1981; Wilde et al., 1982a; Wilde et al., 1982b). Otras investigaciones han detectado múltiples copias de secuencias genómicas de α -tubulina en una variedad de especies mamífera y no mamíferas (Sánchez et al., 1980; Mischke et al., 1982).

Para saber la razón por la cual el subclon pcGK423₂₂₀₀ hibridó con la sonda GK310, se realizó un alineamiento con ambas secuencias. En la figura 15 se mostró la región de la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀, entre los nucleótidos 970 a 1327, en la cual la sonda pudo lograr unirse a la secuencia del subclon. La única explicación a esta forma de unirse que presentó la sonda

hacia esta secuencia es como se ha señalado, y a que no se fue tan estricto en las condiciones de lavado de los Southern blot dado que se usó una sonda heteróloga de mamíferos.

El análisis de la secuencia del subclon pcGK423₂₂₀₀, correspondiente a una secuencia genómica de carpa, nos otorgó como resultado un 88% de identidad con α -tubulina de Salmón chum (*O. keta*), indicando que podría pertenecer a un probable exón de este gen de α -tubulina. Es así como se dedujo su secuencia aminoacídica con los seis marcos de lecturas en la región en la cual mostró identidad con el cDNA de *O. keta*.

El resultado del alineamiento aminoacídico nos afirma la homología que existe entre esta secuencia genómica del subclon pcGK423₂₂₀₀ con una región de α -tubulina de Salmón chum, Salmón sockeye y de otras especies mamíferas como son en ratón, humano mostrada en la figura 19. La homología que presenta con α -tubulina de Salmón chum es de un 94%, al igual que con las otras especies mamíferas que poseen el mismo porcentaje de homología. El marco de lectura -2, correspondiente a la secuencia invertida fue la que presentó dicha homología. La homología a nivel aminoacídico es mayor a la presentada a nivel nucleotídico entre la secuencia génica del subclon pcGK423₂₂₀₀ con el cDNA de α -tubulina del salmón chum, esto debido a que el código genético es degenerado, significando que un aminoácido puede estar codificado por más de un codón, otorgando esta característica el tercer nucleótido del codón. Además, en la figura 19 se puede destacar que la región alineada de esta proteína, es muy conservada en todas las especies analizadas, inclusive carpa. Se puede decir entonces que esta región de la secuencia genómica corresponde a un posible exón de α -tubulina en carpa. Además, la información obtenida de la secuencia nucleotídica no presentó homología con regiones promotoras de la base de datos, faltando por conocer más secuencias génicas de α -tubulina de carpa, para realizar dichas comparaciones respecto a las posibles regiones promotoras de este gen de α -tubulina. La

secuencia promotora de α -tubulina de carpa debería estar en las regiones de los restantes fragmentos producto de la digestión con la enzima *Xba* I del clon λ cGK423 (figura 3), los cuales podrían ser subclonados y analizados. Cabe destacar que una de las homologías con α - tubulina de *O. keta* corresponde al isotipo específico de cerebro (Detrich et al., 2000) y el mismo porcentaje de homología es con el isotipo de $M\alpha 2$ de ratón (Lewis et al., 1985). Se observa en la figura 19 una región muy conservada desde el aminoácido 126 a 443 de la secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia nucleotídica del subclon pcGK423₂₂₀₀ con los distintos isotipos de α - tubulina entre las especies allí expuestas como ejemplo. Además entre las α - tubulina de estas especies también la misma región conservada. Por lo tanto, esto nos afirma que esta secuencia génica del clon pcGK423₂₂₀₀ podría corresponder a α - tubulina, ya que se corrobora lo señalado por Lemischka et al (1982) en relación a que todos los genes de tubulina son derivados de una secuencia ancestral común y que evolutivamente no ha cambiado en todas las especies tanto mamíferos como no mamíferos.

Como inicialmente se pensó que el subclon pcGK423₂₂₀₀ poseía un inserto que podría corresponder a un posible gen de calicreína, se fabricó una sonda homóloga de este inserto de 2200pb, experimentos de expresión en diferentes tejidos de la carpa. El Northern blot nos arrojó como resultado tres bandas bien definidas en riñón de carpa y fuerte señal radiactiva en hígado. Conjuntamente con el alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del subclon pcGK423₂₂₀₀ y este análisis del Northern blot, podría sugerir entonces que en riñón se expresan diferentes isotipos de α -tubulina. La banda cuyo tamaño aproximado es de 1Kb podría corresponder a un isotipo similar al de ratón, $M\alpha 2$ de 1,8Kb descrita por Lemischka et al., 1982, y que al igual que en nuestros experimentos, es expresada principalmente en riñón de carpa. En los otros tejidos también se observa señal radiactiva pero muy débil pero que sin embargo, igual

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
<i>pcGK423₂₂₀₀</i>	-----												0
<i>O. keta</i>	MHVGQAGVQ	MGNACWELYCLEHGI		QPDGQMPSDKTCGGG		DDSFNTFFSETGAGK		HVPRAIFVDLEPTVI		DEVRTGIYRQLFHPE			84
<i>M. musculus Ma2</i>	MRECISIHVGQAGVQ	IGNACWELYCLEHGI		QPDGQMPSDKTIGGG		DDSFNTFFSETGAGK		HVPRAVFDLEPTVI		DEVRTGTYRQLFHPE			90
<i>O. nerka</i>	MRECISVHVGQAGVQ	IGNACWELYCLEHGI		QPDGQMPSDKTIGGG		DDSFNTFFSETGAGK		HVPRAVFDLEPTVI		DEVRTGTYRQLFHPE			90
<i>H. sapiens</i>	MRECISIHVGQAGVQ	IGNACWELYCLEHGI		QPDGQMPSDKTIGGG		DDSFNTFFSETGAGK		HVPRAVFDLEPTVI		DEVRTGTYRQLFHPE			90
<i>M. musculus</i>	MRECISIHVGQAGVQ	IGNACWELYCLEHGI		QPDGQMPSDKTIGGG		DDSFNTFFSETGAGK		HVPRAVFDLEPTVV		DEVRTGTYRQLFHPE			90
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
<i>pcGK423₂₂₀₀</i>	-----												55
<i>O. keta</i>	QLITGKEDAANNYAR	GHYTIGKEIIDIVLD		RTRKLADQCTGLQGF		LIFHSFSGGTGSGFT		SLLMERLSVDYGKKS		KLEFAIYPAPQVSTA			174
<i>M. musculus Ma2</i>	QLITGKEDAANNYAR	GHYTIGKEIIDLVLD		RIRKLADQCTGLQGF		LVFHSFSGGTGSGFT		SLLMERLSVDYGKKS		KLEFSIYPAPQVSTA			180
<i>O. nerka</i>	QLITGKEDAANNYAR	GHYTIGKEIIDLVLD		RIRKLADQCTGLQGF		LVFHSFSGGTGSGFT		SLLMERLSVDYGKKS		KLEFSIYPAPQVSTA			180
<i>H. sapiens</i>	QLITGKEDAANNYAR	GHYTIGKEIIDLVLD		RIRKLADQCTGLQGF		LVFHSFSGGTGSGFT		SLLMERLSVDYGKKS		KLEFSIYPAPQVSTA			180
<i>M. musculus</i>	QLITGKEDAANNYAR	GHYTIGKEIVDLVLD		RIRKLADLCTGLQGF		LIFHSFSGGTGSGFA		SLLMERLSVDYGKKS		KLEFAIYPAPQVSTA			180
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
<i>pcGK423₂₂₀₀</i>	-----												145
<i>O. keta</i>	VVEPYNSILTHTTTL	EHSDFCAFMDNEAIY		DICRRNLDIRPTYT		NLNRLIGQIVSSITA		SLRFDGALNVDLTEF		QTNLVPYPRIHFPPLA			264
<i>M. musculus Ma2</i>	VVEPYNSILTHTTTL	EHSDFCAFMDNEAIY		DICRRNLDIRPSYT		NLNRLIGQIVSSITA		SLRFDGALNVDLTEF		QTNLVPYPRIHFPPLA			270
<i>O. nerka</i>	VVEPYNSILTHTTTL	EHSDFCAFMDNEAIY		DICRRNLDIRPTYT		NLNRLISQIVSSITA		SLRFDGALNVDLTEF		QTNLVPYPRIHFPPLA			270
<i>H. sapiens</i>	VVEPYNSILTHTTTL	EHSDFCAFMDNEAIY		DICRRNLDIRPTYT		NLNRLIGQIVSSITA		SLRFDGALNVDLTEF		QTNLVPYPRIHFPPLA			270
<i>M. musculus</i>	VVEPYNSILTHTTTL	EHSDFCAFMDNEAIY		DICRRNLDIRPTYT		NLNRLIGQIVSSITA		SLRFDGALNVDLTEF		QTNLVPYPRIHFPPLA			270
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
<i>pcGK423₂₂₀₀</i>	-----												235
<i>O. keta</i>	TYAPVISA EKAYHEQ	LSVAEITNACFEPAN		QMVKCDPRHGKYMAY		CLLYRGDVVPKDVNS		AIATIKTKRTIQFVD		WCPTGFKVGINYQPP			354
<i>M. musculus Ma2</i>	TYAPVISA EKAYHEQ	LSVADITNACFEPAN		QMVKCDPRHGKYMAY		CLLYRGDVVPKDVNS		AIAAIKTKRSIQFVD		WCPTGFKVGINYQPP			360
<i>O. nerka</i>	TYAPVISA EKAYHEQ	LSVAEITNACFEPAN		QMVKCDPRHGKYMAY		CLLYRGDVVPKDVNA		AIATIKTKRTIQFVD		WCPTGFKVGINYQPP			360
<i>H. sapiens</i>	TYAPVISA EKAYHEQ	LSVSEITNACFEPAN		QMVKCDPRHGKYMAY		CLLFRGDVVPKDVNA		AIATIKTKRSIQFVD		WCPTGFKVGINYQPP			360
<i>M. musculus</i>	TYAPVISA EKAYHEQ	LSVAEITNACFEPAN		QMVKCDPRHGKYMAY		CMLYRGDVVPKDVNA		AIATIKTKRTIQFVD		WCPTGFKVGINYQPP			360

	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
<i>pcGK423₂₂₀₀</i>	TVVPGGDLAKVQRAV	CMLSNTTAIAEAWAR	LDHKFDL	MYAKRAFV	HWYVGE	GMEEGEFSE	AREDMAALEKDYEEV	GTDSVGEE-----					318
<i>O. keta</i>	TVVPGGDLAKVQRAV	CMLSNTTAIAEAWAR	LDHKFDL	MYAKRAFV	HWYVGE	GMEEGEFSE	AREDMAALEKDYEEV	GTDSVGEEDDEEGEEY					444
<i>M. musculus Ma2</i>	TVVPGGDLAKVQRAV	CMLSNTTAIAEAWAR	LDHKFDL	MYAKRAFV	HWYVGE	GMEEGEFSE	AREDMAALEKDYEEV	GVDSVEGEGEEEGEE					450
<i>O. nerka</i>	TVVPGGDLAKVQRAV	CMLSNTTAVAEAWAR	LDHKFDL	MYAKRAFV	HWYVGE	GMEEGEFSE	AREDMAALEKDYEEV	GVDSIEGEGEEEGEE					450
<i>H. sapiens</i>	TVVPGGDLAKVQRAV	CMLSNTTAIAEAWAR	LDHKFDL	MYAKRAFV	HWYVGE	GMEEGEFSE	AREDMAALEKDYEEV	GVDSVEGEGEEEGEE					450
<i>M. musculus</i>	TVVPGGDLAKVQRAV	CMLSNTTAIAEAWAR	LDHKFDL	MYAKRAFV	HWYVGE	GMEEGEFSE	AREDLAALEKDYEEV	GVDSVEAEAEEGEEY					450
			451										
<i>pcGK423₂₂₀₀</i>	-		318										
<i>O. keta</i>	-		444										
<i>M. musculus Ma2</i>	Y		451										
<i>O. nerka</i>	Y		451										
<i>H. sapiens</i>	Y		451										
<i>M. musculus</i>	-		450										

Figura 19: Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de α -tubulina de distintas especies mamíferas y especies de peces. En la parte superior se observa la secuencia de carpa derivada del inserto de *pcGK423₂₂₀₀*, *Oncorhynchus keta*: salmón chum; *Mus musculus Ma2*: *Mus musculus Ma2* α -tubulina isotipo; *Oncorhynchus nerka*, salmón sockeye; *Homo sapiens*; *Mus musculus*: α -tubulina 3.

se visualizan bandas en la misma posición que las bandas observadas en riñón, siendo quizás que este gen putativo de α -tubulina corresponda a algún isotipo en particular y que se esté expresando en todos los tejidos en la carpa. Por el contrario, en hígado se observa una fuerte señal, tamaño que pareciera ser una sola banda, que como ya se ha señalado anteriormente para riñón, podría corresponder al mismo isotipo que se esté expresando en hígado.

Los resultados obtenidos de esta tesis son un aporte importante para el conocimiento del genoma de la carpa, ya que en este pez no se ha descrito hasta el momento el clonamiento, caracterización y secuenciación de tubulina, y más particularmente de α -tubulina. El análisis muestra claramente que esta secuencia génica del subclon pcGK423₂₀₀₀ corresponde a la región que codifica para esta proteína del citoesqueleto celular, por el alto grado de conservación que muestra su secuencia aminoacídica deducida con otras especies de peces y por sobre todo con especies mamíferas.

El hallazgo de esta secuencia génica de α -tubulina en carpa es importante, desde el punto de vista que puede ser utilizado como un “gen casero” o “constitutivo”. Esto quiere decir que puede ser usado como estándar en experimentos de Hibridación *in situ* o Northern blot. Muy probablemente en los 18 clones recombinantes lambda restantes se debería encontrar algún gen de calicreína glandular de carpa. Posiblemente algunos de los que mostraron una hibridación más intensa con la sonda podría corresponder a secuencias calicreína-like. Los dos clones lambda analizados y no secuenciados en esta tesis, podrían ser uno de los posibles genes de calicreína, sobre todo el clon, por sus características de hibridación fuerte con la sonda GK310. Durante el proceso del rastreo λ cGK814 presentó una hibridación muy fuerte con la sonda GK310 y que podría corresponder al gen de calicreína glandular de carpa, que se expresa en pituitaria o en otro tejido. Esta optimización en la estrategia de trabajo debería estar centrada en los métodos de

lavados de los Southern, siendo aún más estrictos en cuanto a temperatura y tiempos en los que se ejecutan. Si bien estos parámetros no fueron estricto en esta tesis, ya que no se sabe nada aún a cerca del gen de calicreína de carpa, con los antecedentes ya entregados en la presente investigación, se pueden realizar algunas modificaciones a los métodos utilizados para próximas investigaciones de este gen.

Luego de obtenidos todos estos resultados se puede decir entonces que la secuencia encontrada pertenecería a un gen putativo de α -tubulina y siendo éste un gen constitutivo su expresión debe presentarse en todos los tejidos de cualquier especie, que en este caso de la carpa, y así lo reafirma el resultado del Northern blot (figura 18) en el cual con diferentes intensidades radiactivas de los posibles mensajeros, que sugiere que si existe expresión en todos los tejidos del pez *Cyprinus carpio*. Por lo tanto podemos señalar que con esta tesis se ha otorgado una información importante para el genoma de la carpa, dado que si se continúa con la investigación del resto del inserto de λ cGK423, sería el primer gen completo de α -tubulina secuenciado en el pez *Cyprinus carpio*.

6. BIBLIOGRAFIA

- Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Stenman, G., Mok, S.C. and Sager, R. (1996) A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol. Med.* 2, 624-636.
- Ashley, P.L. and MacDonald, R.J. (1985) Kallikrein-related mRNAs of the rat submaxillary gland: nucleotide sequences of four distinct types including tonin. *Biochemistry* 24, 4512-4519.
- Avella, M., Schreck, C. and Prunet, P. (1991) Plasma prolactin and cortisol concentrations of stressed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in fresh water or salt water. *General and Comparative Endocrinology* 81: 21-27.
- Bern, H.A. (1983) Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. *American Zoologist* 23: 663-671.
- Bhoola, K.D., Figueroa, C.D. and Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacological Reviews* 44, 1-80.
- Billger, M., Wallin, M., Williams, R.C., Jr. and H.W. Detrich. (1994) Dynamic instability of microtubules from cold-living fishes. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 28, 327-332.
- Brady, J.M., Wines, D.R. and MacDonald, R.J. (1989) Expression of two kallikrein gene family members in the rat prostate. *Biochemistry* 28, 5203-5210.
- Brady, J.M. and MacDonald, R.J. (1990) The expression of two kallikrein gene family members in the rat kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 342-349.
- Brooks, C.L., Kim, B.G., Aphale, P., Kleeman, B.E. and Johnson, G.C. (1990) Phosphorylated variant of bovine prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 71, 117-123.
- Chao, J. and Margolius, H. (1983) Differential effects of testosterone, thyroxine and cortisol on rat submandibular gland versus renal kallikrein. *Endocrinology* 113, 2221-2225.

- Chao, J., Chao, L., Swain, C., Tsai, J. and Margolius, H. (1987) Tissue kallikrein in the rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology* 120, 475-482.
- Chen, Y., Chao, J., and Chao, L. (1988) Molecular cloning and characterization of two rat renal kallikrein genes. *Biochemistry* 27, 7189-7196.
- Clapp, C., Torner, L., Gutierrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gomez, F., Nogano, M., Kelly, P., Mejías, S., Morales, M. and Martínez, G. (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10384-10388.
- Clements, J.A., Fuller, P.J., McNally, M., Nikolaidis, I. and Funder, J.W. (1986) Estrogen regulation of kallikrein gene expression in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 119, 268-273.
- Clements, J., Matheson, B., Wines, D., Brady, J., MacDonald, R., and Funder, J. (1988). *J. Biol. Chem.* 263, 16132-16137
- Clements, J. (1989) The glandular family of enzymes: tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocrinology Rev*, 10, 393-419.
- Clements, J. (1997) The Molecular Biology of the Kallikreins and their roles in inflammation. In "The Kinin System" (Farmer, S., ed.), pp71-79, Academic Press.
- Clements, J.A. (1998) Current perspectives on the molecular biology of the renal tissue kallikrein gene and the related tissue kallikrein gene family. *Biological Research* 31, 151-159.
- Cowan, N.J., Wilde, C.D., Chow, L.T. and Wefald F.C. (1981) Structural variation among human beta-tubulin genes. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 78(8), 4877-4881.

- Diamandis, E., Yousef, G., Luo, L.Y., Magklara, A. and Obiezu, C. (2000) The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11, 54-60.
- Detrich, H.W., Parker, S.K., Robley, C., Williams, Jr., Nogales, E. and Downing, K.H. (2000) Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics: structural interpretation of primary sequence changes present in the α and β tubulins of antarctic fishes. *J. Biol. Chem.* 275, 37038- 37047.
- Drinkwater, C.C., Evans, B.A. and Richards, R.I. (1987) Mouse glandular kallikrein genes: identification and characterization of the genes encoding the epidermal growth factor binding proteins. *Biochemistry* 26, 6750-6756.
- Evans, B.A., Drinkwater, C.C., and Richards, R.I. (1987) Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. *J. Biol. Chem.*, 262, 8027-8034.
- Ferris, S.D. and Whitt, G.S. (1977) Duplicate gene expression in diploid and tetraploid loaches (Cypriniformes, Cobitidae). *Biochem. Genet.* 15, 1097-1112.
- Figueroa, J., Molina, A., Álvarez, J., Villanueva, J., Reyes, A., León, G. and Krauskopf, M. (1994) Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary level during the seasonal acclimatization of the carp. *Comparative and Biochemical Physiology* 108, 551-560.
- Figueroa, J., Reyes, A., Rios, M., Vera, M.I. and Krauskopf, M. (1997) Effect of temperature and photoperiod on prolactin transcription in *Cyprinus carpio*. *Zoological Science* 14, 353-357.
- Figueroa, J., Kausel, G., Vera, M.I., San Martín, R., Molina, A., Müller, M., Martial, J. and Krauskopf, M. (1999) Transcription factor pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: identification of two pit-1 genes in the carp. *J. Cell. Biochem.* 75, 598-609.

- Figuroa, J., Fernández, K., Hausmann, D., Richards, G., Barra, V., and Kausel, G. (2002) Glandular kallikreins in the teleost *Cyprinus carpio*: tissue distribution, possible involvement in prolactin processing, and effect of 17 β -estradiol in vivo. *General and Comparative Endocrinology* 128, 135-142.
- Fuller, P.J, Clements, J.A., Whitfeld, P.L. and Funder, J.W. (1985) Kallikrein gene expression in the rat anterior pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 39, 99.
- Fuller, P., and Funder, J. (1986) The cellular physiology of glandular kallikrein. *Kidney Int.* 29, 953-964.
- Ginzburg, I., Behar, L., Givol, D., and Littauer, U. (1981) The nucleotide sequence of rat α -tubulin: 3' end characteristics and evolutionary conservation. *Nuc. Acids Res.* 9, 2691-2697.
- Goyal, J., Smith, K.M., Cowan, J.M., Wazer, D.E., Lee, S.W. and Band, V. (1998) The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res.* 58, 4782 - 4786.
- Hall, J., Dudley, P., Lewis, S. and Cowan, N. (1983) Identification of two human β -tubulin isotypes. *Mol. Cell. Biol.* 3, 854-862.
- Harvey, T., Hooper, J., Myers, S., Stephenson, S.A., Ashworth, L. and Clements, J. (2000) Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J. Biol. Chem.* 275, 37397-37406.
- Havercroft, J. and Cleveland, D. (1984) Programmed expression of β -tubulin genes during development and differentiation of the chicken. *J. Cell. Biol.* 99, 1927-1935.
- Hatala, M. and Powers, C. (1989) Biochemical Investigation of the subcellular localization of the estrogen-induced pro-glandular kallikrein in the rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 49, 537-544.

- Himes, R. and Detrich, H.W. (1989) Dynamics of Antarctic fish microtubules at low temperatures. *Biochemistry* 28, 5089-5095.
- Hirano, T. (1986) The spectrum of prolactin action in teleosts. In *Comparative Endocrinology Developments and Directions*, pp 53-74. Eds CL Ralph & AR Liss. N.Y.
- Jones, T., Figueroa, C.D., Smith, C., Cullen, D.R. and Bhoola, K.D. (1990) Characterization of a tissue kallikrein in human prolactin-secreting adenomas. *J. Endocrinol.* 124,327-331.
- Kausel, G., Vera, M.I., Figueroa, J., Hernandez, J., San Martin, R., Molina, A., Chavez, V.M., Muller, M., Martial, J. and Krauskopf, M. (1998) Effect of seasonal acclimatization on the expression of the carp transcription factor Pit-1. *Biochemistry and Molecular Biology International* 45: 813-821.
- Kausel, G., Vera, M.I., San Martin, R., Figueroa, J., Molina, A., Muller, M., Martial, J. and Krauskopf, M. (1999) Transcription factor Pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: identification of two Pit-1 genes in the carp. *Journal of Cellular Biochemistry* 75:598-609.
- Krauskopf, M., Amthauer, R., Araya, A., Concha, M., León, G., Ríos, L., Vera, M.I. and Villanueva, J. (1988) Temperature acclimatization of the carp. Cellular and molecular aspects of the compensatory response. *Archives of Biological and Medical Experiments* 21: 151-157.
- Leipoldt, M. and Kellner, M. (1984) Ribosomal RNA structure in the diploid and phylogenetically polyploid amphibian species *Hyla* and *Odontophrynus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 79, 181-185.
- Lemischka, I. and Sharp, P. (1982) The sequence of an expressed rat α -tubulin gene a pseudogene with an inserted repetitive element. *Nature* 300, 330-335.
- Lewis, S., Gilmartin, M., Hall, J. and Cowan, N. (1985) Three expressed sequences within the human β -tubulin multigene family each define a distinct isotype. *J. Mol. Biol.* 182, 11-20.

- Lin, F.K., Lin, C., Chou, C.C., Chen, K., Lu, H.S., Bacheller, W., Herrera, C., Jones, T., Chao, J. and Chao, L. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the monkey and human tissue kallikrein genes. *Biochem. Biophys. Acta* 1173, 325-328.
- Lipke, D., Olson, K., Datta Munshi, J., Moitra, A., Ghosh, T., Kunwar, G., Ahmad, M., Roy, P., Singh, O. and Nasar, S. (1987) Angiotensin-converting enzyme in organs of air-breathing fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 486-491.
- Lipke, D. and Olson, K. (1990) Enzymes of the kallikrein-kinin system in rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 27, R501-R506; R507-R514.
- Little, S., Dixon, E., Norris, F., Buckley, W., Becker, G., Johnson, M., Dobbins, J., Wyrick, T., Miller, J., MacKellar, W., Hepburn, D., Corvalan, J., McClure, D., Liu, X., Stephenson, D., Clemens, J. and Johnstone, E. (1997) Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 272, 25135 - 25142.
- Liu, H.S., Hsu, Y.R., Narhi, L.O., Karkare, S. and Lin, F.K. (1996) Purification and characterization of human tissue prokallikrein and kallikrein isoforms expressed Chinese hamster ovary cells. *Protein Exp. Purific.* 8, 227-237.
- Manfioletti, G., and Schnaider, C. (1988). A new and fast method for the preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. *Nucleic Acid Research* 16, 2873-2884.
- Mason, G., Bissette, G. and Nemeroff, C. (1983) Effects of excitotoxic amino acids on pituitary hormone secretion in the rat. *Brain Res.* 289, 366-369.
- Mischke, D. and Pardue, M. (1982) Organization and expression of alpha-tubulin genes in *Drosophila melanogaster*. One member of the alpha-tubulin multigene family is transcribed in both oogenesis and later embryonic development. *J. Mol. Biol.* 156, 449-466.

- Murray, S., Chao, J., Lin, F. and Chao, L. (1990) Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 (suppl), S7-S15.
- Neff, N., Thomas, J., Grisafi, P. and Botstein, D. (1983) Isolation of the β -tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function *in vivo*. *Cell.* 33, 211-219.
- Nicoll, C. (1981) Role of prolactin in water electrolyte balance in vertebrates. In *Prolactin*, pp 127-166. Ed RB Jaffer. New York: Elsevier.
- Oetting, W. and Walker, A. (1985) Intracellular processing of prolactin. *Endocrinology* 117, 1565-1570.
- Oetting, W. and Walker, A. (1986) Differential isoform distribution between stored and secreted prolactin. *Endocrinology* 119, 1377-1381.
- Poncelet, A.C., Yaron, Z., Levavi-Sivan, B., Martial, J.A. and Muller, M. (1997) Regulation of prolactin gene expression in fishes. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology*, pp383-405. Eds R Nagabhushanan, MF Thompson & M Fingerman. New Delhi, Oxford.
- Powers, C. and Hatala, M. (1990) Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: *In vitro* reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin *in vitro*. *Endocrinology* 127, 1916-1927.
- Powers, C. (1993) Anterior pituitary glandular kallikrein: a putative prolactin processing protease. *Molecular and Cellular Endocrinology* 90, C15-C20.
- Printchett D. and Roberts, J. (1987) Dopamine regulates expression of the glandular-type kallikrein gene at the transcriptional level in the pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5545-5549.
- Riegman, P., Vlietstra, R., Van Der Korput, H., Brinkman, A., and Trapman, J. (1989) Identification and androgen-regulated expression of two major human glandular kallikrein 1 mRNA species. *Mol. Cell. Endocrinology* 76, 181-190.

- Richards, G. P., Liang, Y., Chao, J. and Chao, L. (1997a) Purification, characterization and activation of fish muscle prokallikrein. *Comparative and Biochemical Physiology* 118C, 39-48.
- Richards, G.P., Chao, L. and Chao, J. (1997b) Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comparative and Biochemical Physiology* 118C, 49-58.
- Rittenhouse, H., Finlay, J., Mikolajczyk, S. and Partin, A. (1998) Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikrein in the prostate. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 36, 275-368.
- Sally, L., Gwo-Shu Lee, M. and Cowan, N. (1985) Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *J. Cell. Biol.* 101, 852-861.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2^o. Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez, F., Natzle, J., Cleveland, D., Kirschner, M. and McCarthy, B. (1980) A dispersed multigene family encoding tubulin in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 22, 845-854.
- Schedlich, L., Bennetts, B. and Morris, B. (1987) Primary structure of a human glandular kallikrein gene. *DNA* 6, 429-437.
- Schmidtke, J., Schulte, B., Kuhl, P. and Engel, W. (1976) Gene action in fish of tetraploid origin. V. cellular RNA and protein content and enzyme activities in Cyprinid, Clupeoid, and Salmonid species. *Biochemical Genetics* 11-12.
- Shai, S., Woodley-Miller, C., Chao, J. and Chao, L. (1989) Characterization of genes encoding rat tonin and a kallikrein-like serine protease. *Biochemistry* 28, 5334-5343.
- Shimojo, N., Chao, J., Chao, L., Margolius, H. and Mayfield, R. (1987) Identification and characterization of tissue kallikrein in rat skeletal muscle. *Biochemical Journal* 243, 773-778.

- Sinha, Y., Gilligan, T., Lee, D., Hollingsworth, D. and Markoff, E. (1985) Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60, 239 - 243.
- Southard- Smith, M., Pierce, J., MacDonald (1994) Physical mapping of the rat tissue kallikrein family in two gene clusters by analysis of PI bacteriophage clones. *Genomics* 22, 404-417.
- Southern, E.M. (1975) Deletion of Specific sequences among DNA fragments by gel electroforesis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Swift G., Crain, C., Stary S., Quinto, C., Lahaie, R., Rutter, W., and MacDonald, R. (1982) Structure of the two related elastase genes expressed in the rat pancreas. *J. Biol. Chem.* 259, 14271-14278.
- Timasheff, S. and Na, G. (1980) Thermodynamic linkage between tubulin self-association and the binding of vinblastine. *Biochemistry* 19, 1355-1365.
- Velarde, V., Christopher, J., Mayfield, R. and Jaffa, A. (2001) Regulation of B₂ – kinin receptor by glucose in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H1537-H1546.
- Vera, M.I., Norambuena, L., Alvarez, M., Figueroa, J., Molina, A., Leon, G. and Krauskopf, M. (1993) Reprogramming of nucleolar gene expression during the acclimatization of the carp. *Cellular and Molecular Biology Research* 39: 167-174.
- Vera, M.I., Kausel, G., Barrera, R., Leal, S., Figueroa, J. and Quezada, C. (2000) Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2 β subunit gene in the carp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271: 735-740.
- Vío, C.P., Roa, J., Silva, R. and Powers, C. (1990) Localization of immunoreactive glandular kallikrein in lactotrophs of the rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 51, 10-14.

- Wilde, C., Crowther, C. and Cowan, N. (1982a) Diverse mechanisms in the generation of human beta-tubulin pseudogenes. *Science* 217, 549.
- Wilde, C., Crowther, C., Cripe, T., Gwo-Shu Lee, M. and Cowan, N. (1982b) Evidence that a human beta-tubulin pseudogene is derived from its corresponding mRNA. *Nature* 297, 83-84.
- Wines, D., Brady, J., Pritchett, D., Roberts, J. and MacDonald, R. (1989) Organization and expression of the rat kallikrein gene family. *J. Biol. Chem.* 264, 7653-7662.
- Wines, D.R., Brady J., Southard, E.M., and MacDonald, R.J. (1991) Evolution of the rat kallikrein gene family : gene conversion leads to functional diversity. *J. Mol. Evol.* 32, 476-492.
- Wolf, U., Ritter, H., Atkin, N. and Ohno, S. (1969) Polyploidization in the fish family Cyprinidae, order Cypriniforme. I DNA content and chromosome sets in various species of Cyprinidae. *Humangenetik* 7, 240-244.
- Yousef, M., Eleftherios, P. and Diamandis, E. (1999) The New Kallikrein-like Gene, *KLK-L2*. Molecular characterization, mapping, tissue expression, and hormonal regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 37511 - 37516.
- Yousef, G. and Diamandis, E. (2001) The new human tissue Kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrinology Reviews* 22, 184-204.