

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



ANALISIS DE LA ESTRUCTURA DEL GEN IgVk DE RATON EN HIBRIDOMAS RESPONSIVOS Y NO RESPONSIVOS AL ANTIGENO ESE EN ERITROCITOS DE OVEJA

TESIS PROFESIONAL

Que como requisito parcial para
obtener el Título de

B I O L O G O

Presenta

RUBEN DARIO FLORES SAAIB

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

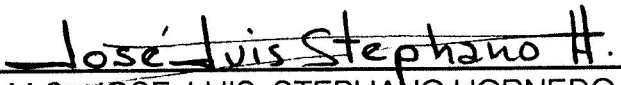
**ANALISIS DE LA ESTRUCTURA DEL GEN IgV_k DE RATON EN
HIBRIDOMAS RESPONSIVOS Y NO RESPONSIVOS AL
ANTIGENO ESE EN ERITROCITOS DE OVEJA**

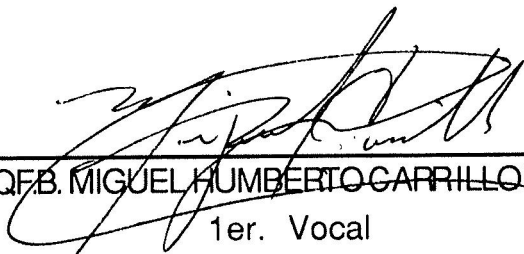
TESIS PROFESIONAL

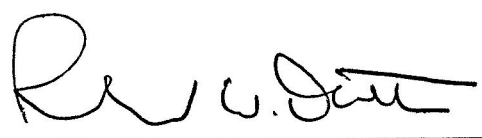
QUE PRESENTA

RUBEN DARIO FLORES SAAIB

APROBADO POR


M.C. JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEDO
Presidente


QFB. MIGUEL HUMBERTO CARRILLO MENDIVIL
1er. Vocal


Ph. D. RICHARD DUTTON
Secretario

ENSENADA, B.C.

DICIEMBRE DE 1993.

DEDICATORIA

A DIOS nuestro señor, TODOPODEROSO

Para mi MADRE y mis HERMANOS, quienes constituyen el principal aliento en mi existencia para continuar adelante, esforzándome por dar cada vez lo mejor de mí en todo lo que hago; por su infinito amor y cariño; y por aguantar mis ratos de genio.

Para Adriana con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Con gran estimación para nuestros maestros José Luis Stephano y Meredith Gould quienes me brindaron su amistad, apoyo y conocimientos para el logro de este trabajo. Que Dios los conserve con salud y energía durante mucho tiempo para que continúen con la invaluable labor que realizan en nuestra Facultad

Al Dr. Richard W. Dutton, por todo el apoyo en la obtención de las facilidades técnicas para realizar mi trabajo.

Al Dr. Joseph R. Volland cuya amistad y conocimientos contribuyeron enormemente para poder realizar el trabajo experimental de esta tesis. Por los consejos brindados y por todo el apoyo recibido para poder prolongar mi estancia en San Diego.

A todo el personal técnico, investigadores y estudiantes del edificio MAAC 303 en UCSD por sus palabras de aliento durante la realización de los experimentos.

A Gautam Thor, Mike, Barry, Mick y Chris por la amistad y apoyo brindado.

A todas aquellas personas que siguieron con interés el desarrollo de este trabajo.

A los maestros Miguel Carrillo, César Migoni, Pedro Ruiz, Olivia Tapia, Irma Rivera y Eusebio Barreto por los conocimientos, apoyo y consejos brindados en el transcurso de mis estudios

Al personal administrativo de nuestra Facultad y Universidad por las facilidades otorgadas en innumerables ocasiones.

A Blanquita

Y por último, aunque no al final, a mis compañeros de la XX generación: Ray, Arturo, Alicia, Lauro, César, Laura y Martín.

I N D I C E

INTRODUCCION		1
ANTECEDENTES		13
METODOLOGIA		18
RESULTADOS		44
DISCUSION		71
CONCLUSIONES		75
APENDICE		76
BIBLIOGRAFIA		80

INTRODUCCION

La presencia del sistema inmune en los vertebrados representa un mecanismo de vigilancia y defensa contra agentes extraños como virus, bacterias y parásitos, a cuya invasión constantemente se encuentran expuestos los organismos, así como a cambios en la estructura de los tejidos normales como la aparición de células cancerosas.

El sistema inmune exhibe dos tipos de reconocimiento y eliminación de agentes extraños: la inmunidad natural, la cual existe de manera independiente al agente extraño y la inmunidad adquirida, la cual produce una reacción específica contra cada agente invasor. Este último tipo de respuesta posee tres características principales: a) es adaptiva contra cada tipo de agente extraño; b) manifiesta una especificidad muy fina; y c) posee una 'memoria' que recuerda encuentros anteriores contra cada agente extraño.

La repuesta inmune adquirida está mediada por componentes celulares (linfocitos B y T), así como por moléculas libres denominadas anticuerpos. El principio medular de la respuesta inmune adquirida es la capacidad de reconocer estructuras en la superficie de macromoléculas que no son constituyentes normales del organismo; los anticuerpos son moléculas protéicas que poseen dicha capacidad y las estructuras que reconocen son llamadas

antígenos.

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir los anticuerpos en respuesta a un estímulo antigénico. La fase inicial de la respuesta inmune consiste en el reconocimiento de un determinante antigénico (proteínas, polisacáridos o lípidos en forma soluble) por moléculas de anticuerpo ya existentes unidas a la membrana de los linfocitos B; la interacción del antígeno con esas moléculas inicia la secuencia de activación de los linfocitos B que consiste primero en la proliferación de clonas responsivas al antígeno y culmina con el desarrollo de células efectoras que secretan moléculas de anticuerpo activamente o en células de memoria (Fig. 1) (Abbas *et al.*, 1991). Los efectos protectores de los anticuerpos son iniciados por su unión con el antígeno, una unión no covalente que no modifica la estructura del antígeno.

La especificidad y diversidad de la respuesta inmune es explicada por la teoría de la selección clonal, propuesta originalmente por Jerne, Brunet, Lederberg y Talmadge en 1957 y la cual es actualmente apoyada por datos experimentales. Básicamente, la teoría propone que cada individuo posee un gran número de linfocitos derivados clonalmente de un solo precursor, siendo cada clona capaz de reconocer a un antígeno distinto; el antígeno a su vez reacciona con una clona preexistente activándola (Roitt *et al.*, 1985) (Fig. 1).

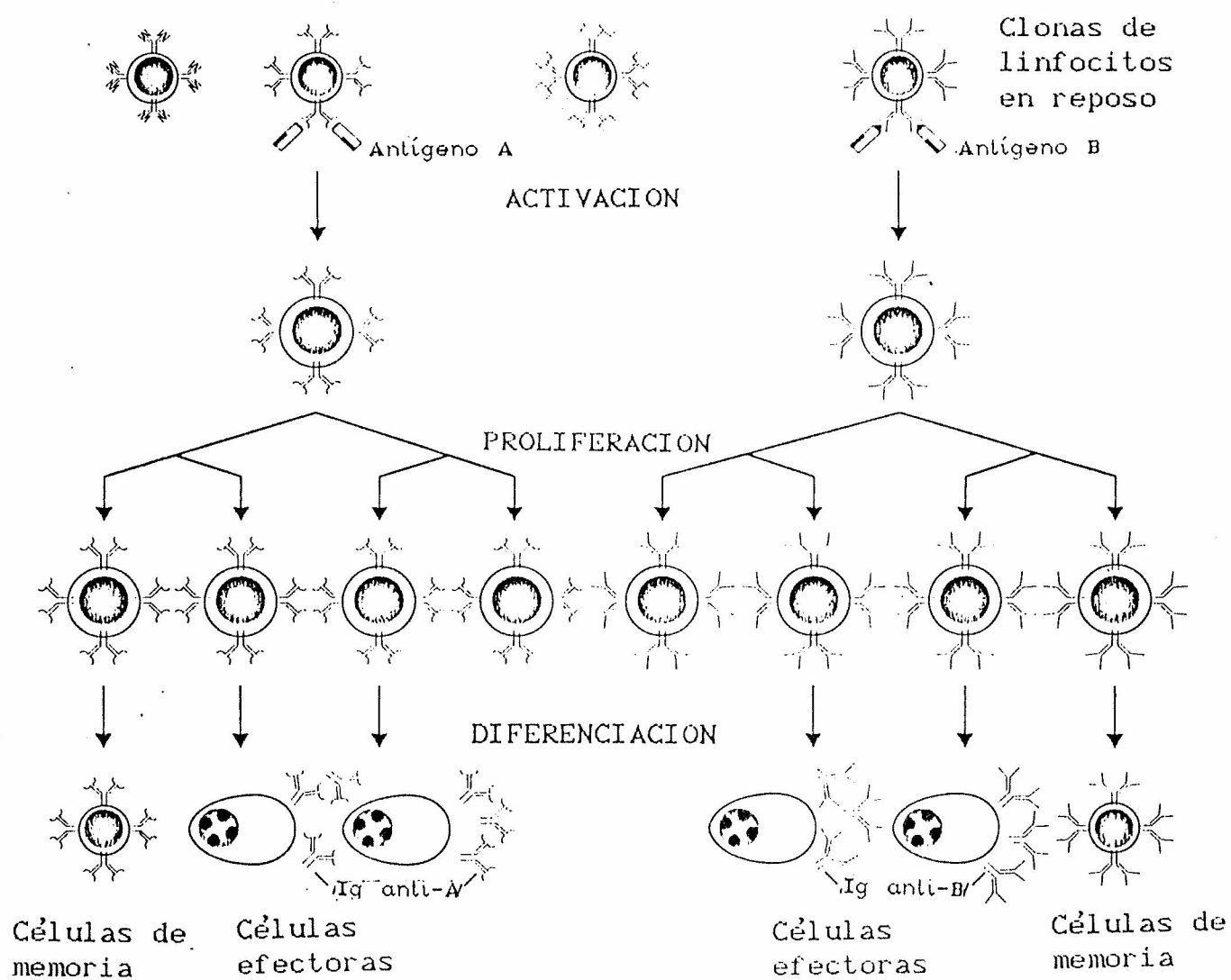


Fig. 1. Teoría de la selección clonal. Cada antígeno (A o B), selecciona una clona específica de linfocitos ya existente, estimulando su proliferación y diferenciación.

La casi ilimitada capacidad combinatoria de las moléculas de anticuerpo reside en su estructura. Las cadenas de anticuerpo pertenecen a una familia de moléculas que comparten una secuencia protéica conservada, la cual representa la duplicación de un gen primordial (Hasemann *et al.*, 1989). Los anticuerpos son glicoproteínas conformados por una estructura básica de dos cadenas peptídicas ligeras idénticas (~ 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas ($\sim 55-70$ kD). Cada cadena ligera se encuentra unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro, y las cadenas pesadas a su vez están unidas entre sí covalentemente también por puentes disulfuro (Fig. 2A) (Abbas *et al.*, 1991; Hilschman *et al.*, 1965 en Hasemann *et al.*, 1989).

La secuencia de aminoácidos de las regiones amino-terminales en las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos son denominadas regiones variables (V), a diferencia de las regiones más conservadas (C) hacia el extremo carboxi-terminal. Cada cadena ligera o pesada puede ser dividida en dominios, cada uno de estos consistiendo de aproximadamente 110 aminoácidos. La cadena ligera posee dos dominios denominados V_L y C_L . V_L conforma la región variable de la cadena ligera y es la región que participa en el reconocimiento y unión del antígeno; C_L es la región constante de la cadena ligera. La cadena pesada posee también una región variable de similar longitud denominada V_H que también participa

en la unión con el antígeno, pero además posee tres dominios constantes C_H1 , C_H2 y C_H3 . De acuerdo a la estructura de las regiones constantes, se conocen cinco tipos de cadenas pesadas o isotipos: IgM (μ), IgD (δ), IgG (γ), IgA (α) e IgE (ϵ). Todas las cadenas ligeras que conforman las inmunoglobulinas pertenecen a uno de dos isotipos: kappa (κ) o lambda (λ); los miembros de cada isotipo comparten la secuencia de aminoácidos de la región constante (Fig. 2B) (Abbas *et al.*, 1991; Hasemann *et al.*, 1989).

Dentro de las regiones variables de las cadenas de los anticuerpos existen tres áreas de muy alta variabilidad denominadas regiones determinadoras de la complementareidad (CDR's) y regiones más conservadas llamadas regiones estructurales. Las tres regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras se acomodan de manera tridimensional en la molécula de anticuerpo para formar una superficie de unión con el antígeno (Fig. 3) (Abbas *et al.*, 1991).

El enorme repertorio de moléculas diferentes de anticuerpo que puede producir un organismo ($\sim 10^9$ o más) con especificidad única es generada por la combinación de distintas cadenas ligeras y pesadas, concretamente por la estructura de las regiones variables de ambas cadenas (Abbas *et al.*, 1991).

En 1965, Dreyer y Bennet propusieron que por cada clase de inmunoglobulinas debería existir un solo gen constante (C)

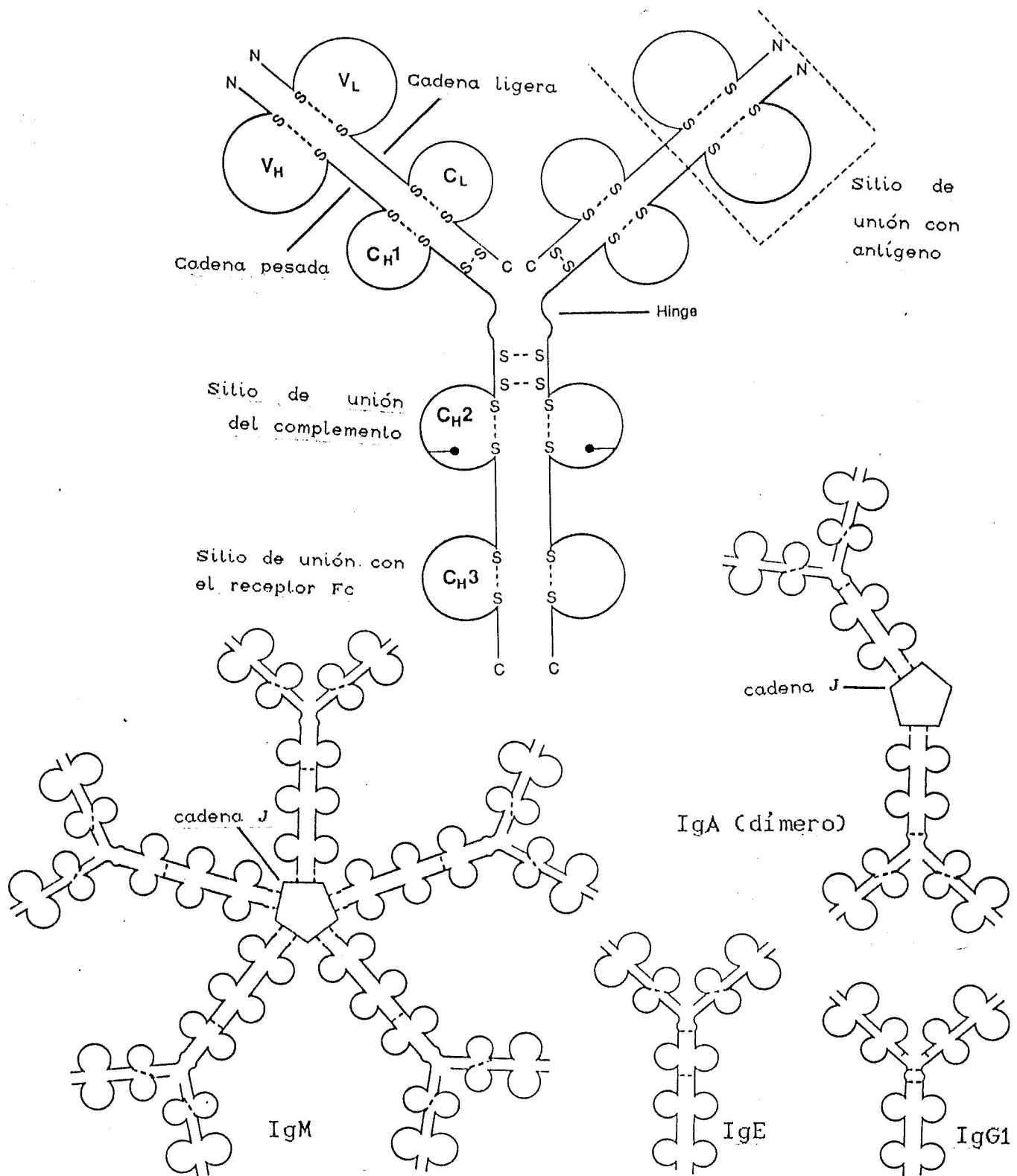


Fig. 2. Diagrama de las inmunoglobulinas. (A) estructura básica de la molécula; los sitios de unión con el antígeno se forman por la yuxtaposición de los dominios VH y VL (S-S puentes disulfuro). (B) los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas (tomado de Abbas *et al.*, 1991).

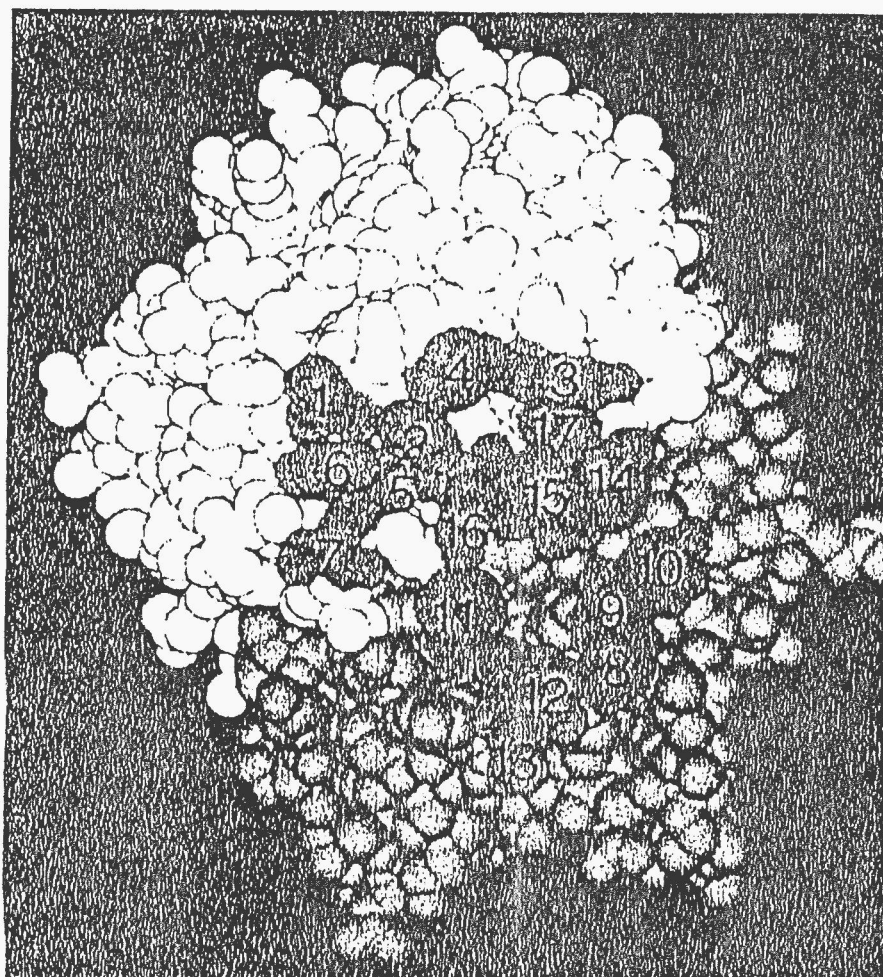


Fig. 3. Sitio de unión con el antígeno de un anticuerpo contra lisozima, revelado por cristalografía de rayos x. Las cadenas numeradas indican residuos aminoácidos en las regiones CDR de la cadena ligera (1-7) y la cadena pesada (8-17) que se unen al antígeno proteico (tomado de Abbas *et al.*, 1991. Derecho de copia 1986 por la American Association for the Advancement of Science).

codificado en la línea germinal separado de las regiones múltiples codificadoras para las regiones variables (V); en el desarrollo del linfocito B uno de los genes codificadores para V se asociaría con la región C para producir un gene completo (V+C) (Fig. 4) que la célula puede entonces expresar (Max, 1989). Mediante el uso de tecnología de DNA recombinante, se logró la clonación de cDNA IgV_k e IgC_k de ratón (Seidman *et al.*, 1978; Lenhard-Schuller *et al.*, 1978; Hamlyn *et al.*, 1979, en Max, 1989). Usando los genes clonados como sondas contra DNA genómico mediante la técnica de Southern Blotting se confirmó que solo existe un gen C_k; que existen varios genes V_k (Fig. 5); y que ambos tipos (C y V) se encuentran muy separados en la línea germinal (Wilson *et al.*, 1979, en Max, 1989). Otro de los descubrimientos efectuados al analizar la estructura de los genes IgV_k fue la detección de los segmentos de unión J (joining), que se encuentran entre los genes V_k y los genes C_k, los cuales contribuyen a la diversidad en la construcción de las cadenas ligeras (Max, 1989).

En la región 5' de cada locus Ig se encuentran los exones V, cada uno de aproximadamente 300 pb de longitud, separado uno de otro por segmentos de DNA no codificador de diferente longitud ocupando una región de 1000 a 2000 kb de longitud (Abbas *et al.*, 1991). Los genes V son clasificados en diferentes familias de acuerdo al grado de similitud que presentan entre si, compartiendo

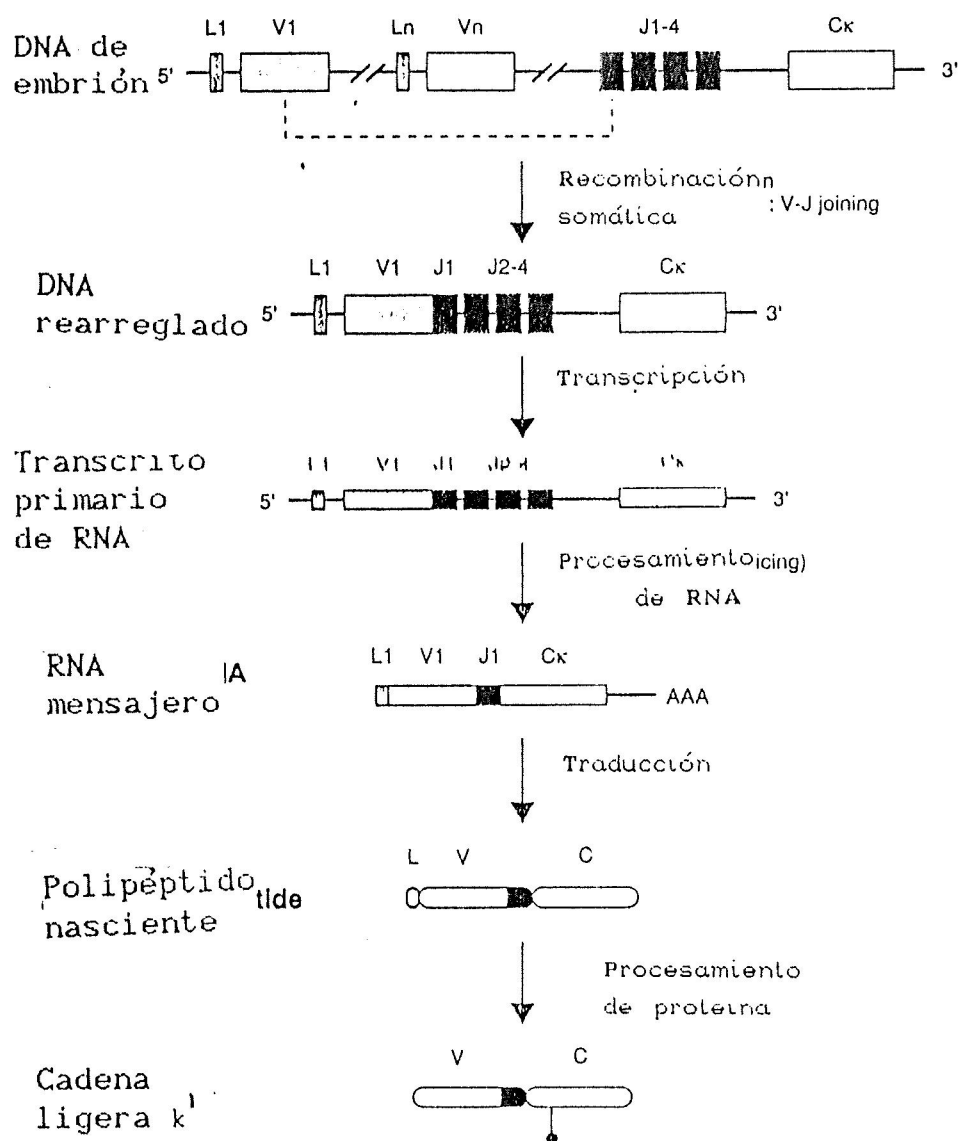
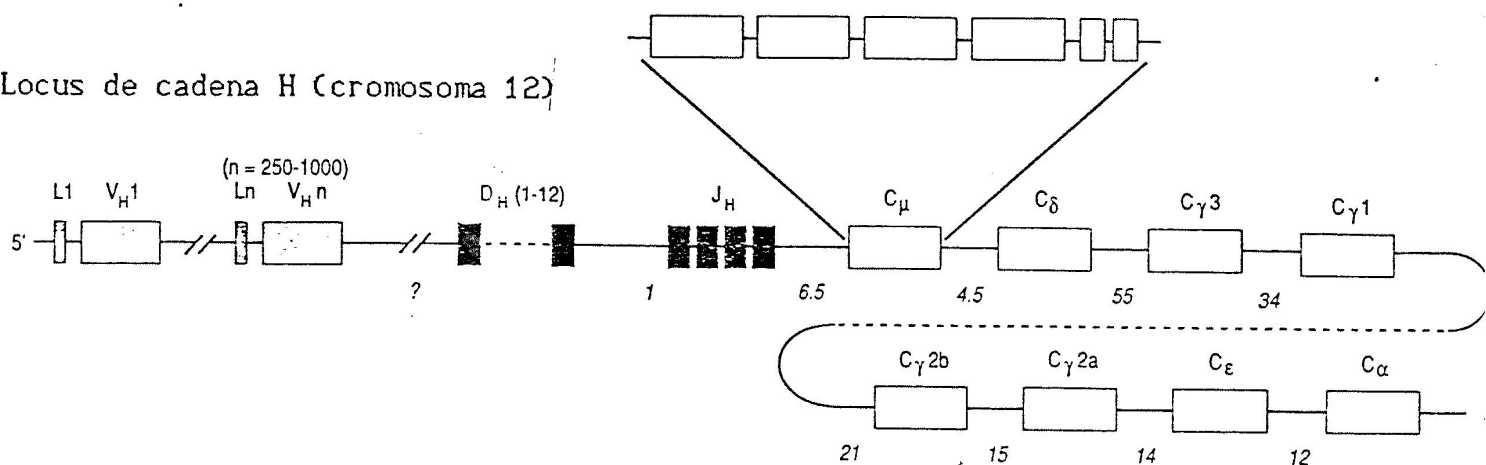
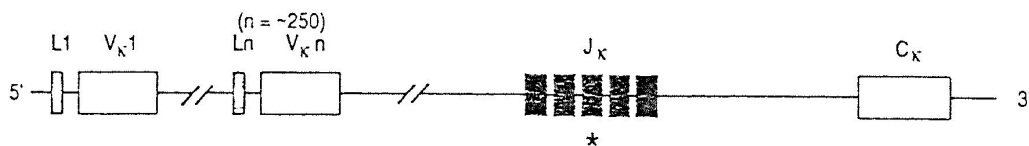


Fig. 4. Secuencia del rearrreglo de genes durante la recombinación somática, transcripción y síntesis de la cadena ligera k en ratón. En este ejemplo la región V está codificada por los exones V₁ y J₁. Los genes V se indican de V₁ a V_n; la localización de los carbohidratos () es esquemática; los segmentos de genes y distancias entre ellos no están a escala (tomado de Abbas *et al.*, 1991).

Locus de cadena H (cromosoma 12)



Locus de cadena k (cromosoma 6)



Locus de cadena λ (cromosoma 16)

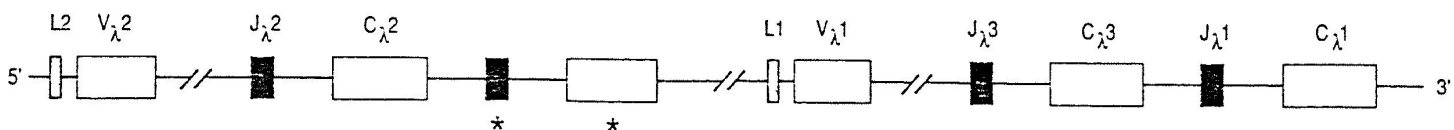


Fig. 5. Organización de los genes Ig (H, k, λ) de ratón en los diferentes cromosomas en la línea germinal (no a escala). Itálicas = kb de DNA; * = pseudogenes no funcionales; cada gen C está compuesto de varios exones. L, líder; V, variable; D, diversidad; J, unión (joining); C, constante (tomado de Abbas *et al.*, 1991).

los miembros de cada familia un 80 % de similitud (Abbas *et al.*, 1991; Strohal *et al.*, 1989).

Los mecanismos de la recombinación de los genes V-J-C para producir un gen transcripcionalmente activo han sido extensamente estudiados. Se han identificado secuencias denominadas elementos recombinatorios, en el extremo 3' de los genes V y en el 5' de los genes J-C, las cuales indican el sitio donde las secuencias de DNA deben ser cortadas y unidas con su complemento (Seidman *et al.*, 1979; Sakano *et al.*, 1979). El reconocimiento de dichos elementos ha permitido elaborar un modelo de los sucesos que ocurren durante la recombinación de los genes V-J-C (Rose, *et al.*, 1984; Sakano *et al.*, 1980; Kataoka *et al.*, 1984; Max, 1989) en el cual las regiones intermedias entre los segmentos de DNA que serán unidos son desechadas o mantenidas en el genoma de acuerdo a la orientación de los elementos recombinatorios y la secuencia codificadora, observándose la adición de nucleótidos "extra" en las secuencias que serán unidas, por la acción de la enzima nucleótido-terminal transferasa (Max, 1989; Van Ness *et al.*, 1982; Selsing *et al.*, 1981).

En respuesta al primer encuentro con un antígeno, los anticuerpos producidos por los linfocitos B son del isotipo IgM, siendo los genes IgV utilizados muy similares a los presentes en la línea germinal. Sucesivos encuentros con el antígeno llevan a

un proceso de maduración en la afinidad por el antígeno, en el cual los anticuerpos producidos son del tipo IgG y los genes empleados para montar la respuesta inmune han sufrido un proceso de mutación somática (Max, 1989).

Durante el desarrollo de los linfocitos B, aquellos que producen un anticuerpo capaz de reaccionar con un autoantígeno son eliminados por un proceso de selección clonal o sometidas a un estado anérgico, en el cual no reaccionan al antígeno pero pueden persistir sin proliferación (Abbas *et al.*, 1991). El estudio de la variabilidad en el uso de los segmentos que codifican para los anticuerpos producidos en enfermedades autoinmunes ha resultado en la caracterización de dos tipos de respuestas autoinmunes: una en la que los genes empleados para la construcción de los anticuerpos son muy similares a los de la línea germinal, y otra en la que parece haber un proceso de afinidad por el antígeno (Davidson *et al.*, 1989).

La respuesta a la pregunta de cuales son los factores que contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes, así como el uso restringido o variable de genes para fabricar los anticuerpos producidos tiene implicaciones de gran importancia para el tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus, artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

ANTECEDENTES

Mishell y Dutton (1967), estudiaron la respuesta inmune desarrollada *in vitro* por células de bazo de ratones no inmunizados e incubadas con eritrocitos de oveja. Para detectar células que produjeron anticuerpos contra los eritrocitos utilizaron el ensayo de células formadoras de placas, en donde las células que producen anticuerpos forman una placa de hemólisis en la presencia de complemento y eritrocitos antigénicos. Encontraron que ciertas líneas de ovejas presentan un antígeno extra en la superficie de sus eritrocitos, que denominaron ESE (''extra sheep erythrocyte''), el cual no está presente en otras líneas de ovejas. Los dos tipos de eritrocitos fueron llamados Hi y Lo, respectivamente. Células de bazo inmunizadas *in vitro* con Hi dieron un número muy grande de placas cuando fueron ensayadas con Hi, pero la cantidad fué menor cuando fueron ensayadas contra Lo; mientras que las células de bazo inmunizadas con Lo *in vitro* dieron el mismo número de placas cuando fueron ensayadas con Hi y Lo. Posteriormente encontraron que solo ciertas cepas de ratones podían producir una respuesta antigénica contra ESE *in vitro* (McCarthy y Dutton, 1975a).

En cambio, cuando se inmunizaron ratones *in vivo* con eritrocitos Hi y posteriormente se ensayaron las células de bazo recién extraídas, no hubo una marcada respuesta anti-ESE aún

después de 10 días de inmunización; pero si se daba una segunda inmunización a los tres días *in vivo*, las células de bazo mostraron una respuesta discriminadora, aunque no tan fuerte como *in vitro* (McCarthy *et al.*, 1976).

Datos experimentales sugirieron que los linfocitos B individuales fueron los responsables de la respuesta anti-ESE (Mishell y Dutton, 1975b); luego, la habilidad para responder al antígeno ESE fué mapeada hacia la región de los genes codificadores de la región variable de la cadena pesada (V_H) de las γ -globulinas, la cual es transmitida como un gen autosomal sencillo (McCarthy y Dutton, 1975c).

Estos antecedentes sugieren que existe una supresión *in vivo* de la expresión del gen que regula la respuesta al antígeno ESE, y que esta supresión desaparece *in vitro*; este fenómeno sería la base para estudiar un posible modelo de supresión idiopática *in vivo* y sus posibles implicaciones en el desarrollo y control de enfermedades autoinmunes. De aquí el interés de continuar el estudio de la expresión de los genes que codifican para la construcción de las regiones variables de los anticuerpos.

Basándose en la hipótesis de que la respuesta hacia ESE es controlada por un solo gen, o un número limitado de genes muy relacionados, Muralidhar *et al.*, (1992) determinaron la secuencia del gen codificador para la región variable de la cadena pesada

usando hibridomas obtenidos a partir de diferentes líneas de ratones positivas para anti-ESE; las secuencias de 4 hibridomas responsivos a ESE (26.1, 12.3.4, 1.7.3 y 4.6.2) y las de 2 hibridomas responsivos a otros determinantes compartidos (30.2, 13.116) fueron determinadas. Sus resultados muestran que el gen usado es prácticamente similar en los 4 hibridomas responsivos a ESE, es un miembro de la familia J558, y es casi idéntico a una secuencia (BXW14) presente en anticuerpos anti-DNA de ratones autoinmunes. Finalmente concluyen que la expresión del gen V_{H}^{ESE} está bajo algún tipo de control regulatorio quizá representando un ejemplo de supresión idiopática.

Numerosos estudios han demostrado el uso preferencial de genes IgV_L o IgV_H en la respuesta de los linfocitos B contra un determinado antígeno. Fernández (1992) analizó la respuesta inmunológica contra el dextrano B512 en una línea de ratón altamente responsiva (C57BL/6) usando 37 diferentes anticuerpos monoclonales y encontró que en 21 de ellos, las secuencias de los genes IgV_H usados son prácticamente la misma y pertenecen a la familia J558.

Pascual *et al.* (1992) confirmaron que la secuencia de los genes usados para la construcción de la cadena pesada en autoanticuerpos que reaccionan con el carbohidrato i/I en la superficie de eritrocitos humanos está restringida al segmento

V_H 4-21, pero a diferencia de otros reportes encontraron una mayor variabilidad en el uso de genes IgV_L.

Adderson *et al.* (1991) encontraron que el uso de genes IgV_H en cinco hibridomas de humanos responsivos al polisacárido capsular tipo b de *Haemophilus influenzae* está restringido a miembros de la familia V_H III y que los genes usados son homólogos en un 83% a 98% a dos secuencias germinales.

Tomando en cuenta estos antecedentes era recomendable observar la respuesta inmunológica en cuanto al uso de genes IgV_L en los hibridomas responsivos a ESE. Dutton y Sepúlveda* (com. pers.) hicieron una determinación isotípica de las cadenas ligeras usando anticuerpos monoclonales y encontraron que se trataba de cadenas k en todos los casos. Una pregunta importante es si la capacidad responsiva a ESE está también determinada por ciertos genes Ig V_L: ¿están usando los linfocitos B de las líneas responsivas a ESE un juego restringido de genes V_k para construir la cadena ligera de la inmunoglobulina o existe un uso variado de genes V_k? Podemos decir que si la capacidad de respuesta de los linfocitos a ESE está determinada solamente por el gen V_H empleado para construir la inmunoglobulina, entonces el uso de genes V_L puede ser aleatorio.

* UCSD, Cancer Center. La Jolla, Ca. USA.

HIPOTESIS

Existe una marcada variabilidad en el uso de genes V_k sin correlación con la capacidad responsiva al antígeno ESE.

METODOLOGIA

RESUMEN:

Se usó la técnica de Southern blotting (Fig. 6; IV B,D) para analizar el rearrreglo del DNA genómico en las secuencias codificadoras para V_k de 4 hibridomas responsivos a ESE y 2 no responsivos. Se empleó el plásmido pEck, así como una secuencia de DNA de 6.5 kb, contenida en el plásmido pEck (Coleclough et al., 1982a y b), complementaria a la codificada por la región C_k en la línea germinal de ratón (Fig. 7) para construir una sonda radiactiva marcada con ^{32}P . El DNA genómico fue digerido con las enzimas de restricción Bam HI, EcoRI, HindIII, PstI y KndI, corrido en gel de agarosa, transferido a filtro de nylon (Zetabind^R) e hibridizado con la sonda radiactiva (para interpretación ver Fig. 8). Como controles se usaron DNA de hígado y DNA del compañero de fusión empleado para fabricar los hibridomas. Se extrajo el RNA total de los hibridomas y se preparó cDNA; usando los cebadores específicos para IgV_k contenidos en el kit "Ig-PrimeTM", de Novagen; se amplificó el DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el producto obtenido se ligó al vector PT7Blue (Fig. 9) y crecido en células competentes Nova Blue; usando el método de secuenciación de dideoxinucleótidos de Sanger se obtuvo la secuencia de bases que codificaban para IgV_k .

DIAGRAMA DE FLUJO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

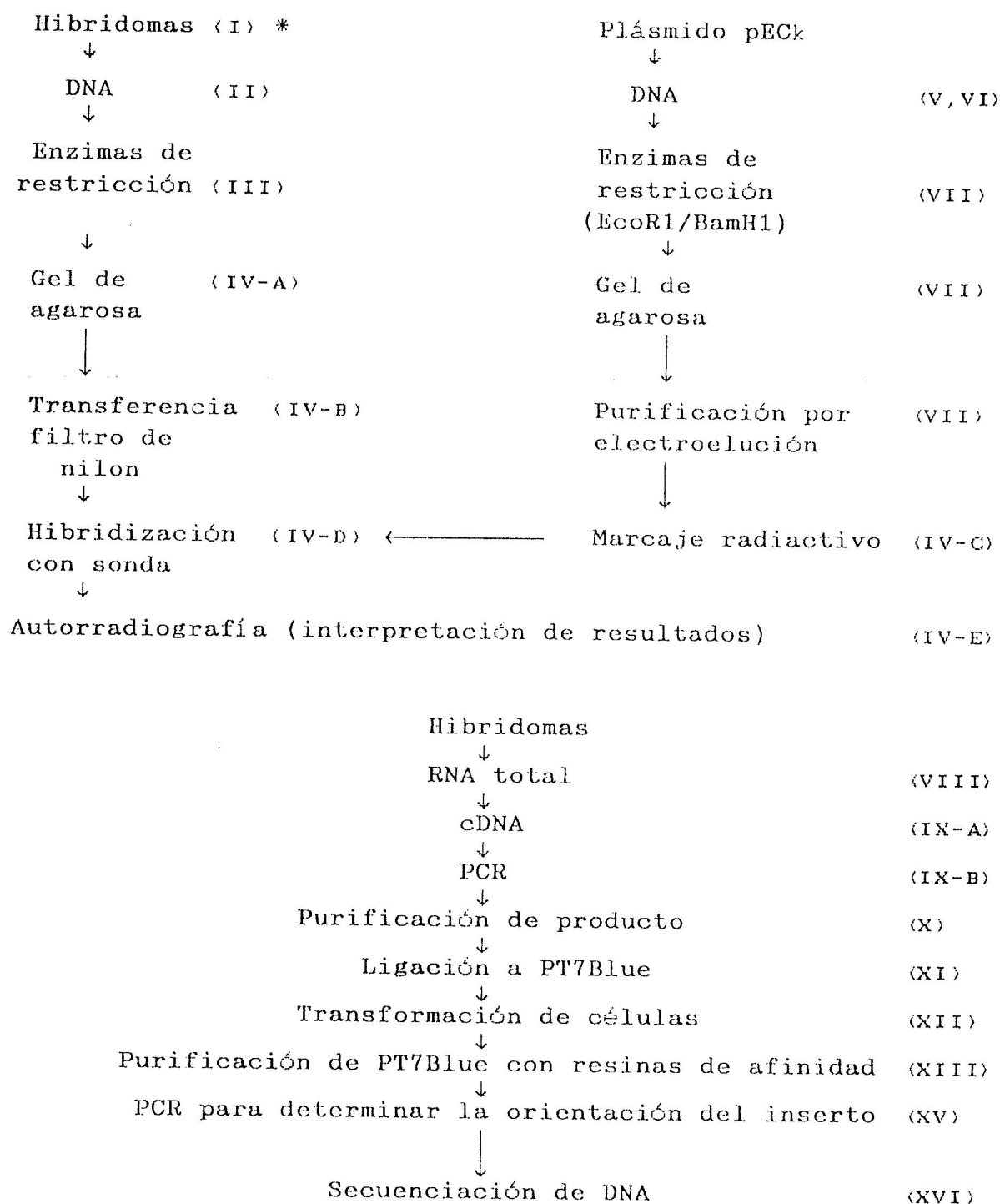
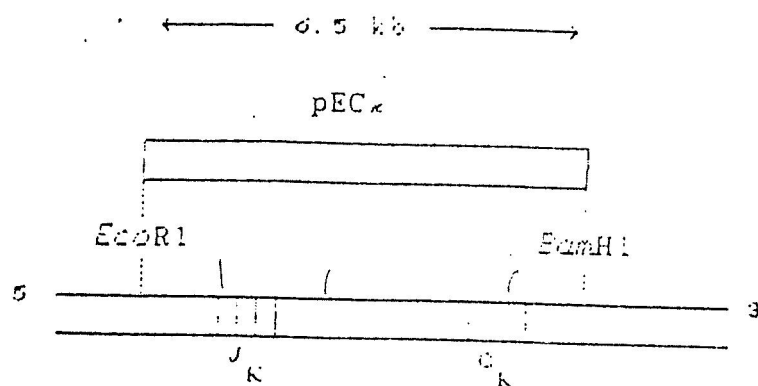
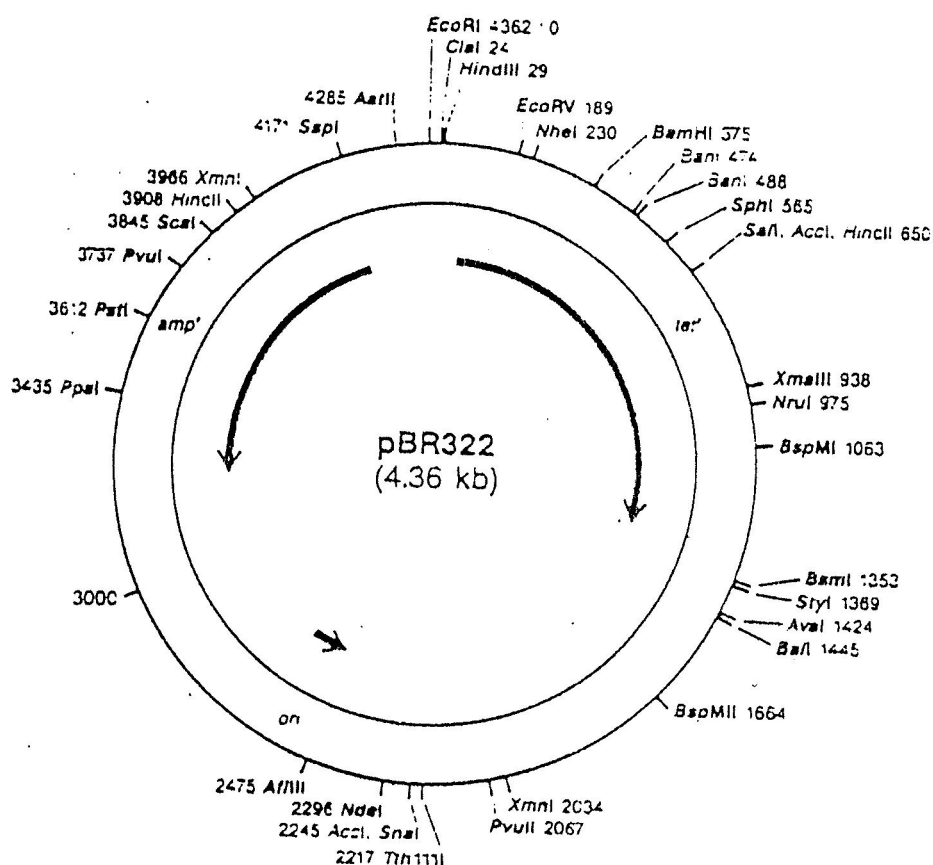


Fig. 6. Diagrama de flujo del trabajo experimental. Los números en *itálicas* se refieren a los pasos descritos en las siguientes páginas.



Fragmento de DNA de la línea germinal



Vector

Fig. 7. El plásmido pECk se construyó por la inserción de un fragmento de 6.5 kb producido por digestión con Eco RI/Bam HI de DNA de la línea germinal, el cual contiene C_k, en el vector pBR322. Las flechas indican los sitios donde se insertó el vector.

GEN para CADENA $I\epsilon_k$ (ligera) - Ratón

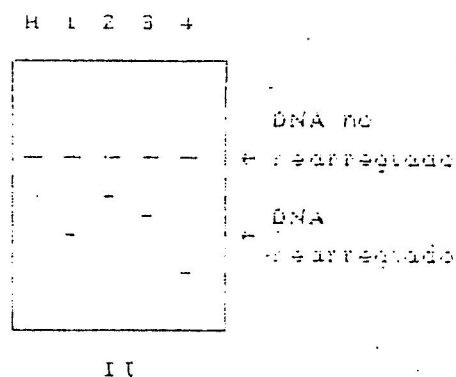
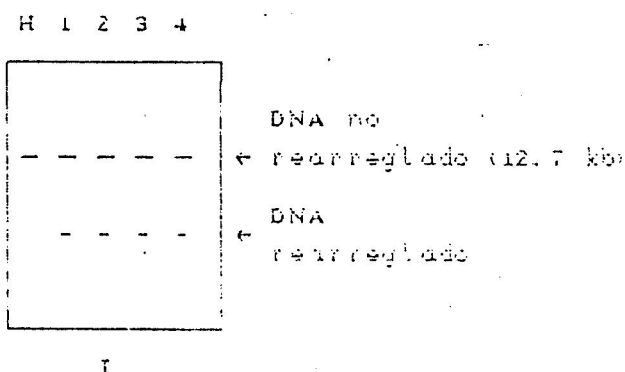
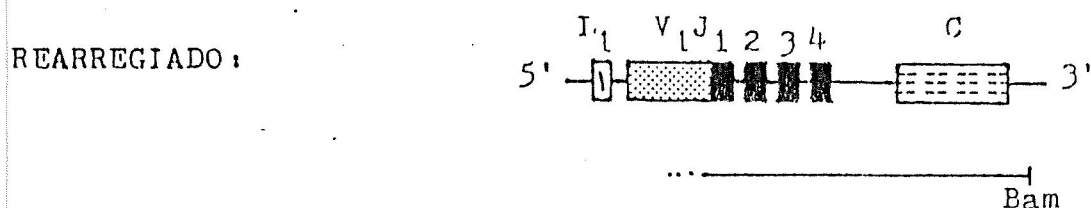
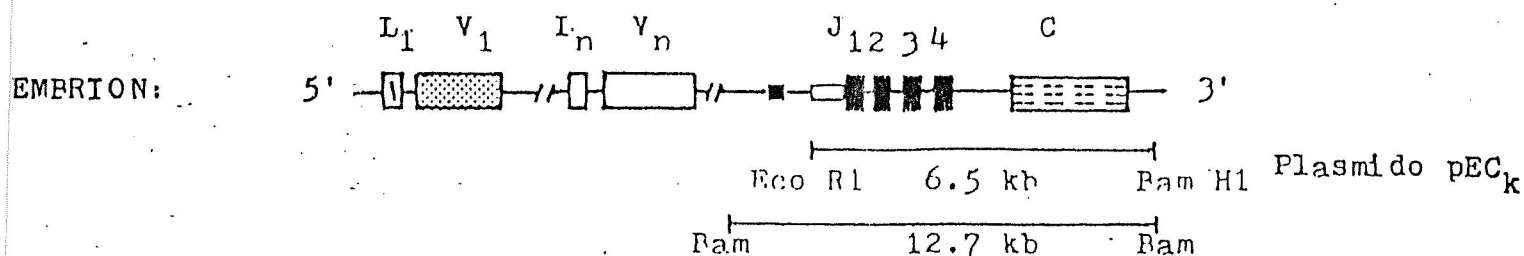


Fig. 8. El DNA de la línea germinal en los linfocitos presenta un sitio Bam HI específico hacia la región 3' de el gen Ck y otro hacia la región 5' de los genes Jk, los cuales están separados entre sí por 12.7 kb. En el DNA rearrreglado funcional de los linfocitos, el sitio Bam HI 5' desaparece y un nuevo sitio de corte es traído cerca de Jk. El cambio en el tamaño del corte producido por Bam HI en el DNA rearrreglado es detectado por la sonda pECk. Se muestran dos de los resultados posibles: en I el DNA rearrreglado de los diferentes hibridomas se localiza en aproximadamente el mismo peso; en II el rearrreglo de DNA es diferente para cada hibridoma. H = DNA de hígado; 1,2,3,4 = hibridomas responsivos a ESE.

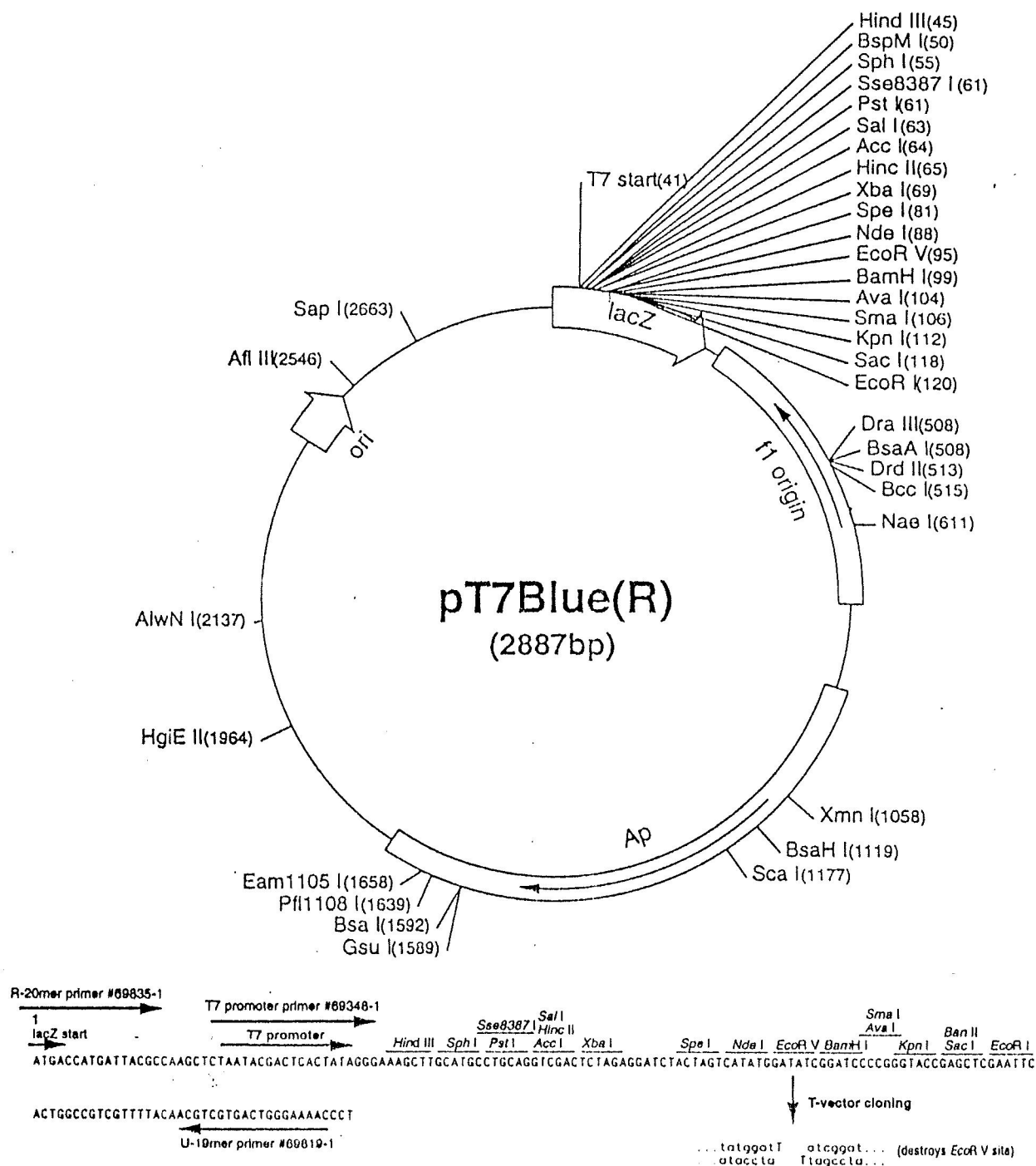


Fig. 9. Mapa de restricción y secuencia de bases del vector PT7Blue en el sitio de clonación múltiple; el producto del PCR se inserta en el sitio EcoR V. Se indican también los lugares de unión de los cebadores para secuenciación (promotor PT7 y U19).

I.- DESCONGELAMIENTO Y CULTIVO DE LOS HIBRIDOMAS

Se utilizaron los hibridomas 26.1, 12.3.4, 4.6.2, 1.7.3 (responsivos a ESE), 30.2 y 13.11.6 (no responsivos) fabricados por Muralidhar *et al.* (1992).

A).- DESCONGELAMIENTO

1.- Los tubos con los hibridomas congelados a -70°C se agitan en un baño de agua a 37°C , hasta lograr el descongelamiento (1 - 2 min).

2.- En una campana de extracción se limpia el exterior del tubo con etanol al 70 %; se seca por completo. Con una pipeta estéril se toma el total de medio con los hibridomas (sin tocar las paredes externas del tubo), y se agrega a tubos de plástico Corning^R de 15 ml que contienen 10 ml de medio RPMI completo (ver apéndice), previamente calentado a 37°C .

3.- Se centrifugan los hibridomas por 6 min a 400 xg.

4.- En una campana de extracción, se desecha el sobrenadante, dejando al paquete celular con un poco de medio; se agregan 10 ml de medio RPMI completo calentado a 37°C , con el cual se resuspende el paquete celular suavemente con la pipeta.

5.- Una vez resuspendidos, los hibridomas se transfieren a frascos de cultivo de plástico de 75 cm^3 con 30 ml de medio RPMI completo y se dejan incubando a 37°C .

B).- CULTIVO

1.- A una concentración de $\sim 30 \times 10^4$ cel/ml determinada por conteo en hematocitómetro, los hibridomas son transferidos a frascos de cultivo de plástico planos de 75 cm^2 con 50 ml de medio RPMI completo. La solución con hibridomas se agita para homogeneizar la distribución y se agrega 1-2 ml en los nuevos frascos de cultivo.

2.- Al alcanzar la concentración indicada, los hibridomas son transferidos a frascos rotativos con medio de cultivo RPMI completo hasta un volúmen total de 250 ml. Los frascos son gasificados con una mezcla de N_2 y CO_2 durante 1 min para mantener el pH del medio; los frascos se cierran completamente y son incubados horizontalmente en bases rotativas hasta alcanzar la densidad de células requeridas para la extracción del DNA (10^8 células en total).

II.- AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO

1.- El total del cultivo celular ($\sim 250 \text{ ml}$) se centrifuga a 1500 rpm para hacer un paquete celular.

2.- Lavar las células con medio RPMI o PBS (Solución de fosfatos); centrifugar a 350 xg durante 10 minutos.

3.- Para 10^8 células, agregar de 0.5 a 1 ml de "Magic Mix" (ver apéndice). Resuspender las células suavemente aspirando con la pipeta. Incubar en hielo por 5 a 10 minutos.

4.- Centrifugar a 200 xg por 10 min.

5.- Resuspender el paquete celular en amortiguador PK (usando una solución madre 2x, para una concentración final de 1x. PK = proteinasa K), hasta un volúmen final de 1 ml. Agregar 20 μ l de proteinasa K por cada ml de paquete resuspendido (solución madre 20 mg/ml). Incubar de 3 horas a toda la noche a 50°C.

6.-Extraer el DNA con fenol - cloroformo:

1 vez con un volúmen igual de fenol

2 veces con un volúmen de fenol-cloroformo 1:1

1 vez con un volúmen igual de cloroformo

7.- Precipitar el DNA con 1/2 volúmen de acetato de amonio (7.5 M), y 2 volúmenes de etanol absoluto.

8.- Liofilizar el paquete (solo si el DNA va a ser refrigerado por largo tiempo).

9.- Resuspender en 500 μ l a 1 ml de TE (Tris-EDTA).

10.- Determinar la concentración de DNA por absorción en espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O.= 50 μ g DNA/ml).

III.- REACCION DE RESTRICCION DE DNA GENOMICO

1.- Agregar de 10 a 15 μ g de DNA en 10 μ l de DNA en un tubo eppendorf.

2.- Agregar 5 μ l de amortiguador requerido por la enzima (generalmente los amortiguadores vienen a una concentración de 10x, así que para un volúmen final de 50 μ l se necesitan 5 μ l de amortiguador).

3.- Agregar 30 μ l de agua estéril

4.- Agregar 5 μ l de la enzima

5.- Dejar la reacción incubando a 37°C toda la noche.

Posteriormente se puede analizar en gel de agarosa, o congelar el DNA digerido a -20°C.

IV.- SOUTHERN BLOTTING

A).- CORRIMIENTO EN GEL DE AGAROSA

1.- Los análisis de la digestión se hicieron en minigeles de agarosa (0.8 % de agarosa en amortiguador de Tris-acetato-EDTA + 5 μ l de bromuro de etidio) corridos horizontalmente, usando amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE).

2.- Se mezclan 20 μ l de la reacción de restricción con 2 μ l de amortiguador de carga; el volúmen total se carga en el gel.

3.- El corrimiento del gel se hace a 100 V, usando amortiguador TAE en el tanque, hasta que el indicador (azul bromofenol) esté cerca del frente del gel.

4.- La visualización del corrimiento se hace con luz U.V.

B).- TRANSFERENCIA A FILTRO DE NILON (''BLOTTING'')

1.-El tanque de transferencia se llena con una solución 10x de SSC (solución de citrato de sodio).

2- El gel se coloca sobre 3 o 4 hojas de papel filtro, previamente empapadas en la solución de SSC. Sobre el gel se coloca un pedazo de filtro de nylon (Zetabind) del tamaño adecuado,

previamente mojado en la solución de transferencia.

3.- Para absorber el líquido se colocan 3 o 4 hojas de papel filtro del mismo tamaño del filtro de nylon, previamente humedecidos; sobre estos se colocan toallas o papel absorbente, cuidando que no sobrepasen los lados del gel. Finalmente se coloca un peso sobre todo el montaje y se permite la transferencia toda la noche.

4.- El filtro de nylon se expone de 5 a 10 min a luz U.V. para fijar el DNA al papel. El gel puede revisarse con luz U.V. para determinar el grado de transferencia.

C.- PREPARACION DE LA SONDA.

1.- Se toma 1 μ l de la solución de DNA y se agregan 4 μ l de agua. Se pone en agua hirviendo por 2 minutos y se coloca en hielo.

2.- Se agrega 1 μ l de cada uno de los nucleótidos no marcados (dTTP, dGTP).

3.- Se agrega 5 μ l de la solución de hexámeros aleatorios.

4.- Agregar 1.5 μ l de los nucleótidos marcados con ^{32}P (dATP, dCTP).

5.- Se agrega 1 μ l del fragmento Klenov de la polimerasa de *E. coli* y se deja a temperatura ambiente por 2 horas para la incorporación.

6.- Posteriormente se precipita el DNA con:

1/2 volúmen de acetato de amonio 7.5 M

2 volúmenes de etanol

3 - 4 μ l de ARN_t de levadura

Se recupera el precipitado centrifugando 5 min a 1 300 xg.

7.- El DNA precipitado se puede disolver en 200 μ l de agua o TE.

D.- HIBRIDIZACION.

1.- El filtro de nylon se coloca en una bolsa de plástico a la que se agrega 10 - 15 ml de solución de hibridación y se sella. Se incuba por 1 h a 42°C

2.- La sonda se hierve antes de agregarla a la bolsa de hibridización y se deja incubando toda la noche a 42°C.

3.- Una vez hibridizada la sonda, el papel debe ser lavado para remover el exceso de sonda sin hibridizar. Los lavados son:

2 veces a temp. ambiente con 2x SSC y 0.5 % SDS

2 veces a 50 - 60°C con 2x SSC y 0.5 % SDS

1 vez a 50 - 60°C con 0.1x SSC y 0.5 % SDS

E.- EXPOSICION Y REVELADO.

1.- El filtro de nylon se envuelve con hojas de plástico Saran Wrap^R y se expone a la película sensible a rayos X (Kodak X-OMAT AR) a -70°C de 6 horas a toda la noche.

V.- TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES (TG1) CON EL PLASMIDO pECk

1.- Las células competentes TG1 de *E. coli.* que se encontraban mantenidas a -70°C , se descongelan en hielo.

2.- El DNA del plásmido (aprox. $0.3\ \mu\text{g}$ en $30\ \mu\text{l}$) se mezcla con las células que han sido descongeladas en hielo. Se mantienen en hielo por 30 min

3.- A continuación se da un choque térmico a $37-42^{\circ}\text{C}$ durante 90 segundos.

4.- Se enfria en hielo; se diluye con 4 volúmenes de medio LB (Luria-Broth; igual a Terrific Broth pero sin glicerol) y se incuba por 1 h a 37°C .

5.- Se siembran en placas de agar LB con ampicilina ($0.05\ \mu\text{g}/\text{ml}$) y se dejan crecer durante la noche a 37°C .

6.- Las colonias positivas son seleccionadas y crecidas en 5 ml de medio LB con ampicilina ($0.05\ \mu\text{g}/\text{ml}$).

VI.- OBTENCION DE DNA DE PLASMIDO MEDIANTE EL METODO ALCALINO (MINIPREP PARA 5 ML DE CULTIVO)

1.- Centrifugar los tubos de cultivo 10 min a 3000 rpm.

2.- Resuspender el paquete bacteriano en $100\ \mu\text{l}$ de solución I fría. Incubar 5 min a temperatura ambiente. El paquete resuspendido puede ser transferido a tubos eppendorf para un mejor manejo.

3.- Agregar $200\ \mu\text{l}$ de solución II recién hecha; cerrar el tubo e invertir rápidamente varias veces para homogenizar el

contenido. Incubar en el hielo por 5 minutos.

4.- Agregar 150 μ l de solución III fría; homogeneizar el contenido usando el vórtex ligeramente con el tubo invertido. Incubar en hielo por 5 min.

5.- Centrifugar por 5 min a 4⁰C.

6.- Transferir el sobrenadante a otro tubo y agregar 6 U de RNAasa. Incubar 1 h a 37⁰C.

7.- Extraer el DNA:

1 vez con un volúmen igual de fenol

2 veces con un volúmen igual de fenol-cloroformo 1:1

1 vez con un volúmen igual de cloroformo

8.- Precipitar el DNA con 1/2 volúmen de acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol absoluto.

9.- Lavar con etanol 70% y liofilizar el paquete.

10.- Resuspender el paquete en 20 μ l de TE. Guardar a -20⁰C.

VII.- RESTRICCION DEL PLASMIDO Y PURIFICACION DE LA BANDA DE INTERES POR ELECTROELUCION

1.- Aproximadamente 5 μ l de DNA de plásmido se corta con las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1, a un volúmen total de 20 μ l:

DNA de plásmido (pEck)	5 μ l
------------------------	-----------

Agua estéril	11 μ l
--------------	------------

Buffer No. 3 (GIBCO-BRL)	2 μ l
EcoR1	1 μ l (concentración: 10 U/ μ l)
BamH1	1 μ l (concentración: 10 U/ μ l)

2.- La reacción se deja correr por 2 horas a 37⁰C.

3.- La solución resultante (20 μ l) se corre en un gel de agarosa (0.8%) a 100 V, hasta lograr una separación adecuada de la banda de interés (6.5 kb).

4.- Usando la luz U.V. para visualizar las bandas de DNA, se corta el fragmento de gel con la banda de interés y se coloca en una bolsa de diálisis con ~ 300 μ l de TE. La bolsa se coloca en la cámara de electroforesis y se deja correr ~ 1 h a 100 V.

5.- Con la luz U.V. se revisa que todo el DNA haya abandonado el gel.

6.- El contenido de la bolsa de diálisis se transfiere a un tubo eppendorf, se limpia con una extracción de fenol-cloroformo (ya descrita) y el DNA se precipita con etanol-acetato de amonio.

VIII.- AISLAMIENTO DE RNA

1.- Centrifugar las células (~ 10⁸ células) a 1000 rpm durante 10 minutos.

2.- Resuspender las células en 2.5 ml de amortiguador GTC por cada 0.5 ml de paquete celular.

3.- Licuar las células de 1 a 2 min a velocidad media o alta con un homogeneizador (Omnimixer).

4.- Enjuagar el homogeneizador con etanol y después con Tris 1 M (pH 8), o con agua destilada una vez completado el licuado.

5.- Agregar un volúmen igual de cloroformo al homogeneizado celular y licuar 2 min a velocidad alta.

6.- Centrifugar a 3000 xg, durante 3 minutos; conservar el sobrenadante.

7.- Agregar 5 volúmenes de cloruro de litio 4 M al sobrenadante. Mantener a -20°C , de 4 horas a toda la noche.

8.- Centrifugar a 12 000 xg, durante 10 min; conservar el precipitado.

9.- Resuspender el precipitado en 250 μl de amortiguador para DNasa y agua tratada con DEPC. Agregar 25 μg de DNasa libre de RNasa por ml de solución, y agregar 1 U de RNasin^R (inhibidor de RNasa) por μg de DNasa. Incubar a 37°C durante 30 minutos.

10.- Agregar un volúmen igual (250 μl) de amortiguador PK 2x. Agregar 10 μl de PK (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubar a 45°C durante 1 h.

11.- Extraer 2 veces con un volúmen igual de fenol:cloroformo 1:1

12.- Agregar 2.5 volúmenes de etanol al 100% y precipitar toda la noche a -20°C .

13.- Colectar el precipitado por centrifugación a 12,000 xg, durante 15 min y resuspender en 75 a 150 μl de agua tratada con DEPC.

14.- Medir la concentración de RNA en la solución por absorbancia en el espectrofotómetro a 260 nm.

IX.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

A).- FABRICACION DE cDNA USANDO TRANSCRIPTASA INVERSA M-MLV

1.- Agregar de 1 a 2 μg de RNA poli-A o 10 μg de RNA total (en aproximadamente 7 μl de agua tratada con DEPC), con 1 μl de oligo dT (solución madre de 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Incubar las mezclas a 72°C por 5 minutos y posteriormente mantenerlas a temperatura ambiente durante 10 minutos.

2.- Preparar un coctel de los siguientes reactivos para todas las mezclas:

Reactivo	μl por muestra
Amortiguador 5x	3
dNTP	2 de cada uno (167 μM)
M-MLV	1 (200 U)
RNAsin	0.5 (20 U)

Añadir 6.5 μl del coctel a cada muestra e incubar a 37°C por 30 minutos.

3.- Inactivar la transcriptasa inversa mediante el calentamiento de la reacción hasta 95°C por 5 minutos.

4.- Mantener en hielo hasta que se efectue el PCR.

B).- AMPLIFICACION DE cDNA

Para la amplificación del cDNA se utilizó el kit Ig-PrimeTM

(Industrias Novagen, 597 Science Dr. Madison, WI 53711; No. de catálogo 69827-1.) el cual contiene 7 diferentes cebadores específicos para secuencias V_K que permiten amplificar, en conjunto, un $\sim 90\%$ de las secuencias V_K .

Secuencia de los cebadores usados en la amplificación del cDNA:

	Longitud(pb)	Secuencia 5' → 3'
$IgV_k -5'A$	32	GGGAATTCATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT
$IgV_k -5'B$	33	GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT
$IgV_k -5'C$	39	ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT
$IgV_k -5'D$	42	ACTAGTCGACATGAGGRCCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT
	41	ACTAGTCGACATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYYCWGG
$IgV_k -5'E$	39	ACTAGTCGACATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGSGTT
	41	ACTAGTCGACATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTTCAATTG
	38	ACTAGTCGACATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
$IgV_k -5'F$	36	ACTAGTCGACATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG
	36	ACTAGTCGACATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG
	35	AGTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
	37	ACTAGTCGACATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
$IgV_k -5'G$	39	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT
	39	ACTAGTCGACATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT
	37	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG
	37	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTTTRCTGCTGCTATGG
$IgV_k -3'$	30	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA

I = inosina

W = A o T

R = A o G

D = A, o G, o T

Y = C o T

H = A, o C, o T

K = G o T

V = A, o C, o G

S = C o G

B = C, o G, o T

M = A o C

1.- Para cada reacción combinar:

<u>Reactivo</u>	<u>μl por muestra</u>	
Amortiguador 10x	5	
dNTP	8	(200 μM de cada dNTP por reacción)
Polimerasa Taq de DNA	0.25	(2.5 U/reacción)
Cebadores	1-2	de cada uno (~ 0.1 μM)
DMSO		Conc. final de 10%

Añadir agua hasta un volumen final de 45 μl por reacción.

2.- Agregar 45 μl del coctel a tubos eppendorf de 0.5 ml
Con una pipeta Pasteur estéril agregar 1 o 2 gotas de aceite mineral (~ 50μl) a cada tubo. Cerrar todos los tubos hasta que se esté listo para agregar el template de DNA (cDNA en este caso).

3.- Abriendo solo un tubo a la vez agregar 3 μl de cDNA;
entre cada tubo limpiar la pipeta con "Count-off",^R o con ácido clorhídrico concentrado.

4.- Colocar las muestras en la máquina de PCR (Ericomp^R) y

correrla por 40 ciclos:

Desnaturalización 1 min a 94°C

Alineamiento 2 min a 55°C

Extensión 3 min a 72°C

5.- Una vez realizada la reacción de PCR, las muestras pueden ser guardadas a 4°C para su análisis posterior. El producto se analiza en geles de agarosa de bajo punto de fusión.

X.- RECUPERACION DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION.

1.- Los geles son preparados y corridos como ya se describió, solo que en este caso se emplea agarosa de bajo punto de fusión (LMA por sus siglas en inglés) al 0.8 %.

2.- Una vez localizadas las bandas de interés en el gel con la ayuda de luz U.V., se separan usando una navaja y procurando cortar la menor cantidad posible del gel. Las bandas así separadas se colocan en un tubo eppendorf.

3.- Se agrega la cantidad suficiente de amortiguador TE justo para cubrir la agarosa en el tubo y se incuba a 80°C .

4.- Una vez fundida la agarosa se procede a realizar una extracción con fenol-cloroformo como ya se describió. Es importante usar fenol saturado con amortiguador previamente calentado a $\sim 50^{\circ}\text{C}$ en el primer paso de la extracción para evitar una solidificación de la agarosa.

5.- El DNA es precipitado del sobrenadante obtenido de la extracción usando 1/2 volúmen de acetato de sodio 7M y 2 volúmenes de etanol al 100%; se centrifuga en minifuga a velocidad máxima y el precipitado se lava con etanol al 70%.

6.- Una vez eliminada la mayor cantidad posible de líquido, el precipitado se liofiliza y posteriormente se resuspende en agua o amortiguador TE.

XI.- REACCION DE LIGACION PARA LOS PRODUCTOS DEL PCR

1.- En un tubo eppendorf se combinan:

2 μ l del vector linearizado (pT7Blue)

6 μ l de DNA (purificado de LMA)

1 μ l de amortiguador de ligación

1 μ l de ATP 100 mM

1 μ l de ligasa (T4)

2.- El contenido total se mezcla y se incuba a temperatura ambiente de 2 horas a toda la noche.

XII.- REACCION DE TRANSFORMACION PARA CELULAS COMPETENTES NOVA BLUE^R.

1.- Al volúmen total de la reacción de ligación (10 μ l) se agregan 40 μ l de agua.

2.- Las células competentes se descongelan en hielo y a 50 μ l de bacterias se les agrega 5 μ l de la dilución de la reacción de ligación.

3.- Las células se dejan en hielo por 30 min; a continuación se les da un choque térmico a 37°C durante 2 min después del cual se vuelven a poner en hielo.

4.- Se añade 0.5 ml de medio a cada tubo y se incuban a 37°C por una hora.

5.- En un tubo eppendorf se mezclan 50 μl de X-Gal y 50 μl de IPTG; el volúmen total se agrega a 150 μl de las bacterias transformadas e incubadas y se siembran en placas de agar LB con ampicilina dejando incubar a 37°C toda la noche.

6.- Las colonias positivas (blancas) son seleccionadas y crecidas en 5 ml de medio LB con ampicilina por toda la noche.

XIII.- PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO DE 5 ML DE CULTIVO USANDO RESINAS DE AFINIDAD (PROMEGA^R).

1.- El volúmen total de cultivo (5 ml) se centrifuga, y el paquete celular se resuspende con 200 μl de amortiguador con 100 $\mu\text{g./ml}$ de RNasa (solución A).

2.- Las células resuspendidas son transferidas a un tubo eppendorf y se agregan 200 μl de solución B (NaOH 0.2 N; 1% SDS) y 200 μl de solución C (acetato de potasio 2.55 M, pH 4.8)

3.- Los tubos se centrifugan y se recupera el sobrenadante. A este se agrega 1 ml de "WizardTM minipreps purification resin" (resina de purificación).

4.- La mezcla se carga en una jeringa de 3 ml y se pasa

lentamente a través de un filtro.

5.- El filtro se lava con 2 ml de solución D (etanol 50%; Tris 10 mM; NaCl 0.1 M; EDTA 2.5 mM); posteriormente se centrifugan en tubos eppendorf para eliminar el exceso de la solución de lavado.

6.- Se agregan 50 μ l de TE a los filtros y se agitan suavemente; se dejan reposar 5 min y se centrifugan en tubos eppendorf para recuperar el DNA.

XIV.- ANALISIS DEL DNA DE PLASMIDO USANDO ENZIMAS DE RESTRICCION

1.- De la manera ya descrita, se prepara una reacción de restricción usando:

10 μ l de DNA de plásmido

2 μ l de amortiguador No. 10 (GIBCO-BRL)

8 μ l de agua

1 μ l de la enzima de restricción Sal I

La reacción se deja correr por 2 horas y se analiza en gel de agarosa.

XV.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA DETERMINAR LA ORIENTACION DEL INSERTO.

1.- Se prepara un coctel como sigue:

105 μ l de amortiguador

105 μ l de DMSO

168 μ l de dNTP

5 μ l de cebador 3'

10 μ l de cebador 5' (cebador del promotor de T7).

616 μ l de agua

10 μ l de Taq polimerasa

2.- En tubos eppendorf se agregan 49 μ l de la mezcla y 1 μ l de DNA de plásmido.

3.- Se ponen 1-2 gotas de aceite mineral en el tubo de reacción y se corren en la máquina de PCR por 40 ciclos.

4.- El resultado del PCR se analiza en gel de agarosa.

XVI.- SECUENCIACION DE DNA.

A) PREPARACION DE UN GEL DE GRADIENTE.

1.- Se preparan las siguientes soluciones:

Solución 1x*

42 g de urea

15 ml de solución de

acrilamida al 40% y

bis-acrilamida al 2%

10 ml de TBE 10x

Solución 5x

8.4 g de urea

3 ml de solución de

acrilamida al 40% y

bis acrilamida al 2%

10 ml de TBE 10x

* Llevar hasta 100 ml con agua

2.- Ambas soluciones se filtran y posteriormente se agrega:

Solución 1x

65 μ l de TEMED

Solución 5x

15 μ l de TEMED

250 μ l de persulfato de
amonio al 25 %

65 μ l de persulfato de
amonio al 25 %

3.- Rápídamente y usando una pipeta de 25 ml se toman 16 ml de la solución 1x y después 10.5 ml de la solución 5x. El contenido de la pipeta se vacía entre las placas de vidrio del soporte de manera continua para formar el gradiente en el gel.

4.- El recipiente se coloca de manera horizontal y se permite polimerizar de 2 horas a toda la noche.

B) PREPARACION DE LAS REACCIONES DE SECUENCIACION

1.- En un tubo eppendorf se combinan de 3 a 4 μ g de DNA en TE con 1/5 volúmen de solución desnaturizadora (NaOH 1 M; EDTA 1 mM).

2.- Colocar la muestra en hielo y agregar 1/10 volúmen de solución neutralizadora enfriada en hielo (acetato de amonio 2 M, pH 5.4); inmediatamente agregar 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA.

3.- Recuperar el DNA por centrifugación y lavarlo con etanol al 70 %.

4.- Liofilizar el paquete y resuspenderlo en 6-7 μ l de agua.

5.- Al DNA en agua agregar de 10 a 15 ng de cebador en aproximadamente 2 o 3 μ l, 2 μ l de amortiguador de secuencia y ajustar el volúmen total a 10 μ l con agua.

6.- Calentar la mezcla a 65°C por 3 min y enfriar

lentamente hasta 30°C para permitir el alineamiento de los cebadores.

7.- Mientras la mezcla de alineamiento se enfria, se preparan los tubos de terminación que contienen dideoxi nucleótidos. Se agrega $2.5\ \mu\text{l}$ de cada mezcla de terminación a cada tubo (4 tubos: G, A, T, C, por cada reacción de secuenciación).

8.- La mezcla de marcaje (7-deaza-dGTP) se diluye 1:5

9.- Diluir la enzima secuenasa 1:8 en el amortiguador de dilución de enzima.

10.- Mezcla de marcaje-extensión: a los $10\ \mu\text{l}$ de la reacción de alineación se agrega:

1 μl de DTT (0.1 M)

1 μl de pirofosfatasa (USA Biochemicals)

2 μl de la mezcla de marcaje diluida

1 μl de ^{35}S -dATP

2 μl de enzima secuenasa (GIBCO-BRL)

Se mezcla con la pipeta y se incuban a temperatura ambiente por 3 minutos.

11.- En este tiempo, los tubos con las soluciones de terminación se precalientan a 45°C . Después de los 3 min de incubación, se agregan $3.5\ \mu\text{l}$ de la mezcla de marcaje-extensión a los tubos de terminación; la reacción se continúa a 45°C durante 2-5 min.

12.- Se agregan 4.5 μ l de solución de finalización a cada tubo de terminación para detener la actividad de la enzima. Las soluciones pueden usarse enseguida o guardarse hasta por 3 días a -20°C .

C) CORRIMIENTO Y REVELADO DEL GEL

1.- El gel se precalienta a 45°C corriéndolo a una corriente constante de 1000 V en la cámara de secuenciación, hasta que las placas estén uniformemente calentadas; para el corrimiento se usa amortiguador de TBE.

2.- Una vez calentado el gel, las muestras de secuenciación se calientan a 90°C . En cada línea de secuenciación se cargan 3 μ l de cada muestra marcada G, A, T y C.

3.- Después de correr el gel, el gel se remoja en 1 l de una solución 10 % de ácido acético glacial y 10 % de metanol, durante 30 minutos.

4.- El gel se recupera adhiriéndolo a una hoja de papel cromatográfico Whatman 3MM y despegándolo a partir de la parte superior. Posteriormente se cubre con una lámina de plástico adhesivo Saran Wrap^R, cortándose las orillas para que quede justo al tamaño del gel y se seca a 80°C al vacío durante una hora.

5.- El plástico adhesivo se retira y el gel secado se expone a la película sensible a radiación (Kodak X-OMAT AR) durante toda la noche.

RESULTADOS

CULTIVO DE HIBRIDOMAS Y PURIFICACION DE DNA GENOMICO

Los hibridomas empleados (Muralidhar *et al.*, 1992) fueron generados por la fusión de un linfocito B y una célula de una línea mielómica de ratón (el compañero de fusión) que no secreta anticuerpos, resultando en una línea inmortal secretora del anticuerpo producido por el linfocito.

El cultivo de los seis hibridomas y el compañero de fusión (P3X) se logró con éxito de acuerdo a los protocolos descritos, excepto en el caso de 26.1, para el cual se hubo de usar estímulo de células exudadas de peritoneo (PEC) de ratón a una concentración final de 1×10^5 hibridomas/ml y 8×10^4 PEC/ml.

La concentración final de DNA extraído (Tabla I) fue suficiente para efectuar los análisis por Southern Blotting, con excepción de 13.11.6, 4.6.2 y P3X en cuyo procesamiento se presentaron problemas con la eliminación de proteínas, quizá por un mal estado de la enzima proteinasa K.

Se hizo una segunda extracción de DNA de P3X para mejorar la concentración, obteniéndose $1.84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. También se purificó DNA de hígado de ratón (C57Bl/6) para ser usado como control en el análisis de Southern Blotting.

ANALISIS POR SOUTHERN BLOTTING

Las Figuras 10 y 11 muestran los primeros resultados

Hibridoma		No. de células	D.O. (1:100)	DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
30.2	(1)N	1.92×10^8	0.65	3
26.1	(2)R	N.D.	0.45	2
12.3.4	(3)R	2.13×10^8	0.44	2
1.7.3	(4)R	1.8×10^8	0.4	2
4.6.2	(5)R	N.D.	0.018	0.1
13.11.6	(6)N	N.D.	0.036	0.16
P3X	P	N.D.	0.248	1.2

Tabla I. El número de células indica la concentración máxima alcanzada en el cultivo en frascos rotatorios. D.O. es determinada a 260 nm en la solución de DNA una vez realizada la extracción (1 D.O.= 50 μg DNA/ml). Los números que aparecen después de cada hibridoma es el código usado en las figuras. N.D.= No determinada. R = responsivo a ESE. N = no responsivo a ESE.

obtenidos en los que se usó el DNA total del plásmido pECk como sonda contra DNA de 4 hibridomas digerido con las enzimas EcoR1, BamH1 e HindIII. La figura 10A nos indica que la digestión del DNA genómico con las enzimas de restricción sí funcionó, ya que el DNA no cortado tiene un alto peso molecular para poder entrar en el gel de agarosa. La Fig. 10B muestra que el DNA del hibridoma 1.7.3 (4 en la Figura) dió la hibridación más fuerte con la sonda pECk, con dos bandas principales en cualquiera de las tres enzimas usadas. El patrón de bandas más claro para los hibridomas analizados, se obtuvo en el DNA digerido con HindIII. No se esperaba detectar bandas del mismo tamaño con las tres diferentes enzimas y no se pudo explicar el porque 1.7.3 hibridizó mucho más fuerte que los demás hibridomas, por lo que el experimento se repitió.

En la Fig. 11 se aprecia que se obtuvo un patrón de bandas similar al análisis anterior: una banda aproximadamente al mismo peso molecular para los 4 hibridomas, aunque esta vez casi no fueron detectables para 30.2 (1), 26.1 (2) y 12.3.4 en el DNA digerido con EcoR1 y BamH1; y una o dos bandas que muestran una fuerte hibridación con 1.7.3 (4) aún usando las tres enzimas. El patrón de bandas obtenido con HindIII es similar al de la Fig. 10. La hibridación que muestra la sonda con los marcadores moleculares de 1 636 pb y los de bajo peso molecular (≥ 500 pb) se debe a que

estos fragmentos fueron derivados a partir de un vector pBR322.

En los siguientes análisis (Fig. 12 y 13) se incluyeron DNA de 4.6.2 (5,), P3X (P) y DNA de hígado de ratón (B), y en un caso (Fig. 12) dos enzimas de restricción más: Pst1 y Kpn1. También se utilizaron alícuotas nuevas de DNA de los hibridomas 1.7.3, 12.3.4, 26.1 y 13.11.6. La sonda empleada fué el plásmido pECk total. En la Fig. 12 se puede apreciar que sólo tres de las enzimas empleadas (BamH1, Pst1, Kpn1) permitieron observar un patrón de bandeo, que en este caso correspondió a una banda única solo para 12.3.4 (3) y 1.7.3 (4). De manera similar no se esperaba obtener bandas en la misma posición con diferentes enzimas. En el DNA digerido con HindIII y EcoR1 no se observaron bandas en 1, 3 y 4. En todas las muestras con hibridoma 2, que fué sobrecargado, hubo un arrastre (hibridación inespecífica) sin bandas.

En la Fig. 13 se utilizó DNA digerido con EcoR1, BamH1 e HindIII. En esta ocasión se detectó la misma banda principal para 1.7.3 (4) que se vió en los análisis anteriores (Fig. 10 y 11). También se observaron bandas de mayor peso para 1.7.3 y 26.1. El alto grado de hibridación inespecífica indica que faltó lavado para eliminar el exceso de sonda no hibridizada.

Se decidió purificar el fragmento de 6.5 kb codificador de Ck contenido en pECk para usarlo como la sonda de hibridación en los siguientes análisis con el fin de evitar posible contaminación

o hibridación inespecífica. En la Fig. 16 se muestra el corrimiento en gel de agarosa de pECk digerido con EcoR1 y BamH1 en gel de LMA y agarosa ultrapura. La banda observada de 6.5 kb se purificó por los métodos descritos y un nuevo gel se corrió para determinar la cantidad de DNA recuperado; se puede apreciar que la purificación por electroelución permitió una mejor recuperación del DNA. Con el fin de tener suficiente material para análisis posteriores, se multiplicó el DNA de plásmido en 5 ml de cultivo de células TG1 transformadas con pECk, se purificó y se corrió en gel de agarosa digerido con las enzimas EcoR1 y BamH1 (Fig. 17A). Esto permitió seleccionar a las colonias positivas 1 y 3 para hacer un cultivo de 1 l en Terrific Broth y purificar pECk (Fig. 17B).

La fig. 14 muestra el resultado del lavado de los blots mostrado en las Figs. 12 y 13 y rehibridizado con la banda de 6.5 kb purificada de LMA. Los resultados mostraron un patrón de bandas más claro, pero similar al obtenido por la hibridación con pECk.

El experimento se repitió una vez más. La Fig. 15 representa la hibridación de DNA digerido con las enzimas BamH1 e HindIII con el fragmento de 6.5 kb purificado por electroelución. Como en los otros análisis un mejor patrón de bandas se apreció por la digestión con HindIII; 30.2 (1), 26.1 (2), 12.3.4 (3) y 1.7.3 (4) mostraron todos 2 bandas ubicadas en posiciones cercanas aunque

diferentes, y además 1.7.3 mostró una banda más como en los otros análisis. En ningún caso se vió hibridación con el DNA de P3X o de hígado de ratón.

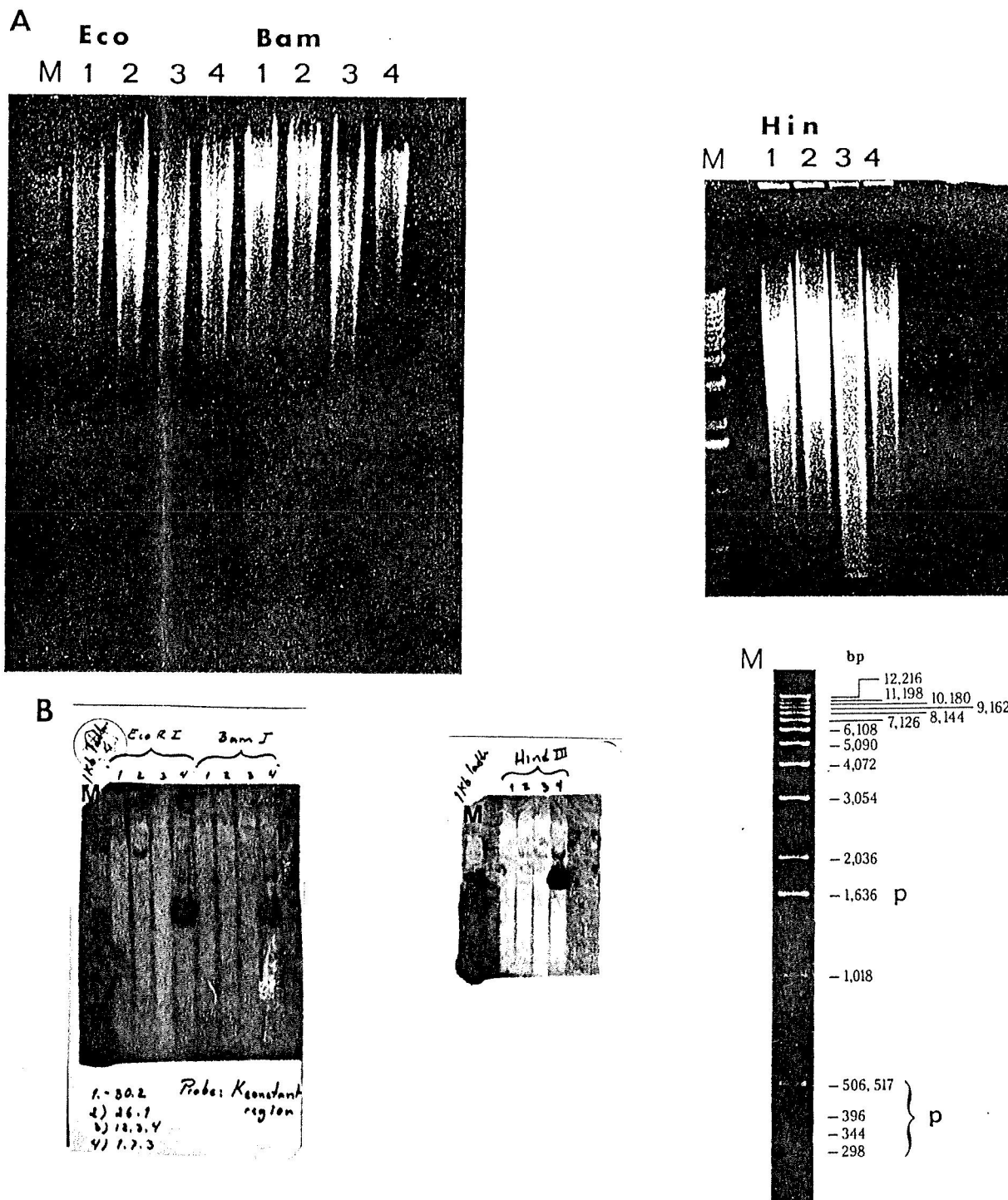


Fig. 10. A) Corrimiento en gel de agarosa de DNA genómico digerido con EcoRI, HindIII y BamHI. B) Hibridación con sonda radiactiva en filtro de nylon (ZetaBind) usando todo el plásmido pECK. El filtro fué expuesto toda la noche a película sensible (Kodak OMAT). M = marcadores de peso molecular; los marcados con "p" son fabricados a partir de pBR322. Los números se refieren a los hibridomas, como descritos en la tabla I.

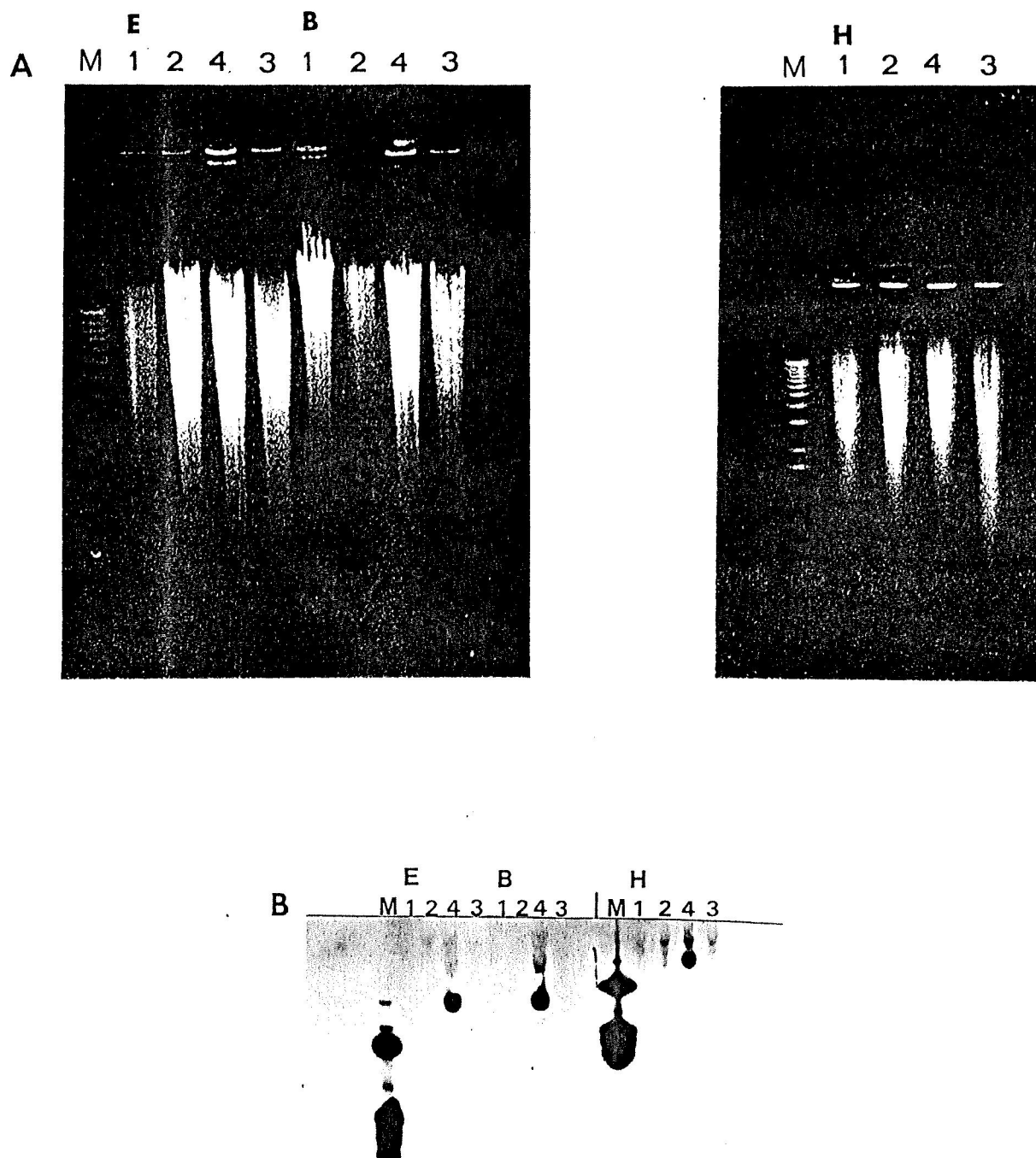


Fig. 11.A) Corrimiento en gel de agarosa de DNA genómico digerido con EcoRI, HindIII y BamHI. B) Hibridación con sonda radiactiva en filtro de nilon (Zeta-bind) usando todo el plásmido pEck. Ambos filtros fueron expuestos toda la noche a película sensible (kodak OMAT); la línea indica los límites entre los filtros.

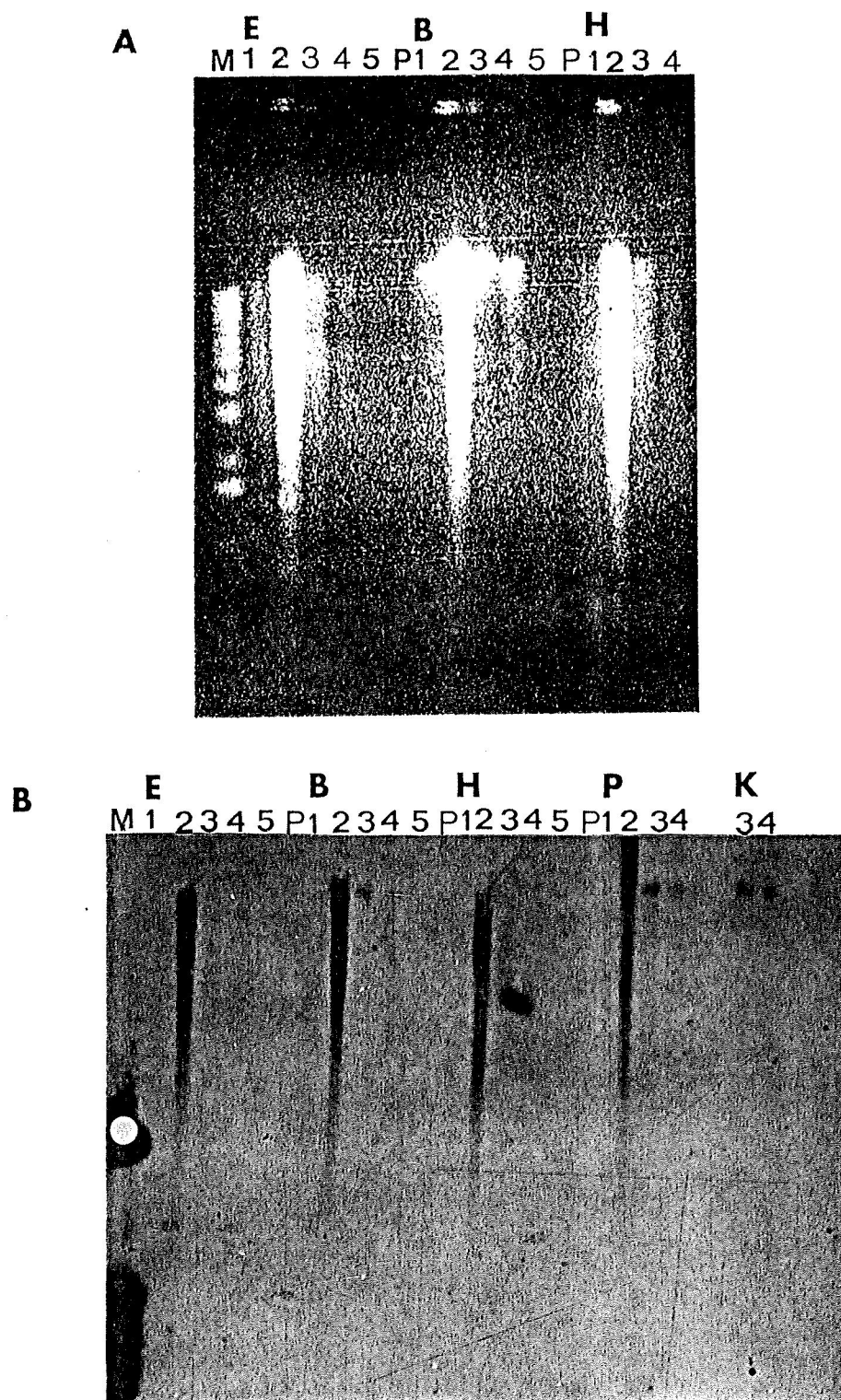


Fig. 12. A) Corrimiento en gel de agarosa de DNA genómico digerido con EcoR1, HindIII, Pst1, Kpn1 y BamH1. B) Hibridación con sonda radiactiva en filtro de nylon (ZetaBind) usando todo el plásmido pEck. El filtro fué expuesto toda la noche a película sensible (Kodak OMAT). P = P3X.

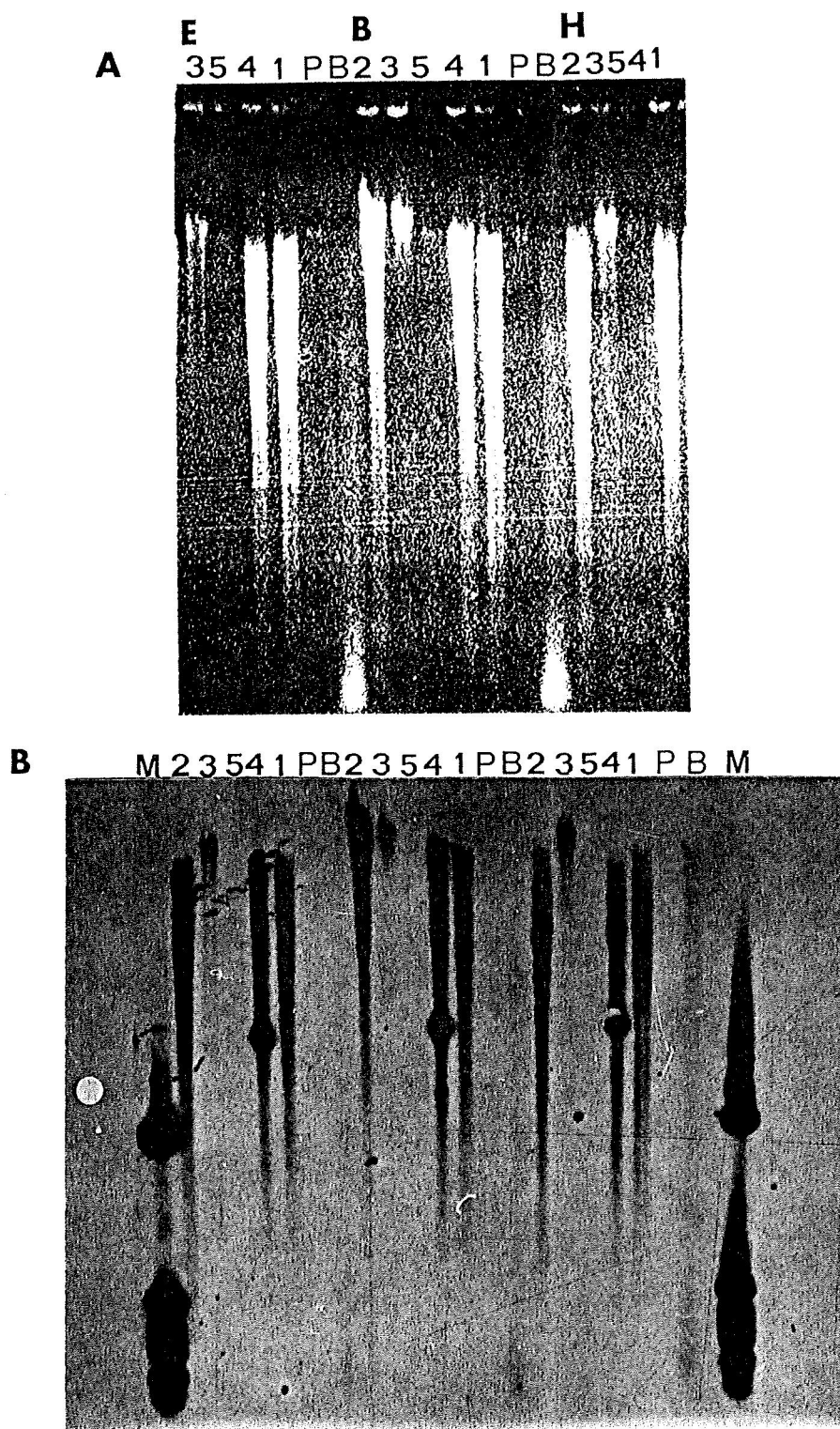
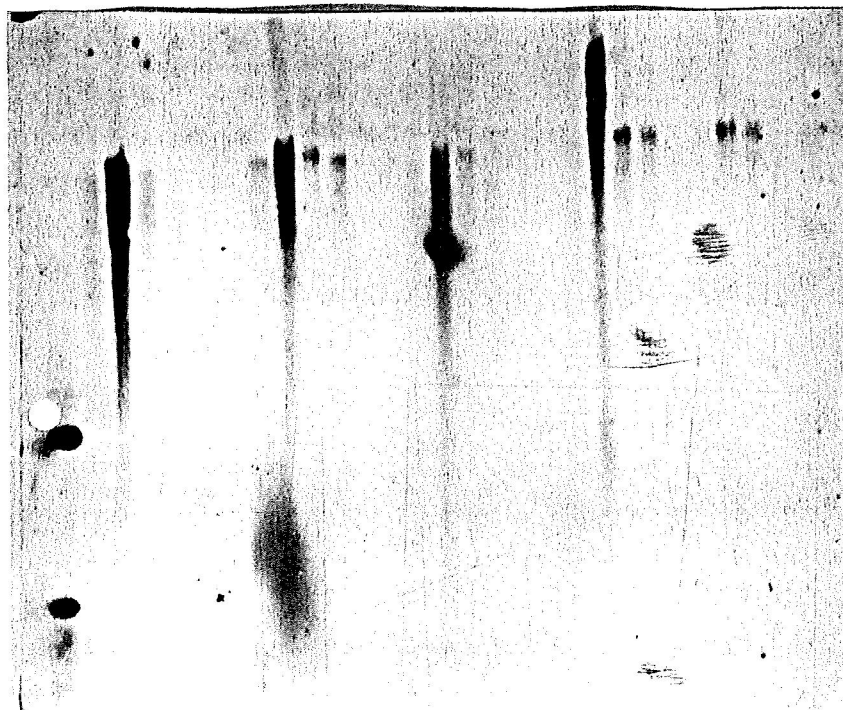


Fig. 13. A) Corrimiento en gel de agarosa de DNA genómico restringido con EcoR1, HindIII y BamH1. B) Hibridación con sonda radiactiva en filtro de nylon (ZetaBind) usando todo el plásmido pEck. El filtro fué expuesto toda la noche a película sensible (Kodak OMAT). B = Black 6.

A



B

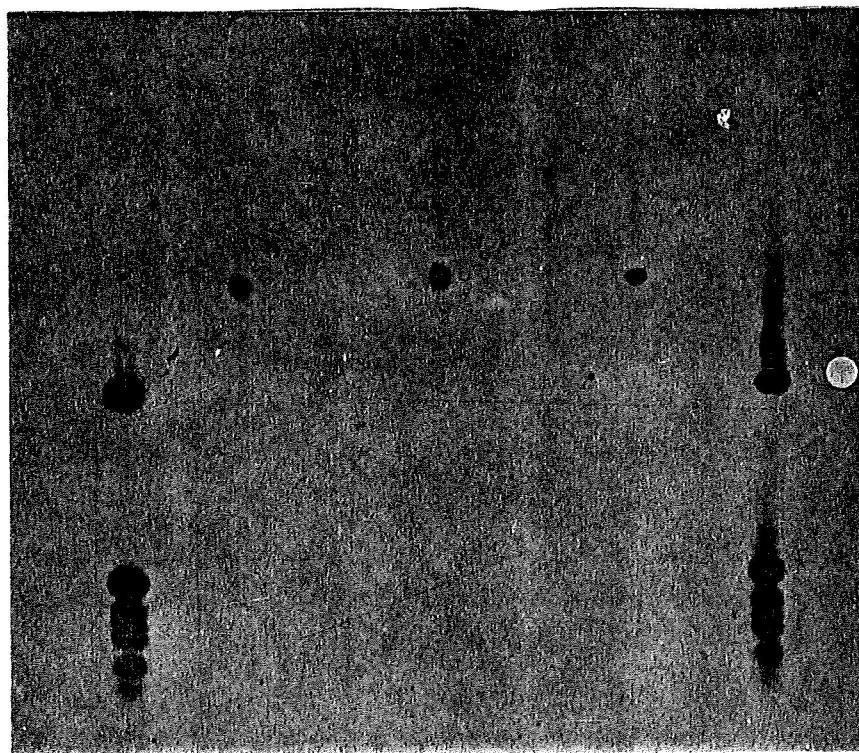


Fig. 14. Hibridación del DNA genómico con el fragmento de 6.5 kb codificador para Ck contenido en pEck. Los filtros usados para la transferencia e hibridación de DNA mostrada en las figs. 11 y 12 fueron lavados extensivamente a 90 C para eliminar por completo la sonda pEck y vuellos a hibridizar con Ck

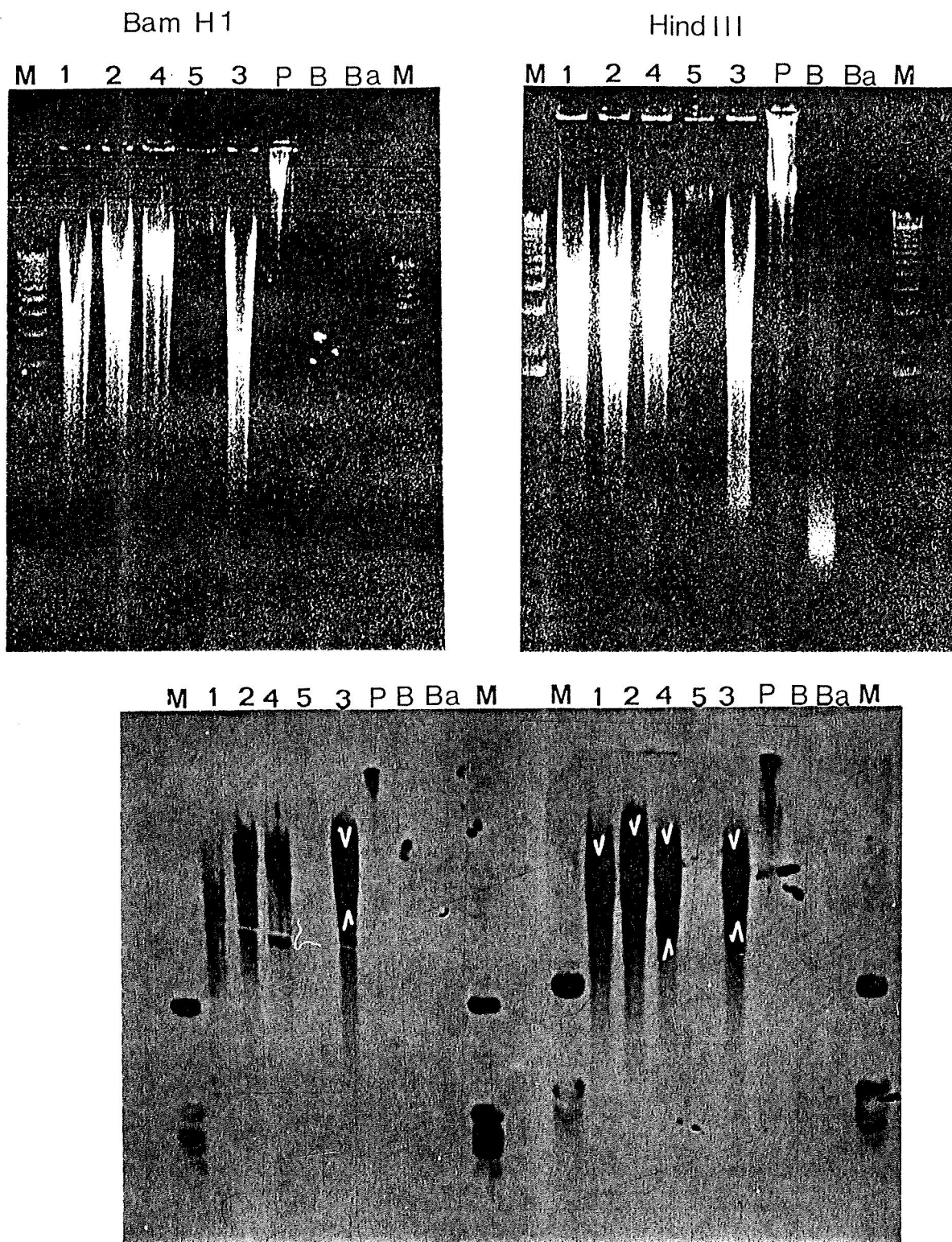


Fig. 15. A) Corrimiento en gel de agarosa de DNA genómico restringido con HindIII y BamH1. B) Hibridación con sonda radiactiva en filtro de nilon (ZetaBind) usando el fragmento de 6.5 kb codificador para Ck, purificado de pECk. El filtro fué expuesto toda la noche a película sensible (Kodak OMAT). B = Black 6. Ba = BalB/C. Las flechas indican bandas.

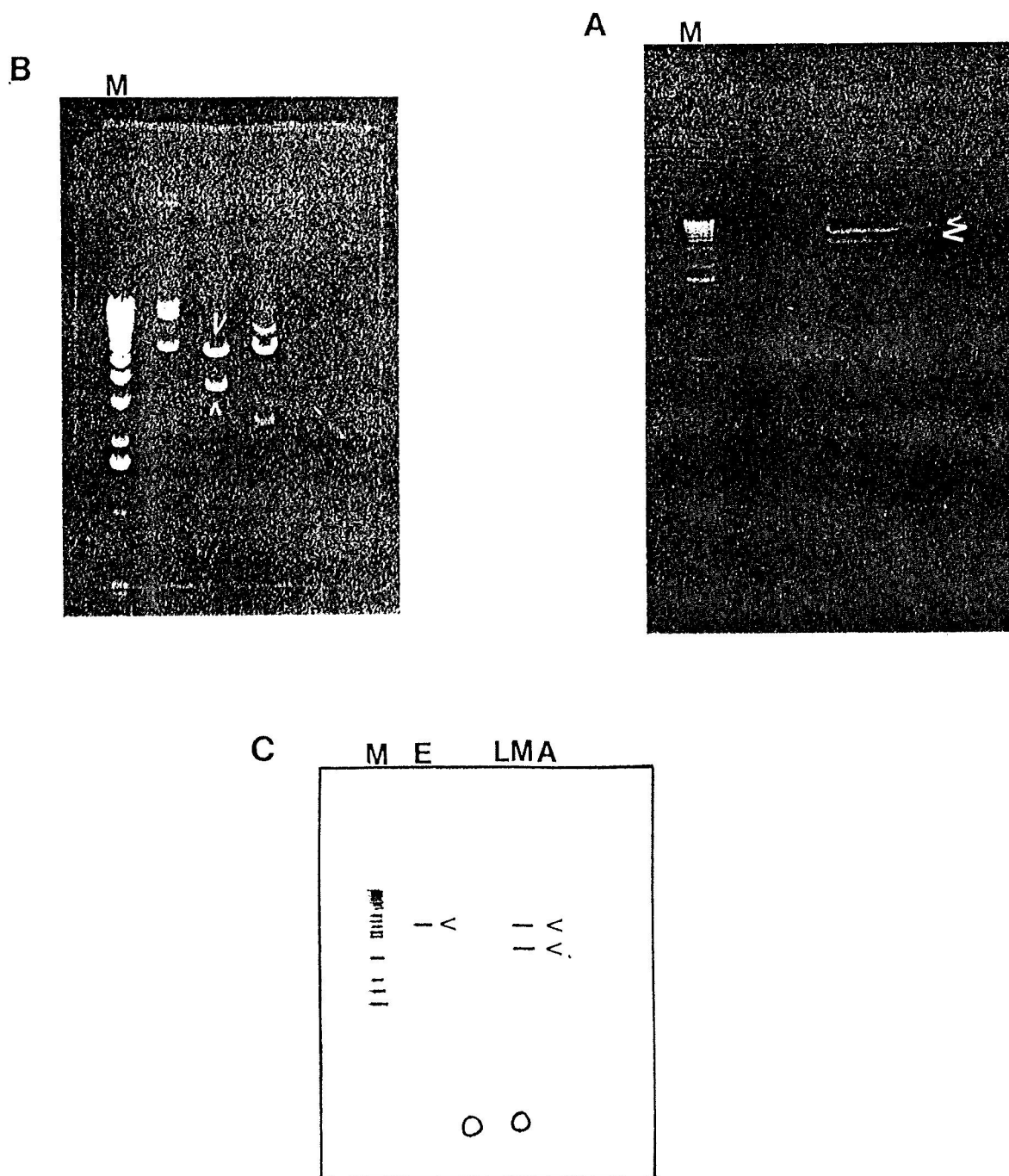


Fig. 16. El plásmido pEck fué digerido con EcoR1 y BamH1 y corrido en gel de LMA (A) y agarosa ultrapura (B). La banda que contiene Ck (6.5 kb) fue purificada por los métodos descritos. Los fragmentos de 4.5 y 6.5 kb se indican por flechas. En (c) se corrió un gel de agarosa para verificar la recuperación del DNA por electroelución y de LMA; el dibujo es un esquema de la foto.

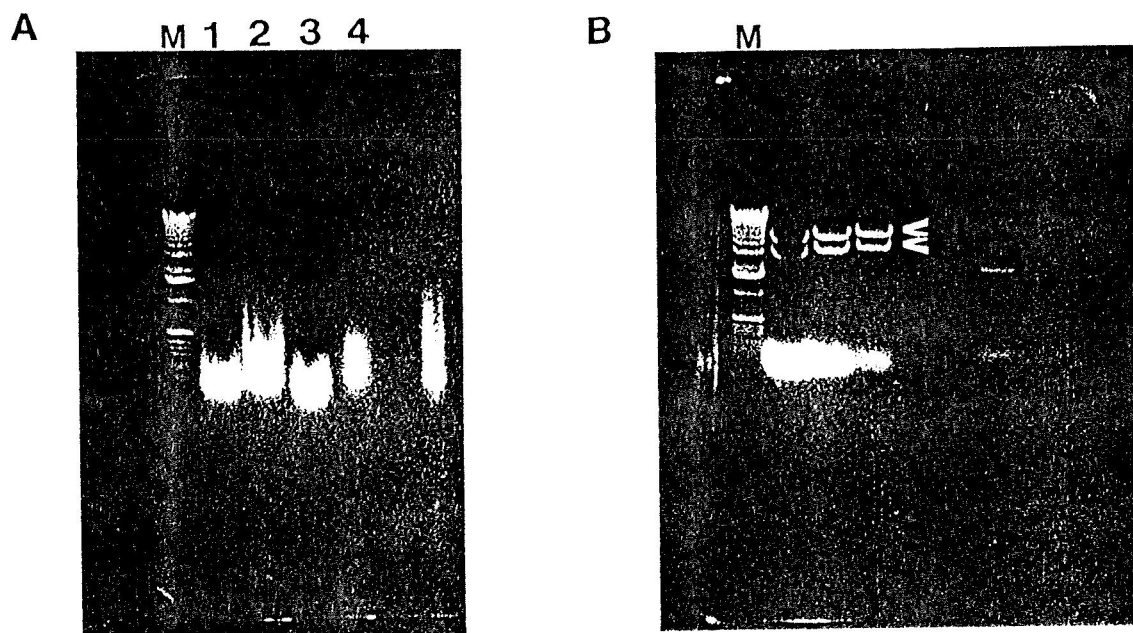


Fig. 17. Se muestra el corrimiento en gel de agarosa del DNA de plásmido pEck digerido con EcoR1 y BamH1, recuperado de (A) 5 ml de cultivo de células TG1 y (B) 1 l de cultivo. Los números corresponden a colonias positivas (ver texto). Las flechas indican las bandas de 4.5 y 6.5 kb. El arrastre al frente del gel corresponde a RNA.

SECUENCIACION DE DNA

OBTENCION DE RNA

Se logró la purificación de RNA de 5 hibridomas:

Hibridoma	D.O. (1:1000)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
13.11.6 (6)	0.179	7160
30.2 (1)	0.429	17160
1.7.3 (4)	0.269	10760
12.3.4 (3)	0.277	11080
26.1 (2)	0.350	14000

El número después de cada hibridoma corresponde a el usado en las Figuras. 1 O.D. = 50 μg DNA/ml.

FABRICACION DE cDNA Y AMPLIFICACION POR PCR

Una vez purificado el RNA total de los hibridomas, se fabricó cDNA usando la enzima transcriptasa inversa y oligo-dT para cebar el sitio de poliadenilación del RNAm.

Para amplificar el cDNA se utilizaron los 7 diferentes cebadores (A-G) en cada una de las muestras (ver IX en Métodos), teniendo así un total de 35 reacciones de PCR. La Fig. 18 muestra el corrimiento en gel LMA del total de la reacción de PCR para todas las muestras; se observa que solo en seis reacciones no se obtuvo producto (1A y F; 6E y F; 3A; 2F). De acuerdo a la fluorescencia producida por el bromuro de etidio con el DNA, se

determinó por aproximación cuáles fueron las reacciones en las que obtuvo más producto (1B, 2B, 3G, 4B, 6D) y las bandas fueron purificadas y ligadas a PT7Blue, el cual fué utilizado posteriormente para transformar células competentes Nova Blue^R.

SELECCION DE COLONIAS RECOMBINANTES

El cDNA amplificado es insertado en el vector PT7Blue en el sitio de restricción EcoRV, el cual interrumpe al gen lacZ del vector (Fig. 9); este gen confiere la capacidad de degradar la galactosa a las células que llevan el plásmido, característica que es detectada usando el indicador X-Gal en las placas de cultivo, dando las colonias positivas un color azul. Si un segmento de DNA es insertado de manera efectiva, el gen es interrumpido y las colonias que llevan el plásmido con inserto no son capaces de dar una coloración azul con el indicador.

Se seleccionaron cuatro colonias positivas (blancas) para cada reacción de ligación. El DNA de plásmido PT7Blue se purificó usando un "kit" comercial que contiene resinas de afinidad para DNA de plásmido, y el cual permite la recuperación de casi todo el DNA de plásmido con una alta pureza. Dado que es posible que ocurran colonias blancas porque el gen lacZ esté dañado, sin que haya un inserto en el vector es necesario analizar el tamaño de los plásmidos aislados de cada colonia. La Fig. 19A muestra el DNA de plásmido purificado y digerido con la enzima Sal I. Hay un solo

sitio de restricción para SalI en el plásmido PT7Blue, por lo que después de su digestión con SalI se espera ver dos fragmentos: uno más pesado que el plásmido original el cual contiene el inserto del gen V_K (PT7Blue + 400 pb inserto); y otro más pequeño correspondiente al vector solo. Con la excepción de la colonia 4 de 12.3.4 (3) todos los plásmidos presentaron inserto.

Cualquiera de los insertos que se encuentren en PT7Blue son susceptibles de secuenciarse, usando cebadores que van en ambos sentidos del vector. Sin embargo, algunos plásmidos van a tener la secuencia del inserto en la misma posición 5' → 3' del promotor de PT7 (Fig. 9) y otros estarán en la orientación inversa. Para elegir los plásmidos con el inserto en la posición adecuada para hacer una secuenciación en los diferentes hibridomas a partir del extremo 5' del gen V_K , se efectuó una reacción de PCR utilizando los cebadores para el promotor de PT7 (T7 promoter primer No. 69348-1; Fig. 9) y el cebador para extremo 3' de los genes IgV_K . Si el gen insertado se encuentra en la misma posición 5' → 3' que el promotor de PT7, entonces se espera encontrar un fragmento de DNA amplificado correspondiente a la longitud del gen (~ 400 pb); si el gen está en la posición invertida, no se encontrará producto del PCR.

La Fig. 19B muestra el corrimiento en gel de agarosa del producto de la reacción de PCR que se hizo a todos los insertos

positivos para determinar la orientación, y el cual indicó que todos los insertos se encontraban en la orientación 5'-3' a partir del promotor de PT7Blue. Dado que la probabilidad de que esto ocurriera es muy pequeña se infirió que los tubos se contaminaron entre sí al momento de preparar las reacciones de PCR. Es muy probable que durante el pipeteo no se haya limpiado la punta de la pipeta con ácido clorhídrico, contaminándose las muestras con aerosoles de DNA.

Las reacciones de secuenciación se prepararon utilizando primero el cebador promotor de PT7Blue (PT7 promoter primer No. 69348-1; Fig 9). El revelado del gel se muestra en la Fig. 20. Se identificó la secuencia del sitio de clonación múltiple del vector comparando la secuencia leída con la descrita en la Fig. 9, y se verificó la secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del cDNA. Se pudo leer la secuencia de bases para 3 hibridomas: 12.3.4 (3; 5'→3'), 1.7.3 (4; 5'→3') y 13.11.6 (6; 3'→5'). 26.1 (2) no mostró ningún inserto; en 30.2 (1) se lee la secuencia en ambos sentidos, por lo que se supone que hubo contaminación, quizá al momento de seleccionar las colonias recombinantes. En un segundo juego de reacciones se utilizó el cebador U19 (Fig. 9) y se seleccionaron dos diferentes templates de DNA de plásmido para 26.1 y 30.2. La fig. 21 muestra el revelado del gel. Se leyó la secuencia de bases para 12.3.4 (3;

3'→ 5'), 1.7.3 (4; 3'→ 5'), 13.11.6 (6; 5'→ 3') y 26.1 (2; 3'→ 5'); 30.2 volvió a presentar contaminación.

La secuencia de bases obtenidas para los diferentes hibridomas se muestran al final de esta sección. Las secuencias leídas fueron comparadas con secuencias V_k conocidas usando la base de datos automatizada GenBank (datos no mostrados). De su comparación se desprende que si se trata de secuencias V_k y que las secuencias leídas son diferentes para cada hibridoma, excepto en el caso de la región 3' de 26.1 y 1.7.3. La comparación de la secuencia obtenida para 1.7.3 mostró un 92.7 % de homología con una secuencia rearmada no productiva de la línea mielómica P3X, descrita por Strohal *et al.* (1987). Dado que la región 3' leída para 26.1 es idéntica a la correspondiente en 1.7.3, se supone que ambas pertenecen a la misma secuencia, aportada por el genoma del compañero de fusión P3X. La secuencia de 12.3.4 mostró un 92.5 % de homología con una secuencia V_k de anticuerpos monoclonales anti-timocitos del isotipo IgM, reportada por Lehuen *et al.* (1992). La secuencia leída para 13.11.6 es prácticamente similar a una secuencia V_k reportada por Strohal *et al.* (1989). De esta manera, se obtuvo la secuencia codificadora para V_k de un hibridoma responsivo a ESE y uno no responsivo, siendo ambas secuencias diferentes.

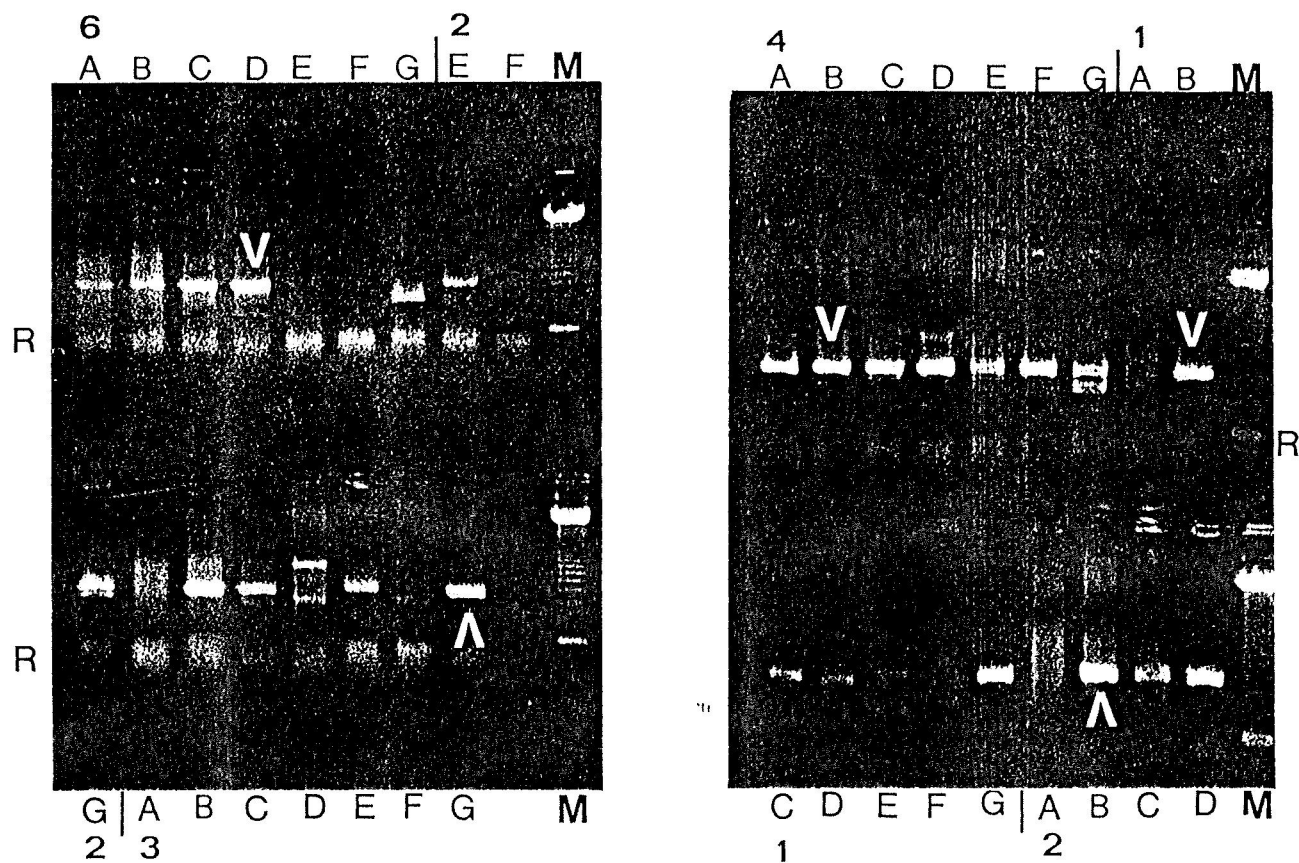


Fig. 18. Se muestra el corrimiento en gel de agarosa para el producto del PCR de cDNA fabricado de los 5 hibridomas usando los diferentes cebadores (A-G). Para efectuar la ligación al vector PT7Blue se purificaron las bandas 1B (30.2), 2B (26.1), 3A (12.3.4), 4B (1.7.3) y 6D (13.11.6), indicadas por flechas. R = RNA contaminante

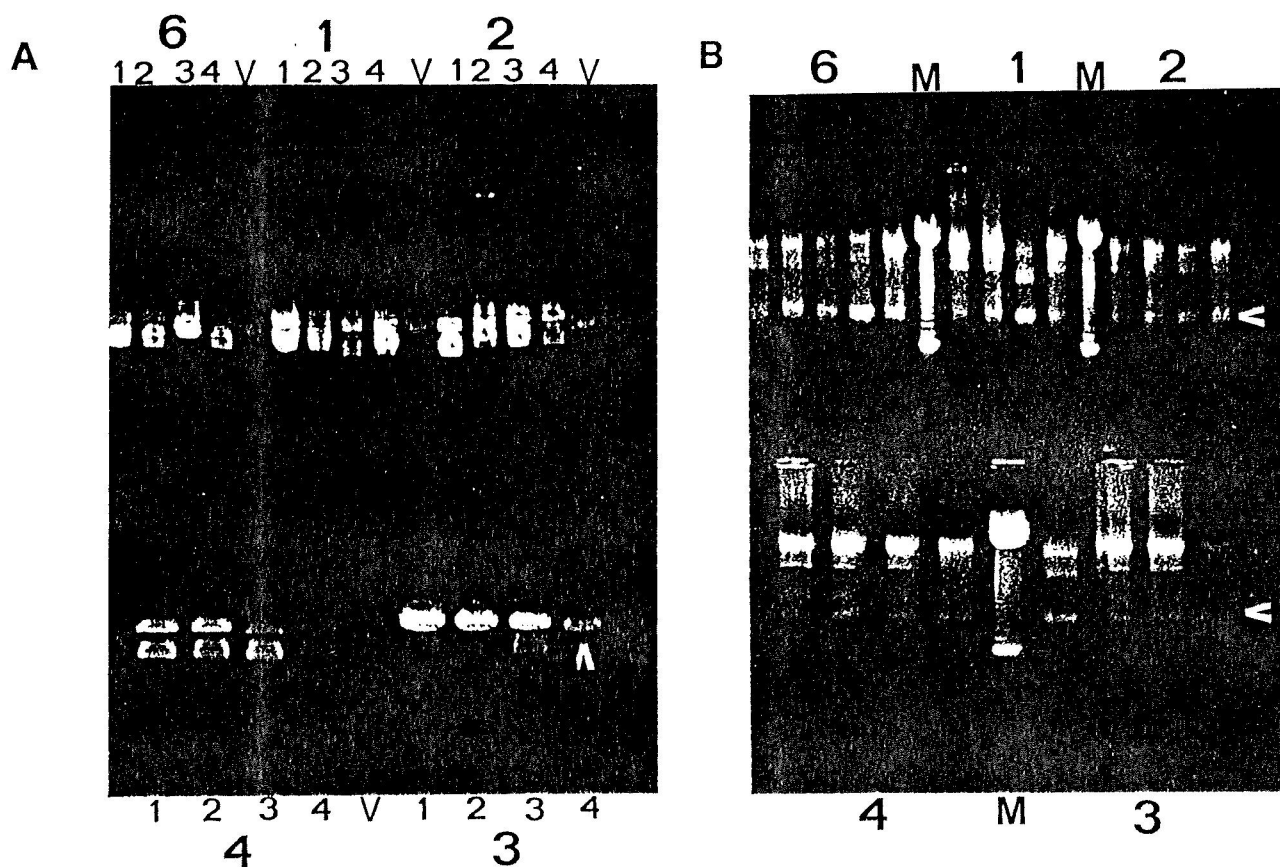


Fig. 19. A) Corrimiento en gel de agarosa de 10 μ l del vector PT7Blue digerido con Sali obtenido de 5 ml de cultivo de células competentes Nova Blue. B) Corrimiento en gel de agarosa del producto de PCR del vector PT7Blue para determinar la orientación del inserto. Los números indican las colonias positivas para PT7Blue con inserto. V = vector comercial. En (A) la flecha indica colonia sin inserto. En (B) las flechas indican el producto del PCR de $\sim$ 400 pb.

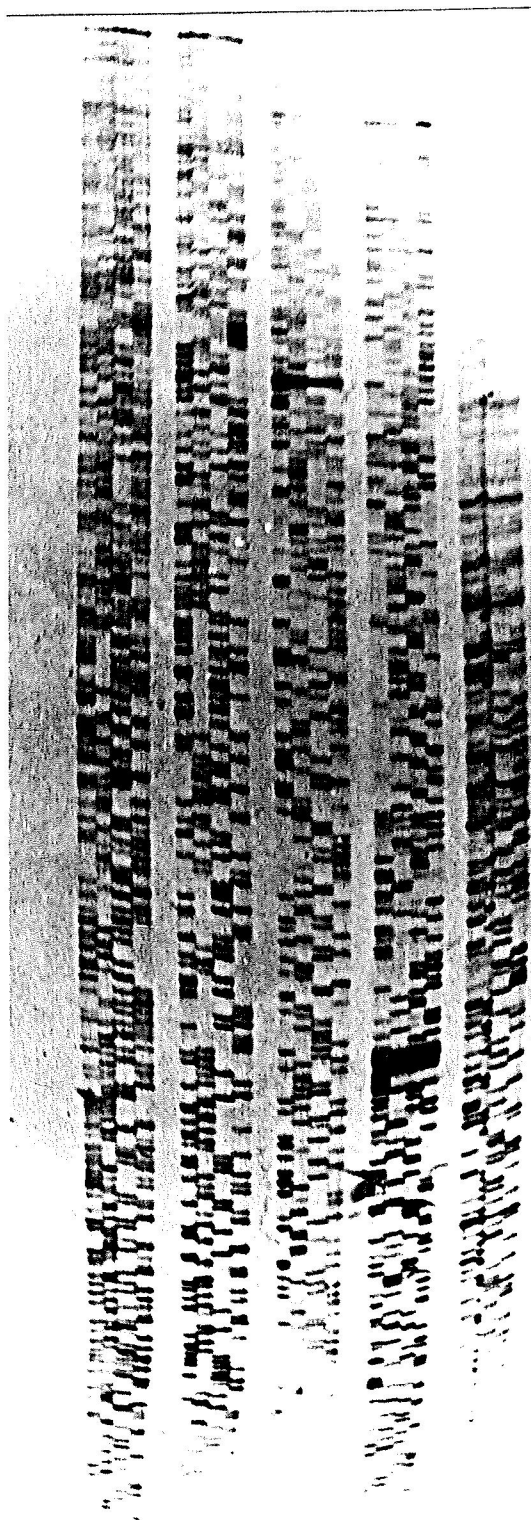


Fig. 20. Revelado de un gel de secuenciación para los hibridomas 30.2, 1.7.3, 13.11.6, 26.1 y 12.3.4 (en este orden). Se utilizó el cebador promotor de PT7. La secuencia se lee C, T, A, G de izquierda a derecha.

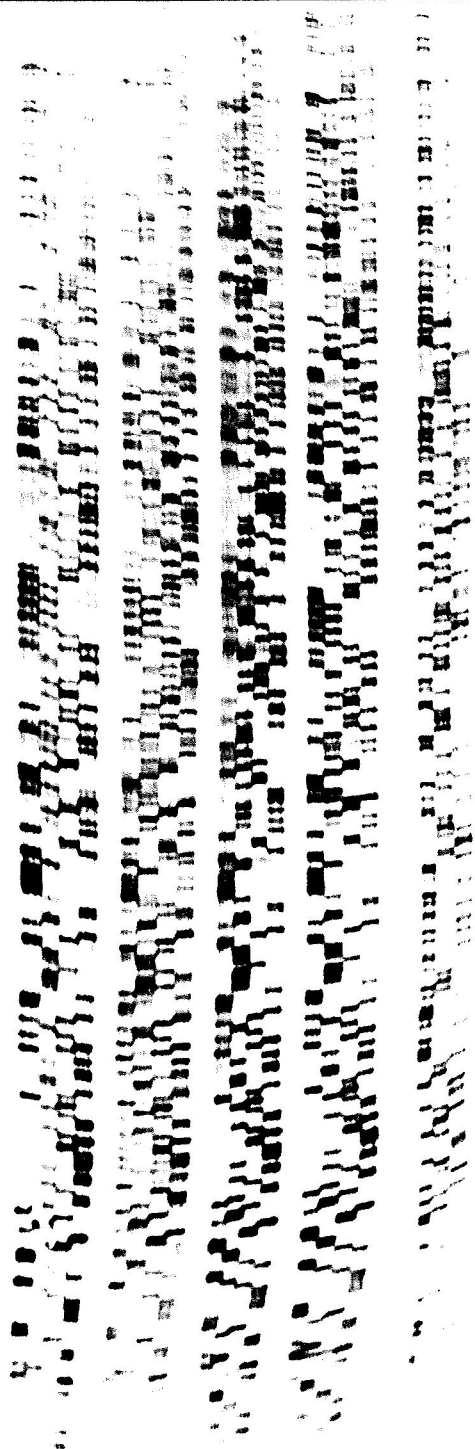


Fig. 21. Revelado de un gel de secuenciación para los hibridomas 30.2, 26.1, 12.3.4, 1.7.3 y 13.11.6 (en este orden). Se utilizó el cebador U19 (ver métodos). La secuencia se lee C, T, A, G de izquierda a derecha.

13.11.6

[cebador 5']

10 20 30 40 50 60
 TCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGTCTGGTGTTC AAGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTC
 70 80 100 110 120 130 * 140
 ACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGCCCAGTCAGGATGTG
 150 160 170 180 190 200
 GGTACTGCTGTAGCCTGGTATAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAATCTAC (GC) TACTGATTTA
 210
 CTGGGTATCATCT----

* 200 270 260 250 240 230
 TGTGGGTACGTCTGTAGCCTGGTATCAACAGAACCAGGGCAATCTCCTAACTACTGATTTACT
 220 210 200 190 180 170
 GGGCATCCACCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTAC
 160 150 140 130 120 110 100
 TCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGC
 90 80 70 60 50 40
 TATCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTG
 30 20 10
 TATCCATCTTCCCACCATCCAGTAAGCTTGGG [cebador 3'].

Fig 22. Secuencia obtenida para cDNA de 13.11.6. Los nucleótidos entre paréntesis indican compresión de las bandas. El asterisco indica la región donde las dos secuencias leídas se complementan; las líneas --- indican el final de la secuencia leída. La numeración se inicia a partir del final de ambos cebadores

1.7.3

[cebador 5']

```

      10      20      30      40      50      60
GGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTC

      70      80      90      100      110      120      130
CTTAG TGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATC

      140      150      160      170 *      180      190
TGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCT

      200      210      220      230      240      250      260
TGTATCCAACCTAGAACTCTGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGG (G) TATGGACAGACTTCAC

      270      280      290      300      310      320
CCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTTATTACTGTCAGCACATTAGGAG--

      *
      220      210      200      190      180      170      160
AGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCAGGTT

      150      140      130      120      110      100
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGC

      90      80      70      60      50      40
AACCTATTACTGTGTCAG (GATC) ACATTAGGGAG (GATC) TTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCT

      30      20      10
GGAAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTAT [cebador 3'].

```

Fig 23. Secuencia obtenida para cDNA de 1.7.3. Los nucleótidos entre paréntesis indican compresión de las bandas. El asterisco indica la región donde las dos secuencias leídas se complementan; las líneas --- indican el final de la secuencia leída. La numeración se inicia a partir del final de ambos cebadores

12.3.4

[cebador 5']

10 20 30 40 50
 CCTGCTAATCAGT (GATC) CTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGT (GATC) TCTCACCCAG
 60 70 80 90 100 110 120
 TCTCCAGCAATCAGTTTCGTCCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACC-GTCAGCGTCTCAGCT

CAGGT----

210 200 190 180 170 160 150
 TTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGAGTCCCTGCTCGGCTTCAGTGGGCATGGATCTGGGACCT
 140 130 120 100 90 80
 CTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC (GATC) ACTTATTACTGCCAGCA
 70 60 50 40 30 20
 AAGGAGTAGTTACCCACACACGTTCTGAAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGC

10

ACCAACTGTA [cebador 3']

Fig 24. Secuencia obtenida para cDNA de 12.3.4. Los nucleótidos entre paréntesis indican compresión de las bandas.; las líneas --- indican el final de la secuencia leída. La numeración se inicia a partir del final de ambos cebadores

26.1

```

      210      200      190      180      170      160
CCAGACTCCTCATTCTATCT(GT)ATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCC(GT)CCAGGTTCAAGTG

      150      140      130      120      110      100
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGACAAC

      90      80      70      60      50      40      30
CTATTACTGTCAGGCACATTAGGGACGGCTTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA

      20      10
ACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA [cebador 3']

```

Fig 25. Secuencia obtenida para cDNA de 26.1. Los nucleótidos entre paréntesis indican compresión de las bandas. En este caso solo se pudo obtener la secuencia a partir del cebador U19 correspondiente al final 3'.

DISCUSION

En los experimentos originales realizados por Van Ness *et al.* (1981) se utilizó el plásmido pECk como sonda contra DNA de ratón NZB digerido con Bam H1; y contra un digerido de DNA embriónico con Hind III (Coleclough *et al.*, 1982). En el primer caso, la digestión con Bam H1 produjo un fragmento de ~ 12.5 kb derivado de la línea germinal que hibridiza con pECk, así como otro fragmento de tamaño muy variable resultado de la unión V-J-C en la que el sitio BamH1 5' de el gen Jk desaparece (ver Fig. 6). En el segundo experimento, la digestión con HindIII produce un fragmento de 4.9 kb que hibridiza con la región 5' de pECk que incluye la región Ck, así como un segundo fragmento de 2.9 kb que hibridiza con la porción 3' que contiene Jk (ver Fig. 6).

En el caso de nuestro análisis, se utilizó una línea de ratón diferente (C57Bl/6) para fabricar los hibridomas. Se esperaba encontrar el mismo juego de fragmentos en las regiones del DNA no modificadas durante el rearreglo de genes V_k (J-C; Fig.7), por ejemplo los producidos por HindIII de 4.9 y 2.9 kb. Sin embargo, los resultados fueron inconsistentes, obteniéndose patrones de bandas diferentes en algunos casos. Para llegar a un resultado satisfactorio se tuvo que dominar primero el método de Southern Blotting, modificando las condiciones de hibridación, lavado, etc.. En el transcurso de la investigación se hicieron

varias modificaciones al método (ver Resultados), con las que al final se pudo obtener un patrón de bandas diferente para cada hibridoma en el último experimento. El siguiente paso consistiría en repetir las condiciones del último experimento, utilizando un nuevo juego de enzimas y DNA de hibridomas.

Los resultados obtenidos con el análisis por Southern Blotting no permitieron obtener respuesta satisfactoria a la pregunta experimental, por lo que se decidió usar la técnica de amplificación y secuenciación de cDNA específico para las secuencias IgV_k .

Las secuencias leídas para los cinco diferentes hibridomas permiten un avance en la resolución de la pregunta sobre el uso de genes V_k en la respuesta anti-ESE.

Las secuencias de bases obtenidas resultaron ser en dos casos (1.7.3 y 26.1) las pertenecientes a las secuencias IgV_k producida por el compañero de fusión P3X; solo dos de las secuencias obtenidas corresponden a las producidas por los hibridomas 13.11.6 (no responsivo) y 12.3.4 (responsivo a ESE), las cuales son diferentes entre sí. El producto del PCR seleccionado para clonación de cDNA de 1.7.3 y 26.1 correspondió en ambos casos en el que se empleó el cebador B del kit Ig-Prime para la amplificación del cDNA; es probable que este cebador permita la amplificación de las secuencias IgV_k específicas para

P3X. Con estos datos no es posible resolver la pregunta acerca del uso restringido o variable de genes IgVk en los hibridomas responsivos a ESE, haciéndose necesario llevar a cabo más reacciones de secuenciación para el cDNA de 30.2, 1.7.3 y 26.1, usando en principio diferente DNAs de plásmido PT7Blue obtenido de otras colonias positivas a las empleadas, o llevando a cabo otra reacción de PCR usando un cebador diferente a B.

Diversos trabajos han demostrado el uso restringido de genes V_k y V_H en los anticuerpos contra un antígeno específico; por ejemplo la respuesta inmune de la línea Λ/J contra el hapteno p-azofenil arsenato utiliza un solo gen V_k , J_k , V_H , D_H y J_H (Newkirk *et al.*, 1989). La respuesta inmune en factores reumatoides ha sido ampliamente estudiada encontrándose uso restringido de genes para fabricar ambas cadenas de las inmonuglobulinas (Newrik, 1992; Ezaki *et al.*, 1991) o un uso restringido de genes V_k (Stanley *et al.*, 1992; Radoux *et al.*, 1986; Fong *et al.*, 1985). Otro cuerpo de datos han demostrado que en ciertos casos la respuesta inmune es restringida en el uso de genes V_H , pero no en los genes V_L . Pascual *et al.* (1992) encontraron que la capacidad responsiva al antígeno i/I en eritrocitos humanos está restringida al uso del segmento V_{H4-21} , pero muestra variabilidad en el uso de genes V_L .

La respuesta al antígeno ESE parece estar controlada por el

uso de un gen V_H (Muralidhar *et al.*, 1992); la comprobación de que el uso de genes V_k no es determinante en la respuesta a ESE está aún sin efectuarse. Sin embargo, el presente trabajo aporta elementos que permiten el uso de una metodología con la cual se pueden obtener resultados satisfactorios para la resolución final del problema experimental.

CONCLUSIONES

El análisis por Southern Blotting permitió obtener resultados prometedores aunque no suficientes para la resolución de la pregunta experimental; es necesario mejorar el manejo de algunas variables en los experimentos, como tiempo de corrido del gel, temperatura de hibridización y pureza de la sonda.

Se obtuvo la secuencia de bases de los genes codificadores para las cadenas ligeras (V_k) de un hibridoma responsivo al antígeno ESE (12.3.4) y de uno no responsivo (13.11.6), siendo las secuencias diferentes entre sí. Es necesario llevar a cabo más análisis de secuencia en otros hibridomas responsivos al antígeno ESE.

APENDICE

SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

MEDIO RPMI COMPLETO

Medio RPMI (Irvine Scientific ^R)	500 ml (1 botella)
Suero bovino fetal (Hyclone ^R)	50 ml
Penicilina-estreptomicina	10 ml
Piruvato de sodio (GIBCO-BRL ^R)	5 ml
Aminoácidos no esenciales (GIBCO-BRL ^R)	5 ml
PBS (Solución salina de fosfatos) 10x por 1 l	

NaCl	80 g
KCl	2 g
NaH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g

Magic Mix

Tris	50 mM, pH 8.0
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
Tritón X-100	0.5 %
Deoxycolato	0.5 %

AMORTIGUADOR PK (proteínasa K) 2x por 100 ml

Tris-HCl (2 M, pH 7.5)	1 ml
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	1.25 ml
NaCl (5 M)	6 ml

SDS (10%)	20 ml
-----------	-------

TE (Tris-EDTA)

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH	7.3 - 7.4

ENZIMAS DE RESTRICCION (10 U/ μ l; GIBCO-BRL)

Buffer 10x

Eco RI	3
Bam HI	3
Hind III	2
Pst I	2
KpNI	4

TAE 50x (Tris-acetato-EDTA), por 4 l

Tris-base	968 g
Ac. acético glacial	228.4 ml
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	400.0 ml

BUFFER DE CARGA

Sucrosa	4.0 g
Azul bromofenol	20 mg
Xilen Cianol	20 mg

SOLUCION DESNATURALIZADORA

NaOH	0.5 M
NaCl	1.5 M

SOLUCION NEUTRALIZADORA

Tris-HCl	1.0 M
----------	-------

NaCl	1.5 M
------	-------

SSC (20x), por 4 l

NaCl	701.2 g	(3 M)
------	---------	-------

Citrato de Sodio ó

ácido cítrico	352.8 g	(300 mM)
---------------	---------	----------

Disolver en 3.2 l de agua y ajustar el pH a 7.0 con HCl.

Ajustar el volumen a 4 l. Esterilizar.

SOLUCION DE HIBRIDIZACION

Formamida	50 % (v/v)
-----------	------------

Amortiguador de

fosfatos pH 7.0	200 mM
-----------------	--------

SDS	5 % (v/v)
-----	-----------

BSA	1 mg/ml
-----	---------

EDTA	1 mM
------	------

TERRIFIC BROTH (1 l)

Bacto Triptona	13.3 g
----------------	--------

Bacto Yeast	26.7 g
-------------	--------

Glicerol	4.44 ml
----------	---------

SOLUCIÓN I

Glucosa	50 mM
---------	-------

EDTA	10 mM
------	-------

Tris-HCL (pH 8.0) 25 mM

SOLUCION II

NaOH 0.2 N

SDS 1 %

SOLUCION III

Acetato de potasio 3 M

Ac. acético glacial 5 M

AMORTIGUADOR DE GTC (ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA) POR 100 ML.

GTC 50 g

Na-N-lauril sarcosina 0.5 g

β -mercaptoetanol 0.1 ml

EDTA 0.5 M (pH 7.5) 5 ml

Esterilizar por filtración y guardar a temperatura de cuarto protegido completamente de la luz.

TBE (TRIS-BORATO) 10X POR 4 L.

Tris-base 432 g

Acido bórico 219.2 g

EDTA (0.5 M, pH 8.0) 160 ml

Disolver en agua y ajustar el volumen a 4 l.

Esterilizar.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A., Litchman, A., Pober, J. 1991. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company. 38-97 pp.
- Adamas, E., Basten, A., Goodnow, C.C. 1990. Intrinsec B cell hyporesponsiveness accounts for self tolerance in lysozyme / anti-lysozyme double transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:5687.
- Adderson. E. E., Shackelford, P., Quinn, A., Carroll, W. 1991. Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. J. Immunol. 147:1667-1674
- Altz, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., Chen, J. 1992. VJD Recombination. Immunology Today. 13:306-314
- Coleclough, C., Perry, R.P., Karjalain, K., Weigert. 1982a. Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expresion. Nature 5805:372-378. 78.
- Coleclough, C., Perry, R.P., Karjalain, K., Weigert. 1982b. DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin k light chain is frecuently retained in cells that rearrange the k locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:262-266.
- Davidson, A., Manheimer-Lory, A., Aranow, C., Shefner, R. 1989.

- Possible mechanisms of autoantibody production. *Biomed. & Pharmacother.* 43:563-570.
- Dreyer, W. J., Bennet, J. C. 1965. The molecular basis of antibody formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54:864-869.
- Fernández, C. 1992. Genetics mechanisms for dominant V_H gene expression. *J. Immunol.* 149:2328-2336
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Jorgensen, H., Brink, R.A., Basten, A. 1989. Induction of self tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* 342:385.
- Hamlyn, P. H., Brownlee, G. G., Cheng, C. C., Gait, M. J. 1978. Complete sequence of constant and 3' noncoding regions of an immunoglobulin mRNA using the dideoxynucleotide method of DNA sequencing. *Cell*, 15:1067-1075
- Hasseman, C.A., Capra, D. 1989. Immunoglobulins: Structure and function. *Fundamental Immunology*, 2a edición. William Paul, editor. Raven Press Ltd., New York.
- Hilischman, N., Craig, L.C. 1965. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 53:1403-1409
- Hood, ,L., Weissman, I., Wood, W., Wilson, J. 1984. *Immunology.* The Benjamin/Cumming Publishing Co. 23-34 pp.
- Kataoka, T., Kondo, S., Miyuki, N., Kodaira, M., Honjo, T. 1984. Isolation and characterization of endonuclease J: a sequence

specific endonuclease cleaving immunoglobulin genes. Nuc. Ac. Res. 12:5995-6009

Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression permits the construction of antibody-secreting hibrid cell lines. Journal of Immunology. 123: 1548-1550.

Lenhard-Schuller, R., Honh, B., Brack, C., Hiramama, M., Tonegawa, S. 1978. DNA clones containing mouse immunoglobulin kappa chain genes isolated by *in vitro* packaging into phage lambda coats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4709-4713

Max, E. E. 1989. Immunoglobulins: Molecular Genetics. Fundamental Immunology, 2a. edición. William Paul, Editor. Raven Press Ltd., New York.

Max, E. E., Seidman, J. G., Leder, P. 1979. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:3450-3454

McCarthy, M.M., Dutton, R.W. 1975a. The humoral response of mouse spleen cells to two types of sheep erythrocytes. I. Genetic control of the response to H and L SRBC. J. Immunol. 115:1316.

McCarthy, M. M., Dutton, R. W. 1975b. The humoral response of mouse spleen cells to two types of sheep erythrocytes. II.

Evidence for gene expression in the B lymphocyte. *J. Immunol.*
115:1322-1326

McCarthy, M.M., Dutton, R. W. 1975c. The humoral response of
mouse spleen cells to two types of sheep erythrocytes. III.
A new V_H region marker. *J. Immunol.* 115:1327.

McCarthy, M.M., Bowman, C., Butler, C., Dutton, R.W. 1976. The
humoral response of mouse spleen cells to two types of SRBC.
IV. The in vivo response to H and L SRBC and the genetic
control of the production of IgM and IgG antibodies in
discriminator mice. *J. Immunol.* 116:1725

Mishell, R.I., Dutton, R.W. 1967. Immunization of dissociated
spleen cells cultures from normal mice. *J. Exp. Med.*
126:423-442.

Muralidhar, G., Sepúlveda, H., Feeney, A., Riblet, R., Dutton,
R.W. 1992. Restricted IgH V gene usage in the response to
the ESE epitope on Hi Sheep Red Blood Cells. *J. Immunol.*
149:3574-3579.

Pascual, V., Victor, K., Spellerberg, M., Hamblin, T. J.,
Stevenson, F. K., Capra, D. 1992. V_H restriction among human
cold agglutinins. The V_H 4-21 segment is required to encode
anti-I and anti-i specificities. *J. Immunol.* 149:2337-2344

Rose, S. M., Garrad, W. 1984. Differentiation-dependent
chromatin alteration precede and accompany transcription of

immunoglobulin light chain genes. J. Biol. Chem. 259:8534-8544.

Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S. 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. Nature. 280:288-294

Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., Tonegawa, S. 1980. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. Nature. 286:676-683.

Seidman, J.G., Edgell, M.H., Leder, P. 1978a. Immunoglobulin light chain structural gene sequences cloned in a bacterial plasmid. Nature, 271:582-85.

Seidman, J.G., Leder, A., Nav, M., Norman, B., Leder, P. 1978b. The structure of cloned immunoglobulin genes suggest a mechanism for generating new sequences. Science. 202:11-17

Seidman, J. G., Max. E. E., Leder, P. 1979. A Kappa immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. Nature. 280:370

Selsing, E., Storb, U. 1981. Mapping of immunoglobulin variable region genes: relationship to the 'deletion' model of immunoglobulin gene rearrangement. Nuc. Ac. Res. 9:5725-5735

Shina, A.A., López, M.T., McDevitt, H.O. 1990. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. Science.

248:1380-1387.

Strohal, R., Helmborg, A., Kroemer, G., Koler, R. 1989. Mouse V_k gene classification by nucleic acid sequence similarity.

Immunogenetics 30: 475-493.

Wilson, R., Miller, J., Storb, U. 1979. Rearrangement of immunoglobulin genes. Biochemistry, 18:5913-5921.

Zouali, M., McLennan, C.M. 1992. Molecular events in the development of the lymphocyte repertoire. Immunology Today.

13:41-43.