



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Milton H. Gallardo

Instituto de Ecología y Evolución

Facultad de Ciencias

Profesor Copatrocinante

Dra. Gudrun Kausel

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL GEN P53 Y
ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES DE
Tympanoctomys barrerae (Rodentia, Octodontidae)**

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

ANNETTE MALEEN FAHRENKROG HASHAGEN

VALDIVIA – CHILE

2007

A mi madre, por su amor, fortaleza y ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis profesores patrocinantes, Milton Gallardo y Gudrun Kausel, por guiarme y ayudarme durante el trabajo de tesis. Además, agradezco a mis compañeros de laboratorio por la ayuda y por amenizar las horas de trabajo, refiriéndome tanto a los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular del Instituto de Ecología y Evolución como a los del Laboratorio de Biología Molecular de Peces del Instituto de Bioquímica. También agradezco al grupo de investigación del Dr. Thomas Dobner del Instituto de Microbiología e Higiene, Universidad de Regensburg, Alemania, por acogerme tan cálidamente y apoyarme en la realización de gran parte de este trabajo.

De todo corazón agradezco también a mi familia, que le da fortaleza y estabilidad a mi vida. A mis hermanas por su amistad y a mis padres por su amor, confianza y por entregarme las herramientas para desenvolverme en la vida. Y a Fito por su amor y apoyo incondicional.

Finalmente, cómo no agradecer a mis amigas Susi, Dani, María Clara, Annesi y Jocelyn, personas muy importantes en mi vida universitaria y con quienes compartí muchos momentos de alegría.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto Fondecyt 1010727 y la beca Pasantías en Centros Internacionales de Alta Tecnología C-13940 de la Fundación Andes.

ÍNDICE

1. Resumen	1
Summary	2
2. Introducción	3
3. Materiales y Métodos	9
3.1. Materiales	9
3.1.1. Material Biológico	9
3.1.2. Enzimas	9
3.1.3. Reactivos y otros	10
3.2. Métodos	11
3.2.1. Amplificación de una secuencia específica del gen <i>p53</i> por reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	11
3.2.2. Preparación de DNA plasmidial a pequeña escala	12
3.2.3. Cuantificación de DNA	14
3.2.4. Fraccionamiento de DNA por electroforesis en geles de agarosa	14
3.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción	15
3.2.6. Extracción de DNA desde geles de agarosa	15
3.2.7. Marcaje de DNA con ³² P	16
3.2.8. Determinación de la eficiencia de marcaje radiactivo	16
3.2.9. Preparación de células para sembrar fagos	17
3.2.10. Titulación de un stock de fago lambda	17
3.2.11. Preparación de un stock de bacteriófago lambda	18
3.2.12. Rastreo de biblioteca genómica	18

3.2.13. Preparación de DNA de bacteriófago lambda	20
3.2.14. Análisis por Southern blot	22
3.2.15. Clonación de un fragmento de DNA en un vector plasmidial	23
3.2.15.1. Preparación de células competentes	23
3.2.15.2. Ligación de un fragmento de DNA a un vector plasmidial	23
3.2.15.3. Transformación de células competentes	24
3.2.16. Cultivo primario de células eucarióticas	25
3.2.17. Transfección de células eucarióticas	26
3.2.17.1. Transfección mediante fosfato de calcio	26
3.2.17.2. Transfección mediante lipofectamina	27
3.2.17.3. Transfección mediante DMRIE-C	27
3.2.18. Obtención de líneas celulares mono- y policlonales	28
3.2.19. Determinación de la curva de crecimiento de células eucarióticas	28
3.2.20. Inmunodetección de proteínas en células eucarióticas por inmunofluorescencia y por análisis de Western blot	29
3.2.20.1. Inmunofluorescencia	29
3.2.20.2. Preparación de un extracto de proteínas totales	30
3.2.20.3. Fraccionamiento electroforético de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS	30
3.2.20.4. Transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección	31
3.2.21. Preparación de cromosomas metafásicos a partir de células de cultivo	31
4. Resultados	33
4.1. Preparación de la sonda para el rastreo del gen <i>p53</i> en la biblioteca genómica de <i>Tympanoctomys barrerae</i>	33

4.2. Rastreo de la biblioteca genómica de <i>Tympanoctomys barrerae</i>	39
4.3. Caracterización de los recombinantes λ typ53	41
4.3.1. Caracterización de los recombinantes λ typ53 por PCR	41
4.3.2. Determinación del tamaño del inserto en los clones λ typ53	43
4.3.3. Caracterización de los clones λ typ53 realizando digestiones con enzimas de restricción	43
4.3.4. Clonación y secuenciación de un fragmento del clon λ typ53-1.1 obtenido por digestión doble con las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>SacI</i>	48
4.3.5. Construcción de un mapa físico parcial de los clones λ typ53 por análisis de Southern blot	50
4.4. Obtención de líneas celulares estables de <i>Tympanoctomys barrerae</i>	55
4.4.1. Cultivo primario	55
4.4.2. Transformación de células eucarióticas	55
4.4.3. Caracterización de las líneas celulares obtenidas	60
4.4.3.1. Construcción de curvas de crecimiento	60
4.4.3.2. Evaluación de la resistencia de células TBL a NaCl	63
4.4.3.3. Detección de proteínas adenovirales y p53 por inmunofluorescencia y análisis de Western blot	65
4.4.3.4. Documentación de la morfología celular	71
4.5. Obtención de placas metafásicas de células de cultivo	73
5. Discusión	75
6. Bibliografía	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema que describe algunas de las funciones de p53 en respuesta a estrés celular.	4
Figura 2: Representación esquemática del fragmento del gen <i>p53</i> utilizado como sonda para rastrear la biblioteca genómica de <i>T. barrerae</i> .	34
Figura 3: Alineamiento de la secuencia nucleotídica (514 pb) del gen <i>p53</i> amplificado en <i>T. barrerae</i> con la secuencia AF367373 de <i>M. musculus</i> .	35
Figura 4: Purificación del fragmento (554 pb) del gen <i>p53</i> .	38
Figura 5: Rastreo de la biblioteca genómica de <i>T. barrerae</i> .	40
Figura 6: Confirmación por PCR de la presencia del gen <i>p53</i> en los clones λ typ53.	42
Figura 7: Determinación del tamaño del inserto de los clones λ typ53.	44
Figura 8: Curva de calibración para el cálculo del tamaño del inserto de los clones λ typ53.	45
Figura 9: Análisis de los recombinantes λ typ53 por digestión con enzimas de restricción.	46
Figura 10: Caracterización de los subclones ptyp53.	49
Figura 11: Análisis por Southern Blot del recombinante λ typ53-3.1.	51
Figura 12: Análisis por Southern blot con la sonda $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53 ₁₆₀₀ de digestiones del DNA λ typ53-3.1 con enzimas de restricción.	53
Figura 13: Mapa físico parcial de los clones recombinantes λ typ53.	54
Figura 14: Curva de crecimiento de células TBL.	61
Figura 15: Curva de crecimiento de las células TBL1-4 y TBL1-7.	62
Figura 16: Evaluación de la resistencia de las células TBL a NaCl.	64

Figura 17: Detección de la proteína adenoviral E1A en la línea celular TBL1-7 utilizando inmunofluorescencia.	66
Figura 18: Detección de las proteínas adenovirales E1A y E1B en la línea celular TBL1-4 utilizando inmunofluorescencia.	67
Figura 19: Detección de la proteína adenoviral E1B y de p53 en la línea celular TBL1-4 utilizando inmunofluorescencia.	68
Figura 20: Detección de las proteínas adenovirales E1A y E1B en las líneas celulares TBL, TBL1-4 Y TBL1-7 por Western blot.	69
Figura 21: Detección de p53 en las líneas celulares TBL, TBL1-4 y TBL1-7 por Western blot.	70
Figura 22: Documentación de la morfología de las células TBL (A), TBL1-7 (B) y TBL1-4 (C).	72
Figura 23: Placa metafásica obtenida de células de cultivo primario de <i>T. barrerae</i> .	74
Figura 24: Participación de p53 en la regulación del ciclo celular.	78
Figura 25: Participación de las proteínas adenovirales E1A y E1B en los procesos de inmortalización y transformación celular.	85
Figura 26: Detección del número de centrosomas presentes en las células de <i>T. barrerae</i> .	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tamaño de los fragmentos obtenidos digiriendo el DNA del clon λ typ53-3.1 con enzimas de restricción.	47
Tabla 2: DNA plasmidial utilizado para diferentes ensayos de transfección.	56
Tabla 3: Genes transfectados y líneas celulares obtenidas para cada transfección del primer ensayo.	57
Tabla 4: Genes transfectados y líneas celulares obtenidas para cada transfección del segundo ensayo.	59

ABREVIATURAS

aá:	aminoácido
ATP:	adenosín trifosfato
BES:	ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminosulfónico
BRK:	células “Baby Rat Kidney”
BSA:	albúmina de suero bovino
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
D-MEM:	“Dublecco’s modified Eagle’s medium”
DMSO:	dimetilsulfóxido
DNAsa:	desoxirribonucleasa
dCTP:	desoxicitidina trifosfato
dNTP:	desoxirribinucleótido trifosfato
EDTA:	ácido etilén-diamino-tetraacético
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
G ₁ :	“Gap” 1 en el ciclo celular
G ₂ :	“Gap” 2 en el ciclo celular
GFP:	proteína fluorescente verde
IgG:	inmunoglobulina G
IPTG:	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB:	medio Luria-Bertani
LBTA:	LB top agar
mRNA:	RNA mensajero
OD:	densidad óptica
PBS:	buffer fosfato salino

PCR:	reacción de la polimerasa en cadena (Polimerase Chain Reaction)
PEG:	polietilenglicol
pfu:	unidades formadoras de placas de lisis
PMSF:	“phenylmethsulphonyl fluoride”
POPOP:	1,4-bis[2-(5-phenoxiloxazolil)]-benceno
PPO:	2,5-difeniloxazol
RNAasa:	ribonucleasa
SBF:	suero bovino fetal
SDS:	dodecilsulfato de sodio
TBL:	células “ <i>Tympanoctomys barrerae</i> -lung” (pulmón)
TCA:	ácido tricloroacético
TAE:	tris-acetato-EDTA
TE:	tris-EDTA
TR:	texas red
U:	unidades enzimáticas
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

1. RESUMEN

El reciente descubrimiento del primer mamífero tetraploide, el roedor *Tympanoctomys barrerae*, plantea una serie de interrogantes con respecto a su dinámica genómica y a su fisiología. Por este motivo se decidió caracterizar parcialmente el gen que codifica para la proteína p53, muy importante en la regulación del ciclo celular, reparación del DNA y mantención de la estabilidad genómica. Estos procesos se ven alterados en las especies poliploides vegetales, por lo que se infiere que p53 ha sufrido alteraciones similares en este animal poliploide.

Para lograr el objetivo planteado anteriormente se aisló tres clones de una biblioteca genómica de *T. barrerae* construida en fago lambda, que presumiblemente contienen el gen *p53* completo. Estos clones permitirán realizar análisis de secuencia comparándola con otras especies y experimentos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para caracterizar al gen y determinar cuántas copias de él se han mantenido en el genoma después del evento de duplicación.

Dado que *T. barrerae* habita en salares y se alimenta de plantas con altas concentraciones de sal, se decidió analizar si sus células tienen una mayor resistencia a NaCl que células control. Para probar esta hipótesis se establecieron líneas celulares y se realizaron experimentos *in vitro*, comprobándose que efectivamente las células de este roedor toleran altas concentraciones de NaCl. Las líneas celulares obtenidas durante el presente trabajo constituyen además una herramienta valiosa para futuros estudios moleculares, fisiológicos y genéticos, los que proporcionarán mayor información sobre la adecuación orgánica de este roedor imposible.

SUMMARY

The recent discovery of the first tetraploid mammal, the rodent *Tympanoctomys barrerae*, has opened several lines of research in connection with its genome dynamics and physiology. For this reason, we partially characterized the p53 gene, which is very important in cell cycle regulation, DNA repair, and maintenance of genomic stability. Since these processes are altered in plant polyploid species, we assume that p53's function is also altered in a polyploid animal.

To characterize the p53 gene three clones from a genomic library from *T. barrerae* constructed in a lambda vector, possibly containing the complete gene, were isolated. These clones will allow a comparison of the p53 sequence with other species. It will also allow performing fluorescent *in situ* hybridization (FISH) experiments in order to determine the copy number in the species genome after the duplication event.

We decided to determine if *T. barrerae*'s cells are more resistant to NaCl than control cells because the animal lives in salt flats and its diet is based on plants with a high salt content. Cell lines were established to check this hypothesis, and *in vitro* experiments indicated that these cells effectively tolerate higher NaCl concentrations than control cells. The established cell lines will be also a useful tool for future molecular, functional and cytogenetic studies, which will provide further information about the organismal homeostasis of this impossible rodent.

2. INTRODUCCIÓN

Uno de los avances más relevantes alcanzados por la biología molecular en los últimos años es el descubrimiento de un sistema que rápidamente destruye células dañadas y potencialmente peligrosas para el organismo (Chumakov, 2000). Este sistema monitorea diversos tipos de daño, así como estados de estrés que puedan producir cambios genéticos, produciendo la detención del ciclo celular para reparar los errores o la muerte celular, ya sea por apoptosis (muerte celular programada) o por senescencia y muerte necrótica (Brooks y Gu, 2003). El componente central de este sistema es p53, proteína multifuncional que actúa en el núcleo, en la que convergen numerosas señales de emergencia (Fig. 1) (Ljungman, 2000).

El gen *p53* en humanos se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3) y abarca 16 a 20 kb de DNA. Tiene 11 exones que codifican para un mRNA de 2.2 – 2.5 kb y para una proteína de 393 aminoácidos de aproximadamente 53 kDa. La proteína se divide en tres dominios: el aminoterminal (aá 1–70) de activación de la transcripción junto a una región rica en prolinas, el central (aá 100-300) de unión a secuencias específicas de DNA y el carboxilterminal (aá 300-325) multifuncional donde se encuentran la señal de localización nuclear y el dominio de oligomerización (Cetin-Atalay y Ozturk, 2000; Gómez-Lázaro y col, 2004; Baroni y col, 2004; Coutts y La Thangue, 2005). Para actuar como factor de transcripción, p53 forma un homotetrámero que reconoce y se une a secuencias de DNA específicas (Michalak y col, 2005).

En *Mus musculus* el gen *p53* es muy conservado y se ubica en el cromosoma 11 (Tanooka y col, 2001). Existe además un pseudogen ubicado en el cromosoma 14, producto de la transcripción reversa de un mRNA del gen funcional. Por verse liberado de la selección restrictiva, éste ha ido acumulando un alto número de mutaciones (Tanooka y col, 2001).

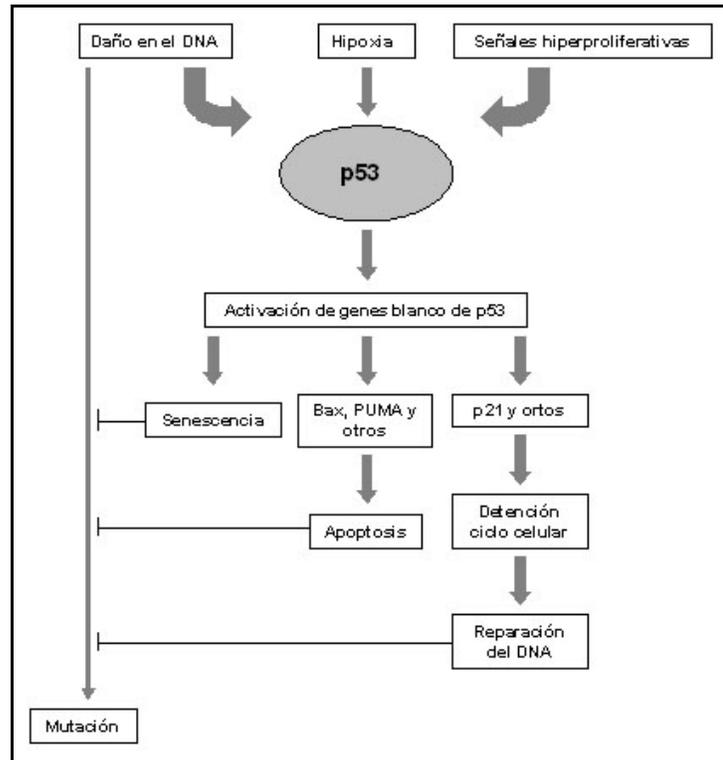


Figura 1: Esquema que describe algunas de las funciones de p53 en respuesta a estrés celular. La proteína p53, activada por señales de alerta, activa a su vez la expresión de genes blanco. Estos desencadenan procesos tales como senescencia, apoptosis, detención del ciclo celular y reparación del DNA, lo que evita la proliferación de células dañadas (adaptado de Attardi y DePinho, 2004; Lane y Fisher, 2004; Ljungman, 2000).

Debido a su gran importancia y a su relación con el cáncer, la proteína p53 fue elegida “molécula del año” por la revista *Science* en 1993 (Soussi, 2003). Desde ese año, su relevancia ha sido enfatizada por el descubrimiento de mutaciones de p53 en más de un 50% de todos los tumores humanos (Brooks y Gu, 2003; Baroni y col, 2004).

La proteína p53 pertenece a una familia de factores de transcripción que incluye también a p73 y p63 (Gómez-Lázaro y col, 2004; Watson e Irwin, 2006). Los tres comparten una homología de secuencia pero difieren en el número de exones, funciones, regulación y distribución en los tejidos (Gómez-Lázaro y col, 2004). *p53* es un gen de copia única pero codifica para diferentes isoformas de la proteína como resultado de empalme alternativo, utilización de promotores alternativos e inicios de la traducción alternativos (Ghosh y col, 2004; Watson e Irwin, 2006).

También se le han atribuido funciones de represor de la transcripción, inhibidor de la traducción de algunos mRNAs, actividad 3'-5'-exonucleasa y capacidad de unión directa a DNA de hebra simple y bases desapareadas. Estas funciones sugieren que p53 participa en procesos de reconocimiento y reparación inmediata de daños en el DNA (Chumakov, 2000; Ljungman, 2000).

El gen *p53* es transcrito y traducido continuamente, pero la proteína es sometida rápidamente a ubiquitinación por la proteína Mdm2 y a degradación en el proteosoma (Brooks y Gu, 2003; Watson e Irwin, 2006), por lo que la concentración intracelular de p53 es baja (Ljungman, 2000). Cuando está presente en cantidades más elevadas corresponde a una forma incapaz de activar la transcripción de sus genes blanco, pero que participa en la reparación del DNA (Brooks y Gu, 2003; Chumakov, 2000). La activación de p53 en respuesta a estrés y daño es principalmente postraducciona, lo que hace aumentar su nivel intracelular al disminuir su degradación y produce cambios conformacionales que aumentan su actividad (Chumakov, 2000;

Gómez-Lázaro y col, 2004). El gran número de modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína, además de relocalización subcelular y subnuclear, permite una fina regulación de la actividad de p53 (Brooks y Gu, 2003; Kohn y Pommier, 2005). En su conformación inactiva, p53 es de localización difusa y principalmente citoplasmática. Sólo cuando se activa o estabiliza se trasloca al núcleo (Gómez-Lázaro y col, 2004). p53 también actúa en la mitocondria produciendo apoptosis por liberación de citocromo c al citoplasma (Erster y Moll, 2005) e induciendo la activación de la respiración aeróbica (Matoba y col, 2006). En los tumores, las células obtienen energía principalmente de la vía glicolítica ya que tienen parcialmente inactivada la respiración aeróbica. Por lo tanto, la regulación de la respiración celular por parte de p53 define un mecanismo genético, independiente del ciclo celular, por el cual la inactivación de p53 promovería el desarrollo de cáncer (Matoba y col, 2006; Green y Chipuk, 2006; McBride y col, 2006).

Una de las principales proteínas blanco de p53 es p21, un poderoso inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas, responsable de detener el ciclo celular en respuesta a una sobreexpresión de p53 y de daño al DNA (Chumakov, 2000; Wong y Stearns, 2005). Las células somáticas de mamífero tienen varios puntos de control de daño al DNA, siendo los principales los siguientes: (i) G₁/S: previene la entrada de la célula a la fase S, (ii) intra-S: bloquea el ciclo celular en la fase S, (iii) S/M: provoca la detención del ciclo celular si el DNA no ha sido replicado por completo o si está dañado, (iv) G₂/M: evita el inicio de la mitosis y (v) punto de control del huso mitótico: detiene el ciclo celular antes de la anafase si el huso no se ha ensamblado correctamente (Song, 2005; Wong y Stearns, 2005).

Se ha reportado que las células con p53 inactivada se vuelven fácilmente tetraploides o poliploides al promoverse la inestabilidad genómica. Por eso se ha implicado a p53 en un punto

de control de tetraploidía durante el ciclo celular (Andreassen y col, 2001; Duensing y Duensing, 2005). Sin embargo, otros autores sostienen que la detención del ciclo celular en células tetraploides en cultivo estaría asociada al estrés que genera el manejo *in vitro*. Un ejemplo es el uso de agentes inhibidores de la citoquinesis, que causaría efectos irreversibles en el citoesqueleto de actina (Uetake y Sluder, 2004; Wong y Stearns, 2005; Sphyris y Harrison, 2005). Se cree además que la formación de tumores *in vivo* estaría precedida por errores en la citoquinesis que generarían en primer lugar células tetraploides. Estas luego generarían células aneuploides en un proceso asociado a la inactivación de la función de p53 (Shi y King, 2005; Fujiwara y col, 2005).

Por lo anteriormente expuesto, el estudio de esta molécula es de gran importancia, siendo el roedor tetraploide *Tympanoctomys barrerae* una herramienta interesante para ello, debido a que tiene el genoma duplicado. La condición de tetraploidía ha sido considerada imposible en mamíferos por alterar el mecanismo de compensación de dosis (inactivación de un cromosoma X en hembras) (Otto y Whitton, 2000). A pesar de esas limitaciones, las evidencias citológicas y moleculares apoyan la tetraploidía de *T. barrerae*. Entre ellas se destaca su elevado número de cromosomas ($2n = 102$), que es el más alto entre los mamíferos; el contenido de DNA de sus células (16,8 pg), que duplica el promedio de los mamíferos y el gran tamaño de sus espermatozoides (Gallardo y col, 1999; Gallardo y col, 2003; Gallardo y col, 2004).

En los organismos poliploides vegetales se ha observado que la regulación génica sufre modificaciones después de ocurrido el evento de duplicación genómica, como por ejemplo el silenciamiento de hasta el 2,5% de los genes duplicados (Ozkan y col, 2001; Liu y Wendel, 2002). Esto hace más interesante aún el estudio de p53 en *T. barrerae*, debido a que es un factor de transcripción fundamental en la regulación del ciclo celular y que al parecer estaría

relacionado con el monitoreo de procesos de poliploidización en la célula (Andreassen y col, 2001; Ljungman, 2000). Para estudiar el gen *p53* en *T. barrerae*, se procedió a rastrear la biblioteca genómica y a caracterizar un fragmento mediante secuenciación.

T. barrerae es un habitante de las dunas de los salares argentinos entre las provincias de Mendoza y Neuquén (Díaz y col, 2000; Gallardo y col, 1999). Este especialista del desierto tiene una dieta consistente en plantas halofíticas de gran contenido salino. Sus riñones pueden procesar grandes cantidades de sal, por lo cual la concentración osmótica de su orina es una de las más altas reportadas para un mamífero (7080 mosm/l) (Díaz y col, 2000; Ojeda y col, 1996; Ojeda y col, 1999). Estas adaptaciones fisiológicas plantean una serie de interrogantes relacionadas con el metabolismo celular de esta especie. Al respecto, se supone que existiría una mayor tolerancia celular a altas concentraciones de sal debido a la forma de vida de este roedor. Para responder a esta interrogante, se inició el aprendizaje de técnicas de cultivo celular primario y se establecieron líneas celulares mediante transformación de células pulmonares y de feto con genes adenovirales. Una vez logrado este objetivo, se puso a prueba la siguiente hipótesis:

- Ho: las células pulmonares de *T. barrerae* soportan las mismas concentraciones de NaCl que las células del control *Rattus rattus*.
- H1: las células pulmonares de *T. barrerae* soportan una mayor concentración de NaCl que las células de la especie control.

Los objetivos y la hipótesis planteada permitirán conocer más cabalmente el genoma y las características fisiológicas de este roedor, que por su naturaleza tetraploide constituye un verdadero desafío a los modelos biológicos y paradigmas existentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material biológico

- Biblioteca genómica de *T. barrerae* construida en el bacteriófago λ FixII
- Células *E. coli* XL1-Blue MRA (P2)
- Células *E. coli* JM 109
- Clones λ typ53-1.1, λ typ53-1.2 y λ typ53-3.1
- Clones ptyp53₅₆₀ y ptyp53₁₆₀₀
- Células de cultivo primario de pulmón y de un feto de una hembra *T. barrerae* capturada en Añelo, Argentina (Instituto de Ecología y Evolución, MHG 1755)
- Líneas celulares TBL, TBL1-4, TBL1-7, BRK1 y AB120

3.1.2. Enzimas

Invitrogen : *Taq*DNA polimerasa, *Not*I, *Sal*I, *Sst*I, RNAsa A

Promega : *Eco*RI, RQ1 DNAsa libre de RNAsa, *Sac*I

3.1.3. Reactivos y otros

Amersham/Searle	: POPOP
Bio-Rad	: filtros de nitrocelulosa, Precision Plus Protein All Blue Standards
Calbiochem	: G418
Caledon	: ácido clorhídrico
Eastman	: xilencianol
Energene	: Glow Microscopy Mounting Medium
Fisher Scientific Company	: PEG 6000
GibcoBRL	: extracto de levadura, ampicilina, DNA de esperma de salmón, D-Mem, suero bovino fetal, penicilina-estreptomicina, tripsina
Invitrogen	: oligonucleótidos partidores p53, DNA λ /HindIII, bromuro de etidio, Lipofectamin 2000, DMRIE-C
Merck	: gelatina, metanol, ácido acético glacial, ácido fosfórico, ácido tricloroacético, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, tritón X-100
NEN	: α^{32} P-dCTP
Pierce	: ECL kit, Comasie Plus – The Better Bradford Assay Kit
Promega	: glicerol, IPTG, Prime-a-gene kit
Qbiogene	: Geneclean kit
Riedel-de Haen	: EDTA, maltosa, sulfato de magnesio
Roche	: Inhibidores de proteasas (completo, libre de EDTA)
Ross	: rubber cement

Sigma	: alcohol isoamílico, glucosa, azul de bromofenol, azul de coomassie, tween 20, colchicina, DAPI, nonidet P-40, poliacrilamida
United States Biological	: peptona, tris, acetato de sodio, X-Gal
Winkler	: cloruro de sodio, agar-agar, agarosa, hidróxido de sodio, SDS, acetato de potasio, fenol, etanol, cloroformo, isopropanol, cloruro de potasio, formamida

3.2. MÉTODOS

La mayoría de los protocolos utilizados en biología molecular fueron obtenidos de Sambrook y col (1989). Sólo para los protocolos obtenidos de otras fuentes se detallan éstas en el texto.

3.2.1. Amplificación de una secuencia específica del gen *p53* por reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Se amplificó por PCR (en DNA genómico o de fago lambda recombinante) una secuencia específica del gen *p53* de *T. barrerae* de 554 pb. Los partidores utilizados fueron los oligonucleótidos sentido: 5'-CATCTTATCCGGGTGGAAGG-3' y antisentido: 5'-CCATGCAGGAGCTATTACAC-3' diseñados a partir de la secuencia AF367373 *Mus musculus* *p53* obtenida de la base de datos GenBank. El fragmento amplificado abarca el extremo terminal del exón 6, el intrón 6 y el comienzo del exón 7 de *p53* en *Mus musculus*.

En un volumen final de 50 μ l se mezcló 1 μ l de DNA templado (100 ng DNA genómico); 40 ng de cada partidor; 2,5 μ l de $MgCl_2$ (50 mM); 5 μ l de tampón de PCR 10X (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl); 2,5 μ l dNTPs (10mM); agua y 0,3 μ l (5 U/ μ l) de la enzima *Taq*DNA polimerasa.

La reacción se realizó en un termociclador, donde la mezcla se denaturó por 5 minutos a 94°C, realizándose luego 30 ciclos de 1 minuto de denaturación a 94°C, 1 minuto de apareamiento de los partidores a 55°C y 1 minuto de extensión a 72°C. A continuación se realizó una extensión final por 7 minutos a 72°C y se terminó la reacción a 4°C. Para comprobar el correcto funcionamiento de la reacción se cargaron 5 μ l de la muestra en un gel de agarosa al 1% y se realizó una electroforesis como se describe más adelante.

3.2.2. Preparación de DNA plasmidial a pequeña escala

En una placa de LB agar (1,8% p/v agar-agar, 0,5% p/v extracto de levadura, 1% p/v peptona, 1% p/v NaCl, [pH 7,4]) con ampicilina (50 – 100 μ g/ml de medio) se sembraron células XL1 Blue (guardadas en glicerol a -80°C) portadoras del plasmidio pGEM-T Easy con un inserto de 554 pb correspondiente a un fragmento del gen p53 de *T. barrerae*. Se incubó la placa a 37°C durante la noche y se inoculó una colonia aislada en 5 – 10 ml de medio LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml). Esta cantidad fue adecuada como para realizar una extracción de DNA plasmidial a pequeña escala luego de incubar durante toda la noche a 37°C y con agitación a 200 rpm.

Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo líquido en un tubo eppendorf a 3700 rpm (1150 x g) por 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió

completamente en 250 μ l de la solución S1 fría (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA [pH 8,0], 400 μ g/ml RNAsa A), luego se agregaron 250 μ l de solución S2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló lentamente por inversión y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 250 μ l de la solución S3 fría (2,55 M acetato de potasio [pH 4,8]), se mezcló muy lentamente y se incubó por 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm (19.300 x g) por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el DNA cromosómico y las proteínas denaturadas. Se recuperó el sobrenadante inmediatamente.

El DNA plasmidial se purificó por extracción fenólica y se precipitó con etanol. Para ello se agregó medio volumen de fenol equilibrado en Tris-HCl (pH 8,0) y medio volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló por algunos minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm (19.300 x g). Se rescató la fase superior acuosa y se le agregó un volumen de isopropanol frío para precipitar el DNA. Se incubó a -20°C por 10 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm (19.300 x g) por 15 minutos a 4°C , descartándose todo el sobrenadante. Se lavó el sedimento de DNA con etanol 70%, se centrifugó por 2 minutos y se eliminó todo el alcohol. El DNA obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 – 50 μ l de agua destilada estéril. Luego se dejó a temperatura ambiente o a 4°C para permitir la rehidratación del DNA. La concentración se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. El DNA se almacenó a -20°C .

3.2.3. Cuantificación de DNA

La concentración del DNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203. Se diluyeron 2 μ l del DNA a cuantificar en 798 μ l de agua destilada y se midió la absorbancia a 260 y a 280 nm, calibrando el equipo con agua. La concentración de DNA se calculó sabiendo que una densidad óptica (OD) de 1 corresponde a 50 μ g/ml de DNA, por lo que el valor de absorbancia obtenido se multiplicó por ese valor y por el factor de dilución igual a 400 (volumen final partido por el volumen de la muestra). La concentración calculada se expresó en μ g/ μ l. La pureza de la muestra se determinó calculando la relación A_{260}/A_{280} , la cual refleja la cantidad de proteínas presentes. En un DNA puro esta relación fluctúa entre 1.70 y 1.85.

3.2.4. Fraccionamiento de DNA por electroforesis en geles de agarosa

Para fraccionar DNA plasmidial o de fago lambda se utilizaron geles de agarosa al 1% preparados en 30 - 50 ml de TAE 1X (Tris-acetato 0,04M [pH 8.0], EDTA 1 mM), disolviendo la agarosa por ebullición en un horno microondas. Se comprobó que el volumen no hubiera disminuido luego de la ebullición y, de ser así, se volvió a enrasar al volumen deseado con agua destilada. Se le agregó 1 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml), se vertió en un molde para electroforesis y se dejó solidificar. El molde con el gel solidificado se sumergió en la cámara de electroforesis con TAE 1X y se cargó la muestra mezclada con tampón de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 30% glicerol en agua), a una concentración final de 1X. En el

mismo gel se cargaron además 0,5 µg de estándar DNAλ/*Hind*III. La electroforesis se llevó a cabo a 40 mA para DNA genómico y a 50 mA para DNA plasmidial o de fago lambda.

3.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción

La digestión de 1 – 5 µg de DNA plasmidial o de fago lambda con una sola enzima de restricción se realizó en un volumen final de 20 µl con una concentración 1X del tampón específico para la enzima y 10 U de enzima de restricción por 2 horas a 37°C. Luego se cargaron los 20 µl de muestra mezclados con 4 µl de tampón de carga 6X en un gel de agarosa para separar los fragmentos de DNA por electroforesis. El mismo procedimiento se realizó cuando se usaron 2 enzimas simultáneamente.

3.2.6. Extracción de DNA desde geles de agarosa

Se extrajo el DNA de la banda de interés cortada del gel de agarosa siguiendo las instrucciones del kit (Geneclean kit, Qbiogene). La técnica se basa en que el DNA normalmente se une a la sílica negativamente cargada por formación de puentes catiónicos con los grupos fosfato en presencia de altas concentraciones de sal caotrópica y eluye cuando se disminuyen las concentraciones de sal. Una vez purificado el fragmento se almacenó a –20°C y se cargó un 10% de la preparación en un gel de agarosa al 1% para comprobar la correcta extracción del DNA de la banda.

3.2.7. Marcaje de DNA con ^{32}P

El DNA a utilizar como sonda para rastrear la biblioteca genómica o para análisis por Southern blot fue marcado siguiendo las instrucciones del kit Prime-a-gene de Promega, diseñado para marcar fragmentos de DNA utilizando hexanucleótidos al azar como partidores para sintetizar las hebras complementarias y como enzima al fragmento Klenow de la DNA polimerasa. La sonda para p53 fue marcada incorporando $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml) en las hebras complementarias sintetizadas.

3.2.8. Determinación de la eficiencia de marcaje radiactivo

En dos tubos se mezclaron 3 ml de ácido tricloroacético frío (TCA 10%) con 1 μg de DNA de timo de ternera y se les agregó respectivamente 10 y 20 μl de la sonda radioactiva diluida 1:50 en agua. El contenido de cada tubo se filtró al vacío a través de un filtro de nitrocelulosa. Luego se lavó un mínimo de 3 veces con TCA 10%, una vez con etanol 95% y se dejó secar los filtros al aire bajo campana. Una vez seco, cada filtro se depositó en un frasco para mediciones de radioactividad que contenía 3,5 ml de solución de centelleo (PPO 4 g/l y POPOP 0,1 g/l en tolueno) y se midieron las cuentas por minuto (CPM) en un contador de centelleo (Tri-Carb, Liquid Scintillation Analyzer).

3.2.9. Preparación de células para sembrar fagos

Se sembraron en placas de LB agar las células XL1-Blue MRA (P2) de un stock en glicerol almacenado a -80°C y se incubaron a 37°C durante la noche. Se sembró una colonia aislada en 10 ml de medio LB suplementado con 0,2 % de maltosa y 10 mM de MgSO_4 y se dejó crecer durante la noche a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Una vez observado un crecimiento suficiente se tomaron 20 μl de este cultivo y se sembraron en 20 ml de medio LB también suplementado con maltosa y MgSO_4 . Se monitoreó el crecimiento mediante la medición de turbidez a 600 nm hasta alcanzar una OD de 0,2 a 0,6. Luego se sedimentaron las células a 3.700 rpm (1.150 x g) por 5 minutos y se resuspendieron en una cantidad adecuada de MgSO_4 10 mM para obtener una OD final igual a 2.

3.2.10. Titulación de un stock de fago lambda

Se realizaron diluciones seriadas desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-5} a partir de un stock de fago lambda utilizando SM frío (0,1 M NaCl, 8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,01% gelatina).

En un tubo de ensayo limpio se mezclaron 100 μl de células con 100 μl de la dilución de fago lambda y se incubaron en baño de María a 37°C , sin agitación, por 20 minutos. Se equilibró LBTA (LB agar al 0,8% p/v) a 50°C y placas de LB agar a 37°C . Al cabo de los 20 minutos se agregaron 10 ml de LBTA líquido al tubo de ensayo con la mezcla de células y bacteriófagos. Se vertió inmediatamente el contenido del tubo sobre una placa de LB agar y se distribuyó el líquido uniformemente sobre la superficie del agar. Una vez solidificado el LBTA se incubó la placa en

una estufa a 37°C durante toda la noche. Las unidades formadoras de placas de lisis por ml de stock (pfu/ml) se calcularon multiplicando por 10 el número de placas de lisis y por el factor de dilución.

3.2.11. Preparación de un stock de bacteriófago lambda

Para obtener una placa de agar de 137 mm de diámetro con placas de lisis confluentes se realizó la infección de 100 µl de bacterias con 100 µl de la dilución 1×10^{-3} de un clon puro en una placa de LB agar. Se incubó a 37°C durante toda la noche. Para eluir los fagos se vertieron 10 ml de SM sobre la placa y se dejó incubando con agitación suave y constante durante dos horas, al cabo de las cuales se recolectó el medio. Después de descartar restos de bacterias por centrifugación, se añadió una gota de cloroformo al sobrenadante y se almacenó la suspensión de bacteriófagos (“cleared lysate”) a 4°C. Para almacenamiento a largo plazo se preparó un stock de 1 ml con 7 % de DMSO y se guardó a -80°C.

3.2.12. Rastreo de biblioteca genómica

Se utilizaron placas de agar en que las placas de lisis producidas por el bacteriófago en la cubierta bacteriana se pudieran distinguir individualmente en forma clara (crecimiento casi confluyente). Se dejaron enfriar las placas a 4°C y se les asignó un número. Se depositó el primer filtro sobre la superficie del agar y se marcaron coordenadas perforando el filtro y el agar con una aguja untada en carbón activo. El primer filtro se dejó sobre la placa de 0,5 a 1 minutos y el

segundo filtro se dejó de 1 – 2 minutos. El duplicado se marcó con coordenadas idénticas a las del primer filtro.

Una vez retirados los filtros de la placa se sumergieron en una solución denaturante (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) por 1 – 2 minutos. Luego se traspasaron a una solución neutralizante (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl [pH 8,0]) por 5 min y finalmente se lavaron por 1 minuto en 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se dejó secar los filtros al aire sobre papel absorbente y luego se fijó el DNA a 80°C en una estufa al vacío por 30 minutos. Finalizada la fijación del DNA los filtros se humedecieron en 2XSSC y se prehibridaron en una solución de 50% formamida, 6 x SSC, 0,5% SDS y 100 µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón previamente desnaturalizado por ebullición durante 15 minutos. La prehibridación se llevó a cabo a 42°C con agitación suave por 1 a 3 horas.

La hibridación del DNA con la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP se realizó incubando los filtros durante la noche a 42°C con agitación suave en la solución de hibridación. Esta solución corresponde a la solución de prehibridación a la que se le agregó la sonda denaturada por ebullición durante 15 minutos, a una actividad final de 1×10^6 cpm/ml.

Los filtros se lavaron disminuyendo progresivamente la concentración de sal de la solución de lavado. Luego se enjuagaron una vez con 2 x SSC + 0,1% SDS, luego se lavaron 2 veces por 15 minutos con una solución de la misma composición para cambiar luego a una solución con 1 x SSC + 0,1% SDS, en la que se lavó también por 15 min a 42°C. Los filtros fueron envueltos en una lámina plástica para preservar la humedad y se revelaron utilizando el equipo Molecular Imager FX de Bio-Rad.

Los clones positivos se identificaron al sobreponer en la misma orientación las coordenadas marcadas con carbón activo en ambos filtros obtenidos de una misma placa. Este

procedimiento supone que los clones de interés correspondían a las placas de lisis que producían una señal en ambos filtros. Una vez localizadas, las placas de lisis se extrajeron del agar utilizando una punta azul para micropipeta cortada en su extremo. El trozo de agar obtenido se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 0,5 ml de SM y 20 μ l de cloroformo y se dejó durante la noche a 4°C con agitación constante para eluir el bacteriófago. Una vez terminada la elución se determinó el título de la solución y se sembró para el siguiente rastreo. Una vez que todas las placas de lisis presentes en la placa de agar fueron positivas (indicando que todas provenían del mismo clon del fago), se procedió a preparar un stock para análisis posteriores.

3.2.13. Preparación de DNA de bacteriófago lambda

Se sembró la dilución adecuada del clon a utilizar para lograr una formación de placas de lisis confluyente. Para cada extracción de DNA se sembraron 6 placas grandes (137 mm de diámetro) de LB agar, cada una de las cuales se eluyó con 10 ml de SM frío bajo agitación suave durante un mínimo de 2 horas a 4°C. Previo a la recolección del líquido las placas se dejaron inclinadas durante 15 minutos. Una vez recolectada la suspensión en un tubo Falcon de 50 ml, se le agregó DNAsa I y RNAsa a una concentración final de 1 μ g/ml. Esto se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la digestión se le agregó a la suspensión NaCl sólido a una concentración final de 1 M y se incubó por una hora en hielo para favorecer la disociación de las partículas virales de los restos bacterianos. Los restos bacterianos fueron removidos por centrifugación a 3700 rpm (1.150 x g) por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para hacer precipitar las partículas virales se agregó PEG 6000 sólido a una concentración final del 10%, se disolvió por agitación suave y se incubó en hielo por un mínimo de una hora.

Se transfirió parte de la suspensión a 6 tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 14.000 rpm (19.300 x g) por 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se volvió a agregar de la suspensión a los mismos tubos para centrifugar nuevamente, proceso que se repitió hasta haber centrifugado todo el volumen. Se removió todo el líquido de los 6 sedimentos resultantes y se resuspendieron en SM juntándolos en un volumen final de 160 µl por cada 10 ml de suspensión original.

El PEG y los restos celulares se extrajeron agregando un volumen de cloroformo, agitando vigorosamente por 30 segundos y separando las fases orgánica y acuosa por centrifugación a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (se reservó para más adelante) y se reextrajo la fase orgánica agregando 100 µl de TE (pH 8.0) (Tris/HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM [pH 8.0]) y 10 µl de NaCl 5M por cada 300 µl de volumen. Se centrifugó por 5 minutos en las condiciones anteriores, se descartó la nueva fase orgánica y se juntó la nueva fase acuosa con la anterior. La mezcla de fases acuosas se reextrajo con 1 volumen de fenol equilibrado en Tris-HCl (pH 8,0), se centrifugó por 5 minutos y se guardó la fase acuosa. La fase orgánica se volvió a extraer con TE (pH 8,0) y NaCl. La nueva fase acuosa se juntó con la anterior y se descartó la fase orgánica restante. Las fases acuosas se extrajeron con cloroformo, se agitaron vigorosamente por 30 segundos y se centrifugaron por 3 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 1 ml de etanol 100% frío para dejar precipitar en hielo por al menos 15 minutos. Luego se centrifugó a 14.000 rpm (19.300 x g) por 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el sedimento en 100 µl de acetato de sodio 0,3 M (pH 8,0). Se le agregaron 250 µl de etanol 100% frío y se dejó precipitar por 10 minutos en hielo. Se centrifugó por 5 minutos en las condiciones anteriores, se lavó el sedimento en 150 µl de etanol 70% y se centrifugó por 2 minutos. Se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente y finalmente se

resuspendió en un volumen adecuado de TE (pH 8,0) (entre 30 y 60 μ l). Una vez resuspendido el DNA se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

3.2.14. Análisis por Southern blot

El DNA a analizar se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se fotografió el gel al lado de una regla, cuyo cero se encontraba a la altura de los pocillos. Luego se denaturó el DNA sumergiendo el gel (2 veces por 10 minutos y con agitación constante) en una solución de NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M. Luego se cambió a una solución neutralizante (NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M [pH 7,4]), donde se incubó dos veces durante 10 minutos. Finalmente se transfirió por capilaridad el DNA a una membrana de nitrocelulosa, depositando el gel sobre una tira de papel filtro (Whatman 3M) en contacto con una solución de 10XSSC. El gel se cubrió con la membrana de nitrocelulosa y con dos trozos de papel filtro de dimensiones idénticas a las del gel. Sobre el papel filtro se apiló papel absorbente hasta alcanzar una altura de unos 8 cm. Finalmente se aplastó todo con un trozo de vidrio para extraer el líquido. Se dejó transfiriendo el DNA durante toda la noche y luego se fijó incubando la membrana a 80°C durante 30 minutos en una estufa de vacío. Los filtros se hibridaron con una sonda marcada con 32 P α -dCTP siguiendo el mismo procedimiento que en el rastreo de la biblioteca genómica. El revelado de los filtros se realizó utilizando el equipo Molecular Imager FX de Bio-Rad (Southern, 1975).

3.2.15. Clonación de un fragmento de DNA en un vector plasmidial

3.2.15.1. Preparación de células competentes

Se sembraron células *E. coli* JM 109 guardadas en glicerol a -80°C en una placa de LB agar y se incubaron a 37°C durante la noche. Se sembró una colonia aislada de esa placa en 5 ml de medio LB y se incubó en un agitador a 200 rpm y 37°C durante la noche. De este cultivo se realizó dilución 1:100 en medio SOC (2% p/v triptona, 0,5% p/v extracto de levadura, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM glucosa) y se dejó crecer hasta que alcanzó una A_{600} de 0,5; momento en que el cultivo se encuentra en su fase exponencial de crecimiento. El cultivo se enfrió completamente por una hora en hielo y las células se centrifugaron a 1250 rpm (130 x g) por 10 minutos a 4°C . El sedimento fue resuspendido muy suavemente en MgCl_2 100 mM frío, utilizando un volumen igual al que tenía el cultivo originalmente. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en MgCl_2 100mM frío y se centrifugaron en las condiciones anteriores y resuspendiendo en 15 ml de CaCl_2 100 mM frío. Luego se incubaron en hielo por 20 minutos, se centrifugaron por última vez y se resuspendieron muy lentamente en 0,5 ml de CaCl_2 100 mM frío. Las células competentes obtenidas de esta forma se guardaron a 4°C durante una semana.

3.2.15.2. Ligación de un fragmento de DNA a un vector plasmidial

A partir de una cepa bacteriana portadora del vector pBluescript vacío se purificó el DNA plasmidial y se digirieron 5 μg de éste con enzimas de restricción para linearizar el vector. Luego se mezclaron aproximadamente 250 ng del vector digerido con 11 μl de tampón de ligación 10X;

1 μ l de ATP (10 mM); 7,2 μ g de DNA digerido con las mismas enzimas utilizadas para linearizar el vector (se agregó la digestión completa del DNA, la que fue realizada en un volumen de 10 μ l) y 1 μ l de T4 DNA ligasa (3U/ μ l) en un volumen final de 24 μ l. La mezcla se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4°C. Para determinar el ruido generado por la religación del vector sin incorporación de inserto se realizó un control de ligación en el que se mezclaron los mismos elementos nombrados anteriormente, excepto el DNA a ser insertado en el vector.

3.2.15.3. Transformación de células competentes

Se mezclaron 100 μ l de células competentes con la totalidad del volumen de la reacción de ligación y se incubaron por 20 minutos en hielo. Además del control de ligación se preparó un control de transformación utilizando como DNA 50 ng del vector sobre enrollado sin inserto y sin digerir. A todas las mezclas se les aplicó un shock térmico incubándolas por 45 segundos a 42°C y se incubaron nuevamente en hielo. Al cabo de unos minutos se les agregó 500 μ l de medio SOC precalentado a 37°C. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y luego por 1-2 horas en agitador a 37°C y 200 rpm. Finalmente las células fueron sembradas sobre placas de LB agar con ampicilina equilibradas previamente a 37°C y conteniendo 40 μ l de X-Gal (20 mg/ml) y 4 μ l de IPTG (200 mg/ml), e incubadas a 37 °C durante la noche.

Posterior a la incubación se observaron colonias de color blanco y de color azul, debido al sistema de α -complementación, que consiste en la acción conjunta del gen lacZ mutante (lacZ Δ M15) que se encuentra en la célula huésped con el gen lacZ' que se encuentra en el vector plasmidial para producir la enzima β -galactosidasa activa. El gen lacZ Δ M15 tiene una delección

en la región que codifica para un α -péptido, mientras que el gen *lacZ'* sólo codifica para el α -péptido. Cuando se inserta un fragmento de DNA al vector plasmidial se interrumpe el gen *lacZ'* por lo que no se produce el α -péptido y por ende no se genera la enzima β -galactosidasa activa. Así las colonias portadoras de un plásmido recombinante son blancas, a diferencia de las que portan el vector vacío, que son azules al tener la enzima β -galactosidasa activa y ser capaces de degradar el reactivo cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactósido) presente en el medio. El IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) se agrega al medio por ser un análogo sintético altamente estable y no metabolizable de la galactosa, que secuestra al represor de β -galactosidasa aumentando la síntesis de la enzima.

Tanto las colonias blancas como las azules se cultivaron por separado en 5 ml de medio LB con ampicilina, incubándolas durante la noche a 37°C y 200 rpm en el agitador. Una vez observado un buen crecimiento se les extrajo el DNA plasmidial para comprobar la presencia del inserto esperado mediante digestión con *EcoRI* y *SacI*. Luego se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los clones que presentaron un inserto fueron enviados a secuenciar.

De los clones con inserto se preparó un stock para almacenar a -80°C creciendo una colonia en 10 ml de medio LB con ampicilina, sedimentando las células a 3000 rpm por 5 minutos y resuspendiéndolas en 1,5 ml de una solución compuesta por Tris-HCl 10mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM y 30% de glicerol.

3.2.16. Cultivo primario de células eucarióticas

Se estableció un cultivo celular primario a partir de explantes de tejido cortado con bisturí y depositado en una botella de cultivo de 12,5 cm² de superficie con medio D-MEM de Gibco.

El medio se suplementó con 20% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de penicilina – estreptomicina y se incubó el cultivo en una estufa a 37°C y con 7% de CO₂. El medio de cultivo se cambió según los requerimientos, lavándose las células con PBS antes de agregar el nuevo medio de cultivo (Freshney, 2000).

3.2.17. Transfección de células eucarióticas

Previo al inicio de los protocolos de transformación, se sembraron células de cultivo primario en placas de 59 cm² de superficie en medio D-MEM con 20% de SBF y 1% de penicilina-estreptomicina y se incubaron a 37°C y 7% de CO₂ hasta obtener un crecimiento confluyente (Kingston y col, 1996).

3.2.17.1. Transfección mediante fosfato de calcio

Una hora antes de la transfección se cambió el medio a 7 placas con crecimiento celular confluyente. Se preparó el DNA a transfectar mezclando los plásmidos portadores de los genes de interés (Tabla 2, sección Resultados 4.4.2.) con DNA de esperma de salmón hasta alcanzar una cantidad de 30 µg de DNA por tubo, y se llevó el volumen a 450 µl con agua. A esta mezcla se le agregó 50 µl de CaCl₂ (2,5 M) y 500 µl de BES-tampón salino 2X (50mM ácido N,N-bis[2-hidroxietil] 2-aminosulfónico [BES], 280 mM NaCl, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 6,96) bajo agitación constante en vortex. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de cristales de fosfato de calcio (que se adhieren al DNA) y se agregó lentamente el contenido del

tubo a la placa con las células, bajo agitación suave. Se incubaron las células a 37°C por 24 horas y luego se cambió el medio de cultivo (Kingston y col, 1996).

3.2.17.2. Transfección mediante lipofectamina

Antes de la transfección, realizada según el manual de instrucciones de Lipofectamin 2000 (Invitrogen), se reemplazó el medio de cultivo de las células por D-MEM₀ (sin SBF ni antibióticos). En un tubo eppendorf se mezcló la cantidad de DNA plasmidial indicada en la Tabla 2 (sección Resultados 4.4.2.) con 500 µl de medio D-MEM₀ y en otro tubo se mezclaron 10 µl de lipofectamina por cada 4 µg de DNA con otros 500 µl de medio D-MEM₀. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. El contenido de ambos tubos se mezcló y se incubó nuevamente por 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agregó gota a gota a las placas con células bajo agitación suave. Luego de 6 horas se agregó SBF para llegar a una concentración de 20% en el medio. Se cambió el medio de cultivo a las 24 horas.

3.2.17.3. Transfección mediante DMRIE-C

Antes de la transfección, realizada según el manual de instrucciones de DMRIE-C (Invitrogen), se cambió el medio de cultivo de las células a D-MEM₀. En un tubo eppendorf se mezcló 4 µg de DNA plasmidial con 500 µl de medio D-MEM₀ y en otro tubo se mezclaron 12 µl de DMRIE-C con otros 500 µl de medio D-MEM₀. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. El contenido de ambos tubos se mezcló y se incubó nuevamente por 35 – 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agregó gota a gota a las placas con células bajo agitación

suave. Luego de 3 - 12 horas se agregó SBF y antibióticos para llegar a una concentración de 20 y 1% respectivamente. Se cambió el medio de cultivo a las 24 horas.

3.2.18. Obtención de líneas celulares mono- y policlonales

Una vez transfectadas las células y habiendo alcanzado un crecimiento confluyente, se agregó 300 - 400 μg de G418 (antibiótico aminoglicósido) por ml de medio a células transfectadas con el vector pcDNA3, que contiene el gen de resistencia a dicho antibiótico. De este modo se seleccionaron los focos de células resistentes. Los focos de crecimiento acelerado no seleccionables y aquellos sobrevivientes después del tratamiento con G418 fueron aislados y cultivados en forma separada para obtener líneas celulares monoclonales. Las células sobrantes fueron tripsinizadas y vueltas a sembrar para obtener líneas celulares policlonales (comunicación personal Dr. Dobner, Instituto de Microbiología e Higiene, Universidad de Regensburg).

3.2.19. Determinación de la curva de crecimiento de células eucarióticas

Se sembraron 30.000 células por pocillo en microplacas de 6 pocillos. Se contó por duplicado el número de células día por medio (o cada tres días) durante 12 días. Cada tipo celular a analizar se sembró en 0,1 y 5 % de SBF. Al momento de contar se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se desprendieron las células agregando 600 μl de tripsina a cada pocillo. Dependiendo de la cantidad de células presentes en el pocillo, se diluyó con diferentes volúmenes de PBS y se tiñeron las células agregando 25 μl de azul de tripan al 1%. Se contaron sólo las células vivas en una cámara de Neubauer y se calculó el número de células totales multiplicando

el número de células contadas por el factor de dilución y por 10^4 (10 debido a la profundidad de la cámara y 10^3 al transformar de μl a ml) para obtener el número de células por ml. Luego se calculó el número de células en 600 μl de tripsina. Se utilizaron como control las líneas celulares BRK1 (Baby Rat Kidney 1) y AB120, ambas provenientes de ratas Sprague-Dawleys. BRK1 es una línea celular espontáneamente transformada y AB120 fue obtenida de la línea BRK1 por transfección de genes adenovirales, por lo que expresa E1B-55kDa y E1A (Freshney, 2000).

3.2.20. Inmunodetección de proteínas en células eucarióticas por inmunofluorescencia y análisis de Western blot

3.2.20.1. Inmunofluorescencia

Se sembraron las células en placas de Petri con portaobjetos en su interior y se incubaron durante la noche. Luego de lograrse 50 – 60% de confluencia, se eliminó el medio, se lavaron las células con PBS y se retiraron los portaobjetos. Las células fueron fijadas sumergiendo los portaobjetos en metanol a -20°C por 15 minutos. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se permeabilizaron sumergiendo los portaobjetos en Triton X-100 al 0,5% en PBS por 15 minutos. Se bloqueó con BSA al 1% en PBS Tween o con TBS-BG tampón (25 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0,1% BSA, 2 mM glucosa) a temperatura ambiente por 30 – 60 minutos. Se lavó 3 veces por 5 minutos en PBS Tween.

Se depositaron 50 μl del anticuerpo primario IgG anti-E1A de ratón (M73; Harlow y col, 1985), IgG anti-E1B de rata (2A6; Sarnow y col, 1982) o IgG anti-p53 de ratón (Pab421 dilución 1/10; Harlow y col 1981) sobre el portaobjetos y se incubó por una hora en cámara húmeda a

temperatura ambiente. Se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS Tween y en oscuridad se agregaron 50 µl de anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron IgG anti-rata e IgG anti-ratón, conjugados con tiocianato de fluoresceína (FITC) o con Texas Red (TR) (dilución 1:100) mezclados con DAPI (dilución 1:1000). Se incubó por una hora y se lavó tres veces por 5 minutos con PBS Tween. Luego se agregaron 50 µl de Glow y se cubrió con un cubreobjetos. Después de guardarlo por 2 - 3 horas a 4°C se observó al microscopio de epifluorescencia (Nevels y col, 1999).

3.2.20.2. Preparación de un extracto de proteínas totales

Se resuspendió un sedimento congelado de células en tampón RIPA Light (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 2 mM DTT) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche, solución stock 25X) y con PMSF (0,2 mg/ml concentración final). Se mezcló con vortex y se incubó por 30 minutos en hielo. Se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante (Nevels y col, 2001). Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford según las instrucciones del kit (Coomasie Plus – The Better Bradford Assay Kit, Pierce).

3.2.20.3. Fraccionamiento electroforético de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS

Las muestras se denaturaron a 95°C por 5 minutos (E1A y p53) o a 55°C por 15 minutos (E1B 55k). En el gel se cargaron las muestras mezcladas con tampón de carga 5X (250 mM Tris-

HCl [pH 6,8], 10% SDS, 50% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 37,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ betamercaptoetanol) y el estándar de peso molecular (Precision Plus Protein All Blue Standards de BIO-RAD). En el gel espaciador (4% acrilamida, 125 mM Tris [pH 6,8], 0,1% SDS) se concentraron las proteínas, que luego se separaron en un gel al 10% (10% acrilamida, 375 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% SDS) (Laemmli, 1970).

3.2.20.4. Transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección por análisis de Western blot

Las proteínas se electrotransfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Towbin y col, 1979), la que se bloqueó posteriormente con 5% de leche descremada en polvo en PBS-Tween (0,1%) agitándola en la solución a 4°C durante la noche. Luego se incubó con anticuerpos específicos contra las proteínas a detectar (Pab421 anti-p53 dilución 1/1000, M73 anti-E1A dilución 1/30, 2A6 anti-E1B dilución 1/30) por 90 minutos. Se lavó 3 veces por 7 minutos con PBS-Tween. Se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1/5000), se lavó tres veces por 7 minutos con PBS-Tween y se reveló con quimioluminiscencia (ECL kit, Pierce). La reacción se detectó en una placa radiográfica (Kodak).

3.2.21. Preparación de cromosomas metafásicos a partir de células de cultivo

Se trabajó con células con alta tasa de división, que se obtuvieron tripsinizando las células de una placa de Petri (mediana) con crecimiento confluyente y se repartieron en 3 nuevas placas

medianas. Se cambió el medio de cultivo 48 horas después de sembrar las células y se agregó colchicina a una concentración final de 0,1 μg por ml de medio. Se incubaron las células con colchicina de 3 – 5 hrs a 37°C y luego se tripsinizaron y se sedimentaron a 2000 rpm por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 10 ml de KCl 0,075 M a 37°C, agregándolo gota a gota. Se dejó reposar a 37°C por 20 minutos para lisar las células. Se agregaron 0,5 ml de fijador (metanol / ácido acético glacial 3:1) y se mezcló por inversión. Posteriormente se sedimentaron las células a 1000 rpm por 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en fijador frío (4°C). Luego se incubaron a 4°C por 20 minutos, se sedimentaron a 1500 rpm por 5 minutos y se volvieron a resuspender en fijador (2 – 5 ml). Se realizaron tres lavados y finalmente las células se guardaron a 4 ó -20 °C resuspendidas en 2 ml de fijador. De esta suspensión se sembró una gota por portaobjetos para observar al microscopio y para usos posteriores (Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000).

4. RESULTADOS

4.1. Preparación de la sonda para el rastreo del gen *p53* en la biblioteca genómica de *Tympanoctomys barrerae*

Para rastrear la biblioteca genómica de *T. barrerae* se utilizó como sonda un fragmento del gen *p53* de 554 pb obtenido mediante amplificación por PCR en DNA genómico de dicha especie. Los partidores utilizados fueron diseñados a partir regiones altamente conservadas de la secuencia AF367373 del gen *p53* en *Mus musculus*, obtenida de GenBank. En *M. musculus* se amplifica un fragmento de 555 pb que abarca parte del exón 6, el intrón 6 y el comienzo del exón 7 (Fig. 2).

El producto de amplificación se clonó en el vector pGEM-T Easy (clon ptyp53₅₆₀) y la secuencia, que se depositó en la base de datos GenBank (número de acceso EF151927), confirmó su pertinencia al gen *p53*. Al comparar la secuencia de *T. barrerae* con la de *Mus musculus*, se identifican las mismas regiones exónicas e intrónicas con sus sitios de empalme conservados (Fig. 3). Además se observa que 76 pb pertenecen al exón 6; 400 pb al intrón 6 y 38 pb al exón 7. Un 54,3% de los nucleótidos son idénticos en ambas secuencias, siendo éstos más frecuentes en las regiones correspondientes a los exones parciales. Analizando las regiones exónicas e intrónicas por separado, se observa que el porcentaje de identidad nucleotídica de 75% en el exón 6 (57 de 76 pb), 47,5% en el intrón (190 de 400 pb) y 84,2% en el exón 7 (32 de 38 pb). La homología de la región exónica total es de un 78,1%. En la región intrónica se observan además diferencias dadas por pequeños “gaps” causados por deleciones o inserciones presentes tanto en la secuencia de *T. barrerae* como en la de *M. musculus*.

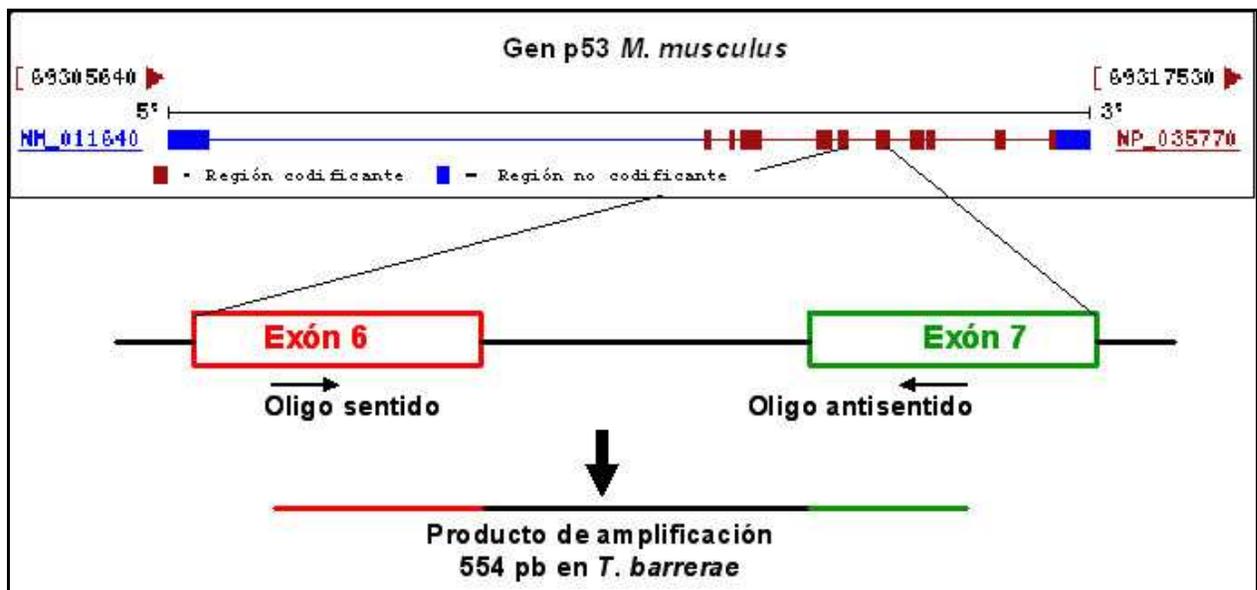


Figura 2: Representación esquemática del fragmento del gen *p53* utilizado como sonda para rastrear la biblioteca genómica de *T. barrerae*.

Figura 3: Alineamiento de la secuencia nucleotídica de 514 pb del gen *p53* amplificado en *T. barrerae* usando la secuencia AF367373 de *M. musculus*. En letra minúscula se detallan los intrones y en mayúscula se detallan los exones. La letra de cada aminoácido derivado está situada sobre la primera letra del codón respectivo. En rojo se marcan los aminoácidos diferentes. Las estrellas entre ambas secuencias indican los nucleótidos idénticos.

Al derivar los aminoácidos de la secuencia nucleotídica de *T. barrerae* se obtiene una secuencia de 37 residuos de aminoácidos. Comparándola con la secuencia aminoacídica derivada de *M. musculus* se observan sólo 9 diferencias, a pesar de que hay 20 codones diferentes. Ello se debe a que en secuencias codificantes las sustituciones nucleotídicas sinónimas (que no causan un cambio de aminoácido en la proteína) ocurren con una frecuencia aproximadamente cinco veces mayor que las no-sinónimas (Li and Graur, 1991). De las 9 diferencias observadas, 6 corresponden a sustituciones por aminoácidos homólogos, mientras que en el tercer aminoácido de la secuencia de *T. barrerae* se encuentra histidina (+), mientras en *M. musculus* hay una tirosina (polar). En la posición 30 se reemplaza cisteína (apolar) por tirosina (polar) y en la posición 36 hay un cambio de asparragina (polar) por lisina (+). Se desconoce si estas diferencias en la secuencia aminoacídica producen alguna modificación en la función de la proteína.

A fin de obtener sólo el inserto del clon ptyp53₅₆₀ que servirá de sonda para el rastreo de la biblioteca genómica, se liberó el fragmento por digestión con *EcoRI* (Fig. 4, A) y se purificó desde el gel de agarosa utilizando el kit GeneClean (Qbiogene). Por comparación con el estándar (DNA λ /*HindIII*) fraccionado en el mismo gel, se determinó la concentración del DNA del fragmento purificado en 5ng/ μ l (Fig. 4, B). De este DNA se marcaron 25 ng con α^{32} P-dCTP a una actividad específica de $6,8 \times 10^8$ cpm/ μ g, obteniéndose un total de $1,72 \times 10^7$ cpm.

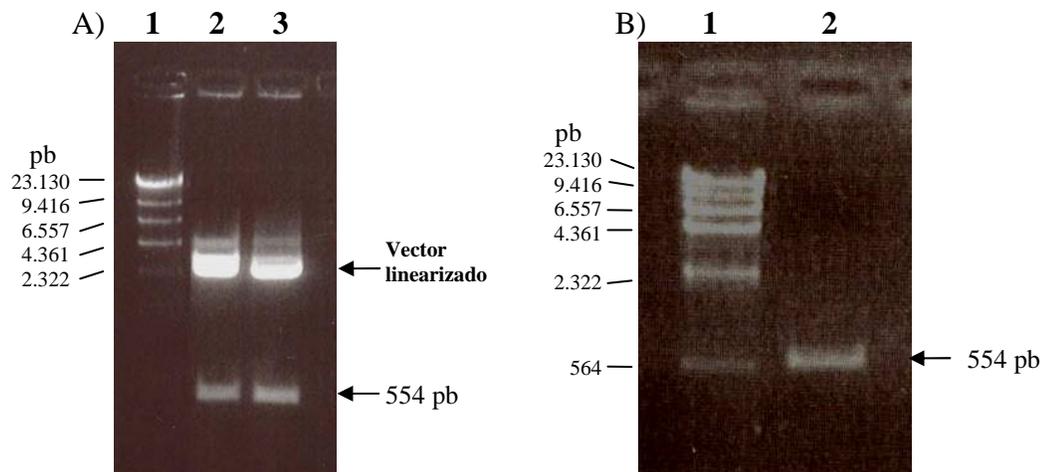
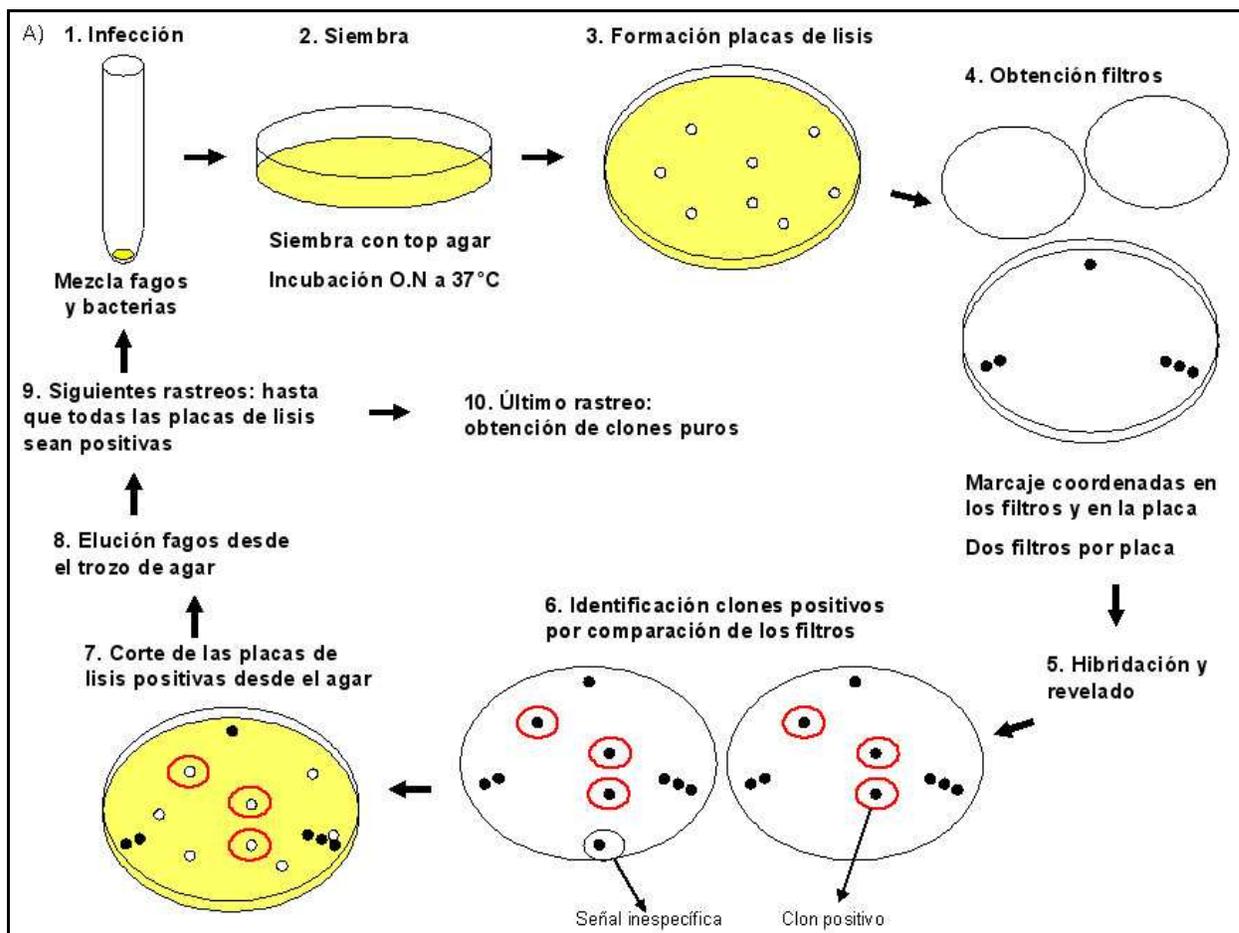


Figura 4: Purificación del fragmento de 554 pb del gen *p53*. Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 en (A) y (B): estándar de peso molecular DNA λ /*Hind*III (0,5 μ g). (A) Carriles 2 y 3: DNA pty *p53*₅₆₀/*Eco*RI; (B) Carril 2: fragmento 554 pb purificado desde el gel en (A).

4.2. Rastreo de la biblioteca genómica de *Tympanoctomys barrerae*

La biblioteca genómica de *T. barrerae* construida en el vector λ FixII está dividida en 6 sub-bibliotecas. Estas fueron analizadas por PCR para identificar cuál contenía un clon portador del gen *p53*. El análisis por PCR con los oligonucleótidos *p53* específicos identificó productos del tamaño esperado en las sub-bibliotecas 2, 3 y 4. Se rastreó la sub-biblioteca 3 (Fig. 5), de la cual se sembraron 3 placas grandes de una dilución de fagos 1×10^{-3} , obteniéndose aproximadamente 50.000 pfu en cada una. De cada placa se obtuvieron 2 filtros que se hibridaron con la sonda $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-*ptyp53*₅₆₀. Luego se identificaron los clones positivos en las 150.000 pfu rastreadas superponiendo ambos filtros de cada placa. Se observaron cuatro clones con señal fuerte y nueve con señal más débil. En cuatro rondas de rastreo se purificaron los recombinantes 1.1.1.3.1, 1.2.1.2.2 y 3.1.1.2.1, a los cuales se les asignaron respectivamente los nombres definitivos λ typ53-1.1, λ typ53-1.2 y λ typ53-3.1. De los tres clones purificados se preparó un stock con un título de 1×10^9 pfu/ml. Los clones positivos que no generaron placas positivas en las siguientes rondas fueron descartados y otros fueron guardados para completar su rastreo más adelante.



B)

Placas originales	Recombinante purificado
1	λ typ53-1.1, λ typ53-1.2
2	-
3	λ typ53-3.1

Figura 5: Rastreo de la biblioteca genómica de *T. barrerae*. (A) Esquema del rastreo y (B) Clones λ typ53 purificados después de 4 rondas de rastreo.

4.3. Caracterización de los recombinantes λ typ53

4.3.1. Caracterización de los recombinantes λ typ53 por PCR

Para confirmar la presencia de p53 en los tres clones aislados, se realizó una reacción de PCR p53 específica utilizando como templado 2 μ l de las soluciones stock de cada clon. Todos los clones amplificaron el fragmento del tamaño esperado. A modo de ejemplo se muestra el resultado obtenido para el clon λ typ53-1.1 (Fig. 6, B).

Para estimar la ubicación del gen *p53* dentro del vector se utilizaron los partidores T3 y T7, que hibridan con los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7 (en el brazo derecho e izquierdo del vector respectivamente; Fig. 6, A), y todas las combinaciones posibles de estos partidores con los oligos sentido y antisentido p53. No se obtuvieron productos de amplificación de tamaño definido en este ensayo, de lo que se deduce que la sonda hibrida con la parte central del inserto. Éste tiene un largo total de ~14 kb, de modo que los productos de amplificación esperados serían muy grandes para ser amplificados desde el comienzo del inserto hasta los partidores específicos.

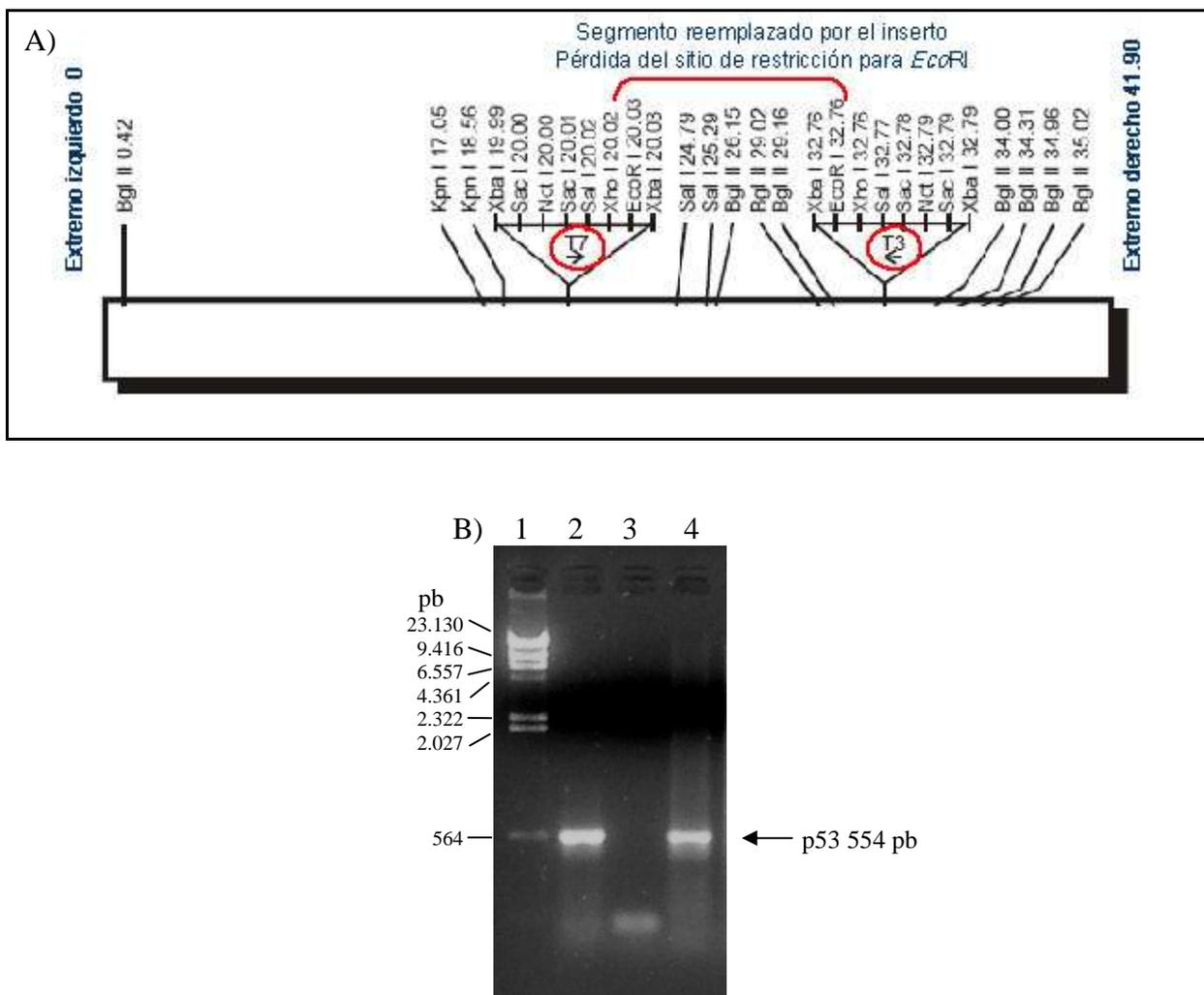


Figura 6: Confirmación por PCR de la presencia del gen *p53* en los clones λ typ53. (A) Mapa del vector λ FixII. Se destacan sitios de hibridación de los oligos T3 y T7 y fragmento del vector reemplazado por el inserto al generarse un recombinante. (B) Producto de amplificación *p53* específico en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: estándar de peso molecular DNA λ /HindIII; carril 2: DNA templado λ typ53-1.1; carril 3: sin DNA templado; carril 4: control positivo con DNA templado ptyp53₅₆₀.

4.3.2. Determinación del tamaño del inserto en los clones λ typ53

Se extrajo DNA de las soluciones stock de cada clon λ typ53 y se digirió con *NotI*, que libera el inserto sin digerir el vector en otros sitios. Los productos de la digestión se fraccionaron un gel de agarosa al 0,8%, donde el inserto liberado aparece como una banda entre las bandas correspondientes a los brazos del vector (brazo izquierdo de 20 kb y brazo derecho de 9 kb) (Fig. 7). A partir de una curva de calibración construida con el estándar se determinó que el inserto tiene un tamaño de aproximadamente 14 kb en todos los clones (Fig. 8).

4.3.3. Caracterización de los clones λ typ53 realizando digestiones con enzimas de restricción

Los clones portadores del gen *p53* fueron digeridos con *SstI*, *NotI*, *SalI* y *EcoRI* por separado (Fig. 9, A y B) y por digestiones dobles combinando *EcoRI* con *SstI* y con *SalI* (Fig. 9, B). Se obtuvo el mismo patrón de bandas para los tres clones en este ensayo. El tamaño de las bandas obtenidas (Tabla 1) se calculó construyendo una curva de calibración en base a la migración y al tamaño de las bandas del estándar de tamaño molecular DNA λ *HindIII*. Se obtuvo el mismo tamaño de bandas para todos los clones λ typ53.

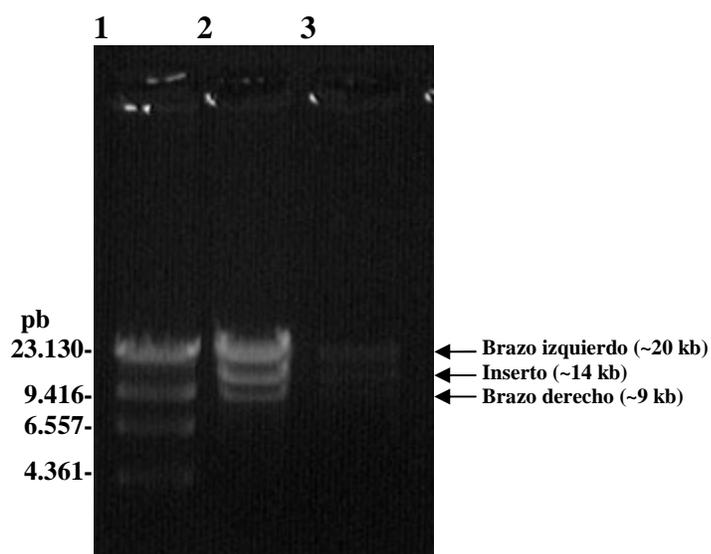


Figura 7: Determinación del tamaño del inserto de los clones λ typ53. Fraccionamiento electroforético de productos de digestión en un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: estándar de peso molecular DNA λ /*Hind*III; carril 2: DNA λ typ53-1.1/*Not*I; carril 3: DNA λ typ53-1.2/*Not*I.

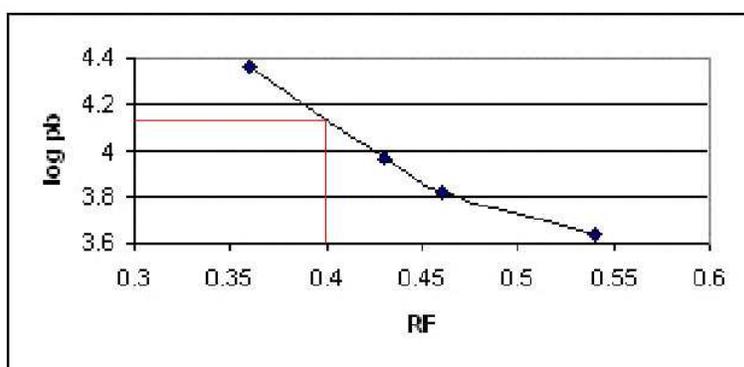


Figura 8: Curva de calibración para el cálculo del tamaño del inserto de los clones λ typ53.

El tamaño del inserto se obtuvo por interpolación (RF inserto = 0,4) de la curva construida a partir del logaritmo del tamaño (en pares de bases, pb) y RF (migración banda [cm]/4 cm) de las bandas del estándar de peso molecular DNA λ /HindIII.

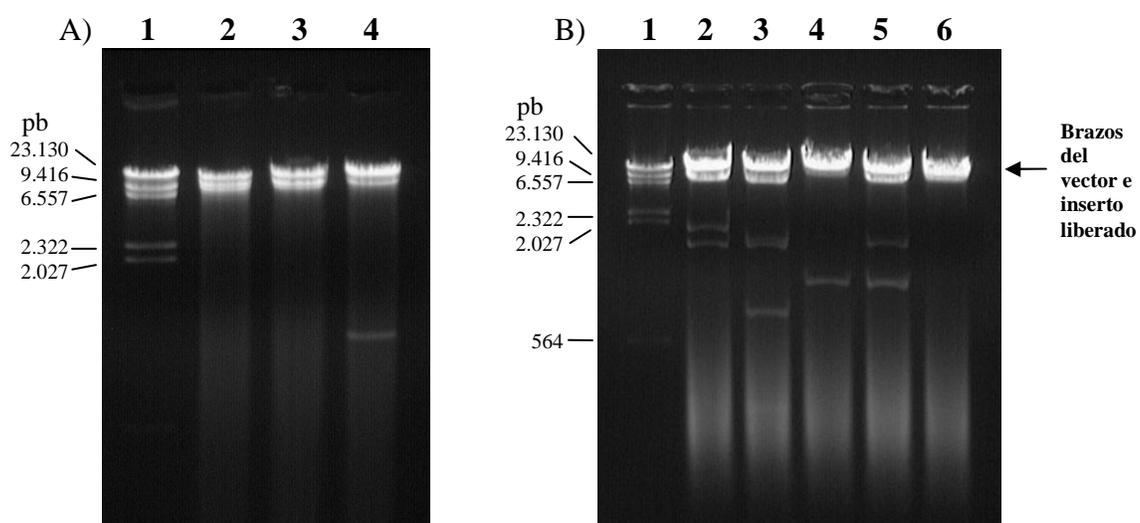


Figura 9: Análisis de los recombinantes λ tyr53 por digestión con enzimas de restricción.

Fraccionamientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Carril 1 en (A) y (B): estándar de peso molecular DNA λ /HindIII. (A) Digestiones DNA λ tyr53-

1.1. Carril 2: *NotI*; carril 3: *SalI*; carril 4: *EcoRI*. (B) Digestiones DNA λ tyr53-3.1. Carril 2: *SstI*;

carril 3: *SstI/EcoRI*; carril 4: *EcoRI*; carril 5: *SalI/EcoRI*; carril 6: *SalI*.

Tabla 1: Tamaño de los fragmentos obtenidos digiriendo el DNA del clon λ typ53-3.1 con distintas enzimas de restricción.

Banda	RF*	log pb	Tamaño (pb)
<i>Sst</i> I 1	0,35	3,2947	1.970
<i>Sst</i> I 2	0,40	3,2039	1.600
<i>Sst</i> I/ <i>Eco</i> RI 1	0,39	3,2220	1.670
<i>Sst</i> I/ <i>Eco</i> RI 2	0,40	3,2039	1.600
<i>Sst</i> I/ <i>Eco</i> RI 3	0,56	2,9132	820
<i>Eco</i> RI	0,49	3,0404	1.100
<i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI 1	0,40	3,2039	1.600
<i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI 2	0,49	3,0404	1.100

* RF= migración (cm)/4 cm

4.3.4. Clonación y secuenciación de un fragmento del clon λ typ53-1.1 obtenido por digestión doble con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI*

El DNA del clon λ typ53-1.1, digerido simultáneamente con *EcoRI* y *SacI*, fue ligado al vector pBluescript. Se obtuvieron 5 colonias: una blanca (subclon 1) y 4 azules (subclones 2 – 5) a las cuales se les extrajo DNA plasmidial. Éste se digirió con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, determinándose que sólo los subclones 1 y 2 portaban un inserto (Fig. 10).

El subclon 1 contenía un fragmento de ~1000 pb, el que se libera al digerir sólo con *EcoRI*. Al digerir el subclon 1 con las enzimas *EcoRI* y *SacI* simultáneamente el inserto se divide en dos fragmentos, de ~630 pb y de ~250 pb. Esto indica que no se trata de un clon portador de un inserto de interés, ya que no se libera intacto al digerir con *EcoRI* y *SacI*.

El subclon 2 contiene un inserto de ~1600 pb que se libera al digerir simultáneamente con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, coincidiendo con el tamaño de una de las bandas obtenidas al digerir el clon λ typ53-1.1 con las mismas enzimas. Esto sugiere que el inserto corresponde a un fragmento del clon λ typ53-1.1.

A los subclones 1 y 2 se les asignó los nombres ptyp53₁₀₀₀ y ptyp53₁₆₀₀ respectivamente, según el tamaño de sus insertos. Del clon ptyp53₁₆₀₀ se obtuvo la secuencia nucleotídica de un fragmento pequeño del inserto, lo que comprobó que se trata de un fragmento de la región 3' no traducida del gen *p53*. La obtención de la secuencia completa del inserto aún está pendiente.

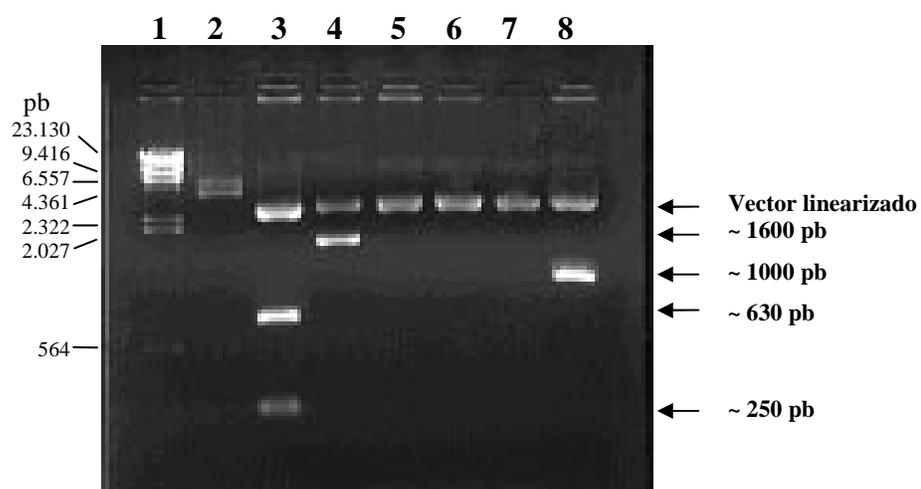


Figura 10: Caracterización de los subclones ptyp53. Liberación de los insertos de los subclones obtenidos en el vector pBluescript y fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al 1%. Carril 1: estándar de peso molecular DNA λ /HindIII; carril 2: DNA subclon 1 sin digerir; carriles 3-7: DNA subclones 1-5/*EcoRI/SacI*; carril 8: DNA subclon 1/*EcoRI*.

4.3.5. Construcción de un mapa físico parcial de los clones λ typ53 por análisis de Southern blot

El DNA de los clones λ typ53 digerido y fraccionado en geles de agarosa fue transferido a membranas de nitrocelulosa mediante la técnica de Southern blot.

En los tres clones se obtuvo el mismo resultado al hibridar las membranas con el DNA de las digestiones dobles con la misma sonda utilizada en el rastreo de la biblioteca genómica ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53₅₆₀). No se observó hibridación de la sonda con los fragmentos de restricción pequeños, pero sí en la zona superior de la membrana donde se encuentran las bandas de gran tamaño, correspondientes a los brazos del vector y a la parte principal del inserto. En las digestiones donde están presentes las enzimas *SacI* y *SalI* la sonda hibrida con el fragmento correspondiente al inserto liberado. En la digestión con *EcoRI* el inserto queda adherido al brazo derecho del vector, lo que se deduce por el mayor tamaño comparativo de esa banda (Fig. 11).

Otras membranas se hibridaron con el fragmento de ~1600 pb obtenido por subclonamiento, el que fue purificado y marcado con ^{32}P (sonda $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53₁₆₀₀). Se determinó que dicho fragmento corresponde a la banda de ~1670 pb generada por la digestión del clon λ typ53-1.1 con *EcoRI* y *SacI* simultáneamente. En las demás digestiones la sonda hibrida con los siguientes fragmentos (Fig. 12):

- *SacI*: ~1970 pb
- *EcoRI* y *SalI*: ~1600 pb e inserto
- *SalI*: inserto
- *EcoRI*: inserto adherido a uno de los brazos del vector

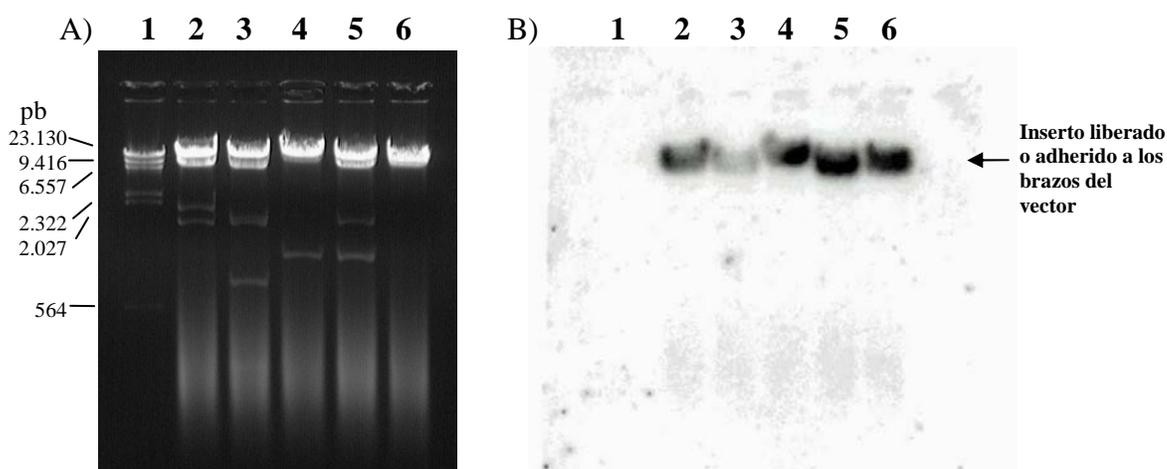


Figura 11: Análisis por Southern blot del recombinante λ typ53-3.1. (A) Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 1% que dio origen a la membrana utilizada en (B). (B) Análisis por Southern blot de las digestiones con enzimas de restricción del clon λ typ53-3.1 con la sonda $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53₅₆₀. Carril 1: estándar de peso molecular DNA λ /HindIII; carril 2: *Sst*I; carril 3: *Sst*I/*Eco*RI; carril 4: *Eco*RI; carril 5: *Sal*I/*Eco*RI; carril 6: *Sal*I. Tiempo de exposición: 24 horas.

Como el inserto tiene un tamaño de ~14 kb probablemente se generan los fragmentos que se observan en el gel de agarosa y quizás otros fragmentos muy pequeños para que el fragmento restante sea lo suficientemente grande para generar una banda a la altura de los brazos del vector o entre ellos. Además se sabe que la banda de ~1970 pb producida por digestión con *SacI* y que hibrida con la sonda $\alpha^{32}\text{P-dCTP-ptyp53}_{1600}$ tiene un sitio de corte para *EcoRI* ya que desaparece al digerir con *SacI* y *EcoRI* simultáneamente. En esa digestión se genera una nueva banda de ~1670 pb, la que también hibrida con la sonda $\alpha^{32}\text{P-dCTP-ptyp53}_{1600}$, sugiriendo que ese es el fragmento que dio origen a la sonda. Al digerir los clones simultáneamente con *EcoRI* y *SalI*, la sonda hibrida tanto con el fragmento de ~1600 pb como con el resto del inserto liberado y que está a la altura de los brazos del vector. Esto sugiere que el fragmento utilizado como sonda tiene un sitio de corte para *SalI*.

Por las secuencias nucleotídicas parciales de los clones λtyp53 , se sabe que en ellos está presente parte del exón 6, el intrón 6 y parte del exón 7 (secuencia correspondiente a la sonda $\alpha^{32}\text{P-dCTP-ptyp53}_{560}$ utilizada para el rastreo de la biblioteca genómica). Además se sabe que contienen una parte de la región 3' no traducida (presente en la sonda $\alpha^{32}\text{P-dCTP-ptyp53}_{1600}$). Con estos datos más la información obtenida en los análisis por Southern blot y con la información de que en *M. musculus* el gen *p53* tiene un tamaño aproximado de 12 kb se construyó un mapa físico parcial de los clones λtyp53 (Fig. 13).

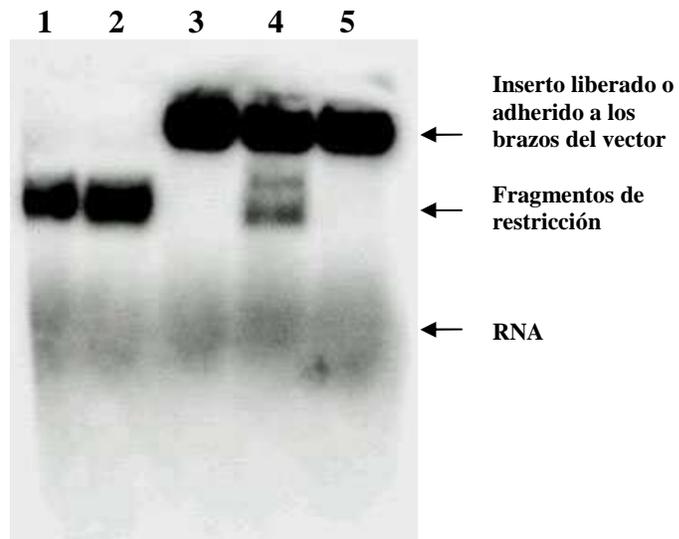


Figura 12: Análisis por Southern blot con la sonda $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53₁₆₀₀ de digestiones del DNA λ typ53-3.1 con enzimas de restricción. Carril 1: *Sst*I; carril 2: *Eco*RI/*Sst*I; carril 3: *Eco*RI; carril 4: *Eco*RI/*Sal*I; carril 5: *Sal*I. Tiempo de exposición: 6 hrs.

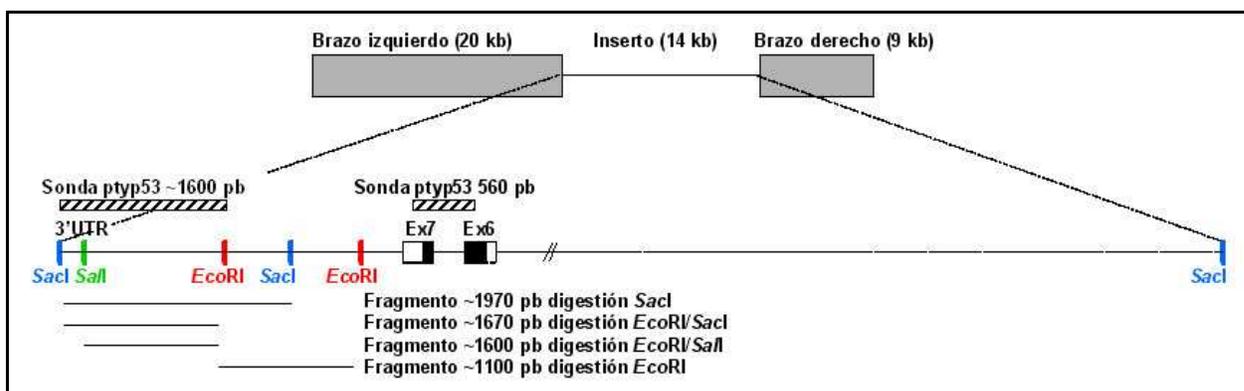


Figura 13: Mapa físico parcial de los recombinantes λ typ53. El mapa físico parcial revelado con las sondas exón 6–exón 7 ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53₅₆₀) y 3'UTR ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-ptyp53₁₆₀₀) indica que el inserto abarca todo el gen p53 (línea punteada). Línea negra: secuencia parcial del gen *p53* de *T. barrerae*; cajas: exones parciales; líneas rayadas: sondas. En color se indican los sitios de restricción determinados por análisis por Southern Blot en la región cercana al brazo izquierdo del vector.

4.4. Obtención de líneas celulares estables de *Tympanoctomys barrerae*

4.4.1. Cultivo primario

Para establecer un cultivo primario se envió el pulmón del animal #1755 M.H.G (hembra) y de un feto de la misma hembra al Instituto de Microbiología e Higiene de la Universidad de Regensburg, Alemania. Al cabo de una semana de cultivo comenzaron a crecer fibroblastos a partir de los explantes, prosperando sólo una pequeña fracción de ellos. Algunos de estos fibroblastos sufrieron una transformación espontánea y comenzaron a proliferar, generando una línea celular que recibió el nombre de TBL. Esto permitió almacenar células en nitrógeno líquido para ensayos posteriores de transfección de genes virales.

4.4.2. Transformación de células eucarióticas

Se realizaron dos ensayos de transfección consecutivos con distintas combinaciones de genes del adenovirus tipo 5 (E1A, E1B, E4orf6), con el gen “large T antigen” del virus SV40 y el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) (Tabla 2).

En el primer ensayo de transfección, mediante el método del fosfato de calcio, se utilizaron sólo las células de la línea celular TBL. La transfección con el gen GFP se realizó para determinar la eficiencia de transfección, la que fue muy baja para el método del fosfato de calcio. Al tercer día de transfección sólo se vieron bajo microscopio 2 células verdes fluorescentes por placa de crecimiento casi confluyente. A pesar de este resultado se obtuvieron 8 líneas celulares de este ensayo: 4 mono- y 4 policlonales (Tabla 3).

Tabla 2: DNA plasmidial utilizado para diferentes ensayos de transfección.

Plasmidio (μg)	Número de Ensayo						
	1	2	3	4	5	6	7
EGFP	5						
pcDNA3-SV40 LagreT Antigen		2,5	5				
ppG-S2-TNEX6*				5	5	5	
pcDNA3-E4orf6					2,5	5	
pCMV-E1A 12s							3

*TNEX6 corresponde a la región E1 completa del adenovirus tipo 5, por lo que contiene los genes E1A y E1B.

Tabla 3: Genes transfectados y líneas celulares obtenidas para cada transfección del primer ensayo.

Transfección N°	Genes (cantidad plasmidio)	Policlonal	Monoclonales
1	EGFP (5 µg)	-	-
2	SV40 Large T Antigen (2,5 µg)	-	-
3	SV40 Large T Antigen (5 µg)	-	-
4	E1A-E1B (5 µg)	TBL1-4	TBL1-4I, 4III y 4IV
5	E1A-E1B (5 µg), E4orf6 (2,5 µg)	TBL1-5	-
6	E1A-E1B (5 µg), E4orf6 (5 µg)	TBL1-6	-
7	E1A (3 µg)	TBL1-7	TBL1-7I

Para aumentar la eficiencia de transfección se introdujo el gen GFP en células TBL utilizando otros dos métodos además del fosfato de calcio: DMRIE-C y Lipofectamin 2000. En cada placa de crecimiento casi confluyente se contaron bajo microscopio las células verdes de 9 campos con el aumento 10X. En promedio se observó una célula verde fluorescente por campo en la placa transfectada con fosfato de calcio, 3 células en la transfectada con DMRIE-C y 14 células en la transfectada con Lipofectamin 2000. Se escogió el método de la lipofectamina para el segundo ensayo de transfección, para el cual se utilizaron células TBL y de feto. De este segundo ensayo de transfección se obtuvieron 22 líneas monoclonales y 9 policlonales (Tabla 4), debido a que el método que utiliza lipofectamina puede ser hasta 80 veces más eficiente que el del fosfato de calcio (Felgner y col, 1987).

Tabla 4: Genes transfectados y líneas celulares obtenidas para cada transfección del segundo ensayo.

Tipo celular	N° Ensayo	Genes (cantidad plasmidio)	Policlonal	Monoclonales
TBL	1	EGFP (5 µg)	-	-
TBL	2	SV40 Large T Antigen (2,5 µg)	TBL2-2	-
TBL	3	SV40 Large T Antigen (5 µg)	TBL2-3	-
TBL	4	E1A-E1B (5 µg)	TBL2-4	TBL2-4II, 4III y 4IV
TBL	5	E1A-E1B (5 µg), E4orf6 (2,5 µg)	TBL2-5	TBL2-5II y 5III
TBL	6	E1A-E1B (5 µg), E4orf6 (5 µg)	TBL2-6	TBL2-6III
TBL	7	E1A (3 µg)	TBL2-7	TBL2-7II, 7III y 7IV
Feto	1	SV40 Large T Antigen (2,5 µg)	-	-
Feto	2	SV40 Large T Antigen (5 µg)	-	-
Feto	3	E1A-E1B (5 µg)	TBE-3	TBE-3I, 3II, 3V y 3VI
Feto	4	E1A-E1B (5 µg), E4orf6 (2,5 µg)	TBE-4	TBE-4II, 4III, 4IV, 4VI y 4VII
Feto	5	E1A-E1B (5 µg), E4orf6 (5 µg)	-	-
Feto	6	E1A (3 µg)	TBE-6	TBE-6I, 6III, 6IV y 6VII

4.4.3. Caracterización de las líneas celulares obtenidas

4.4.3.1. Construcción de curvas de crecimiento

Al construir las curvas de crecimiento se determinó que las células de inmortalización espontánea (TBL) se multiplican a menor velocidad que las células control (BRK1 y AB120). De estas células control, la primera se originó por transformación espontánea (Endter y col, 2005) y la segunda, por transfección de genes adenovirales (Endter y col, 2001). Sin embargo, el crecimiento de las células TBL es sostenido a bajas concentraciones de SBF (5%), lo que avala su transformación espontánea (Crane, 1999) (Fig. 14). De la curva de crecimiento se puede deducir además que el tiempo de duplicación de las células TBL es de ~1,8 días en condiciones óptimas de espacio y de cultivo. Por ejemplo, una placa de las células espontáneamente inmortalizadas se mantuvo en cultivo constante durante algunos meses hasta alcanzar 60 pasajes. Esto equivaldría aproximadamente a unas 100 - 130 divisiones, considerando el tiempo de duplicación y que los pasajes se realizaban cada 3 - 4 días. Una tasa mitótica tan alta no habría sido posible con fibroblastos no inmortalizados, ya que este tipo celular en roedores sólo resiste de 15 a 30 divisiones in vitro (Sherr y DePinho, 2000).

Al comparar el crecimiento de las células obtenidas a partir de las células TBL transfectadas con genes adenovirales de expresión temprana (TBL1-4 y TBL1-7) con el de las células TBL originales, se observó un aumento en la velocidad de crecimiento de las primeras (Fig. 15). No hubo crecimiento de células en el medio suplementado con 0,1% de SBF, dado que sólo las líneas celulares muy oncogénicas crecen en esas condiciones de cultivo (Nevels y col, 1999).

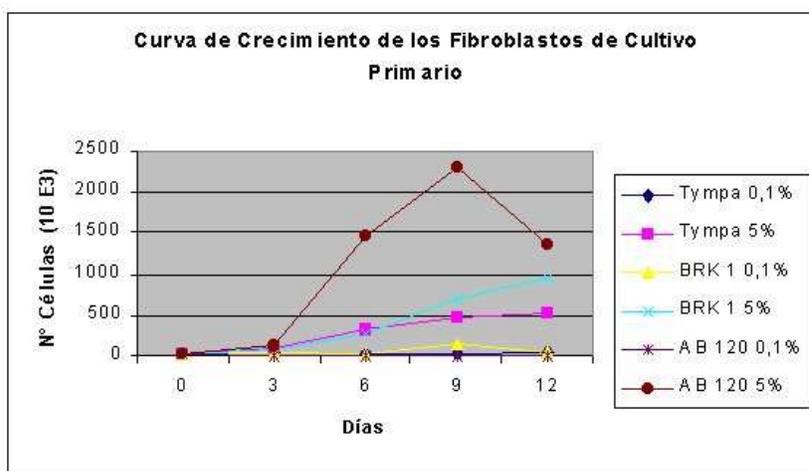


Figura 14: Curva de crecimiento de células TBL. Comparación del crecimiento de los fibroblastos espontáneamente transformados (TBL) con el crecimiento de líneas celulares control (BRK1 y AB120). Cada tipo celular se cultivó en presencia de 0,1 y 5% de SBF en el medio. Tympa: células TBL.

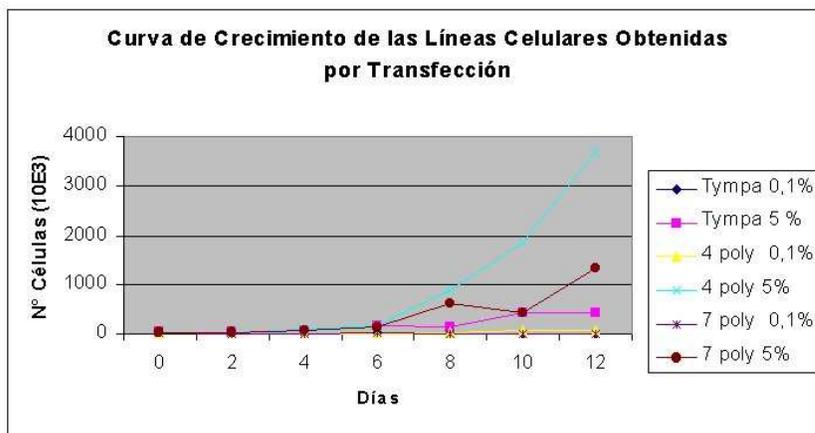


Figura 15: Curva de crecimiento de las células TBL1-4 y TBL1-7. Comparación del crecimiento de las líneas celulares TBL1-4 y TBL1-7 obtenidas por transfección de genes adenovirales con el crecimiento de las células TBL de transformación espontánea. Cada tipo celular se cultivó en presencia de 0,1 y 5% de SBF en el medio. Tympa: células TBL, 4 poly: células TBL1-4 y 7 poly: células TBL1-7.

4.4.3.2. Evaluación de la resistencia de células TBL a NaCl

Debido a que el hábitat de *T. barrerae* es muy rico en sal (Ojeda y col, 1996), se estudió si las células de cultivo primario tenían mayor tolerancia a la NaCl que otras células. Efectivamente las células TBL con bajo número de pasajes (10 pasajes) crecen mejor en presencia de altas concentraciones de NaCl en el medio que las células control (Fig. 16).

En efecto, las células TBL generan seis veces más células que lo originalmente sembrado después de 6 días de cultivo en medio con 100% de NaCl adicional (100 T). En contraste, las células control sólo duplican su número en las mismas condiciones (100 B). A concentraciones más altas de NaCl, las células control mueren a los 3 días (primer recuento), mientras que las células TBL mantienen el número original por lo menos durante 6 días (tiempo que duró el ensayo) en presencia de 200% de NaCl adicional (200 T). Las células TBL murieron cuando las concentraciones de NaCl en el medio aumentaban en 300 y 400%.

Al realizar este experimento con células TBL con 20 pasajes no se observó el mismo nivel de resistencia a NaCl (resultados no mostrados).

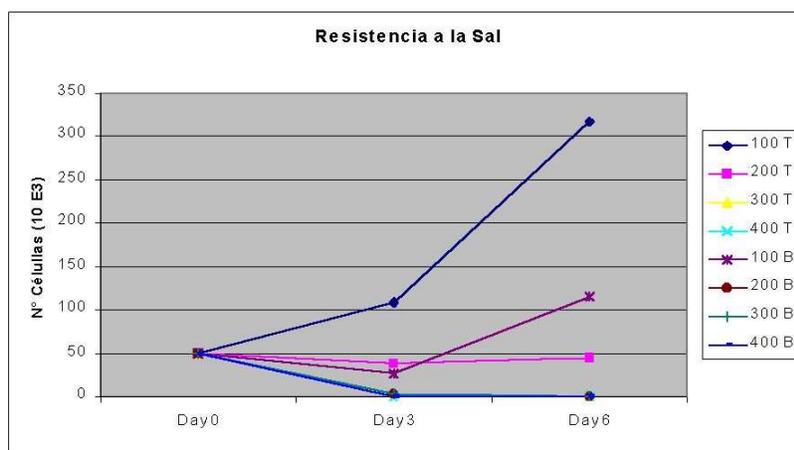


Figura 16: Evaluación de la resistencia de las células TBL a NaCl. Curva de crecimiento en concentraciones ascendentes de NaCl en el medio (100, 200, 300 y 400%). Concentración de SBF en el medio: 5% para BRK1 y 10% para TBL. Contenido normal de NaCl en el medio: 0,16 M.

4.4.3.3. Detección de proteínas adenovirales y p53 por inmunofluorescencia y análisis de Western blot

Para determinar si las líneas celulares obtenidas por transfección de genes adenovirales expresaban los productos de esos genes, se detectó la presencia de las proteínas E1A y E1B en las células por inmunofluorescencia y Western blot. Se utilizaron los mismos métodos para detectar la proteína p53, cuyos niveles intracelulares son afectados por los genes adenovirales introducidos (Endter y Dobner, 2004).

En la línea celular TBL1-4 fue posible detectar por inmunofluorescencia la expresión de la proteína adenoviral E1B (Figs. 18 y 19), acumulada en un cuerpo perinuclear. También se detectó p53 (Fig. 19), distribuída en forma similar a E1B en la célula. A pesar de que esa línea celular también contiene el gen que codifica para E1A, no fue posible detectar su expresión por inmunofluorescencia (Fig. 18). Sin embargo, fue posible detectarla con el método de Western blot, donde se observa una baja expresión de E1A en comparación con E1B (Fig. 20). En la línea celular TBL1-7 se detectó la expresión de E1A tanto por inmunofluorescencia como por Western blot (Figs. 17 y 20), siendo su distribución difusa en todo el núcleo de la célula.

Mediante Western blot se observa que la expresión de p53 está aumentada en las células transfectadas (TBL1-4 y TBL1-7) respecto de los niveles de p53 detectados en la línea TBL de inmortalización espontánea (Fig. 21).

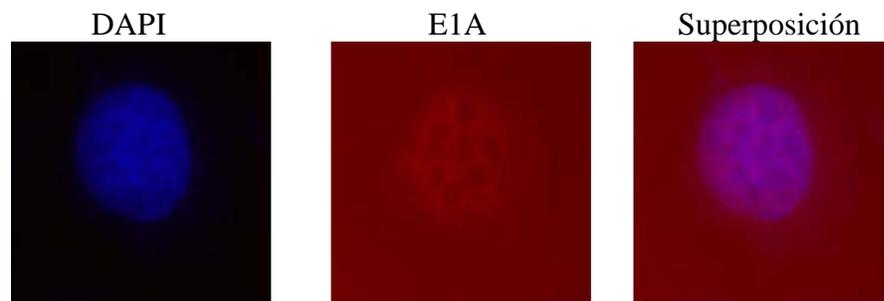


Figura 17: Detección de la proteína adenoviral E1A en la línea celular TBL1-7 utilizando inmunofluorescencia. Anticuerpo primario M73 (anti-E1A de ratón) y secundario IgG anti-ratón conjugado con Texas red (dilución 1:100). Magnificado 260 veces.

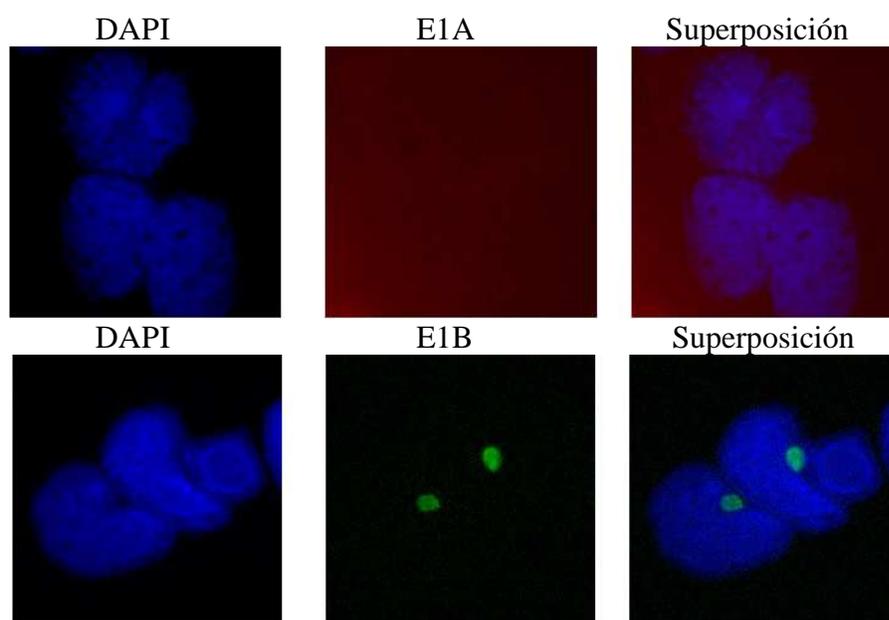


Figura 18: Detección de las proteínas adenovirales E1A y E1B en la línea celular TBL1-4 utilizando inmunofluorescencia. Anticuerpos primarios: anti-E1A de ratón (M73) y anti-E1B de rata (2A6). Anticuerpos secundarios IgG anti-ratón conjugado con Texas red e IgG anti-rata conjugado con FITC (dilución 1:100). Magnificado 260 veces.

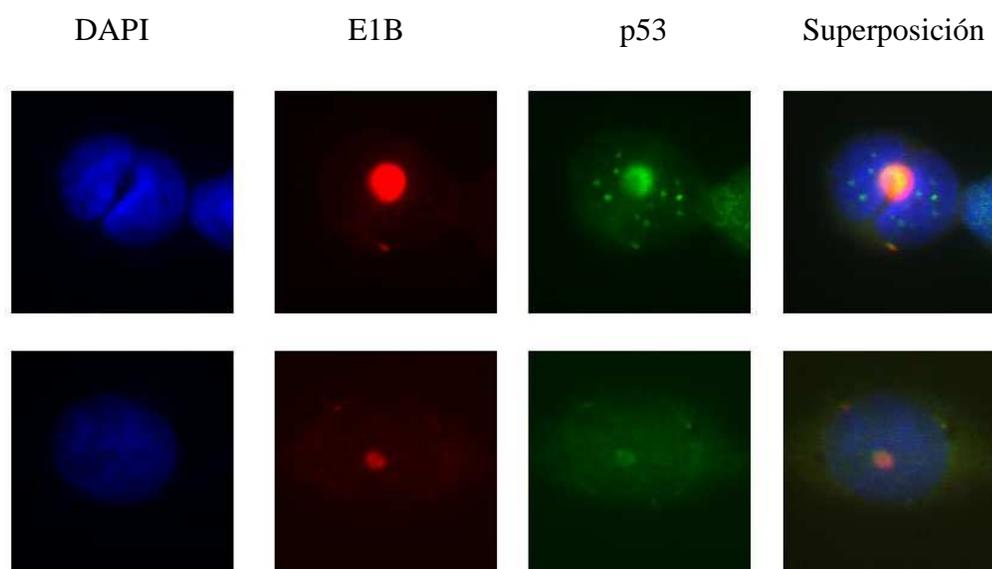


Figura 19: Detección de la proteína adenoviral E1B y de p53 en la línea celular TBL1-4 utilizando inmunofluorescencia. Anticuerpos primarios: anti-E1B de rata (2A6) y anti-p53 de ratón (Pab421, dilución 1:10). Anticuerpos secundarios IgG anti-rata conjugado con Texas red e IgG anti-ratón conjugado con FITC (dilución 1:100). Magnificado 225 veces.

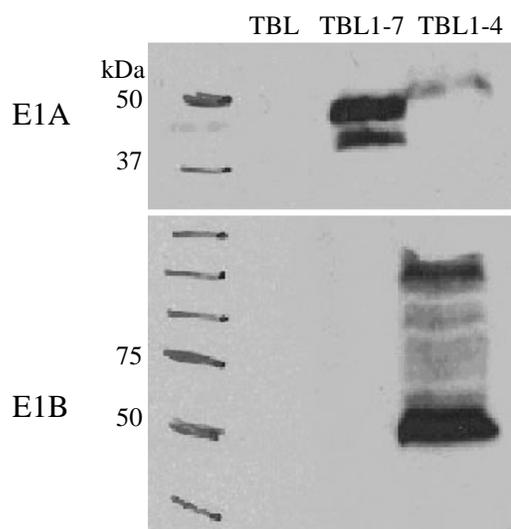


Figura 20: Detección de las proteínas adenovirales E1A y E1B en las líneas celulares TBL, TBL1-4 Y TBL1-7 por Western blot.

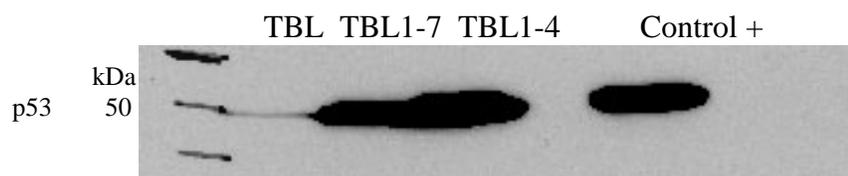


Figura 21: Detección de p53 en las líneas celulares TBL, TBL1-4 y TBL1-7 por Western blot.

4.4.3.4. Documentación de la morfología celular

La morfología de las células TBL, TBL1-4 y TBL1-7, observada mediante microscopía de contraste de fases, indica que las células TBL mantienen la forma de fibroblastos normales (Fig. 22-A), lo que no ocurre con las células transfectadas con los genes adenovirales de expresión temprana. Las células TBL1-7, transfectadas sólo con E1A, conservan una morfología más parecida a la original. Sin embargo, entre las células alargadas similares a fibroblastos se observan células redondeadas, producto de la inmortalización y transformación parcial producida por E1A (Fig. 22-B) (Endter y Dobner, 2004).

Las células TBL1-4 muestran una morfología totalmente diferente a la original, observándose células irregulares de tamaño variable y multinucleadas gigantes (Fig. 22-C). Estos efectos son producto de la transformación completa ocurrida con estas células gracias a la acción conjunta de las proteínas adenovirales E1A y E1B-55kDa (Endter y Dobner, 2004).



Figura 22: Documentación de la morfología de las células TBL (A), TBL1-7 (B) y TBL1-4 (C). Fotografías tomadas en microscopio de contraste de fases. Magnificación: (A) 115 veces, (B) y (C) 15 veces.

4.5. Obtención de placas metafásicas de células de cultivo

Para obtener cromosomas de las líneas celulares se dividieron las células de una placa que presentaba crecimiento confluyente en tres placas nuevas, las que se incubaron hasta obtener un 60% de confluencia (aproximadamente 2 días) (Fig. 23). Luego se agregó colchicina al medio de cultivo, se incubaron las células de 2 a 3 horas con este compuesto y se prepararon los cromosomas. Al observar las preparaciones al microscopio en el aumento menor (10X) se aprecian aproximadamente 10 placas metafásicas por campo. La obtención de cromosomas con el tamaño ideal para los diferentes estudios citogenéticos y moleculares a realizar se puede ajustar cambiando el tiempo de incubación de las células con colchicina. Por lo expuesto anteriormente, este procedimiento permite obtener en un corto tiempo una gran cantidad de cromosomas de buena calidad. Este rendimiento es óptimo para estudios de citogenética molecular, dado que se requiere gran cantidad de material para lograr buenos resultados.



Figura 23: Placa metafásica obtenida de células de cultivo primario de *T. barrerae*

5. DISCUSIÓN

La poliploidización y la duplicación génica se consideran eventos fundamentales en la evolución de los organismos desde que Ohno publicara en el año 1970 el libro “Evolution by gene duplication” (Spring, 2002). Ohno postula que habrían ocurrido dos rondas de duplicaciones genómicas en etapas tempranas de la evolución de los vertebrados (David y col, 2003; Furlong y Holland, 2001; Seoighe, 2003), teoría que en la actualidad, más de 30 años después de su publicación, es ampliamente aceptada (Holland, 1999).

La principal contribución de la duplicación génica a la evolución es que provee de nuevo material genético que puede ser modificado por mutaciones, deriva y selección, sin desventajas para el organismo, resultando en genes con funciones nuevas o más especializadas (Taylor y Raes, 2004; Zhang, 2003). Sin duplicación génica la plasticidad adaptativa de genomas o especies sería muy limitada debido a la existencia de no más de dos variantes o alelos en cualquier locus en un individuo diploide (Zhang, 2003).

En genes recientemente duplicados, la selección que previene la aparición de mutaciones está relajada (Otto y Whitton, 2000; Rodin y Riggs, 2003). Esto permite que el destino de los genes duplicados finalice en (i) pseudogenización: pérdida del gen por acumulación de mutaciones deletéreas, (ii) conservación de la función mediante evolución concertada para aumentar los niveles de proteína o RNA producidos, (iii) subfuncionalización: partición de las funciones del gen original en las dos copias generadas luego de la duplicación o expresión diferencial de las copias según tejido o estado del desarrollo y (iv) neofuncionalización: adquisición de una nueva función por mutaciones beneficiosas (Taylor y Raes, 2004; Teshima y Innan, 2004; Wolfe, 2001; Zhang, 2003).

El destino más frecuente de los genes duplicados sería la pseudogenización, lo que ocurriría en más de un 90% de los casos (Rodin y Riggs, 2003). Sin embargo, el análisis de poliploides antiguos sugiere que en realidad se conserva una mayor proporción de los genes duplicados y por un mayor período de tiempo que lo predicho con anterioridad (Otto y Whitton, 2000; Rodin y Riggs, 2003). Recientemente se ha descubierto que en un primer momento parece ocurrir con mayor frecuencia una subfuncionalización en los genes duplicados, proceso que podría verse favorecido por silenciamiento epigenético (Liu y Wendel, 2003; Rodin y Riggs, 2003). Este fenómeno se ha visto en genes duplicados que se expresan en forma diferencial dependiendo del tejido o del estado de desarrollo (Rodin y Riggs, 2003), así como en la producción de genomas altamente diploidizados en organismos poliploides (Comai, 2005; Liu y Wendel, 2003; Rodin y Riggs, 2003; Soltis y Soltis, 1995).

Se ha reportado además el crecimiento de la red de regulación génica por duplicación de genes que codifican para factores de transcripción, genes blanco o de ambos, de tal forma que se pueden establecer sofisticadas regulaciones de la expresión génica (Teichmann y Babu, 2004; Zhang, 2003). Sin embargo, la expresión génica luego de un evento de duplicación no sólo dependería de la red de regulación, sino además de la estructura local de la cromatina, que se modifica al haber mayor cantidad de DNA de lo normal en el núcleo (Liu y Wendel, 2003; Zhang y col, 2004).

El descubrimiento de una especie de mamífero tetraploide natural como lo es *Tympanoctomys barrerae* (Gallardo y col, 1999), entrega una herramienta única para estudiar si en un mamífero con el genoma duplicado ocurre una amplia reorganización del genoma luego del evento de duplicación, como ocurre en poliploides vegetales (Ozkan et al, 2001). En éstos ocurren cambios estructurales en genes y cromosomas, como también modificaciones en la

regulación de la expresión génica. Además se ha detectado amplificación o eliminación de secuencias específicas e intercambio de secuencias entre los genomas que se unieron en el caso de un alopoliploide (Adams y Wendel, 2005).

El gen *p53* es fundamental en la regulación del ciclo celular, reparación de daño en el DNA y mantención de la estabilidad genómica (Fig. 24) (Chowdhury y col, 2006; Chumakov, 2000; Song, 2005). Dado que en la etapa de establecimiento de un poliploide su genoma pasa por un período de inestabilidad debido a grandes modificaciones y reordenamientos (Adams y Wendel, 2005; Ozkan y col, 2001; Storchová y col, 2006), se puede inferir que *p53* jugaría un rol fundamental en el proceso de establecimiento de un poliploide animal.

Al respecto, se ha propuesto la participación de *p53* en un punto de control de tetraploidía, el que detendría el ciclo celular en la fase G1 en células en que haya fallado la citoquinesis (Andreassen y col, 2001). Sin embargo, la existencia de este punto de control de tetraploidía ha sido cuestionada (Uetake y Sluder, 2004; Wong y Stearns, 2005) debido a la existencia natural de animales y de ciertos tipos celulares poliploides (Stukenberg, 2004). A pesar de lo anterior, no se puede desconocer la participación de *p53* en prevenir la aparición de células poliploides en cultivo *in vitro*, ya que en diversos estudios la incidencia de poliploidía es muchísimo mayor en células carentes de *p53* que en células donde presenta actividad normal (Fujiwara, 2005; Shi y King, 2005; Stukenberg, 2004). A pesar de lo anterior, la participación de *p53* en monitorear eventos de poliploidización *in vivo* aún debe ser confirmada (Stukenberg, 2004), siendo muy interesante el estudio de esta proteína en una especie poliploide natural como el roedor *T. barrerae*.

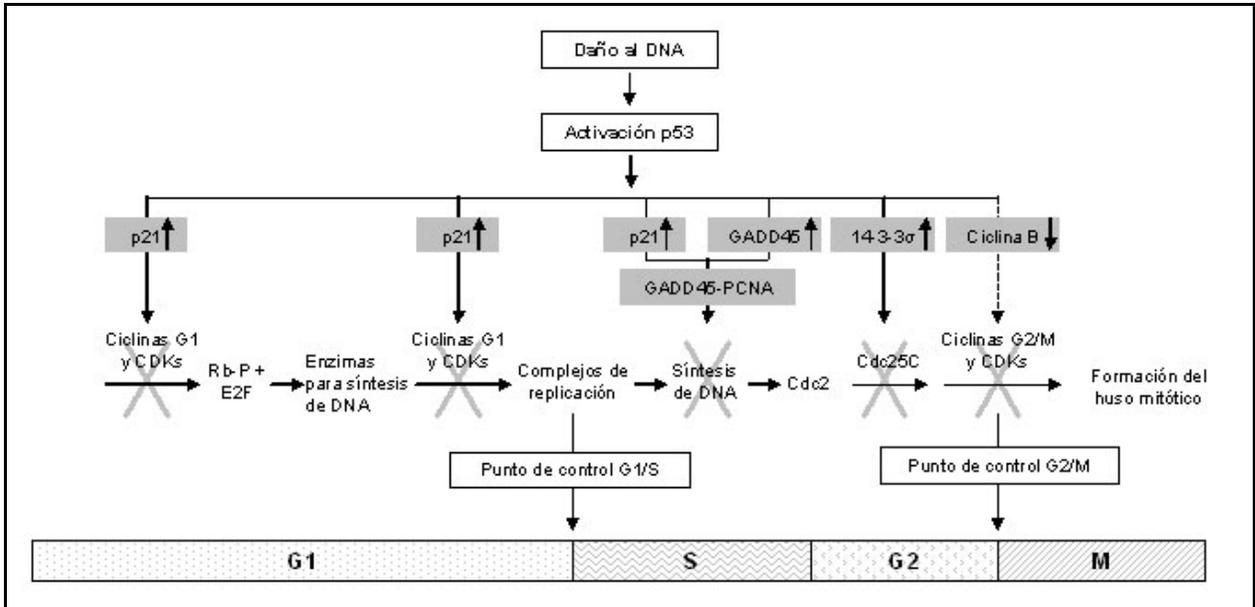


Figura 24: Participación de p53 en la regulación del ciclo celular. Frente a daños en el DNA se activa p53 y, mediante la regulación de la expresión de genes específicos, detiene el ciclo celular promoviendo la reparación del DNA. p21 bloquea la transcripción de enzimas necesarias para síntesis de DNA y activación de complejos de replicación. GADD45-PCNA reduce la procesividad de la DNA polimerasa bloqueando la síntesis de DNA. 14-3-3 σ bloquea la activación del complejo Ciclina B-Cdc2, deteniendo el ciclo celular en la transición G₂/M (adaptado de Hartl y Jones, 2005).

La caracterización parcial del gen *p53* en *T. barrerae* incluyó la amplificación de un fragmento del gen y su utilización como sonda para rastrear la biblioteca genómica, aislándose fagos recombinantes portadores del gen *p53* completo o parte de él como inserto. Lo anterior permitirá el análisis futuro de secuencias y la determinación del número de alelos del gen *p53* presentes en la especie.

El mapa físico de los recombinantes se construyó digiriendo el DNA con diferentes enzimas de restricción y analizándolo por Southern blot. En todos los clones se obtuvo el mismo patrón de bandas, el mismo tamaño de inserto y el mismo patrón de hibridación con las sondas utilizadas. Esto sugiere que todos los clones podrían corresponder al mismo fago recombinante. Sin embargo, los clones aislados podrían portar alelos diferentes del gen *p53*, a pesar de que la metodología utilizada no lo demuestre. En este caso se realizaron digestiones con enzimas de restricción, las que sólo generarían un patrón de bandas distinto si las diferencias entre las secuencias nucleotídicas de los clones modificaran uno de los sitios de restricción para las enzimas utilizadas (Lodish y col, 2005). Para determinar si efectivamente hay más de un alelo del gen *p53* presente en los clones aislados es necesario comparar las secuencias nucleotídicas completas de sus insertos.

Al subclonar uno de los fragmentos generados por digestión con enzimas de restricción y analizar parte de su secuencia, se comprobó que se trataba de un fragmento correspondiente a la región 3' no traducida del gen *p53*. Esto indicaría que todos los clones contienen al menos la región del gen comprendida entre el exón 6 y el extremo 3' del gen. Esta información, sumada a la ubicación central dentro del inserto de la región comprendida entre los exones 6 y 7 y la longitud del inserto, podrían indicar que los recombinantes aislados contienen el gen completo o por lo menos la región codificante completa. Esta inferencia se apoya en que tanto en

M. musculus como en humanos el primer exón del gen *p53* es no codificante y el primer intrón tiene un tamaño de ~6 y ~10 kb respectivamente (Bienz y col, 1984; Bienz-Tadmor et al, 1985; Reisman y col, 1988). Esta suposición es válida sólo si el gen *p53* de *T. barrerae* tiene un tamaño similar al gen *p53* de *M. musculus*, que abarca aproximadamente 12 kb (Bienz y col, 1984).

El aislamiento y la caracterización de los clones λ typ53 provee de material para la preparación de sondas homólogas para detectar el número de alelos del gen *p53* en *T. barrerae* por análisis de FISH (fluorescence in situ hybridization). La efectividad de utilizar sondas para FISH preparadas a partir de fagos recombinantes ya fue demostrada con anterioridad en el estudio que logró confirmar la duplicación del gen *Hoxc8* en *T. barrerae* (Gallardo y col, 2006). Además de la obtención de la sonda, el otro paso crítico para poder realizar análisis de FISH es la obtención de buenas placas metafásicas (Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000). Al respecto, se obtuvieron excelentes resultados gracias al establecimiento de las líneas celulares de *T. barrerae*. El análisis por FISH del número de alelos del gen *p53* presentes en las células de *T. barrerae* permitirá determinar si se han mantenido las cuatro copias del gen *p53* después del proceso de diploidización que ha ocurrido en su genoma (Gallardo et al, 2006). Además, el análisis de las secuencias de los recombinantes aislados no sólo permitiría determinar si entre ellos se encuentra más de un alelo del gen *p53*, sino también analizar la estructura intrónica y exónica del gen. Si el gen estuviera completo, la presencia de la región 5' no traducida permitiría analizar la región promotora del gen para estudiar cómo es regulada su transcripción y establecer así comparaciones con mamíferos diploides.

Es conocido que las especies poliploides suelen tener una mayor capacidad de adaptación al ambiente de lo que se observa en sus progenitores diploides. Esta observación se basa en el hecho que su mayor heterocigocidad y flexibilidad metabólica les confieren tolerancia a un

espectro más amplio de condiciones ambientales (Otto y Whitton, 2000; Ozkan y col, 2001). Esta mayor tolerancia ambiental parece ser también el caso de *T. barrerae*, especialista del desierto muy bien adaptado a consumir grandes cantidades de sal en su dieta, dado que habita en salares y dunas del centro-oeste de Argentina (Díaz y col, 2000; Ojeda et al, 1999).

El aumento de los niveles de NaCl en el medio de cultivo de células *in vitro* causa detención del crecimiento debido al aumento de la expresión de proteínas inducidas por p53, sugiriendo su activación en respuesta a estrés osmótico (Dmitrieva y col, 2000). Además se ha comprobado que el aumento de NaCl en el medio hasta una osmolaridad de 600 mosm/kg incrementa los niveles intracelulares de p53 y de su estado fosforilado, el que ejerce un efecto protector. A mayores niveles de osmolaridad p53 causa apoptosis (Dmitrieva y col, 2000; Friis y col, 2005). La activación de p53 al someter células a estrés osmótico se debería a que la hipertoncidad induce rupturas en la doble hebra de DNA, desencadenando los procesos de reparación de éste (Wang y col, 2005).

El estudio de la tolerancia osmótica de las células de *T. barrerae* confirmó que éstas tienen una mayor tolerancia a la sal que las células control. La capacidad de adaptarse a un ambiente salino podría estar relacionada con su condición de tetraploide como ha sido reportado para diferentes especies vegetales (Otto y Whitton, 2000; Ozkan y col, 2001). Sin embargo, al repetir el experimento de resistencia a NaCl con células con un mayor número de pasajes, no se obtuvo el mismo nivel de resistencia. Esto se debió probablemente a la adaptación de las células a las condiciones de cultivo *in vitro* y a su mayor lejanía de las células originales. Las líneas celulares transformadas pierden varias características de las células de cultivo primario de las que derivan, debido a alteraciones fenotípicas y funcionales producidas por los continuos pasajes *in vitro* (Crane, 1999; Zimmermann, y col, 2001).

Para realizar el estudio mencionado anteriormente fue necesario establecer líneas celulares de este roedor. La transfección de células de cultivo primario con genes de expresión temprana del adenovirus tipo 5, específicamente de las regiones E1A y E1B, produce la immortalización de las células y su transformación en células con potencial oncogénico (Endter y Dobner, 2004). Este mismo efecto se logra por transfección del gen que codifica para la proteína “large T antigen” del virus SV40 (DeAngelis y col, 2006; Borges y DeCaprio, 2006). En comparación con células de cultivo primario, las líneas celulares inmortales tienen bastantes ventajas: (i) pueden soportar continuos pasajes *in vitro*, (ii) no es necesario volver al sacrificio de animales como fuente de células ni de tejido, (iii) son clonales, por lo que son relativamente homogéneas en fenotipo y genotipo, exhibiendo propiedades estables que favorecen la reproducibilidad de los experimentos y (iv) pueden ser almacenadas por varios años en nitrógeno líquido, estando disponibles en grandes cantidades dentro de un corto período de tiempo después de descongeladas (Crane, 1999).

En algunas especies, como por ejemplo en ratones, una proporción de las células de cultivo primario (usualmente fibroblastos) se puede “transformar” espontáneamente, creciendo más rápido y transformándose en el tipo celular dominante (Christman y col, 2006; Crane, 1999). Estas células se pueden cultivar infinitamente, adquieren la capacidad de crecer en medio con bajo contenido de suero bovino fetal (SBF, aporta factores de crecimiento) y son consideradas inmortales (Crane, 1999). La transformación espontánea de algunas de las células de cultivo primario se evidenció por un aumento en la velocidad de crecimiento de las células y por la adquisición de la capacidad de crecer en presencia de menores concentraciones de SBF en el medio (5%) que las células originales (20%). Al establecer un cultivo primario frecuentemente se suplementa el medio de cultivo con una cantidad de SBF alta, cercana al 20% p/v, mientras que

las líneas celulares estables se cultivan en presencia de 5 – 10% p/v de SBF (Bian y col, 2005; Pérez-Reyes y col, 1992).

A pesar del aumento en la velocidad de crecimiento de las células de cultivo primario, no había certeza de la transformación espontánea, ya que las células podrían detener su ciclo celular entrando la etapa de senescencia replicativa, como ocurre después de un cierto número de duplicaciones *in vitro* (Bian y col, 2005; Goldstein, 1990). Por esta razón se llevó a cabo la transfección de estas células con genes virales, para asegurar la obtención de líneas celulares inmortales.

Durante el proceso de transformación oncogénica que ocurre en células transfectadas con genes adenovirales la expresión del gen E1A tiene un rol esencial, pero, sin la co-transfección de E1B, produce solamente immortalización y transformación parcial de las células (Endter y col, 2001). Esto se evidencia porque las células crecen a menor velocidad que células completamente transformadas, no alcanzan grandes densidades de crecimiento y rara vez producen tumores en animales (Nevels y col, 1999). Las propiedades transformantes de E1A se deben a que induce la síntesis de DNA y la proliferación celular al interactuar con reguladores clave de la transcripción, ciclo celular, apoptosis y degradación de proteínas y modular su función (Endter y Dobner, 2004; Nevels y col, 1999). Paradójicamente, por las funciones antes descritas de E1A, los productos de este gen también estimulan la apoptosis y la detención del ciclo celular al estabilizar a la proteína p53 e inhibir su degradación en el proteosoma (Endter y col, 2005). Estos efectos proapoptóticos y de detención del ciclo celular son contrarrestados por los productos del gen E1B, los que no tienen capacidad transformante por sí solos, pero junto a E1A producen la transformación completa de las células (Endter y col, 2005; Nevels y col, 1999). E1B 55-kDa, uno de los productos del gen E1B, actúa como un represor transcripcional dirigido a promotores activados

por p53 al unirse y bloquear a este factor de transcripción (Fig. 25) (Endter y Dobner, 2004; Nevels y col, 1999). El grado de transformación de las células transfectadas con genes adenovirales se evidencia además por el cambio de morfología con respecto a las células originales, asociándose la transformación completa de las células a un cambio evidente en la morfología, mientras que la transformación parcial mantiene características similares a las originales (Nevels y col, 1999).

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo expuesto anteriormente en relación a los efectos que produce en las células su transfección con genes adenovirales. Al respecto, se comprobó que las líneas celulares generadas efectivamente expresan las proteínas codificadas por las regiones de expresión temprana del adenovirus tipo 5 transfectadas, siendo su localización la esperada. Además se observó un aumento en la velocidad de crecimiento proporcional al grado de transformación, el que también se relacionó con cambios en la morfología celular.

Una de las modificaciones frecuentes que ocurre con las células transformadas tanto espontánea- como artificialmente, es el cambio a un complemento cromosómico anormal o aneuploidía (Crane, 1999; Walen, 2002). Este proceso es consecuencia de los defectos en los puntos de control del ciclo celular, los que permiten la transformación celular. Estos procesos favorecen la aparición de células multinucleadas, las que luego se dividen generando células aneuploides (Walen, 2002). Al igual que en las células transformadas *in vitro*, la aparición de aberraciones cromosómicas y de células aneuploides es una característica de la mayoría de los tumores cancerígenos, lo que se debe a que en casi todos ellos hay alteraciones del ciclo celular por mutaciones en la proteína p53 (Duensing y Duensing, 2005; Stukeberg, 2004).

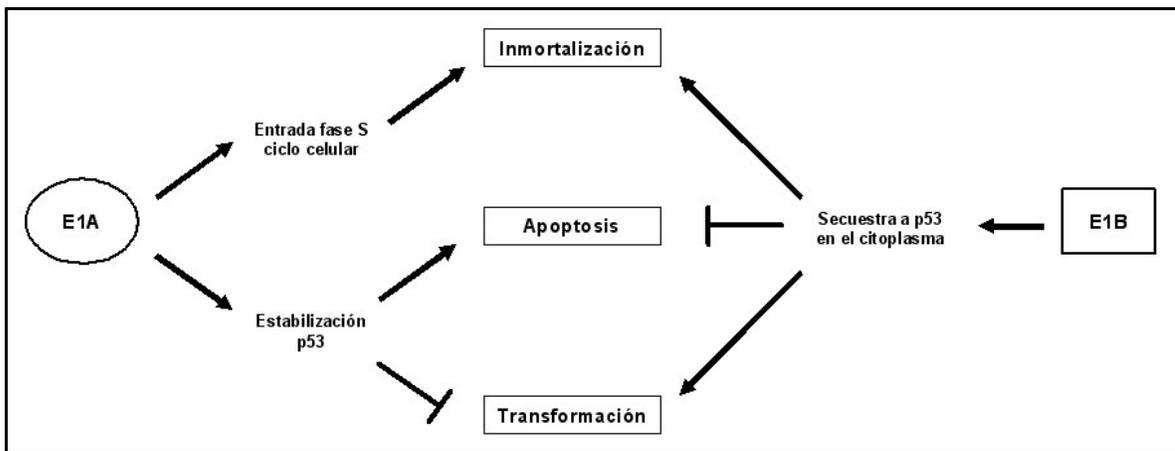


Figura 25: Participación de las proteínas adenovirales E1A y E1B en los procesos de inmortalización y transformación celular. Flecha: promueve, líneas perpendiculares: bloquea.

Para determinar si las líneas celulares de *T. barrerae* habían sufrido este tipo de modificación, se prepararon placas metafásicas y se contó el número de cromosomas presente en las células. No se detectaron alteraciones en el complemento cromosómico normal ($2n = 102$) en ninguna de las líneas celulares analizadas, lo que no quiere decir que no puedan ocurrir en el futuro, ya que estos errores se manifiestan al mantener las células en cultivo durante un tiempo prolongado (Walen, 2002).

Para comprobar si las proteínas adenovirales expresadas por las líneas celulares de *T. barrerae* se comportan como en líneas celulares de animales diploides, se estudiaron los niveles y la localización de p53 en estas células. Se detectaron niveles mucho mayores de p53 en las células transfectadas que en las originales y la acumulación de p53 en un cuerpo perinuclear junto a E1B. Esto indicaría que las proteínas adenovirales expresadas en estas líneas celulares provenientes de un animal tetraploide se comportan de la misma forma que en células diploides. Además, el hecho de que las células de *T. barrerae* se hayan podido transfectar con genes adenovirales utilizando un protocolo para células diploides, sugiere un comportamiento diploidizado, como ya ha sido reportado con anterioridad por Gallardo y col (2006).

Una evidencia adicional de la diploidización funcional de *T. barrerae* la entregan resultados preliminares (no desarrollados en detalle en este trabajo) en los que se encontró un solo centrosoma en células en estado quiescente al igual que en células que acaban de duplicarse por mitosis (Fig. 26). El número normal de centrosomas en una célula diploide es 1 ó 2 (Duensing y col, 2001). Este número se ve alterado en células cancerígenas, las que frecuentemente son poliploides y presentan un número de centrosomas mayor de lo normal (Sphyris y Harrison, 2005). La ausencia de un número mayor de centrosomas en las células tetraploides de *T. barrerae*, en contraposición a lo que se observa en células cancerígenas autopo-

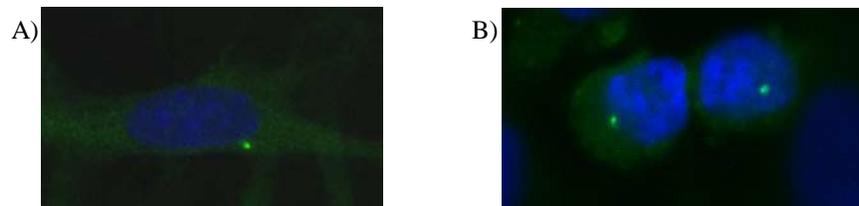


Figura 26: Detección del número de centrosomas presente en las células de *T. barrerae*. Inmunofluorescencia donde se evidencia el centrosoma como punto verde (detectado con un anticuerpo contra γ -tubulina conjugado con FITC) adyacente al núcleo teñido de azul (tinción de contraste con DAPI). (A) Célula en estado quiescente. (B) Células en que recién culminó la división mitótica.

liploides, indicaría que sólo uno de los dos genomas presentes en su núcleo está involucrado en el control de la mitosis. La dominancia de un genoma sobre otro (dominancia nucleolar) produce un comportamiento celular diploidizado en organismos poliploides de origen híbrido. Por ejemplo, en *T. barrerae* la región organizadora del nucleolo (NOR) de sólo uno de los genomas está activa, a pesar de que el número de copias del gen corresponde a su nivel de ploidía (Gallardo y col, 2006).

El trabajo realizado durante la presente tesis de pregrado entrega herramientas para continuar con los estudios del gen *p53* y su función en un animal poliploide. La purificación de fagos recombinantes portadores del gen *p53* permitirá el análisis de las secuencias de los clones entregando información sobre la estructura y regulación de la expresión del gen, además de proveer de una sonda homóloga para determinar el número de alelos del gen *p53* que se conservaron en el genoma de *T. barrerae* después del evento de duplicación genómica.

Por otra parte, las líneas celulares establecidas permitirán continuar con la realización de estudios fisiológicos y de expresión génica en *T. barrerae*, lo que en el futuro quizás logre aclarar la interrogante de cómo se generó un mamífero poliploide y se estableció como una nueva especie, a pesar de que la ciencia lo considerara imposible (Otto y Whitton, 2000).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, K.L., Wendel, J.F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 135-141.
- Andreassen, P.R, Lohez, O.D., Lacroix, F.B., Margolis, L.R. (2001). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol. Biol. Cell.*, 12, 1315-1328.
- Attardi, L.D., DePinho, R.A. (2004). Conquering the complexity of p53. *Nature Genetics*, 36, 7-8.
- Baroni, T.E, Wang, T., Qian, H., Dearth, L.R., Truong, L.N., Zeng, J., Denes, A.E., Chen, S.W., Brachmann, R.K. (2004). A global suppressor motif for p53 cancer mutants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101, 4930-4935.
- Bian, C., Zhao, K., Tong, G-X., Zhu, Y-L., Chen, P. (2005). Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen. *J. Zhejiang Univ. SCI.*, 6B, 631-636.
- Bienz, B., Zakut-Houri, R., Givol, D., Oren, M. (1984). Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *EMBO J.*, 3, 2179-2183.
- Bienz-Tadmor, B., Zakut-Houri, R., Libresco, S., Givol, D., Oren, M. (1985). The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element *EMBO J.*, 4, 3209-3213.
- Borger, D.R., DeCaprio, J.A. (2006). Targeting of p300/CREB binding protein coactivators by simian virus 40 is mediated through p53. *J. Virol.* 80, 4292-4303.

- Brooks, C.L., Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 164-171.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G. (2006). Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 11, 506-525.
- Christman, S.A., Kong, B-W., Landry, M.M., Kim, H., Foster, D.N. (2006). Contributions of differential p53 expression in the spontaneous immortalization of a chicken embryo fibroblast cell line. *BCM Cell Biol.*, 7:27, 1-12.
- Chumakov, P.M. (2000). Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry (Moscow)*, 65, 28-40.
- Cetin-Atalay, R., Ozturk, M. (2000). p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure Appl. Chem.*, 72, 995-999.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature*, 6, 836-847.
- Coutts, A.S., La Thangue, N.B. (2005). The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 778-785.
- Crane, M.S.J. (1999). Mutagenesis and cell transformation in cell culture. *Methods Cell Sci.*, 21, 245-253.
- David, L., Blum, S., Feldman, M.W., Lavi, U., Hillel, J. (2003). Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.*, 20, 1425-1434.
- DeAngelis, T., Chen, J., Wu, A., Prisco, M., Baserga, R. (2006). Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signalling. *Oncogene*, 25, 32-42.

- Díaz, G.B., Ojeda, R.A., Gallardo, M.H., Giannoni, S.M. (2000). *Tympanoctomys barrerae*. *Mammalian Species*, 646, 1-4.
- Dmitrieva, N., Kültz, D., Michea, L., Ferraris, J., Burg, M. (2000). Protection of renal inner medullary epithelial cells from apoptosis by hypertonic stress-induced p53 activation. *J. Biol. Chem.*, 275, 18243-18247.
- Duensing, A., Duensing, S. (2005). Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 694-700.
- Duensing, S., Duensing, A., Flores, E.R., Do, A., Lambert, P.F., Münger, K. (2001). Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J. Virol.*, 75, 7712-7716.
- Endter, C., Dobner, T. (2004). Cell transformation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 273, 163-214.
- Endter, C., Härtl, B., Spruss, T., Hauber, J., Dobner, T. (2005). Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene*, 24, 55-64.
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R., Dobner, T. (2001). SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98, 11312-11317.
- Erster, S., Moll, U.M. (2005). Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 843-850.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417.

- Freshney, R.I. (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*. 4th Edition, Wiley-Liss. 600 pp.
- Friis, M.B., Friborg, C.R., Schneider, L., Nielsen, M-B., Lambert, I.H., Christensen, S.T., Hoffmann, E.K. (2005). Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Physiol.*, 567, 427-443.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in *p53*-null cells. *Nature*, 437, 1043-1047.
- Furlong, R.F, Holland, P.W.H. (2001). Were vertebrates octoploid? *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 357, 531-544.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, 401, 341.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Kausel, G., Köhler, N., Honeycutt, R.L. (2003). Gradual and quantum genome size shifts in the hystricognath rodents. *J. Evol. Biol.*, 16, 163-169.
- Gallardo, M.H., Kausel, G., Jiménez, A., Bacquet, C., González, C., Figueroa, J., Köhler, N., Ojeda, R. (2004). Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 82, 443-451.
- Gallardo, M.H., González, C.A., Cebrián, I. (2006). Molecular cytogenetics and allotetraploidy in the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Genomics*, 88, 214-221.
- Ghosh, A., Stewart, D., Matlashewski, G. (2004). Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol. Cell Biol.*, 24, 7987-7997.

- Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*, 249, 1129-1133.
- Gómez-Lázaro, M., Fernández-Gómez, F.J., Jordán, J. (2004). La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *Rev. Neurol.*, 39, 243-250.
- Green, D. R., Chipuk, J. E. (2006). p53 and Metabolism: Inside the TIGAR. *Cell*, 126, 30-32.
- Harlow, E., Pim, D.C., Crawford, L.V. (1981). Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells. *J. Virol.*, 37, 564-573.
- Harlow, E., Franza, B.R. Jr., Schley, C. (1985). Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J. Virol.*, 55, 533-546.
- Hartl, D.L, Jones, E.W. (2005). Genetics: Analysis of genes and genomes. 6th Edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts. 854 pp.
- Holland, P.W.H. (1999). Gene duplication: Past, present and future. *Cell Dev. Biol.*, 10, 541-547.
- Kingston, R.E., Chen, C.A., Okayama, H., Rose, J.K. (1996). Introduction of DNA into mammalian cells, p. 9.1.1-9.1.11. En Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
- Kohn, K., Pommier, Y. (2005). Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the on-off switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 816-827.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lane, D.P., Fischer, P.M. (2004). Turning the key on p53. *Nature*, 427, 789-790.

- Li, W.-H, Graur, D. (1991). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 284 pp.
- Liu, B., Wendel, J.F. (2002). Non-mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Curr. Genom.*, 3, 1-17.
- Liu, B., Wendel, J.F. (2003). Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29, 365-379.
- Ljungman, M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*, 2, 208-225.
- Lodish, L., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. 5^a Ed., Editorial Médica Panamericana, Colombia. 973 pp.
- Matoba, S., Kang, J., Patino, W. D., Wragg, A., Bohem, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F., Hwang, P. M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*, 312, 1650-1653.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.*, 16, 551-560.
- Michalak, E., Villunger, A., Erlacher, M., Strasser, A. (2005). Death squads enlisted by the tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 786-798.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H., Dobner, T. (1999). The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene*, 18, 9-17.
- Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Wolf, H., Dobner, T. (2001). „Hit-and-run“ transformation by adenovirus oncogenes. *J. Virol.*, 75, 3089-3094.

- Nevels, M., Täuber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H., Dobner, T. (1999). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.*, 73, 1591-1600.
- Ojeda, R.A., Borghi, C.E., Díaz, G.B., Giannoni, S.M., Mares, M.A., Braun, J.K. (1999). Evolutionary convergence of the highly adapted desert rodent *Tympanoctomys barrerae* (Octodontidae). *J. Arid Environ.*, 41, 443-452.
- Ojeda, R.A., Gonnet, J.M., Borghi, C.E., Giannoni, S.M., Campos, C.M., Díaz, G.B. (1996). Ecological observations of the red vizcacha rat, *Tympanoctomys barrerae* in desert habitats of Argentina. *Mastozool. Neotrop.*, 3, 183-191.
- Otto, S.P., Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genetics*, 34, 401-437.
- Ozkan, H., Levy, A.A., Feldman, M. (2001). Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell*, 13, 1735-1747.
- Pérez-Reyes, N., Halbert, C.L., Smith, P.P., Benditt, E.P., McDougall, J.K. (1992). Immortalization of primary human smooth muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89, 1224-1228.
- Reisman, D., Greenberg, M., Rotter, V. (1988). Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 5146-5150.
- Rodin, S.N., Riggs, A.D. (2003). Epigenetic silencing may aid evolution by gene duplication. *J. Mol. Evol.*, 56, 718-729.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2° Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J., Levine, A.J. (1982). Adenovirus E1B-58kDa tumor antigen and SV40 large tumour antigen are physically associated with the same 54 kDa cellular protein in transformed cells. *Cell*, 28, 387-394.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000). Practical *in situ* Hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, New York. 203 pp.
- Seoighe, C. (2003). Turning the clock back on ancient genome duplication. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13, 636-643.
- Sherr, C.J., DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, 102, 407-410.
- Shi, Q., King, R.W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploidy rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*, 437, 1038-1042.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. (1995). The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 8089-8091.
- Song, Y-H. (2005). *Drosophila melanogaster*: a model for the study of DNA damage checkpoint response. *Mol. Cells.*, 19, 167-179.
- Soussi, T. (2003). Focus on the p53 gene and cancer: advances on the TP53 mutation research. *Human Mutation*, 21, 173-175.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- Sphyris, N., Harrison, D.J. (2005). p53 deficiency exacerbates pleiotropic mitotic defects, changes in nuclearity and polyploidy in transdifferentiating pancreatic acinar cells. *Oncogene*, 24, 2184-2194.
- Spring, J. (2002). Genome duplication strikes back. *Nature Genetics*, 31, 128-129.

- Storchová, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O'Toole, E., Pellman, D. (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*, 443, 541-547.
- Stukenberg, P.T. (2004). Triggering p53 after cytokinesis failure. *J. Cell Biol.*, 165, 607-608.
- Tanooka, H., Sasaki, H., Shiroishi, T., Moriwaki, K. (2001). p53 pseudogene dating: identification of the origin of laboratory mice. *Gene*, 270, 153-159.
- Taylor, J.S., Raes, J. (2004). Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu. Rev. Genetics*, 38, 615-643.
- Teichmann, S.A., Babu, M.M. (2004). Gene regulatory network growth by duplication. *Nature Genetics*, 36, 492-496.
- Teshima, K.M., Innan, H. (2004). The effect of gene conversion on the divergence between duplicated genes. *Genetics*, 166, 1553-1560.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- Uetake, Y., Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J. Cell Biol.*, 165, 609-615.
- Walén, K.H. (2002). The origin of transformed cells: studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and human amniocytes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 133, 45-54.
- Wang, Y., Ko, B.C.B., Yang, J.Y., Lam, T.T.L., Jiang, Z., Zhang, J., Chung, S.K., Chung, S.S.M. (2005). Transgenic mice expressing dominant-negative osmotic-response element-binding

- protein (OREBP) in lens exhibit fiber cell elongation defect associated with increased DNA breaks. *J.Biol. Chem.*, 280, 19986- 19991.
- Watson, I. R., Irwin, M.S. (2006). Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modifications of the p53 Family. *Neoplasia*, 8, 655-666.
- Wolfe, K.H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews*, 2, 333-342.
- Wong, C., Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol.*, 6:6, 1-12.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.*, 18, 292-298.
- Zhang, Z., Gu, J., Gu, X. (2004). How much expression divergence after yeast gene duplication could be explained by regulatory motif evolution? *Trends Genet.*, 20, 403-407.
- Zimmermann, T., Kunisch, E., Pfeiffer, R., Hirth, A., Stahl, H-D., Sack, U., Laube, A., Liesaus, E., Roth, A., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., Kinne, R.W. (2001). Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture – primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.*, 3, 72-76.