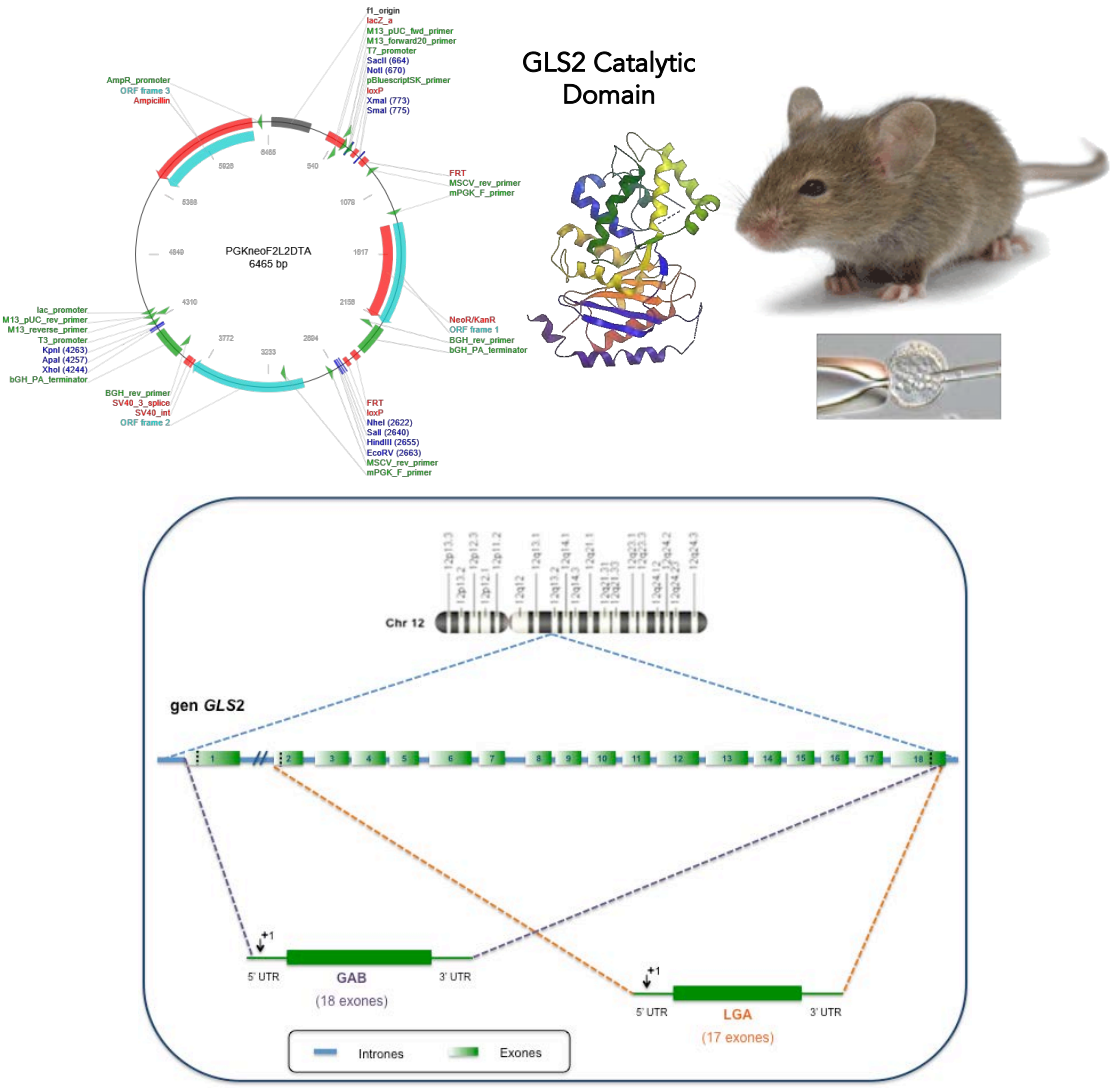
UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

Regulación Transcripcional del Gen *GLS2* y Obtención de Células Madre Embrionarias Transformadas para Generación de Ratones *Knockout*



Marta Tosina García

Málaga, 2015

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

"REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *GLS2* DE GLUTAMINASA Y OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS TRANSFORMADAS PARA GENERACIÓN DE RATONES *KNOCKOUT*"

Memoria presentada por Marta Tosina García al título de Doctora en Ingeniería Química por la Universidad de Málaga.

Málaga, Noviembre 2015

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

AUTOR: Marta Tosina García

http://orcid.org/0000-0001-5057-2291

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode
Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.
No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

ANA MARÍA RODRÍGUEZ QUESADA, Directora del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

ACREDITA QUE: la Tesis Doctoral titulada: "REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *GLS2* DE GLUTAMINASA Y OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS TRANSFORMADAS PARA GENERACIÓN DE RATONES *KNOCKOUT*", que presenta Dña. MARTA TOSINA GARCÍA para optar al título de Doctora en Ingeniería Química, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Javier Márquez Gómez, Catedrático de Universidad, y D. Francisco J. Alonso Carrión, Catedrático de Universidad, ambos del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Málaga a 12 de Noviembre de 2015.

Fdo. Ana María Rodríguez Quesada

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

JAVIER MÁRQUEZ GÓMEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y

FRANCISCO JOSÉ ALONSO CARRIÓN, Catedrático de Universidad del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN que Dña. MARTA TOSINA GARCÍA, Ingeniera química por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos recogidos en la presente Memoria para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente en Málaga a 12 de Noviembre de 2015.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Fdo. Javier Márquez Gómez
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular

Fdo. Francisco J. Alonso Carrión
Catedrático Bioquímica y Biol. Molecular

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto de excelencia CVI-01543 de la Consejería Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, por el proyecto RD06/1012 de la red de trastornos adictivos (RTA, programa RETICS, Instituto de Salud Carlos III) y por el proyecto SAF2007-61953 del Ministerio de Educación y Ciencia. La Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) concedió una beca predoctoral del Plan de Formación de Investigadores, de cuatro años de duración (2007-2010), a la investigadora Dña. Marta Tosina García. Parte de los resultados y metodologías recogidas en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- Donadio, A.C., Lobo, C., TOSINA, M., de la Rosa, V., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J.A., Matés, J.M., Márquez, J., Alonso, F.J., Segura, J.A. **Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells.** *J. Cell. Biochem.* 103, 800-811 (2008).

- Márquez, J., TOSINA, M., de la Rosa, V., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., Campos-Sandoval, J.A. **New insights into brain glutaminases: Beyond their role on glutamatergic transmission**. *Neurochem. Int.* 55, 64-70 (2009).

- Martín-Rufián, M*., TOSINA, M*., Campos-Sandoval, J.A., Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J.A., Alonso, F.J., Matés, J.M., Márquez, J. **Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism.** *PLoS ONE* 7(6):e38380 (2012).
  **ambos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.*

- Márquez, J., Cardona, C., Campos-Sandoval, J.A., Peñalver, A., TOSINA, M., Matés, J.M., Martín-Rufián, M. **Mammalian glutaminase isozymes in brain.** *Metab. Brain Dis.* 28: 133-137 (2013).

- M. TOSINA, C. Cardona, J.A. Campos-Sandoval, J.A. Segura, J.M. Matés, F.J. Alonso, A. Gutiérrez and J. Márquez. **Human PDZ protein GIP: Interaction with glutaminase and expression in mammalian brain.** *VIII European Symposium of the Protein Society.* Zurich (Suiza) 2009.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- M Martín-Rufián, M TOSINA, JA Campos-Sandoval, C Lobo, C Cardona, J Márquez. **Alternative transcripts of glutaminase gls2 gene in mammalian tissues.** *XV ISHEN SYMPOSIUM (International Society for Hepatic Encephalopathy).* Grenaa (Dinamarca) 2012.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Hace unos años imaginaba cómo sería este momento y, desde luego, tengo que decir que nunca pensé que lo viviría como lo estoy viviendo. Llevo cuatro años dedicada a algo completamente diferente y ha sido comenzar y volver. En mayúsculas. Puedo asegurar rotundamente que una parte de mí estaba todavía aquí, en esta memoria, en este trabajo, en estas personas y en este lugar; y, curiosamente, no me daba cuenta.

Tengo mucho que agradecer, mucho más de lo que aquí pueda expresar, empezando por todas las personas que han coincidido en el laboratorio durante los años que pasé allí y terminando por las que han coincidido y todavía coinciden en mi vida.

A mis "jefes", Javier y Francis, por confiar en mí y esforzarse en conseguir que este trabajo saliera adelante y por dirigirme en los momentos en los que estaba perdida. También por este último empujón que me han dado, por su disponibilidad, acercamiento, amabilidad y ayuda.

A Juani, que fue casi el primero en darme su confianza y en quien siento que en ni un solo momento la ha perdido, lo que significa muchísimo para mí. Nunca lo he dicho, pero siempre lo he pensado.

A mis niñas. Mi Laury y mis Caros, que las quiero con locura. Pasa el tiempo y pasan distintas personas y proyectos por allí... Pero al vernos, todo sigue igual. Gracias por ser mis amigas, entonces y ahora. Y a Cristina. Tú sabes Cristina, cuántas charlas hemos tenido...

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Al resto de personas que integran o han integrado nuestro grupo. A Jose Manuel, que siempre tiene unas palabras amables y una sonrisa; a Merche, por su parte de trabajo en este proyecto; a Vane, una de las primeras en darme la bienvenida, por apoyarme en aquellos momentos, y por las risas. Y a tantos que me he ido encontrando en el departamento en distintos momentos y, de alguna manera, me han hecho sonreír.

Me gustaría hacer mención especial al Dr Alfonso Gutierrez Adán y al Dr Miguel Ángel Ramírez de Paz, investigador principal y miembro respectivamente del Departamento de Reproducción animal del instituto INIA (Madrid) por su importante colaboración en este proyecto, por el trabajo llevado a cabo con manipulación de animales y por acogerme en su laboratorio y enseñarme técnicas de cultivos de células ES, además de mostrarme las diferentes tareas que diariamente llevan a cabo. También a la Dra. Aurora Burds Connor, directora científica del departamento *Mouse ES Cell & Transgenics Core* del MIT (Boston, MA), quien nos orientó en un principio en cómo abordar el complejo proyecto de llevar a cabo un KO en ratón, desde los primeros a los últimos pasos.

Saliendo del ámbito científico, me gustaría agradecer profundamente, enormemente y de todas las formas posibles el apoyo, el ánimo, el estar siempre ahí y el quererme a mi familia. Mis hermanos: Eva, Merche, Montana y Toñe; sois los mejores, cada uno con sus cualidades y absolutamente fantásticos. Mis sobrinos: Caro, Viki, Martita, Diego, Alvarito y Antonio; qué decir de ellos, que para ellos lo que sea, que se me cambia la cara cuando los veo. Mi padre. A él tengo que agradecérselo TODO. ¡¡¡GRACIAS PAPÁ!!!.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

A Keko, por compartirlo todo conmigo. Bueno, por mil cosas, innumerables. Gracias por hacer que te quiera.

A mi madre, en mi corazón, siempre.

"Mirada de cerca, la vida es una tragedia; pero vista de lejos, la vida es una comedia" - Charles Chaplin

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi madre, *in memoriam*

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción 3

1. Glutaminasa de mamíferos: perspectiva general 3

2. Genes y transcritos glutaminasa de mamíferos 7

2.1. Gen *Gls* y transcritos derivados de este gen 7

2.2. Gen *Gls2* y transcritos derivados de este gen 12

3. Glutaminasa en cerebro y otros tejidos de mamíferos 20

4. Animales genéticamente modificados en Genómica Funcional 36

4.1 Tecnología del DNA recombinante 38

5. *Gene targeting* en ratón 51

Objetivos 60

Materiales y Métodos 63

1. Cultivos, transformación y almacenamiento de cepas de *Escherichia coli* 63
1.1 Plásmidos y cepas de E. coli empleados para su propagación 63
1.2 Obtención de cepas de E. coli competentes 63
1.3 Transformación de cepas de E. coli con plásmidos o mezclas de ligación 64
1.4 Cultivo y almacenamiento de cepas de E. coli transformadas 66
2. Aislamiento y purificación de DNA 66
2.1 Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos a pequeña escala 66
2.2 Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos y bácmidos a mediana y gran escala 66
3. Manipulación enzimática de DNA 67
3.1 Digestión de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción 67

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3.2. Subclonación de fragmentos de DNA en plásmidos 67

4. Cuantificación de DNA 71

5. Electroforesis de DNA de plásmidos, de bácmidos y fragmentos de DNA obtenidos por PCR 72

5.1 Purificación de insertos de DNA separados en geles de agarosa 73

6. Amplificación de fragmentos de DNA mediante Long PCR 73

7. Manipulación y cultivos de células madre embrionarias ES (Embrionyc Stem cells) de ratón 77

7.1 Inactivación de fibroblastos 78

7.2 Procedimiento para el cultivo de células ES de ratón 79

7.3 Criopreservación de células ES 80

7.4 Transferenias de células ES modificadas a blastocistos embrionarios de ratón 80

8. Materiales y métodos empleados para el análisis y caracterización de transcritos del gen Gls2 de GA de mamíferos 81

8.1 Animales de experimentación y su mantenimiento 81

8.2 Obtención de muestras de RNA 81

8.3 Amplificación de secuencias de isoenzimas Gls2 de GA de mamífero tras retrotranscripción del RNA y PCR (Ensayos de RT-PCR) 82

8.4 Experimentos de extensión de cebadores para el establecimiento del sitio de inicio de la transcripción (Primer Extensión Analysis) de la isoenzima LGA humana 85

8.5 Expresión proteica de variantes hLGA mediante ensayos de transcripción y traducción in vitro en lisados de reticulocitos de conejo 87

8.6 Medida de actividad GA en lisados de reticulocitos 88

8.7 Expresión de isoenzimas GLS2 de GA mediante inmunotransferencias Western 89

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8.8 Análisis de expresión de isoenzimas GA mediante PCR a tiempo real cuantitativo (q-RT-PCR) 90

Resultados y discusión 97

1. Diseño de las construcciones génicas para generar ratones KO condicionales del gen Gls2 de GA 98

1.1 Vector esqueleto de la construcción: pGKneoF2L2DTA (pGKneo) 99

1.2 Características del gen *Gls*2 para la recombinación homóloga condicional 101

1.3 Construcciones pGKneoF2L2DTA-*Gls*2 105

1.4 Comprobación de la recombinación homóloga 107

2. Construcción de la *cassette* transgénica 112

2.1 Obtención de los fragmentos del gen *Gls*2 mediante *longPCR* 112

2.2 Clonación de los fragmentos en vectores intermedios 118

2.3 Clonación en pGKneo: construcciones A, B, "Mock" y EUCOMM. Prueba de PCR 124

2.3.1 Construcción A 125

2.3.2 Construcción B 130

2.3.3 Construcción "Mock" 131

2.3.4 Construcción de EUCOMM 133

3. Resultado de la microinyección de células ES con construcción transgénica de Gls2 adquirida de EUCOMM (construcción C) 135

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4. Clonación, secuenciación y caracterización de transcritos del gen *Gls*2 en mamíferos 143

4.1 Aislamiento de transcritos alternativos del gen *Gls*2 144

4.2 El transcrito LGA aparece por un mecanismo de sitio alternativo de inicio de la transcripción y posee un promotor alternativo 152

4.3 Cuantificación de transcritos GAB y LGA mediante PCR cuantitativa a tiempo real (real-time PCR) 159

4.4 Expresión de las isoformas proteicas de GLS2: transcripción y traducción *in vitro* y análisis por inmunotransferencia 161

5. Discusión sobre la caracterización de transcritos del gen Gls2 en mamíferos 168

Conclusiones 181

Apéndice 184

Bibliografía 226

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Glutaminasa de mamíferos: perspectiva general

La glutamina (Gln) es el aminoácido libre más abundante en el cuerpo humano y el principal vehículo nitrogenado entre los diferentes tejidos de mamíferos (Krebs, 1980). Es un aminoácido con múltiples facetas, que juega un papel esencial en diversas rutas metabólicas y desempeña funciones de señalización. Aunque habitualmente se clasifica como un aminoácido no esencial, recientes evidencias sugieren que se le puede calificar como condicionalmente esencial en determinadas situaciones fisiológicas como, por ejemplo, cuando su concentración disminuye en sangre en situaciones de estrés. Así, las concentraciones de Gln en plasma disminuyen notablemente en los cuadros de trauma clínico, tales como la cirugía principal o tras un prolongado y exhaustivo ejercicio (Castell y col., 1996).

La Gln actúa como donador de nitrógeno para la síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina para producir nuevo DNA, en la reparación del RNA mensajero (mRNA), en la síntesis de aminoácidos, carbamilfosfato, aminoazúcares y otros metabolitos. La Gln juega un papel esencial en el metabolismo nitrogenado y representa una forma de transporte y almacenamiento de glutamato (Glu) y amonio. Por todas estas razones, el Glu y el amonio derivados de la Gln desempeñan papeles fisiológicos cruciales en muchos tejidos, con particular relevancia en cerebro, hígado y riñón. En cerebro, el ciclo Gln-Glu entre astrocitos y neuronas es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de Gln y la generación y reciclaje del Glu neurotransmisor (Schousboe, 2003). El ciclo intercelular de Gln entre hepatocitos periportales y perivenosos es fundamental

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

para la regulación del ciclo de la urea en hígado, con importantes implicaciones en la regulación sistémica del pH y en la desintoxicación del amonio (Häussinger y Schliess, 2007). La Gln es también un sustrato esencial para algunas células importantes del sistema inmune como macrófagos y linfocitos (Castell y col., 2004).

La homeostasis de Gln debe, por consiguiente, estar exquisitamente regulada. La glutaminolisis, nombre que indica la conversion de Gln en piruvato, es un proceso fundamentalmente mitocondrial con repercusiones en la estructura y la dinámica de este orgánulo subcelular, lo que sugiere un estrecho y mutuo control entre la forma de la mitocondria y la bioenergética celular (Benard y Rossignol, 2008). La principal ruta degradativa para la Gln, glutaminolisis, ocurre en la mitocondria y es iniciada por la enzima glutaminasa activada por fosfato (GA; EC 3.5.1.2) (Kovacevic y McGivan, 1983; Quesada y col., 1988). McKeehan (1982) fue el primero en postular que la degradación oxidativa de Gln a piruvato era un proceso mitocondrial y lineal. Sin embargo, de acuerdo con Moreadith y Lehninger (1984), existía una compartimentación entre el citosol y la mitocondria en el proceso glutaminolítico. Finalmente, McKeehan (1986) afirmó que la glutaminolisis puede ocurrir completamente dentro de la mitocondria, aunque también puede tener lugar como un proceso compartimentado entre el citosol y la mitocondria.

Muchas enzimas tienen a la Gln como sustrato, entre ellas las llamadas glutamina amidotransferasas (EC 2.4.2) que catalizan la ruptura del grupo amido de la Gln y la transferencia del amonio a otros sustratos específicos en rutas biosintéticas. Sin embargo, la GA se engloba dentro de las glutamina

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

amidohidrolasas (EC 3.5.1.2), ya que el sustrato aceptor del grupo acilo y del amonio es el agua y no otra molécula. La reacción catalizada por la GA es la hidrólisis del grupo amido de la L-glutamina (Gln), dando lugar a cantidades estequiométricas de L-glutamato (Glu) y amonio:

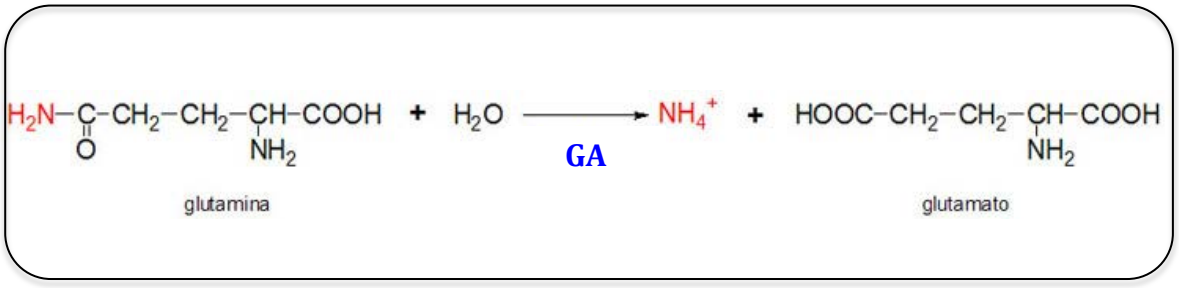


Figura 1. Reacción catalizada por la glutaminasa activada por fosfato

Krebs en sus primeros trabajos sobre el metabolismo de los aminoácidos descubrió la GA mientras estudiaba la hidrólisis enzimática de la Gln en tejidos animales (Krebs, 1935). Los primeros en utilizar el término glutaminasa activada por fosfato fueron Errera y Greenstein en 1949, al describir la actividad enzimática en extractos de riñón, hígado, cerebro y bazo: esta actividad se veía notablemente aumentada por la presencia de fosfato. Actualmente se sabe que en mamíferos la enzima necesita fosfato inorgánico (Pi) para presentar actividad en ensayos *in vitro*, aunque no se conoce si el Pi es el verdadero activador *in vivo*.

Algunas de la principales funciones fisiológicas en las que se encuentra implicada la GA son la generación de amonio renal, el aporte de nitrógeno para la biosíntesis de urea en el hígado, la síntesis del neurotransmisor Glu en el cerebro y el aporte de energía para numerosos tipos celulares normales y transformados

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Kovacevic and McGivan, 1983; Curthoys and Watford, 1995). Aunque se han descrito diferentes precursores para la síntesis del transmisor Glu en el cerebro, la Gln a través de la reacción de la GA es considerada la fuente más importante (Nicklas y col., 1987). Además de ser uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso central (SNC), el Glu desempeña otros papeles biológicos importantes, tales como la sinaptogénesis, plasticidad sináptica, patogénesis de enfermedades neuro-psiquiátricas (Conti y Weinberg, 1999), síntesis del ácido γ-aminobutírico (GABA) y metabolismo energético en cerebro (Hertz, 1979; Kvamme, 1984) .

El papel de los dos genes principales implicados en el metabolismo de la Gln, la glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2) y la GA, merece especial atención en biología tumoral, ya que la Gln se comporta como un metabolito fundamental en el crecimiento y proliferación de tumores (Matés y col., 2002). Además, el catabolismo de la Gln ha sido ligado a las transformaciones neoplásicas (Kovacevic and McGivan, 1983): la elevada velocidad de glutaminolisis, observada en una amplia variedad de tumores, se supone esencial para mantener su capacidad proliferativa (Souba, 1993) y el aumento de la expresión de GA parece ser un carácter fenotípico distintivo presente en numerosos tumores (Aledo y col.,1994). Además, estudios experimentales en tumores humanos centrados en cambios en actividad enzimática y en los niveles relativos de mRNA de GS y GA, demuestran un patrón similar que se repite en la mayoría de los casos: inhibición de la expresión de GS y aumento en la expresión de GA (Matsuno y Goto, 1992; Medina y col., 1992; Gebhardt and Williams, 1995).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2. Genes y transcritos GA de mamíferos

En humanos, la familia GA está constituida por dos miembros principales localizados en genes distintos y situados en cromosomas diferentes: el gen *Gls*, en el cromosoma 2, codifica las isoenzimas conocidas como GA tipo riñón o tipo K; mientras que el gen *Gls2*, en el cromosoma 12, codifica para las isoenzimas GA tipo hígado o tipo L (Aledo y col., 2000). Genes ortólogos a los genes humanos *Gls* y *Gls2* se han descrito en otras especies de mamíferos como ratón y rata (Mock y col., 1989; Chung-Bok y col., 1997).

2.1. Gen *Gls* de mamíferos y transcritos derivados de este gen

El gen *GLS* humano abarca 82 kb. Tras un análisis de su secuencia por comparación con cDNAs depositados en las bases de datos, se dedujo que el gen está dividido en 19 exones (Porter y col., 2002). Al menos dos transcritos diferentes se originan a partir de este gen: el mRNA denominado KGA, formado al unirse los exones 1 a 14 y 16 a 19, y un transcrito que aparece por ayuste alternativo, llamado glutaminasa C (GAC), que utiliza tan sólo los 15 primeros exones del gen, omitiendo los exones 16 a 19 (Elgadi y col., 1999; Porter y col., 2002) (Figura 2). El cDNA GAC fue aislado originalmente de una genoteca de la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano (Elgadi y col., 1999), aunque posteriormente también se ha demostrado su expresión en riñón de rata y en una línea celular de riñón de cerdo (Porter y col., 2002). En tejidos humanos, el mRNA GAC es expresado mayoritariamente en músculo cardiaco y páncreas, apreciablemente en placenta, riñón y pulmón, y no se expresa en hígado y cerebro

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(Elgadi y col., 1999). De esta forma, numerosas especies de mamíferos expresan dos clases distintas de mRNAs tipo K que difieren en su región codificante 3'-terminal.

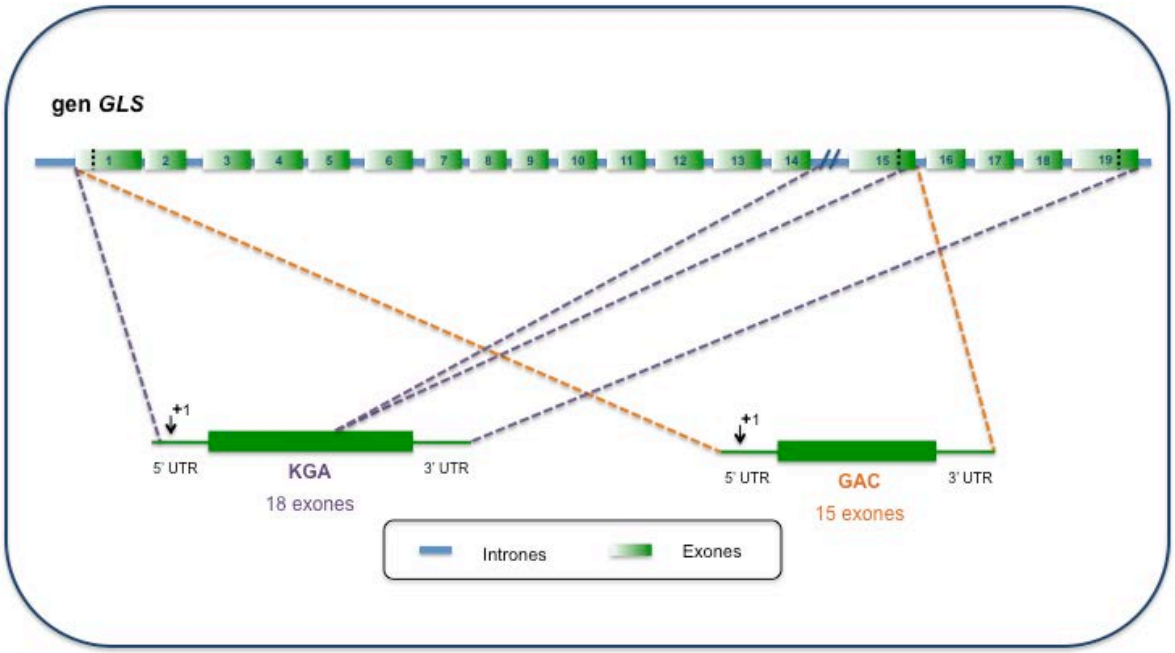


Figura 2. Gen de la glutaminasa humano *GLS* y transcritos alternativos KGA y GAC. El gen GLS tiene una longitud de aproximadamente 82kb y se divide en 19 exones. La secuencia de exones se indican como cajas verdes numeradas; la secuencia intrónica se muestra en línea continua color azul. El gen *GLS* codifica para dos transcritos: el mRNA de la isoforma KGA formado por la unión de los exones 1a 14 y 16 a 19, y el transcrito GAC que está formado por los 15 primeros exones. Las líneas discontinuas comprenden los exones implicados en la generación de ambos variantes transcritos. El sitio de comienzo de transcripción se marca con una flecha numerada con +1.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El mRNA KGA es ubicuo en todos los tejidos humanos a excepción de hígado adulto (Aledo y col., 2000). Se ha conseguido con éxito la clonación de cDNAs tipo K en diferentes tejidos de mamíferos incluyendo riñón (Shapiro y col., 1991), cerebro (Nagase y col., 1998) y células de cáncer de colon (Elgadi y col., 1999). Múltiples mRNAs tipo K se han detectado en células LLC-PK1-FBPasa$^+$ del túbulo proximal de riñón de cerdo (Porter y col., 1995), linfocitos de rata (Sarantos y col., 1993), esplenocitos de ratón (Aledo y col., 1998), células de tumor ascítico de Ehrlich (Aledo y col., 1994) y riñon humano (Elgadi y col., 1999). La longitud de estos transcritos está en el rango de 3.0 a 6.0 kb y su aparición podría explicarse al emplear el mRNA precursor sitios alternativos de poliadenilación (Porter y col., 2002), o bien mediante un mecanismo de ayuste alternativo (Elgadi y col., 1999). En mamíferos, se ha encontrado un patrón de expresión distintivo de estos transcritos que parece ser tejido-específico; más aún, este patrón específico de expresión ha sido relacionado con alteraciones en el estado metabólico, proliferativo o de desarrollo de las células, así como con cambios inducidos por el tumor en los tejidos del hospedador (Porter y col., 2002; Aledo y col., 1998).

En riñón, la enzima KGA se induce fuertemente por acidosis metabólica empleando un mecanismo post-transcripcional de estabilización del mRNA a pH ácido (Laterza y col., 1997). Esta expresión incrementada resulta en un aumento del catabolismo renal de Gln, como parte de un mecanismo adaptativo para contrarrestar la acidosis sistémica. La presencia de un elemento de respuesta al pH (secuencias ricas en AU) en la región 3'-no traducida (3'-UTR) del mRNA KGA es la responsable de su estabilización selectiva, gracias a la unión de la proteína

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ξ-cristalina/NADPH-quinona reductasa (Tang y Curthoys, 2001). No obstante, en otros tejidos distintos a riñón, la expresión del gen *Gls* está probablemente regulada a nivel de transcripción. Por ejemplo, en las células de la mucosa del intestino delgado la dexametasona induce un aumento del mRNA KGA y de la actividad específica GA. El incremento en el mRNA precedió al aumento de actividad, un resultado consistente con la síntesis *de novo* de RNA seguida de la síntesis de la proteína KGA. Los glucocorticoides pueden acelerar la utilización de Gln intestinal induciendo la expresión de GA, una respuesta adaptativa que podría suministrar más energía para las células de la mucosa en estados de estrés (Sarantos y col., 1992). El papel primario de la GA en el intestino es regular el metabolismo de los enterocitos, dado que la Gln es el principal sustrato respiratorio de los enterocitos y la GA cataliza el paso velocidad-limitante en la degradación de Gln. La nutrición parenteral enriquecida en Gln aumenta la actividad KGA en células del intestino mediante el aumento del mRNA KGA (Kong y col., 2000).

En células proliferantes y tumores la regulación transcripcional del gen *GLS* parece estar operativa y asociada con el crecimiento celular y la proliferación. La Gln es el principal combustible metabólico usado por los linfocitos y un marcado aumento en el mRNA de KGA se observó tras la inducción de un estímulo mitogénico mediante endotoxina (Sarantos y col., 1993). De nuevo, el aumento en el mensajero precedió a la subida de actividad, lo que es consistente con un mecanismo transcripcional de regulación génica previo a la biosíntesis de la enzima. Las citoquinas como interleukina-1, interleukina-6, el factor de necrosis

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

tumoral-α y el γ-interferón disminuyeron la actividad GA, la concentración de proteína KGA y sus niveles de mRNA en cultivos humanos de fibroblastos; ensayos de *nuclear run-on* mostraron una disminución en la cantidad de transcritos GA, como cabría esperar de una regulación transcripcional del gen. Los autores relacionaron estos hechos con el efecto de diferentes citoquinas pro-inflamatorias que menoscaban la proliferación de los fibroblastos (Sarantos y col., 1994). En células de tumor ascítico de Ehrlich se ha descrito una regulación a largo plazo de la expresión de KGA durante el desarrollo tumoral, de tal forma que los máximos valores de actividad y niveles de mRNA fueron encontrados en la fase de crecimiento exponencial de las células, en comparación con la fase estacionaria de crecimiento (Aledo y col., 1994). Aunque la actividad GA es elevada en células transformadas, su mayor nivel de expresión ocurre cuando las células se están dividiendo activamente durante la fase exponencial de crecimiento, en coincidencia con su máximo requerimiento de nitrógeno.

La regulación de la expresión de la enzima KGA también se ha relacionado con el factor de transcripción oncogénico c-Myc. El oncogén c-Myc estimula la proliferación celular, inhibe la transcripción de miR-23a y miR-23b, resultando en un aumento en la expresión de KGA en células cancerígenas de próstata y linfoma B humanos (Gao y col., 2009). Asimismo, se ha detectado un aumento en la actividad enzimática de GAC en líneas celulares tumorales altamente agresivas de cáncer de mama (Erickson y Cerione, 2010). La activación de GAC en estos tumores se ha visto bloqueada debido a la unión alostérica de la pequeña molécula 968 (una benzofenantridinona), reduciendo considerablemente la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

actividad invasiva de estos tumores.

Por último, con respecto a la regulación del gen *Gls* en cerebro de mamíferos, hay que destacar que el cDNA de la KGA de rata, así como los de KGA y GAC humanos, contienen un número variable de repeticiones del trinucleótido CAG en sus extremos 5' (Shapiro y col., 1991; Elgadi y col., 1999). Curiosamente, las repeticiones CAG de los mRNAs tipo K se localizan en la region 5'-UTR en humanos, mientras que en rata se encuentran en la región codificante. La importancia de estas secuencias repetitivas radica en su relación con determinadas enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Huntington, ataxia o distrofias musculares. Las repeticiones de los nucleótidos CAG codifican para extensiones de poliglutamina que pueden dar lugar a agregaciones de proteínas y daño del tejido neuronal. El significado funcional de las repeticiones CAG en GA no se conoce aún, y la implicación que puedan tener estas repeticiones en cualquiera de los dos genes de GA afectando a su expresión o favoreciendo desórdenes neuronales está aún por determinar.

2.2. Gen *Gls*2 y transcritos derivados de este gen

El gen de GA humano *GLS2*, localizado en el cromosoma 12, tiene una longitud superior a 18 kb y posee 18 exones (Aledo y col., 2000; Pérez-Gómez y col., 2003) (Figura 3). Aparte del exón adicional (exón 19) presente en el gen *GLS*, las principales diferencias en las secuencias codificantes de ambos genes GA están localizadas en los exones 1 y 18. El exón 1 de ambos genes exhibe un 62.5% de homología en su secuencia, pero codifica para 129 aminoácidos en KGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

y tan solo para 61 aminoácidos en la GAB humana, lo que explica los 67 aminoácidos extra de la isoenzima KGA en el extremo N-terminal. Los aminoácidos codificados por el exón 2 contienen las secuencias señal de envío y procesamiento mitocondrial (Shapiro y col., 1991; Gómez-Fabre y col., 2000). A resaltar, un motivo LXXLL en el exón 1 del gen *GLS2*, que podría explicar la localización nuclear que nuestro grupo ha demostrado para la GA GLS2 en cerebro de mamíferos (Olalla y col., 2002). De forma análoga, el último exón, que codifica para la región C-terminal en la isoenzima KGA y en las dos isoenzimas GLS2 (GAB y LGA), muestra la similitud de secuencia más baja (29.4%). Se ha demostrado que los aminoácidos codificados por este exón en la isoenzima GAB humana están implicados en el reconocimiento de módulos de interacción PDZ (dominios originalmente descritos en las proteínas PSD95/Dlg/ZO1) (Olalla y col., 2001). Por consiguiente, las diferencias más significativas entre los exones de los genes humanos *GLS* and *GLS2* están localizadas en regiones implicadas con la señalización y envío de proteínas a orgánulos y con las interacciones proteína-proteína, lo que puede ayudar a explicar las distintas funciones que estas isoformas pueden desempeñar así como su regulación diferencial. Por el contrario, los exones 3-17 de los transcritos mRNA de KGA y GAB/LGA poseen la misma longitud y muestran una alta similitud de secuencia (Pérez-Gómez y col., 2003).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

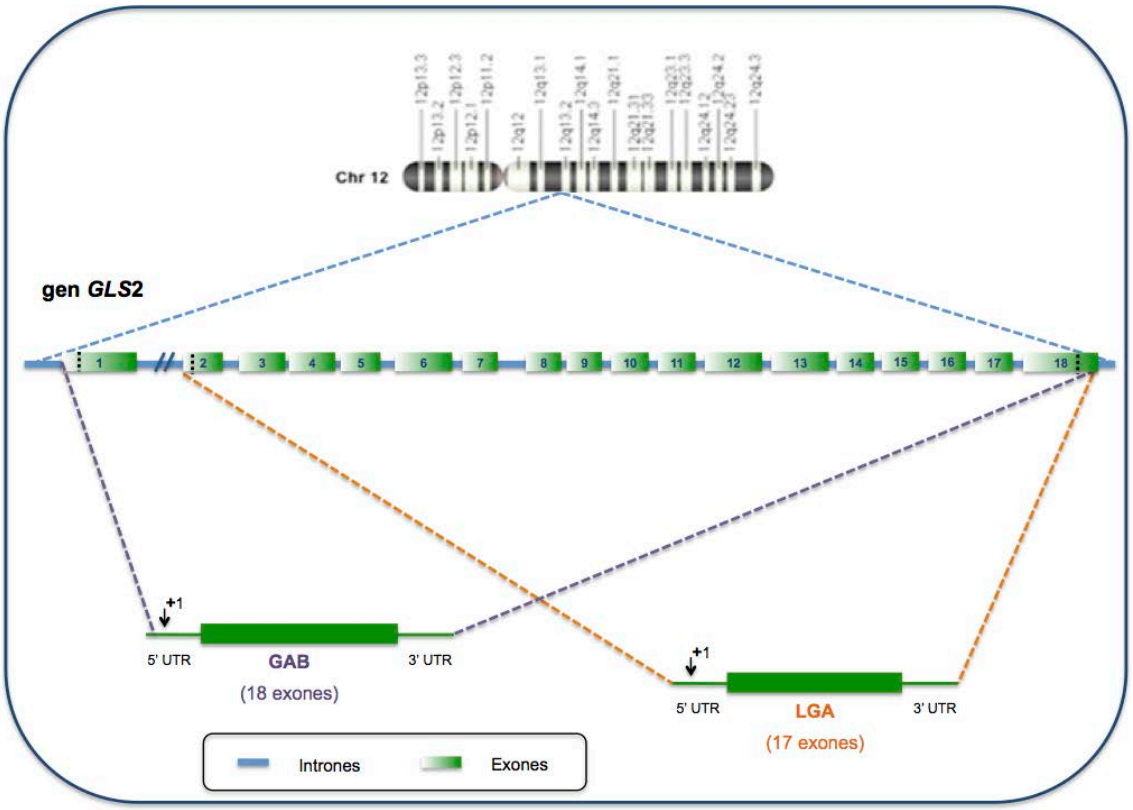


Figura 3. Estructura del gen *GLS*2 de humano y transcritos de GA (*). El gen *GLS*2 se localiza en la región 12q13 del cromosoma12 de humano, como se muestra en la parte superior de la Figura. El gen tiene una longitud de aproximadamente 18kb y se divide en 18 exones. La secuencia de exones se indican como cajas verdes numeradas; la secuencia intrónica se muestra en línea continua color azul. El gen *GLS*2 codifica para dos transcritos: el mRNA de la isoenzima canónica GAB formado por la unión de los 18 exones del gen y el transcrito corto LGA que carece del exón 1. Las líneas discontinuas comprenden los exones implicados en la generación de ambos variantes transcritos. El sitio de comienzo de transcripción se marca con una flecha numerada con +1. *La estructura génica y de transcritos GLS2 aquí mostrada se demostró de forma concluyente tras la publicación de parte de los resultados recogidos en esta Memoria.

Los transcritos GA tipo L, derivados del gen *GLS2*, fueron originalmente descritos como exclusivos del tejido hepático adulto y ausentes en el resto de tejidos extrahepáticos e hígado fetal (Smith y Watford, 1990; Curthoys y Watford,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1995). Este patrón restrictivo de expresión fue generalmente aceptado hasta muy recientemente, cuando resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de transcritos GLS2 en numerosos tejidos extrahepáticos en mamíferos tales como cerebro, páncreas y células de cáncer de mama humano (Gómez-Fabre y col., 2000). Se ha conseguido la clonación de los cDNAs tipo L de hígado de rata (Smith y Watford, 1990) y de células ZR-75 de cáncer de mama humano (Gómez-Fabre y col., 2000).

La Gln es un sustrato principal para la gluconeogénesis hepática y la síntesis de urea (Watford, 1993). En relación con la regulación transcripcional del gen *GLS2*, se ha descrito una expresión aumentada de la GA hepática en diabetes, ayuno y tras consumo de una dieta alta en proteínas. El mecanismo subyacente a estos cambios se demostró que era un aumento en la velocidad de transcripción del gen, al menos en los casos de dieta alta en proteínas y ayuno (Watford y col., 1994). Esta sobreexpresión de GA y el aumento del catabolismo de Gln se han relacionado con un incremento en la gluconeogénesis a partir de Gln y una mayor utilización de este aminoácido en el ciclo de la urea para facilitar la eliminación del exceso de amonio (Nurjhan y col., 1995; Watford, 1993). En contraste con la KGA, la GA hepática no se ve afectada por cambios en la homeostasis ácido-base. Sin embargo, un análisis bioinformático del promotor del gen *Gls2* de rata detectó un elemento de respuesta a cAMP (CREB), que podría explicar la respuesta del gen a niveles bajos de insulina y/o niveles elevados de glucagón (Chung-Bok y col., 1997). El promotor proximal de este mismo gen carece de una caja funcional TATA clásica, pero en cambio contiene sitios de reconocimiento HNF-1, HNF-5 y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

C/EBP (CAAT-*enhancer binding protein*) que pueden ser importantes para su expresión basal en hígado (Chung-Bok y col., 1997).

La primera secuencia humana completa de una GA tipo L fue deducida del cDNA obtenido por clonación en nuestro laboratorio, a partir de una genoteca de células ZR-75 de cáncer de mama (Gómez-Fabre y col., 2000). El cDNA completo aislado tiene 2408 nt de longitud y un marco abierto de lectura compuesto por 1806 nt. La traducción de este cDNA origina una proteína de 602 residuos con una masa molecular teórica de 66,309 Da. El análisis comparativo de su secuencia demostró que era muy similar (89% de identidad) con el cDNA de la GA de hígado de rata. En relación con las secuencias deducidas de aminoácidos, esta GA humana tipo L (posteriormente denominada GAB tras los resultados detallados en esta Memoria) comparte igualmente un considerable grado de identidad (94%) con la enzima de hígado de rata (tradicionalmente conocida como LGA), si bien la enzima humana se extiende 67 residuos adicionales en el extremo N-terminal. A diferencia de la similitud encontrada con la GA de hígado de rata, la GA humana tipo L sólo muestra un 68.5% de identidad con el cDNA de la KGA de riñón de rata, un porcentaje similar al encontrado entre los cDNAs de LGA y KGA aislados de hígado y riñón de rata, respectivamente (Chung-Bok y col., 1997).

Como mencionamos anteriormente, el gen humano *GLS2* tiene un tamaño superior a 18.1 kb y posee 18 exones y 17 intrones. La organización exón/intrón del gen *GLS2* humano fue determinada usando la secuencia del clon de cDNA de células ZR-75 de cáncer de mama. Las secuencias de aminoácidos y núcleotidos de los transcritos de la GA tipo L en humanos y en rata comparten un alto nivel de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

identidad, siendo la LGA de rata 67 amino ácidos más corta que la GA tipo L de células de ZR-75 en el extremo N-terminal: la proteína LGA de rata carece de todos los aminoácidos codificados por el exón 1 y los seis primeros amino ácidos del exón 2. La existencia de transcritos alternativos del gen *Gls2* parecía muy probable, tal y como como ocurre con el gen *Gls*. Tras los resultados detallados en esta Memoria, se ha concluido que la GA tipo L de las células de cáncer de mama ZR-75 representa una nueva especie de mRNA que codifica a una nueva isoforma de GA denominada GAB (de la Rosa y col., 2009) (Figura 3) , por lo que así la denominaremos en adelante para evitar confusiones.

Las regiones promotoras de los genes *Gls2* de rata y humano no contienen cajas TATA canónicas, pero sí poseen dominios ricos en G+C (Pérez-Gómez y col., 2003; Chung-Bok y col., 1997). Esta característica también se encuentra en el promotor del gen *GLS* humano (Porter y col., 2002). Pese a la elevada identidad de secuencia (89%) entre las regiones codificantes de los genes *Gls2* de rata y humano (Gómez-Fabre y col., 2000), las regiones proximales de los promotores de ambos genes no muestran una significativa homología de secuencia. A diferencia del gen *Gls2* de rata, el gen humano sí posee una caja CAAT canónica y otra para proteínas que reconocen al elemento de respuesta a Ras (RREBs, *Ras-responsive element-binding proteins*), aunque carece de sitio HNF-5 que sí aparece, en cambio, en el promotor del gen *Gls2* de rata. Experimentos de actividad transcripcional con vectores luciferasa como gen reportero, demostraron que dos cajas CAAT desempeñan un papel crucial en la regulación transcripcional del gen *GLS2* humano, tanto en células tumorales de origen hepático (HepG2)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

como en células MCF7 de cáncer de mama (Pérez-Gómez y col., 2003). Las proteínas que se unen a las cajas CAAT (C/EBPs) controlan el crecimiento celular y la diferenciación: en varias líneas celulares de adipocitos, granulocitos y queratinocitos provocan detención del crecimiento e inducen diferenciación (Darlington y col., 1998). Más aún, células HepG2 de hepatoma humano expresan niveles significativamente muy bajos de C/EBPα and C/EBPβ en relación con los niveles habituales encontrados en hepatocitos diferenciados (Friedman y col., 1989). En conclusión, la conversión de hepatocitos en células proliferantes de hepatomas podría requerir un silenciamiento génico de la expresión de C/EBPα y C/EBPβ.

La enzima GAB de células ZR-75 de cáncer de mama también muestra una regulación a largo plazo dependiendo del estado de proliferación celular: máximas actividades enzimáticas se detectan al comienzo de la fase exponencial de crecimiento de estas células, mientras que una drástica disminución se observa en la fase estacionaria, cuando se alcanza la confluencia celular. En paralelo, los niveles de mRNA de GAB también mostraron un aumento notable justo antes del comienzo de la fase exponencial, para disminuir rápidamente en las fases exponencial y estacionaria; en concreto, la cantidad de mRNA fue 5 veces superior antes de la fase exponencial, comparado con el encontrado cuando la proliferación celular ya había cesado (Gómez-Fabre y col., 2000). Estos resultados son diferentes a los obtenidos previamente en células de tumor ascítico de Ehrlich al analizar la expresión de la isoenzima KGA: en este caso, la actividad GA mitocondrial y los máximos niveles de mRNA de KGA coincidieron en el día 7 del

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

desarrollo tumoral, justo en la mitad de la fase exponencial de crecimiento de este tumor experimental que crece en ratones (Aledo y col., 1994). Por lo tanto, existe una regulación diferencial de la expresión génica de las isoenzimas GA en tumores. La sobreexpresión de GA es una característica fenotípica exhibida por muchos tumores experimentales y cánceres humanos (ver Márquez y col., 2015 para una revisión reciente sobre el tema).

Tanto los nuevos patrones de interacción con proteínas, descubiertos para las isoenzimas GA durante los últimos años, como su localización subcelular sugieren que, además de su función metabólica clásica, las isoformas de GA han de tener un comportamiento multifuncional. La correlación entre la expresión de GA y el crecimiento y proliferación celular en cáncer, así como el aumento del catabolismo de la Gln mitocondrial en numerosos tipos de células tumorales, apoyan esta teoría (Matés y col., 2002; De Berardinis y Chang, 2010; Wise y col., 2008).

Nuestro grupo descubrió por primera vez una función diferencial de las proteínas GA después de examinar sus patrones de expresión en varias líneas celulares de cáncer y tumores humanos: las isoformas GLS se asociaron a oncogénesis y crecimiento de tumores, mientras las isoformas GLS2 se asociaron a diferenciación celular (Pérez-Gómez y col., 2005). Además, en algunos tejidos de mamíferos y células tumorales se ha observado la coexpresión de isoformas GLS y GLS2 (Aledo y col., 2000; Pérez-Gómez y col., 2005), aunque el significado fisiológico de la existencia de diferentes transcritos GA en estos tipos celulares aún no se ha explicado (Turner y col., 2003).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El descubrimiento de nuevos tipos celulares que expresan proteínas GLS2, junto con las nuevas características y funciones recientemente sugeridas para la isoformas GLS2 (Márquez y col., 2006; Campos-Sandoval y col., 2007; Martín-Rufián y col., 2014; Márquez y col., 2015), hacen plantearse la caracterización de los distintos transcritos codificados por el gen *Gls*2 en mamíferos como prerrequisito para entender la regulación tejido específica de GA y el metabolismo de la Gln.

En esta Memoria se muestran por primera vez sólidas evidencias experimentales que demuestran la existencia de formas alternativas de mRNA del gen *Gls*2 ortólogo en ratón, rata y humano. Se concluye que existen al menos dos transcritos del gen *Gls*2: una forma larga, canónica, que contiene 18 exones y denominamos GAB; y un transcrito corto llamado LGA, que aparece por un mecanismo de sitio alternativo de inicio de la transcripción, emplea un promotor alternativo (separado más de 7 kb del promotor canónico de la GAB) y presenta un primer exón diferente al de la isoforma larga. Además, GAB y LGA se expresan diferencialmente en tejidos de mamíferos y células de cáncer humano.

3. Glutaminasa en cerebro y otros tejidos de mamíferos

Krebs, en sus pioneros estudios acerca del catabolismo de Gln en mamíferos, ya distinguió entre una GA tipo hígado y otra tipo cerebro (Krebs, 1935), si bien ésta última fue posteriormente denominada enzima tipo riñón (Kovacevic y McGivan, 1983). Aparte de diferencias en las estructuras moleculares, su distinto comportamiento cinético ha sido frecuentemente

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

empleado para distinguir las diversas isoformas GA. Estas enzimas están reguladas por un gran número de efectores de baja masa molecular: las principales diferencias cinéticas han sido observadas en la dependencia por el activador Pi—baja para las tipo L, alta para las tipo K—, la afinidad relativa por el sustrato Gln—más elevada para las tipo K que para las tipo L—, y el efecto inhibitorio del Glu, una característica únicamente encontrada para isoenzimas tipo K (Kovacevic y McGivan, 1983; Curthoys y Watford, 1995). Ambas isoenzimas han sido tradicionalmente consideradas como proteínas mitocondriales (Curthoys y Watford, 1995).

La GA desempeña un papel clave en cerebro: es la principal enzima que consume Gln en este tejido y representa un paso fundamental en la generación del Glu neurotransmisor. El modelo tradicional de expresión de GA aceptaba que la única isoenzima presente en cerebro, y responsable de la generación del Glu neurotransmisor, era la isoforma KGA (GLS) (Haser y col., 1985; Curthoys y Watford, 1995). Nuestro grupo fue el primero en descubrir la expresión simultánea de transcritos de mRNA para KGA y GA GLS2 en cerebro humano (Aledo y col., 2000; Gómez-Fabre y col., 2000). Posteriormente, demostramos la coexpresión de mRNA de KGA y GLS2 en cerebro de otras especies de mamíferos como vaca, ratón, conejo y rata (Olalla y col., 2002). La coexpresión fue verificada a nivel de proteínas por métodos bioquímicos e inmunológicos mediante el empleo de anticuerpos isoenzima-específicos (Olalla y col., 2002). Además de cerebro, también se ha demostrado la coexpresion de ambas isoenzimas en las siguientes líneas celulares humanas: en células de tumor colorrectal (Turner and McGivan,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2003), en células de hepatoma HepG2, células de leucemia mieloide KU812F y células de cáncer de mama MCF7 y ZR75 (Pérez-Gómez y col., 2005).

En la sinapsis tripartita (neurona presináptica, neurona postsináptica y astrocitos), el balance entre Glu liberado y captado se denomina homeostasis de Glu; esta homeostasis regula la actividad sináptica y controla la activación de receptores de Glu (Aledo y col., 2000). La GA juega un papel imprescindible en la homeostasis glutamatérgica como la fuente más importante de Glu presináptico liberado (Nicklas y col., 1987) (Figura 4).

Las homeostasis de Gln y Glu en cerebro están inexorablemente unidas, un claro ejemplo es el ciclo Gln-Glu entre neuronas y astrocitos (Hertz, 1979; Figura 4). Esta relación entre ambos metabolitos explica la generación y reciclaje del neurotransmisor. La neurotransmisión glutamatérgica controla el primer comportamiento esencial para la supervivencia, la respiración, mediada por circuitos glutamatérgicos del tronco cerebral. Posteriormente, durante el desarrollo y en la etapa adulta, la transmisión sináptica glutamatérgica está implicada en prácticamente todos los circuitos del SNC. A pesar de numerosas investigaciones, el origen del Glu neurotransmisor no ha sido completamente resuelto. Aunque existe más de una ruta para la síntesis de Glu, el reservorio de Glu en neuronas se deriva principalmente de Gln a través de la enzima GA (Nicklas y col., 1987). No obstante, también se ha demostrado síntesis del neurotransmisor Glu mediante transaminación de α-cetoglutararo, reacción implicada en el ciclo del ácido tricarboxílico (Waagepetersen y col., 2005). Dado que en neuronas la síntesis *de novo* de Glu a partir de α-cetoglutarato es mínima, la teoría más aceptada sugiere

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

la existencia de un ciclo Gln-Glu entre neuronas y astrocitos, en el que el Glu se recicla a Gln en astrocitos mediante la actividad GS (Shen y col., 2009; Figura 4). La Gln se envía entonces a neuronas donde se genera Glu neurotransmisor por la acción de la enzima GA. Esta teoría está apoyada por una localización exclusivamente glial de la GS, mientras que la GA se localizaría principalmente en neuronas (Laake y col., 1995; Shen, 2006).

Así pues, en cerebro, la Gln es considerada la fuente más importante del Glu neurotransmisor a través de la reacción de la GA (Kvamme, 1984; Nicklas y col., 1987). Además de ser el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC (Fonnum, 1984), el Glu desempeña funciones esenciales en sinaptogénesis, plasticidad sináptica, patogénesis de enfermedades neuropsiquiátricas (Conti y Weinberg, 1999), síntesis del ácido γ-aminobutírico (GABA), y metabolismo energético cerebral (Erecinska and Silver, 1990).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

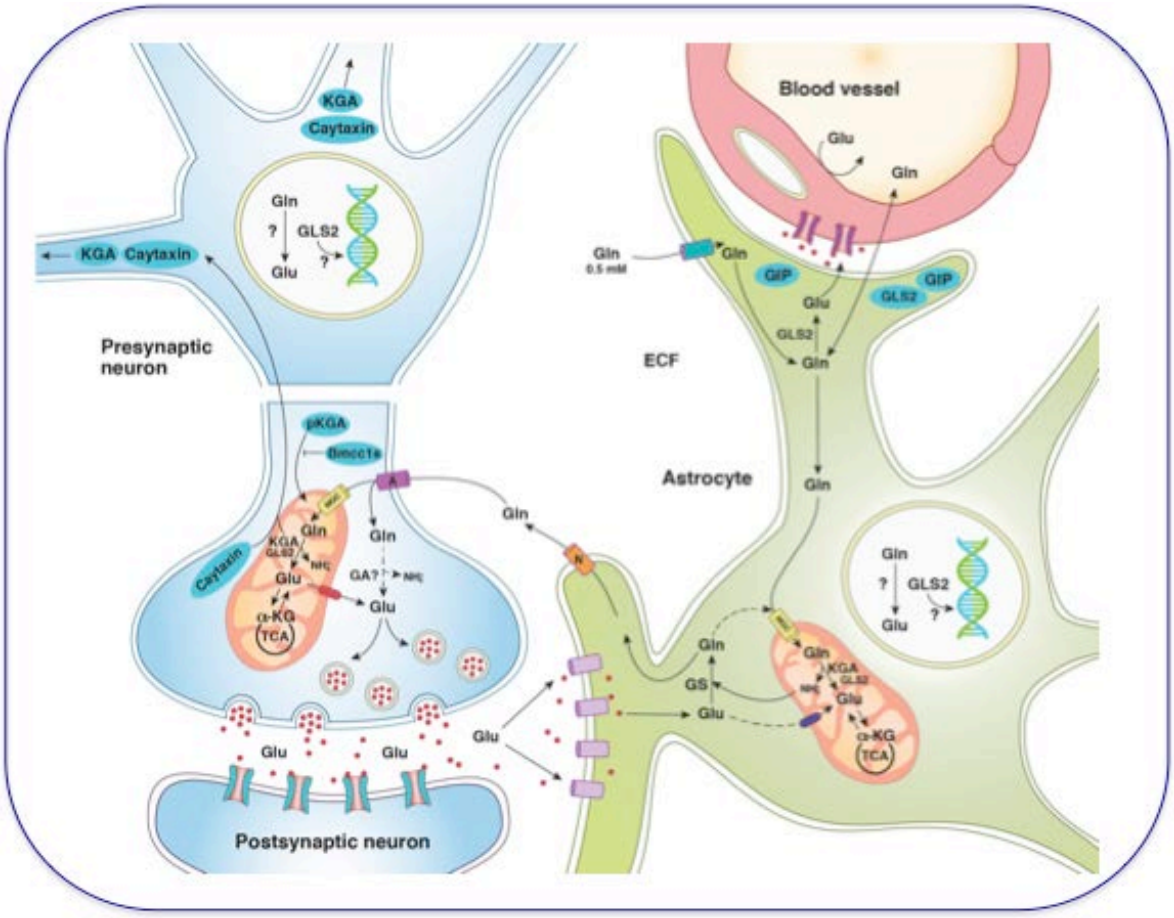


Figura 4. Esquema del ciclo Gln-Glu entre neuronas y astrocitos. Además del ciclo Gln-Glu entre neuronas y astrocitos, en la figura se indica también la posibilidad de la existencia de actividad GA en los pies astrocitarios perivasculares, así como la posible localización nuclear de la isoenzima GLS2 en neuronas y astrocitos. Las potenciales funciones de isoenzimas GA para las cuales no existe una evidencia experimental definitiva se indican con un signo de interrogación (Adaptado de Márquez y col., 2016).

Para cuestionar aún más el modelo tradicional de regulación del ciclo Gln-Glu en cerebro, hemos aportado sólidas evidencias experimentales de una segregación subcelular de GA en neuronas: la isoenzima KGA está presente en mitocondrias, mientras que la GA GLS2 se localiza en núcleo (Olalla y col., 2002). La localización nuclear de la GA GLS2 (GAB y/o LGA) fue completamente

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

inesperada: este trabajo cambió drásticamente el paradigma de expresión de GA en mamíferos, siendo la primera vez que se describía una localización extramitocondrial para una GA. La visión de la GA como una proteína monofuncional, con un papel relevante pero exclusivamente catalítico, ha quedado relegada debido a nuevos descubrimientos aportados, en gran parte, por nuestro grupo. Las isoformas GAB/LGA poseen motivos consenso y dominios funcionales que sugieren que se trata de una proteína multifuncional (Márquez y col., 2006). Por ejemplo, en la region C-terminal, los últimos cuatro amino ácidos (ESMV) conforman una secuencia consenso de interacción con proteínas PDZ (Kornau y col., 1995). Mediante la técnica del rastreo de doble-híbrido en levadura, nuestro grupo aisló y caracterizó un cDNA de cerebro humano que codifica para una proteína PDZ, a la que denominamos GIP (*Glutaminase-Interacting Protein*), que interacciona específicamente con el extremo C-terminal de las isoenzimas GLS2 (Olalla y col., 2001) (Figura 5). Las proteínas PDZ median interacciones proteína-proteína que conducen a la generación de agregados multifuncionales, particularmente en cerebro. Existen hallazgos recientes que establecen la importancia de las proteínas que contienen dominios PDZ en la localización subcelular de otras proteínas (Márquez y col., 2006). Así, la asociación entre el dominio PDZ de la γ1-sintrofina y la proteína diacilglicerol quinasa-ζ es capaz de reclutar γ1-sintrofina al núcleo de las células (Hogan y col., 2001). En este contexto, también hay que señalar que GIP es un regulador de la transcripción: la proteína interacciona físicamente con β-catenina e inhibe su actividad transcripcional. Existen otros ejemplos de proteínas que contienen dominios PDZ y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

actúan como factores de transcripción: CASK/LIN-2 (Hsueh y col., 2000) y ZO-1 (Balda y Matter, 2000). La capacidad de la proteína GIP de actuar como factor de transcripción *in vivo* podría estar relacionada con la hipótesis de que las isoenzimas GLS2 actúen como corregulador transcripcional, ya que, como se ha expresado anteriormente, esta proteína interacciona con GIP. La interacción de esta isoforma con proteínas PDZ podría constituir un mecanismo molecular que regule su translocación al núcleo y su función nuclear.

Estos resultados abren una nueva línea de investigación sobre cómo la GA, y el par Gln/Glu, puede afectar la función de las células cerebrales. Respecto a la localización nuclear, también conviene señalar que el análisis bioinformático de las proteínas GLS2 reveló la existencia de un dominio de dedos de Zn, concretamente del tipo Cys2His2, característico de muchos factores de transcripción (Figura 5). Por consiguiente, queda abierta la posibilidad de que las isoenzimas GLS2 funcionen directamente como un factor de transcripción. Además, mientras que estas proteínas no poseen ninguna secuencia específica de localización nuclear, sí poseen un motivo LXXLL que constituye una secuencia de interacción con receptores nucleares (Figura 5). La enzima mitocondrial 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA sintasa (EC 4.1.3.5) ha sido detectada en núcleo y su translocación implica la interacción con un receptor hormonal nuclear a través de un motivo LXXLL presente en la enzima (Meertens y col., 1998). La GA GAB posee este motivo consenso en los aminoácidos 72-76 (LGDLL) y además es capaz de interaccionar con proteínas PDZ que pueden modular su actividad. La regulación de la transcripción génica a través de receptores nucleares requiere la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

participación de correpresores y coactivadores y GAB podría formar parte de un complejo transcripcional, actuando como un corregulador. Por último, la participación de GLS2 en núcleo podría ser indirecta, por regulación de los niveles de Gln (Glu) en el nucleoplasma. La idea de que los aminoácidos regulan la expresión génica surgió hace unos años. Ahora ya se acepta que los aminoácidos juegan un papel importante, junto con las hormonas, en el control de la expresión génica; sin embargo, los mecanismos moleculares implicados se desconocen en su mayoría. En concreto, la Gln induce la expresión de proteínas HSP ("heat shock proteins"), tanto a nivel de mRNA como de proteína (Sanders y Kon, 1992), y reprime la expresión de GS. De esta forma, la importancia de la localización nuclear de GAB radicaría en el control in situ de los niveles de Gln (Glu), estando implicada indirectamente en la expresión de genes regulados por Gln (Glu).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

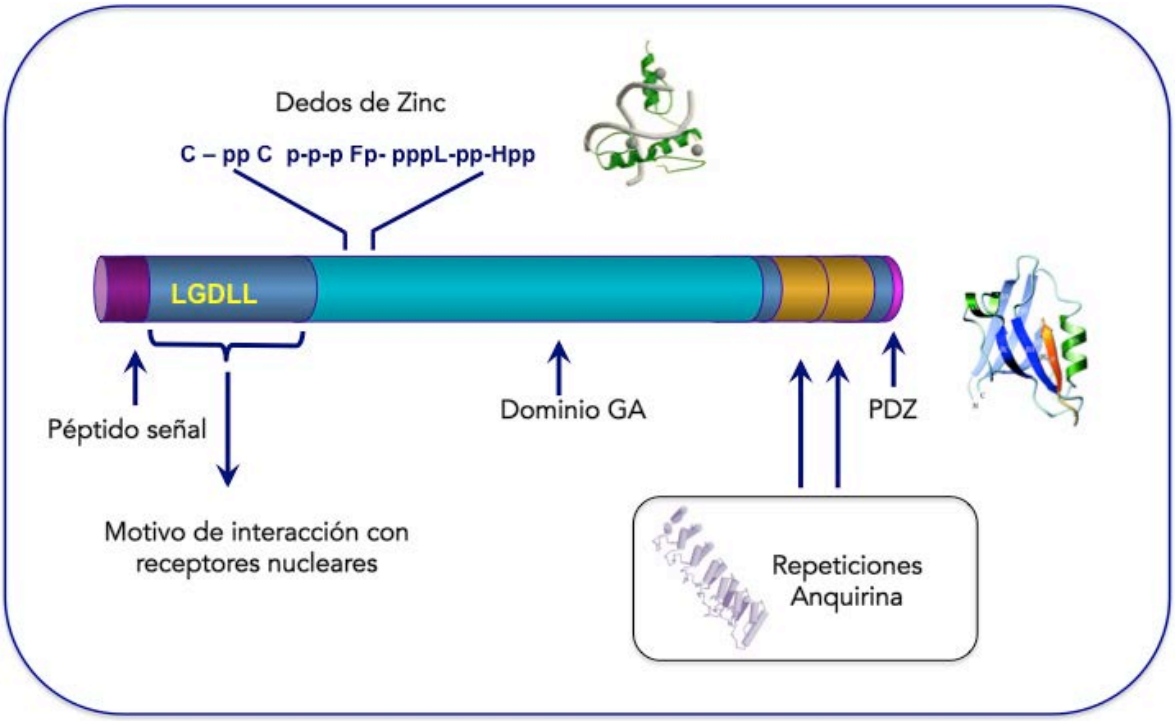


Figura 5. Esquema de las características de las proteínas GLS2. Motivos estructurales clave de la isoenzima GLS2. Se destaca especialmente los dominios de interacción con receptores nucleares, dominios PDZ, dedos de Zinc y dominio que define la actividad GA.

Posteriormente, nuestro grupo ha identificado la presencia de GA en astrocitos (Márquez y col., 2016). Se realizaron estudios de inmunohistoquímica en tejido de cerebro humano y de rata empleando anticuerpos isoforma específicos revelando expresión de ambas isoenzimas GLS (KGA) y GLS2 (GAB/LGA) en neuronas y en astrocitos, aunque con diferente localización subcelular: la isoforma KGA se localiza en mitocondra mientras que las isoformas GAB/LGA se localizan en núcleo y mitocondria (Márquez y col., 2016). La expresión de GA en astrocitos también se ha demostrado a nivel de mRNA y se ha probado la actividad enzimática de la misma (Cardona y col., 2015). La presencia

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de GA con actividad catalítica en astrocitos es relevante para la estequiometría del ciclo Gln/Glu en los procesos de sinapsis, lo que sugiere la posibilidad de nuevas funciones para las distintas isoformas GA.

Desde muy pronto se postularon importantes funciones reguladoras para la GA en cerebro, habida cuenta de su perfil de activación e inhibición por una amplia variedad de efectores exógenos y endógenos. Así, en preparaciones particuladas de cerebro (homogenados y sinaptosomas) los efectores activadores incluyen: Pi, sulfato, cloruro, ácidos carboxílicos, nucleótidos trifosfato y fosfato de riboflavina, todos ellos activos en el rango de concentración milimolar (Erecinska y Silver, 1990). Otros compuestos, como CoA, acil-CoA de cadena corta y cadena larga y el colorante azul de bromotimol, activan la GA cerebral en el rango micromolar, pero se convierten en inhibidores a concentraciones milimolar (Kvamme y col., 2000). No obstante, estos datos deben interpretarse con precaución, debido a la dificultad de obtener resultados reproducibles cuando se ensayan preparaciones de tejidos o extractos celulares crudos, así como a ciertas diferencias metodológicas reportadas por distintos autores. Por ejemplo, el calcio es un candidato potencialmente muy importante para regular GA porque sus concentraciones cambian con la función cerebral. El Ca^{2+} activa la GA en mitocondria, en sinaptosomas de cerebro y en cortes y homogeneizados cerebrales, pero no tiene efecto sobre la enzima purificada, lo que sugiere que su efecto es indirecto (Erecinska y Silver, 1990; Kvamme y col., 2000).

Como ya hemos comentado, el Pi es el principal activador de GAs codificadas por el gen *GLS* (Tabla 1). La enzima KGA purificada de cerebro es una

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

enzima alostérica y su curva de activación con Pi es sigmoide (Haser y col., 1985; Kvamme y col., 2000). La curva de activación muestra un cambio de pendiente muy abrupto, lo que indica que KGA es muy sensible a cambios en el nivel de Pi. De hecho, sus principales efectores son compuestos que fundamentalmente alteran el efecto activador del Pi (Kvamme y col., 2000). Si el Pi es o no el verdadero activador fisiológico *in vivo* de la GA cerebral permanece aún por determinarse; sin embargo, su elevada concentración en cerebro, y el hecho de que sus niveles varían rápidamente durante la actividad neuronal, ha llevado a muchos autores a postularlo como importante regulador fisiológico *in vivo* de la GA cerebral (Erecinska y Silver, 1990). Los principales inhibidores de las isoenzimas GLS de cerebro son: Glu, iones amonio, protones, y cAMP y cGMP a concentraciones mM (Krebs, 1935; Erecinska y Silver, 1990; Kvamme y col., 2000). Otros inhibidores no específicos incluyen a compuestos que reaccionan con grupos tiol, así como análogos de Gln como el 6-diazo-5-oxo-norleucina (DON) (Campos y col., 1998; Curthoys y Watford, 1995). Dos inhibidores específicos recientemente descubiertos de las isoenzimas tipo K, BPTES [sulfuro de bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il)etil] para la KGA y el compuesto 968 [5-[3-Bromo-4-(dimetilamin)fenil]-2,3,5,6-tetrahidro-2,2-dimetilbenzofenantridin-4(1H)ona] para la GAC, pertenecen al tipo de inhibidores alostéricos que impiden los cambios conformacionales asociados con la activación por Pi, impidiendo la formación de oligómeros de elevada masa molecular (Robinson y col., 2007; Erickson y Cerione, 2010).

El Glu es un inhibidor competitivo (Tabla 1) y las concentraciones relativas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de Gln y Glu en los terminales glutamatérgicos (Kvamme y col., 2000) sugieren que la GA puede estar fuertemente inhibida en células nerviosas y en sus terminales sinápticos, de acuerdo con resultados previos obtenidos en sinaptosomas (Erecinska y Silver, 1990). De hecho, la actividad GA *in vivo* en cerebro de ratas hiperamonémicas, medida por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{15}N, representa aproximadamente el 1% de la actividad medida *in vitro* en homogenados de cerebro de rata (Kanamori y Ross, 1995). Estos resultados sugieren que en cerebro la actividad GA se mantiene a un nivel bajo mediante una regulación a corto plazo por sus efectores principales, básicamente Pi y Glu.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 1. Genes de GA de mamífero, transcritos e isoformas proteicas.

Transcrito/proteína	KGA	GAC	GAB	LGA
Gen	*Gls*	*Gls*	*Gls2*	*Gls2*
Longitud transcrito	18 exones/4348 nt	15 exones/3183 nt	18 exones/2408 nt	17 exones/2026 nt
Mecanismo transcripcional	Ayuste alternativo	Ayuste alternativo	Canónico	Sitio alternativo de inicio de la transcripción y promotor alternativo
Regulación transcripcional	c-Myc	−	p53	−
Expresión	Ubicua en la mayoría de tejidos de mamífero excepto hígado, células de cáncer humano	Músculo cardiaco, páncreas, placenta, riñón, pulmón, células de cáncer humano	Cerebro, páncreas, células del sistema inmune, células de cáncer humano	Hígado, cerebro, células de cáncer humano
Proteínas humanas	669 aa	598 aa	602 aa	565 aa
Masa molecular de la proteína madura	68 and 66 kDa	58 kDa	63 kDa	58 kDa
Dependencia de Pi	Alta	−	Baja	Baja
Activación por amonio	No	No	Muy baja	Fuerte
Inhibición por glutamato	Fuerte	−	Moderada	No
Proteínas que interactúan	*Caytaxin*, Bmcc1s	−	GIP, SNT	−
Inhibidores	BPTES, 968, *ebselen, chelerythrine, apomorphine*, B839, *zaprinast*		Alquilbenzoquinonas, apomorfina	

La isoforma LGA fue parcialmente purificada de hígado de rata por Patel y McGivan (1984) y a homogeneidad por Heini y col. (1987) y por Smith y Watford (1988). Al contrario que sucede con KGA, la enzima hepática no se inhibe por Glu, tiene una K_m mas alta para la Gln, es totalmente activa a bajas concentraciones de Pi y necesita obligatoriamente amonio para ser activa (Tabla1). La isoenzima LGA de hígado de rata posee una única subunidad con una Mr de 58000 (Tabla 1); sin embargo, una gran variedad de masas moleculares han sido estimadas: desde

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

162000-170000 Da por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Heini y col., 1987; Smith y Watford, 1988), hasta más de 300000 Da por cromatografía de filtración en gel (Patel y McGivan, 1984; Smith y Watford, 1988). Esta discrepancia considerable ha sido también observada en la estimación de la Mr nativa para la KGA de riñón de rata analizada por filtración de gel y por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Curthoys y col., 1976). Un volumen específico parcial fuera de lo normal, agregación de la enzima e inactivación de la proteína como resultado de la dilución podrían explicar la diferencia de resultados que han sido descritos (Heini y col., 1987; Smith y Watford, 1988; Segura y col., 1995). Los datos obtenidos por ultracentrifugación sugieren que la GA de hígado de rata es un trímero compuesto de tres subunidades idénticas (Heini y col., 1987). Al contrario que para KGA, no se han encontrado signos de agregación similares para la enzima LGA de hígado, incluso con elevadas concentraciones de Pi (Heini y col., 1987; Smith y Watford, 1988).

El mRNA humano de GAB ha sido expresado heterólogamente en procariotas (Campos y col., 2003) y en sistemas de baculovirus (Campos-Sandoval y col.,2007). El primer sistema sobreproductor heterólogo para GA de mamíferos fue descrito para la enzima GAB en *Escherichia coli*. La expresión de GAB humana en bacterias fue completamente optimizada, aunque la proteína estaba desprovista de actividad catalítica (Campos y col., 2003). Posteriormente, se estudió la expresión en sistemas eucarióticos, comprobándose que la isoforma GAB humana expresada en células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes era funcional. (Campos-Sandoval y col., 2007). Los sistemas de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

baculovirus en células de insecto constituyen un potente sistema de expresión eucariótico, con la ventaja de que las células de insecto poseen modificaciones post-traduccionales similares a las células de mamíferos. Esta fue la primera demostración directa de que el cDNA humano de GAB, originalmente clonado de células de cáncer de mama ZR-75, codifica para una GA activa. La isoenzima GAB purificada mostró unas característica cinéticas híbridas entre las isoenzimas GLS (tipo K) y GLS2 (tipo L). De este modo, aunque mostró una menor dependencia por el activador Pi (como cabría esperar de una isoenzima GLS2), fue en cambio inhibida por Glu (una característica exclusiva de las isoenzimas GLS) y escasamente activada por amonio, un activador obligatorio para la isoenzima LGA hepática, arquetipo de enzima GLS2 (Tabla1).

En cuanto a las isoformas GLS, se ha demostrado que la forma GAC muestra una respuesta mayor al activador Pi que la KGA. Análisis de la estructura cristalina de GAC por rayos X en distintos estados sugieren un cambio conformacional del tetrámero esencial para la unión alostérica de Pi, definiendo así el modo de activación de la proteína. Se ha demostrado también una mayor tendencia a oligomerizar de la proteína GAC, a diferencia de su isoforma alternativa KGA. La dependencia de la unión Pi en el sitio activo de la molécula le diferencia también de las isoenzimas GLS2, que son menos dependientes (Cassago y col., 2011) (Tabla 1). La estructura cristalina de la GAC también se ha determinado en presencia y ausencia del inhibidor alostérico BPTES (DeLaBarre y col., 2011). Dos moléculas de BPTES se unen al tetrámero de GAC, adquiriendo una conformación no productiva de la proteína, que impide su oligomerización

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

necesaria para alcanzar el estado activo.

Las nuevas localizaciones subcelulares en cerebro de las isoformas de GA sugieren funciones para la isoenzima GLS2 no relacionadas con neurotransmisión, sino con regulación transcripcional y diferenciación celular (Campos-Sandoval y col., 2015). Además, se ha demostrado que las enzimas GA desempeñan funciones esenciales en la biología de los tumores y, como consecuencia, se postulan como nuevas dianas terapéuticas para inhibir la reprogramación metabólica de las células cancerígenas. Hay que destacar que las isoenzimas GA juegan papeles opuestos en el crecimiento y proliferación celular de células de cáncer, especialmente en células de tumores cerebrales (Campos-Sandoval y col., 2015). En cerebro, el hecho de que se expresen cuatro isoenzimas diferentes codificadas por dos genes separados aún no ha sido explicada. No se conoce la contribución de cada isoenzima al *pool* de Glu neurotransmisor, así como la posibilidad de que algunas de estas isoenzimas, particularmente las GLS2, realicen otras funciones aparte de la meramente catalítica. Por ello, decidimos diseñar y generar modelos animales transgénicos deficientes en el gen *Gls*2 que nos permitieran arrojar luz sobre algunas de estas cuestiones, profundizando así en la función cerebral de las isoenzimas GA.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4. Animales genéticamente modificados en Genómica Funcional

Una de las herramientas más poderosas para elucidar la función de un gen es la generación de modelos animales transgénicos deficitarios para ese gen concreto. El posterior fenotipado del animal a nivel conductual y comportamental, así como a nivel molecular, empleando técnicas de Genómica Funcional y Proteómica, proporciona la información esencial para descubrir la función del gen diana y los mecanismos moleculares implicados que subyacen en las alteraciones o patologías que su silenciamiento ha provocado en el animal, con potencial repercusión en trastornos y enfermedades humanas.

La importancia de generar animales transgénicos para investigar la función de genes *in vivo* y que puedan ser utilizados como modelos de enfermedades humanas es patente hoy en día. Esta relevancia de los modelos murinos transgénicos viene avalada por dos proyectos, a escala internacional, que pretenden conseguir en los próximos años una amplia representación de líneas celulares embrionarias y de ratones transgénicos, uno a nivel norteamericano (proyecto KOMP) y otro a nivel europeo (proyecto EUCOMM). El proyecto KOMP (Knock-Out Mouse Project) es una iniciativa de los Institutos Nacionales de la Salud Americanos (NIH) para generar una colección pública de células embrionarias y ratones transgénicos, conteniendo una mutación nula (knock-out génico) de cada uno de los genes del ratón. El concepto KOMP fue desarrollado a partir de una conferencia internacional celebrada en Otoño de 2003 (Austin y col., 2004) y comenzó en julio de 2006. Este proyecto pretende generar líneas de células madre embrionarias con mutaciones nulas en la cepa C57BL/6, la más

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

empleada en investigación (Skarnes y col., 2011). Por su parte, el programa EUCOMM (European Condicional Mouse Mutagenesis) se plantea como alternativa complementaria al proyecto KOMP y pretende aglutinar las iniciativas en este campo en diversos países europeos, con la participación de once grandes centros de Genómica Funcional de Alemania, Inglaterra, Francia e Italia. Fuertemente apoyado por la Unión Europea (tuvo una inversión inicial de 13 millones de euros), se inició en octubre de 2005 y pretende generar en los próximos años líneas de células madre embrionarias murinas (cepa 129Sv) conteniendo mutaciones condicionales de al menos 20.000 genes. Una estrategia similar se puso en marcha en Canadá con el nombre de programa NORCOMM (Ringwald y col., 2011).

La secuenciación del genoma humano ha dado lugar a la generación de nuevas incógnitas y, con ello, nuevas expectativas sobre la función que se deriva de cada gen; es decir, de las proteínas que expresa directamente cada gen y de sus interacciones. Se desconoce la función de algo más de la mitad de todos los genes humanos identificados hasta la fecha (más de 13.000 genes). Para intentar conocer la funcionalidad de estos genes resulta esencialmente útil trabajar con organismos modelos. Dado que se conocen los genomas humano y de ratón (cepa C57BL/6), dado que el 99% de los genes humanos posee un gen homólogo en ratón, y que el desarrollo embrionario, la anatomía, fisiología y comportamiento están conservados entre ambas especies, mientras que la organización genómica, la estructura génica y sus mecanismos de expresión están estrechamente relacionados, resulta evidente que el ratón es el modelo ideal para estudiar la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

función de genes humanos y para estudiar la base genética de las enfermedades humanas. Por ello, esta estrategia de Genómica Funcional nos pareció que resultaba ideal para averiguar la función del gen *Gls2*, particularmente en cerebro, intentando descifrar algunas de las interrogantes con notable repercusión fisiológica que plantea la expresión de dos isoenzimas GA en cerebro y con distinta localización subcelular.

4.1 Tecnología del DNA recombinante

La tecnología del DNA recombinante ha supuesto un enorme avance en el estudio y la determinación de la función génica. Hoy en día se dispone de métodos eficaces para la incorporación de DNA exógeno a células animales, permitiendo modificar y regular la expresión de un gen concreto. Antes de que fuera posible transferir material génico a las células animales, la función de los genes se estudiaba observando los fenotipos particulares que resultaban al provocar mutaciones aleatorias mediante el empleo de radiaciones o sustancias químicas. Estas técnicas eran poco útiles y poco precisas para genomas diploides y, por ello, se han desarrollado otros métodos de mayor validez: tecnología antisentido, ribozimas, RNA de interferencia, técnicas de inmunología empleando anticuerpos específicos para un producto proteíco, y mucho más recientemente la tecnología de edición del genoma CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* asociado a la nucleasa Cas9). El uso de estas técnicas ha dado lugar a modelos determinados que han resultado muy útiles para entender la función de los genes, tanto a escala individual como colectiva.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Otra ventaja que supone la puesta en práctica de las técnicas de transferencia génica es que permite la modificación genética no sólo en ensayo *in vitro*, sino también *in vivo*. La capacidad de manipular el genoma de un animal ha permitido el desarrollo de nuevos modelos experimentales más fiables con los que investigar función y regulación génica. Los animales modificados genéticamente no sólo son aplicables a la investigación básica, también pueden emplearse como biorreactores para generar proteínas de alto valor, como mecanismos de prueba de nuevos fármacos y nuevas terapias o como fuentes de órganos para transplantes entre otras aplicaciones.

El genoma completo de un animal puede ser modificado siempre y cuando el DNA que se ha de introducir lo haga en células con capacidad de producir el animal completo. Esto quiere decir que el DNA ha de introducirse en células germinales, gametos o embriones antes del desarrollo de la línea germinal y en células ES (*embryonic stem*, madre embrionarias) derivadas de la masa celular interior del embrión en estado de blastocisto. La Tabla 2 resume los principales métodos para transformar la línea germinal.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 2. Transferencia genética en animales. Resumen de los principales métodos empleados para transformar la línea germinal.

Células diana	Método
Células germinales	Transfección de células germinales cultivadas (mamíferos) Inyección en el embrión en el lugar del desarrollo de la célula germinal (*Drosophila*)
Esperma	Inserción del DNA a las cabezas del esperma (mamíferos) Introducción del DNA en el núcleo de esperma descondensado (*Xenopus*)
Huevo/zigoto	Introducción en el citoplasma de la célula huevo (pájaros, anfibios, pescados, *C.elegans*) Inyección pronuclear (mamíferos) Transferencia retroviral (pájaros y mamíferos) Transferencia de DNA modificado al núcleo de células ES Electrofusión con células enucleadas que contienen modificación genética en mitocondria (transgénicos mitocondriales)
Blastocisto	Microinyección en el blastocele (mamíferos) Transferencia a células ES (ratón) Transferencia retroviral (mamíferos, pájaros)
Células ES (seguido de transferencia de célula a blastocisto o transferencia nuclear al zigoto)	Transfección → adición de transgén Transfección →*gene targeting* Transducción retroviral
Células somáticas (seguida de transferencia nuclear al zigoto)	Transfección → adición de transgén Transfección →*gene targeting* Transducción retroviral

La tecnología de transferencia génica a células animales permite adicionar secuencias exógenas de DNA previamente modificadas *in vitro*. Los genes modificados pueden aportar nuevas funciones (ganancia de función) a la célula una vez se han incorporado en su genoma. La modificación también puede ser una construcción génica que al integrarse en el genoma de la célula inhiba a genes endógenos (pérdida de función). Normalmente el mecanismo de integración se lleva a cabo por un proceso conocido como recombinación ilegítima, que se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

basa en la unión entre sí de extremos de fragmentos de DNA no homólogos y que implica un conjunto de proteínas que no muestran requerimientos específicos de secuencia. Otro mecanismo de recombinación ligeramente diferente al mencionado es el conocido como recombinación transposicional, donde las proteínas que median el proceso de integración (llamadas transposasas o integrasas) reconocen secuencias específicas en una de las partes que recombinan (el transposón o el genoma retroviral que porta el DNA foráneo). La secuencia del DNA receptor en el sitio de integración, sin embargo, es relativamente no específica. En ambos tipos de recombinación, la integración del DNA en el genoma del hospedador es un proceso más o menos al azar.

Cuando el objetivo concreto es modificar, reemplazar o destruir secuencias endógenas específicas con DNAs exógenos, se requiere llevar a cabo manipulaciones más precisas y se emplean las técnicas denominadas *gene targeting*. El *gene targeting* requiere formas alternativas de recombinación en las que tanto el donador como el receptor de las secuencias de DNA son definidos. Se han identificado dos mecanismos de recombinación que responden a estas características. El primero de ellos es la recombinación homóloga como proceso general, una forma de intercambio génico que ocurre en todas las células y que requiere dos moléculas de DNA con secuencias similares aunque no necesariamente idénticas. No se requieren secuencias de DNA específicas pero, al menos en células animales, se necesita que las secuencias sean de gran longitud para que el intercambio génico sea eficiente. La frecuencia de recombinación homóloga en células animales es generalmente muy baja en

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

comparación con la recombinación ilegítima (10^3-10^5 veces menor) y, por esta razón, se requieren estrategias de selección complicadas para identificar las células en las que el DNA exógeno se ha recombinado correctamente y no al azar. El otro mecanismo de recombinación homóloga empleado en *gene targeting* es la recombinación específica, en el que están implicadas proteínas que reconocen secuencias cortas y muy específicas de recombinación. A diferencia de la recombinación homóloga como proceso general, los diferentes organismos tienen sus propios sistemas de recombinación lugar específicos, aunque estos sistemas pueden ser importados a células animales, normalmente para el control preciso de los transgenes. En la Tabla 3 se indican las diferentes formas de recombinación que se utilizan en la manipulación genética de células animales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 3. Diferentes formas de recombinación empleadas para la manipulación genética de células animales.

Mecanismo	Forma de recombinación	Sitio dador	Sitio receptor	Aplicaciones principales
Ilegítima	General	No específico	No específico	Integración del transgén
Transposicional	Diferentes sistemas codificados por diferentes transposones y retroelementos	Específico (normalmente repeticiones directas o invertidas)	No específica, pero en muchos casos se requiere una secuencia consenso en el sitio receptor	Integración del elemento P Integración retroviral Integración insercional
Homóloga	General	No específico pero debe ser homólogo al lugar receptor	No específica pero debe ser homóloga al lugar dador	*Gene targeting* Inserción del transgén en algunos vectores virales
Lugar específica	Diferentes sistemas en diferentes organismos	Específica	Específica	Integración y escisión del transgén (In)activación condicional
In vitro	Se usa DNA ligasa purificada	Extremos romos o cohesivos compatibles	Extremos romos o cohesivos compatibles	Construcción de moléculas de DNA recombinantes

Otra técnica que explota los principios de recombinación homóloga es la nueva tecnología de edición génica llamada sistema CRISPR-Cas9, que mencionamos con anterioridad. Se trata de un sistema inmunológico adaptable usado por los microbios como autodefensa ante virus invasores a través de secuencias específicas de DNA. Esta tecnología permite la mutación de genes con eficacia, causando deleciones en la secuencia del gen diana e insertando nuevas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

secuencias por recombinación homóloga con un DNA molde reparador (Rath y col., 2015; Lander, 2016). Entre las aplicaciones desarrolladas a partir de este sistema se encuentra la de generación de modelos de animales con complejas enfermedades congénitas y distintos tipos de cáncer y el llevar a cabo una amplia búsqueda de genes esenciales en los distintos procesos biológicos (Lander, 2016). Esta tecnología empezó a ponerse a punto y a irse haciendo accesible comercialmente a investigadores posteriormente a la finalización de la presente tesis doctoral, aunque los modelos transgénicos usando el sistema CRISPR-Cas9 serían no condicionales y, por tanto, no se enmarcarían dentro de nuestro objetivo original. La principal diferencia con respecto a otras técnicas de recombinación homóloga es en la forma en que se eliminan las secuencias. En la Figura 6, tomada del artículo de Lander mencionado, se explica el mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 tipo II descrito en *Streptococcus thermophilus*.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

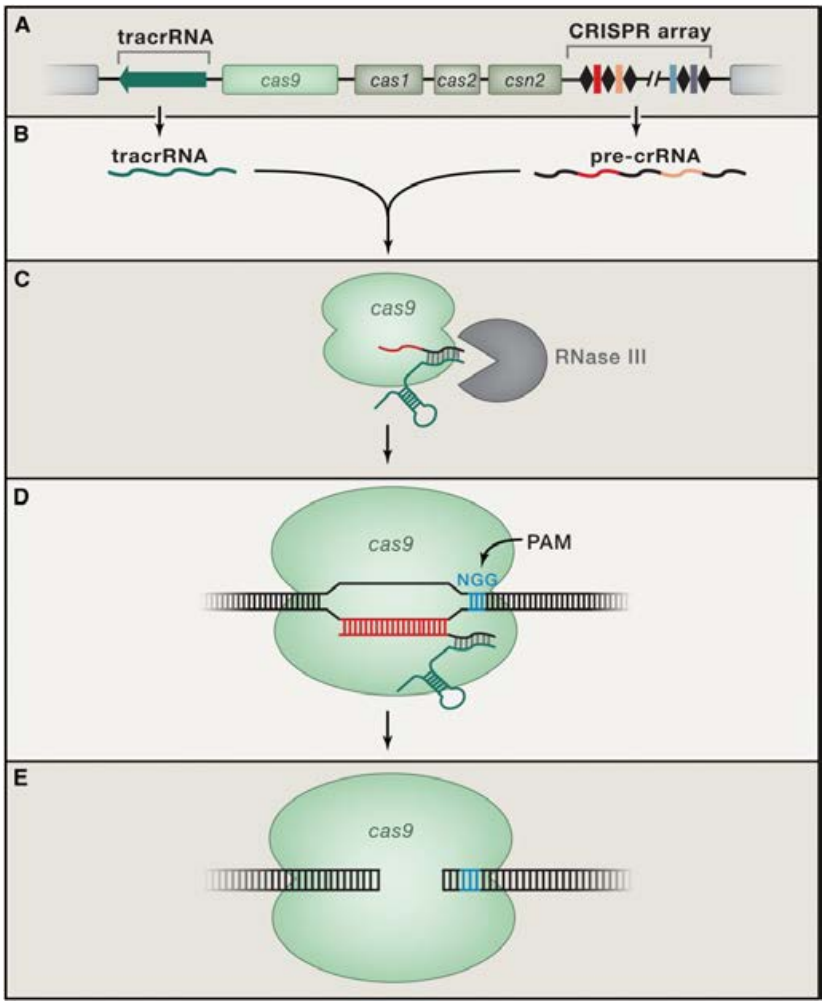


Figura 6. Esquema del sistema CRISPR-Cas9 (tipo II, descrito en *Streptococcus thermophilus*). **A**. Representación del sistema, donde se incluye la zona CRISPR *array*, secuencias de los cuatro genes codificantes *cas9*, *cas1*, *cas2* y *cns2* y la zona tracrRNA (esencial para la función de CRISPR y para que el complejo nucleasa Cas9 corte al DNA molde). La zona CRISPR array contiene regiones de repetición (rombos en negro) separadas por regiones espaciadoras (rectángulos a color) derivadas de un fago y de otros elementos genéticos invasores. El gen *cas9* codifica a la nucleasa que confiere inmunidad cortando el DNA invasor que se une a las zonas espaciadoras, mientras que los genes *cas1*, *cas2* y *cns2* codifican para las proteínas cuya función es la adquisición de nuevas regiones espaciadoras procedentes del DNA invasor. **B.** Las zonas de CRISPR array y tracrRNA se transcriben, dando lugar a una larga secuencia de pre-crRNA y tracrRNA. **C.** Estas dos secuencias de RNA hibridan con secuencias complementarias y son procesadas a formas más cortas mediante Cas9 y RNasa III. **D.** El complejo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

resultante (Cas9 + tracRNA + crRNA) comienza a buscar a las secuencias de DNA que se unen a las secuencias espaciadoras (mostrada en rojo). La unión al sitio específico también requiere la presencia de un motivo adyacente pro-espaciador (PAM), que funciona como sustento molecular para que Cas9 se enganche. **E.** Una vez que Cas9 se une al sitio diana, que empalma entre el crRNA y el DNA molde, corta al DNA molde tres bases cadena arriba del sitio PAM. Cas9 contiene dos dominios endonucleasa, HNH y RUvC, que cortan, respectivamente, las hebras complementaria y no complementaria del DNA molde, originando extremos romos.

Cualquier célula de mamífero podría ser objeto de recombinación homóloga, aunque la eficiencia en general es muy baja y la mayoría de los experimentos publicados hasta la fecha se han llevado a cabo empleando células ES de ratón únicamente. Además, hasta muy recientemente también los ratones eran los únicos animales que podían ser manipulados genéticamente mediante recombinación homóloga. Otra característica que reúnen las células ES de ratón es su relativa facilidad para ser transfectadas por electroporación o lipofección.

El *gene targeting* puede realizarse para lograr diferentes objetivos (véase la Tabla 4), pero en todos los casos los vectores usados para introducir DNA exógeno comparten un conjunto de propiedades comunes. Estos vectores son plásmidos especializados que promueven recombinación homóloga cuando son introducidos en células ES o de otro tipo. Para conseguirlo, se le introducen al vector regiones de homología con el gen diana, permitiendo así el apareamiento con el gen endógeno. El tamaño de la región de homología y el nivel de identidad de las secuencias juegan un papel importantísimo en la eficiencia del *gene targeting*.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 4. Diferentes estrategias de *gene targeting*. El *gene targeting* por recombinación homóloga puede usarse para alcanzar diferentes objetivos.

Estrategia de *targeting*	Explicación
Gene Knockout	Interrupción o deleción de un gen endógeno. La interrupción puede alcanzarse por *targeted insertion* de un gen marcador (p.e *neo*) en un sólo paso. La deleción requiere dos eventos de *targeting* secuenciales. En muchos casos no es necesario la deleción del gen completo, quitar un simple exón puede ser suficiente.
Reemplazamiento de alelo	Introducción de un alelo de reemplazamiento en un gen endógeno. Normalmente se distingue del knockout en que el alelo de reemplazamiento es una variación sutil más que un alelo nulo (p.e una mutación puntual). El procedimiento siempre requiere dos pasos : dos procesos de recombinación homóloga, o bien uno de recombinación homóloga y uno de recombinación lugar específica.
Reparación de genes	Una forma de reemplazamiento de alelo donde un alelo mutante disfuncional es reemplazado por un alelo funcional. Requiere dos eventos de *targeting* secuenciales.
Targeted insertion	Un método para la inserción de un transgén en un lugar específico sin la necesidad de interrumpir ningún gen endógeno. Requiere un solo evento de targeting.
Gene Knockin	Reemplazamiento de un gen endógeno por otra secuencia no alelo. Se usa, por ejemplo, para expresar un gen usando el complementario completo de elementos de regulación endógenos, en el contexto genómico correcto, de otro.
Gene Knockdown	Cualquier estrategia para reducir la expresión de un gen endógeno. Puede o no estar basado en *gene targeting*.

Muchos de los experimentos de *gene targeting* se han diseñado para destruir genes endógenos. Normalmente se requiere la inserción de una gran casete dentro de un exón esencial, interrumpiendo su expresión y dando lugar así a alelos nulos. Esta estrategia se conoce como *gene knockout* y para llevarla a cabo pueden utilizarse dos tipos de vectores: vectores de inserción y vectores de reemplazamiento (véanse las Figuras 7 y 8).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

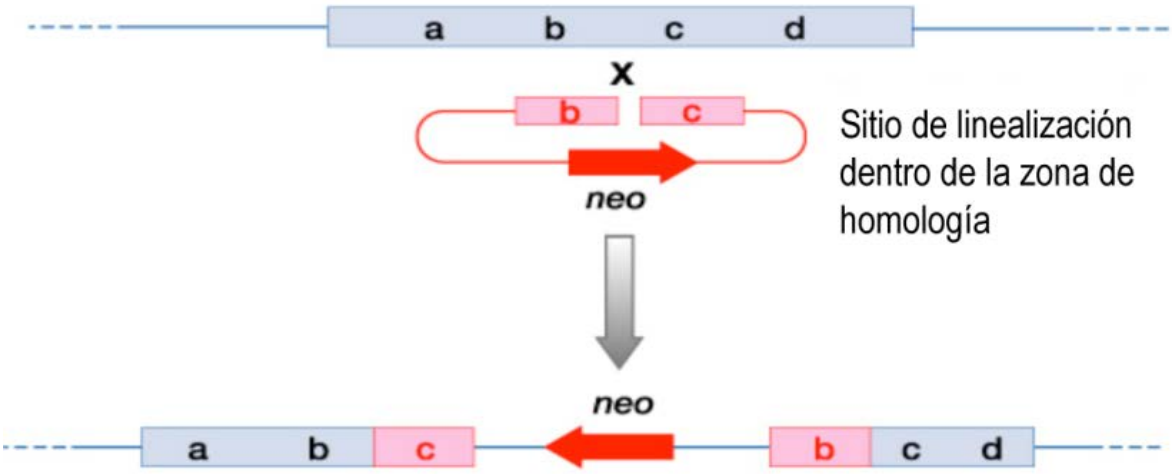


Figura 7. Esquema explicativo del método *gene knockout* empleando un vector de inserción. El vector de DNA introducido se corta en un solo sitio en la secuencia que es relativamente análogo, o bien idéntico, a parte de la secuencia del gen endógeno diana. La recombinación homóloga puede ocurrir (x) con la secuencia completa del vector (incluyendo el gen marcador *neo*, que le confiere resistencia al antibiótico G418) dentro de la localización deseada. Sin embargo, esta estrategia de selección no permite eventos de *targeting* para diferenciarse de la integración aleatoria; por lo que requiere un análisis posterior, por ejemplo, mediante PCR.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

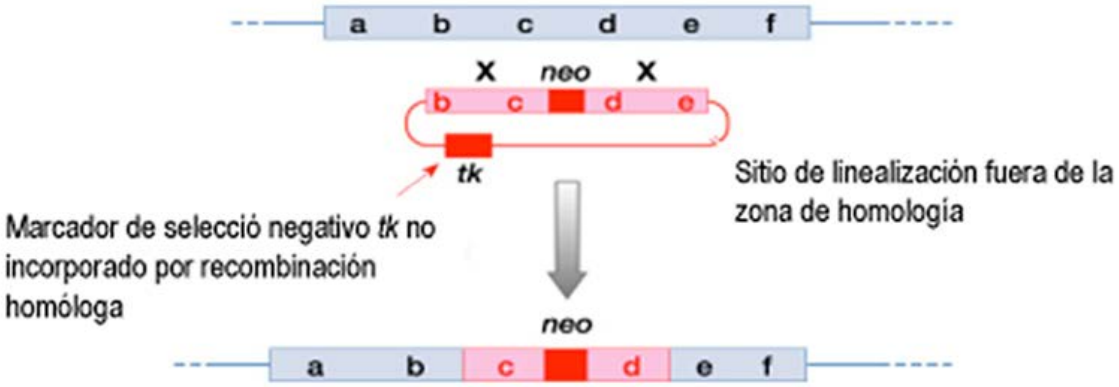


Figura 8. Esquema explicativo del método *gene knockout* empleando un vector de reemplazamiento. En este caso el gen *neo* está incluído entre las secuencias de homología del gen endógeno y el vector se corta en un sitio único fuera de la región de homología. Se produce una doble recombinación (x x) que da lugar a un reemplazamiento de las secuencias internas del gen por las secuencias homólogas que están en el vector, incluido el gen *neo*. Nótese que con el vector de reemplazamiento se puede incluir un marcador de selección negativo (como puede ser *tk,*timidilato quinasa) que se sitúa fuera de la región de homología y que permite seleccionar ante los eventos de recombinación aleatoria. Al no estar *tk* incluida en la región de homología, se podrán seleccionar las células en las que la recombinación haya sido homóloga directamente: células resistentes a G418 y no sensibles a la concentración de ganciclovir.

Para seleccionar los eventos en los que realmente se haya producido *gene targeting* se pueden emplear marcadores selectivos o discriminación mediante PCR. Para los vectores de inserción, la posición de los marcadores de selección es poco importante, todo el vector se integra en el genoma. En los vectores de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

reemplazamiento, sin embargo, es importante que el marcador de selección positiva (como el gen *neo*) esté incluido dentro de la región de homología y el marcador de selección negativa (como pueden ser los genes HSV*tk* o *dta*) ha de situarse fuera de la región de homología puesto que solo parte del vector se integrará.

El marcador *neo*, que permite seleccionar las células transformadas en presencia del antibiótico G418, es uno de los más utilizados. Un solo marcador, no obstante, no es suficiente para discriminar entre las células en las que la recombinación ha sido homóloga y aquellas en las que la construcción se ha integrado al azar. Empleando vectores de reemplazamiento es posible eludir esta dificultad mediante la selección positiva/negativa. En este caso, según los ejemplos explicados, *neo* se emplearía como marcador positivo y como marcadores negativos contraseleccionables se podrían emplear el gen HSV *tk* (timidilato quinasa) o el gen de la toxina de la difteria *dta*. El marcador neo interrumpe la región de homología y, como ocurre en un vector estándar, permite a las células ser seleccionadas en presencia de un antibiótico, G418 para neo. El selector negativo se sitúa fuera de la región de homología, de modo que no se integra en el genoma cuando la recombinación es homóloga y sí en el caso de que sea ilegítima. Las células que han sufrido recombinación homóloga podrán sobrevivir en presencia de análogos tóxicos de timidina (para el gen HSV *tk*) como el ganciclovir o el FIAU (1-(2-desoxi-2-fluo-(β-D-arabinofuranosil))-5-iodouracilo), que son incorporados en el DNA produciendo la muerte de la célula en el caso en que la célula exprese un gen *tk* funcional. Si se utiliza como selector negativo el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

gen *dta*, no es necesaria la adición de un análogo tóxico, ya que las células en las que se haya integrado este gen liberaran directamente la toxina de la difteria y provocarán la muerte celular.

5. *Gene targeting* en ratón

La transfección de las células ES y su subsecuente incorporación en un blastocisto hospedador da lugar a animales quiméricos que en muchos casos transmiten los transgenes a la línea germinal. La combinación de este método con el *gene targeting* en células ES permite producir ratones que portan una información genética adicional, así como ratones con mutaciones específicas en genes endógenos preseleccionados. El procedimiento general se resume en la Figura 9.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

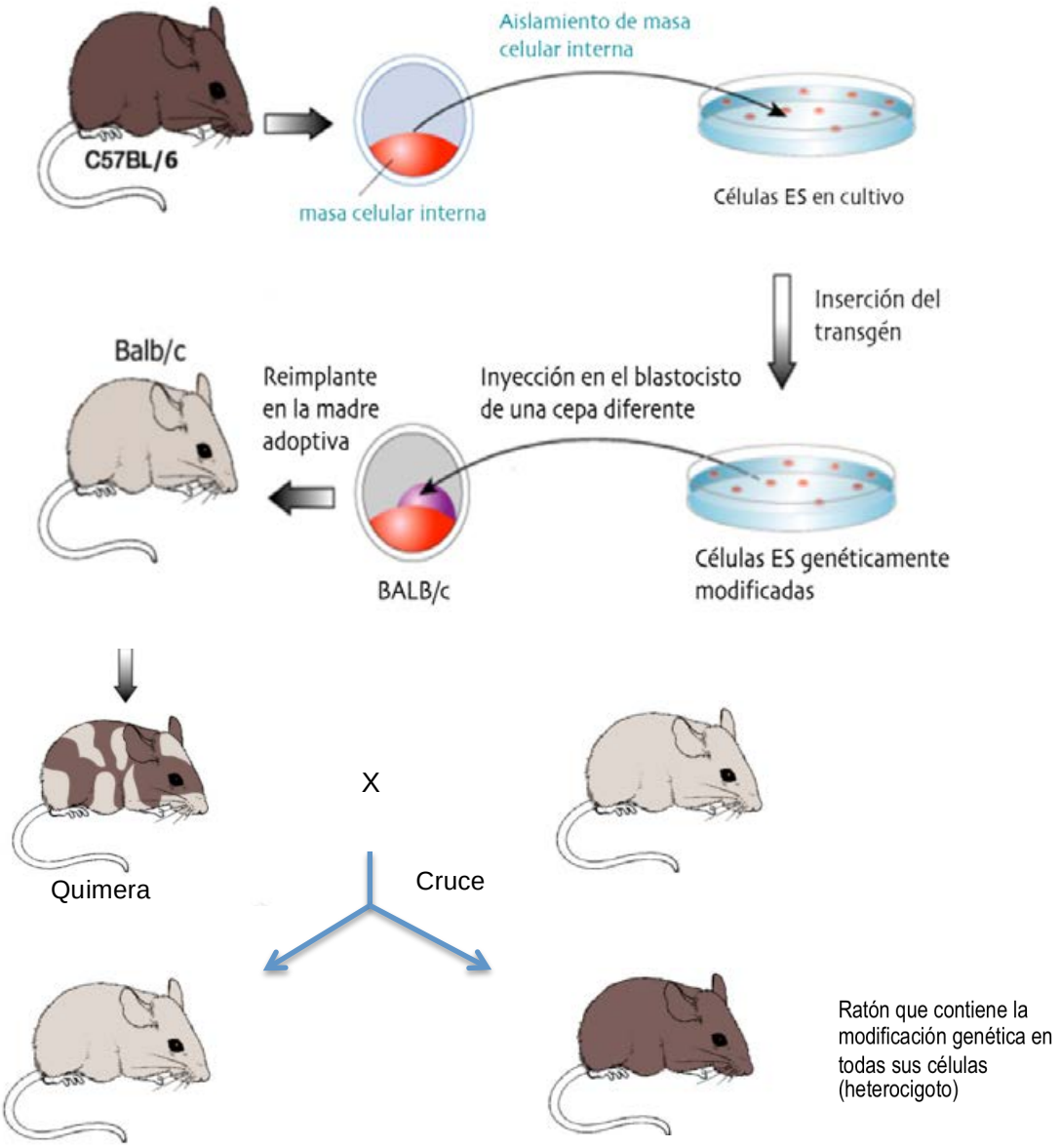


Figura 9. Esquema del procedimiento para la generación de un ratón *knockout* mediante *gene targeting* en células ES.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

En este ejemplo, el interés es eliminar un gen endógeno del genoma del ratón dando lugar a un ratón *knockout*. El evento de deleción se crea mediante *gene targeting* en una población de células ES, seguido de la selección y validación de los eventos de *targeting*.

Tradicionalmente, el *targeting* en ratón se ha llevado a cabo en un contexto de células que procedían de la cepa 129Sv. Actualmente se emplea tanto la estirpe 129Sv como la C57BL/6, ya que ésta última es la estirpe de ratón cuyo genoma se ha secuenciado en su totalidad, lo que permite obtener la información necesaria en cualquier base de datos genómica (Skarnes y col., 2011). En el caso que nos ocupa, las células ES de las que disponemos son de la estirpe C57BL/6 y poseen un color de pelaje negro dominante. Estas células se introducen en blastocistos de cepas BALB/c, que tienen un color de pelaje blanco recesivo. La combinación de estirpes genéticas mencionadas (células ES C57BL/6 inyectadas en blastocistos de estirpe BALB/c) ha demostrado previamente una alta probabilidad de transmisión de la modificación genética a la línea germinal (Lemckert y col., 1997). Los blastocistos son implantados en hembras pseudopreñadas y se les permite llegar a término. Los animales resultantes son quimeras (contienen sectores de tejidos derivados de células ES diferentes) y se identifican por el color de pelo. Posteriormente machos quimeras se cruzan con hembras BALB/c, dando así lugar a una descendencia con pelaje negro o blanco. Las crías que nacen con pelaje negro derivan completamente de tejidos procedentes de la línea germinal que portaban la modificación genética. Si la modificación reside en un locus situado en cualquier sitio que no sea el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

cromosoma X o el Y, la primera generación debe cruzarse entre sí para producir un ratón que sea homocigoto para la mutación.

Una de las principales desventajas del *gene targeting*, es que el gen diana se modifica en la línea germinal, por lo que todas las células se ven afectadas de la misma forma a lo largo de todas las etapas desde el desarrollo a la madurez y, en muchas ocasiones, da lugar a alelos nulos. En estos casos se recurre a introducir casetes transgénicos que permiten la eliminación a voluntad de determinados exones o elementos seleccionados al ser marcados a ambos lados con secuencias para el reconocimiento de recombinasas lugar específicas. Se consigue de esta forma la producción de mutantes condicionales (*conditional knockouts*) en los que un gen endógeno es inactivado específicamente en ciertos tipos celulares o en una etapa particular del desarrollo.

La recombinación lugar específica es un tipo de recombinación homóloga que depende del reconocimiento de secuencias de DNA cortas y específicas y en que es un proceso natural que sólo tiene lugar en ciertos organismos. En términos de transferencia génica práctica, esto quiere decir que los lugares diana para la recombinación lugar específica se pueden introducir en transgenes sin causar grandes disrupciones en las construcciones génicas. Además, si se pretende conseguir la recombinación en un sistema heterólogo, es necesario suministrar una fuente de recombinasa. La recombinación lugar específica como herramienta para la manipulación genética requiere entonces el suministro por parte del experimentador de la enzima recombinasa en una base condicional.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Se han identificado diferentes sistemas de recombinación lugar específicos y algunos de ellos se han estudiado en gran detalle. Los sistemas más útiles para la transferencia génica en animales son la Cre recombinasa del bacterófago P1 (Figura 10) y la FLP recombinasa (flipasa) de *Saccraromyces cerevisiae*. Se ha comprobado que ambos funcionan en muchos sistemas heterólogos eucariotas incluyendo células de mamífero y animales transgénicos. Ambas enzimas, Cre y FLP reconocen lugares con 34 pb (llamados lugares *loxP* y *FRP*, respectivamente) que contienen un par de repeticiones invertidas de 13 pb alrededor de un elemento central de 8 pb. La Cre recombinasa ha sido más ampliamente utilizada en sistemas de mamífero debido a que su temperatura óptima es de 37ºC. La temperatura óptima de FLP es de 30ºC y su uso es habitual en Drosophila.

Una de las aplicaciones de las deleciones mediadas por Cre es la eliminación de secuencias indeseables, como por ejemplo, marcadores génicos seleccionables después de los ensayos de transformación. También es común el diseño de vectores de *targeting* en los que los lugares *loxP* se introducen en el interior de genes endógenos flanqueando exones esenciales. Se dice entonces que los genes han sido *floxed*. La Cre recombinasa en estos casos suministrada de forma tejido específica es dependiente de una etapa concreta del desarrollo o de un promotor inducible, causando que el segmento génico definido por los lugares *loxP* sea delecionado sólo en células concretas o en etapas del desarrollo definidas por el investigador.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

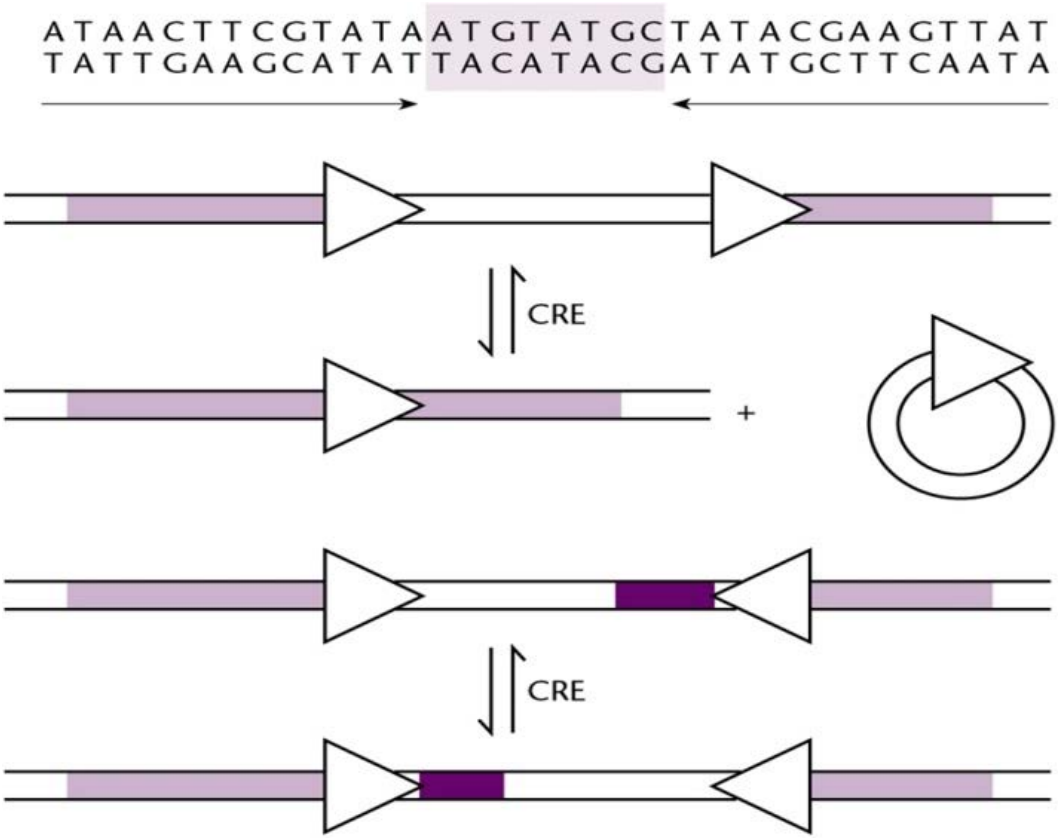


Figura 10. Estructura de los lugares *loxP* y reacción catalizada por la Cre recombinasa. Si ambos sitios *loxP* se encuentran orientados en el mismo sentido, la recombinasa Cre cataliza la escisión de la secuencia que se encuentra entre los dos sitios loxP y la libera en forma de círculo, que se degrada rápidamente. Cuando ambos sitios loxP flanqueantes a un fragmento de DNA están orientados en sentidos opuestos, el fragmento de DNA en concreto invierte su secuencia como efecto de la acción de la recombinasa.

Una estrategia muy utilizada es usar dos líneas transgénicas separadas, una que exprese Cre recombinasa de una forma regulada y otra conteniendo el gen diana que ha sido *floxed*. El cruce de ambas líneas podrá en contacto al gen

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cre y su diana juntos en el mismo ratón y en el momento en que Cre se active se producirá el evento de deleción en las células apropiadas. Ratones transgénicos que expresan Cre controlada por diferentes promotores son comerciales, lo que permite que la manipulación del *gene targeting* o del transgén de manera espacial y temporal. De igual forma animales transgénicos para Cre pueden emplearse para activar o inhibir condicionalmente transgenes o generar modificaciones cromosómicas condicionales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

De acuerdo con los antecedentes expuestos en la introducción, es patente que averiguar el patrón de expresión de isoenzimas GA en mamíferos es esencial para entender las nuevas funciones que estas proteínas pueden desempeñar. En cerebro, por ejemplo, la función de la(s) isoenzima(s) GLS2, expresada(s) en localizaciones subcelulares distintas a la mitocondria, es desconocida, por lo que un modelo transgénico nulo para el gen *Gls2* podría ser una herramienta fundamental para elucidar la función cerebral de esta(s) isoenzima(s). Por otra parte, los mecanismos moleculares que controlan la transcripción son esenciales para comprender la expresión tejido-específica de GA y su alteración en condiciones patológicas, como el cáncer y enfermedades neurológicas.

A la vista de estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos en esta Memoria:

1) DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE CASETES TRANSGÉNICAS PARA EL GEN *Gls2* DE RATÓN.

2) GENERACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS NULOS CONDICIONALES PARA *Gls2*.

3) ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *Gls2* EN MAMÍFEROS.

4) CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRANSCRITOS GLS2 ALTERNATIVOS EN CEREBRO E HÍGADO.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Materiales y Métodos

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Cultivo, transformación y almacenamiento de cepas de *Escherichia coli*

1.1 Plásmidos y cepas de *E. coli* empleados para su propagación

En esta memoria se han empleado tres cepas de *E. coli* : Mach1^{TM}- T1^{R} , DH5α y ElectroMAX^{TM} DH10B las cuales fueron adquiridas de la casa comercial Thermo Fisher Scientific. Se emplearon asimismo los plásmidos pCR®-XL-TOPO (Invitrogene), pGEM®-T Easy Vector (Promega) y pGKNeoF2L2DTA (Addgene). Para la propagación del plásmido pCR®-XL-TOPO se usó la cepa Mach1^{TM}- T1^{R} . Para la propagación de construcciones realizadas en pGEM®-T Easy Vector se utilizaron las células DH5α. Finalmente, la cepa ElectroMAX^{TM} DH10B se empleó para la propagación del plásmido pGKNeoF2L2DTA y las construcciones derivadas del mismo.

1.2 Obtención de cepas de *E. coli* competentes

Para la obtención de células bacterianas competentes se tomó una colonia única de la cepa adecuada y se dejó crecer en medio LB (ver Apéndice) durante toda la noche, con agitación (250 rpm) y aireación a 37ºC. A la mañana siguiente, cuando el cultivo presentaba una absorbancia a 600 nm (DO_{600}) entre 1,2 y 1,4 unidades, se inocularon 200 µl del mismo en 50 ml de medio LB. Este nuevo cultivo se dejó crecer durante tres horas con agitación (250 rpm), de manera que alcanzase la fase de crecimiento logarítmica (DO_{600} entre 0,4 y 0,6). El cultivo se centrifugó después a 2500 g, a 4ºC durante 5 min. Tras retirar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 15 ml de $MgCl_2$ 100 mM a 4ºC. A continuación, se realizó una centrifugación en las

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

mismas condiciones anteriores, tras la cual, se resuspendieron en 15 ml de $CaCl_2$ 100 mM a 4ºC, dejándose posteriormente en hielo durante 30 min. Tras volver a centrifugar, las bacterias se resuspendieron en 3 ml de una disolución de $CaCl_2$ 100 mM y se añadió glicerol al 15% (v/v). Las células competentes se distribuyeron en alícuotas de 100 µl y se mantuvieron a –80ºC hasta su uso.

1.3 Transformación de cepas de *E. coli* con plásmidos o mezclas de ligación

Se incubaron 100 µl de células competentes con 10-50 ng del plásmido o la mitad del volumen de la mezcla de ligación de interés. La mezcla se dejó en hielo durante 30 min y posteriormente se sometió a un choque térmico a 42ºC durante 2 min. Después, se añadió 1 ml de medio LB y se incubó durante 45-50 min a 37ºC con agitación leve. A continuación, se sembraron alícuotas de 100 µl en placas LB-ampicilina. El resto de las células que permanecían en el tubo fueron centrifugadas durante 1 min a 13000 rpm (centrífuga Biofuge pico, Heraeus), resuspendidas en un volumen de 100 µl de su propio sobrenadante y también fueron sembradas en las placas de LB-ampicilina. Solo las bacterias transformadas aparecen formando colonias, ya que al adquirir los plásmidos, poseen resistencia al antibiótico empleado en el medio de cultivo, mientras que las no transformadas no consiguen crecer. Todos los plásmidos utilizados en este trabajo portaban un gen de resistencia a kanamicina o ampicilina.

Para las células competentes Mach1^{TM}- T1^{R}, usadas con el plásmido pCR®-XL-TOPO , se empleó la mezcla de ligación completa, la cual se añadió

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

junto a 100 µl de las células competentes, dejándose el conjunto en hielo durante 30 min. Después de la incubación en hielo las células se sometieron a un choque térmico (2 min a 42ºC), se le añadieron 250 ml de medio SOC (ver Apéndice) y se incubó durante 60 min a 37ºC con agitación leve. A continuación se sembraron en placas de LB-kanamicina del mismo modo que con el resto de las transformaciones.

Las células ElectroMAX™ DH10B se transformaron por electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un equipo Gene Pulser Xcell™ de Bio-Rad. Se utilizaron volúmenes de 1 a 3 µl de mezcla de ligación, conteniendo la cantidad apropiada de DNA (entre 50 y 100 ng de vector). El volumen utilizado se mezcló con 40µl de células competentes ElectroMAX™ DH10B, previamente descongeladas en hielo, y se dispuso en cubetas de 0.2 cm (enfriadas en hielo) aptas para el electroporador. Se aplicaron pulsos de diferentes voltajes comprendidos entre 2.5 y 3 KV, con una capacidad de 25 µF y una resistencia de 200 Ω, y comprobando que la constante de tiempo fuera siempre aproximada a 5 ms. Inmediatamente después del pulso eléctrico, la mezcla de cada cubeta se añadió a 1 ml de medio SOC en un tubo de propileno de 17x100 mm y se incubó durante 1 hora a 37ºC con agitación leve. A continuación se sembraron en placas de LB-ampicilina al igual que con el resto de transformaciones.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1.4 Cultivo y almacenamiento de cepas de *E. coli* transformadas

Para la obtención de cultivos en medio líquido, se tomó una colonia aislada de las placas de LB-agar-antibiótico y se dejó crecer en 5 ml de medio

LB con el antibiótico correspondiente (ampicilina o kanamicina) a una concentración de 50 µg/ml durante toda la noche a 37ºC y en agitación (250 rpm). El almacenamiento y conservación de las células se llevó a cabo a –80ºC añadiendo un 15% (v/v) de glicerol a los cultivos líquidos.

2. Aislamiento y purificación de DNA

2.1 Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos a pequeña escala

Para el aislamiento y purificación de plásmidos a pequeña escala se utilizó el kit comercial Wizard Minipreps (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Mediante la medida de la absorbancia a 260 nm, se estimó un rendimiento de 15-25 µg de DNA/5 ml de cultivo, para plásmidos de alto número de copias.

2.2 Aislamiento y purificación de DNA de plásmidos y bácmidos a mediana y gran escala

Para aislar DNA de bácmidos o mayores cantidades de DNA plasmídico que las descritas anteriormente, se utilizó el sistema PureLink™ Hipare Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogene), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El rendimiento fue de 70-100 µg para 50 ml de cultivo con plásmidos de alto número de copias. En esta memoria hemos utilizado el bácmido BAC RP23, que contiene la secuencia del gen *Gls2* de ratón (véase apartado de Resultados). Partiendo de 100 ml de cultivo de BAC RP23, empleando el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

método de aislamiento comentado anteriormente, se obtuvo un rendimiento de 50-100 µg. Alternativamente, para el aislamiento de DNA bacmídico libre de genómico se utilizó el kit Qiagen ® Large Construct, con el que se obtuvo un rendimiento de 25-50 µg partiendo de 500 ml de cultivo.

3. Manipulación enzimática de DNA

3.1 Digestión de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción

Para la digestión de DNA de plásmidos y bácmidos con enzimas de restricción, la cantidad empleada por reacción osciló entre 1 y 10 µg. Al volumen de muestra se añadió 1/10 del volumen final de reacción del tampón adecuado para cada enzima, a partir de una disolución 10×. Se utilizaron entre 1 y 2.5 U de actividad enzimática por cada µg de DNA a digerir. La incubación se realizó durante 2 h a 37º C.

3.2. Subclonación de fragmentos de DNA en plásmidos

Para subclonar los insertos digeridos con enzimas de restricción en los vectores se empleó la enzima T4 DNA ligasa (Promega). El volumen de reacción se mantuvo entre 10 y 20 µl y se incubó a 4ºC durante toda la noche. Para asegurarnos de la efectividad del proceso de ligación, habitualmente se emplearon distintas relaciones molares de inserto:plásmido (1:3, 1:1 3:1, 1:10 y 10:1). La cantidad de vector usada por ligación fue de 50 o 100 ng y, en función del tamaño del inserto a ligar, se efectuaron los cálculos correspondientes para obtener las distintas relaciones molares.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Para la clonar los fragmentos obtenidos a partir del clon BAC RP23 mediante PCR, se utilizaron los sistemas pGEM®-T Easy Vector (Promega) (Figura 1) y pCR®-XL-TOPO (Thermo Fisher Scientific). El vector pGEM®-T Easy Vector se encuentra en forma abierta mediante digestión con *EcoR*V y posee extremos 3´-T protuberantes, lo que facilita la eficiencia de unión de los fragmentos de PCR subclonados en él. Además, también posee un gen de resistencia a ampicilina que permite su selección en bacterias, y secuencias específicas del fago M13 donde pueden unirse cebadores específicos (universal y reverso) que facilitan la secuenciación de los insertos introducidos en él.

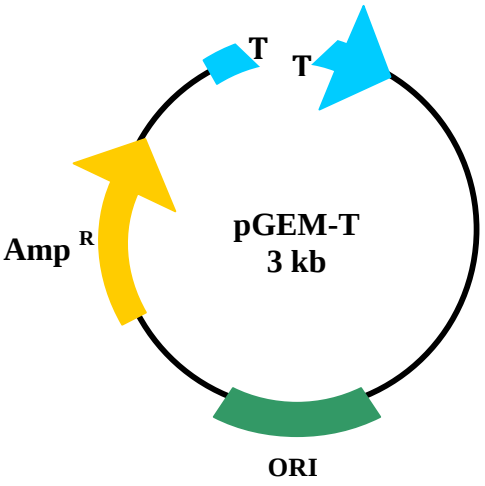


Figura 1: Mapa simplicado del vector pGEMT

Una vez clonados, los insertos se secuenciaron utilizando el cebador M13. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de la UMA (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación, Universidad de Málaga).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

El sistema “TOPO® Cloning Reaction” utiliza la reacción que se describe a continuación para clonar productos de PCR con gran eficiencia.

Además de encontrarse en forma lineal con extremos 3´-T protuberantes, el plásmido pCR®-XL-TOPO está asociado a moléculas de topoisomerasa del virus *Vaccinia* covalentemente unida que ayuda a la ligación de productos de PCR difíciles de clonar, como son los fragmentos de gran tamaño procedentes de amplificaciones mediante la técnica de *Long PCR*. La topoisomerasa I del virus *Vaccinia* se une al DNA de doble hebra en sitios específicos y rompe el enlace fosfodiéster después de la secuencia 5´-CCCTT en una de las hebras (Shuman, 1991). La energía del enlace roto se conserva por la formación de un enlace covalente entre el fosfato del extremo 3´ de la hebra que ha sido cortada y el residuo tirosilo de la Tyr-274 de la topoisomerasa I. El enlace fosfo-tirosilo formado por la enzima topoisomerasa y el DNA puede ser atacado por el extremo 5´-hidroxilo de la hebra original cortada, dando lugar a la liberación de la topoisomerasa (Shuman, 1994) (Figura 2).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

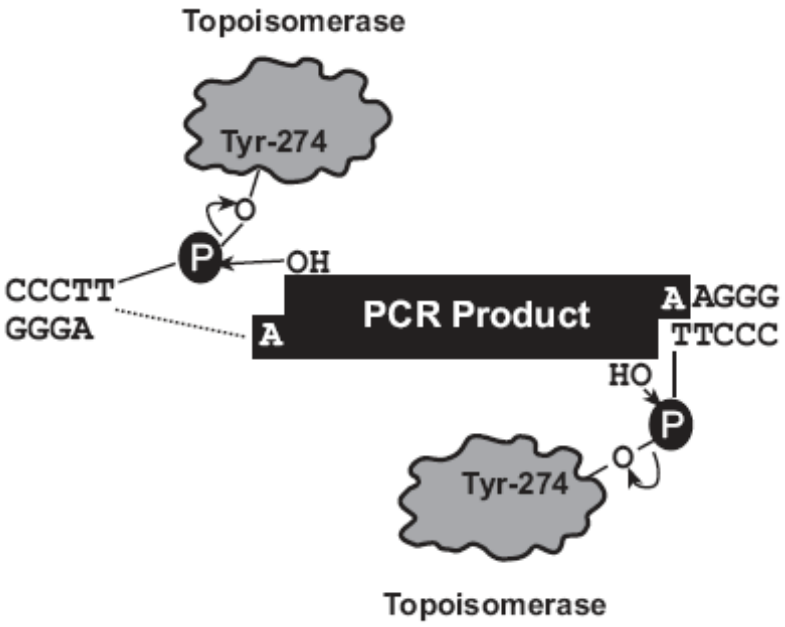


Figura 2. Esquema de la reacción de la topoisomerasa I con el DNA producto de PCR.

Los productos clonados en el vector pCR®-XL-TOPO fueron secuenciados usando los cebadores M13, que proporciona el fabricante junto con el vector en el Servicio de Secuenciación de la UMA.

Las subclonaciones de insertos en el vector pGKNeoF2L2DTA (véase apartado de Resultados) se realizaron después de que éste fuera desfosforilado. Tras la digestión del plásmido con la enzima de restricción adecuada, se comprobó su completa digestión mediante análisis electroforético de una alícuota del mismo. Después se incubó durante 60 min a 37ºC con fosfatasa alcalina (Roche) en cantidad proporcional al plásmido digerido, con tampón adecuado a la fosfatasa (proporcionado por el fabricante) y añadiendo agua hasta un volumen total de 100 µl. Tras la incubación, se paró la reacción con 2 µl de EDTA 0.5 M. Posteriormente, se añadió 1 µl de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml. Después de una incubación de 30 min a 56ºC, se

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

extrajo la mezcla con 1 vol de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló vigorosamente utilizando el vortex durante 1 min y se centrifugó a 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) durante 2 min. Separada la fase acuosa, se procedió a una segunda extracción con 1 vol de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1; v/v), siguiendo las mismas pautas que en la extracción anterior. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se le añadió 0.1 vol de acetato sódico 3 M (pH 7). Se mezcló y se añadieron 2 vol de alcohol absoluto, dejando la mezcla a -80ºC durante al menos 30 min. Una vez precipitado el DNA, se centrifugó la mezcla a 13000 rpm y a 4ºC durante 10 min. Cuidadosamente, después se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70% frío. Tras centrifugar de nuevo a 13000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Una vez estuvo seco éste, se resuspendió en 10-20 µl de H_2O estéril.

4. Cuantificación de DNA

El DNA plasmídico aislado a partir de bacterias se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm. El rango de medida es lineal entre 0.05 y 1 U de absorbancia. Una unidad (U) de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble hebra. El cociente entre las absorbancias medidas a 260 nm y 280 nm, respectivamente, se empleó para analizar la pureza de la preparación. Se consideró una preparación de buena pureza aquella en la que el cociente $260/280$ estuvo comprendido entre 1.7 y 1.9.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5. Electroforesis de DNA de plásmidos, bácmidos y fragmentos de DNA obtenidos por PCR

Tanto para el análisis de plásmidos, como del clon BAC RP23 y de los fragmentos obtenidos mediante PCR, se utilizaron geles de agarosa al 0,8% (p/v). El tampón utilizado en la preparación del gel fue TAE (ver Apéndice). La agarosa se fundió en el tampón calentando la mezcla en un microondas. Posteriormente, se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50ºC y se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml. La mezcla resultante se vertió sobre la cubeta de electroforesis, y se dejó enfriar.

La cantidad de DNA por pocillo fue de 1 µg aprox. A cada muestra se le añadió tampón de carga Orange G 10X (ver Apéndice), antes de ser cargadas en los geles. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 60 V durante los 15 primeros min, y se aumentó entonces a 90-100 V hasta obtener la correcta resolución de las bandas.

Las bandas se analizaron con el sistema de documentación de geles Gel Doc XR (Bio-Rad) equipado con transiluminador capaz de excitar fluoróforos a 254, 302 y 365 nm, incluyendo bromuro de etidio. El sistema está controlado por el programa Quantity One (Bio-Rad).

Como marcadores de masa molecular se utilizó λDNA digerido con *Hind*III (Sigma), así como un marcador de DNA de doble hebra de 50-500 pb de Sigma.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5.1 Purificación de insertos de DNA separados en geles de agarosa

El gel de agarosa se situó sobre el transiluminador UV del sistema Gel Doc XR y las bandas de interés se cortaron con una hoja de bisturí. Calculada la masa de los tacos de agarosa, el DNA se extrajo empleando el sistema GeneClean® Turbo (MP Biomedicals), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR se purificaron directamente en solución utilizando el sistema GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6. Amplificación de fragmentos de DNA mediante *Long PCR*

Se llevaron a cabo reacciones de PCR empleando la técnica de *Long PCR* para la obtención de fragmentos del gen *Gls2* a partir del clon BAC RP23. La amplificación de DNA mediante *Long PCR* permite la obtención de productos de mayor tamaño a los que se pueden conseguir mediante PCR tradicional. El método requiere un mezcla de DNA polimerasas termoestables, una de las cuales posee alta procesividad (normalmente *Taq* DNA polimerasa), es decir, elevada actividad 5'-3' polimerasa sin disociarse de la hebra molde; y la otra proporciona actividad correctora.

En nuestro caso, empleamos la enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogene). Esta enzima está compuesta por una mezcla de *Taq* DNA polimerasa recombinante y polimerasa *Pyrococcus species* GB-D, que poseen respectivamente las características anteriormente mencionadas, y un anticuerpo Platinum® *Taq* Antibody. La mezcla de las polimerasas aumenta la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

fidelidad y permite la amplificación de un amplio rango de tamaños de secuencias de DNA. El anticuerpo inhibe la actividad polimerasa a temperatura ambiente y se libera después del paso inicial de desnaturalización, recuperando entonces la actividad polimerasa y permitiendo aumentar la especificidad de la reacción.

La mezcla de reacción típica se realizó en un volumen total de 50 µl, empleándose las siguientes concentraciones finales de reactivos: tampón de PCR de alta fidelidad a 1X (procedente del stock 10X: Tris-SO_4^{2-} 600 mM, pH 8.9, y sulfato de amonio 180 mM), mezcla de los 4 desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Roche) 0.2 mM, sulfato de magnesio 0.4 mM, cebadores específicos directo y reverso (0.2 µM cada uno de ellos), 1 U de enzima *Platinum* ® *Taq*, ácido L-Poliglutámico (Sigma) 0.2 mg/ml, y DNA molde a distintas concentraciones según ensayo a realizar (entre 0.13 y 130 µM). En el caso de amplificaciones de zonas más complicadas, con estructuras secundarias difíciles de desnaturalizar, elevado porcentaje de bases GC y productos con tamaños superiores a 4 kb, se empleó el doble de unidades de enzima polimerasa y una concentración final de DNA molde de 12 µM.

Los cebadores específicos se obtuvieron de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la UMA. En la Tabla 1 se muestran los cebadores diseñados para la obtención de fragmentos del gen *Gls*2.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tabla 1. Nombre y secuencia de los distintos cebadores usados para las reacciones de PCR. Las secuencias subrayadas corresponden a dianas específicas para distintas enzimas de restricción.

Nombre	Secuencia 5'→3'
BC2 Fw	AAGCTTCCAAGTCCAGAGGAGAACACCTTTCGT
BC2 Rv	AAGCTTGGATGAGAGCAAAGGCTAAGACACAGAGGA
BC234 Fw	GTCGACGGGCTAAGACAGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAG
BC234 Rv	GTCGACCAACTCTAGTAGAAGATGAGATGAGGCAGGTCCC
EX2 Fw	CCCGGGTCCTCAAACTGACAAATACCCTCCTACCTC
EX2 Rv	CCCGGGTACCCTATACTGTTCGACCATCCTCCTCAC
EX234 Fw	CCCGGGGCATGAAATTTGTTATCCTCAGACATCCAG
EX234 Rv	CCCGGGGCAATTCTAGGATTAGGTTCTCAGGTTCAG
BCext Fw	AAGCTTAGTAGCACGTGACTTAGGACCTTTATGGATGTGGA
BCext Rv	AAGCTTCGAAGCTGTCTAGTGGCTCTGTCTAGGAAATTTGG
BL Fw	CCGCGGCCTGCCTAAGCTTCTCAGATGTTGGGAT
BL Rv	CCGCGGATACTGCAGTGAATTGTGATGCGTAAGGAGGA
NeoBCext Fw	AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
NeoBCext Rv	CCACCATATGGTTGCTGGGATTTGAACTTCGGACCT

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad). Los programas usados para amplificar mediante *Long* PCR presentan algunas diferencias respecto a los programas de PCR tradicional, normalmente los tiempos de los ciclos son más cortos, exceptuando el tiempo de extensión que suele adaptarse a la longitud del producto deseado. Asimismo, las temperaturas de hibridación y extensión son sustancialmente diferentes a las programadas en una PCR tradicional: se aconseja programar la temperatura de hidridación entre 55 y 60ºC, sin tener en cuenta la temperatura esencial de fusión de los cebadores, y la temperatura de extensión se ajusta a 68ºC. Se ensayaron diferentes programas en función de las secuencias y tamaños a amplificar y se programaron las siguientes secuencias de ciclos:

▪ 1 ciclo de desnaturalización inicial	T_{d0}	94ºC	1 min
▪ 30 ciclos que comprenden:	$T_{desnat.}$	94ºC	30 s
	$T_{hibridación}$	55ºC	30 s
	$T_{extensión}$	68ºC	X min,

donde X representa el número de kb del producto a amplificar.

Para la zona a amplificar con los cebadores BL Fw y BL Rv (véase Tabla 1), se utilizó el siguiente programa:

▪ 1 ciclo de desnaturalización inicial	T_{d0}	94ºC	2 min
▪ 30 ciclos que comprenden:	$T_{desnat.}$	94ºC	15 s
	$T_{hibridación}$	55ºC	20 s
	$T_{extensión}$	68ºC	4 min 30 s

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

7. Manipulación y cultivos de células madre embrionarias ES (*Embryonic Stem cells*) de ratón

Las células ES de ratón fueron cultivadas sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón (EF) (previamente inactivados), que actúan como células nodrizas (*feeder cells)*.

La composición del medio de cultivo para los EF fue: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma), suero bovino fetal (FCS) al 10% (v/v) (Lab Clinics), penicilina/estreptomicina (Sigma) a una concentración final de 1mM y L-glutamina (Sigma) a una concentración final de 1mM.

La composición del medio de cultivo para las células ES murinas fue: DMEM con L-glutamina 1 mM y piruvato 1 mM, 1% de la solución stock de aminoácidos no esenciales (100mM) (NEAA, Sigma), 20% (v/v) FCS, β-mercaptoetanol 50 µM y LIF (*Leukemya Inhibitory Factor*, Sigma) 1000 U/ml.

Tanto las soluciones *stock* como los medios de cultivo fueron filtrados a través de filtros de 0.2 µm (Millipore).

Las células EF usadas como células nodriza, y las ES murinas empleadas en ensayos de electroporación de construcciones génicas realizadas en nuestro laboratorio, fueron cedidas por el Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid). Dichas células ES proceden de embriones resultantes del cruce entre ratones de las cepas F1DAB2 y C57BL6. Como se ha comentado, en esta memoria se adquirieron, también, del consorcio EUCOMM, células ES procedentes de la cepa CD1 de ratón modificadas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

genéticamente para permitir conseguir condicionalmente un *knockout* completo del gen *Gls2*.

7.1 Inactivación de fibroblastos

Como medio de cultivo para la inactivación de fibroblastos se empleó medio de cultivo EF al que se añadió mitomicina C (Sigma) a una concentración final de 10 µg/ml.

Alcanzada la confluencia se retiró el medio de cultivo EF y se sustituyó por medio de inactivación. Las células se incubaron posteriormente a 37ºC durante 2 ó 3 h. Tras esta incubación, se les retiró el medio y se lavaron con PBS (preparado a partir del stock a 10X, véase Apéndice).

Para separar las células de la placa, se le añadió tripsina (Sigma) y se incubó durante 1 min a 37ºC. Para detener la acción de la tripsina, se añadió medio de cultivo de EF, que al poseer α1-antitripsina en el suero bloquea su acción. Una vez separadas las células, se centrifugaron a 1100 rpm (Biofuge pico, Heraeus) durante 5 min, se resuspendieron en medio de cultivo EF y distribuyeron en placas de cultivo. Las placas de cultivo se impregnaron previamente con gelatina (Sigma) al 0.1% y se dejaron reposar durante 1.5 h. Posteriormente, se les retiró la gelatina con vacío justo antes de añadir los EF inactivados. Los fibroblastos así preparados se mantuvieron en el incubador (15 días como máximo) cambiando el medio de cultivo cada dos días.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

7.2 Procedimiento para el cultivo de células ES de ratón

Las células ES son muy sensibles a las condiciones de los cultivos, por tanto se ha de tener un cuidado extremo para mantenerlas bajo parámetros constantes. Estas células crecen formando colonias compactas tridimensionales en forma de isla, dentro de las cuales las células se encuentran muy densamente empaquetadas. En ellas se puede observar un núcleo prominente y una delgada región citoplasmática. Los cambios en la morfología de las colonias pueden indicar diferenciación de las células y, consecuentemente, pérdida de la totipotencia y capacidad para generar quimeras. Las células ES crecen rápido, se dividen cada 8-10 h y tienden a diferenciarse si el tamaño de la colonia es demasiado grande o alcanzan la confluencia. Por estas razones, es necesario hacerles pases y cambios de medio muy frecuentemente. Al hacer los pases, han de ser separadas de forma que se obtenga una suspensión unicelular para evitar la diferenciación. La totipotencia de las células ES tiende a perderse con el número de pases, siendo aconsejable no llevar a cabo más de 20 pases.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

Día 1: Siguiendo un protocolo convencional, se descongeló un vial de células ES. Posteriormente, se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo para ES hasta conseguir una suspensión unicelular. Las células procedentes de esta suspensión se añadieron a una placa de Petri de 35 mm previamente recubierta con una capa de EF inactivados.

Día 2: Se comprobó al microscopio la correcta morfología de las células ES y se cambio el medio de cultivo por medio fresco.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Día 3: Nuevamente se observó la morfología celular y el número de colonias. Estas se separaron con tripsina, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y se añadieron de nuevo a las placas de 35 mm recubiertas de EF inactivados.

Las células ES podrían seguir cultivándose siguiendo los pasos descritos durante los días 2 y 3 y podrían expandirse en placas de mayor diámetro, aunque no pueden mantenerse en cultivo durante más de 10 días.

7.3 Criopreservación de células ES

Hasta su utilización, las células ES fueron mantenidas y almacenadas siguiendo un protocolo estándar de criopreservación. Para ello, las células se separaron del soporte con tripsina y se resuspendieron a una concentración de 10^7 células/ml de medio de cultivo conteniendo un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Los viales se mantuvieron 20 min a 4º C, 2 h a -20º C, 12 h a -80º C y finalmente, fueron almacenados en un contenedor de N_2 líquido. Mediante el procedimiento comentado, se consigue que la temperatura baje aprox. 1º C por min.

7.4 Transferencias de células ES modificadas a blastocistos embrionarios de ratón

Todos los experimentos de microinyección de células ES modificadas (adquiridas de EUCOMM) a blastocistos de ratón, para la obtención de animales modificados genéticamente, se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Madrid). Tanto el mantenimiento como los procedimientos experimentales llevados a cabo se realizaron de acuerdo a la legislación europea de investigación con animales (Directivas Europeas 86/609/EU, 98/81/CEE, 2003/65/EC y Comisión de Recomendación 2007/526/EC).

8.- Materiales y métodos empleados para el análisis y caracterización de transcritos del gen *Gls2* de GA de mamíferos

8.1 Animales de experimentación y su mantenimiento

Para llevar los experimentos de este apartado de la memoria, se han utilizado ratas Wistar macho como fuente para la obtención de tejidos cerebral y de hígado. Dichos animales fueron mantenidos en el estabulario de los Servicios Centrales de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga (UMA) situado en la Facultad de Medicina. Todos los procedimientos de manipulación y experimentación realizados con estos animales se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa europea específica a tal efecto, citada en el apartado anterior. Asimismo, todos los protocolos llevados a cabo contaron con la previa aprobación del comité directivo y el veterinario responsable del mencionado Servicio Central para la Experimentación Animal de la UMA.

8.2 Obtención de muestras de RNA

Ratas Wistar macho de 9-10 semanas de edad fueron sacrificadas por decapitación; inmeditamente después, se extrajeron y congelaron en nitrógeno líquido sus tejidos cerebrales y hepáticos. A partir de estas muestras se obtuvo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

el RNA total empleando el kit *RNeasy Mini* de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante el proceso de purificación se llevó a cabo una digestión con DNasa, a fin de eliminar posibles restos de DNA contaminante, empleando *RNase Free DNase Set,* también de Qiagen. La integridad del RNA total obtenido fue analizada por electroforesis en geles de agarosa y su cuantificación de realizó midiendo espectrofotométricamente la absorbancia de las muestras a 260 nm. La pureza de la preparación fue establecida calculando el cociente entre las absorbancias medidas a 260 y 280 nm, respectivamente. En este trabajo hemos empleado también mRNAs poli-(A^+) de cerebro e hígado, humano y de ratón, que fueron adquiridos comercialmente de Clontech.

8.3 Amplificación de secuencias de isoenzimas *Gls2* de GA de mamífero tras retrotranscripción del RNA y PCR (Ensayos de RT-PCR)

Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo partiendo de 1 µg de RNA total (rata) ó 0.5 µg de mRNA poli-(A^+) (humano y ratón). En todos los casos, para convertir el RNA en cDNA, se empleó como cebador el siguiente oligo: 5'-CCGTGGGTCTAACTTCCGAGCAC-3´ (2 µg), el cuál fue usado previamente por nuestro grupo para clonar la isoenzima GAB de GA humana. Se añadieron asimismo la transcriptasa reversa *SuperScript II* (GIBCO/BRL) y los 4 dNTPs (10 mM cada uno de ellos) siguiendo los procedimientos estándar. Para la amplificación por PCR de las diferentes isoenzimas *Gls2* de GA se usaron 2 µl de la mezcla de cDNA obtenida

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

anteriormente, a la que se añadieron la enzima retrotranscriptasa *Advantage cDNA polymerasa* de Clontech y los cebadores sentido y antisentido (500 nM) que se muestran a continuación:

Cebadores sentido

- **Intron1human**, 5'-ATCAGATGGCTTAAGGAGGAGGC-3'. Este cebador se empleo para la amplificación del transcrito corto de GA tipo L (LGA) procedente de cerebro e hígado humano;
- **Exon1rat**, 5'-ATGCGCTCCATGAAGGCTCTG-3'. Este cebador se empleó para la amplificación del transcrito largo de GA tipo L (GAB) procedente de cerebro e hígado humano, hígado de rata e hígado de ratón; y
- **Intron1mouse**, 5'-GCCAGATGGTTCAAAGAGGAGG-3'. Este cebador se empleó para la amplificación del transcrito corto de GA tipo L (LGA) procedente de cerebro de rata y de hígado y cerebro de ratón.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Cebador antisentido

El cebador antisentido utilizado en todos los casos fue el llamado GSP-6, un oligonucleótido universal deducido de la isoforma GAB humana: 5'-GCAGTGGTGAACTTGTGGATAGGG-3'.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en el equipo termociclador *Thermocycler iCycler* de Bio-Rad, que fue programado tal y como se indican a continuación:

- 1 ciclo a 94ºC durante 5 minutos;
- 30 ciclos con las etapas: 94ºC durante 1 min; 57ºC-61.5ºC (dependiendo del cebador sentido utilizado) durante 45 s y 72ºC durante 2 min;
- 1 ciclo de extensión final a 72ºC durante 7 min.

El aislamiento del transcrito completo de LGA humano (hLGA) se llevó a cabo partiendo de mRNA poli-(A^+). En este caso se empleó un cebador oligo(dT) (10 µM) en la reacción de retrotranscripción. Obtenido el cDNA, se trató con 2 unidades de RNasa H durante 20 min a 37ºC antes de proceder a la reacción de amplificación por PCR.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Los cebadores utilizados en la reacción de PCR fueron:

- **hLGAfw**, 5'-GAGGACACTCACCTACTTATAAGCCC-3'; y
- **hLGArev**, 5'-CTTCTCTGTACTCTGTCTGCTGAGG-3'.

El programa de PCR empleado en el termociclador contemplaba en esta ocasión las siguientes etapas:

- 1 ciclo de 1 min a 94 ºC;
- 35 ciclos con las etapas: 20 s a 94 ºC, 30 s a 55 ºC y 2 min a 68 ºC; y
- 1 ciclo de extensión final a 68 ºC durante 3 min.

Una vez terminadas las reacciones de PCR, alícuotas de los productos obtenidos, fueron analizadas en geles de agarosa. Las bandas obtenidas se eluyeron de los geles y se subclonaron en el vector pGEM®-T Easy para, posteriormente, ser enviadas a secuenciar.

8.4 Experimentos de extensión de cebadores para el establecimiento del sitio de inicio de la transcripción (*Primer Extensión Analysis*) de la isoenzima LGA humana

La secuencia de cDNA de LGA de cerebro humano (hLGA), obtenida por RT-PCR según el procedimiento indicado anteriormente, sirvió de base para diseñar cebadores destinados a determinar el lugar de inicio de su

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

transcripción. Se diseñaron un total de tres cebadores, todos ellos partir de los 400 primeros nucleótidos del cDNA hLGA: GSP-6, PEXT1 (5'-CAGAGAATGGGGAGGAAAGTG-3') y PEXT2 (5'-CATGGGCTTATAAGTAGGTGAGTG-3'). Para el seguimiento del ensayo de extensión, los oligonucleótidos se marcaron en sus extremos 5´ con ^{32}P usando [γ-^{32}P]-ATP y la enzima T4 polinucleótido-quinasa. A continuación, una cantidad aproximada de entre 0.5 - 1 µg de mRNA poli-(A)+ de cerebro humano fue retrotranscrita mezclando los oligonucleótidos radioactivos y la transcriptasa reversa de virus de la mieloblastosis aviar, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante del kit utilizado (*Primer Extension Analysis Kit*, de Promega). Los productos de la reacción de extensión de los cebadores fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8% (p/v), urea 7 M en tampón 1x TBE (Tris-borato-EDTA, ver Apéndice). Como control positivo, se utilizó RNA del gen de resistencia a la kanamicina. Se incluyeron también controles negativos sin RNA en todos los geles analizados. Finalmente, los geles se secaron al vacío y posteriormente se revelaron por autorradiografía. El tamaño de los productos de cDNA de hebra sencilla obtenidos (en bases) se estimó comparando las bandas con las del marcador (DNA del fago ϕX174 cortado con HindfI), usando el software *Image Lab* y un equipo *Pharos FX Molecular Imager* de Bio-Rad.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8.5 Expresión proteica de variantes hLGA mediante ensayos de transcripción y traducción *in vitro* en lisados de reticulocitos de conejo

El análisis de la secuencia de cDNA hLGA completa, subclonada en el vector pGEM®-T Easy, permitió observar la existencia de dos tripletes ATG en pauta de lectura. Con el fin de comprobar si ambos tripletes podían ser utilizados como codones de iniciación dando lugar a variantes proteicas distintas, se llevaron a cabo experimentos de transcripción y traducción *in vitro* empleando el kit TNT^{R} T7 *Coupled Reticulocyte Lysate System* de Promega. Para ello, se siguieron esencialmente las instrucciones del fabricante. En el ensayo se incluyeron dos contrucciones génicas realizadas en pGEM®-T Easy, la correspondiente a la secuencia codificante completa (1900 pb), comenzando 3 pb cadena arriba del primer codón de inicio y terminando con las primeras 26 pb de la región 3'-UTR, y un mutante de deleción de la anterior que comienza en el segundo ATG. Asimismo se ensayaron, otras tres construcciones más, dos de ellas realizadas en pGEM®-T Easy conteniendo secuencias de hLGA carentes de los exones 4 y 10, respectivamente y otra, que incluía la secuencia hLGA clonada en orientación antisentido que se usó como control negativo. Una vez purificados los plásmidos, el ensayo de transcripción y traducción *in vitro* se inició empleando 1 µg de cada uno de ellos a los que se añadieron 20 µCi de [^{35}S]-Met en un volumen total de 50 µl. Después de una incubación a 30ºC durante 60 min, las alícuotas se guardaron para posteriores experimentos. Paralelamente se llevaron a cabo ensayos empleando Met sin marcar con el fin de medir la actividad GA de los extractos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

(ver 9.6). La síntesis de novo de los polipéptidos producidos en los ensayos se monitorizó mediante electroforesis SDS-PAGE seguida de autorradiografía. Las películas fotográficas se analizaron con un escáner GS800 empleando el programa informático *Quantity One* de Bio-Rad.

8.6 Medida de actividad GA en lisados de reticulocitos

La actividad GA se midió tal y como se describe en el artículo de Campos-Sandoval y col., (2007), citado en esta Memoria, con pequeñas modificaciones. La medida se basa en la reacción del amonio liberado en la reacción de la GA con o-ftalaldehído (OPA).

Tras la transcripción y traducción *in vitro*, el lisado de reticulocitos se diluyó en un pequeño volumen de tampón de medida de la actividad GA (fosfato de potasio 150 mM, cloruro de amonio 1 mM, pH 8.0). Posteriormente, el extracto soluble se llevó a 25 µl por ultracentrifugación (11000 g) usando tubos *Centricon YM-30* de Millipore, tras lo cual, se inició el ensayo de medida de la actividad GA. Los resultados obtenidos con la construcción pGEM-T[hLGA] clonada en orientación antisentido se utilizaron en todos los casos para fijar el cero en las medidas de actividad GA. Después de la reacción GA y con anterioridad a las determinaciones espectrofotométricas, los extractos se trataron con ácido tricloroacético (TCA) al 20% para reducir el fondo causado por la absorbancia debida a la hemoglobina y otros componentes del lisado de reticulocitos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

8.7 Expresión de isoenzimas GLS2 de GA mediante inmunotransferencias *Western*

Ante la existencia de distintas variantes de transcritos GLS2, se investigó también la expresión proteica de isoenzimas GA mediante técnicas de inmunotransferencia (Western blot). Los experimentos se realizaron a partir de proteínas aisladas de mitocondrias de hígado y cerebro de rata. Para el aislamiento de las mismas, se siguió el protocolo descrito previamente por Campos y col. (2003). El contenido en proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las fracciones proteicas se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia *Western*, tal y como se describe en Campos-Sandoval y col. (2007). Para el revelado de las membranas se emplearon dos anticuerpos primarios diferentes; uno de ellos reconoce de manera específica tanto a la isoenzima LGA como a la GAB, fue desarrollado en conejo por nuestro grupo de investigación siguiendo los procedimientos habituales. Las diluciones óptimas de este anticuerpo fueron las descritas en los artículos de Olalla y col., (2002); y Campos y col. (2003). El segundo anticuerpo empleado fue un anticuerpo policlonal que reconoce solo a la isoenzima GAB de GA. Este anticuerpo GAB-específico, fue obtenido mediante la inmunización de conejos con el péptido sintético RETPHSHQPQHQDH, enlazado covalentemente a hemocianina de lapa. Dicho péptido, pertenece al exón 1 del gen GAB humano, por lo que no contiene secuencias de aminoácidos que formen parte de las isoformas LGA. Estos últimos anticuerpos fueron adquiridos de la casa comercial *Genosphere Biotechnologies*, Francia. Se empleó un kit de quimiolumiscencia aumentada para el revado final de las membranas, para lo

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que se siguieron las instrucciones del fabricante (*Armersham Biosciences*). La línea celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y que expresa ambas isoformas GLS2, se utilizó para validar el uso de los anticuerpos utilizados en estos experimentos.

8.8 Análisis de expresión de isoenzimas GA mediante PCR a tiempo real cuantitativo (q-RT-PCR)

Para evaluar cuantitativamente la expresión de transcritos de las diferentes isoenzimas de GA de hígado y cerebro de ratón y rata, se ha llevado a cabo un procedimiento de determinación absoluta de los mismos mediante la técnica de q-RT-PCR empleando el colorante fluorescente SYBR-Green.

Partiendo de 1 µg de RNA total de rata ó 500 ng de mRNA poli (A)+ de ratón en un volumen de reacción de 20 µl se sometieron a la acción de transcriptasa reversa (RT) usando el sistema *Quantitec Reverse Transcription kit* de Qiagen y siguiendo las indicaciones del fabricante (Véase el apartado 8.2 para el método de extracción de RNA). Para comprobar la ausencia de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA, se incluyeron controles negativos sin RT y controles sin molde para verificar la ausencia de contaminación por reactivos y aerosoles. Para normalizar la variabilidad experimental de la reacción de retrotranscripción y facilitar una correcta cuantificación de los amplicones, se usaron genes constitutivos que codifican para las proteínas Rpl19 del ribosoma 60S de rata y la β-actina de ratón, respectivamente.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las medidas de PCR a tiempo real se realizaron en el equipo CFX thermocycler de Bio-Rad mediante el registro de la intensidad de fluorescencia emitida por el SYBR-Green en el transcurso de los ciclos de amplificación con cada pareja de cebadores específicos de cada uno de los transcritos analizados: KGA, GAB y LGA, Rpl19 y β-actina, respectivamente. Dichos cebadores específicos se indican en la Tabla 2:

Tabla 2. Cebadores isoforma específicos usados para las reacciones de PCR. Se indica el nombre, secuencia, tamaño y masa de molar de cada amplicón para cada una de las parejas de cebadores.

NOMBRE	DIRECTO (5'→3')	REVERSO (5'→3')	Amplicón(pb) /MASA MOLARx10^{-4} (g/mol)
mβ-actin	CTTTGCAGCTCCTTCGTTGCC	GCGAAGCCGGCTTTGCACAT	111 / 7,33
mKGA	GCGAGGGCAAGGAGATGGTG	CTCTTTCAACCTGGGATCAGATGTTC	179 /11,81
mGAB	GCACTCGGATCATGACGCCTCAC	TTGGACCATGCGCTGCATCTTG	190 / 12,54
mLGA	GCCAGATGGTTCAAAGAGGAGG	GTGGTGAACTTGTGGATAGGG	230 / 15,18
rRpl19	TCGCCAATGCCAACTCTCGTC	AGCCCGGGAATGGACAGTCAC	89 / 5,87
rKGA	GCGAAGGCAAGGAGATGGTG	CTCTTTCAACCTGGGATCAGATGTTC	179 / 11,81
rGAB	GCACTCGGACCATGATGCCTCGA	TTGGACCATGCGCTGCATCTTG	168 / 11,09
rLGA	ACCAGATGGCCCAAAGAGGAG	CGTGGTGAACTTATGGATGGGG	212 / 13,99

Antes de llevar a cabo la determinación cuantitativa de los amplicones se comprobó la eficiencia de los cebadores realizando curvas de dilución, y la ausencia de dimeros de cebadores, mediante curvas de fusión, ambos siguiendo los procedimientos convencionales. En todos los casos las

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

eficiencias de amplificación de los cebadores utilizados estuvo comprendida entre el 97 y 101%. A modo de ejemplo se muestran las curvas de dilución y fusión correspondiente a la isoenzima KGA (Figura 3).

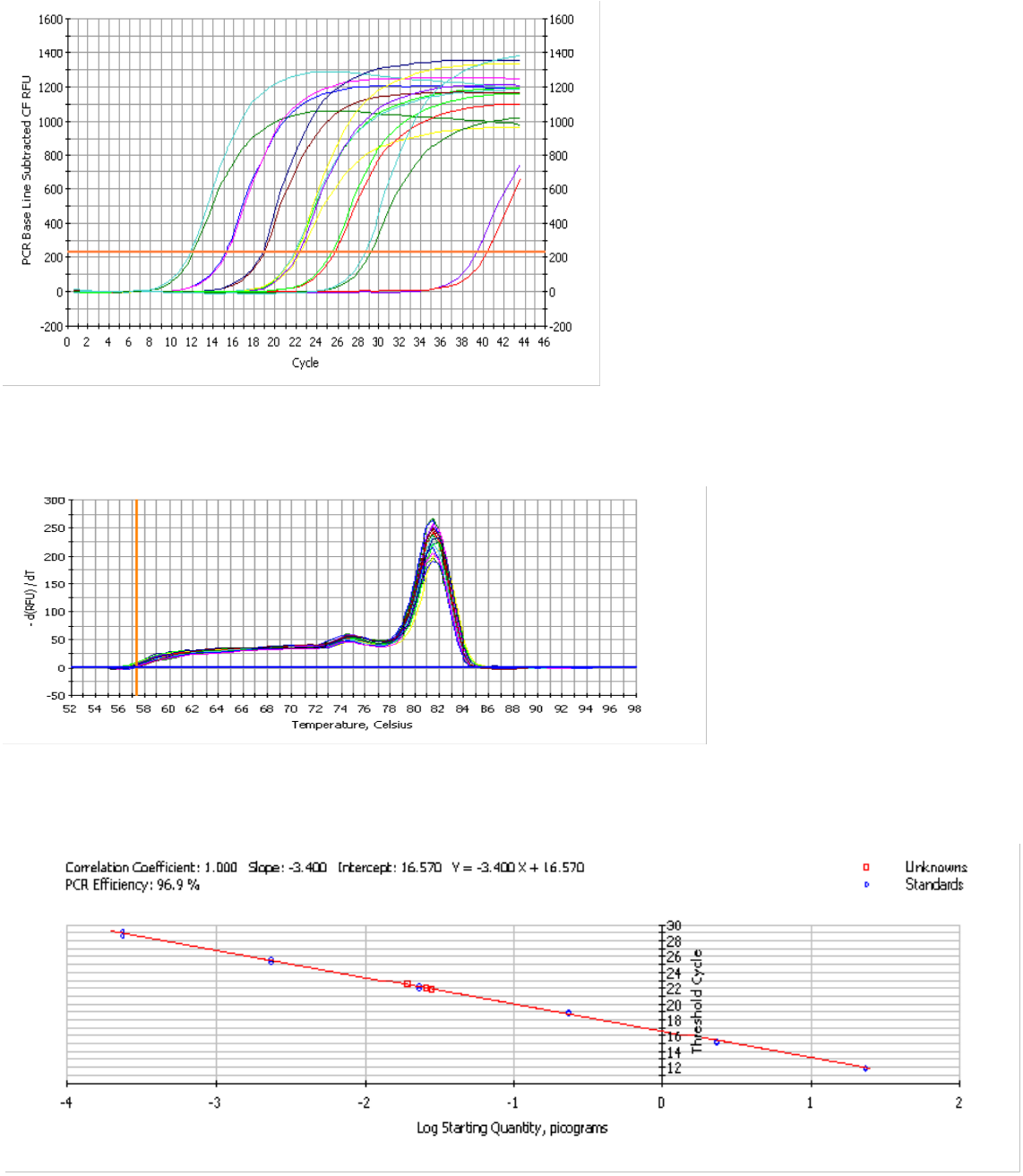


Figura 3. Curvas de dilución, curvas de fusión y recta estándar para la isoenzima KGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, usando: 25 ó 50 ng de cDNA, 2x *Perfecta SYBR-Green Supermix* (Quanta Biosciences) y cebadores específicos a una concentración 200 nM cada uno de ellos.

Las condiciones de las reacciones fueron:

- 1 ciclo de 4 minutos a 94ºC;
- 40 ciclos con las etapas: 15 segundos a 95ºC, 45 segundos a 61ºC para ratón o 63ºC para rata y 30 segundos a 72ºC.

Cada ensayo incluyó un control negativo de la RT-PCR y un control sin molde. Los resultados se analizaron utilizando el programa informático CFX de Bio-Rad. El tamaño de los amplicones y la ausencia de productos no específicos se confirmó por análisis electroforético en geles de agarosa.

Para la cuantificación absoluta de los transcritos (constitutivos y de isoenzimas GA), se realizaron curvas estándar empleando como estándares externos cantidades conocidas de cada uno de los amplicones específicos. Dichos amplicones fueron obtenidos previa amplificación por PCR de cada uno de ellos con sus respectivos cebadores, separación en geles de agarosa al 2% y purificación desde los mismos (*GFX^{TM}PCR DNA* y *Gel Band Purification Kit*, ambos de GE Healthcare). Las concentraciones de los ácidos nucleicos purificados se determinaron por espectrofotometría. A continuación se hicieron diluciones seriadas de cada estándar (1/10) y para cada una de ellas se determinó el C_t (*Cycle Threshold).* La curva estándar se realizó representando el Ct de cada dilución de estándar frente al logaritmo de la cantidad inicial de estándar correspondiente en pg (rango de 10^2 a 10^{-5} pg). Finalmente, los

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

resultados de la expresión de transcritos de GA se obtuvieron determinando sus Ct e interpolando en la curva estándar. Los resultados se expresaron como número de moléculas + SEM de mRNA por ng de RNA total ó en su caso mRNA poli $(A)^+$, corregidos de acuerdo con los valores obtenidos con los genes constitutivos Rpl19 ó β-actina. El número de copias absoluto de cada transcrito se calculó teniendo en cuenta el número de Avogadro ($6.022x10^{23}$) y su correspondiente masa molecular (Sambrook J y col., 1989).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resultados y Discusión

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Uno de los objetivos a largo plazo de la investigación realizada es la obtención de ratones KO condicionales del gen *Gls*2 de GA. Para tal efecto se llevaron a cabo dos estrategias paralelas: una estrategia directa que consiste en la adquisición de una línea celular ES murina que contiene una casete transgénica de *Gls*2, lista para ser transferida a los animales; y otra estrategia basada en el diseño y consecución de construcciones génicas originales que, posteriormente, se transfectarán a células madre embrionarias (ES) murinas. En el primer caso, se llevaría a cabo un KO completo del gen *Gls*2 que, según la experiencia demostrada para la generación de ratones KO del gen *Gls*, podría dar lugar a animales no viables (Masson y col., 2006). Al diseñar nosotros construcciones génicas desde el principio, pudimos realizar modificaciones tales que nos permitirán generar un animal KO directo para la isoenzima GAB, pero condicional para LGA. El hecho de que al menos una de las dos isoenzimas GLS2 se exprese desde el nacimiento del animal trangénico, podría evitar que el ratón muriera al nacer o a los pocos días. Además, con estas aproximaciones experimentales podríamos avanzar en el estudio de la expresión de las dos isoenzimas en conjunto, así como en la funcionalidad de cada una de ellas por separado.

Por último, reseñar que esta doble estrategia aplicada está de acuerdo con la opinión mayoritaria de los expertos en transgénesis que nos han asesorado y han colaborado con nosotros durante este trabajo (Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán y Dra. Aurora Burds Connor, entre otros): generar al menos dos construcciones transgénicas alternativas para bloquear la expresión de un gen.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1. Diseño de las construcciones génicas para generar ratones KO condicionales del gen *Gls2* de GA

Como se ha indicado en la introducción, las isoenzimas GA tipo L (o GLS2) de ratón son codificadas por el gen *Gls2*, constituido por 18 exones (15255 pb) y localizado en el cromosoma 10.

Una de las cuestiones que se ha de tener en cuenta para el diseño de las construcciones génicas son los productos que surgen por ayuste alternativo tras la expresión del gen *Gls*2. Cuando comenzamos el diseño de nuestras casetes transgénicas, al menos en rata se había detectado otra isoenzima de GA tipo L (LGA, Smith y Watford, 1990), que carece de todos los aminoácidos codificados por el exón 1, por lo que parece deducirse que este exón no es imprescindible para la expresión y funcionalidad de esta isoenzima.

Para conseguir el *knockout* condicional del gen *Gls*2 se ha diseñado una estrategia consistente en eliminar mediante recombinación homóloga uno o varios exones considerados imprescindibles para su expresión y funcionalidad, procurando además que los exones remanentes tras eliminar los exones seleccionados no continúen en pauta de lectura correcta. De esta forma, se favorece la generación de numerosos codones de parada, impidiendo la expresión y, lógicamente, perdiendo la funcionalidad.

Teniendo en cuenta las consideraciones indicadas y tras el análisis de la secuencia completa del gen *Gls*2 murino, hemos diseñado dos posibles construcciones: una en la que se elimina el exón 2 y otra en la que se eliminan los exones 2, 3 y 4. Nuestro punto de partida fue un clon de DNA genómico

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

murino insertado en cromosomas artificiales de bacteria (BAC), denominado RP23-132119 (RP23), adquirido del Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, http://www.chori.org/), con un tamaño de 46165pb que, teóricamente, contiene la secuencia genómica completa del gen *Gls2* de ratón de la estirpe C57BL/6J. Antes de iniciar los experimentos, se secuenció el BAC clon adquirido a través de toda la secuencia exónica completa del gen *Gls2* y se realizaron diferentes análisis de restricción. Se confirmó la existencia de los exones 2 a 18 y la ausencia del exón 1. Esta característica peculiar (ausencia del exón 1) nos permitía diseñar construcciones que darían lugar a animales KO directos para GAB (cuyo transcrito comienza en el exón 1) y KO condicionales para LGA, isoenzima en la que transcripción comienza en el exón 2.

1.1 Vector esqueleto de la construcción: pGKneoF2L2DTA (pGKneo)

Las construcciones se realizaron en el vector plasmídico pGKneo, desarrollado por el laboratorio de Phillipe Soriano (Hoch y Soriano, 2006) y que nos cedió gentilmente la Dra. Aurora Burds Connor, Directora técnica y responsable del Servicio de Transgénesis del Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT, Boston, http://web.mit.edu/transgenic/). Este vector, de 6465 pb, posee las características necesarias para permitir la introducción de brazos de homología del gen diana y motivos estructurales que hacen posible la generación de *knockouts* génicos condicionales. Dichas características se resumen a continuación:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

- Un fuerte promotor. El correspondiente a la fosfoglicerato quinasa, PGK.
- Gen de resistencia a la neomicina, gen neo, que funciona como marcador positivo de selección.
- Gen de la toxina de la difteria, gen DTA, marcador de selección negativo, que permite discriminar los eventos de recombinación homóloga de los de recombinación no homóloga.
- Dos sitios Frt que flanquean al gen neo (casete de neomicina) y que son reconocidos específicamente por la recombinasa FLP, que cuando se expresa escinde toda secuencia de DNA comprendida entre ellos.
- Dos sitios LoxP de reconocimiento por la recombinasa Cre, que, al igual que FLP, reconoce los sitios específicos (LoxP) y escinde toda secuencia de DNA que se encuentre flanqueada por ellos.

En la Figura 1 se muestra un mapa de restricción del vector pGKneo, así como la localización de sus distintos elementos:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

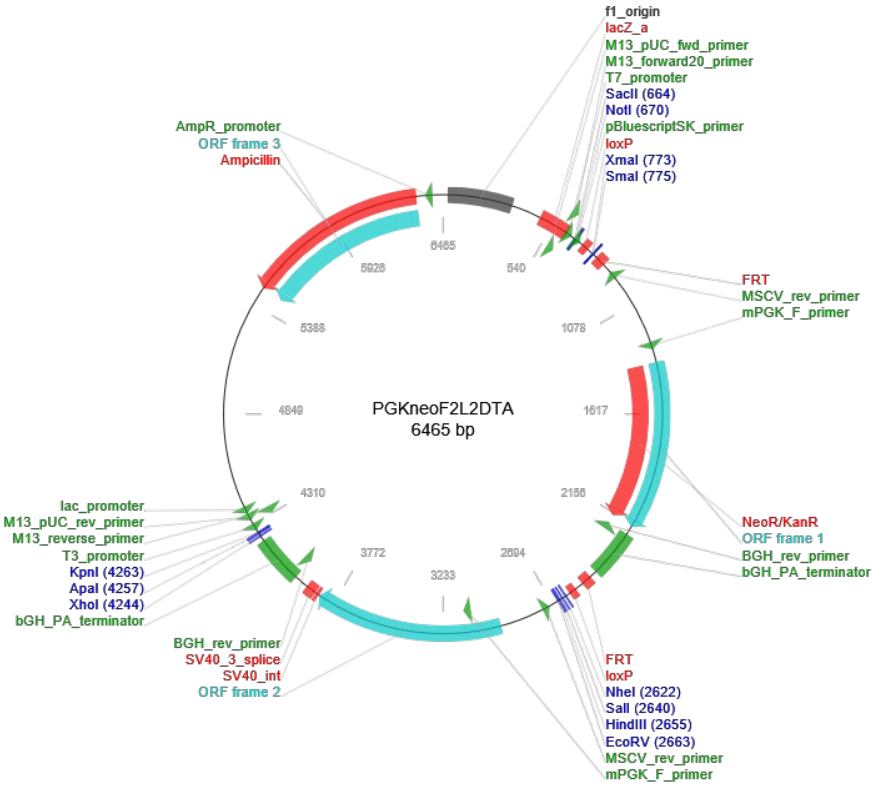


Figura 1. Mapa de restricción del vector pGKneoF2L2DTA. Localización de los distintos elementos que lo caracterizan: promotor PGK, gen neo, gen DTA, sitios Frt y sitios LoxP. En color azul se indican los sitios de corte único de enzimas de restricción presentes en el vector.

1.2 Características del gen *Gls*2 para la recombinación homóloga condicional

Como se ha mencionado con anterioridad, se han diseñado dos construcciones que, a partir de ahora, denominaremos construcción A (en la que se intenta eliminar el exón 2 del gen *Gls*2) y construcción B (en la que se pretende eliminar los exones 2,3 y 4 del gen *Gls*2). Según las indicaciones de la bibliografía especializada (Nagy , 2003; Burds, 2006), las construcciones han de poseer dos brazos de homología: uno largo, de alrededor de 4 kb, que

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

facilitará por su tamaño la recombinación homóloga, y otro de longitud inferior, entre 1.2 y 2.5 kb, que permitirá discriminar mediante PCR las recombinaciones homólogas de las ilegítimas. Tanto la construcción A como la B se han diseñado siguiendo estas recomendaciones.

En la Figura 2 se esquematiza el diseño de las zonas de homología y los exones a eliminar del gen *Gls*2 para las construcciones A y B.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

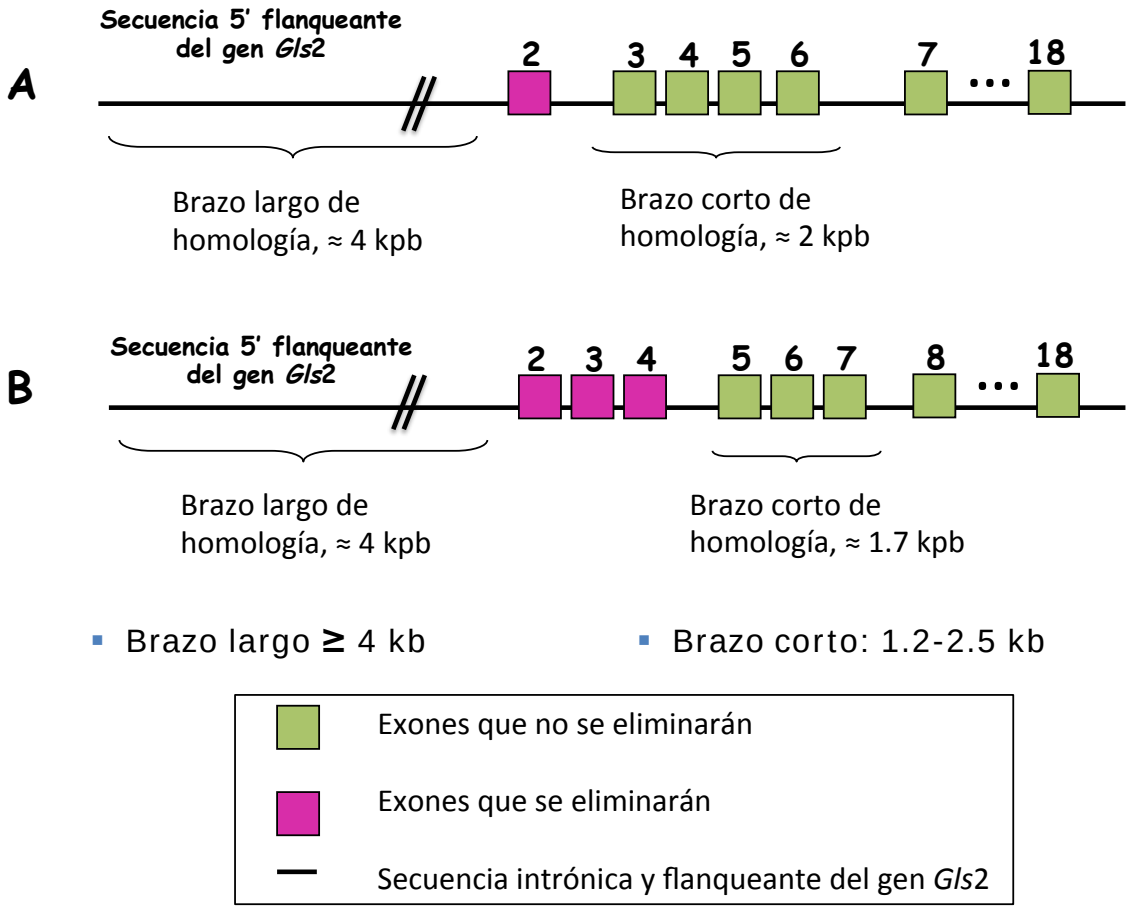


Figura 2. Esquema de las zonas de homología y exones a eliminar del gen *Gls*2 para las construcciones A y B. ***A***, esquema para la construcción A, con el exón 2 que será flanqueado por los sitios LoxP.; **B**, esquema para la construcción B, con los exones 2, 3 y 4 que serán flanqueados por los sitios LoxP. Se indican los tamaños de las distintas zonas de homología. Con la doble barra oblicua (*//*) se indica la posición teórica del exón 1, eliminado del BAC clon.

La localización de las distintas zonas a insertar en el vector de transferencia puede observarse en la Figura 3. La región que se desea eliminar ha de estar localizada entre los sitios LoxP, ya que, al actuar la recombinasa Cre, toda secuencia situada entre estos dos sitios será escindida. Las zonas de homología han de situarse en las zonas 5'-cadena arriba (*upstream*) del primer

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

sitio LoxP y 3'-cadena abajo (*downstream*) del segundo sitio LoxP, de forma que la escisión no afecte a estas secuencias. El gen de selección negativa DTA ha de situarse en las zonas exteriores a las regiones de homología, fuera de la secuencia genómica incluida en la construcción. En nuestras construcciones se ha ubicado a continuación del brazo corto de homología; se ha comprobado experimentalmente que situando el gen de selección negativa junto al brazo más corto de homología se reduce el número de clones que ha de examinarse (Burds Connor, *Beginner Guide To Gene Targeting*).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

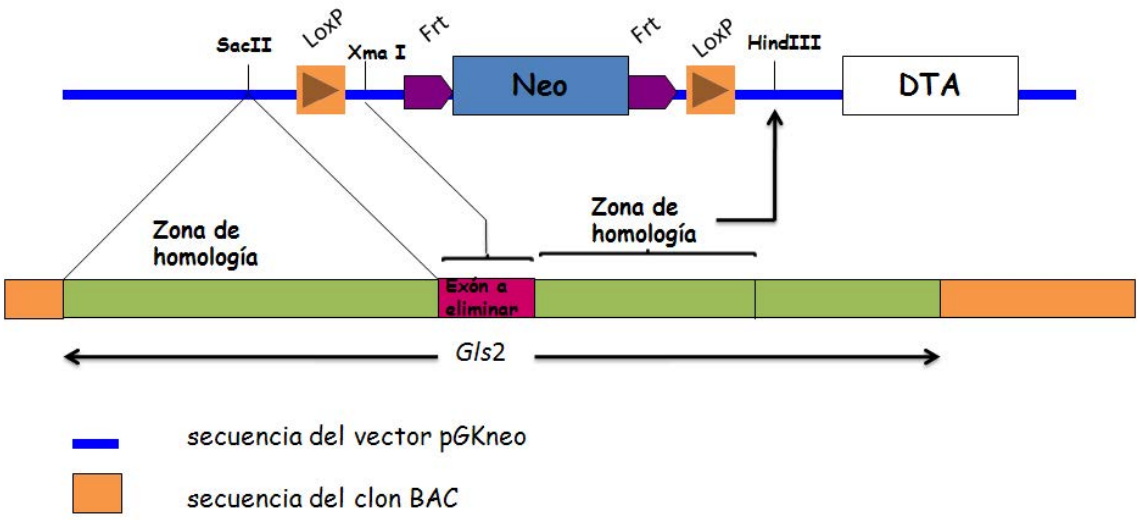


Figura 3. Esquema de las zonas de inserción de secuencias genómicas de *Gls2* en el vector pGKneo. Localización estratégica de las zonas de homología y de la zona a eliminar del gen *Gls*2 en el vector pGKneo con respecto a los distintos elementos del mismo. *Sac*II, *Sma*I y *Hind*III: sitios de restricción en los que se producirán las inserciones de las distintas zonas; Neo: gen de resistencia a la neomicina para selección positiva; DTA: gen de la toxina de la difteria para la selección negativa; LoxP: sitios de reconocimiento LoxP; Frt: sitios de reconocimiento Frt.

1.3 Construcciones pGKneoF2L2DTA-*Gls*2

Las construcciones A y B se han diseñado teniendo en cuenta las propiedades indicadas para el vector de transferencia (pGKneo) y para el gen diana (*Gls*2). En la Figura 4 se representa un esquema de la estructura de las construcciones A y B completas, es decir, una vez introducidos los fragmentos del gen *Gls*2 en el vector de transferencia.

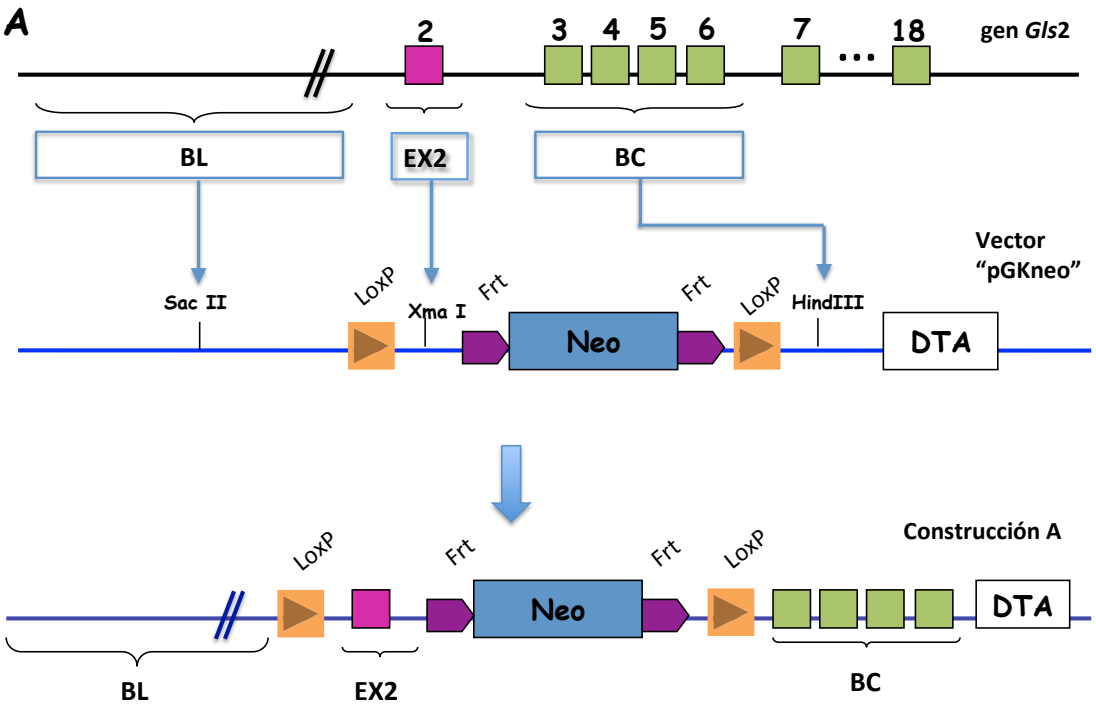
De acuerdo con el esquema de la Figura 4, el procedimiento experimental seguido para obtener las construcciones A y B ha sido:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

1. obtención de los brazos de homología y de los exones a eliminar del gen *Gls*2 a partir del clon BAC RP23 y su subclonación en vectores intermedios de clonación;

2. introducción de dichos fragmentos en los lugares estratégicos escogidos del vector pGKneo.

Según el diseño realizado, en ambas construcciones el brazo largo de homología se introducirá en el sitio *SacII* del vector pGKneo y el fragmento exónico a eliminar en el sitio *XmaI*. El brazo corto de homología se introducirá en el sitio *HindIII* para la construcción A y en el sitio *SalI* para la construcción B.



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

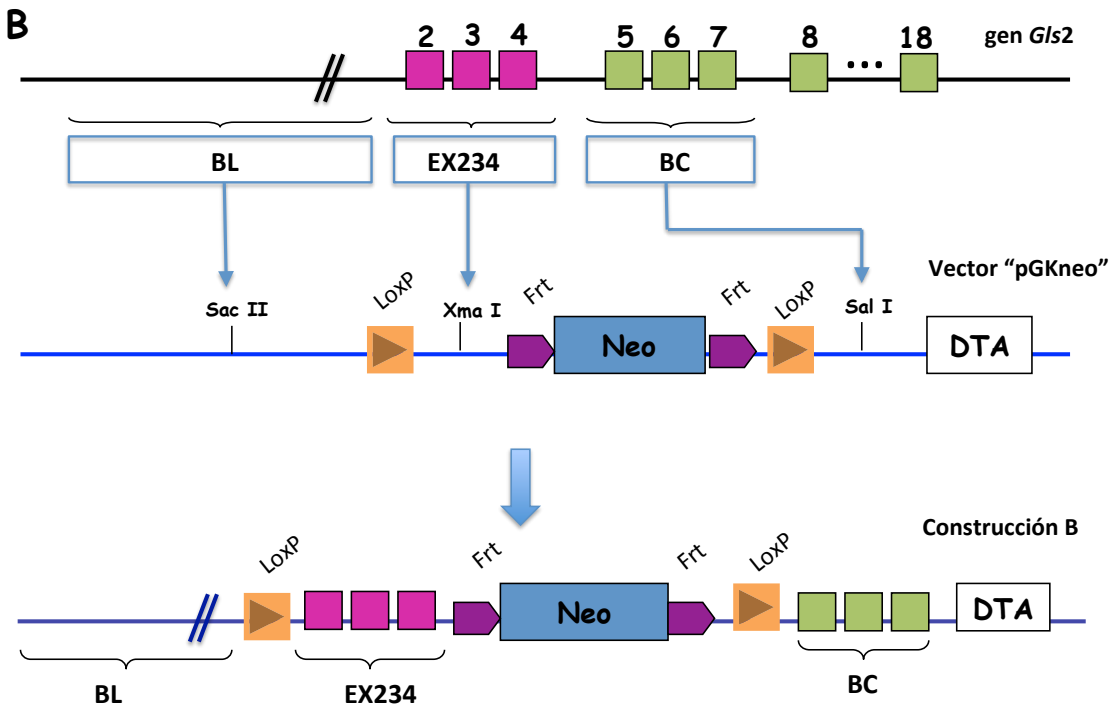


Figura 4. Estructura de las construcciones A y B en el vector pGKneo. *A*, esquemas del gen *Gls*2 para la construcción A, del vector pGKneo y de la construcción A completa. **B**, esquemas del gen *Gls*2 para la construcción B, del vector pGKneo y de la construcción B completa. **BL**: brazo largo de homología, **EX2**: exón 2, **BC**: brazo corto de homología, **EX234**: exones 2, 3 y 4, **Neo**: gen de resistencia a la neomicina para selección positiva, **DTA**: gen de la toxina de la difteria para la selección negativa, **LoxP**: sitios de reconocimiento LoxP, **Frt**: sitios de reconocimiento Frt.

1.4 Comprobación de la recombinación homóloga

Una vez se transfecten las células madre embrionarias murinas con ambas construcciones, necesitaremos algunas estrategias de comprobación que acrediten que la recombinación se ha producido de forma homóloga: por un lado la exclusión del gen *dta* (si la recombinación fuera no homóloga el gen *dta* se incluiría y, al expresarse, las células no sobrevivíran); por otro lado, una estrategia de PCR para el análisis y genotipado de los clones ES

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

seleccionados. Con este objetivo, se ha diseñado una pareja de cebadores para las construcciones A y B. Uno de los cebadores se diseñó de forma que hibridase con una región del gen no incluida en la construcción (en nuestro caso el intrón 7, en la zona 3'-cadena abajo del brazo corto de homología de la construcción B); el otro cebador se diseñó para que hibridara con una región comprendida en la secuencia del gen *Neo* del vector pGKneo. Esta última secuencia no se encuentra incluida en el gen *Gls*2 de forma original, pero sí cuando este es modificado, tras la electroporación de la construcción "pGKneo-*Gls*2" en las células ES y su posterior recombinación con el gen *Gls2*. La aparición de las bandas del tamaño esperado amplificadas con estos cebadores, mediante una electroforesis realizada tras la PCR, sirve para confirmar que la recombinación producida ha sido verdaderamente homóloga.

Estos cebadores se muestran en las Figuras 5 y 6 y su secuencia se indica en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, con los nombres NeoBCext Fw y NeoBCext Rv. El tamaño teórico del producto de PCR que se obtendría en la reacción sería de 3.9 kb para la construcción A y de 2.9 kb en la construcción B.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

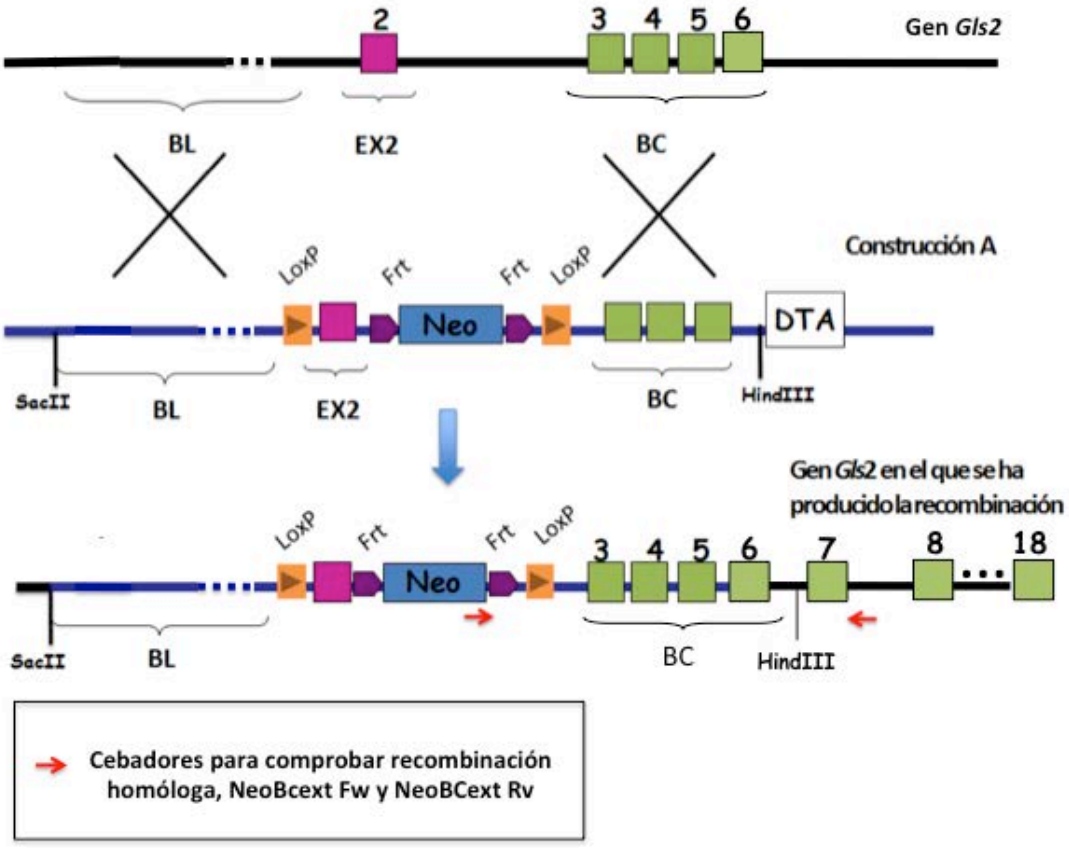


Figura 5. Esquema de recombinación homóloga entre el gen *Gls2* y la construcción A. Zonas de diseños de los cebadores. BL: brazo largo de homología; EX2: exón 2; BC: brazo corto de homología; Neo: gen de resistencia a la neomicina para selección positiva; DTA: gen de la toxina de la difteria para la selección negativa; LoxP: sitios de reconocimiento LoxP; Frt: sitios de reconocimiento Frt.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

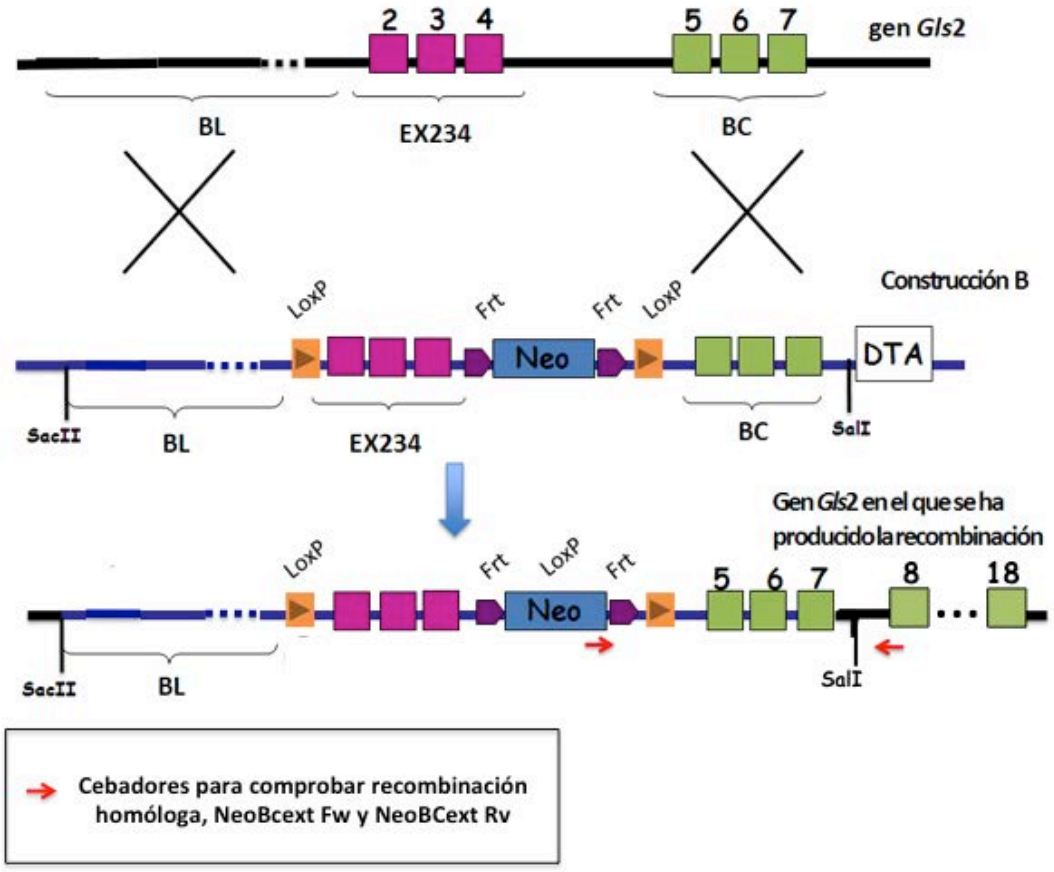


Figura 6. Esquema de recombinación homóloga entre el gen *Gls*2 y la construcción B. Zonas de diseños de los cebadores. BL: brazo largo de homología; EX234: exones 2,3 y 4; BC: brazo corto de homología; Neo: gen de resistencia a la neomicina para selección positiva; DTA: gen de la toxina de la difteria para la selección negativa; LoxP: sitios de reconocimiento LoxP; Frt: sitios de reconocimiento Frt.

Además de comprobar que la recombinación es homóloga, se ha de comprobar la integridad de los genes FLP y Cre, lo que se realizó por secuenciación y análisis de restricción.

Para comprobar la funcionalidad de los cebadores denominados NeoBCext Fw y NeoBCext Rv, necesitamos diseñar una construcción intermedia, que llamaremos construcción ficticia o “Mock”, porque simula (en el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

vector de transferencia) la estructura del gen *Gls2* tras la recombinación homóloga.

La construcción "Mock" consta del vector pGKneo y un inserto que hemos llamado brazo corto extendido (BCext). El BCext es un fragmento del gen *Gls*2 que se extiende desde el brazo corto de homología hasta la zona del gen *Gls*2 no incluida en las construcciones A y B. El BCext que hemos diseñado comienza en el intrón 4 y se extiende hasta la zona del intrón 9 del gen *Gls*2. En la Figura 7 se representa un esquema de la construcción ficticia o "Mock":

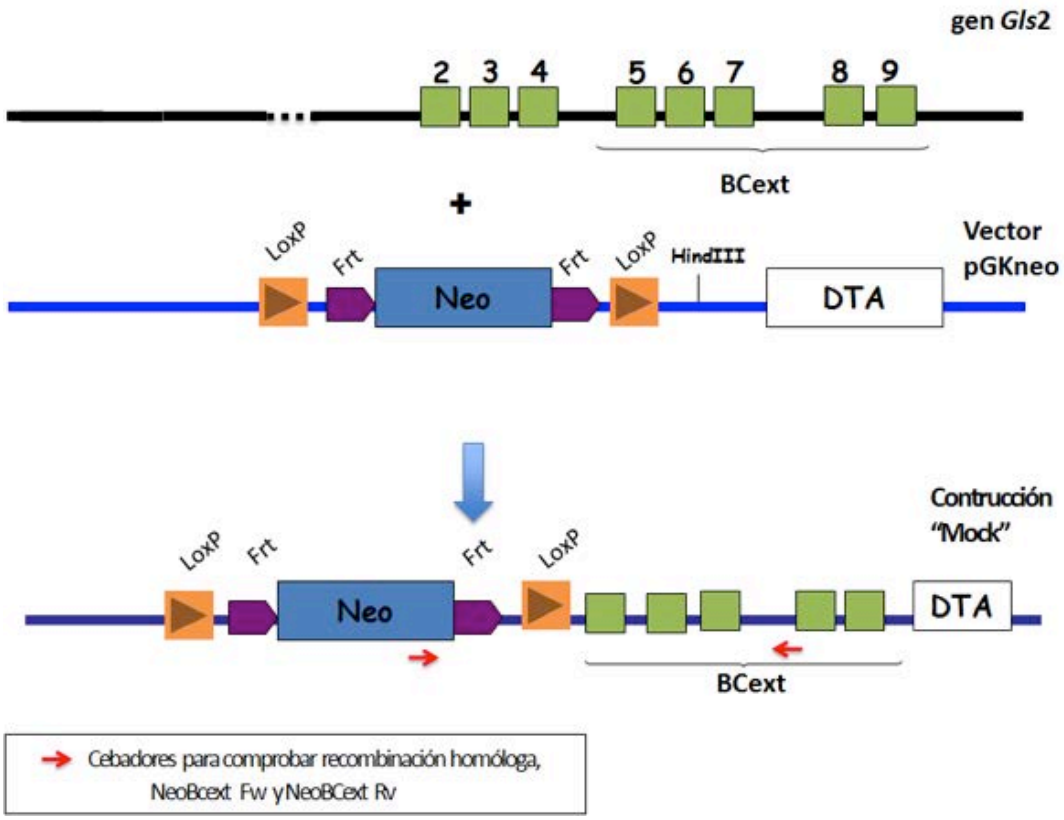


Figura 7. Estructura de la construcción ficticia o "Mock". Esquema del gen *Gls*2 indicando la zona en la que se sitúa el BCext; esquema del vector pGKneo y esquema de la construcción "Mock". Neo: gen de resistencia a la neomicina para selección positiva, DTA: gen de la toxina de la difteria para la selección negativa, LoxP: sitios de reconocimiento LoxP, Frt: sitios de reconocimiento Frt.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2. Construcción de la casete transgénica

El proceso de construcción de la casete transgénica es complejo y se ha de realizar siguiendo una serie de pasos intermedios. En primer lugar, se han de obtener los distintos fragmentos del gen *Gls*2 y, posteriormente, éstos se han de clonar en un vector intermedio (pGEMT o pTOPO), cuya amplificación y purificación permitirá obtener la cantidad necesaria de cada fragmento para realizar subclonaciones consecutivas en el vector de transferencia pGKneo.

2.1 Obtención de los fragmentos del gen *Gls*2 mediante *Long* PCR

Para la obtención de los brazos de homología y de las regiones a eliminar posteriormente desde el gen *Gls*2, se han diseñado cebadores en cuyo extremo 5’ se han añadido dianas específicas para el corte con enzimas de restricción concretas (véase apartado de Materiales y Métodos). La introducción de dichas dianas permitirá la clonación en el sitio de restricción deseado en el vector de transferencia pGKNeo. Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia del gen *Gls*2 y las PCRs se llevaron a cabo empleando el clon BAC RP23 como DNA molde. En las siguientes Figuras se muestran fotografías de geles de agarosa obtenidos tras las reacciones de *Long* PCR, en los que se pueden distinguir cada uno de los fragmentos amplificados.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

➔ Brazo largo de homología (BL). Para llevar a cabo esta reacción de *Long* PCR se utilizaron los cebadores BL Fw y BL Rv, en los que se añadió la secuencia diana de *SacII* en el extremo 5'. El fragmento BL posee 3.8 kb de la región flanqueante 5' del gen *Gls2* (ver Apéndice):

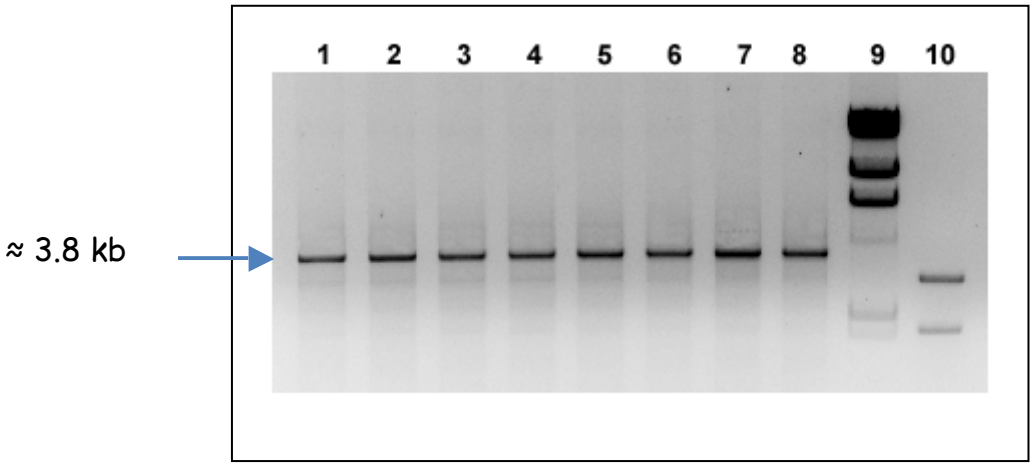


Figura 8. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción de *Long* PCR para la obtención del brazo largo de homología. 1➔8: producto de las reacciones de PCR para la obtención del BL, de 3.8 kb longitud. **9**: marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **10**: marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

➔ Fragmento EX2, con una longitud de 2481 pb y que comprende 2292 pb del intrón 1, las 100 pb del exón 2 y 90 pb del intrón 2 (secuencia completa en Apéndice). Representa el fragmento a eliminar posteriormente entre los sitios loxP de la construcción A. Los cebadores usados fueron EX2 Fw y EX2 Rv, que incluyen la secuencia diana de *XmaI* en 5':

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

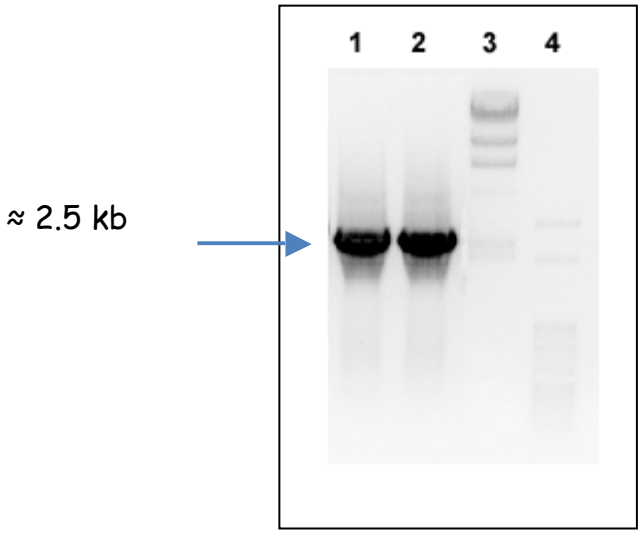


Figura 9. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción de *Long* PCR para la obtención del fragmento EX2. 1,2: producto de las reacciones de PCR para la obtención del EX2, de longitud 2481 pb. **3**: marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **4**: marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

➔ Brazo corto de homología BC2 (válido para la construcción A). La región del brazo corto BC2 de 2007 pb abarca la zona comprendida desde el intrón 2 hasta el intrón 6, incluyendo los exones 3, 4, 5 y 6 (secuencia completa en el Apéndice). Se usaron los cebadores BC2 Fw y BC2 Rv, que incluyen la secuencia diana de *HindIII* en 5':

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

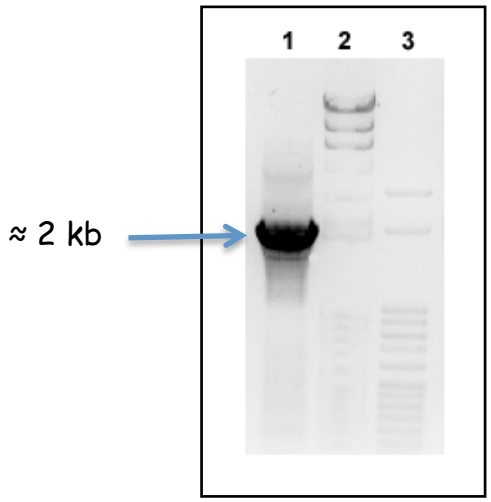


Figura 10. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción de *Long* PCR para la obtención del fragmento BC2. 1: producto de las reacciones de PCR para la obtención de BC2, de longitud 2006 pb. **2**: marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **3**: marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

➔ Fragmento EX234, de 2715 pb comprende la zona incluida entre los exones 2 y 4 (secuencia completa en el Apéndice). Representa el fragmento a eliminar posteriormente entre los sitios LoxP en la construcción B. Los cebadores usados fueron EX234 Fw y EX234 Rv, que incluyen la secuencia de *XmaI* en 5':

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

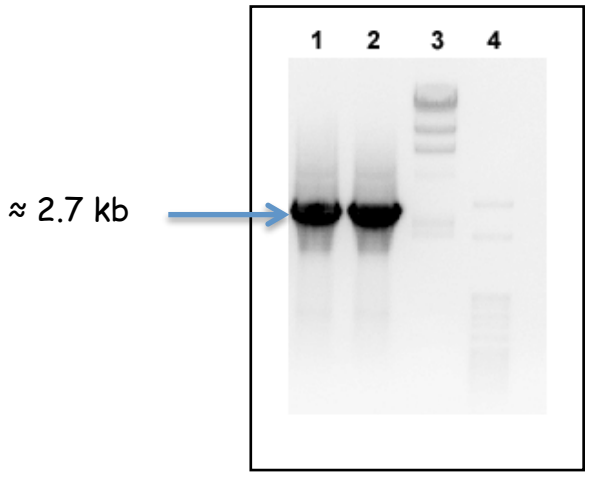


Figura 11. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción de *Long* PCR para la obtención del fragmento EX234. 1,2: producto de las reacciones de PCR para la obtención del EX234, de longitud 2715 pb. **3**: marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **4**: marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

➔ Brazo corto de homología BC234 (válido para la construcción B). Fragmento de 1975 pb que comprende la zona desde el intrón 4 al intrón 7, incluyendo los exones 5, 6 y 7 (secuencia en Apéndice). Los cebadores utilizados, BC234 Fw y BC234 Rv, incluyen la diana *SalI* en el extremo 5':

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

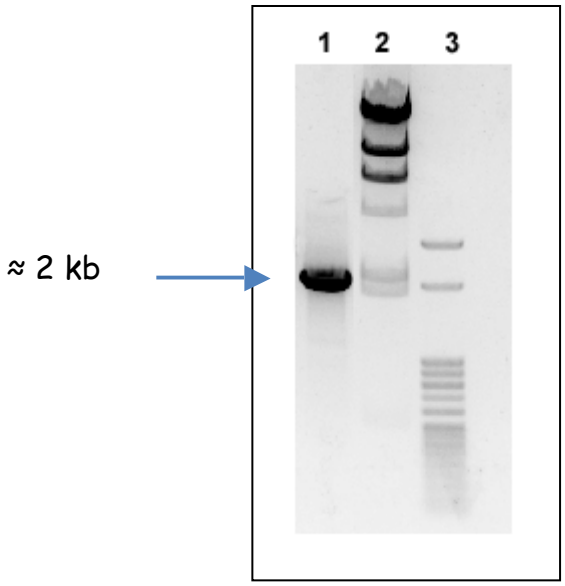


Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción de *Long* PCR para la obtención del fragmento BC234. 1: producto de las reacciones de PCR para la obtención de BC234, de longitud 1975 pb. **2**: marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **3**: marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

➔ Brazo corto extendido (BCext) (válido para las construcciones A y B). Región de 3990 pb que comprende las zonas incluidas en BC2 y BC234 y se extiende hasta la zona del intrón 9 (secuencia completa en Apéndice). Para amplificar este fragmento se utilizaron los cebadores BCext Fw y Rv, que incluyen la secuencia diana de la enzima *HindIII* en el extremo 5':

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

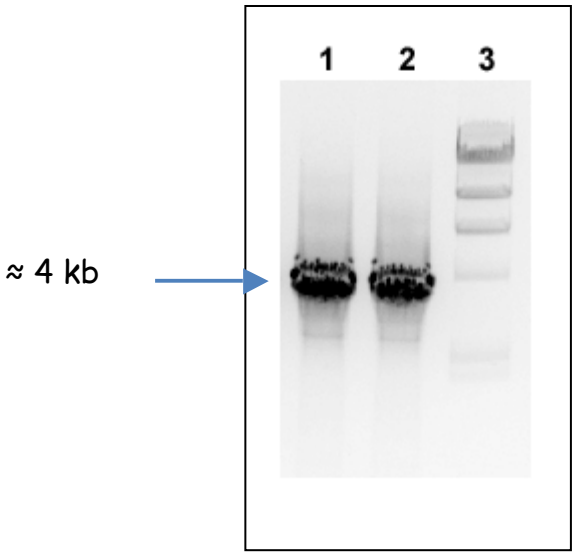


Figura 13. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de reacción de *Long* PCR para la obtención del fragmento BCext. 1: producto de las reacciones de PCR para la obtención de BCext, de longitud 3990 pb. **2**: marcador de masa molecular λ-*HindIII*.

2.2 Clonación de los fragmentos en vectores intermedios

Cada uno de los fragmentos amplificados por PCR se introdujo en un vector intermedio, como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez conseguida la subclonación, los distintos fragmentos fueron comprobados por secuenciación y análisis de restricción. A partir de la amplificación de las construcciones obtenidas en estos vectores es posible disponer de la cantidad deseada de inserto. Además, la inserción de una diana para una enzima de restricción concreta permite su subclonación en el vector de transferencia pGKneo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

➔ Clonación de BC2 en el vector pGEM-T

El vector pGEMT ligado al inserto BC2 (pGEMT-BC2) se digirió con la enzima *HindIII*, dando como resultado una banda de unas 3 kb, correspondiente al vector lineal y una banda a una altura de 2 kb, correspondiente al inserto:

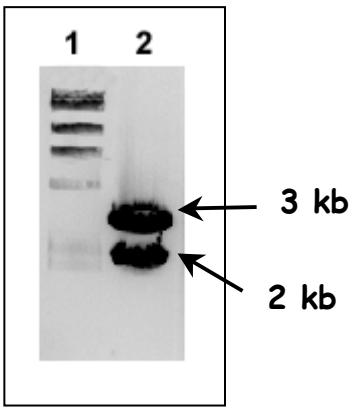


Figura 14. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGEMT-BC2 con *HindIII*. La banda de 3 kb corresponde al vector pGEMT. La banda que se encuentra a la altura de unos 2 kb corresponde al inserto BC2.**1**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **2**, pGEMT-BC2 digerido con *HindIII*.

La banda de 2 kb se envió a secuenciar, comprobándose que la secuencia coincidía con la del fragmento BC2.

➔ Clonación de BC234 en pGEMT

Tras la ligación y transformación del vector pGEMT con el fragmento BC234 (pGEMT-BC234), el vector resultante se digirió con la enzima *SalI*, dando como resultados dos fragmentos: uno de 3 kb aproximadamente, que correspondería al vector pGEMT; y otro cercano a 2 kb, que se corresponde con el tamaño del inserto BC234:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

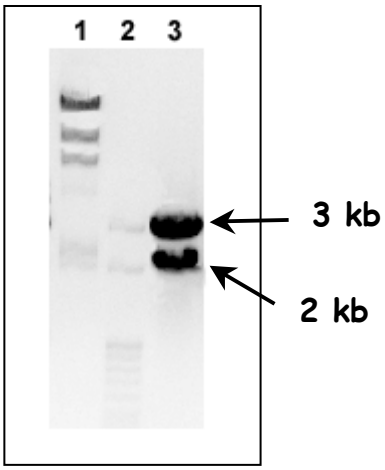


Figura 15. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGEMT-BC234 con *SalI*. La banda a 3 kb corresponde al vector pGEMT. La banda que se encuentra a la altura próxima a 2 kb corresponde al inserto BC234.**1**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **2**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.**3**, pGEMT-BC234 digerido con *SalI*.

Con el objeto de comprobar que la secuencia del inserto liberado se correspondía con la de BC234, la banda de 2 kb se envió a secuenciar, dando resultado positivo.

➔ Clonación de EX2 en pCR®-XL-TOPO (pTOPO):

El fragmento EX2 se insertó por clonación en el vector pCR®-XL-TOPO (pTOPO). El vector resultante pTOPO-EX2 se digirió con la enzima *XmaI*, liberando un fragmento de unas 2.5 kb:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

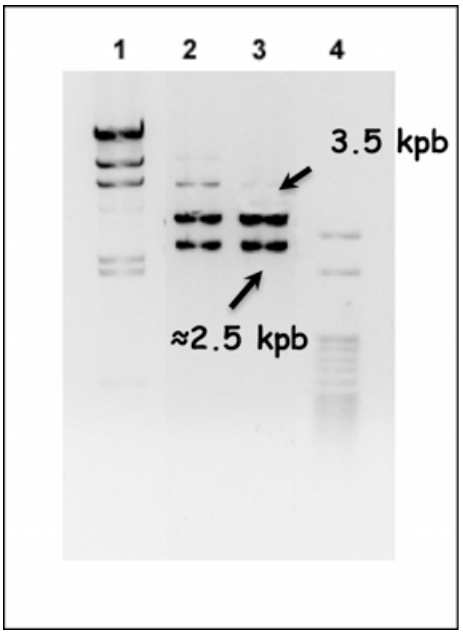


Figura 16. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pTOPO-EX2 con *XmaI*. Las bandas que se observan a 3.5 kb corresponden al vector pTOPO. La banda que se encuentra a la altura de unas 2.5 kb corresponde al inserto EX2.**1**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **2,3**, pTOPO-EX2 digerido con *XmaI*. **4**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

Además de liberar el inserto con el tamaño esperado, se comprobó que este correspondía con la secuencia de EX2 mediante secuenciación.

➔ Clonación de EX234 en pTOPO:

El vector obtenido tras la clonación de EX234 en pTOPO, vector pTOPO-EX234, se sometió a digestión con la enzima *XmaI*. El resultado puede verse en la Figura 17, donde se observa una foto de la electroforesis en gel de agarosa de la digestión mencionada:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

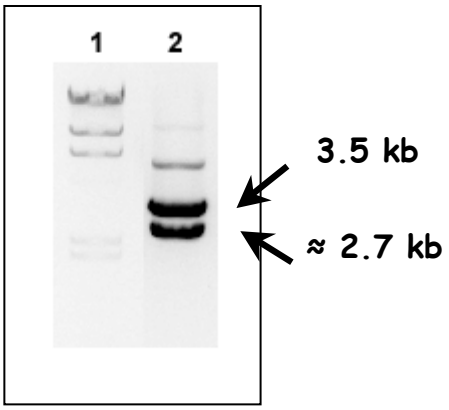


Figura 17. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pTOPO-EX234 con *XmaI*. La banda que se observan a 3.5 kb corresponde al vector pTOPO. La banda que se encuentra a la altura de unas 2.7 kb corresponde al inserto EX234.**1**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **2,** pTOPO-EX234 digerido con *XmaI*.

Además de comprobar la ligación por digestión enzimática, la banda de 2.7 kb también se envió a secuenciar, comprobando así su identidad.

➔ Clonación de BCext en pTOPO:

La clonación del fragmento BCext en el vector pTOPO dio como resultado el vector pTOPO-BCext. El resultado de la digestión de este vector con la enzima *HindIII* puede verse en la siguiente Figura:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

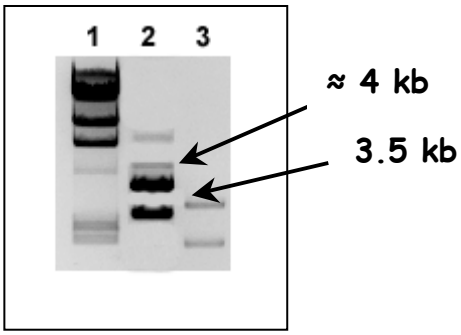


Figura 18. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pTOPO-BCext con *HindIII*. La banda que se observa a 3.5 kb corresponde al vector pTOPO lineal. La banda que se encuentra a la altura próxima a 4 kb corresponde al inserto BCext.**1**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **2,** pTOPO-BCext digerido con *HindIIII*. **3**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

La identidad de la banda cercana a 4 kb se comprobó también por secuenciación.

➔ Clonación de BL en pTOPO:

Se llevó a cabo la clonación del BL en el vector pTOPO dando lugar al vector pTOPO-BL. La Figura 19 muestra la digestión de pTOPO-BL con la enzima *SacII*:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

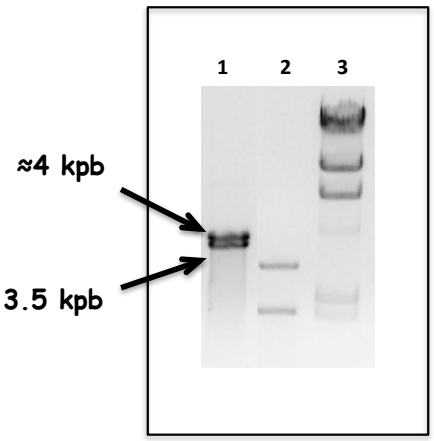


Figura 19. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pTOPO-BL con *SacII*. La banda que se observa a 3.5 kb corresponde al vector pTOPO lineal. La banda que se encuentra a la altura próxima a 4 kb corresponde al inserto BL.**1**, pTOPO-BL digerido con *SacII* **2,** marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.**3**, marcador de masa molecular λ-*HindIII.*

Se ratificó también la identidad del fragmento BL mediante secuenciación.

2.3 Clonación en pGKneo: construcciones A, B, "Mock" y EUCOMM. Prueba de PCR

Como se ha comentado en el apartado anterior, la clonación de los distintos fragmentos en el vector pGKneo, para la obtención de la construcción final, se lleva a cabo previa purificación de los fragmentos obtenidos en las construcciones realizadas en los vectores intermedios pGEMT y pTOPO. A partir de ellas, fuimos obteniendo, por etapas sucesivas de subclonación, los fragmentos correspondientes al brazo largo de homología, zona a eliminar y brazo corto de homología, en el vector de transferencia pGKneo.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.3.1 Construcción A

En primer lugar, la digestión de pGEMT-BC2 con *HindIII* recuperó el fragmento BC2 y permitió la subclonación en el sitio de restricción *HindIII* del vector pGKneo. En la Figura 20 puede observarse una electroforesis en gel de agarosa del plásmido pGKneo-BC2 digerido con *HindIII* procedente de su extracción a partir de una colonia positiva.

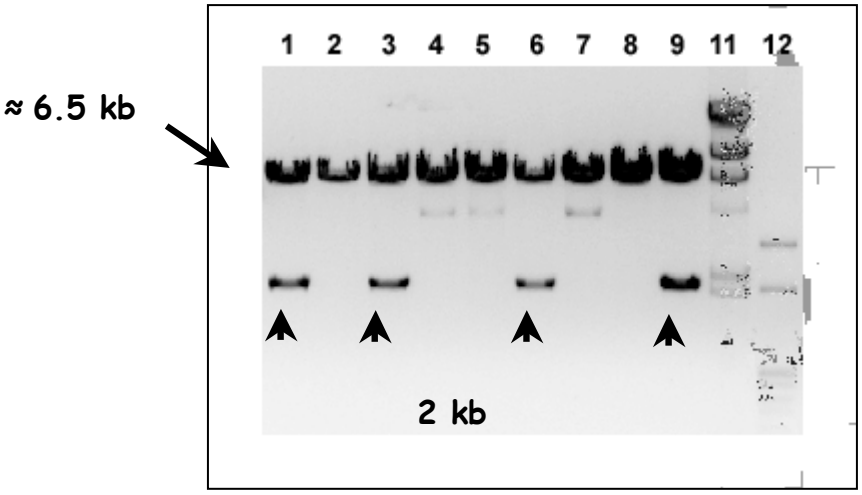


Figura 20. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGKneo-BC2 con *HindIII*. A la altura aproximada de 6.5 kb puede verse el vector pGKneo lineal (el vector sin inserto presenta un tamaño de 6465 pb). Las flechas señalan las colonias en las que se liberó un inserto de 2 kb, que coincide con el tamaño del BC2. **1→9** digestiones con la enzima *HindIII* de las colonias transformadas con pGKneo-BC2. **11**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **12**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

Analizando el resultado de la electroforesis mostrada en la Figura 20, observamos que los plásmidos procedentes de las colonias 1,3, 6 y 9 liberaron el inserto del tamaño del BC2 (señalados con flechas en la Figura 20).

Dado que la subclonación de los fragmentos no es dirigida, además de comprobar la presencia de inserto es necesario validar la orientación correcta

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

del mismo. Para ello se procedió a un análisis de restricción digiriendo con enzimas que originan un patrón de bandas diferente según la orientación del inserto.

A modo de ejemplo, vemos en la Figura 21 el análisis electroforético del plásmido obtenido de una de las colonias positivas que se muestran en la Figura 20, digerido con las enzimas *KpnI* y *EcoRV*. Comprobamos que el patrón de bandas obtenido coincide con el teórico de orientación correcta. Este resultado se repitió para los plásmidos correspondientes a todas las colonias seleccionadas que se muestran en la Figura 20 (colonias 1, 3, 6 y 9).

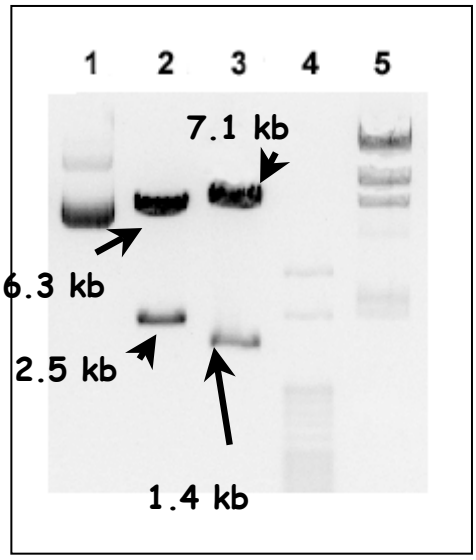


Figura 21. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGKneo-BC2 con *KpnI y EcoRV*.1: plásmido sin digerir*;* **2,** plásmido digerido con *KpnI*; las flechas indican los tamaños de las bandas cuando el inserto se ha introducido en la orientación deseada, 6.3 y 2.5 kb **3,** plásmido digerido con *EcoRV;* las flechas indican los tamaños de las bandas, 7.1 y 1.4 kb, correspondientes a orientación correcta de inserto **4**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb. **5**, marcador de masa molecular λ-*HindIII.*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Además, la identidad del inserto BC2 también se comprobó por secuenciación.

Una vez obtenido el vector pGKneoBC2, se procedió a la obtención del fragmento de DNA EX2 mediante digestión del vector intermedio pTOPO-EX2 con la enzima *XmaI*. Seguidamente, efectuamos la clonación del fragmento en el sitio *XmaI* del vector pGKneoBC2. En la siguiente Figura observamos una electroforesis del plásmido pGKneoBC2-EX2, obtenido a partir de una colonia positiva de bacterias transformadas, digerido con la enzima *XmaI*.

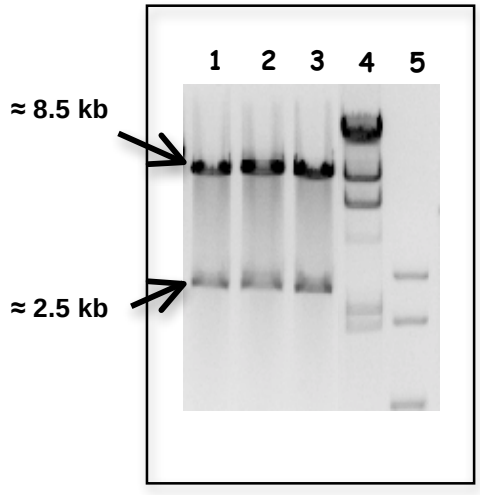


Figura 22. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGKneoBC2-EX2 con *XmaI*. A la altura aproximada de 8.5 kb se observa el vector pGKneoBC2 lineal. La flecha señala una altura correspondiente a unas 2.5 kb, tamaño coincidente con el correspondiente al fragmento EX2. **1→3** digestiones de colonias transformadas con el vector pGKneoBC2-EX2 con la enzima *XmaI*. **4**, marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **4**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

En este caso también se llevó a cabo un análisis de restricción con la enzima *ApaI* para comprobar la orientación del inserto EX2 en el vector

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

pGKneoBC2-EX2. El resultado de una digestión típica puede observarse en la Figura 23.

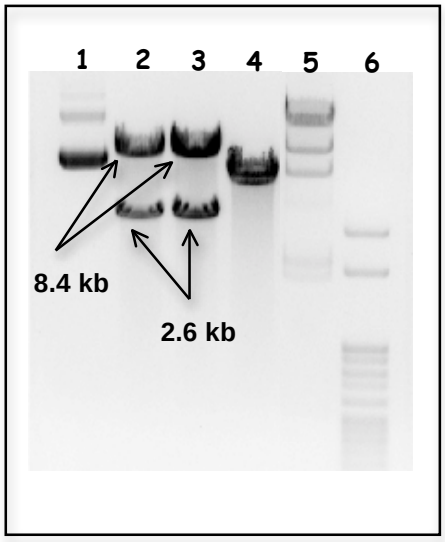


Figura 23. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGKneoBC2-EX2 con *ApaI*. Las flechas señalan los tamaños obtenidos al digerir dos plásmidos procedentes de colonias positivas en las que el inserto se ha introducido con la orientación deseada. **1,** plásmido sin digerir. **2 y 3,** plásmidos procedentes de dos colonias distintas de bacterias digeridas con *ApaI*; las flechas indican los tamaños esperados cuando el inserto se ha introducido en orientación sentido: bandas de 8443 y 2557 kb. **4,** plásmido procedente de una colonia positiva de bacterias digerida con *ApaI;* la orientación en este caso fue contraria a la esperada: bandas de 6557 y 4423 kb. **5,** marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **6**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

El análisis de restricción se realizó con DNA extraído de todas las colonias bacterianas que resultaron positivas tras la transformación. Aquellos plásmidos que presentaron un patrón de bandas correspondiente a la orientación del inserto deseada se enviaron también a secuenciar, comprobando así la identidad de la secuencia.

El último paso para la obtención de la construcción A completa consiste en la integración del brazo largo de homología en el vector pGKneoBC2EX2 en

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

el sitio de restricción *SacII*. El fragmento de DNA BL se obtuvo a través de la digestión de pTOPO-BL con la misma enzima. En la siguiente Figura observamos el resultado de la digestión del plásmido pGKneoBC2EX2-BL con la enzima *SacII*.

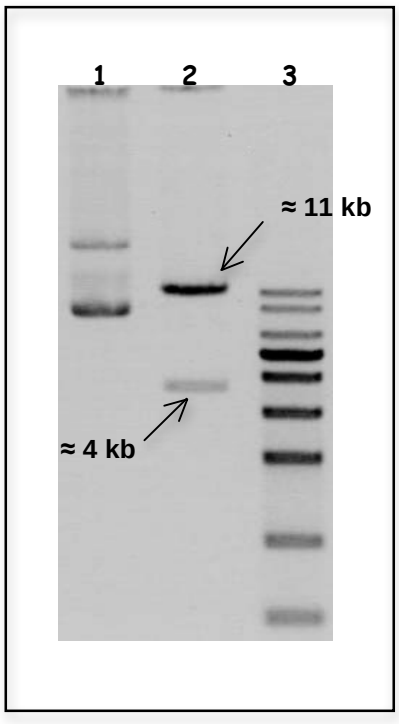


Figura 24. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGKneoBC2EX2-BL con *SacII*. Las flechas señalan las alturas correspondientes al plásmido pGKneoBC2EX2 lineal (unas 11 kb) y al inserto BL liberado (≈ 4 kb). **1,** plásmido pGKneoBC2EX2-BL sin digerir. **2**, plásmido pGKneoBC2EX2-B digerido con *SacII*. **3**, marcador de masa molecular de alto rango *HRL* (1.5-10 kb).

El plásmido pGKneoBC2EX2BL se secuenció directamente comprobando la identidad del inserto BL y la orientación sentido del mismo. Se completó así la construcción A, correspondiente al plásmido pGKneoBC2EX2BL, quedando lista para la electroporación en células madre embrionarias murinas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2.3.2 Construcción B

El primer paso para la obtención de la construcción B consiste en la digestión de pGEMT-BC234 con *SalI*, obtención del fragmento BC234 y subclonación del mismo en el sitio *SalI* del vector pGKneo. Las colonias obtenidas tras clonación del inserto BC234 en el sitio de restricción del vector mencionado se analizaron directamente por *PCR-colony*, realizada con los cebadores empleados para la obtención del mismo BC234Fw y BC234Rev. En la Figura 25 vemos una muestra del resultado de la PCR:

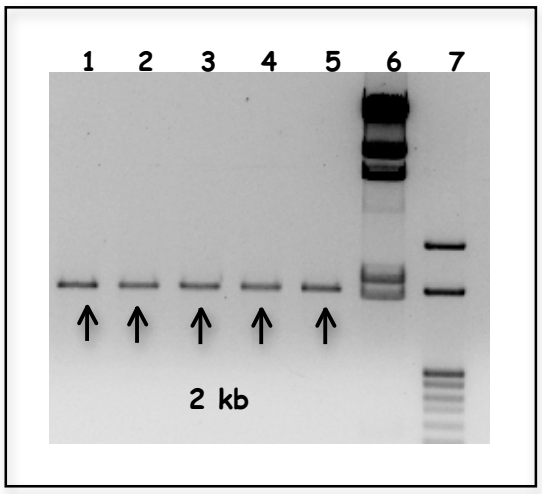


Figura 25. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la *PCR-colony* realizada sobre colonias transformadas con pGKneoBC234. Las flechas señalan el tamaño obtenido al realizar la PCR con los cebadores BC234Fw y BC234Rev. Fragmento amplificado de 2 kb, correspondiente al tamaño esperado de inserto. **1→5,** resultado de la PCR sobre cinco colonias distintas. **6,** marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **7**, marcador de masa molecular con fragmentos que se diferencian en 50 pb.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Se extrajo el material genético de aquellas colonias que amplificaron el tamaño esperado de 2 kb y se envió a secuenciar, comprobando así la identidad y orientación del inserto BC234, consiguiendo el vector pGKneoBC234. En este punto se encuentra el avance en la construcción B. De forma análoga a la construcción A, los siguientes pasos a llevar a cabo requerirán la subclonación de los fragmentos EX234 y BL, sucesivamente, en el vector de transferencia pGKneo.

2.3.3 Construcción “Mock”

Para la obtención de la construcción ficticia o de prueba “Mock”, se procedió a la purificación del inserto BCext, a partir del vector intermedio pTOPO-BCext, y a la subclonación en el sitio *HindIII* del vector pGKneo. Puesto que la finalidad de esta construcción es la ratificación de la utilidad de los cebadores NeoBCext directo y reverso, de nuevo es importante comprobar la orientación del inserto en la construcción pGKneo-BCext. En la Figura 26 tenemos una muestra del análisis realizado para determinar la orientación del inserto:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

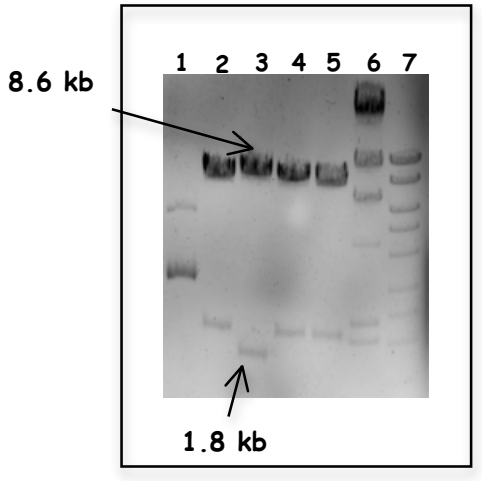


Figura 26. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pGKneo-BCext con *EcoRV*. Las flechas señalan los tamaños obtenidos al digerir DNA plasmídico procedente de una colonia positiva en la que el inserto se ha introducido con la orientación deseada. **1,** plásmido sin digerir. **2, 4 y 5,** plásmidos procedentes de colonias distintas digeridos con *EcoRV*; la orientación en este caso fue contraria a la esperada: bandas de longitud 8263 y 2183 pb. **3,** plásmido procedente de una colonia positiva digerido con *EcoRV;* las flechas indican los tamaños esperados cuando el inserto se ha introducido en orientación sentido: bandas de longitud 8638 y 1818 pb **6,** marcador de masa molecular λ-*HindIII*. **7**, marcador de masa molecular de alto rango *HRL* (1.5-10 kb).

El plásmido cuyo resultado en análisis de restricción dio positivo se envió a secuenciar, finalizando así el proceso de obtención de la construcción pGKneoBCext o construcción “Mock”. Tomando como molde este plásmido, se realizaron PCRs con los cebadores NeoBCext Fw y NeoBCext Rv para poner a punto las condiciones de la reacción y comprobar que los cebadores amplifican correcta y específicamente. Podemos observar el resultado en la siguiente Figura:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

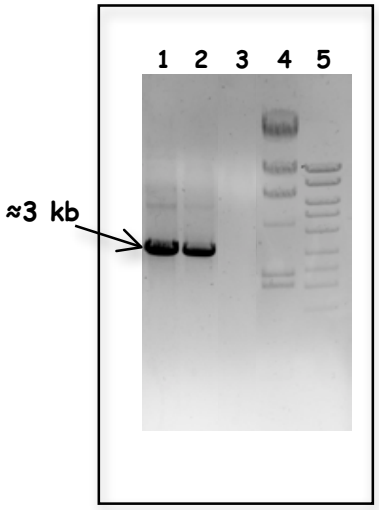


Figura 27. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR sobre pGKneoBCext. La imagen muestra el resultado de la reacción de PCR sobre la construcción "Mock", demostrando la idoneidad de los cebadores NeoBCext Fw y NeoBCext Rv. **1 y 2**, PCR sobre DNA molde a distintas concentraciones; la flecha señala la altura correspondiente al amplicón esperado (2975 pb). **3**, control negativo de la PCR. **4**, marcador de masa molecular *λ-HindIII*. **5**, marcador de masa molecular de alto rango *HRL* (1.5-10 kb).

2.3.4 Construcción de EUCOMM

Como ya hemos comentado al comienzo del apartado de Resultados, la presencia o ausencia del exón 1 en el brazo largo de homología nos permitirá progresar en la obtención de ratones KO para el gen *Gls*2 que serán condicionales para las distintas isoformas GLS2 (GAB y LGA). Tanto la construcción A (terminada) como la construcción B (en progreso) presentan una mutación que daría lugar a un KO directo de GAB y condicional de LGA. Se adquirió del consorcio EUCOMM (The European Conditional Mouse Mutagenesis) una línea celular ES murina transgénica que contenía una casete transgénica de *Gls2* que hemos llamado construcción C. La construcción C posee todos los elementos necesarios para realizar un KO condicional

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

descritos en este apartado anteriormente (Figura 28): lleva inserta un brazo de homología en el extremo 5' de 5.3 kb que incluye el exón 1 del gen *Gls*2 y un brazo de homología en el extremo 3' de 6.99 kb. Los sitios LoxP se encuentran flanqueando los exones a eliminar (secuencias desde el exón 2 hasta el exón 7) y los sitios Frt flanquean al gen de la neomicina de selección positiva (ver secuencias completas en Apéndice). Al estar presente el exón 1 en el brazo de homología del extremo 5', la construcción C daría lugar a un KO condicional para ambas isoenzimas GAB y LGA.

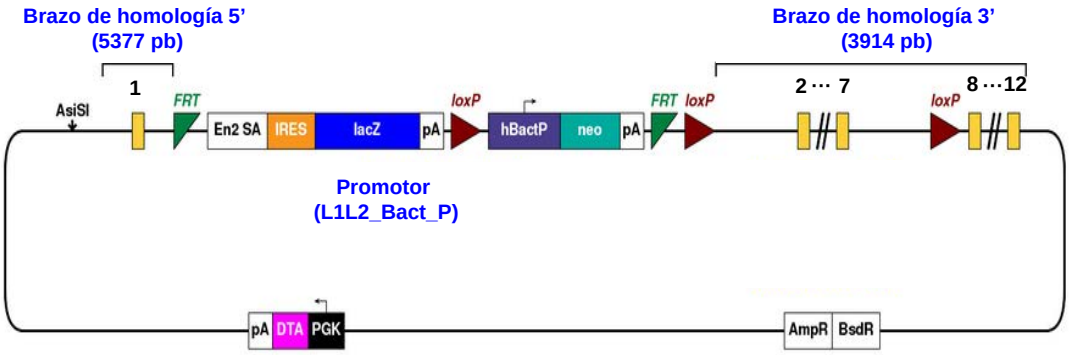


Figura 28. Estructura de la construcción EUCOMM. Se muestran las zonas de homología, la zona a eliminar y los sitios de reconocimiento de las recombinasas Cre y Flipasa. El brazo de homología 5' incluye secuencia 5'-flanqueante del gen *Gls*2, el exón 1 y parte del intrón 1, para un total de 5377 pb. Los exones 2 a 7, incluidos entre los sitios LoxP, serán eliminados tras cruce con los animales mutantes que expresan la recombinasa Cre. El brazo de homología 3' tiene una longitud de 3914 pb, incluyendo los exones "floxeados" y los exones 8 a 12. **Neo**: gen de resistencia a la neomicina para selección positiva, **LoxP**: sitios de reconocimiento LoxP, **Frt**: sitios de reconocimiento Frt, **DTA**: gen de la toxina de la difteria para la selección negativa.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

3. Resultado de la microinyección de células ES con construcción transgénica de *Gls2* adquirida de EUCOMM (construcción C)

La línea celular JM8A1.N3 se consiguió a través del consorcio EUCOMM, procedente de la estirpe C57BL6. El consorcio nos suministró igualmente la contrucción C (Figura 28), nueva construcción portadora del gen *Gls*2 modificado para generar animales KO condicionales totales de ambas isoenzimas GLS2 (GAB + LGA), así como células ES murinas mutantes conteniendo la casete transgénica por recombinación homóloga. La confirmación de la integridad del alelo mutante (integridad de la casete transgénica) fue confirmada mediante un genotipado por PCR, empleando cebadores específicos de los sitios LoxP y de las secuencias del gen *Gls*2 situadas en los brazos de homología 5' y 3' (Figura 29, Esquema 1 y Tabla 1).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

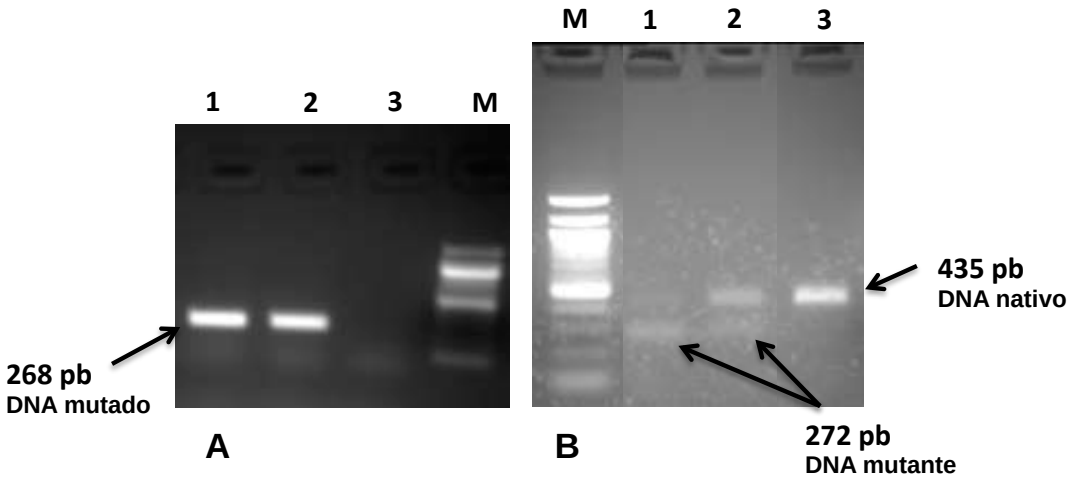
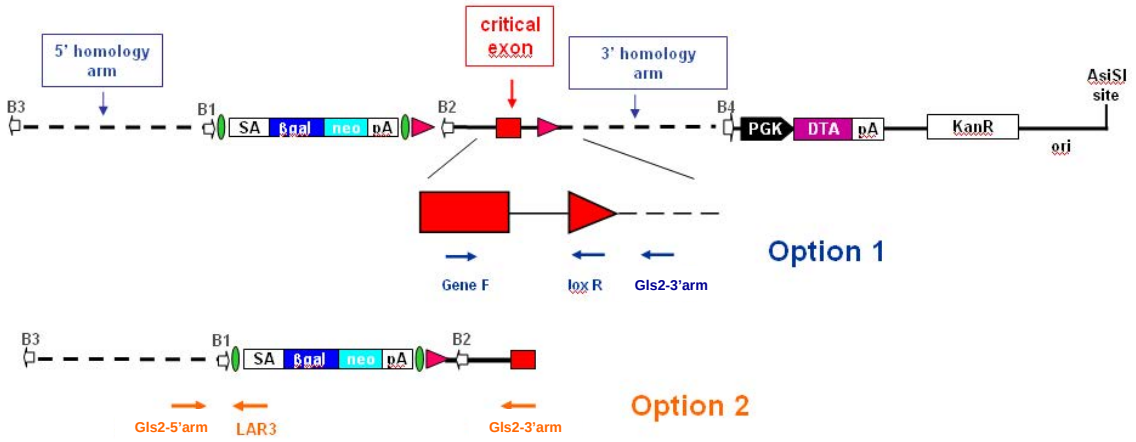


Figura 29. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR sobre dos clones de las células JM8A1.N3. Comprobación de la integridad del alelo mutante o casete transgénica de la construcción C con las células JM8A1.N3. **A**. Resultado de PCR empleando como cebador inverso LoxP reverse diseñado sobre secuencia únicamente presente en el clon mutante (sitio LoxP más 3'), y no en el DNA original. **1,** resultado de PCR sobre primer clon. **2**, resultado de PCR sobre segundo clon. **3**, resultado de PCR sobre DNA nativo sin mutación. **M**, marcador de masa molecular. **B.** Resultado de PCR empleando cebadores Gls2-5'arm, Gls2-3'arm y LAR3reverse (Tabla 1) que amplifican secuencias de distintos tamaños en el DNA nativo con respecto al DNA de los clones en los que se ha llevado a cabo la recombinación homóloga. **M**, marcador de masa molecular. **1**, resultado de PCR sobre primer clon. **2**, resultado de PCR sobre segundo clon. **3**, resultado de PCR sobre DNA nativo sin mutación.

Tabla 1. Cebadores para genotipado por PCR sobre los clones de las células JM8A1.N3.

Cebador	SECUENCIA	Sitio de hibridación
LoxP reverse	TGAACTGATGGCGAGCTCAGACC	Sitio LoxP más cadena abajo (3')
Gene F	TTGTGGTCAGCTCCCTGATCAAGG	Exón 7 (zona *floxed*)
Gls2-5'arm	TCCACCTGAGTGAGGTAGACATCC	Intrón 1, Brazo de homología 5'
Gls2-3'arm	ACCATCTGGCAGGTTCTGTGATCC	Exón 8, Brazo de homología 3'
LAR3reverse	CAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC	Vector, región *engrailed-2 splice acceptor* (En2/SA)

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



Esquema 1. Sitios de hibridación de los cebadores indicados en Tabla 1. Se indican dos opciones: opción 1, para la verificación de la integridad del gen *Gls*2 en la construcción C y la presencia del sitio 3'LoxP (Figura 29, A); opción 2, para comprobar los clones en los que se ha llevado a cabo la recombinación (Figura 29, B).

Se llevó a cabo el cultivo de la línea celular JM8A1.N3, con la construcción C integrada, junto con otra línea de células madre embrionarias ES procedentes de embriones resultantes de cruce entre cepas F1DAB2 y C57BL6, de capa oscura. En esta segunda línea celular se procederá a la transfección por electroporación de la construcción A. Ambas líneas celulares de descongelaron y cultivaron en placas con *feeder cells* (fibroblastos de ratón) inactivados durante tres días. Las células presentaban una morfología apropiada y llegaron a un 50-60% de confluencia (Figura 30).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

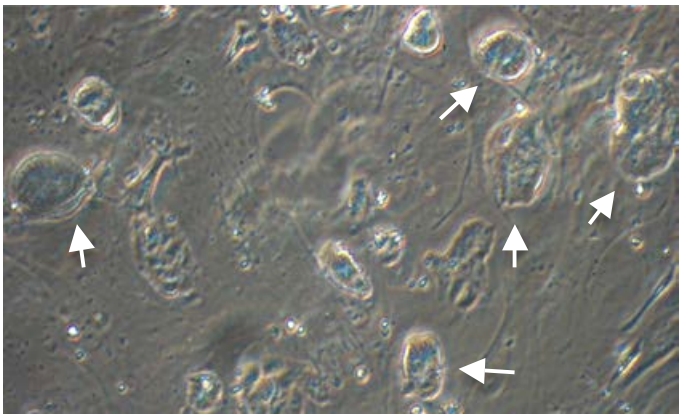


Figura 30. Imagen de un cultivo de células ES murinas. Las flechas señalan algunas de las células ES (forma de isla). Se observa también la capa de *feeder cells* (fibroblastos de ratón) sobre la que han crecido las células ES.

Posteriormente, se procedió a la microinyección de células JM8A1.N3 modificadas genéticamente en embriones de la cepa CD1, de capa blanca (Figura 31). La inyección se llevó a cabo en las fases de crecimiento de embrión de 8 blastómeras y se implantaron en el útero de la madre adoptiva, también CD1, a un tiempo igual a 12 horas posteriores al coito (Ramírez y col., 2009). Los resultados de los experimentos llevados a cabo, nacimiento de crías y quimerismo en ellas se recogen en la Tabla 2:

Tabla 2. Resumen de los distintos experimentos de microinyección de células JM8A1.N3 mutantes.

Experimento	Embriones inyectados	Número de ES	Transferencia	Nacimientos	Quiméricos	Nivel	
1	11	10	1	3	1	2	
2	43	12	2	6	4	ON	2 Muertos
3	42	12	2	2	2	ON	
4	47	12	2	0			

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5	20	10	1	0			
6	44	10	2	0			
7	30	9	2	1	0		
8	42	9	2	0			
9	42	4	2	0			
10	48	4	2	0			
11	20	2	1	4	0		
12	42	4	2	4	1	ON	
13	19	2	1				
14	12	3	1	2	0		
15	56	3	3	7	1	5	
16	14	5	1	2	1	1	
17	40	5	2	2	0		
18	16	10	1	1	1	ON	Muerto
19	14	10	1	2	1	1	
20	34	5	2	0			
21	18	5	1	0			
22	32	10	2	1	1		Muerto
23	53	2	2	0			
24	90	2	2	2	0		
25	37	2	2	5	0		
26	28	3	1	1	1		Muerto
27	29	3	1	3	1	ON	
Total	829			51	15		5

Se llevaron a cabo 27 experimentos en los que se realizaron un total de 829 inyecciones. Solo progresaron algunos de los embriones inyectados, dando lugar a la suma de 51 nacimientos. De los animales que nacieron,

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

fueron 15 los que dieron pruebas de quimerismo en distintos niveles. Los grados de quimerismo se asignaron en porcentajes del mismo de la siguiente forma:

- Nivel 1 → hasta un 25%
- Nivel 2 → entre 25 y 50%
- Nivel 3 → entre 50 y 75%
- Nivel 4 → entre 75 y 100%
- ON → animales con “ojos negros”, que corresponde a un grado de quimerismo entre 4 y 5.

Los animales quiméricos obtenidos (Figura 32) se han de cruzar con ratones de la estirpe CD1 para obtener animales homocigotos o fundadores. En este momento el proyecto se encuentra en esta fase de cruce de animales.

Una vez se obtengan animales fundadores, se debe continuar el estudio mediante el cruce con un segundo animal que exprese la recombinasa Cre en cerebro mediante un promotor específico y obtener así un ratón KO de *Gls*2 en cerebro, procedente de la modificación genética introducida por la construcción C.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

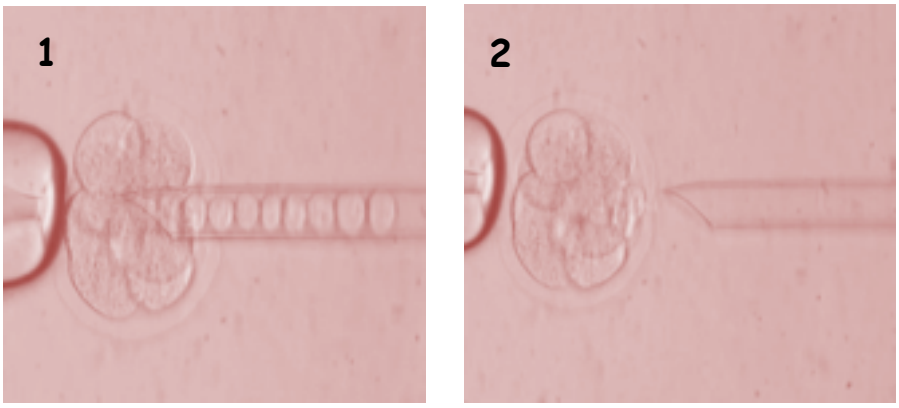


Figura 31. Imágenes muestra de microinyección. **1 y 2**, microinyección de células ES en embriones en estado de 8 células. Las células fueron inyectadas a través de una perforación en la zona pelúcida realizada mediante una aguja de inyección convencional.

Figura 32. Imágenes muestra de ratones quiméricos. Ratones quiméricos producidos por microinyección de células ES en el estadío de 8 blastoméras.

La construcción A se encuentra en una fase previa, futuros trabajos comprenderán la electroporación de la misma en células madre embrionarias

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

murinas ES (F1DAB2 x C57BL6) y comprobación de la integración y recombinación homóloga en el genoma mediante PCR (utilizando los cebadores NeoBCext Fw y NeoBCext Rv) y mediante selección negativa (incorporación/no incorporación gen DTA). Confirmada la recombinación homóloga, se procederá al cultivo y microinyección de las células tal y como se ha realizado con la línea JM8A1-N3.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4. Clonación, secuenciación y caracterización de transcritos del gen *Gls*2 en mamíferos

Además de iniciar y desarrollar las técnicas *knockout* para el futuro análisis de la función del gen *Gls2*, mediante el fenotipado de animales que posean su expresión anulada en tejidos concretos, tanto a nivel conductual como molecular, también realizamos estudios para profundizar en la regulación de la expresión génica del gen *Gls2* en mamíferos, incluyendo experimentos de caracterización de sus transcritos. Como se expuso en la Introducción, se han caracterizado dos transcritos del gen *Gls* de mamíferos (KGA y GAC), que aparecen por un mecanismo de corte y empalme alternativo, mientras que apenas nada se conoce acerca de la expresión y procesamiento del gen *Gls2*. Evidencias experimentales previas sugerían la posible existencia de transcritos alternativos del gen *Gls2*. Así, el cDNA de la GA tipo L aislado de células ZR-75 de cáncer de mama (Gómez-Fabre y col., 2000), y posteriormente denominado GAB (de la Rosa y col., 2009), mostró una secuencia de nucleótidos y aminoácidos con un notable grado de identidad con la isoenzima LGA de hígado de rata (89% y 94%, respectivamente) (Smith y col., 1990; Curthoys y Watford, 1995). Cabe destacar que también se encontraron importantes diferencias: la LGA de rata es 67 aminoácidos más corta que la GAB humana en el extremo N-terminal y la enzima de rata carece de todos los aminoácidos codificados por el exón 1 y los 6 primeros aminoácidos del exón 2 de la humana (Pérez-Gómez et al., 2003). Los resultados de estos estudios nos indujeron a pensar que la existencia de transcritos alternativos del gen *Gls*2 era muy probable, tal y como ocurre con el gen *Gls* de mamíferos. En el estudio

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

que se detalla a continuación, hemos usado una combinación de aproximaciones y técnicas bioquímicas, de biología molecular y bioinformáticas, que han conducido a la demostración, por primera vez, de la existencia de transcritos alternativos del gen ortólogo Gls2 en ratón, rata y humanos.

4.1 Aislamiento de transcritos alternativos del gen *Gls*2

El primer indicio de la existencia de transcritos alternativos para el gen *Gls2* de mamíferos surgió del análisis de secuencias de rata y ratón depositadas en las bases de datos *Rat Genome Sequencing Consortium*, *GenBank* y *Ensembl*. Detectamos que la zona 5'-UTR y el inicio de la secuencia codificante de la LGA de hígado de rata (Chung-Bonk y col., 1997) mostraban una gran similitud con las secuencias presentes en el extremo 3' del intrón 1 del gen *Gls*2 humano y de ratón, lo que sugería que un transcrito corto LGA podría también expresarse en estas especies. Por este motivo, diseñamos experimentos de RT-PCR sobre tejido humano y de ratón para aislar los transcritos cortos LGA ortólogos de la LGA de hígado de rata (Smith y Watford, 1990).

Para aislar los transcritos LGA por RT-PCR se diseñaron cebadores sentido en la zona final del intrón 1 del gen *Gls*2 humano (Pérez-Gómez y col., 2003) y de ratón (NCBI *Mus musculus Genome Build* 37.2). El cebador diseñado del intrón 1 humano se usó para amplificar el transcrito LGA de hígado y cerebro humano, mientras que el cebador derivado del intrón 1 de

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ratón sirvió para amplificar la LGA de rata y ratón, indistintamente. En todos los casos se empleó un único cebador antisentido, GSP-6, que alinea con el exón 2 del gen *GLS2* humano y con el exón 1 del gen *Gls2* de las especies rata y ratón. Los productos de PCR obtenidos presentaron el tamaño esperado; el análisis de su secuencia demostró una alta similitud con la isoenzima LGA de hígado de rata (Figura 33); lo cual demuestra que la expresión de la isoforma LGA ocurre en otras especies y tejidos y no está restringida únicamente a hígado de rata.

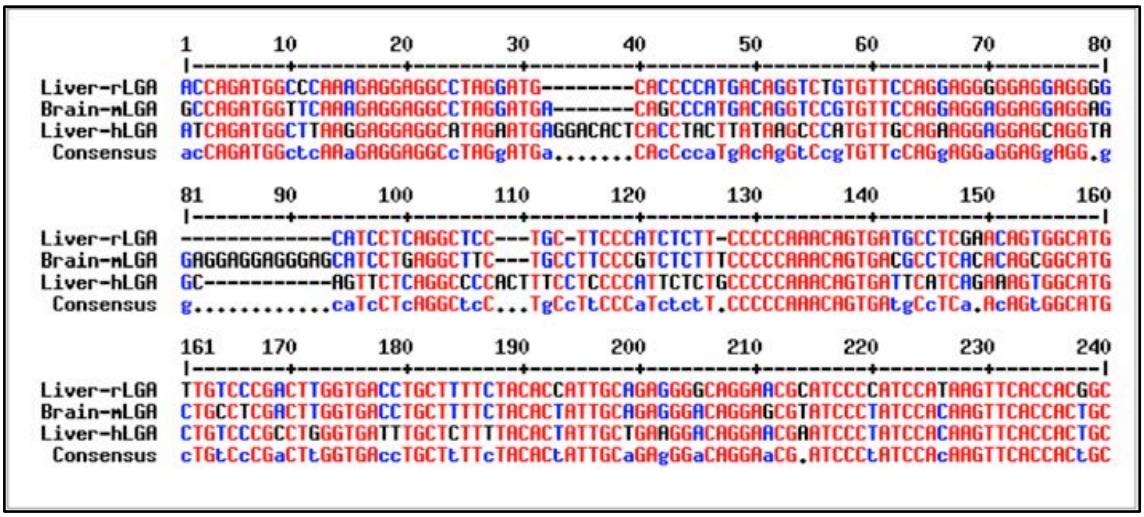


Figura 33. Comparación de las secuencias de los productos de RT-PCR para transcritos LGA en tejidos de rata, ratón y humano. La identidad de cada fragmento amplificado fue comprobada mediante alineamiento con la secuencia conocida del cDNA de la LGA de hígado de rata (GenBank#J05499), empleando el programa BLAST. Los fragmentos de la zona 5' de las secuencias de cDNA obtenidas por RT-PCR y correspondientes a las LGA de cerebro de ratón (Brain-mLGA) e hígado humano (Liver-hLGA) se alinearon con las secuencias de cDNA de la LGA de hígado de rata (Liver-rLGA). En color rojo se muestran los nucleótidos idénticos, mientras que los nucleótidos diferentes se muestran en azul. El alineamiento de la secuencia se realizó con el programa Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Posteriormente, intentamos encontrar secuencias genómicas homólogas al exón 1 del mRNA de la isoforma GAB humana en los genes GA de rata y ratón. Para ello, se realizó mediante BLAST una comparación de secuencia entre el exón 1 del mRNA de la isoforma GAB humana (Aledo y col., 2000; Pérez-Gómez y col., 2004) y las secuencias genómicas de rata (*Rnor 3.3, Rat Genome Sequencing Consortium*) y ratón (*Ensembl v35*). Mediante este análisis identificamos una región homóloga (identidad >95%) en la zona 5'-flanqueante de ambos genes *Gls2*, aproximadamente 5.2 y 4 kb cadena arriba de sus respectivos sitios de inicio de la transcripción (TSS) en el cromosoma 7 de rata y en el cromosoma 10 de ratón. Con esta evidencia experimental, se diseñó una nueva estrategia de RT-PCR para probar la existencia de transcritos ortólogos de GAB en hígado y cerebro de rata y ratón, con los cebadores y programas de RT-PCR detallados en Materiales y Métodos. Los productos obtenidos por RT-PCR se secuenciaron y el resultado se muestra en la Figura 34, donde podemos apreciar la homología con el cDNA de la isoenzima GAB aislado de células ZR-75 de cáncer de mama humano (Pérez-Gómez y col., 2000), demostrando que transcritos GAB se expresan también en rata y ratón.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

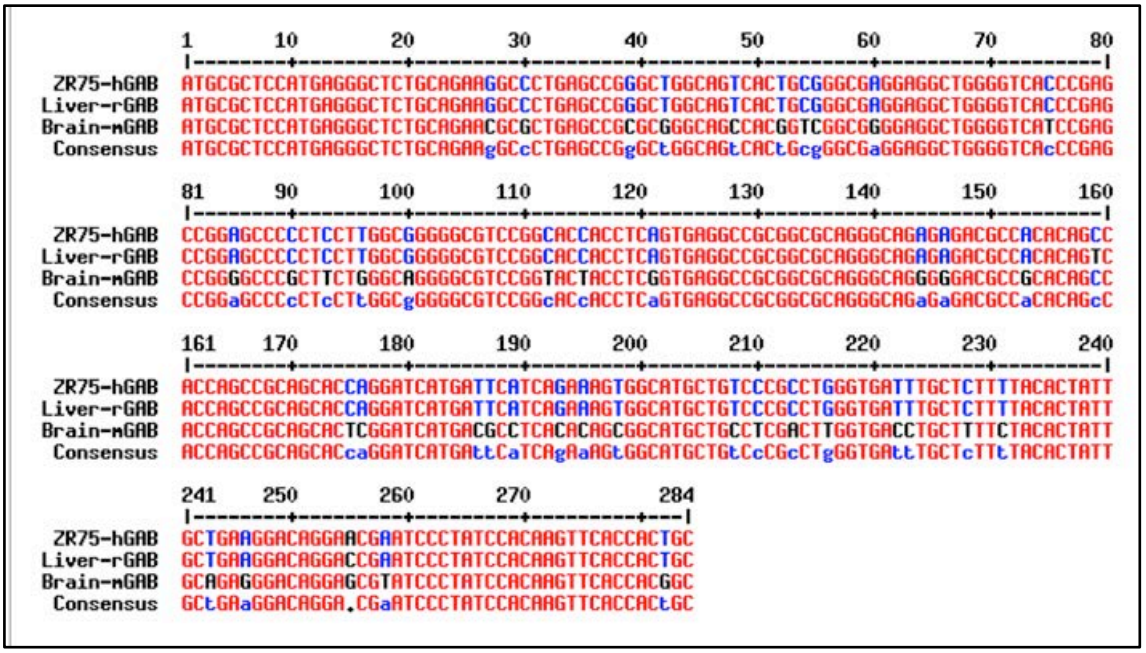


Figura 34. Comparación de las secuencias de los productos de RT-PCR para transcritos GAB en tejidos de rata, ratón y humano. La identidad de cada fragmento amplificado fue comprobada mediante alineamiento con la secuencia conocida de GAB humana (GeneBank #AF348119), empleando el programa BLAST. Los fragmentos de la zona 5' de las secuencias de cDNA obtenidas por RT-PCR y correspondientes a las GAB de hígado de rata (Liver-rGAB) y cerebro de ratón (Brain-mGAB) se alinearon con la secuencia de cDNA de la GAB de células ZR-75 de cáncer de mama humano (ZR75-hGAB). En color rojo se muestran los nucleótidos idénticos, mientras que los nucleótidos diferentes se muestran en azul. El alineamiento de la secuencia se realizó con el programa Multalin(http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/).

Una vez que demostramos la co-expresión de transcritos GLS2 en distintos tejidos de mamíferos, demostrando, por tanto, que la GAB humana no es el transcrito ortólogo de la LGA de hígado de rata, decidimos llevar a cabo la clonación del transcrito LGA humano para realizar una caracterización más profunda y estudios funcionales adicionales. Elegimos cerebro como el tejido de referencia para clonar este transcrito por RT-PCR. El transcrito fue secuenciado en su totalidad y la secuencia depositada en la base de datos

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GenBank (GenBank #775422) (Figura 35). La secuencia de nucleótidos de la isoforma LGA humana muestra una identidad del 89% con la LGA de hígado de rata (análisis con el programa BLAST); el transcrito presenta un marco abierto de lectura de 1698 nucleótidos que codifica una proteína teórica de 565 aminoácidos (Figura 35). Asimismo, se comprobó que la secuencia deducida de aminoácidos presenta un 91% de identidad con respecto a las proteínas LGA de rata y GAB humana (análisis con el programa Clustalw) (Figura 36).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

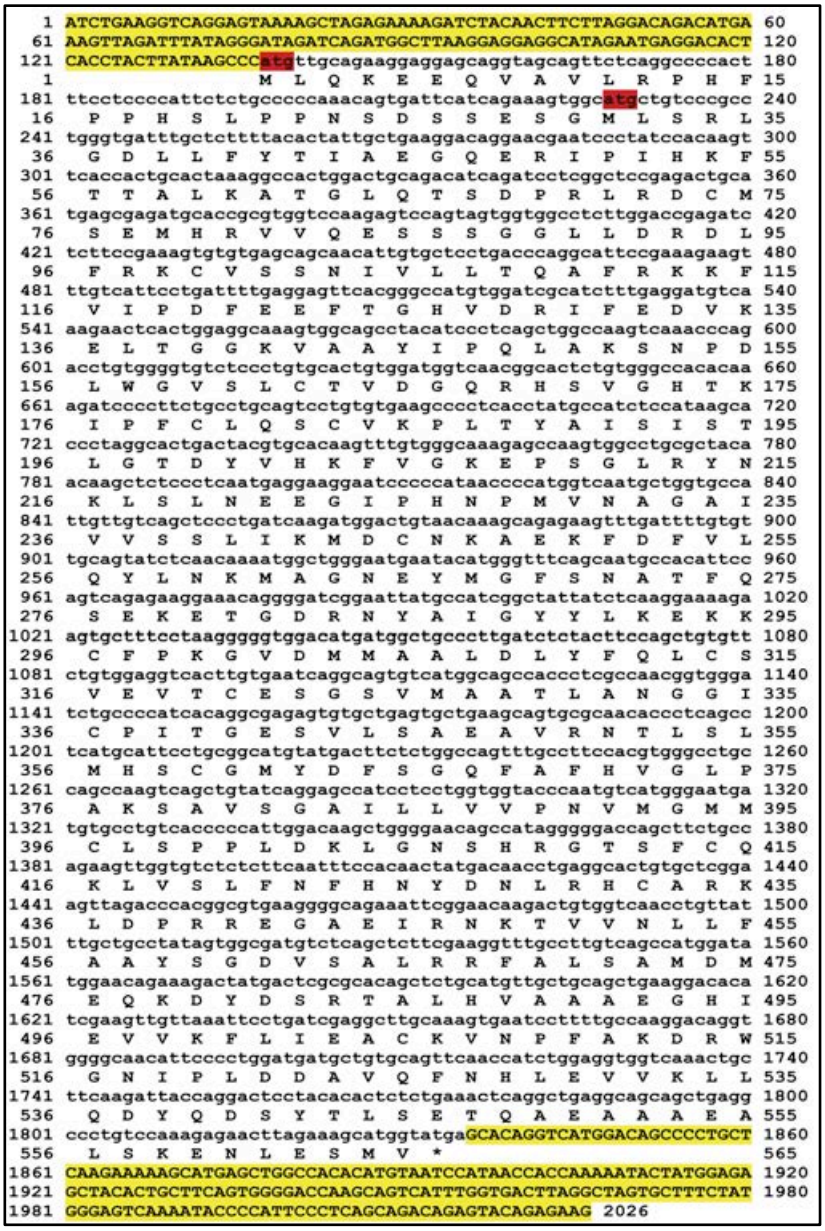


Figura 35. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del transcrito LGA humano. El transcrito corto LGA fue amplificado mediante RT-PCR a partir de mRNA de cerebro humano, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El cDNA aislado fue secuenciado en su totalidad y se muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos bajo ésta. Los dos primeros codones ATG de inicio de la traducción se marcan en rojo; las regiones 5'-UTR y 3'-UTR se muestran con fondo amarillo. El primer aminoácido es la metionina de inicio y el codón de parada está indicado con un asterisco. Se usó el programa Prettyseq para disponer en forma ordenada ambas secuencias (http://emboss.sourceforge.net/apps/release/6.4/emboss/apps/prettyseq.html).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

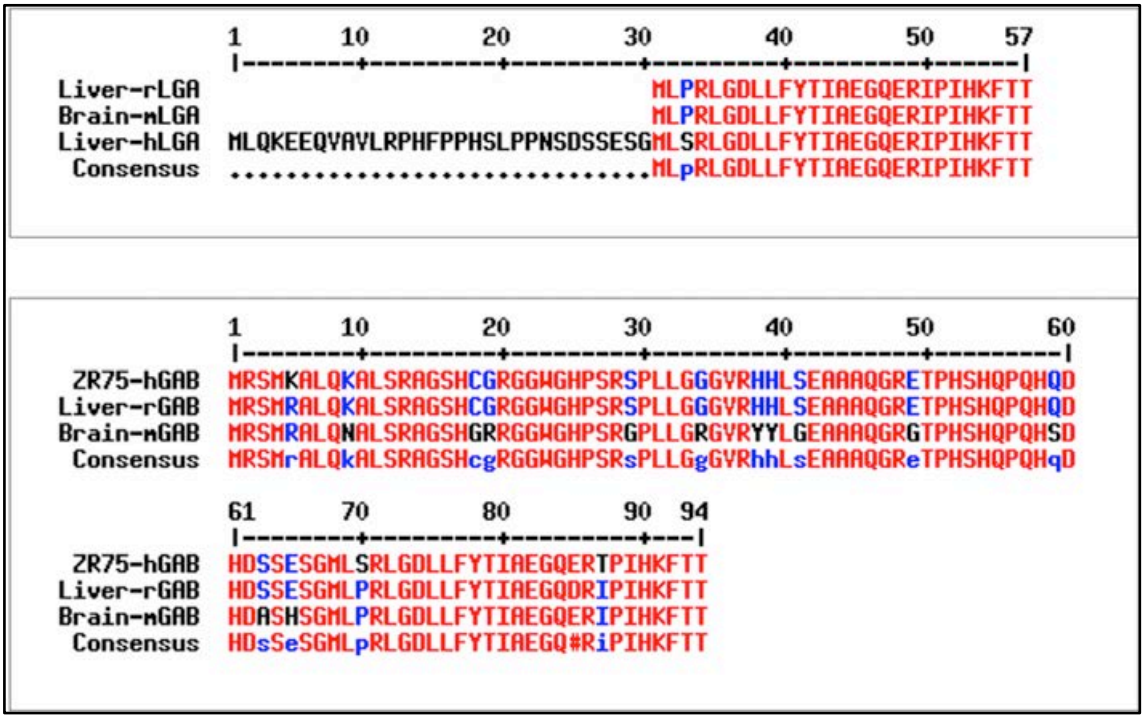


Figura 36. Comparación de las secuencias N-terminales de aminoácidos en las proteínas LGA y GAB de tejidos de rata, ratón y humano. Para una mayor claridad, mantenemos aquí el mismo orden ya empleado en las Fig. 33 y 34 de comparación de secuencias de nucleótidos de estas isoformas. *Panel superior***:** las secuencias N-terminales de aminoácidos de la isoenzima LGA de cerebro de ratón (Brain-mLGA) y de hígado humano (Liver-hLGA) se alinearon con la secuencia conocida de aminoácidos de la LGA de hígado de rata (Liver-rLGA, GenBank #J05499). *Panel inferior*: las secuencias de aminoácidos de la isoenzima GAB de hígado de rata (Liver-rGAB) y cerebro de ratón (Brain-mGAB) se alinearon con la secuencia conocida de aminoácidos de la GAB humana aislada de células ZR-75 de cáncer mamario (ZR75-hGAB, GenBank #AF348119). Aminoácidos idénticos se muestran en color rojo, mientras que los aminoácidos diferentes se muestran en color negro. En color azul se muestran secuencias coincidentes en dos de los tres casos estudiados. El alineamiento de la secuencia se realizó con el programa Multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Queremos resaltar que, durante los estudios de clonación del transcrito LGA humano, aislamos por RT-PCR tres transcritos GLS2 no codificantes que contienen codones de parada prematuros y que fueron, asimismo, depositados en la base de datos GenBank.. Dos de ellos resultaron ser transcritos de cerebro humano con mutaciones terminadoras (*non-sense transcripts*) en los que faltaban los exones 4 y 10, respectivamente (*GenBank* #HM775423 y #HM775424). La ausencia de estos exones supone una alteración en la pauta de lectura de los transcritos, dando lugar a codones de parada prematuros y, por consiguiente, a proteínas erróneas o truncadas. Se aisló un tercer transcrito no codificante de cerebro de ratón mediante RT-PCR. En este caso, se encontraba parcialmente retenida la secuencia del intrón 2, dando lugar a un transcrito *non-sense* (GenBank# EU770627). Finalmente, en otra serie de experimentos, fuimos capaces de identificar fragmentos de secuencias expresadas (*expressed sequence tags* o ESTs) que apoyaban, así mismo, la existencia de transcritos GAB codificados por genes *Gls2*. La secuencia genómica de la GAB humana (Pérez-Gómez y col., 2003) se comparó con la base de datos EST de *Homo sapiens*. El mismo análisis se realizó con las secuencias genómicas de *Gls*2 de rata y ratón, depositadas en la versión vigente del proyecto genoma de rata del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (versión 37) y en la base de datos del proyecto *Ensembl* (proyecto de software que produce y mantiene anotaciones automáticas de genomas eucariotas, particularmente ratón. Wellcome_Trust_Sanger Institute/Instituto Europeo de Bioinformática), respectivamente. Varias secuencias EST apoyaron la existencia de trancritos largos GAB en ambas especies, concretamente *GenBank* #BC104712 y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

#BC089776 en rata y *GenBank* #AI195692.1, #BB633707.1 y #BY243446.1 en ratón. Por el contrario, no se encontraron secuencias EST para los transcritos cortos LGA en las bases de datos de humano, rata y ratón. Una causa que podría explicar la ausencia de secuencias EST LGA-específicas radica en el hecho de que para obtenerlas se necesita remontar hasta la región distintiva 5'-UTR de la secuencia de LGA, muy rica en bases GC y, por lo tanto, difícil de retro-transcribir por la enzima transcriptasa reversa.

4.2 El transcrito LGA aparece por un mecanismo de sitio alternativo de inicio de la transcripción y posee un promotor alternativo

El análisis de las secuencias de las variantes GAB y LGA demuestra, de forma evidente, que el transcrito corto LGA aparece por un mecanismo denominado sitio alternativo de inicio de la transcripción, ya que su TSS se localizó en la zona final (extremo 3'-terminal) del primer intrón del gen *Gls2*. Debido a la gran longitud de este primer intrón (más de 7 kb en humano y 4 kb en rata y ratón) el promotor que regule la expresión de LGA debe ser, necesariamente, distinto del que regula la expresión de GAB, ya que ha de estar situado en la región que flanquea su primer exón. Para mapear esta región reguladora, y localizar exactamente el sitio de inicio de la transcripción de LGA, se llevaron a cabo experimentos de extensión de un cebador 5' (*primer extension analysis*) (Figura 37). Se emplearon tres cebadores distintos, aunque sólo con uno de ellos obtuvimos un resultado consistente de amplificación mediante transcripción inversa, dando lugar a dos bandas en la autorradiografía (Figura 37). La banda más alta, señalada con una flecha en la

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Figura 37, corresponde a un tamaño de 140 nucleótidos, por comparación con marcadores de masa molecular que se analizaron en paralelo en el mismo gel (margen izquierdo de la Figura 37). Esto significa que la transcripción de la isoforma LGA de cerebro humano comienza en el nucleótido de adenina localizado 140 nts cadena arriba del codón de inicio de la traducción (Figura 35). La secuencia del TSS de la LGA humana se asemeja a las secuencias consenso para inicio de la transcripción en eucariotas y es casi idéntica al sitio de inicio de la transcripción del mRNA ortólogo de la LGA de hígado de rata (Chung-Bok y col., 1997).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

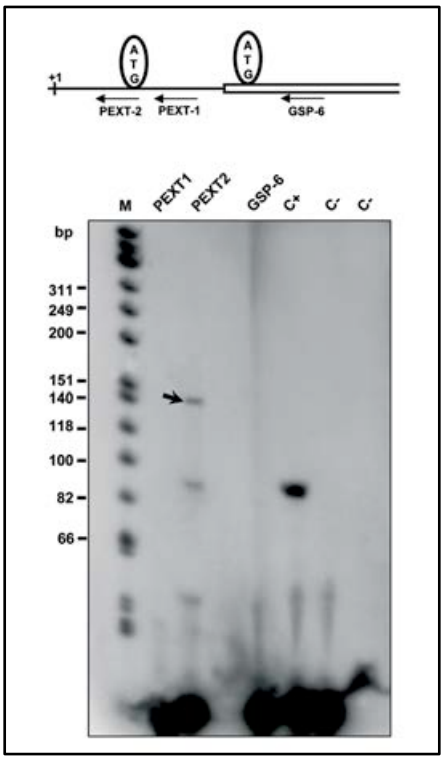


Figura 37. Análisis por extensión de un cebador 5' de RNA de cerebro humano. Los cebadores GSP-6, PEXT1 y PEXT2, que flanquean el extremo 5' terminal del cDNA de la isoforma LGA humana, fueron marcados con ^{32}P con [γ-^{32}]ATP y la enzima T4 polinucleótido quinasa. Se mezcló mRNA poli(A)$^+$ de cerebro humano (aprox. 0.5-1 µg) con los cebadores radiactivos y con la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar. Los productos de estas reacciones se separaron por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 8% (p/v). Las calles PEXT1, PEXT2 y GSP-6 indican el nombre del cebador empleado en cada caso. El tamaño de los productos de cDNA de hebra sencilla obtenidos (en bases) se estimó por comparación con el marcador de DNA *ΦX174 HinfI* (calle M). Calle C+: producto amplificado con un control positivo de kanamicina. Calles C-: controles negativos usando PEXT2 sin mRNA molde. La flecha indica el producto específico GA de aproximadamente 140 nucleótidos obtenido por transcripción reversa con el cebador PEXT2. En la parte superior de la Figura se muestra un esquema con la posición aproximada de los tres cebadores en relación con el TSS (+1) y los dos primeros codones ATG del transcrito LGA humano.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Obviamente, el candidato a promotor alternativo más probable para el transcrito LGA humano ha de estar localizado secuencia arriba de su TSS, en la zona 3'-terminal del intrón 1 del gen *GLS2*. Para ratificarlo, se realizó un análisis bioinformático del fragmento de 1.5 kb en la zona 5' distal del sitio de inicio de la transcripción, encontrando numerosos sitios de reconocimiento de factores de transcripción (Figura 38), que apoyan, por tanto, la hipótesis de que se trata de un fuerte promotor funcional para el transcrito LGA humano. Los principales sitios de reconocimiento de factores de transcripción encontrados fueron las cajas AP-1, TATA-*like*, GATA-1, CAAT, SP1 y p53. Además, se encontró una zona promotora distal al comienzo del intrón 1 del gen *GLS*2, separada unas 7 kb del TSS de LGA, que contiene, entre otras, las siguientes cajas consenso: c-Myb, c-Myc, AP-2 y NF-kappa B (Figura 38).

Evidencia adicional para nuestra hipótesis de que la región 3'-terminal del intrón 1 es un promotor alternativo que regula la transcripción de LGA fue obtenida de la Enciclopedia de Elementos de DNA (ENCODE), producida por el consorcio ENCODE (Consorcio para el proyecto ENCODE, 2007, The National Human Genome Research Institute (NHGRI), http://www.genome.gov/encode/). El análisis del locus genómico *GLS2* humano para buscar marcas de histonas (H3K4Me1 y H3K27Ac: metilación del residuo de lisina 4 y acetilación del residuo lisina 27, ambos en la histona H3) asociadas a elementos potenciadores (*enhancer*) y promotores de la transcripción en varias líneas celulares humanas detectó tres regiones principales: el promotor canónico de GAB, el promotor alternativo de LGA y una región distal localizada en el extremo 5' del intrón 1 (Figura 39). Sin embargo, la marca de histona H3K4Me3, que se asocia normalmente a zonas promotoras, solo se detectó en

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

el promotor GAB y en la región potenciadora (*enhancer*) del comienzo del intrón 1, tanto en corteza frontal cerebral como en líneas celulares humanas (Figura 39). La presencia de islas CpG difiere notablemente en ambos promotores: el promotor GAB tiene un alto contenido, mientras que no se encontraron islas CpG en el promotor LGA (Figura 39). Por último, los datos de inmunoprecipitación del DNA, dependiente de metilación, y su secuenciación (MeDIPseq) para las regiones reguladoras de GAB y LGA en cerebro humano también mostraron un patrón diferencial: la región potenciadora y el promotor alternativo de LGA no muestran metilación del DNA, mientras que la zona proximal del promotor GAB aparece metilada (Figura 39).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

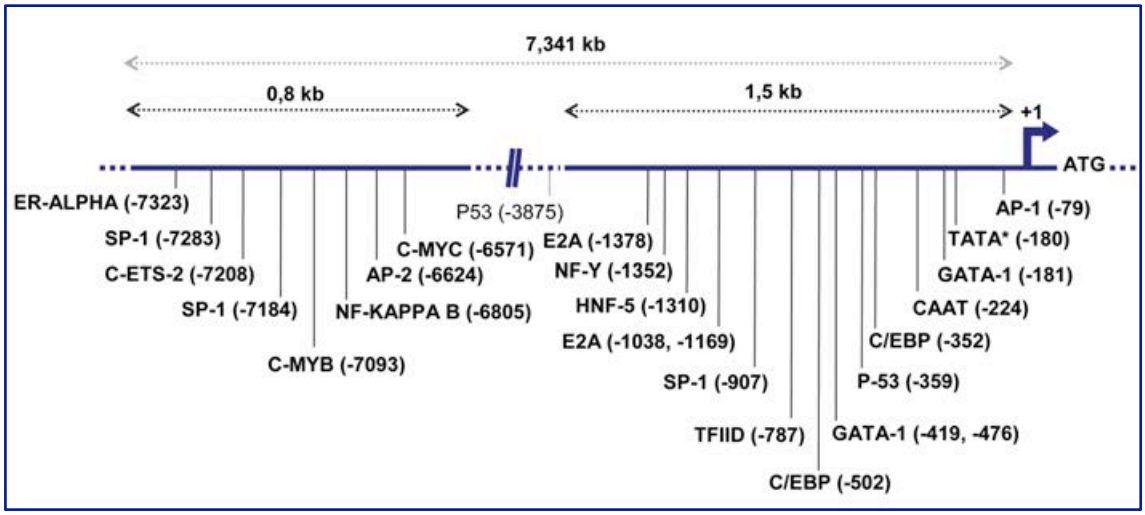


Figura 38. Principales sitios de reconocimiento de factores de transcripción presentes en el promotor alternativo del transcrito LGA humano. El esquema muestra las 7341 pb del intrón 1 del gen *GLS2* humano. El sitio de inicio de la transcripción se indica con +1. Se representan las secuencias de la región potenciadora distal (desde el nucleótido -7340 al -6540) y la región promotora proximal (desde el nucleótido -1500 hasta el +1). Los principales sitios de unión de proteína detectados por análisis informático se indican mediante líneas verticales y por su nombre en negrita bajo la secuencia. Se empleó el programa TESS (http://www.cbil.upenn.edu/tess) para buscar los motivos consenso de los factores de transcripción. Se encontró un segundo motivo p53 entre las zonas promotoras distal y proximal (aprox. en la zona del nucleótido -3875), indicado en la parte superior del diagrama con caracteres tipográficos normales.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

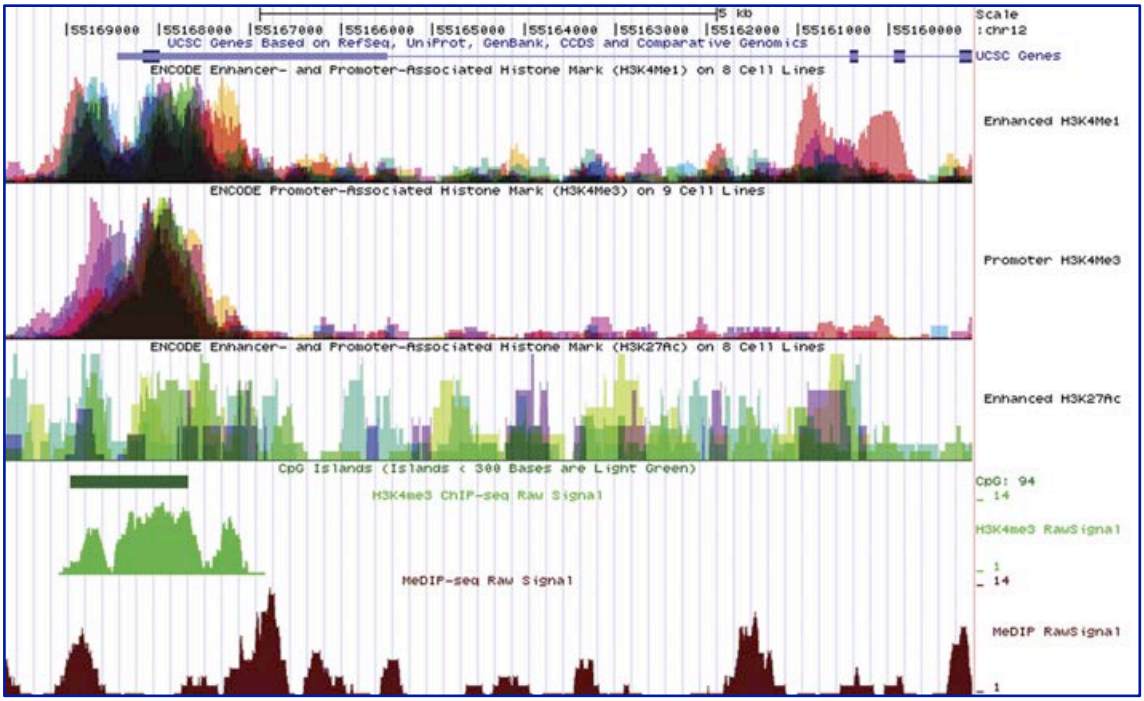


Figura 39. Marcas de histonas asociadas a regiones promotoras y potenciadoras de la transcripción, islas CpG y estado de metilación del locus génico *GLS2* localizado en el cromosoma 12 humano, recogidas en la enciclopedia de elementos del DNA (ENCODE). Por simplicidad, solo se muestran resultados para los cuatro primeros exones del gen *GLS2* humano y para la zona genómica flanqueante del extremo 5' (mostrados en la parte superior de la Figura). Se presentan seis gráficas que, de arriba a abajo, muestran: 1º,marca de histona H3K4Me1 asociada con zonas promotoras y potenciadoras en 9 líneas celulares humanas; 2º, marca de histona H3K4Me3 asociada a promotores en 8 líneas celulares humanas; 3º, marca de histona H3K27Ac asociada con zonas promotoras y potenciadoras en 8 líneas celulares humanas; 4º, islas CpG que se muestran con una barra horizontal color verde; 5º, marca de histona H3K4Me3 asociada a promotores y procedente de datos de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChiP-seq) y; 6º, datos de inmunoprecipitación de DNA, dependiente de metilación, y secuenciación en cerebro humano (Methylation-dependent immunoprecipitation of DNA and sequencing, MeDIP-seq).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.3 Cuantificación de transcritos GAB y LGA mediante PCR cuantitativa a tiempo real (r*eal-time* PCR)

Se llevaron a cabo experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR o *real-time* PCR) para la cuantificación de los dos transcritos GLS2 de GA en cerebro e hígado de mamíferos, tejidos donde previamente habíamos demostrado coexpresión de ambas isoformas. La abundancia relativa de ambos transcritos resultó ser tejido-específica y, más sorprendentemente, también específica para cada especie. Así, mientras que en cerebro de ratón la isoforma LGA fue algo más abundante que GAB, en cerebro de rata se encontró hasta cuatro veces más cantidad de mRNA de GAB que de LGA (Figura 40). Como control y referencia para el método de qPCR desarrollado, se cuantificó el número de copias de mRNA de la isoenzima KGA. En cerebro de ratón, la abundancia del transcrito KGA fue 15 veces superior que la suma de los dos transcritos GLS2 (GAB+LGA), afianzando el papel de KGA como isoforma principal en este tejido (Figura 40). El número de copias de KGA fue $46.96 \times 10^4 \pm 9.48 \times 10^4$, mientras que el número de copias de mRNA de transcritos GLS2 (GAB+LGA) fue $3.02 \times 10^4 \pm 0.33 \times 10^4$. Se encontraron resultados similares en cerebro de rata, donde de nuevo se obtuvo un número de copias 21 veces mayor para el mRNA de KGA que para la suma de los transcritos GLS2 (GAB+LGA) (Figura 40).

Al contrario que en cerebro, en tejido hepático la cantidad de transcrito KGA obtenida fue insignificante y, por ello, resultó un control muy válido para nuestro método de qPCR. La abundancia de transcritos GLS2 en hígado fue totalmente dependiente de la especie analizada. Así, la isoforma GAB resultó

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ser la predominante en hígado de ratón, mostrando un número de copias 11 veces superior al obtenido para el mRNA de LGA, mientras que la abundancia del transcrito LGA fue 5 veces mayor que la correspondiente a GAB en hígado de rata (Figura 40). Este patrón de expresión de transcritos GLS2 tan marcadamente diferente era inesperado e implica la existencia de mecanismos selectivos de regulación transcripcional en los diferentes tejidos y especies de mamíferos.

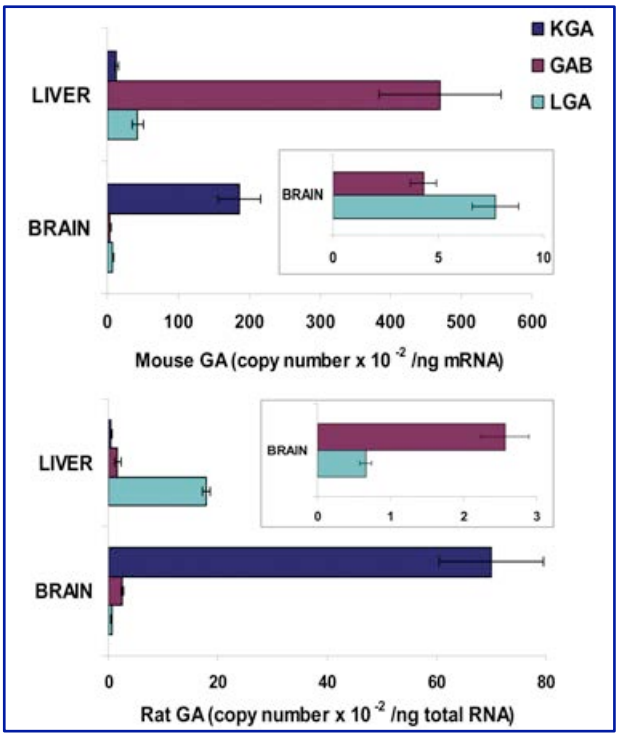


Figura 40. Cuantificación de los niveles de mRNA de KGA, GAB y LGA en tejidos de rata y ratón mediante qPCR. Los histogramas muestran el número absoluto de copias de mRNA para las isoformas KGA (azul oscuro), GAB (magenta) y LGA (azul claro). Los experimentos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real se llevaron a cabo tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como media de tres experimentos independientes realizados por triplicado ± S.E.M. Los valores se obtuvieron para hígado y cerebro de rata y ratón y se expresan como número de copias por ng de RNA total. INSERTOS: Los valores de mRNA de GAB y LGA en cerebro de rata y ratón son representados en solitario, sin mostrar los valores de mRNA de KGA, para apreciar mejor las diferencias entre ellos.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

4.4 Expresión de las isoformas proteicas GLS2: transcripción y traducción *in vitro* y análisis por inmunotransferencia

El transcrito LGA humano posee dos codones ATG de inicio de la traducción en pauta de lectura en el primer exón, característica que no está presente en las formas ortólogas de este transcrito en rata y ratón (Figuras 34 y 35). Ambos ATGs se encuentran rodeados por unas secuencias (CCCATGT y GGCATGC) en las posiciones 83 y 218 de sus respectivos mRNA (Figura 35), las cuales se asemejan razonablemente bien a la secuencia consenso Kozak deducida para una óptima iniciación de la traducción en eucariotas (Kozak, 1989). Es interesante poner de manifiesto que la secuencia consenso Kozak asociada al segundo ATG de la LGA humana es idéntica a la presente en el transcrito largo GAB (Gómez-Fabre y col., 2000). Los marcos abiertos de lectura que comienzan en los dos primeros ATGs del transcrito LGA humano codifican para dos posibles proteínas de 565 y 535 aminoácidos, respectivamente, con masas moleculares teóricas de 56 y 51 kDa.

Las proteínas codificadas por el cDNA de LGA, obtenido por clonación a partir de RNA de cerebro humano, se demostraron usando el sistema de transcripción y traducción *in vitro* TnT® T7. Se llevó a cabo la clonación del marco abierto de lectura o secuencia codificadora del cDNA de LGA humano en el vector pGEM-T. Usando un lisado de reticulocitos de conejo, la proteína [^{35}S-Met]-LGA, transcrita y traducida *in vitro*, fue analizada por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y autorradiografía, dando como resultado dos bandas claramente diferenciables y con masas moleculares aparentes correspondientes a los tamaños de las proteínas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

teóricas codificadas a partir de los dos ATGs alternativos de inicio de la traducción (Figura 41). Los transcritos LGA humanos que carecen del exón 4 y del exón 10 se incluyeron en las pruebas como controles, así como el transcrito LGA completo clonado en la dirección antisentido. En ninguno de estos tres controles se detectaron bandas proteicas relevantes (Figura 41). Además, para asegurar que las dos bandas obtenidas en la autorradiografía corresponden a proteínas traducidas desde el primer y el segundo ATG, y no a formas truncadas traducidas a partir de codones de iniciación ATG posteriores, se preparó un mutante de deleción de LGA que empezaba en el segundo codón ATG. La trascripción y traducción de este mutante de deleción dio como resultado una clara banda proteica a la altura de la banda inferior del doblete obtenido para el transcrito completo LGA (Figura 41). Estos resultados confirman que las dos proteínas traducidas a partir de los dos primeros codones de iniciación del transcrito LGA humano se expresan con rendimientos similares usando un sistema de transcripción y traducción *in vitro*.

Posteriormente, se intentó averiguar si alguna de las proteínas producidas *in vitro* era catalíticamente activa. Para ello se realizó un ensayo de actividad catalítica GA sobre alícuotas “en frío” (ausencia de [^{35}S-Met]) de las proteínas traducidas *in vitro*. El lisado de reticulocitos se clarificó por ultracentrifugación para eliminar contaminantes potenciales que pudieran interferir con el ensayo. También se cambió la composición del tampón y el pH de la mezcla de traducción, de forma que alcanzaran valores óptimos para ensayar la actividad de una GA GLS2 (Campos-Sandoval y col., 2007). La actividad GA se detectó consistentemente, por encima de los valores control, cuando los ensayos se realizaron con los productos traducidos del transcrito

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

completo LGA humano. La actividad encontrada fue de 318.50 ± 13.84 mU/ml (nmoles de glutamato producido por minuto y por ml de extracto), valor medio determinado a partir de tres experimentos de transcripción/traducción distintos (Figura 42). En el mutante de deleción de LGA, que comienza en el segundo codón del marco abierto de lectura, solamente se alcanzó un valor residual de actividad, similar al valor control en ausencia de proteína LGA (Figura 42), a pesar de que su nivel de expresión fue satisfactorio (Figura 41).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

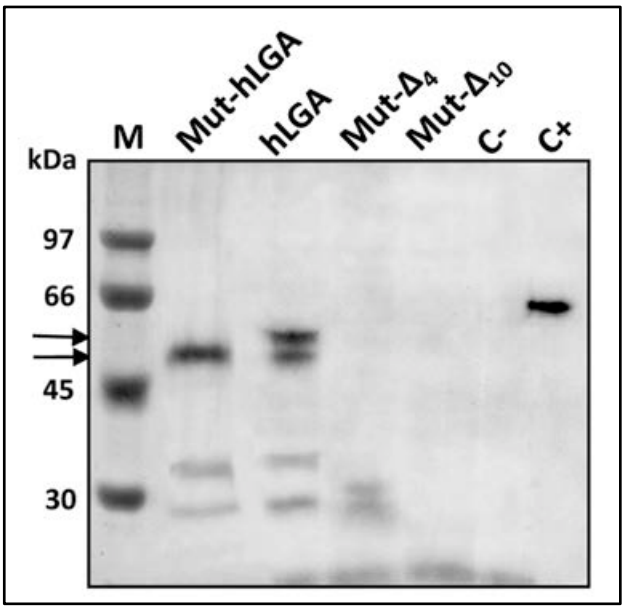


Figura 41. Transcripción y traducción *in vitro* del cDNA de la LGA humana. Los marcos abiertos de lectura de la LGA humana (hLGA), del mutante de deleción que comienza en el segundo ATG (Mut-hLGA) y de los mutantes carentes de los exones 4 y 10 (Δ4-hLGA y Δ10-hLGA, respectivamente) se clonaron en el vector pGEM-T y fueron transcritos y traducidos *in vitro* en presencia de ^{35}S-Met. Las mezclas de reacción se analizaron por SDS-PAGE y autorradiografía. Calle M: marcadores preteñidos de masa molecular estándar; se indican las posiciones de las masas moleculares en kDa a la izquierda de la Figura. Calle Mut-hLGA: alícuota de la mezcla de traducción usando como molde cDNA de LGA que comienza en el segundo ATG. Calle hLGA: cDNA completo de la LGA humana. Calle Mut-Δ4: alícuota de la mezcla de traducción usando el cDNA mutante Δ4-hLGA. Calle Mut-Δ10: alícuota de la mezcla de traducción usando el cDNA mutante Δ10-hLGA. Calle C-: control negativo (hLGA clonada en orientación antisentido en pGEM-T). Calle C+: control positivo de luciferasa. Las dos bandas de proteínas LGA radiactivas se indican con flechas a la izquierda de la Figura.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

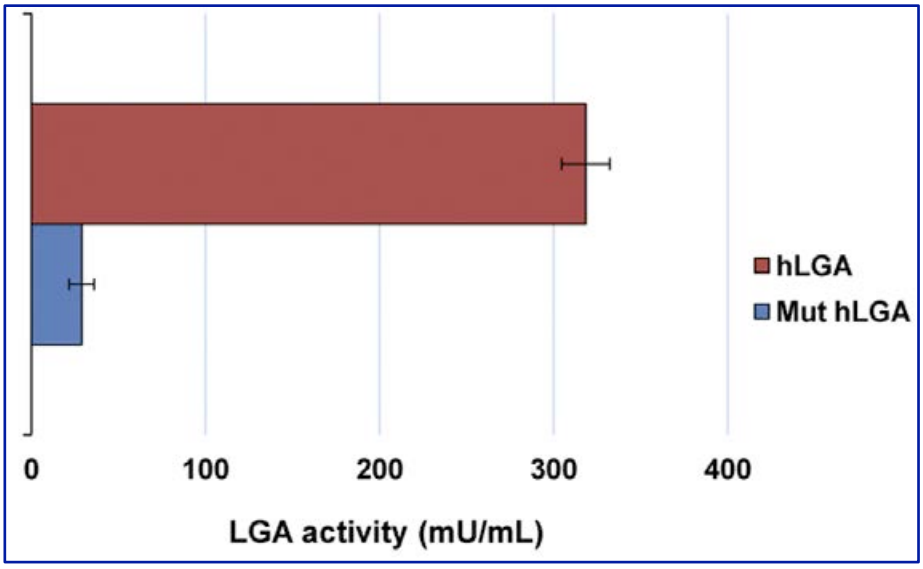


Figura 42. Ensayo de actividad GA. La proteína LGA humana (hLGA) y la proteína LGA mutante, que comienza en el segundo codón de iniciación (Mut-hLGA), fueron transcritas y traducidas *in vitro* y se sometieron a ensayo de actividad GA, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los valores mostrados representan la media ± S.E.M. de tres experimentos independientes. La proteína hLGA se representa en el gráfico como una barra de color marrón y la proteína mutante Mut-hLGA en color azul. El valor residual control de actividad GA se evaluó empleando la construcción pGEM-T[hLGA] que se clonó en orientación antisentido. Este valor se restó a los valores de actividades obtenidos para las proteína hLGA. Los valores se expresan en miliunidades de actividad enzimática por ml (mU/ml).

Finalmente, además de los experimentos descritos de transcripción y traducción *in vitro* y evaluación de la actividad catalítica, se realizaron análisis por inmunotransferencia para evaluar, a nivel de proteína, la existencia de transcritos GAB y LGA en tejidos de mamíferos. La presencia de productos proteicos codificados por ambos transcritos alternativos se detectó usando anticuerpos isoenzima-específicos anti-GA GLS2 humana (Olalla y col., 2002), los cuales son capaces de reconocer ambas isoformas GAB y LGA, y anticuerpos policlonales específicos para la proteína GAB, que reconocen a un

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

péptido sintético del exón 1 presente únicamente en la isoforma GAB. Para validar los anticuerpos en tejidos de mamíferos se usó como control positivo la línea celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y, la cual expresa ambos transcritos GLS2 (comprobado mediante análisis por qPCR, resultados no mostrados). En células SHSY-5Y obtuvimos dos bandas con la masa molecular esperada para los péptidos GAB y LGA, cuando revelamos con el anticuerpo que reconoce los epítopos comunes de ambas isoformas (Figura 43, panel central). La banda de menor masa molecular desapareció tras realizar un ensayo similar pero empleando anticuerpos específicos para GAB (Figura 43, panel izquierdo). Finalmente, se diseñó un experimento de inmunotransferencia con mitocondrias aisladas de cerebro e hígado de rata. Se obtuvo un doblete de bandas, cuyas alturas corresponden a las masas moleculares de los polipéptidos GAB y LGA para tejido hepático de rata, empleando los anticuerpos que reconocen ambas isoformas (Figura 43, panel derecho). Se puede observar que la banda correspondiente a menor masa molecular, es decir, al polipéptido LGA, presenta una intensidad mayor que la correspondiente a la proteína GAB, lo que concuerda con los resultados de qPCR para hígado de rata (Figura 40). Por el contrario, en mitocondrias de cerebro de rata la banda correspondiente a LGA se detectó muy débilmente (prácticamente inapreciable) y sólo la proteína GAB fue revelada (Figura 43, panel derecho). Este resultado también es consistente con la abundancia relativa de ambos transcritos determinada por qPCR en cerebro de rata (Figura 40).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

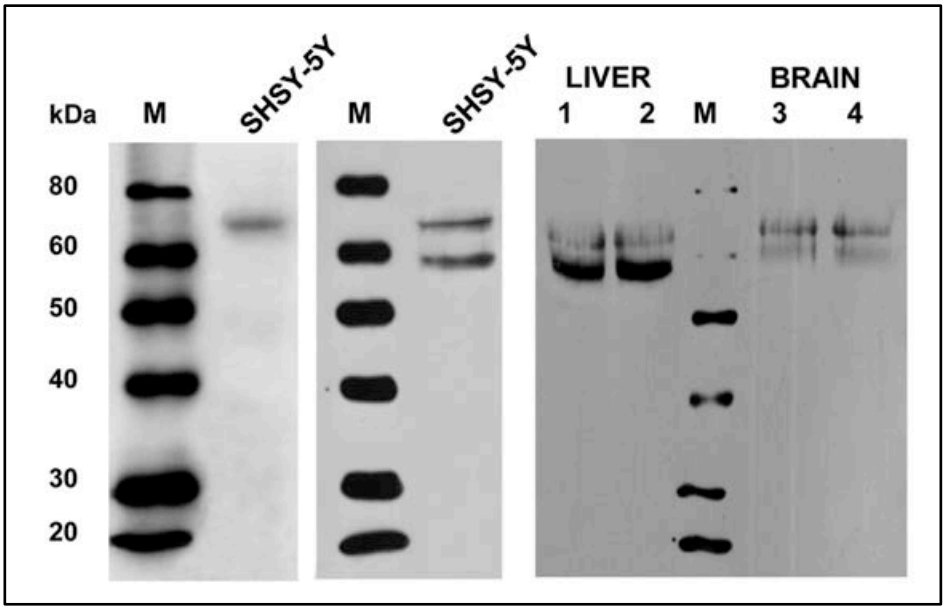


Figura 43. Análisis por inmunotransferencia de células de neuroblastoma SHSY-5Y y de mitocondrias de hígado y cerebro de rata. Los extractos de células de neuroblastoma humano SHSY-5Y (paneles izquierdo y central) y de mitocondrias aisladas de hígado y cerebro de rata (panel derecho) se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia Western y se revelaron por quimioluminiscencia usando anticuerpos policlonales anti-GAB (reconocen la zona del primer exón del gen *Gls*2, exclusiva de GAB) y anticuerpos anti-GA GLS2 (reconocen ambas isoformas). Calles M: marcador de masa molecular, valores indicados en kDa en el margen izquierdo de la Figura. Calles SHSY-5Y: extractos de proteínas aislados de células de neuroblastoma humano. Calles LIVER 1 y 2: contienen extractos proteicos totales y mitocondriales de hígado de rata, respectivamente. Calles BRAIN 3 y 4: contienen extractos proteicos totales y mitocondriales de cerebro de rata, respectivamente.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5. Discusión sobre la caracterización de transcritos del gen *Gls*2 en mamíferos

Los experimentos de RT-PCR empleando cebadores isoforma específicos para las tres especies, humano, rata y ratón, demuestran coexpresión de dos transcritos GLS2 con sitios alternativos de inicio de la transcripción (Figuras 33 y 34): un transcrito corto LGA que carece del primer exón del gen *Gls*2 y que se caracterizó por primera vez en hígado de rata (Smith y col, 1990; Chung-Bok y col., 1997); y un transcrito largo GAB que fue caracterizado inicialmente en células de cáncer de mama ZR-75 (Gómez-Fabre y col., 2000). Cuando comenzamos con los experimentos de RT-PCR, las secuencias genómicas de *Gls2* de rata y ratón contenían 17 exones, y ninguna de ellas contenía el exón 1. Las versiones vigentes por aquél entonces de las secuencias genómicas para las especies *Rattus novergicus* BN/SsNHsdMCW (RGSC_v3.4) y *Mus musculus* (base de datos para ratón *Ensembl*, NCBIm37) incluían la variante GAB basándose en la similitud de estas secuencias con la GAB humana, el gen *GLS2* y los fragmentos de secuencias expresadas ESTs. Las evidencias experimentales obtenidas en este estudio por RT-PCR demuestran claramente que los transcritos GAB y LGA se coexpresan en tejidos de hígado y cerebro de rata, ratón y humano.

Las isoformas proteicas LGA muestra un alto grado de homología en las especies humana, rata y ratón, con un 91% de identidad en sus secuencias de aminoácidos. Como genes parálogos, se asume que los genes *Gls* y *Gls*2 derivan de la duplicación génica de una misma secuencia, seguida de distintos cambios graduales en el tiempo en la secuencia de ambas copias. El análisis

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de la secuencia codificante de los genes GA humanos sugiere que éstos han evolucionado de un mismo gen ancestral común (Pérez-Gómez y col., 2003), como fue previamente indicado para los genes de rata (Chung-Bok y col., 1997). Es interesante resaltar que las proteínas parálogas pueden adquirir funciones completamente diferentes durante su evolución aun manteniendo una fuerte similitud en secuencia y estructura tridimensional. A diferencia de las isoformas KGA y GAC del gen *Gls*, que difieren en sus extremos C-terminal, la única diferencia entre las proteínas GLS2 se encuentra en sus extremos N-terminal. Es importante destacar que la isoforma LGA de humano es mayor en longitud que la correspondiente para las especies rata y ratón, mostrando 30 aminoácidos adicionales en la región N-terminal, de los cuales los 6 últimos corresponden a los 6 primeros del exón 2 de la GAB humana (Figura 36). La región N-terminal de la GA está relacionada con la localización subcelular y el procesamiento post-traduccional (Márquez y col., 2006). Los análisis bioinformáticos de la proteína LGA humana no señalan una región consenso en su zona N-terminal para la localización mitocondrial de la misma; sin embargo, sí predicen la existencia de un péptido señal de secreción en los primeros 16 aminoácidos de la proteína LGA humana traducida desde su segundo ATG (Petersen y col., 2011).

La clonación del transcrito LGA humano (Figura 35) ha permitido el descubrimiento del mecanismo transcripcional que regula la expresión de los transcritos GLS2. Los experimentos de *primer extension analysis* revelaron el sitio de inicio de la transcripción, que se localiza en el extremo 3' del intrón 1 del gen *Gls*2 (Figura 37). Este sitio mostró una alta identidad de secuencia con el sitio de inicio de transcripción de la isoforma LGA de hígado de rata. Cabe

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

añadir que las cajas CAAT y TATA-*like* se localizaron a distancias consenso de este sitio de inicio de la transcripción de la LGA humana. Los experimentos de clonación y de *primer extension analysis* para la isoforma LGA humana demostraron que esta isoforma se transcribe a partir de un sitio de inicio de la transcripción alternativo del gen *GLS*2. La diversidad biológica de las proteínas en eucariotas superiores puede verse aumentada por distintos procesos que operan a nivel transcripcional, y entre los que podemos citar como más destacados: ayuste alternativo, inicio alternativo de la transcripción, poliadenilación alternativa, promotores alternativos y la edición del RNA. Estos mecanismos son los responsables de la sorprendente gran diversidad del proteoma en las eucariotas superiores a pesar de poseer un número de genes relativamente pequeño. Los sitios alternativos de inicio de la transcripción y el ayuste alternativo son dos mecanismos bien caracterizados que proporcionan una gran diversidad de transcritos (Pan y col., 2008; Koscielny y col., 2009). Un número creciente de evidencias demuestran que la mayoría de los genes humanos presentan transcritos variantes que aparecen por algún mecanismo de regulación transcripcional (o combinaciones de varios mecanismos). De esta forma, estudios de caracterización del transcriptoma humano a gran escala han concluido que, aproximadamente, un 69-75% de genes experimentan ayuste alternativo (Johnson y col., 2003; Tress y col., 2007), un 81% posee sitios alternativos de inicio de la transcripción (Denoeud y col., 2007), un 60% experimentan poliadenilación alternativa (Lee y col., 2007), y un 52% están sometidos a regulación por promotores alternativos (Kimura y col., 2008). Además, investigaciones recientes han demostrado la importancia de la expresión de variantes transcripcionales para explicar cambios en el

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

desarrollo, procesos de diferenciación celular específicos y reprogramaciones metabólicas conducentes a estados patológicos (Wang y Cooper, 2007; Dredge y col., 2001). Por consiguiente, los dos genes GA humanos pueden añadirse a esta creciente lista de genes con sofisticada regulación transcripcional, y el estudio de la regulación de su expresión, así como de los cambios inducidos en su patrón normal, puede tener gran relevancia en cáncer y en la función cerebral.

La localización del sitio alternativo de inicio de la transcripción de la isoforma LGA en el intrón 1 sugiere, inmediatamente, la presencia de un promotor alternativo al de GAB, ya que el promotor de esta isoforma se localiza a más de 7kb del sitio de inicio de transcripción de la isoforma LGA humana. Como cabría esperar, las últimas 1.5 kb del intrón 1 tienen numerosas cajas de reconocimiento de factores de transcripción; entre ellas, varias para p53. Apoyando este hallazgo, hay que destacar que recientemente se han identificado y validado experimentalmente tres secuencias consenso de unión de DNA para p53 en el gen GLS2 humano: una en el promotor canónico de la GAB y otras dos en el intrón 1, reforzando así la teoría de que hay un verdadero promotor en el intrón 1 para el transcrito LGA (Hu y col., 2010). Los análisis bioinformáticos también apoyan dicha teoría, ya que muestran sitios potenciales de reconocimiento para AP-1, GATA-1, C/EBP y SP-1 en la zona proximal de la región promotora, detectando además una región activadora reguladora distal a casi 7 kb de distancia del sitio de inicio de la transcripción (Figura 38). El análisis de las secuencias de los promotores canónico y alternativo del gen GLS2 humano reveló que no hay homología significativa

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

entre ellos. La zona promotora del transcrito ortólogo de LGA de rata fue previamente clonada y secuenciada (GenBank# L76175) (Chung-Bok y col., 1997). Ese promotor justo apareaba con el final del intrón 1 del gen *Gls*2 de rata, aproximadamente 1.1 kb cadena arriba del exón 2 en la versión vigente entonces del cromosoma 7 de rata (*Rat Genome Database*, v3.4, http://rgd.mcw.edu/). Tanto los resultados experimentales como los bioinformáticos apuntan a la misma conclusión: el transcrito LGA resulta de la transcripción directa del gen *Gls*2 a partir de un promotor alternativo localizado al final del intrón 1.

Los promotores canónico y alternativo del gen *GLS*2 difieren en elementos básicos como las islas CpG (Figura 39). Esta diferencia ha sido una característica frecuentemente encontrada en los promotores alternativos, siendo la frecuencia de islas CpG menor de la mitad de la que se ha caracterizado en promotores canónicos (Kimura y col., 2008). Además, se ha demostrado que los promotores que contienen islas CpG tienen una expresión ubicua (Yamasita y col., 2005), mientras que, en promedio, casi el triple de los promotores alternativos muestran expresión tejido específica o dependiente de señal en lugar de ser expresados de forma ubicua (Kimura y col., 2008). Como consecuencia, la diferencia en el contenido CpG indica una regulación diferencial de los dos transcritos por mecanismos epigenéticos. Asimismo, se observa una notable diferencia en el patrón de metilación de ambos promotores (Figura 39). La existencia de promotores separados, metilados y sin metilar, en el mismo gen humano ha sido recientemente caracterizada como un mecanismo de regulación transcripcional alternativa en diferenciación normal y cáncer, permitiendo la expresión de un gen pese a que su promotor

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

canónico 5'-flanqueante permanezca metilado (Irizarry y col., 2009; Rauch y col., 2009). Como consecuencia, puede afirmarse que la metilación del DNA puede controlar el uso de promotores alternativos.

El uso de promotores alternativos fue descrito por primera vez en 1981 (Young y col., 1981), aunque su relevancia en la generación y regulación de proteínas no ha sido plenamente apreciada hasta hace poco tiempo. El uso de promotores alternativos no siempre implica la producción de proteínas diferentes; de hecho, parece que del 60 al 80% de los genes con promotores alternativos producen transcritos con marcos abiertos de lectura idénticos (Landry y col., 2003). En un estudio reciente de promotores alternativos de genes humanos utilizando datos de microarrays de exones se identificaron 7708 genes con promotores alternativos, de los cuales el 57% transcribió un primer exón común y solo el 42% transcribió un primer exón alternativo diferente. En todos los casos, el promotor alternativo fue localizado por completo en un intrón (Jacox y col., 2010). Para el gen *GLS*2, el promotor alternativo fue localizado en el intrón 1, conduciendo a un transcrito con un exón 1 diferente y que se traduce en una isoforma proteica con una zona N-terminal diferente (LGA). Por lo tanto, el gen *GLS*2 tiene un nuevo promotor intrónico carente de islas CpG y que debe ser añadido a la lista de promotores alternativos de genes humanos. Cabe notar que los genes humanos con primeros exones alternativos poseen una incidencia dos veces mayor de promotores que carecen de islas CpG en uno de sus TSS (Jacox y col., 2010), exactamente como ocurre con el gen *GLS*2.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Interesantemente, estudios previos han demostrado que el cerebro es uno de los tejidos donde la presencia de promotores alternativos de genes humanos es más abundante (Kimura y col., 2008). Los mismos autores reportaron que el 52% del total de genes humanos están sujetos a regulación por promotores alternativos, siendo los genes que codifican a proteínas relacionadas con procesos de transducción de señales los que presentan una mayor probabilidad de poseer promotores alternativos. Se podría especular que los transcritos del gen *GLS*2 podrían participar en este tipo de mecanismos de regulación en cerebro, debido a que las proteínas GAB y LGA han sido asociadas con funciones regulatorias y de señalización, además de su papel como productores del neurotransmisor Glu (Márquez y col., 2006; Márquez y col., 2010).

Otro mecanismo postranscripcional recientemente descubierto es el decaimiento de RNA mediado por RNA sin sentido (*nonsense-mediated* mRNA *decay* o NMD). En análisis a gran escala de isoformas alternativas de genes humanos conocidos, se encontró que una tercera parte de los transcritos alternativos examinados contenían codones de terminación prematuros (Lewis y col., 2003). Los autores descubrieron que el acoplamiento del ayuste alternativo junto con el NMD es un mecanismo importante de regulación de la expresión proteica. Además, en este mismo estudio, se demostró que ambos genes GA humanos eran diana del mecanismo NMD: dos transcritos NMD fueron encontrados para *GLS*2 y uno para *GLS* (Lewis y col., 2003). En esta Memoria hemos descrito además dos secuencias de RNA no codificantes para el gen humano *GLS*2 (que carecen de los exones cuarto y décimo, respectivamente) y uno para el gen de ratón *Gls*2 (intrón parcialmente

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

conservado), apoyando la teoría de que los mecanismos NMD pueden jugar un papel importante en la regulación de los niveles de expresión de proteínas GA.

El objetivo final de nuestro estudio sobre la regulación transcripcional del gen *Gls*2 es la descripción completa de la función *in vivo* de ambos productos alternativos. De hecho, los promotores alternativos pueden jugar un papel importante en la expresión de proteínas especie-específicas, como se puede deducir de nuestros resultados sobre abundancia relativa de las isoformas LGA y GAB en tejidos de rata y ratón. Uno de los resultados más inesperados fue el notable cambio encontrado en los niveles de transcritos observados en hígado: la proteína GAB es la más abundante en ratón (11 veces más frente a LGA), pero no en rata, donde la isoforma LGA predomina sobre la GAB, aproximadamente en la misma proporción (10.5 veces más). En cerebro, el patrón de expresión de mRNA encontrado fue el opuesto al de hígado: la isoforma LGA es la más abundante en ratón, mientras que la proteína GAB muestra la mayor abundancia en rata. Tanto en cerebro de rata como de ratón la isoforma KGA es la isoenzima claramente predominante, representando más del 90% del total de transcritos GA. Hasta el momento, esta ha sido la primera vez que se reporta una cuantificación de los niveles de mRNA de las principales isoformas de GA (KGA, GAB y LGA) en cerebro de mamíferos.

Las isoformas alternativas de mRNA no siempre se traducen en diferentes proteínas, sino que pueden estar implicadas en la regulación del inicio de la traducción, en los procesos de edición de RNA o bien en otros procesos. Por este motivo, buscamos evidencias experimentales adicionales a nivel de proteína para evaluar la funcionalidad de las variantes de mRNA del

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

gen *GLS*2. Cuando el cDNA de LGA humana fue transcrito y traducido *in vitro*, dos bandas de proteína marcadas con [35S]-Met fueron claramente identificadas. Haciendo un ensayo paralelo, con una construcción mutante cuyo marco abierto de lectura comenzaba en el segundo ATG, llegamos a la conclusión de que ambas bandas encontradas correspondían a los dos productos procedentes de la traducción a partir del primer y el segundo ATG de su secuencia de marco abierto de lectura. Los productos de traducción *in vitro* se usaron para hacer un ensayo de actividad enzimática: se detectó consistentemente actividad para la construcción con el cDNA completo de LGA, pero no para la construcción mutante. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la proteína con el cDNA completo de LGA, cuya traducción comienza en el primer ATG, es el único producto que muestra actividad catalítica, aunque la traducción de la proteína puede comenzar en cualquiera de los dos ATGs iniciales con igual eficiencia, al menos en el sistema de lisado de reticulocito de conejo. En su conjunto, los resultados apuntan a la existencia de una única proteína LGA de humana funcional, la proteína que se traduce desde el primer codón de inicio de su secuencia de mRNA.

Basándonos en las diferencias en la estructura molecular, el comportamiento cinético y la localización subcelular, concluimos que la isoforma GAB humana debía ser una nueva isoenzima GA y no la ortóloga humana de la enzima de hígado de rata (de la Rosa V y col., 2009; Campos-Sandoval JA y col., 2007). En esta memoria hemos aportado evidencias experimentales concluyentes que apoyan esta hipótesis. Los resultados de las pruebas de inmunotransferencia (*western blot*) en tejido de hígado de rata fueron consistentes con la coexpresión de proteínas GAB y LGA. Dos bandas

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

principales con masas moleculares aparentes compatibles con las isoformas GAB y LGA se detectaron con anticuerpos policlonales anti-GAB (Figura 40). Previamente, se obtuvo un resultado similar en mitocondria de hígado de rata (Campos y col., 2003). Para obtener más pruebas de su identidad, revelamos las inmunotransferencias con anticuerpos policlonales isoforma-específicos que solo reconocen al transcrito largo GAB. En este caso, observamos que la banda de menor masa molecular desaparecía. Este resultado está en concordancia con que la proteína de mayor masa molecular corresponde a la GAB y la banda de menor masa molecular (del doblete detectado en hígado de rata) corresponde a la isoforma LGA. Los dos péptidos *GLS*2 procedentes de tejido de cerebro parecen ser diferentes en tamaño de los péptidos de tejido de hígado, lo que probablemente se deba a un diferente patrón de modificaciones post-traduccionales. Resulta interesante que se haya encontrado un comportamiento similar en mitocondria de hígado y cerebro de ratón (Campos , 2003). En conclusión, los resultados de expresión de proteína concuerdan con los resultados obtenidos de niveles de RNA mensajero, lo que sugiere un comportamiento paralelo entre la abundancia de los transcritos y la concentración de proteína de cada isoforma de *GLS*2.

Nuestro estudio sobre transcritos alternativos GLS2 generados a partir de promotores alternativos y el consecuente uso alternativo del primer exón para el gen *Gls*2 de mamífero puede explicar la mayoría de los datos experimentales previos que sugerían la existencia de dos isoformas GLS2. Se necesitarán estudios posteriores para clarificar la función *in vivo* de los productos alternativos del gen *Gls*2 de mamíferos. Actualmente, se progresa en el trabajo de caracterizar la regulación transcripcional y post-transcripcional

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

de los transcritos GAB y LGA, así como en su relevancia para el cáncer y otras enfermedades.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Conclusiones

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Se ha diseñado y generado una construcción transgénica para el silenciamiento génico condicional del gen *Gls2* murino en el vector de transgénesis pGKNeo, eliminando el exón 1 y clonando el exón 2 entre sitios loxP de reconocimiento por Cre recombinasa. La construcción rendirá animales KO nulos para la isoenzima GAB y condicionales para LGA.
2. Se ha adquirido una construcción transgénica del consorcio EUCOMM para el silenciamiento génico completo del gen *Gls2* murino. El vector de transgénesis sitúa los exones 2 a 7 entre los sitios loxP. Este vector de transgénesis venía incorporado en células ES murinas por electroporación y, mediante microinyección en blastocistos, se han obtenido animales quiméricos, que se cruzarán para seleccionar aquellos donde la mutación se haya incorporado a la línea germinal, permitiendo obtener una colonia de animales fundadores.
3. Mediante una combinación de técnicas de biología molecular, bioquímicas y bioinformáticas, hemos obtenido evidencia experimental directa que demuestra, por vez primera, la existencia de transcritos alternativos de los genes ortólogos *Gls2* de ratón, rata y humano.
4. Existen al menos dos transcritos sentido de mRNA codificados por el gen *Gls2*: un transcrito largo denominado GAB y formado por los 18 exones del gen, y un transcrito corto, LGA, que posee un sitio alternativo de inicio de la transcripción y está compuesto por 17 exones, omitiendo el exón 1 del gen *Gls2*

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5. La variante LGA posee un promotor alternativo situado al final del intrón 1 del gen *Gls2* y separado una distancia de 7 kb del promotor canónico del transcrito GAB humano. El promotor LGA posee secuencias de reconocimiento de importantes factores de transcripción como p53, GATA-1, C/EBP y SP1.
6. Ambos promotores del gen *Gls2* difieren notablemente en su grado de metilación y contenido en islas CpG, lo que permite especular que poseen una regulación transcripcional diferencial.
7. En los estudios de RT-PCR empleando poli(A^+)-mRNA hemos aislado transcritos sin sentido correspondientes a tres pseudogenes: uno en ratón y dos en humano. Estos resultados apuntan a una regulación transcripcional de los genes *Gls2* de mamíferos por otro mecanismo adicional: el *decaimiento del RNA mediado por transcritos sin sentido*.
8. Se ha conseguido clonar y expresar el cDNA del transcrito LGA humano. Aunque dos polipéptidos diferentes fueron trascritos y traducidos con igual eficiencia en un sistema de expresión *in vitro*, solo el polipéptido completo traducido desde el primer codón de iniciación mostró actividad enzimática.
9. Las isoenzimas GAB y LGA se expresan diferencialmente en cerebro, hígado y en células de neuroblastoma humano. Los cambios de expresión fueron tejido- y especie-específicos, aunque se desconoce su implicación funcional en estados normales y patológicos, fundamentalmente cáncer y alteraciones neurológicas.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Apéndice

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Medio LB (Luria Bertani)

Bactotriptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

El pH se ajustó a 7,4 y el volumen a 1 litro. Para hacer medio sólido, se añadieron 16 g/l de agar. A continuación se esterilizó en autoclave.

Cuando se necesitó selección por resistencia a antibiótico (ampicilina o kanamicina), éste se añadió al medio a una concentración de 50 µg/ml después de la esterilización y cuando la temperatura había descendido a 50 ºC como máximo.

Medio SOC

Bactotriptona	2%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	0.05%
KCl	2.5 mM
$MgCl_2$	10 mM
Glucosa	20 mM

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tampón PBS 10X (1l)

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2.28 g
KCl	4.6 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	16.6 g
NaCl	87.7 g

Tampón TBE 10X (1l)

Tris base	108 g
Ácido bórico	55g
EDTA 0.5M (pH 8)	40 ml

Tampón TAE 50X (pH 7,2)

Tris	2 M
Acetato Sódico	1 M
EDTA	50 mM

Tampón de Carga de DNA Orange G 10X

Glicerol	30% (p/v)
Orange G	100 mg
H_2O	hasta 50 ml

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

>BL

ACCCACATAGCAGTTCACAATCATATGTAACTCTGGTCACCTCTCTGGTCTCCAGAGGC
CCCAGGTGCGTACACACACATTCACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
ACACACACACACACACGTAAAACACTATACAGACAAGAGGGGAAAGCCAGGCTTGGTGG
CACACACCTTTAATACCAGCACTTAGAAGGCACAGGAAGGTGGATCTCTGTGAGTTCCA
GGCCAGCCTGGGTTACAAAATGAGACCCTATCTCAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAC
CACCAACAACAAAAACAACTTTAAAAAACATACTGGGGGAGTGGGGGGCTGGAGAGATG
GCTCAGCGGTTAAGAGCACTGACTGCTTTTCCTCTTCCGGGGACAGTGATTAGAGGCAC
TCAGGATGGTCCAGCGTTTGACAAACTCTCGTAGGCTTTCCTACAACACAGCCTCTAAC
AAAACTAGGCTGTCTCGAACCCCTGGCAACAGGATTGTTTACCTCTACACCATGAAGGG
TGGGAAAGCACCTAAATCCGCATGTGGTGTGTCCCCAGGCAGACTGCAAGGGGTTCGTG
CTGTGAGACCCAAAGTCCTTCTGAGATTGTCTAACCAAAGAAGCATGTCATGACGCAGG
GCCTATGATGGTTCCATGTGTGCCAAGTGTGTCTGTGACGGGATCAAGCGGGCTTTCCT
TATTGAGGAGCAGAAAATCGTTGTGGAAGTATTGAAGGCACAAGCACAGAGTCAGAGAG
CAAAATAGATCTGCAGCTTTTTGCACTGACTGCTCTTCCAGAGGTTCTGAGTTCAAATC
CCACAACCACATGGTGGCTCAGAACCATATGTAATGAGATCTGATACCCTCTTCAGGTG
TGTCTGAAGACAACTACAGTGTACTTACATATAATAAATAAATAAATCTTTTTTAAAAA
CCAGACTAGGTAGAGATCCATTGAGAGAGATACCTGGGGTTCACCCTTTATTCTTCACC
TGTGTACAAGCTTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACACACACACACACAC
ACAGATACTAATGTTGAATTGTTGAATTGTTTATACTGAGTATTTGAGAGGCTCTTAAT
TGAATCAGGCACGGCGTCACAGACGTGTGTAATCTCAGCCACTCTGGAGACTTCGGCAG
GAGGCAGCAAATTTGAGCCCAGCAATATAACTAGTTCCTGTCTCATAAACCAGAACCAT
GGGGCTGGGACGGTGCTTACCTGGCAGGCCAGAATCCTTTGGTTCATTCCCTAGCCTGG
AATGAAGCTGGGAAGGTGATGTAGGTCTACTCTAATCCCTGTACTTGAGGTAAGCAGAA
GAAGCAGAGAATCAAGGGCTTCCTTGGACCACAGGTTCAAGGGCACTCCTGGAGACACC
CAATCTGAAAAGCAAAAGTTTGCTTTGAGGACAAAGTCAGGAGTGGGGCAGCAGACTGT
AGACTGTGAATTAGAGGAAGTGCTCTGGATAAGACAGCAGATAAGCCAGAGAGGGAACG
GCTAACAGAAGGGAAATCAAACAGAAGGTCCACCTGGTTTCAAACCAAACACACCCTCT
AAACTGTAAGGCAAAGAGCTGCTGTTCTAGTAAACACAGAAACATGGCTTCGATGTTGA
TTTTCCCATGGTTGCATTTTGTTTGTGGCAAGGTCTCCTTGCACAGCCTCACCTGACTT
GCACTCCTGTCCTGCCTAAGCTTCTCAGATGTTGGGATCCACAAAGAGTATACTGCCAC
CATTCCTGGTTATTTAAATTCAAAAATTAAAAGTTTTGCAGTGCTGCCTGGGCAGCTCA
AGAGACAGCTCCCAGTACTATCTCATAGCATAGAAAACTCTTTTACAAGTGAGGTAGGT
TTGGTTTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTGTTTTTAAAGAATTATTTATTTATTTATTTAT
TTATTTAAAAGATTTATTTATTTTTATTGTATATAAGTACACTGAGACACTCCAGAAGA
GGGAGTCAGATCTCATTACAGATGATTGTGAGTCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAAC
TTCAGACCTTTGGAAGAGTAGTCGGGTGCTCTTACCCACTGAGCCATCTCACCAGCCCC
AAGAATTATTTATTTAATGTATGTAAGTACACTGTCTCTTCTTCAGACACACCAGAAGA
GGGCATCAGATCCCATTACAGATGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGAATTGAAC
TCAGGACCTCTGAAAGAGCAGCCATCTCTCCAGCCCCCAGAGGTAGTTTTCCTCCAGTT
GTTAATTCAGTTGTTAATTTTGGAGGAGAAAGCTTGTAATCAGAGATTTCTGTCTAATT
TCTGGCTCTGGGTTATCTTATGCAAGTAGTCTTAACTTTCTTTTAAATAAAAGCTTAAA
AAAAACCCACACATTTAAAAAAAAAACATGCATACATTTATCGGGGGCTGGAGATATGG
TTCAGTGGTTAAGAACACAGATTGCTCTTCCGAAGGTCCTGAGTTCAAATCCCAGCAAC
CACATGGGGGCTCACAACATCTGTAATGAGATCTGACACCCTTTTCTAGAGTGTTTAAA
GACAGCTAGTGTACCTATATATAATAAGTAAATATAATGTATATAATAATAATAAATAA
GTAAGTAAATAAATCTTTAAAAAAACCAGCTGGGCGTGGTGGCACATGCCTTTAATCCC
AGCACTTGAGAGGCAGAGGCAGGCAGATTTCTGAGTTGGAGGCCAGCCTGGTCTACAAA
GTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTATTCAGAGAAACCCTGTCTCGAAAAAAAAAAATCT
TTAAAAAAACATAACAAACAAAAACCCCCACATTTATCTAAGTGTGTGGGGGGGTTTCA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TGAGAACCATTGTCTGAGTAATTATCAGGTTTGGGAACAAGAGCCTTTACCCAGTGAAG
TGTCTTGGTTCCAATTTGGTTTCCTCTTTTCAAAACAAACCTAGTAACTGCTTCTTTGG
CCACTGCTAGGGGAAAATAAACTAACTGGTTGGCATAGCATACACATGCAATAATAGTT
GTTAATATAATTCCTGCTAAGTCAAAGTGCTGTGAGGGCTGAGGTCAGGTGAGTGAAAG
CTTTCGAAGCCCACGCTGGCCTTGGACTCTTTCAGATGACGTTGAACTACTGACCCACT
TGTCTCCACATCCCTGGCGCTGGGACTCCAGGAATGCTGACCACCACATTTTTAATTCT
CCTAAATTTTGTGCATTTTCTCCACTACAAACCAAGACCACACCTTTAATCCCAACACT
CTGGAGCCTAAAGTAGGTGGATCTGAGAGTTTGAGGTCAGGCTGGTCTAGCTCGTAAGT
TCTAAGAGATACGGAGAGGCCAGGTCTTAAAACTAAAAACAATTGGGGGAGCACGTATA
TGTTTTGTGTTTCTTTGCTTTTTTGTCGTGTGTGTGTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGCAC
GCGCACCGGCATGCGTGTGGTGTTGCACACCCCTGCAATTCTAGCACTTGAGAAGTTGA
GGTAGAAGGTTGGCCACGAATTCAAGGCCAACACGGGCTACAAACTGAGTACTACGGCA
ACAAGGGCTATATCTCAAAGCCCTGTTTCTAAAACAACAATAAAAAAAGATTTCAGCCG
GCCCAGCACTTGGGAAGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGGCTGGCCTC
TGTCCTGGAACTCACTCTGTAACCCAGGCTGGCCTCAAACTCAGAGATCCATCTGCCTC
CACCTCCCCAGTGCTGGGATTAAAGTCATATGGCACTACTACCTGGATGTGACTGAATA
TTTGTA

ACLARACIONES:

- Secuencia genómica correspondiente a la región 5' flanqueante del gen *Gls2* murino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

>Fragmento EX2

TCCTCAAACTGACAAATACCCTCCTACCTCTTCTTCCCAGTACTTCCAAGGCTGAGATT
GAAGGTGTGTGCCACCACCATCCTGCTTGGTTTATGAACTTTTTAAAAATGTATATAGG
TGTTTTGCTTTGTATATGTGTCTGTGTACCACATGCAAGCCTGGAACTTGCTGAGATCA
GAGGAGGTGTTGGATCCCCTGAAACTGGAGCCACTACATGGGTATTAGGAATTGAACCC
AGGTCCTCTGTAAGAACAACTGCTCTTAACCACTAAGCTAGCTCTTCAGCCCTGGAGTA
TGTGATACTCCTGAAGAGGGCCCATGCCCAGTTTCCAGCACCCACTTGGTGGTTAGCGC
AACTATCCATAACTCTAGTTCCAGGGTACCTGGTTTGTTCTGACTTCTCAGGGTACCAG
GCTGGGTGTGTTGGCCTTTAGTCCCAGTATTCTGGAGGCAGAGGCAGAAGGATTTCTGT
GAGTTCCAGGACTGCCTGAACTACATAGTAAGTTCTGAGATAGCCAGGCCTACATAGAA
AGACCCTTAGAACAAACAAACAAAATCCTAGATAAGTCAAAGATGAAAATAAAAACCCC
AGTATTAGAGATAACTAGTTAATACTGTGATATAACCATATGTATCTTATATATGTTAT
GTATGTATGTGCTTGTAATTTAACAAAAATAAAATTATGATATTCATAGTAATTGGTAA
GCTATGTTTTCCATTTATGAATTTATTTTTAATTGATCTTTAGTGTAAGCATATGAGTA
CCAGTGTGCCACATGTTCATGTCAGTGGACAACTTTGTGGAATTGGTTCTTTCCTTCTA
CCTTTACGTGGCTTCTGGGGTTTCATGGGTCAAACTCACTGCCAGAGTTGCATAGCAAG
CACTTTTTTCTGCGGAGCCATCTTGCTTACCCTATATTCACTTTTTTAAATGGCTTTCT
AAAAGTTTTATTTTGCCGGGCGTGGTGGCTCACACCTTTAATCCCAGTACTTGGGAGGC
AGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGAC
AGCCAGGGCTATACAGAGAAACCCTGTCTTGAAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAACCCAAAAAACAAAAAAAAAAACTGTCTAAGCTAAGCATGATGGTGCATGCTTTA
GTCTTAGCACCCAAGAGGCAGAGGCAGGTGGATCCCTGAGTTCAAAGCCAGCCTGGTCT
ACAGAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGAGCTACACAGAGAAAGCCTATCTTAGGGGAAAAA
AAAAGTCTTCTAAGTCTAATAACATTAAAAGAAGTCTTAAGATCAGCGGTTCTCCACCT
TCCTAATGTATTAAAGGGCTTAACTCTTTAACCCTTTAAAACAGTTCTTCATGTTGTGC
TGACCCCCAATCGTAAAATAATTCTCATTGTTACTTCAAAACTTTAGTTTTGCTCCTGT
TATGAATTGTAATGTAAATATCTGTGTTTTCTGATGGTCTTAGGCCCCTCCTGTGAAAG
GGTTGTTTGACCCCAAAGGGTCAAGACCTACAGGTTGAGAACCATTGCTTTAGATGTTT
TTGGAGTTTTATACCAGTGTGAGAGACCTTTGCGGCTGGCATGGAGACAAAAGCATACA
GTGGCAGAGAACAGACAGGAAGTTGGTGATTGGCTGATTTTATATAGGGCAGTTTATCA
TGGAGTAAGGTCTTAGATAGGCCTCACTCCACCTGAGTGAGGTAGACATCCTATATCTT
TATTCCATAGATAAGTAATATTAAGTGGGCTTCCTATAGCAATTGGGAGCAAAGTAGGA
CTGCACTGTGCAGGAGAGAAGAGGGTGCATTTGAGAGAAAATAGGAAGATCAATTTGTC
CAGTGTTAGTTTCTAACTCACTGCAGACGCAGAATGTGGGAACAGTCAGACGGATGCTG
TGTTTCCATCTCGTCCCCATCCTCACGGGAAACACAAAGACACACACCATTGCTGGATG
CACTCTGTTTCCAGTGTTTGCCGGACATCAGTACGTGCAATGATTTAGGAGGTGGCTCG
AAATAAAGGACTGAAAAGTTCAGAGTTCCTTTTAAAAGAGACTAGAGAGTCAGATTGGC
AACCTCTCGCACTGGGGTGGAAGTTAGGATCACAGAACCTGCCAGATGGTTCAAAGAGG
AGGCCTAGGATGACAGCCCATGACAGGTCCGTGTTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGA
GGAGGGAGCATCCTCAGGCTTCTGCCTTCCCGTCTCTTTCCCCCAAACAG**TGACGCCTC**
ACACAGCGGCATGCTGCCTCGACTTGGTGACCTGCTTTTCTACACTATTGCAGAGGGAC
AGGAGCGTATCCCTATCCACAAGTTCACCACGGTGAGTGGCTATCTATCTGCCGATTCA
GAGAACTCTGATTCCTTAGAGTCTCTGGAACCTGTGAGGAGGATGGTCGAACAGTATAG
GGTA

ACLARACIONES:

- Letra en rosa: exón 2 del gen Gls2 murino.
- Letra en negro: secuencia intrónica del gen Gls2 murino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

>BC2

CCAAGTCCAGAGGAGAACACCTTTCGTGAGCTGTGGCAAGAGGCTTGCTAGCCTTCCAA
GTTCCAAAACCAATTTGTTCTACCAGTTGTAATTGGGGTGGAGTGACTTGAGTAGCTAT
TGGGAAACACTGAGGTATGGATTGCTGTCCTTGGCTGACCTAGCCAGACCTCTTCTTCC
CCCCCAAAGGCTCTGAAGGCCACTGGACTGCAGACGTCAGACCCACGGCTCCAGGACTG
CATGAGCAAGATGCAGCGCATGGTCCAAGAGTCCAGCAGCGGTGGCCTCTTGGACCGAG
AGCTCTTCCAAAAGTGAGAGCCCCAGAGATGAGCATTGACCCCCAAAACAGTTCTGTAG
GAGGAAAGATCTTGGGAATTAAACAGTTCAACCCTTCATTTTGTTAGTAGCTTCTAGAA
GATGTTCTCATACATATATGGTGTATATATTAGGACTTCTCAATGCTAAAGCCCATAGC
TGTGGTTATTCTGATTTTAACGTTTTTTTCTCAGAATGTCTTGAGATATCTTTCCATGT
CTTTAGAACATATCATTTTAGAGGTTAGGAAATTTAAACCTAGGGAGATGAAATGATAT
TCCAAAAGTTACACGACTGCTAGTCCAAAACCAAATGAACACTTCAACCTTCTTTACCT
CTGACTTCCGTGCTCCCGAGTGAGTCCCAGCTGTGTCTCTCCAGCTCCTAACACACTCG
TGTCTGGGATCCAGGTGTGTGAGCAGCAACATTGTGCTCCTGACTCAGGCATTCCGAAA
GAAGTTTGTCATTCCTGACTTTGAGGAGTTCACGGGCCATGTGGATCGCATATTTGAGG
ATGCCAAAGAGCCCACTGGAGGCAAAGTGAGGGCCAAGGGGACGAGGGAGGGGAGAGGG
CTCTGGGCCAGATACACAGTGCTTCTCAGAGACGCCTTGGGGCTGTGGACTCAATGATG
GATGAGCAGAGCCTATAAAGTTGAGGGCATGTTTTCATGTGTTTTCACTTGTGATTCTA
GTAGCACGTGACTTAGGACCTTTATGGATGTGGATGGCAGAAGCTAGGGTTTGGTGGCA
CAGGCCTGTAGTCCCAGCTCTTGTTGGGCTAAGACAGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAGTA
TTGGTTACATAGGGAGACCCTGTCTCAAAGTAAAGAGATTCAGTCCAGCCTTCAAGGAG
ACTTACAGGGACTGAACCTGAGAACCTAATCCTAGAATTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTAATATTTCATGGGCTCTACTGTTTGGACTACAGAGATGTATGGTTGAAAGGGACTA
AAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGAATATACAAAAGGGGACAGATTTTAACTTTTACCTC
AAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCTGTGCTGTTCTCCATAGTCACCTGTCTCCCCTTTC
TCTACCCATTTATGCCCAGGTGGCAGCCTACATCCCGCACCTGGCCAAATCAAACCCAG
ACCTTTGGGGCGTCTCCCTGTGCACTGTGGATGGGCAGCGGTAAGATGCTGGGTGATGC
TGGGCCTTGTAGTGCACCCCTTTAATCTCAGGACTCAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATCT
CTGAGTTTGAGACCAGCCTGGTATCATCCTGAGTGCCAGGACAGCCAGAGCTCTGCAGA
TAGACCCTGTCTCAAAACAAAGATGCTGGGTGAGAGGCAGGAGCTGAGAGAGCACAGGT
GAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTATGGTACCTGTCTCCTCCAGGCACTCTGTGGGCCA
CACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAGTCCTGTGTCAAGCCCCTCACTTACGCCATCTCCG
TGAGCACCTTAGGCACTGACTACGTGCACAAGTTTGTGGGCAAGGAACCCAGTGGTCTG
CGCTATAACAAACTCTCCCTCAATGAGGAAGGTGAGCATCTCCAGGGCTCAGGTTCATA
CCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCGCCTCCTCCTCTGTGTCTTAGCCTTTGCTCTCATC
C

ACLARACIONES:

- Letra en rosa: exones 3, 4, 5 y 6 (por orden) del gen *Gls*2 murino.
- Letra en negro: secuencia intrónica del gen *Gls*2 murino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

>Fragmento EX234

ACTAGTTAATACTGTGATATAACCATATGTATCTTATATATGTTATGTATGTATGTGCT
TGTAATTTAACAAAAATAAAATTATGATATTCATAGTAATTGGTAAGCTATGTTTTCCA
TTTATGAATTTATTTTTAATTGATCTTTAGTGTAAGCATATGAGTACCAGTGTGCCACA
TGTTCATGTCAGTGGACAACTTTGTGGAATTGGTTCTTTCCTTCTACCTTTACGTGGCT
TCTGGGGTTTCATGGGTCAAACTCACTGCCAGAGTTGCATAGCAAGCACTTTTTTCTGC
GGAGCCATCTTGCTTACCCTATATTCACTTTTTTAAATGGCTTTCTAAAAGTTTTATTT
TGCCGGGCGTGGTGGCTCACACCTTTAATCCCAGTACTTGGGAGGCAGAGGCAGGCGGA
TTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTATA
CAGAGAAACCCTGTCTTGAAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAA
ACAAAAAAAAAAACTGTCTAAGCTAAGCATGATGGTGCATGCTTTAGTCTTAGCACCCA
AGAGGCAGAGGCAGGTGGATCCCTGAGTTCAAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTC
CAGGACAGCCAGAGCTACACAGAGAAAGCCTATCTTAGGGGAAAAAAAAAGTCTTCTAA
GTCTAATAACATTAAAAGAAGTCTTAAGATCAGCGGTTCTCCACCTTCCTAATGTATTA
AAGGGCTTAACTCTTTAACCCTTTAAAACAGTTCTTCATGTTGTGCTGACCCCCAATCG
TAAAATAATTCTCATTGTTACTTCAAAACTTTAGTTTTGCTCCTGTTATGAATTGTAAT
GTAAATATCTGTGTTTTCTGATGGTCTTAGGCCCCTCCTGTGAAAGGGTTGTTTGACCC
CAAAGGGTCAAGACCTACAGGTTGAGAACCATTGCTTTAGATGTTTTTGGAGTTTTATA
CCAGTGTGAGAGACCTTTGCGGCTGGCATGGAGACAAAAGCATACAGTGGCAGAGAACA
GACAGGAAGTTGGTGATTGGCTGATTTTATATAGGGCAGTTTATCATGGAGTAAGGTCT
TAGATAGGCCTCACTCCACCTGAGTGAGGTAGACATCCTATATCTTTATTCCATAGATA
AGTAATATTAAGTGGGCTTCCTATAGCAATTGGGAGCAAAGTAGGACTGCACTGTGCAG
GAGAGAAGAGGGTGCATTTGAGAGAAAATAGGAAGATCAATTTGTCCAGTGTTAGTTTC
TAACTCACTGCAGACGCAGAATGTGGGAACAGTCAGACGGATGCTGTGTTTCCATCTCG
TCCCCATCCTCACGGGAAACACAAAGACACACACCATTGCTGGATGCACTCTGTTTCCA
GTGTTTGCCGGACATCAGTACGTGCAATGATTTAGGAGGTGGCTCGAAATAAAGGACTG
AAAAGTTCAGAGTTCCTTTTAAAAGAGACTAGAGAGTCAGATTGGCAACCTCTCGCACT
GGGGTGGAAGTTAGGATCACAGAACCTGCCAGATGGTTCAAAGAGGAGGCCTAGGATGA
CAGCCCATGACAGGTCCGTGTTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGAGCATCC
TCAGGCTTCTGCCTTCCCGTCTCTTTCCCCCAAACAGTGACGCCTCACACAGCGGCATG
CTGCCTCGACTTGGTGACCTGCTTTTCTACACTATTGCAGAGGGACAGGAGCGTATCCC
TATCCACAAGTTCACCACGGTGAGTGGCTATCTATCTGCCGATTCAGAGAACTCTGATT
CCTTAGAGTCTCTGGAACCTGTGAGGAGGATGGTCGAACAGTATAGGGTAGCTAATGGC
TGCCACTGGGGGATGGGAAATACAGAGGGGTAATGGCTGCCTGGGCTAAAAAGCCAACG
CCATCCTTCCCCCAAGTCCAGAGGAGAACACCTTTCGTGAGCTGTGGCAAGAGGCTTGC
TAGCCTTCCAAGTTCCAAAACCAATTTGTTCTACCAGTTGTAATTGGGGTGGAGTGACT
TGAGTAGCTATTGGGAAACACTGAGGTATGGATTGCTGTCCTTGGCTGACCTAGCCAGA
CCTCTTCTTCCCCCCCAAAGGCTCTGAAGGCCACTGGACTGCAGACGTCAGACCCACGG
CTCCAGGACTGCATGAGCAAGATGCAGCGCATGGTCCAAGAGTCCAGCAGCGGTGGCCT
CTTGGACCGAGAGCTCTTCCAAAAGTGAGAGCCCCAGAGATGAGCATTGACCCCCAAAA
CAGTTCTGTAGGAGGAAAGATCTTGGGAATTAAACAGTTCAACCCTTCATTTTGTTAGT
AGCTTCTAGAAGATGTTCTCATACATATATGGTGTATATATTAGGACTTCTCAATGCTA
AAGCCCATAGCTGTGGTTATTCTGATTTTAACGTTTTTTTCTCAGAATGTCTTGAGATA
TCTTTCCATGTCTTTAGAACATATCATTTTAGAGGTTAGGAAATTTAAACCTAGGGAGA
TGAAATGATATTCCAAAAGTTACACGACTGCTAGTCCAAAACCAAATGAACACTTCAAC
CTTCTTTACCTCTGACTTCCGTGCTCCCGAGTGAGTCCCAGCTGTGTCTCTCCAGCTCC
TAACACACTCGTGTCTGGGATCCAGGTGTGTGAGCAGCAACATTGTGCTCCTGACTCAG
GCATTCCGAAAGAAGTTTGTCATTCCTGACTTTGAGGAGTTCACGGGCCATGTGGATCG
CATATTTGAGGATGCCAAAGAGCCCACTGGAGGCAAAGTGAGGGCCAAGGGGACGAGGG
AGGGGAGAGGGCTCTGGGCCAGATACACAGTGCTTCTCAGAGACGCCTTGGGGCTGTGG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ACTCAATGATGGATGAGCAGAGCCTATAAAGTTGAGGGCATGTTTTCATGTGTTTTCAC
TTGTGATTCTAGTAGCACGTG

ACLARACIONES:

- Letra en rosa: exones 2, 3 y 4 (por orden) del gen *Gls*2 murino.
- Letra en negro: secuencia intrónica del gen *Gls*2 murino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

>BC234

GGGCTAAGACAGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAGTATTGGTTACATAGGGAGACCCTGTCT
CAAAGTAAAGAGATTCAGTCCAGCCTTCAAGGAGACTTACAGGGACTGAACCTGAGAAC
CTAATCCTAGAATTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATATTTCATGGGCTCTACTGT
TTGGACTACAGAGATGTATGGTTGAAAGGGACTAAAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGAA
TATACAAAAGGGGACAGATTTTAACTTTTACCTCAAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCT
GTGCTGTTCTCCATAGTCACCTGTCTCCCCTTTCTCTACCCATTTATGCCCAGGTGGCA
GCCTACATCCCGCACCTGGCCAAATCAAACCCAGACCTTTGGGGCGTCTCCCTGTGCAC
TGTGGATGGGCAGCGGTAAGATGCTGGGTGATGCTGGGCCTTGTAGTGCACCCCTTTAA
TCTCAGGACTCAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATCTCTGAGTTTGAGACCAGCCTGGTATC
ATCCTGAGTGCCAGGACAGCCAGAGCTCTGCAGATAGACCCTGTCTCAAAACAAAGATG
CTGGGTGAGAGGCAGGAGCTGAGAGAGCACAGGTGAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTA
TGGTACCTGTCTCCTCCAGGCACTCTGTGGGCCACACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAG
TCCTGTGTCAAGCCCCTCACTTACGCCATCTCCGTGAGCACCTTAGGCACTGACTACGT
GCACAAGTTTGTGGGCAAGGAACCCAGTGGTCTGCGCTATAACAAACTCTCCCTCAATG
AGGAAGGTGAGCATCTCCAGGGCTCAGGTTCATACCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCG
CCTCCTCCTCTGTGTCTTAGCCTTTGCTCTCATCCAGGTAGGAACTGGACCCAACCCCG
ATTAGCTTCAGAGTGGGAACAGTGCAGAGTAGGCTTTCTTGGTGACTGACAAGACTGAG
TGGTTTGTATTTCCCCAGGAATTCCCCATAACCCCATGGTCAATGCTGGTGCCATTGTG
GTCAGCTCCCTGATCAAGGTCAGTGCATTTCTAACCTTCTGAAAGGTAATTTCTCAACT
CCCCTTATCCCTACATCCCCATATCTGTTCAGTTCTCCAGGCAGATAGGGCAGGGGGTG
GGGGGGTTCCTGAGTCATTTGAGAATTAATAAGAGGCATGGAAAAAATGCATCAGGAAG
TCCTGTGCAATAAGCTGTGGATGTTAGTGATAGCTGCCACATCCGTCCCCTCACCCCAT
GTGCTCCCTGCCCCCTCCCAGAGTTCTATGAGCAGGTCATGACCTTTGCCTAGGACCAA
GAGCCAAATGCCAAGGGCAGGGGGAGGACAACACCATCAGGCATTGATTGGCCACTCCT
GGGTGAGAGATATGCTGACAGAAGGGTGAATGGCCAGTCCAGGGCAGTCATTCACGTCA
CCTGGAACTGTGAGTTGGCCTTGAGCAAGTGATGTCCAACAGGCCCATCAGCTGCAGGT
CTCCCAGGGCTTGAGCAAGAACGCAGGAGCAGTGTGGGCAGCGACACTCTGGGGCCAAT
CACGGTCCCTCCTGAAGAAGGTGGTGTTAGGAACCCTTCCCCCTAGGAACTCAGGTTTC
AGAGTCCTGGAGTGTTGACTCCTACCTGAGCCTGCAGTGTTGACGGAAGTGAGCCTGGC
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
ACTGTCTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGT
GTGACTGTCTGTGTGTGTGTCTGTCTGTCTGTTCTGTGTCTGTGTGTCTCGTGCGTG
CTAAGGTAAGCATATCTCCCTGTTCTGGGGAGTCCTGTCGGCAGCCCTATCTTTGGGAC
CTGCCTCATCTCATCTTCTACTAGAGTTG

ACLARACIONES:

- Letra en rosa: exones 5, 6 y 7 (por orden) del gen *Gls*2 murino
- Letra en negro: secuencia intrónica del gen *Gls*2 murino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

>BCext

AGTAGCACGTGACTTAGGACCTTTATGGATGTGGATGGCAGAAGCTAGGGTTTGGTGGC
ACAGGCCTGTAGTCCCAGCTCTTGTTGGGCTAAGACAGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAGT
ATTGGTTACATAGGGAGACCCTGTCTCAAAGTAAAGAGATTCAGTCCAGCCTTCAAGGA
GACTTACAGGGACTGAACCTGAGAACCTAATCCTAGAATTGCCTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTAATATTTCATGGGCTCTACTGTTTGGACTACAGAGATGTATGGTTGAAAGGGACT
AAAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGAATATACAAAAGGGGACAGATTTTAACTTTTACCT
CAAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCTGTGCTGTTCTCCATAGTCACCTGTCTCCCCTTT
CTCTACCCATTTATGCCCAGGTGGCAGCCTACATCCCGCACCTGGCCAAATCAAACCCA
GACCTTTGGGGCGTCTCCCTGTGCACTGTGGATGGGCAGCGGTAAGATGCTGGGTGATG
CTGGGCCTTGTAGTGCACCCCTTTAATCTCAGGACTCAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATC
TCTGAGTTTGAGACCAGCCTGGTATCATCCTGAGTGCCAGGACAGCCAGAGCTCTGCAG
ATAGACCCTGTCTCAAAACAAAGATGCTGGGTGAGAGGCAGGAGCTGAGAGAGCACAGG
TGAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTATGGTACCTGTCTCCTCCAGGCACTCTGTGGGCC
ACACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAGTCCTGTGTCAAGCCCCTCACTTACGCCATCTCC
GTGAGCACCTTAGGCACTGACTACGTGCACAAGTTTGTGGGCAAGGAACCCAGTGGTCT
GCGCTATAACAAACTCTCCCTCAATGAGGAAGGTGAGCATCTCCAGGGCTCAGGTTCAT
ACCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCGCCTCCTCCTCTGTGTCTTAGCCTTTGCTCTCAT
CCAGGTAGGAACTGGACCCAACCCCGATTAGCTTCAGAGTGGGAACAGTGCAGAGTAGG
CTTTCTTGGTGACTGACAAGACTGAGTGGTTTGTATTTCCCCAGGAATTCCCCATAACC
CCATGGTCAATGCTGGTGCCATTGTGGTCAGCTCCCTGATCAAGGTCAGTGCATTTCTA
ACCTTCTGAAAGGTAATTTCTCAACTCCCCTTATCCCTACATCCCCATATCTGTTCAGT
TCTCCAGGCAGATAGGGCAGGGGGTGGGGGGGTTCCTGAGTCATTTGAGAATTAATAAG
AGGCATGGAAAAAATGCATCAGGAAGTCCTGTGCAATAAGCTGTGGATGTTAGTGATAG
CTGCCACATCCGTCCCCTCACCCCATGTGCTCCCTGCCCCCTCCCAGAGTTCTATGAGC
AGGTCATGACCTTTGCCTAGGACCAAGAGCCAAATGCCAAGGGCAGGGGGAGGACAACA
CCATCAGGCATTGATTGGCCACTCCTGGGTGAGAGATATGCTGACAGAAGGGTGAATGG
CCAGTCCAGGGCAGTCATTCACGTCACCTGGAACTGTGAGTTGGCCTTGAGCAAGTGAT
GTCCAACAGGCCCATCAGCTGCAGGTCTCCCAGGGCTTGAGCAAGAACGCAGGAGCAGT
GTGGGCAGCGACACTCTGGGGCCAATCACGGTCCCTCCTGAAGAAGGTGGTGTTAGGAA
CCCTTCCCCCTAGGAACTCAGGTTTCAGAGTCCTGGAGTGTTGACTCCTACCTGAGCCT
GCAGTGTTGACGGAAGTGAGCCTGGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGT
GTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTCTGTCTGTCTG
TTCTGTGTCTGTGTGTCTCGTGCGTGCTAAGGTAAGCATATCTCCCTGTTCTGGGGAGT
CCTGTCGGCAGCCCTATCTTTGGGACCTGCCTCATCTCATCTTCTACTAGAGTTGGGGA
TGAAGAACATTTGGGTAGAACATTTGCTCCACCATGTACAGAGACCCAAGGCACTTCAA
TCTCTGGCACTGCTATAAAGAAATAATTTTTGTTTCTTTATCACTATATCTGGGGATAT
CTCAGTGGCAGAACATTTGACCAGCATACCTGAGTTCTTAGTTTCAATCCTGGTAGTAG
AAAGAAAAATCAGGGCTGGTGAGATGGCTCAGGGGCTCAGGGGGTAAGGGCACCCGAAT
GTTCTTCCAAAGGTCCGAAGTTCAAATCCCAGCAACCATATGGTGGCTCACAACCACCT
GTAACAGAGATCTAACACCCTCTTCTGGTGCGACTGAAGACAGCTACAGTATACTTACA
TATAATAAATAAATAAATCTTTAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAATCATTCATCAATA
TAACTGAATATTCAGCAGACACATTCCATTTCTGTCACAGAGGATCTGGGAATCAGGTA
TAAGCTAGAGTGAGGCTATAGAATGGGGCATAAAGGTTGGGGGGGGGGTATAGGCATGG
TAGCATATGCCTATAATGCCAGAACCTAGAAGTTCTGGGGCTGGAGAGATGGATCAGCA
GTTGAGAGCACGGACTGCTCTTCCAGAGGTCTTGAGTTCAATTCCCAGCAACTACATAG
TGGCTCCCAACCATCTGTAATGGGATCTGAAAACAGCTACAGTGTACTCATATACATAA
AAAAAAAAATCACAAGTTCAAGGCTAGTCTGGGATACCTGAGACCTCTATTTAAAAGTA
AATAAATAAATAAAATGGATAGTAGTAATCATGGATAAGGTGGAATTTAGAGACCGAAG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TGGAGACAGAAGGAGTGAGCCAGGAGAGAGGAGAGGCAAGTAGATGGGGTGAGGTTATC
TGAATCCTCATTCCTTGATAATTTACATTTTGTTTGTTTGTTTCAACAATCCTCCTGCC
TCAACCTCCCAAAAGCTGGGATTATAGGTGTGCATCACCACACAGGCTGGTGGTCTGGA
TTTTTCTCACTAGACTACATAAACCTGCATGCACAAAAAGTCTCAGCTGCTTAAACAAG
AAGTATCTGGTGCCTATAACATCAGTTACTCCAAGGCCAGAGGGGCTCTCAGCCACGGG
ACAACCCAGGCCTGACTCAGAGCAAACAAAGGACATTGTAAAATGTAACATTCCCAGAG
CAAACAAAGGGCATTGTAAAAAATAACAGTCCCAGTAGCAAGGTTTGACTAAGCCCTCC
TGCCCCTGCTGTCTGCCATCCTCCCAGACCTGGAATGCTGATTGCTTTCCCTTTCCTTC
TGTGCAGATGGACTGTAACAAAGCAGAGAAGTTCGATTTTGTAAGTTCCTCACACTCAA
CCCTTTCCTGCCTTTCTCCACCGCATGCTGTCCACACAGCTGCTACAGCTATCTCCAGA
GGAGTGGGGACCACTGGCTTCAGCTTCTTGAAGTCCCTACTCTCCCGGGGAAAGAGAGG
GTCTGAGTGCCTTATCAGCCCGGGTGTGTTAGCTAGCGATCCTTAGTCTAAAGGCGTCT
TTCTTACCTCTCTTCTCTTCCAGGTGTTACAGTATCTGAACAAGATGGCTGGGAACGAA
TTCATGGGGTTCAGCAATGCCACGTAAGACTCTGTTTAGGGGGCTGGCTGAGTAGGTTG
TACCGTTGAGCATGTGTGTGCTTGGTGGGGGAAGTCGAGGAGGGAAGGGAAAGAAGAAT
ATATATTATCGTAGGAAGAAATTTGGGGGGAATCTTGGCCTCTCAGCTTCCTCTGAGCT
TCTGCATCGACATTTACTTACTTGGAGAAATAACATCCCATGTCTGATTACCACATAAT
GAGAAAGGCAGCATGCTGGCTTGTGCCGAGGCCCTCGTCAAGACTCAGAGCCAAACATC
TTGCCAAATTTCCTAGACAGAGCCACTAGACAGCTTCGAAGCTT

ACLARACIONES:

- Letra en rosa: exones 5, 6, 7,8 y 9 (por orden) del gen Gls2 murino
- Letra en negro: secuencia intrónica del gen Gls2 murino.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

> pGKneoBCext (construcción Mock)

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCG
CCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT
TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG
GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA
GTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT
TATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG
GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCA
CCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAA
TGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACCTGCAGGAATTCGAGCTCGCCCGGGGA
TCCTCTAGAGTCAACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAAC
TTCGTTAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTT
TAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCA
CATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTA
CTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGAC
AAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGA
AGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTC
AGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGG
GCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCG
CGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCC
ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGC
TATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAG
GACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTC
GACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGAT
CTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGG
CGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC
GAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAG
CATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
GATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGC
CGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATA
GCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTC
GTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAC
GAGTTCTTCTGAGGGGATCAATTCTCTAGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC
TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAG
CTGGGGCTCGAAACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT
TCGTTGACCTAGAGTCGAATCAAGCTGATCCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGT
ATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTAGCTTTATCGATACCG
TCGACGGTATCGATAAGCTTAGTAGCACGTGACTTAGGACCTTTATGGATGTGGATGGCA
GAAGCTAGGGTTTGGTGGCACAGGCCTGTAGTCCCAGCTCTTGTTGGGCTAAGACAGGCT
CAGAAGTTTGAGTTCAGTATTGGTTACATAGGGAGACCCTGTCTCAAAGTAAAGAGATTC
AGTCCAGCCTTCAAGGAGACTTACAGGGACTGAACCTGAGAACCTAATCCTAGAATTGCC
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATATTTCATGGGCTCTACTGTTTGGACTACAGAGATGTA
TGGTTGAAAGGGACTAAAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGAATATACAAAAGGGGACAGAT
TTTAACTTTTACCTCAAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCTGTGCTGTTCTCCATAGTCAC
CTGTCTCCCCTTTCTCTACCCATTTATGCCCAGGTGGCAGCCTACATCCCGCACCTGGCC
AAATCAAACCCAGACCTTTGGGGCGTCTCCCTGTGCACTGTGGATGGGCAGCGGTAAGAT

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GCTGGGTGATGCTGGGCCTTGTAGTGCACCCCTTTAATCTCAGGACTCAGGAGGCAGAGG
CAGGAGGATCTCTGAGTTTGAGACCAGCCTGGTATCATCCTGAGTGCCAGGACAGCCAGA
GCTCTGCAGATAGACCCTGTCTCAAAACAAAGATGCTGGGTGAGAGGCAGGAGCTGAGAG
AGCACAGGTGAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTATGGTACCTGTCTCCTCCAGGCACTCT
GTGGGCCACACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAGTCCTGTGTCAAGCCCCTCACTTACGCC
ATCTCCGTGAGCACCTTAGGCACTGACTACGTGCACAAGTTTGTGGGCAAGGAACCCAGT
GGTCTGCGCTATAACAAACTCTCCCTCAATGAGGAAGGTGAGCATCTCCAGGGCTCAGGT
TCATACCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCGCCTCCTCCTCTGTGTCTTAGCCTTTGCTCT
CATCCAGGTAGGAACTGGACCCAACCCCGATTAGCTTCAGAGTGGGAACAGTGCAGAGTA
GGCTTTCTTGGTGACTGACAAGACTGAGTGGTTTGTATTTCCCCAGGAATTCCCCATAAC
CCCATGGTCAATGCTGGTGCCATTGTGGTCAGCTCCCTGATCAAGGTCAGTGCATTTCTA
ACCTTCTGAAAGGTAATTTCTCAACTCCCCTTATCCCTACATCCCCATATCTGTTCAGTT
CTCCAGGCAGATAGGGCAGGGGGTGGGGGGGTTCCTGAGTCATTTGAGAATTAATAAGAG
GCATGGAAAAAATGCATCAGGAAGTCCTGTGCAATAAGCTGTGGATGTTAGTGATAGCTG
CCACATCCGTCCCCTCACCCCATGTGCTCCCTGCCCCCTCCCAGAGTTCTATGAGCAGGT
CATGACCTTTGCCTAGGACCAAGAGCCAAATGCCAAGGGCAGGGGGAGGACAACACCATC
AGGCATTGATTGGCCACTCCTGGGTGAGAGATATGCTGACAGAAGGGTGAATGGCCAGTC
CAGGGCAGTCATTCACGTCACCTGGAACTGTGAGTTGGCCTTGAGCAAGTGATGTCCAAC
AGGCCCATCAGCTGCAGGTCTCCCAGGGCTTGAGCAAGAACGCAGGAGCAGTGTGGGCAG
CGACACTCTGGGGCCAATCACGGTCCCTCCTGAAGAAGGTGGTGTTAGGAACCCTTCCCC
CTAGGAACTCAGGTTTCAGAGTCCTGGAGTGTTGACTCCTACCTGAGCCTGCAGTGTTGA
CGGAAGTGAGCCTGGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGA
CTGTCTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTCTGTCTGTCTGTTCTGTGTCTGTG
TGTCTCGTGCGTGCTAAGGTAAGCATATCTCCCTGTTCTGGGGAGTCCTGTCGGCAGCCC
TATCTTTGGGACCTGCCTCATCTCATCTTCTACTAGAGTTGGGGATGAAGAACATTTGGG
TAGAACATTTGCTCCACCATGTACAGAGACCCAAGGCACTTCAATCTCTGGCACTGCTAT
AAAGAAATAATTTTTGTTTCTTTATCACTATATCTGGGGATATCTCAGTGGCAGAACATT
TGACCAGCATACCTGAGTTCTTAGTTTCAATCCTGGTAGTAGAAAGAAAAATCAGGGCTG
GTGAGATGGCTCAGGGGCTCAGGGGGTAAGGGCACCCGAATGTTCTTCCAAAGGTCCGAA
GTTCAAATCCCAGCAACCATATGGTGGCTCACAACCACCTGTAACAGAGATCTAACACCC
TCTTCTGGTGCGACTGAAGACAGCTACAGTATACTTACATATAATAAATAAATAAATCTT
TAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAATCATTCATCAATATAACTGAATATTCAGCAGACAC
ATTCCATTTCTGTCACAGAGGATCTGGGAATCAGGTATAAGCTAGAGTGAGGCTATAGAA
TGGGGCATAAAGGTTGGGGGGGGGGTATAGGCATGGTAGCATATGCCTATAATGCCAGAA
CCTAGAAGTTCTGGGGCTGGAGAGATGGATCAGCAGTTGAGAGCACGGACTGCTCTTCCA
GAGGTCTTGAGTTCAATTCCCAGCAACTACATAGTGGCTCCCAACCATCTGTAATGGGAT
CTGAAAACAGCTACAGTGTACTCATATACATAAAAAAAAAAATCACAAGTTCAAGGCTAG
TCTGGGATACCTGAGACCTCTATTTAAAAGTAAATAAATAAATAAAATGGATAGTAGTAA
TCATGGATAAGGTGGAATTTAGAGACCGAAGTGGAGACAGAAGGAGTGAGCCAGGAGAGA
GGAGAGGCAAGTAGATGGGGTGAGGTTATCTGAATCCTCATTCCTTGATAATTTACATTT
TGTTTGTTTGTTTCAACAATCCTCCTGCCTCAACCTCCCAAAAGCTGGGATTATAGGTGT
GCATCACCACACAGGCTGGTGGTCTGGATTTTTCTCACTAGACTACATAAACCTGCATGC
ACAAAAAGTCTCAGCTGCTTAAACAAGAAGTATCTGGTGCCTATAACATCAGTTACTCCA
AGGCCAGAGGGGCTCTCAGCCACGGGACAACCCAGGCCTGACTCAGAGCAAACAAAGGAC
ATTGTAAAATGTAACATTCCCAGAGCAAACAAAGGGCATTGTAAAAAATAACAGTCCCAG
TAGCAAGGTTTGACTAAGCCCTCCTGCCCCTGCTGTCTGCCATCCTCCCAGACCTGGAAT
GCTGATTGCTTTCCCTTTCCTTCTGTGCAGATGGACTGTAACAAAGCAGAGAAGTTCGAT
TTTGTAAGTTCCTCACACTCAACCCTTTCCTGCCTTTCTCCACCGCATGCTGTCCACACA
GCTGCTACAGCTATCTCCAGAGGAGTGGGGACCACTGGCTTCAGCTTCTTGAAGTCCCTA
CTCTCCCGGGGAAAGAGAGGGTCTGAGTGCCTTATCAGCCCGGGTGTGTTAGCTAGCGAT
CCTTAGTCTAAAGGCGTCTTTCTTACCTCTCTTCTCTTCCAGGTGTTACAGTATCTGAAC
AAGATGGCTGGGAACGAATTCATGGGGTTCAGCAATGCCACGTAAGACTCTGTTTAGGGG
GCTGGCTGAGTAGGTTGTACCGTTGAGCATGTGTGTGCTTGGTGGGGGAAGTCGAGGAGG
GAAGGGAAAGAAGAATATATATTATCGTAGGAAGAAATTTGGGGGGAATCTTGGCCTCTC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

AGCTTCCTCTGAGCTTCTGCATCGACATTTACTTACTTGGAGAAATAACATCCCATGTCT
GATTACCACATAATGAGAAAGGCAGCATGCTGGCTTGTGCCGAGGCCCTCGTCAAGACTC
AGAGCCAAACATCTTGCCAAATTTCCTAGACAGAGCCACTAGACAGCTTCGAAGCTTGAT
ATCGAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTA
GCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACA
TCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACT
CCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAA
ATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAG
CGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAG
AGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGC
GCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCG
CTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGGTCCTCGCCATGGATCCTG
ATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTGATGGAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGA
CTAAACCTGGTTATGTAGATTCCATTCAAAAAGGTATACAAAAGCCAAAATCTGGTACAC
AAGGAAATTATGACGATGATTGGAAAGGGTTTTATAGTACCGACAATAAATACGACGCTG
CGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACCCGCTCTCTGGAAAAGCTGGAGGCGTGGTCAAAG
TGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTCTCGCACTAAAAGTGGATAATGCCGAAACTATTA
AGAAAGAGTTAGGTTTAAGTCTCACTGAACCGTTGATGGAGCAAGTCGGAACGGAAGAGT
TTATCAAAAGGTTCGGTGATGGTGCTTCGCGTGTAGTGCTCAGCCTTCCCTTCGCTGAGG
GGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATAACTGGGAACAGGCGAAAGCGTTAAGCGTAGAAC
TTGAGATTAATTTTGAAACCCGTGGAAAACGTGGCCAAGATGCGATGTATGAGTATATGG
CTCAAGCCTGTGCAGGAAATCGTGTCAGGCGATCTCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGT
GGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAA
TTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCA
ACCTATGGAACTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAATGCAGATCCTAGAGCTCGCTGATCA
GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCC
TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG
GAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAG
GCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCCTTTAG
TGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT
TATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGT
GCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCG
GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTG
CGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTG
CGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT
AACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA
AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT
CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG
TAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGC
GCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC
TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG
CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCT
CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGT
TAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAA
AAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCC
TGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCA
GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATT
AATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTT

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC
TCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTT
ATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC
CCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATT
GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCG
ATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCT
GGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAA
TGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGT
CTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGC
ACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

*** ACLARACIONES:**

- Subrayado rosa: sitios de reconocimiento Frt
- Secuencia entre sitios Frt: secuencia correspondiente al gen Neo
- Letra en azul: Brazo corto extendido
- Subrayado en amarillo: secuencia del gen DTA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

> pGKneo-BC234

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCG
CCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT
TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG
GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA
GTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT
TATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG
GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCA
CCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAA
TGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACCTGCAGGAATTCGAGCTCGCCCGGGGA
TCCTCTAGAGTCAACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAAC
TTCGTTAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTT
TAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCA
CATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTA
CTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGAC
AAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGA
AGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTC
AGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGG
GCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCG
CGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCC
ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGC
TATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAG
GACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTC
GACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGAT
CTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGG
CGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC
GAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAG
CATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGC
GATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGC
CGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATA
GCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTC
GTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAC
GAGTTCTTCTGAGGGGATCAATTCTCTAGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCC
TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG
TGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAG
CTGGGGCTCGAAACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACT
TCGTTGACCTAGAGTCGAATCAAGCTGATCCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGT
ATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTAGCTTTATCGATACCG
TCGACGGGCTAAGACAGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAGTATTGGTTACATAGGGAGACCCT
GTCTCAAAGTAAAGAGATTCAGTCCAGCCTTCAAGGAGACTTACAGGGACTGAACCTGAG
AACCTAATCCTAGAATTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATATTTCATGGGCTCTACT
GTTTGGACTACAGAGATGTATGGTTGAAAGGGACTAAAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGA
ATATACAAAAGGGGACAGATTTTAACTTTTACCTCAAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCT
GTGCTGTTCTCCATAGTCACCTGTCTCCCCTTTCTCTACCCATTTATGCCCAGGTGGCAG
CCTACATCCCGCACCTGGCCAAATCAAACCCAGACCTTTGGGGCGTCTCCCTGTGCACTG
TGGATGGGCAGCGGTAAGATGCTGGGTGATGCTGGGCCTTGTAGTGCACCCCTTTAATCT
CAGGACTCAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATCTCTGAGTTTGAGACCAGCCTGGTATCATCC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TGAGTGCCAGGACAGCCAGAGCTCTGCAGATAGACCCTGTCTCAAAACAAAGATGCTGGG
TGAGAGGCAGGAGCTGAGAGAGCACAGGTGAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTATGGTAC
CTGTCTCCTCCAGGCACTCTGTGGGCCACACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAGTCCTGTG
TCAAGCCCCTCACTTACGCCATCTCCGTGAGCACCTTAGGCACTGACTACGTGCACAAGT
TTGTGGGCAAGGAACCCAGTGGTCTGCGCTATAACAAACTCTCCCTCAATGAGGAAGGTG
AGCATCTCCAGGGCTCAGGTTCATACCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCGCCTCCTCCTC
TGTGTCTTAGCCTTTGCTCTCATCCAGGTAGGAACTGGACCCAACCCCGATTAGCTTCAG
AGTGGGAACAGTGCAGAGTAGGCTTTCTTGGTGACTGACAAGACTGAGTGGTTTGTATTT
CCCCAGGAATTCCCCATAACCCCATGGTCAATGCTGGTGCCATTGTGGTCAGCTCCCTGA
TCAAGGTCAGTGCATTTCTAACCTTCTGAAAGGTAATTTCTCAACTCCCCTTATCCCTAC
ATCCCCATATCTGTTCAGTTCTCCAGGCAGATAGGGCAGGGGGTGGGGGGGTTCCTGAGT
CATTTGAGAATTAATAAGAGGCATGGAAAAAATGCATCAGGAAGTCCTGTGCAATAAGCT
GTGGATGTTAGTGATAGCTGCCACATCCGTCCCCTCACCCCATGTGCTCCCTGCCCCCTC
CCAGAGTTCTATGAGCAGGTCATGACCTTTGCCTAGGACCAAGAGCCAAATGCCAAGGGC
AGGGGGAGGACAACACCATCAGGCATTGATTGGCCACTCCTGGGTGAGAGATATGCTGAC
AGAAGGGTGAATGGCCAGTCCAGGGCAGTCATTCACGTCACCTGGAACTGTGAGTTGGCC
TTGAGCAAGTGATGTCCAACAGGCCCATCAGCTGCAGGTCTCCCAGGGCTTGAGCAAGAA
CGCAGGAGCAGTGTGGGCAGCGACACTCTGGGGCCAATCACGGTCCCTCCTGAAGAAGGT
GGTGTTAGGAACCCTTCCCCCTAGGAACTCAGGTTTCAGAGTCCTGGAGTGTTGACTCCT
ACCTGAGCCTGCAGTGTTGACGGAAGTGAGCCTGGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGACT
GTCTGTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTCTGT
CTGTCTGTTCTGTGTCTGTGTGTCTCGTGCGTGCTAAGGTAAGCATATCTCCCTGTTCTG
GGGAGTCCTGTCGGCAGCCCTATCTTTGGGACCTGCCTCATCTCATCTTCTACTAGAGTT
GGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCC
AAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGG
CCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGG
TGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCCCCGCA
GCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGAT
GGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCT
TTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAG
GGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCAC
GCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTTCGAC
CTGCAGGTCCTCGCCATGGATCCTGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTGATG
GAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATTCCATTCAAAAAGGT
ATACAAAAGCCAAAATCTGGTACACAAGGAAATTATGACGATGATTGGAAAGGGTTTTAT
AGTACCGACAATAAATACGACGCTGCGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACCCGCTCTCT
GGAAAAGCTGGAGGCGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTCTCGCACTA
AAAGTGGATAATGCCGAAACTATTAAGAAAGAGTTAGGTTTAAGTCTCACTGAACCGTTG
ATGGAGCAAGTCGGAACGGAAGAGTTTATCAAAAGGTTCGGTGATGGTGCTTCGCGTGTA
GTGCTCAGCCTTCCCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATAACTGGGAA
CAGGCGAAAGCGTTAAGCGTAGAACTTGAGATTAATTTTGAAACCCGTGGAAAACGTGGC
CAAGATGCGATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTGTGCAGGAAATCGTGTCAGGCGATCT
CTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGAT
TTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCT
AATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAACTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAA
TGCAGATCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGT
TGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTC
CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGG
TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA
TGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGGGGGGGCCC
GGTACCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGG
AAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGA
CTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCC
TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATA
AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC
ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC
GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG
AACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG
CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCA
GATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
CGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGAT
CTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA
GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
TCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGA
GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCC
AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAAC
TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC
AGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTC
GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTT
GGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCC
ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG
TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAG
CAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGAT
CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGC
ATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA
AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTA
TTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

ACLARACIONES:

- Subrayado rosa: sitios de reconocimiento Frt
- Secuencia entre sitios Frt: secuencia correspondiente al gen Neo
- Subrayado verde: sitios de reconocimiento LoxP
- Letra en azul: Brazo corto extendido
- Subrayado en amarillo: secuencia del gen DTA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

>pGKneoBC2EX2BL (construcción A)

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCG
CCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT
TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG
GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA
GTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT
TATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG
GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCA
CCGCGGTGGCGGCCGCACCCACATAGCAGTTCACAATCATATGTAACTCTGGTCACCTCT
CTGGTCTCCAGAGGCCCCAGGTGCGTACACACACATTCACACACACACACACACACACAC
ACACACACACACACACACACACACACACACGTAAAACACTATACAGACAAGAGGGGAAAG
CCAGGCTTGGTGGCACACACCTTTAATACCAGCACTTAGAAGGCACAGGAAGGTGGATCT
CTGTGAGTTCCAGGCCAGCCTGGGTTACAAAATGAGACCCTATCTCAAAAACAAAAAAAA
AAAAAAAAAACCACCAACAACAAAAACAACTTTAAAAAACATACTGGGGGAGTGGGGGGC
TGGAGAGATGGCTCAGCGGTTAAGAGCACTGACTGCTTTTCCTCTTCCGGGGACAGTGAT
TAGAGGCACTCAGGATGGTCCAGCGTTTGACAAACTCTCGTAGGCTTTCCTACAACACAG
CCTCTAACAAAACTAGGCTGTCTCGAACCCCTGGCAACAGGATTGTTTACCTCTACACCA
TGAAGGGTGGGAAAGCACCTAAATCCGCATGTGGTGTGTCCCCAGGCAGACTGCAAGGGG
TTCGTGCTGTGAGACCCAAAGTCCTTCTGAGATTGTCTAACCAAAGAAGCATGTCATGAC
GCAGGGCCTATGATGGTTCCATGTGTGCCAAGTGTGTCTGTGACGGGATCAAGCGGGCTT
TCCTTATTGAGGAGCAGAAAATCGTTGTGGAAGTATTGAAGGCACAAGCACAGAGTCAGA
GAGCAAAATAGATCTGCAGCTTTTTGCACTGACTGCTCTTCCAGAGGTTCTGAGTTCAAA
TCCCACAACCACATGGTGGCTCAGAACCATATGTAATGAGATCTGATACCCTCTTCAGGT
GTGTCTGAAGACAACTACAGTGTACTTACATATAATAAATAAATAAATCTTTTTTAAAAA
CCAGACTAGGTAGAGATCCATTGAGAGAGATACCTGGGGTTCACCCTTTATTCTTCACCT
GTGTACAAGCTTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACAC
AGATACTAATGTTGAATTGTTGAATTGTTTATACTGAGTATTTGAGAGGCTCTTAATTGA
ATCAGGCACGGCGTCACAGACGTGTGTAATCTCAGCCACTCTGGAGACTTCGGCAGGAGG
CAGCAAATTTGAGCCCAGCAATATAACTAGTTCCTGTCTCATAAACCAGAACCATGGGGC
TGGGACGGTGCTTACCTGGCAGGCCAGAATCCTTTGGTTCATTCCCTAGCCTGGAATGAA
GCTGGGAAGGTGATGTAGGTCTACTCTAATCCCTGTACTTGAGGTAAGCAGAAGAAGCAG
AGAATCAAGGGCTTCCTTGGACCACAGGTTCAAGGGCACTCCTGGAGACACCCAATCTGA
AAAGCAAAAGTTTGCTTTGAGGACAAAGTCAGGAGTGGGGCAGCAGACTGTAGACTGTGA
ATTAGAGGAAGTGCTCTGGATAAGACAGCAGATAAGCCAGAGAGGGAACGGCTAACAGAA
GGGAAATCAAACAGAAGGTCCACCTGGTTTCAAACCAAACACACCCTCTAAACTGTAAGG
CAAAGAGCTGCTGTTCTAGTAAACACAGAAACATGGCTTCGATGTTGATTTTCCCATGGT
TGCATTTTGTTTGTGGCAAGGTCTCCTTGCACAGCCTCACCTGACTTGCACTCCTGTCCT
GCCTAAGCTTCTCAGATGTTGGGATCCACAAAGAGTATACTGCCACCATTCCTGGTTATT
TAAATTCAAAAATTAAAAGTTTTGCAGTGCTGCCTGGGCAGCTCAAGAGACAGCTCCCAG
TACTATCTCATAGCATAGAAAACTCTTTTACAAGTGAGGTAGGTTTGGTTTTTTGTTTGT
TTGTTTGTTTTGTTTTTAAAGAATTATTTATTTATTTATTTATTTAAAAGATTTAT
TTATTTTTATTGTATATAAGTACACTGAGACACTCCAGAAGAGGGAGTCAGATCTCATTA
CAGATGATTGTGAGTCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAACTTCAGACCTTTGGAAGAGT
AGTCGGGTGCTCTTACCCACTGAGCCATCTCACCAGCCCCAAGAATTATTTATTTAATGT
ATGTAAGTACACTGTCTCTTCTTCAGACACACCAGAAGAGGGCATCAGATCCCATTACAG
ATGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGAATTGAACTCAGGACCTCTGAAAGAGCAGC
CATCTCTCCAGCCCCCAGAGGTAGTTTTCCTCCAGTTGTTAATTCAGTTGTTAATTTTGG
AGGAGAAAGCTTGTAATCAGAGATTTCTGTCTAATTTCTGGCTCTGGGTTATCTTATGCA
AGTAGTCTTAACTTTCTTTTAAATAAAAGCTTAAAAAAAACCCACACATTTAAAAAAAAA
ACATGCATACATTTATCGGGGGCTGGAGATATGGTTCAGTGGTTAAGAACACAGATTGCT

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CTTCCGAAGGTCCTGAGTTCAAATCCCAGCAACCACATGGGGGCTCACAACATCTGTAAT
GAGATCTGACACCCTTTTCTAGAGTGTTTAAAGACAGCTAGTGTACCTATATATAATAAG
TAAATATAATGTATATAATAATAATAAATAAGTAAGTAAATAAATCTTTAAAAAAACCAG
CTGGGCGTGGTGGCACATGCCTTTAATCCCAGCACTTGAGAGGCAGAGGCAGGCAGATTT
CTGAGTTGGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTATTCAGA
GAAACCCTGTCTCGAAAAAAAAAAATCTTTAAAAAAACATAACAAACAAAAACCCCCACA
TTTATCTAAGTGTGTGGGGGGGTTTCATGAGAACCATTGTCTGAGTAATTATCAGGTTTG
GGAACAAGAGCCTTTACCCAGTGAAGTGTCTTGGTTCCAATTTGGTTTCCTCTTTTCAAA
ACAAACCTAGTAACTGCTTCTTTGGCCACTGCTAGGGGAAAATAAACTAACTGGTTGGCA
TAGCATACACATGCAATAATAGTTGTTAATATAATTCCTGCTAAGTCAAAGTGCTGTGAG
GGCTGAGGTCAGGTGAGTGAAAGCTTTCGAAGCCCACGCTGGCCTTGGACTCTTTCAGAT
GACGTTGAACTACTGACCCACTTGTCTCCACATCCCTGGCGCTGGGACTCCAGGAATGCT
GACCACCACATTTTTAATTCTCCTAAATTTTGTGCATTTTCTCCACTACAAACCAAGACC
ACACCTTTAATCCCAACACTCTGGAGCCTAAAGTAGGTGGATCTGAGAGTTTGAGGTCAG
GCTGGTCTAGCTCGTAAGTTCTAAGAGATACGGAGAGGCCAGGTCTTAAAACTAAAAACA
ATTGGGGGAGCACGTATATGTTTTGTGTTTCTTTGCTTTTTTGTCGTGTGTGTGTGTGTG
TTTGTGTGTGTGTGCACGCGCACCGGCATGCGTGTGGTGTTGCACACCCCTGCAATTCTA
GCACTTGAGAAGTTGAGGTAGAAGGTTGGCCACGAATTCAAGGCCAACACGGGCTACAAA
CTGAGTACTACGGCAACAAGGGCTATATCTCAAAGCCCTGTTTCTAAAACAACAATAAAA
AAAGATTTCAGCCGGCCCAGCACTTGGGAAGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAGG
CCAGGCTGGCCTCTGTCCTGGAACTCACTCTGTAACCCAGGCTGGCCTCAAACTCAGAGA
TCCATCTGCCTCCACCTCCCCAGTGCTGGGATTAAAGTCATATGGCACTACTACCTGGAT
GTGACTGAATATTTGTAGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCGGAACCCTTAATATAAC
TTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACCTGCAGGAATTCGAGCTC
GCCCGGGTCCTCAAACTGACAAATACCCTCCTACCTCTTCTTCCCAGTACTTCCAAGGCT
GAGATTGAAGGTGTGTGCCACCACCATCCTGCTTGGTTTATGAACTTTTTAAAAATGTAT
ATAGGTGTTTTGCTTTGTATATGTGTCTGTGTACCACATGCAAGCCTGGAACTTGCTGAG
ATCAGAGGAGGTGTTGGATCCCCTGAAACTGGAGCCACTACATGGGTATTAGGAATTGAA
CCCAGGTCCTCTGTAAGAACAACTGCTCTTAACCACTAAGCTAGCTCTTCAGCCCTGGAG
TATGTGATACTCCTGAAGAGGGCCCATGCCCAGTTTCCAGCACCCACTTGGTGGTTAGCG
CAACTATCCATAACTCTAGTTCCAGGGTACCTGGTTTGTTCTGACTTCTCAGGGTACCAG
GCTGGGTGTGTTGGCCTTTAGTCCCAGTATTCTGGAGGCAGAGGCAGAAGGATTTCTGTG
AGTTCCAGGACTGCCTGAACTACATAGTAAGTTCTGAGATAGCCAGGCCTACATAGAAAG
ACCCTTAGAACAAACAAACAAAATCCTAGATAAGTCAAAGATGAAAATAAAAACCCCAGT
ATTAGAGATAACTAGTTAATACTGTGATATAACCATATGTATCTTATATATGTTATGTAT
GTATGTGCTTGTAATTTAACAAAAATAAAATTATGATATTCATAGTAATTGGTAAGCTAT
GTTTTCCATTTATGAATTTATTTTTAATTGATCTTTAGTGTAAGCATATGAGTACCAGTG
TGCCACATGTTCATGTCAGTGGACAACTTTGTGGAATTGGTTCTTTCCTTCTACCTTTAC
GTGGCTTCTGGGGTTTCATGGGTCAAACTCACTGCCAGAGTTGCATAGCAAGCACTTTTT
TCTGCGGAGCCATCTTGCTTACCCTATATTCACTTTTTTAAATGGCTTTCTAAAAGTTTT
ATTTTGCCGGGCGTGGTGGCTCACACCTTTAATCCCAGTACTTGGGAGGCAGAGGCAGGC
GGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTA
TACAGAGAAACCCTGTCTTGAAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAA
AACAAAAAAAAAAAACTGTCTAAGCTAAGCATGATGGTGCATGCTTTAGTCTTAGCACCCA
AGAGGCAGAGGCAGGTGGATCCCTGAGTTCAAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCC
AGGACAGCCAGAGCTACACAGAGAAAGCCTATCTTAGGGGAAAAAAAAAAGTCTTCTAAGT
CTAATAACATTAAAAGAAGTCTTAAGATCAGCGGTTCTCCACCTTCCTAATGTATTAAAG
GGCTTAACTCTTTAACCCTTTAAAACAGTTCTTCATGTTGTGCTGACCCCCAATCGTAAA
ATAATTCTCATTGTTACTTCAAAACTTTAGTTTTGCTCCTGTTATGAATTGTAATGTAAA
TATCTGTGTTTTCTGATGGTCTTAGGCCCCTCCTGTGAAAGGGTTGTTTGACCCCAAAGG
GTCAAGACCTACAGGTTGAGAACCATTGCTTTAGATGTTTTTGGAGTTTTATACCAGTGT
GAGAGACCTTTGCGGCTGGCATGGAGACAAAAGCATACAGTGGCAGAGAACAGACAGGAA
GTTGGTGATTGGCTGATTTTATATAGGGCAGTTTATCATGGAGTAAGGTCTTAGATAGGC
CTCACTCCACCTGAGTGAGGTAGACATCCTATATCTTTATTCCATAGATAAGTAATATTA
AGTGGGCTTCCTATAGCAATTGGGAGCAAAGTAGGACTGCACTGTGCAGGAGAGAAGAGG
GTGCATTTGAGAGAAAATAGGAAGATCAATTTGTCCAGTGTTAGTTTCTAACTCACTGCA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GACGCAGAATGTGGGAACAGTCAGACGGATGCTGTGTTTCCATCTCGTCCCCATCCTCAC
GGGAAACACAAAGACACACACCATTGCTGGATGCACTCTGTTTCCAGTGTTTGCCGGACA
TCAGTACGTGCAATGATTTAGGAGGTGGCTCGAAATAAAGGACTGAAAAGTTCAGAGTTC
CTTTTAAAAGAGACTAGAGAGTCAGATTGGCAACCTCTCGCACTGGGGTGGAAGTTAGGA
TCACAGAACCTGCCAGATGGTTCAAAGAGGAGGCCTAGGATGACAGCCCATGACAGGTCC
GTGTTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGAGCATCCTCAGGCTTCTGCCTTCCC
GTCTCTTTCCCCCAAACAGTGACGCCTCACACAGCGGCATGCTGCCTCGACTTGGTGACC
TGCTTTTCTACACTATTGCAGAGGGACAGGAGCGTATCCCTATCCACAAGTTCACCACGG
TGAGTGGCTATCTATCTGCCGATTCAGAGAACTCTGATTCCTTAGAGTCTCTGGAACCTG
TGAGGAGGATGGTCGAACAGTATAGGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCAACGAAGTTCC
TATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCGTTAATTCTACCGGGTAGGG
GAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGG
CGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCG
GCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTC
CCCCCCGCCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACT
AGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGC
GGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCC
GGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGC
CCGGCATTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCT
CCGGGCCTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGC
AGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAAT
CGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGT
CAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTG
GCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAG
GGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCC
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGC
TACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGA
AGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGA
ACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTCGTGACCCATGG
CGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTG
TGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGC
TGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCC
CGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGGGGATCAATT
CTCTAGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG
TTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCT
AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG
GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
CGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAAACGAAGTTCCT
ATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCGTTGACCTAGAGTCGAATCAA
GCTGATCCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTC
CCTCGACCTGCAGCCCAAGCTAGCTTTATCGATACCGTCGACGGTATCGATAAGCTTCCA
AGTCCAGAGGAGAACACCTTTCGTGAGCTGTGGCAAGAGGCTTGCTAGCCTTCCAAGTTC
CAAAACCAATTTGTTCTACCAGTTGTAATTGGGGTGGAGTGACTTGAGTAGCTATTGGGA
AACACTGAGGTATGGATTGCTGTCCTTGGCTGACCTAGCCAGACCTCTTCTTCCCCCCCA
AAGGCTCTGAAGGCCACTGGACTGCAGACGTCAGACCCACGGCTCCAGGACTGCATGAGC
AAGATGCAGCGCATGGTCCAAGAGTCCAGCAGCGGTGGCCTCTTGGACCGAGAGCTCTTC
CAAAAGTGAGAGCCCCAGAGATGAGCATTGACCCCCAAAACAGTTCTGTAGGAGGAAAGA
TCTTGGGAATTAAACAGTTCAACCCTTCATTTTGTTAGTAGCTTCTAGAAGATGTTCTCA
TACATATATGGTGTATATATTAGGACTTCTCAATGCTAAAGCCCATAGCTGTGGTTATTC
TGATTTTAACGTTTTTTTCTCAGAATGTCTTGAGATATCTTTCCATGTCTTTAGAACATA
TCATTTTAGAGGTTAGGAAATTTAAACCTAGGGAGATGAAATGATATTCCAAAAGTTACA
CGACTGCTAGTCCAAAACCAAATGAACACTTCAACCTTCTTTACCTCTGACTTCCGTGCT
CCCGAGTGAGTCCCAGCTGTGTCTCTCCAGCTCCTAACACACTCGTGTCTGGGATCCAGG
TGTGTGAGCAGCAACATTGTGCTCCTGACTCAGGCATTCCGAAAGAAGTTTGTCATTCCT
GACTTTGAGGAGTTCACGGGCCATGTGGATCGCATATTTGAGGATGCCAAAGAGCCCACT
GGAGGCAAAGTGAGGGCCAAGGGGACGAGGGAGGGGAGAGGGCTCTGGGCCAGATACACA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GTGCTTCTCAGAGACGCCTTGGGGCTGTGGACTCAATGATGGATGAGCAGAGCCTATAAA
GTTGAGGGCATGTTTTCATGTGTTTTCACTTGTGATTCTAGTAGCACGTGACTTAGGACC
TTTATGGATGTGGATGGCAGAAGCTAGGGTTTGGTGGCACAGGCCTGTAGTCCCAGCTCT
TGTTGGGCTAAGACAGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAGTATTGGTTACATAGGGAGACCCTG
TCTCAAAGTAAAGAGATTCAGTCCAGCCTTCAAGGAGACTTACAGGGACTGAACCTGAGA
ACCTAATCCTAGAATTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATATTTCATGGGCTCTACTG
TTTGGACTACAGAGATGTATGGTTGAAAGGGACTAAAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGAA
TATACAAAAGGGGACAGATTTTAACTTTTACCTCAAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCTG
TGCTGTTCTCCATAGTCACCTGTCTCCCCTTTCTCTACCCATTTATGCCCAGGTGGCAGC
CTACATCCCGCACCTGGCCAAATCAAACCCAGACCTTTGGGGCGTCTCCCTGTGCACTGT
GGATGGGCAGCGGTAAGATGCTGGGTGATGCTGGGCCTTGTAGTGCACCCCTTTAATCTC
AGGACTCAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATCTCTGAGTTTGAGACCAGCCTGGTATCATCCT
GAGTGCCAGGACAGCCAGAGCTCTGCAGATAGACCCTGTCTCAAAACAAAGATGCTGGGT
GAGAGGCAGGAGCTGAGAGAGCACAGGTGAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTATGGTACC
TGTCTCCTCCAGGCACTCTGTGGGCCACACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAGTCCTGTGT
CAAGCCCCTCACTTACGCCATCTCCGTGAGCACCTTAGGCACTGACTACGTGCACAAGTT
TGTGGGCAAGGAACCCAGTGGTCTGCGCTATAACAAACTCTCCCTCAATGAGGAAGGTGA
GCATCTCCAGGGCTCAGGTTCATACCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCGCCTCCTCCTCT
GTGTCTTAGCCTTTGCTCTCATCCAAGCTTGATATCGAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCG
CTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTAC
ACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCG
TTCTTTGGTGGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCC
GCCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTC
GTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAA
TAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGC
GGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCA
TTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGC
CTTTCGACCTGCAGGTCCTCGCCATGGATCCTGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTT
TTGTGATGGAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATTCCATTC
AAAAAGGTATACAAAAGCCAAAATCTGGTACACAAGGAAATTATGACGATGATTGGAAAG
GGTTTTATAGTACCGACAATAAATACGACGCTGCGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACC
CGCTCTCTGGAAAAGCTGGAGGCGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTC
TCGCACTAAAAGTGGATAATGCCGAAACTATTAAGAAAGAGTTAGGTTTAAGTCTCACTG
AACCGTTGATGGAGCAAGTCGGAACGGAAGAGTTTATCAAAAGGTTCGGTGATGGTGCTT
CGCGTGTAGTGCTCAGCCTTCCCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATA
ACTGGGAACAGGCGAAAGCGTTAAGCGTAGAACTTGAGATTAATTTTGAAACCCGTGGAA
AACGTGGCCAAGATGCGATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTGTGCAGGAAATCGTGTCA
GGCGATCTCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCT
ACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAAACTA
CTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAACTGATGAATGGGAGCAG
TGGTGGAATGCAGATCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
CCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACT
GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAT
GCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGAGG
GGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAA
TCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA
CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG
ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCT

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGT
ATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA
GCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT
AGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCA
CGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGA
AGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT
GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
CCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTC
TCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
TCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAT
GCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT
CAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

ACLARACIONES:

- Subrayado verde: sitios de reconocimiento LoxP.
- Subrayado rosa: sitios de reconocimiento Frt.
- Secuencia comprendida entre sitios Frt: secuencia del gen Neo.
- Letra en azul: secuencias del gen Gls2. Por orden: brazo largo de homología, fragmento de exón 2 y brazo corto de homología.
- Subrayado amarillo: secuencia del gen DTA.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

> Construcción EUCOMM

TACGTTGCTTAGTCTGGTTCCCAGCTCAGACTCCTAATTACCCTCCAAGAAAGTAGAATTGTAG
GCAGTACCACTATGTCCAGGCTAAGGGTTGTTTTGAAGAGGGGAGTAGAAATTGTTTGTGATAA
CTTTTTTTCTTTTTTCTTTTTGTTTTGTTTTGTTGTTGTTGTTGTTTTTTGAGATAGGGTTTCT
TCTCTGTGTAGCCCTGGCTGTCCTGGAAATCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACTCAGAA
ATCCTTCTGCCTCTGCCTCCAGAGAGCTGGGATTAAAGGCATGCACCACTACACCCAGCTCTTG
TGATAACTTTTAAGAAAAGAGAATTTATCCCACCTGATTCAGTATAGCCGAATTTGTAATTTTT
CTAGAACATGCACTGAAAAAAAAAAAAGTATTCTTACTGGGTGTGGAAGCACACACACTCCCAG
CTCTTGGGAGGCAGAGGCAGGCAGATCTATGTTGAATATGAATAAGGCTAGCCTGGTCTACATA
GTGAGTTCCAAGACTTCCAGGGCTAAAAAGAGAGACACTGCCTCAATAAAACAAACAAACAAAA
AACAACCACAAAAGGTGCTTTTTGTTATTTTGTTTTGTTTGTTTGTTTCTTGTGACTATGTGCC
TGCCAAAACTAGAAGAGGGGGTTGAATCTCCCCTGCAGCTGGAGTAACAAGCAGCTGTATGATG
TCAGGTATGGGCGCTGGAAATCATACTCGGGTCCTCTGGAAAAACAGCAAGCACTCTTAGCCTC
TGAGTCATCATCATCTTTCCAGCACATTTTCTTTTTTTAAATACAAAGTCTCACAAATTTGCCC
AAACTGGCCTGGAGGTCATTTTGTGAAGAATGTAACACTGCAGTGGGTGTGGTTGCACATGCCT
GGAATCCCAGCCCTTGGGATACAGAAGCAAAAGGGCTCAGGGCTGGAGAACAGTCTACTAGTCT
ACTAGTCTACTAGTCTACTAGTCTACTAGTCTAAAGTCTCTGAGGCCAGCCTAAGCTACATTAC
AGACACACACACACACAGACACACACAGAGACACAGACACACACACACACAGAGACACACACAC
ACAGAAGCACACACACACAGACACACACACACACAGACACACACACACACAGACACCCACCCGC
CCACACACACACACACACTCCTTACTGTGTGTAACAACACTCATGAATGTTCCCGCTATTTAGG
AAGCTGAAGCATGTGCTCTGCTGGGCCTCACAGCAAGATTCTATTTCAAAACAAAAAATAGGGG
CTGGAGAGATGGCTCAGCAGTTAAGAGCACTGATTGCTCTTCCGAATGGTCCTGAGTTCAAATC
CCAGCAACCACATGGTGGCTCACAACCATCTGTAAAGAGATCTGATGCCTTCTTCTGGTGTGTC
TGAAAACAGCTATACTGTGCTGTTAATAAATAATAAATAAATAAATCTTTTAAAAAAACAATAA
AAATTAAAATACACTTTTAATAATAAATAAATAAATCTTTAAAAAAACAATAAAAATTAAAATA
CACTTTTAAATAAGAATCACGAGTAAAGCTGGGCAGTGGTGGCGCACGCCTTTAATCCCAGCAT
TTGGAAGGCAGAGGTGGGCGGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGATCTACAGAGTGAGTTCCA
GGACTGCCAGGCCTACCCTGTCTTGAAAAAACAAACAAACAAAGAATCACAAGTAAAAGATTTG
GAGCTGGACGGACCGCATCTGTTTGAGAAGATGTCTGTGATTCTATGATGTCACTATTGGCCCC
TCGGGATCAGGGTGGAGAACAGAGATTAATGGATTACCTGCAGATGTGCTGGACTCTAGCCAGA
TACAGGCCATCATGTGTGCTTGAAAGTCAGAAGGCTGACCAGCATGCTAGTGAAGGTCTGGATA
GGCTTCAGAAACCAGGAAATAAACCTCATCAAAGCCAAGGACACTCACCTCCAGTATACTCCCA
TCTACAATTTAAAAAAAGCTCCTCCCTCTGATGAACGTGTCTGCCTCAAGTACTCTGTAATGGA
AATGATCTAAAAAGTTGAATTTATCTCCTTGTAAAGAGTTATGAAAAGGAAGGTTAGGGGGCTG
GAGAGATGACTCAGCGGTTAAGAACACTGACTCTTCAAGAGGTCCTGAGTCCAGTTCCCAGCAA
CCACATGGTGACTCACAACCATTTGTAGTGGGGTCCAATGCACTCTTCTGGTGTGTCTGAAGAC
AGCAACAGTGTACTCATATAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATCTTAAAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGGTACTCAGAAGAGCGGATGTGGAATAGTG
ACCTGGGAAAAGGCATGTGTTCTGTGTCAGAGCCCAGACTGACCTCTGACTCATGTTCATCTTG
TGTCTGGAGAAGAGTGCTTGTTGGCACAGGGAATTGGAGTTTAGGTTACCAGCATGTAAATGCA
CCACCACCTGTAATCTGCAGAGTCTAGCACCCTCTACTGGCCCCCATGGGTACTGCATAAAAGT
GGTGCATGTCCATGCAGGCAAACCAAAACTTCCTTAGCTTCCAGACTTAGTTTCCAGACCACTG
GGACCACAGGTGTATGCATGCATCCATGCCAGCTAGGAATCTATATTTTTCTGACTCTCCGTTC
CTTTTTTTTTAAAGATTTATTTATTTATTTTATGTATATGAGTACACTGTAGCTGTACAGGTGG
TTATGAGCCTTCATGTGGGTTTGTTGGGAATTGAATTCAGGACCTCTGCTTGCTCTGGTCAGCC
CCACTCACTCCAGCCAAAAGATTTATTTATTATTATAAATAAGTACACTGTAGCTGTCTTCAGA
CACACCAGAAAAGGGCGTCAGATCTCATTACGGGTGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTAGGA
TTTGAATTCAGGACCTTCAGAAGAGCAGTCAGTGCTCTTACCTACCAAGCCTTCTCACCAGCCC
CTAACTCTCGATTCTATCCTATTTTCTTATGACAGGCATGGCCTCAGAATAGCTTTGAAGGATG
GATCTTGAACTCTGACCCTGCCTCTCTGGCCCAAATGCAGGCATTCCAGGAATGAGATACCACA
CACACTCACTGACTTGTTTGTTTGTGTTTGTGTTTATTTTTGTTTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
GTTGTTTGTTTTTTGTTTTTTGAGACAGCGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGTCCTAGAACTCA
CTTTGTAGATCAGGCTGGCTTCAAACTCAGAAATTCACCTGCCTCTGCCTCCTGAGTGCTGGGA
TTAAAGGTGTGCACCACCATGCCCCGCACTGACTTTTAAGAGGTTCATACCCACCTCTTTCTTA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CATTGAATCTTGTTTTGTAACTTTCTGAGAGAATGTCTCACTGTATAGCAAGGCTGGGATAGGA
TTCAGTCTCTCCCCTCACCCTCTTCAGAACTCAGATTATCTGTGACAAACACAGGAACTTGGGA
AAGCAAAGGACTTAGCGGGTTTGCCCTTCCATGTCACAGTCCCTCATTATGGACTGAAGCAGAG
AGTAGATGCGGCTTACTGTACTCTTTGGCTTGTTCCACTAGATTTTCCTACAGCCCAGGCCCAT
CTGCCTAGGGATAGTAACGCCCACAGTGGGGTGTGTCCTCCTTTATCAATTAGCAATCCAATGA
TGCCTCCAAAGACTTGCTAACAGGTCAGCCTCTTCAACAAAAGTTCTCTCCCCTTCTCCAGGTG
CATTTGCATCACAGACCCCTACACCTAGCTTGGAACTAATTGTTTTTCAGTCTGAAGAGCAAAT
CCAGGGCTTCTTGCTTGCTAGAGGAGTACTCCAACGCTGGATACGCCCCAGCCCCACTCTTATC
TCTTGCTCCCAGACTGTGAACACCAGTGAAGTAGGAACTATACTTTTGTCAGTATTTTTTGTTT
TGTTTTGTTTTAATGTTTATTTATTTGTTTTATGTATATGAGTACACTGTAGCTGTCTCCAGAC
ACACCAGAAGAGGGCATCAGATCTCATTACAGATGGTTGTGAGCCATCATGTGGTTGCTGGGAT
TTGAACTCAGGACCTCTGGAAGAAGAATAGTCGATGCTCTTAACCATTGAGCCATCTCTCCAGC
CCCTGTTTTGTTTTGTTTTAAGACAGGGATTCTCTTATAACCCTAGCTTTTTGTTTGTTTGTTT
CGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGTCCGGGAACTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCC
TTGAACTCAGAAATCCACCTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCTGGGATTAAAGGCATGCGCCACCAC
TGCCTGGTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGATTTATTATTTGTCATTTATATGAGTACA
CTATCTCTCTTCAGACACACCAGAAGAGGGCATCAGATTCCTTTACAGATGGTTGTGAGCCACC
ATGTGGTTGCTGGGAATTGAACTCAGGACCTCTGGAAGAGCAGTCAGTGCTCTTAACCCCCGAG
CCATCTCTCCAGCCCTATCTTGGCTTTCTATTGCTGTGATAAAACACCATTACCAAAGCAACAA
TGGTGGGAAAGGATTTATTATAACTTATATGCCCCATCATGAACGGAAGTCAGCTTCTCAAATG
TTGTGAAGCAGGGGCCAGGGAGAAATGCAGCTTACTGGCTTGTACAGTCTGCTTTCTCATACAA
ACCAGGATCTTCTGCAAAGGGGTAGGGCCACCTACTTTGGGATGGGCCCTCCCATGTCAATTAG
GGAAATCCCCCTCCTCCCCCATTGCCCTACAGACTTGCCTGCAGGCTATTCTGACCGAGGCTTT
TTTTTTCAAGTGAGATTCCCTTTCTCCAAATAACTCCAGCTTATGTCAAGCTGGAAAACAACAA
CAACAACAACCAGAACACTATCCAAATATAATTTAGATTCAAGAATGCTTGCTGACAGGATATA
ATTTTCATGCTTTTTAGACTGTCTCCATGGGAAAGGGAACCTCAGAGAATACTAGGAGAAACAC
TGCCATCTGCTGGGCAGAACAGGTCATGCTGCCTTTAGGAACCTGTCTAAGAGCAGAAGTTGGA
TTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTTGGGGGTGAGTATATGTGT
GAGTGCATGTGTGAGTATATGTGTGAGTGTGTGAGTATATGTGTGAGTGTGTGAGTGTATGTGT
GAGTATATGTGTGAGTGTGTGAGTGTATGTGTGAGTATATGTGTGAGTGTATGTGTGAGTATAT
GTGTTAGTGTGTGAGTGTATGTGTGAGTATATGTGTGAGTGTGTGAGTATATGTGTGAGTATAT
GAGTGTATGTGTGAGTATATGTGTGAGTGTGTGAGTGTATGTGTGAGTATATGTATGAGTGTAT
GTGTAGTATATGTGTGAGTGTATGTGTGAGTATATGTGTTAGTGTGTGAGTGTATGTGTGAGTA
TATGTGTGAGTGTGTGAGTATATGTGTGAGTATATGAGTGTATGTGTGAGTATATGTGTGAGTG
TGTGAGTGTATGTGTGAGTATATGTATGAGTGTATGTGTAGTATATGTGTGAGTGTATGTGTGA
GTATATGTGTGAGTATGTGTGTGAGTGTATGTGTGAGTATATGTGTAAATATATGTGTGAGTTA
GAGGACTATACTGTGGGGCCCCCTTTCTCTTTACATAGGTCCCAGGGATCAAACTCGGGCTGCC
AGATTCAGACATAAATAGCAAACGCTCTACCCATTGAGCCATCTCAGTTTGTTCTGATGCTGAG
GTTTGAAGTGGAGCTCACTGTGTGGTAGAGGCTGGCTTTGAACTGTTCATCCCTCAGTCTCTAC
CTCAAAAGATTAAAATGCACCTGGGGCTACTTCTAGAGGCAAGTCTTTGCCCAGTCAGCTCCCA
TTTAAAGGGGAAATACAAAAAGCAGAAACTCACTACTGGTTATATGAAAAGCTAACTCAGAGAA
ACAGGGATGGAAAGGCAGCTAATAGCTTCTGGGTAACAATTTGAAACCCTCTAACCTGTGGCAG
TTTTCTCTTGAACAGATCTAAAAGCTTCAAAAAAAATAACAGTTTCCCCATGAAGTAAGCATAA
GCCTGTTGTGTATTTAACCCCAATTAAGGGCTGAGACGATGGTCCGGTGCATAAGGTTCTGGCC
ATGCAAACTTAAGGAACTGAGTTCAAATCCCCAGCACCCACACAAAAAACTGGGAATCTGTAAC
TCCAGTATCAAGCTGAGGTGTTGCCGCCTGTCCAGTCTAGCTGAATCTGCTAGGTCCAGGTTCA
GTGAGAGATCCTCACTCAGAAAATAAGATGGGGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTGGCTGG
AGAGATGGCTCAGTGGCCAAGAGCACTTGCTGCTCTTGCAGAGGACCCAGGTTCAGTTCCCAGC
ACCCACATAGCAGTTCACAATCATATGTAACTCTGGTCACCTCTCTGGTCTCCAGAGGCCCCAG
GTGCGTACACACACATTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
ACACACGTAAAACACTATACAGACAAGAGGGGAAAGCCAGGCTTGGTGGCACACACCTTTAATA
CCAGCACTTAGAAGGCACAGGAAGGTGGATCTCTGTGAGTTCCAGGCCAGCCTGGGTTACAAAA
TGAGACCCTATCTCAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAACCACCAACAACAAAAACAACTTTAAA
AAACATACTGGGGGAGTGGGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTTAAGAGCACTGACTGCTTTT
CCTCTTCCGGGGACAGTGATTAGAGGCACTCAGGATGGTCCAGCGTTTGACAAACTCTCGTAGG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CTTTCCTACAACACAGCCTCTAACAAAACTAGGCTGTCTCGAACCCCTGGCAACAGGATTGTTT
ACCTCTACACCATGAAGGGTGGGAAAGCACCTAAATCCGCATGTGGTGTGTCCCCAGGCAGACT
GCAAGGGGTTCGTGCTGTGAGACCCAAAGTCCTTCTGAGATTGTCTAACCAAAGAAGCATGTCA
TGACGCAGGGCCTATGATGGTTCCATGTGTGCCAAGTGTGTCTGTGACGGGATCAAGCGGGCTT
TCCTTATTGAGGAGCAGAAAATCGTTGTGGAAGTATTGAAGGCACAAGCACAGAGTCAGAGAGC
AAAATAGATCTGCAGCTTTTTGCACTGACTGCTCTTCCAGAGGTTCTGAGTTCAAATCCCACAA
CCACATGGTGGCTCAGAACCATATGTAATGAGATCTGATACCCTCTTCAGGTGTGTCTGAAGAC
AACTACAGTGTACTTACATATAATAAATAAATAAATCTTTTTTAAAAACCAGACTAGGTAGAGA
TCCATTGAGAGAGATACCTGGGGTTCACCCTTTATTCTTCACCTGTGTACAAGCTTGCTCTCTC
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACACACAGATACTAATGTTGAATTGTTGAA
TTGTTTATACTGAGTATTTGAGAGGCTCTTAATTGAATCAGGCACGGCGTCACAGACGTGTGTA
ATCTCAGCCACTCTGGAGACTTCGGCAGGAGGCAGCAAATTTGAGCCCAGCAATATAACTAGTT
CCTGTCTCATAAACCAGAACCATGGGGCTGGGACGGTGCTTACCTGGCAGGCCAGAATCCTTTG
GTTCATTCCCTAGCCTGGAATGAAGCTGGGAAGGTGATGTAGGTCTACTCTAATCCCTGTACTT
GAGGTAAGCAGAAGAAGCAGAGAATCAAGGGCTTCCTTGGACCACAGGTTCAAGGGCACTCCTG
GAGACACCCAATCTGAAAAGCAAAAGTTTGCTTTGAGGACAAAGTCAGGAGTGGGGCAGCAGAC
TGTAGACTGTGAATTAGAGGAAGTGCTCTGGATAAGACAGCAGATAAGCCAGAGAGGGAACGGC
TAACAGAAGGGAAATCAAACAGAAGGTCCACCTGGTTTCAAACCAAACACACCCTCTAAACTGT
AAGGCAAAGAGCTGCTGTTCTAGTAAACACAGAAACATGGCTTCGATGTTGATTTTCCCATGGT
TGCATTTTGTTTGTGGCAAGGTCTCCTTGCACAGCCTCACCTGACTTGCACTCCTGTCCTGCCT
AAGCTTCTCAGATGTTGGGATCCACAAAGAGTATACTGCCACCATTCCTGGTTATTTAAATTCA
AAAATTAAAAGTTTTGCAGTGCTGCCTGGGCAGCTCAAGAGACAGCTCCCAGTACTATCTCATA
GCATAGAAAACTCTTTTACAAGTGAGGTAGGTTTGGTTTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTGTTTT
TAAAGAATTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAAAAGATTTATTTATTTTTATTGTATATAAG
TACACTGAGACACTCCAGAAGAGGGAGTCAGATCTCATTACAGATGATTGTGAGTCACCATGTG
GTTGCTGGGATTTGAACTTCAGACCTTTGGAAGAGTAGTCGGGTGCTCTTACCCACTGAGCCAT
CTCACCAGCCCCAAGAATTATTTATTTAATGTATGTAAGTACACTGTCTCTTCTTCAGACACAC
CAGAAGAGGGCATCAGATCCCATTACAGATGGTTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGAATTGA
ACTCAGGACCTCTGAAAGAGCAGCCATCTCTCCAGCCCCCAGAGGTAGTTTTCCTCCAGTTGTT
AATTCAGTTGTTAATTTTGGAGGAGAAAGCTTGTAATCAGAGATTTCTGTCTAATTTCTGGCTC
TGGGTTATCTTATGCAAGTAGTCTTAACTTTCTTTTAAATAAAAGCTTAAAAAAAACCCACACA
TTTAAAAAAAAAACATGCATACATTTATCGGGGGCTGGAGATATGGTTCAGTGGTTAAGAACAC
AGATTGCTCTTCCGAAGGTCCTGAGTTCAAATCCCAGCAACCACATGGGGGCTCACAACATCTG
TAATGAGATCTGACACCCTTTTCTAGAGTGTTTAAAGACAGCTAGTGTACCTATATATAATAAG
TAAATATAATGTATATAATAATAATAAATAAGTAAGTAAATAAATCTTTAAAAAAACCAGCTGG
GCGTGGTGGCACATGCCTTTAATCCCAGCACTTGAGAGGCAGAGGCAGGCAGATTTCTGAGTTG
GAGGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTATTCAGAGAAACCCTGTCT
CGAAAAAAAAAAATCTTTAAAAAAACATAACAAACAAAAACCCCCACATTTATCTAAGTGTGTG
GGGGGGTTTCATGAGAACCATTGTCTGAGTAATTATCAGGTTTGGGAACAAGAGCCTTTACCCA
GTGAAGTGTCTTGGTTCCAATTTGGTTTCCTCTTTTCAAAACAAACCTAGTAACTGCTTCTTTG
GCCACTGCTAGGGGAAAATAAACTAACTGGTTGGCATAGCATACACATGCAATAATAGTTGTTA
ATATAATTCCTGCTAAGTCAAAGTGCTGTGAGGGCTGAGGTCAGGTGAGTGAAAGCTTTCGAAG
CCCACGCTGGCCTTGGACTCTTTCAGATGACGTTGAACTACTGACCCACTTGTCTCCACATCCC
TGGCGCTGGGACTCCAGGAATGCTGACCACCACATTTTTAATTCTCCTAAATTTTGTGCATTTT
CTCCACTACAAACCAAGACCACACCTTTAATCCCAACACTCTGGAGCCTAAAGTAGGTGGATCT
GAGAGTTTGAGGTCAGGCTGGTCTAGCTCGTAAGTTCTAAGAGATACGGAGAGGCCAGGTCTTA
AAACTAAAAACAATTGGGGGAGCACGTATATGTTTTGTGTTTCTTTGCTTTTTTGTCGTGTGTG
TGTGTGTGTTTGTGTGTGTGTGCACGCGCACCGGCATGCGTGTGGTGTTGCACACCCCTGCAAT
TCTAGCACTTGAGAAGTTGAGGTAGAAGGTTGGCCACGAATTCAAGGCCAACACGGGCTACAAA
CTGAGTACTACGGCAACAAGGGCTATATCTCAAAGCCCTGTTTCTAAAACAACAATAAAAAAAG
ATTTCAGCCGGCCCAGCACTTGGGAAGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGGCTG
GCCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTATACAGAGAAACCCTGTCTGGGGGGGGTGGG
GGGGGGGAAGATTTTGAGTTCACTGGCTTATTTTAATACGTGAACTTTAGAGAAAGAGAACTTT
AGAGAGAGACTATAAGTCCTCCGCAGCCACCAAATGACCTAAGAACCTGGGCTCCATGACGCCT
AGCAATGAAGCGCGGCGGGCTGCTTCTGGACCGTCTTTCTGTCCACTCAGCGCCAGCGCGCATC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CGTGATTGGGGTGTTTGCAGCCCGCACCGCCTGCCTGTAAGTGTGCACTGGCCACCCCTGGCCT
TCGAACATGGAAGGTCACTACGTGGCTCCCGCATCCCGCTCGCTCTCATCTCTCTTTGAAAGTG
TGGCGTTTTCATCTGCACCAGAGCACTCCGTCGTCCCCAGCCCTGGCGCGTTTCCACGAACTCC
GACTGCGCAGAGGCCGATCCTCTCCCCGCCAAAGCTCTGACGCGCGCCGGTGTCCCGACTGTCC
CAGCCTCCCGCGCCTTTCCCCGCCTCCCAGCGTTCCTCCTCCTCAGTGATTGGACGCGGTTCCT
GTCCCTTTTGACTCCAGACCACGCCCCCTCCCCACCCAGCCGCCTCCAGCTTCTCCTCAATCGA
ACCCGTGGCGCTCCTGGCTGGAGGCTGTGAGGGGACTATGGGTGTACCTGCGGGATCCGAGTCG
TCCCGGACTGGCCCCTCCCCGGACCCCAACCACTCCCACCGGGCCGGTCCTTCCCCCCCCCACC
CCCCCCCCGCAGGCTCCACTGGCCCCAGGACTGCTCCCGGGCTCCTAGTCTCGCCCGCCACTCT
TCCGCCCCTCCCTCCTCGCCGCCGCTCGCACGTCTGGAGCGCCCGGGCCGAGCGGGTGGCGCGC
CGGGGGCATGCGCTCCATGAGGGCTCTGCAGAACGCGCTGAGCCGCGCGGGCAGCCACGGTCGG
CGGGGAGGCTGGGGTCATCCGAGCCGGGGCCCGCTTCTGGGCAGGGGCGTCCGGTACTACCTCG
GTGAGGCCGCAGCGCAGGGCAGGGGGACGCCGCACAGCCACCAGCCGCAGCACTCGGATCAGTA
AGGCTCGCGGGACAGGGGCAGGGGACAGGCTGGCTCCCACTCCCACTGTCGTTCTCGCTAGCTC
CCTGGGAGTCCCCTTCCCCAGAGAGCGAGCGCATCTCATCTCCTCTCCGCGCTCACTAGCCTGC
GATGCCTTTTCCTTTAGATGTGGGGCTTTGGGTCCGCCGCGCTCGGGCGGTCAGGTGCTGTCCG
CCGCGCTCGGGCGGTCAGGTGCTGTCCGCCCGGGAGGGCGTTTGGGCAGGTCGGTCTTCGAGAT
GATGCCTGTCCAAGGTGCGTACTTATTTGGGAACGCAGATGGGCGCGGAGTGTTGCTTGGTGCA
CGTGTCTGAGTGCAGGGCCGAGTGCACACCTGCCCATCCCCAGCCTCTCTTCTCTGGTCCCAGT
ATTTTAGGGAATTTTGTGGATATCGAACAGCTTCCTGCCCCAGGTCCAAGTGCGCTTGGGTCTG
ACTGTGTGGGGTTTCTTGTCTCTGCCTGTCGTCAGTGGGTAATGTGCGGTGTGCGTCATTGCTG
ATGCGCACGTAGGTGCGTATGTGTCCGGAGTGTTTTTGTAGCAGAGCTTAACCGTGGAATATCT
TATATGCTGGCAAAACACTGATAATCAAGTTTCCAACTTGGTTTTGGAATGCGTTGATTATTCA
TAAATGAGAAAATTGTGAGACAGTTCCTAAACCAGTCAGCTATTGCGTTGCTCTGCCTCTCTAA
ATTGAAGTGTTTTTCCCCTTTGGGGCCATCTTCAACCCAGGAAGTCGACCCCCCCCCCCCCAGC
ATACATTGCCCAGGAATGCTTAGTAGCTGGGCTTTCTCTCCAGCCCCAAGAGGAGTGTTTTCAA
AGCATGAAATTTGTTATCCTCAGACATCCAGCTGGACGTTGTCCTGGTAGCTCCTGCCTCATTA
TGGCAGTATAGGAAATGGACCGTTTTTTCCCTATCATATCAGCTTAGTGATATTTAGAAACATA
TGCACACCATAATTAAATGAACCAGACTGACACAGCAAACTACCTCAACACCAATAAATATGGT
TGGGTAAGCAAATACCATTTGCTTATCCGTTCCCTTGTAAGACCTTTGGGGTGAGGAGCCAGAG
GCATCCCTGAGTCCTCCTTACGCATCACAATTCACTGCAGTATGTGACAGAATTGTGTTGTTGT
TTGTTTTTTCAAGACAGGCTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGTCCTGGAACTCACTCTGTAACCC
AGGCTGGCCTCAAACTCAGAGATCCATCTGCCTCCACCTCCCCAGTGCTGGGATTAAAGTCATA
TGGCACTACTACCTGGATGTGACTGAATATTTGTAGGAGACCTAGTTTTTTGTGGCTGCTTGTG
TTCCAGGGAACTAATTGGTAAAGGTCTTAAACCTTGGCTCCCTTTGGAAGGTAAAGGAGGTTGG
CAAAGAGGAAATACATTCTGATTATTAATTCTAATAATTCTGATTATTTAAAAGTATATAGTTT
AGGGCTTCAGACCCAGACATTCAGAGTACTTGTTACTCTGGCAAAGGACTTGGATCTGATTTCC
AGCACAGCACGTGATGGCTCACAACCATCTGTAAATCCCAGGGACTCACATGGGCATTCATACA
CACACAAATCTTAGGAAACACTTAAAAATAAAATACTTGCCAGGCGTGGTGGCTCATGCCTTTA
ATCCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCGGGCAGATTTCTGAGTTCAAGGGCAGCCTGGTCTACAAA
GTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAAACCCTGTCTTAAAACAAACAAACAAACAAA
CAAACACCTAATAAAACCAAAATACTTAGCTTCGTTTTATTCTGTTTTTAAAAAGAATACTGTG
ATAGGTGCTAGAGAGGTGGCTCAGAAGTTTAAAACACTTGATACTTTTTGTTTGTTTCTTTCTT
TTTTCTGAGACAAAGTTTCTCTGTGTAACCCTGGCTGTCCTGGAACTCACTCAGGACTGTCCTC
AAACTGACAAATACCCTCCTACCTCTTCTTCCCAGTACTTCCAAGGCTGAGATTGAAGGTGTGT
GCCACCACCATCCTGCTTGGTTTATGAACTTTTTAAAAATGTATATAGGTGTTTTGCTTTGTAT
ATGTGTCTGTGTACCACATGCAAGCCTGGAACTTGCTGAGATCAGAGGAGGTGTTGGATCCCCT
GAAACTGGAGCCACTACATGGGTATTAGGAATTGAACCCAGGTCCTCTGTAAGAACAACTGCTC
TTAACCACTAAGCTAGCTCTTCAGCCCTGGAGTATGTGATACTCCTGAAGAGGGCCCATGCCCA
GTTTCCAGCACCCACTTGGTGGTTAGCGCAACTATCCATAACTCTAGTTCCAGGGTACCTGGTT
TGTTCTGACTTCTCAGGGTACCAGGCTGGGTGTGTTGGCCTTTAGTCCCAGTATTCTGGAGGCA
GAGGCAGAAGGATTTCTGTGAGTTCCAGGACTGCCTGAACTACATAGTAAGTTCTGAGATAGCC
AGGCCTACATAGAAAGACCCTTAGAACAAACAAACAAAATCCTAGATAAGTCAAAGATGAAAAT
AAAAACCCCAGTATTAGAGATAACTAGTTAATACTGTGATATAACCATATGTATCTTATATATG
TTATGTATGTATGTGCTTGTAATTTAACAAAAATAAAATTATGATATTCATAGTAATTGGTAAG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CTATGTTTTCCATTTATGAATTTATTTTTAATTGATCTTTAGTGTAAGCATATGAGTACCAGTG
TGCCACATGTTCATGTCAGTGGACAACTTTGTGGAATTGGTTCTTTCCTTCTACCTTTACGTGG
CTTCTGGGGTTTCATGGGTCAAACTCACTGCCAGAGTTGCATAGCAAGCACTTTTTTCTGCGGA
GCCATCTTGCTTACCCTATATTCACTTTTTTAAATGGCTTTCTAAAAGTTTTATTTTGCCGGGC
GTGGTGGCTCACACCTTTAATCCCAGTACTTGGGAGGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGA
GGCCAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTATACAGAGAAACCCTGTCTTG
AAAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAACAAAAAAAAAAACTGTCTAAGC
TAAGCATGATGGTGCATGCTTTAGTCTTAGCACCCAAGAGGCAGAGGCAGGTGGATCCCTGAGT
TCAAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGAGCTACACAGAGAAAGCCTAT
CTTAGGGGAAAAAAAAAAGTCTTCTAAGTCTAATAACATTAAAAGAAGTCTTAAGATCAGCGGTT
CTCCACCTTCCTAATGTATTAAAGGGCTTAACTCTTTAACCCTTTAAAACAGTTCTTCATGTTG
TGCTGACCCCCAATCGTAAAATAATTCTCATTGTTACTTCAAAACTTTAGTTTTGCTCCTGTTA
TGAATTGTAATGTAAATATCTGTGTTTTCTGATGGTCTTAGGCCCCTCCTGTGAAAGGGTTGTT
TGACCCCAAAGGGTCAAGACCTACAGGTTGAGAACCATTGCTTTAGATGTTTTTGGAGTTTTAT
ACCAGTGTGAGAGACCTTTGCGGCTGGCATGGAGACAAAAGCATACAGTGGCAGAGAACAGACA
GGAAGTTGGTGATTGGCTGATTTTATATAGGGCAGTTTATCATGGAGTAAGGTCTTAGATAGGC
CTCACTCCACCTGAGTGAGGTAGACATCCTATATCTTTATTCCATAGATAAGTAATATTAAGTG
GGCTTCCTAAAGGCGCATAACGATACCACGATATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGC
GCCGGAACCGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCGAACCCT
TTCCCACACCACCCTCCACACTTGCCCCAAACACTGCCAACTATGTAGGAGGAAGGGGTTGGGA
CTAACAGAAGAACCCGTTGTGGGGAAGCTGTTGGGAGGGTCACTTTATGTTCTTGCCCAAGGTC
AGTTGGGTGGCCTGCTTCTGATGAGGTGGTCCCAAGGTCTGGGGTAGAAGGTGAGAGGGACAGG
CCACCAAGGTCAGCCCCCCCCCCCTATCCCATAGGAGCCAGGTCCCTCTCCTGGACAGGAAGAC
TGAAGGGGAGATGCCAGAGACTCAGTGAAGCCTGGGGTACCCTATTGGAGTCCTTCAAGGAAAC
AAACTTGGCCTCACCAGGCCTCAGCCTTGGCTCCTCCTGGGAACTCTACTGCCCTTGGGATCCC
CTTGTAGTTGTGGGTTACATAGGAAGGGGGACGGGATTCCCCTTGACTGGCTAGCCTACTCTTT
TCTTCAGTCTTCTCCATCTCCTCTCACCTGTCTCTCGACCCTTTCCCTAGGATAGACTTGGAAA
AAGATAAGGGGAGAAAACAAATGCAAACGAGGCCAGAAAGATTTTGGCTGGGCATTCCTTCCGC
TAGCTTTTATTGGGATCCCCTAGTTTGTGATAGGCCTTTTAGCTACATCTGCCAATCCATCTCA
TTTTCACACACACACACACCACTTTCCTTCTGGTCAGTGGGCACATGTCCAGCCTCAAGTTTAT
ATCACCACCCCCAATGCCCAACACTTGTATGGCCTTGGGCGGGTCATCCCCCCCCCCACCCCCA
GTATCTGCAACCTCAAGCTAGCTTGGGTGCGTTGGTTGTGGATAAGTAGCTAGACTCCAGCAAC
CAGTAACCTCTGCCCTTTCTCCTCCATGACAACCAGGTCCCAGGTCCCGAAAACCAAAGAAGAA
GAACCCTAACAAAGAGGACAAGCGGCCTCGCACAGCCTTCACTGCTGAGCAGCTCCAGAGGCTC
AAGGCTGAGTTTCAGACCAACAGGTACCTGACAGAGCAGCGGCGCCAGAGTCTGGCACAGGAGC
TCGGTACCCGGAAGATCTGGACTCTAGAGAATTCCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTT
ACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAT
TGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAG
GGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCT
CTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCAC
CTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACA
ACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTA
TTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTC
GGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGG
GACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAAGCTTGCCACAACCATGGAAGATCCCGTCGTT
TTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC
CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTG
GAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACG
ATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGA
GAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAG
ACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCG
GTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGA
AAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATG
TGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

ATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCA
GATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAG
GTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATC
GCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTA
TCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTC
GGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTC
GAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGT
GCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAAC
CATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTG
AAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAG
CGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTG
GGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATC
CTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCC
GATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAA
TGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCCACGCGATGGGTA
ACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGG
CTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCG
GCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCT
TTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTT
CCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAG
CTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATG
TCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCA
ACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATC
AGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACG
CCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCA
ATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACG
CCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCC
GCATTGACCCTAACGCCTGGGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGC
GTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGG
CAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAA
TGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAA
CTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTAT
CCCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCC
CGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCCACA
CCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACC
AGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGG
GGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCG
CTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACCGGGCAGGGGGGATCTAAGCTCT
AGATAAGTAATGATCATAATCAGCCATATCACATCTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACC
TCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTAT
TGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTT
TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGGA
ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGTTTAAACGGCGCGCCCCGGAATTCGCCTT
CTGCAGGAGCGTACAGAACCCAGGGCCCTGGCACCCGTGCAGACCCTGGCCCACCCCACCTGGG
CGCTCAGTGCCCAAGAGATGTCCACACCTAGGATGTCCCGCGGTGGGTGGGGGGCCCGAGAGAC
GGGCAGGCCGGGGGCAGGCCTGGCCATGCGGGGCCGAACCGGGCACTGCCCAGCGTGGGCGCGG
GGGCCACGGCGCGCGCCCCCAGCCCCCGGGCCCAGCACCCCAAGGCGGCCAACGCCAAAACTCT
CCCTCCTCCTCTTCCTCAATCTCGCTCTCGCTCTTTTTTTTTTTCGCAAAAGGAGGGGAGAGGG
GGTAAAAAAATGCTGCACTGTGCGGCGAAGCCGGTGAGTGAGCGGCGCGGGGCCAATCAGCGTG
CGCCGTTCCGAAAGTTGCCTTTTATGGCTCGAGCGGCCGCGGCGGCGCCCTATAAAACCCAGCG
GCGCGACGCGCCACCACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCG
ATCCTCTAGAGTCGAGATCCGCCGCCACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCC
GGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGAT
GCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCG
GTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTG
CCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG
CAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCG
CATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAG
CATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGG
ATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTC
TGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCG
CCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACT
CTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTCGATTCCACCG
CCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCA
GCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCCCGGATCTAAGCTCTAGATAAGTAATG
ATCATAATCAGCCATATCACATCTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCC
CCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA
TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCT
AGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGGGGGTACCGCGTCG
AGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCGTCGAGATAACTTCG
TATAGCATACATTATACGAAGTTATGTCGAGATATCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT
TGATATCTCTATAGTCGCAGTAGGCGGTTAGTTTCTAACTCACTGCAGACGCAGAATGTGGGAA
CAGTCAGACGGATGCTGTGTTTCCATCTCGTCCCCATCCTCACGGGAAACACAAAGACACACAC
CATTGCTGGATGCACTCTGTTTCCAGTGTTTGCCGGACATCAGTACGTGCAATGATTTAGGAGG
TGGCTCGAAATAAAGGACTGAAAAGTTCAGAGTTCCTTTTAAAAGAGACTAGAGAGTCAGATTG
GCAACCTCTCGCACTGGGGTGGAAGTTAGGATCACAGAACCTGCCAGATGGTTCAAAGAGGAGG
CCTAGGATGACAGCCCATGACAGGTCCGTGTTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGAG
CATCCTCAGGCTTCTGCCTTCCCGTCTCTTTCCCCCAAACAGTGACGCCTCACACAGCGGCATG
CTGCCTCGACTTGGTGACCTGCTTTTCTACACTATTGCAGAGGGACAGGAGCGTATCCCTATCC
ACAAGTTCACCACGGTGAGTGGCTATCTATCTGCCGATTCAGAGAACTCTGATTCCTTAGAGTC
TCTGGAACCTGTGAGGAGGATGGTCGAACAGTATAGGGTAGCTAATGGCTGCCACTGGGGGATG
GGAAATACAGAGGGGTAATGGCTGCCTGGGCTAAAAAGCCAACGCCATCCTTCCCCCAAGTCCA
GAGGAGAACACCTTTCGTGAGCTGTGGCAAGAGGCTTGCTAGCCTTCCAAGTTCCAAAACCAAT
TTGTTCTACCAGTTGTAATTGGGGTGGAGTGACTTGAGTAGCTATTGGGAAACACTGAGGTATG
GATTGCTGTCCTTGGCTGACCTAGCCAGACCTCTTCTTCCCCCCCAAAGGCTCTGAAGGCCACT
GGACTGCAGACGTCAGACCCACGGCTCCAGGACTGCATGAGCAAGATGCAGCGCATGGTCCAAG
AGTCCAGCAGCGGTGGCCTCTTGGACCGAGAGCTCTTCCAAAAGTGAGAGCCCCAGAGATGAGC
ATTGACCCCCAAAACAGTTCTGTAGGAGGAAAGATCTTGGGAATTAAACAGTTCAACCCTTCAT
TTTGTTAGTAGCTTCTAGAAGATGTTCTCATACATATATGGTGTATATATTAGGACTTCTCAAT
GCTAAAGCCCATAGCTGTGGTTATTCTGATTTTAACGTTTTTTTCTCAGAATGTCTTGAGATAT
CTTTCCATGTCTTTAGAACATATCATTTTAGAGGTTAGGAAATTTAAACCTAGGGAGATGAAAT
GATATTCCAAAAGTTACACGACTGCTAGTCCAAAACCAAATGAACACTTCAACCTTCTTTACCT
CTGACTTCCGTGCTCCCGAGTGAGTCCCAGCTGTGTCTCTCCAGCTCCTAACACACTCGTGTCT
GGGATCCAGGTGTGTGAGCAGCAACATTGTGCTCCTGACTCAGGCATTCCGAAAGAAGTTTGTC
ATTCCTGACTTTGAGGAGTTCACGGGCCATGTGGATCGCATATTTGAGGATGCCAAAGAGCCCA
CTGGAGGCAAAGTGAGGGCCAAGGGGACGAGGGAGGGGAGAGGGCTCTGGGCCAGATACACAGT
GCTTCTCAGAGACGCCTTGGGGCTGTGGACTCAATGATGGATGAGCAGAGCCTATAAAGTTGAG
GGCATGTTTTCATGTGTTTTCACTTGTGATTCTAGTAGCACGTGACTTAGGACCTTTATGGATG
TGGATGGCAGAAGCTAGGGTTTGGTGGCACAGGCCTGTAGTCCCAGCTCTTGTTGGGCTAAGAC
AGGCTCAGAAGTTTGAGTTCAGTATTGGTTACATAGGGAGACCCTGTCTCAAAGTAAAGAGATT
CAGTCCAGCCTTCAAGGAGACTTACAGGGACTGAACCTGAGAACCTAATCCTAGAATTGCCTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTAATATTTCATGGGCTCTACTGTTTGGACTACAGAGATGTATGGTTGA
AAGGGACTAAAGGCCTTGTTGGTTCTGGAAGGAATATACAAAAGGGGACAGATTTTAACTTTTA
CCTCAAAGTTTCTGACCCTGAGTACTGCTGTGCTGTTCTCCATAGTCACCTGTCTCCCCTTTCT
CTACCCATTTATGCCCAGGTGGCAGCCTACATCCCGCACCTGGCCAAATCAAACCCAGACCTTT
GGGGCGTCTCCCTGTGCACTGTGGATGGGCAGCGGTAAGATGCTGGGTGATGCTGGGCCTTGTA
GTGCACCCCTTTAATCTCAGGACTCAGGAGGCAGAGGCAGGAGGATCTCTGAGTTTGAGACCAG
CCTGGTATCATCCTGAGTGCCAGGACAGCCAGAGCTCTGCAGATAGACCCTGTCTCAAAACAAA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GATGCTGGGTGAGAGGCAGGAGCTGAGAGAGCACAGGTGAGGAACAAAGTCTAGCCCCTTTTAT
GGTACCTGTCTCCTCCAGGCACTCTGTGGGCCACACGAAGATCCCCTTCTGCCTGCAGTCCTGT
GTCAAGCCCCTCACTTACGCCATCTCCGTGAGCACCTTAGGCACTGACTACGTGCACAAGTTTG
TGGGCAAGGAACCCAGTGGTCTGCGCTATAACAAACTCTCCCTCAATGAGGAAGGTGAGCATCT
CCAGGGCTCAGGTTCATACCTGCCTTCTGAGCCCCGTGCCTCGCCTCCTCCTCTGTGTCTTAGC
CTTTGCTCTCATCCAGGTAGGAACTGGACCCAACCCCGATTAGCTTCAGAGTGGGAACAGTGCA
GAGTAGGCTTTCTTGGTGACTGACAAGACTGAGTGGTTTGTATTTCCCCAGGAATTCCCCATAA
CCCCATGGTCAATGCTGGTGCCATTGTGGTCAGCTCCCTGATCAAGGTCAGTGCATTTCTAACC
TTCTGAAAGGTAATTTCTCAACTCCCCTTATCCCTACATCCCCATATCTGTTCAGTTCTCCAGG
CAGATAGGGCAGGGGGTGGGGGGGTTCCTGAGTCATTTGAGAATTAATAAGAGGCATGGAAAAA
ATGCATCAGGAAGTCCTGTGAGATGGCGCAACGCAATTAATGATAACTTCGTATAGCATACATT
ATACGAAGTTATGGTCTGAGCTCGCCATCAGTTCAAGAGCCAAATGCCAAGGGCAGGGGGAGGA
CAACACCATCAGGCATTGATTGGCCACTCCTGGGTGAGAGATATGCTGACAGAAGGGTGAATGG
CCAGTCCAGGGCAGTCATTCACGTCACCTGGAACTGTGAGTTGGCCTTGAGCAAGTGATGTCCA
ACAGGCCCATCAGCTGCAGGTCTCCCAGGGCTTGAGCAAGAACGCAGGAGCAGTGTGGGCAGCG
ACACTCTGGGGCCAATCACGGTCCCTCCTGAAGAAGGTGGTGTTAGGAACCCTTCCCCCTAGGA
ACTCAGGTTTCAGAGTCCTGGAGTGTTGACTCCTACCTGAGCCTGCAGTGTTGACGGAAGTGAG
CCTGGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GACTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGACTGTCTGTGTGTGTGTGA
CTGTCTGTGTGTGTGTGTCTGTCTGTCTGTTCTGTGTCTGTGTGTCTCGTGCGTGCTAAGGTAA
GCATATCTCCCTGTTCTGGGGAGTCCTGTCGGCAGCCCTATCTTTGGGACCTGCCTCATCTCAT
CTTCTACTAGAGTTGGGGATGAAGAACATTTGGGTAGAACATTTGCTCCACCATGTACAGAGAC
CCAAGGCACTTCAATCTCTGGCACTGCTATAAAGAAATAATTTTTGTTTCTTTATCACTATATC
TGGGGATATCTCAGTGGCAGAACATTTGACCAGCATACCTGAGTTCTTAGTTTCAATCCTGGTA
GTAGAAAGAAAAATCAGGGCTGGTGAGATGGCTCAGGGGCTCAGGGGGTAAGGGCACCCGAATG
TTCTTCCAAAGGTCCGAAGTTCAAATCCCAGCAACCATATGGTGGCTCACAACCACCTGTAACA
GAGATCTAACACCCTCTTCTGGTGCGACTGAAGACAGCTACAGTATACTTACATATAATAAATA
AATAAATCTTTAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAATCATTCATCAATATAACTGAATATTCAGC
AGACACATTCCATTTCTGTCACAGAGGATCTGGGAATCAGGTATAAGCTAGAGTGAGGCTATAG
AATGGGGCATAAAGGTTGGGGGGGGGGTATAGGCATGGTAGCATATGCCTATAATGCCAGAACC
TAGAAGTTCTGGGGCTGGAGAGATGGATCAGCAGTTGAGAGCACGGACTGCTCTTCCAGAGGTC
TTGAGTTCAATTCCCAGCAACTACATAGTGGCTCCCAACCATCTGTAATGGGATCTGAAAACAG
CTACAGTGTACTCATATACATAAAAAAAAAAATCACAAGTTCAAGGCTAGTCTGGGATACCTGA
GACCTCTATTTAAAAGTAAATAAATAAATAAAATGGATAGTAGTAATCATGGATAAGGTGGAAT
TTAGAGACCGAAGTGGAGACAGAAGGAGTGAGCCAGGAGAGAGGAGAGGCAAGTAGATGGGGTG
AGGTTATCTGAATCCTCATTCCTTGATAATTTACATTTTGTTTGTTTGTTTCAACAATCCTCCT
GCCTCAACCTCCCAAAAGCTGGGATTATAGGTGTGCATCACCACACAGGCTGGTGGTCTGGATT
TTTCTCACTAGACTACATAAACCTGCATGCACAAAAAGTCTCAGCTGCTTAAACAAGAAGTATC
TGGTGCCTATAACATCAGTTACTCCAAGGCCAGAGGGGCTCTCAGCCACGGGACAACCCAGGCC
TGACTCAGAGCAAACAAAGGACATTGTAAAATGTAACATTCCCAGAGCAAACAAAGGGCATTGT
AAAAAATAACAGTCCCAGTAGCAAGGTTTGACTAAGCCCTCCTGCCCCTGCTGTCTGCCATCCT
CCCAGACCTGGAATGCTGATTGCTTTCCCTTTCCTTCTGTGCAGATGGACTGTAACAAAGCAGA
GAAGTTCGATTTTGTAAGTTCCTCACACTCAACCCTTTCCTGCCTTTCTCCACCGCATGCTGTC
CACACAGCTGCTACAGCTATCTCCAGAGGAGTGGGGACCACTGGCTTCAGCTTCTTGAAGTCCC
TACTCTCCCGGGGAAAGAGAGGGTCTGAGTGCCTTATCAGCCCGGGTGTGTTAGCTAGCGATCC
TTAGTCTAAAGGCGTCTTTCTTACCTCTCTTCTCTTCCAGGTGTTACAGTATCTGAACAAGATG
GCTGGGAACGAATTCATGGGGTTCAGCAATGCCACGTAAGACTCTGTTTAGGGGGCTGGCTGAG
TAGGTTGTACCGTTGAGCATGTGTGTGCTTGGTGGGGGAAGTCGAGGAGGGAAGGGAAAGAAGA
ATATATATTATCGTAGGAAGAAATTTGGGGGGAATCTTGGCCTCTCAGCTTCCTCTGAGCTTCT
GCATCGACATTTACTTACTTGGAGAAATAACATCCCATGTCTGATTACCACATAATGAGAAAGG
CAGCATGCTGGCTTGTGCCGAGGCCCTCGTCAAGACTCAGAGCCAAACATCTTGCCAAATTTCC
TAGACAGAGCCACTAGACAGCTTCGGGTGGGTTTTGTTTCTGTTTGTTTACATTTAACCACAAA
GCTACACCAGGTATTTGTTCAGGTTCTGAAGTTCCCACTAATGCTCTGTGAGACTGTAAAGGCC
CGGCTTTCAGCCTGACACAGGCAACAGAATTCTGTATCCCAGGAAAGGTACCCTCCCTCTTTCC
CCCCTACACACCCCTTAAGCTTCAAGCATGAAATTTGGTATTTGCTTCAGATTCCAGTCAGAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

AGGAGACTGGGGATCGGAATTACGCCATCGGCTATTACCTCAAGGAGAAGAAGGTAACTGGGAA
AGGTCGTAGAGAAAGTCCCTGAGAGTTCTACTGCCAGGTCAATGGCAGGGGGTCAGGCTATGTG
AGCCCCTGGCAGTGTGAGCCTATGTCCTGAAGAGACTGCTACACCCTGTTCTTTGCAGTGCTTC
CCTAAGGGTGTGGACATGATGGCTGCCCTTGATCTCTATTTCCAGGTAAGCAAACACTCCCGGG
GTCAAGGGGACGGGACAGAGTGCCCTCCTGTTAAACGGTAGACGCTCCTCTCTGGTGGTTCTGT
TAGAACGTGTTGAAAGATCTAGATGTAGAGAACGTTATTCTACATTAATGTGTTCGAGTCTACA
CTGCCCTTTGACCTCTCTTGTCTCCGTAGCTGTGCTCTGTGGAGGTTACCTGTGAGTCAGGCAG
TGTCATGGCGGCCACTCTGGCCAATGGCGGCATCTGCCCTATCACAGGGGAGAGCGTGCTGAGC
GCCGAGGCCGTGCGCAACACCCTCAGCCTCATGCATTCCTGTGGCATGTATGACTTCTCGGGCC
AGTTTGCCTTCCATGTGAGTGTTATCTGCTGTCCAGTGCCAAGAGGAGAGGGTAGCCAGGCAAA
TAGGCTAAGAATCCTTAGGGGATTTTGTCAAATACATCACATTCCTTAAATATATAGACCCTTT
CCATAGCTGGCTCCCATCTTAGATGCCACTTCTAGGGAGAGGCATGGCTGATTTATTCCTCTGT
TCCCCCACGATAGGCTCTCACTGTGCAGCTGAGGGCAGTCTCAGAGTCAATGATCCTCCTGCCT
CATCCTTTAAAGTACTAGAAGGACAGTCATGCACTTAGCCTGGCTTTTTTTTCTTGTTTGATTT
GGCATTGGGGATCAAACCTACACTGGGTAAGCCCTGTACCACACTATAAACTTCATCCCCAGCC
CTGAAGACTTTCCTGGTTGCTCTGTCTCAAACAAAACTACATCCACCTCTGATTGTAGCACCCT
GGTCCTTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTGCTTGTCTATTTATAAAGGTTTATTTTT
ATTATTGGAAGGGATTTGTACAGGTGAACGTATGAGGCCACTGAGGGTGGAGGTGTTGGACCAC
CCCACACGCTGGAGTTATGGGTGCTTAAAACTGAACTGGGGTCCTTTGCAAGAACAGCCCAGGC
TCTTAATTACTGAGCCATTTCTCCAGGTCCCACCTCACTTTTAAAAATATATATACATTTTAAA
ATTCCAGTGCTGGGGAGGCAGCGGCAGAACAATATCTGGTTTGAGGAACCCTGTCTCAAAAAAA
CTTTTATTCATTTTTAAGTTATGTGTATGGGTGTTTTGCCTGCGTCTATGTCTGTGTACCATGT
GCATGCAGTGCTCAGACAGGACAGAGGAGGGATCAGATCTTTTGGAACTGACAGACAATTGTGA
TCTGCCATGCAGGTGTTCTGAACCAAACCCTGGTCTTCCACTGAGCCATCCTCCCTTCAGCCCC
CAGGTCCCATTTTTAAAATTTAAAAATGTATTTATCATGAGTATATATGTATGCATGATGGTGC
ATGTATGAAGGTCAGAGGACAACTTTGTAAAGGCTTTTCTCTCCATCCACCTTTACATGGGGTC
TGGGGAGCAAACTTGGGTTGCTAGACTCGCACAGCAAGCACCTTAACTGATAGGCCATCTTGAA
AGCCCCTGTTTATCTTTCTGTCTGTCTTCTACTCCTAGAATAGAAGTTGACCGAGAGGCCACTT
CCTGGGGCTGGAGAGACAGATGGCTCTGTGTTCTGGAGCACCTGCTGCTTTTGTAGAGGACCTG
GGACCAGCTCACCCACATGGTGGCTCATAACCATCTGTAATTCAGCTCCAGAGCATCCATTGAC
CTCCTCTGGCTTCCTTGGGCAGTAGGCACACATGTGGTACACATACATACACTCATATACATAA
AGTTAAAAAGTAATTTGTCTTTTTAAAAGGAAGGTCGGAGAACACTTCCTGGTTTGAATACAAC
ACCCAGGAGAGTGCACAGCAAGCATTCCCTAGCTCTATTGATGCACACGGTAGAAGAGAGTAGT
CGAGGCAGATAGAAAAATCTAAGAGGTTGACGTGGGTGTGGCCTTGCCTGTGCAATCACTTTGA
CTAGTCCACCTTGTTCCTCAGGTGGGCCTGCCAGCCAAGTCAGCTGTGTCAGGAGCCATCCTCC
TGGTTGTACCCAATGTCATGGGCATGATGTGTCTGTCGCCGCCGTTAGACAAGCTGGGGAACAG
CCAAAGGGGCATCAACTTCTGCCAGGTGAGTTGTTCTGCATATAGAAGTTAATACTGTTTAGTC
AAGAATAAGTCAGTGGTGCTGGGCTGTGGTGGCGCACGCCTTTAATCCCAACACTCAGGAGGCA
GAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCGAGGCCAGCCTGATCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAG
GGCTATACAGAGAAACCCTGTTTTGGAAAAGAAAAGAATAAGTCAGTGGTCAGCACTGTAAGAG
CAACTGTGAGCTCCCAGGAAGGACAAGGAATAAGTAAACAATTCTTTTGGCTTCTAATTCTAGA
AGTTGGTGTCTCTCTTTAACTTCCACAACTATGACAACCTGCGGCACTGCGCTCGGAAGTTAGA
CCCACGGAGGGAAGGAGGAGAGGTTCGGGTAAGGAAGACCCGGTAGCCTAAAGGGTATTTTAGA
AGGTATCATACATTCCACAAGACTTCAGCAGTGGCCTTGGTGAAGAGGCCCACGGAGGAGGGCC
TCGGGGAGAGCTGAGCATGGCTGGGTTCACAGCCACAGTTCTTCTCAGGTGGGTGCAATGTGTG
TTCCAGAACAAGACCGTGGTGAACCTGCTATTTGCTGCATATAGTGGAGATGTCTCGGCCCTTC
GAAGGTAATTCTGTCATGACTAAATAGAGGTAATAAAATACTCGCAGTCCCACATCTTATTAGG
ACACTGTGCAGCAAACTGCTAAATGCTTCGGTTTACCCGTTAGACTAGAGAAGCTGCATTTAAA
TAAGTGTCTGTAGGCTCATTGTGTACACATGCCTGCTTGCCCAGTTGCACATTTGTATGTGTGC
CTGTGGTAGCCAGAGGACAATTTCAGATGTCATAACCTATCAAGCCCCAGGGACTTACCTGTCC
CCACCCCCCACCAATCTAGGATTAAAAACCAGTGCTACTATTTTTATTTTTTTTTCAATGTGGA
GTCTGTGGATCAAACTCAGGTCTTGGCAGGCAAGCACTTCACTGAGCTATCTCTCCAGCCTGAG
GATTTGTTGTTTTAAAATCAAAGCGCCTGCTGTGAGTTAAGAATTCATCAACTCAGCTGGGCTA
GTGGCGCATGTCTTTAATCCCAGCACTCGGGAGGCAGGCGAATTTCTGAGTTCAAGGCCAGCCT
GGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACAGGGCTATAAAAAGAAAACCTGTCTCGAAAAACAAAAAAC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

AAACAAACAAAAAGAATTCATCAACTCAGGGCTGGAGAGATGGCTCAGTGGTTAAGAGCACTGA
CTGCTCTTCCAGAGGTCCTGAGTTTAATTCCCAATAACTACATGGTGGCTCACAACCATCTGTA
ATGGGGATCCGATGCCCTCTTCCGGTGTGTCTGAAGACAGTGACACTGTACTCACATACATGAA
ATAAATAAATAAATGAATCTTAAAAAAAAAAGAATTCATCCACTAATGGCGTGGGTTTGGCGAG
CATAGTCATTGGAAGTGACTCATATACAATCCTCAATGGATTGCCAACAGGAACCCATCCAGTC
TGGCCCCACTTCAGAACGCTATCTAAGTGATTCCAGACTGGCAAGGGTAACCCACGCGACTTCC
CACTCCCCTCAGGTTTGCATTGTCGGCCATGGATATGGAGCAGAAGGACTATGATTCCCGCACA
GCCCTACATGTCGCTGCAGCTGAAGGTATCTTTTTGGTTTTGGATTTTTTATTTGTTTTTCATG
GCAGGGTTTCTCTGTGTGGCCCTGGCTGTCCTGGAACCTGCTCTATAGACTAGGCTTGACTCAA
ACCCGGCCTCCCAAATGCTGAGATTAAAGGCATGTGCCAGCACTGCCCAACCTAGCTGTAGGTA
TTCAGAGGGTTAAAGAGAAAGAGCAGAGTGGAGGGCCCTTTCTCTTCTACCAGATGTCCCCCTA
TCATTGTGCCCATAAAGGGCAATGGCTAGTTTTGTCTACAGGCCTTTCACCCGACAGGGAGACT
AGACTGTAACTAGGGGCTAGCAAGAGCAAATATTGAGGACTTTTCTCCTCCCCTCTGGTACAGA
CTCTAGCTACCGAGGGTCTACACCAAACAGTTCAGAACCTACCTGCACGCTCTCATTTTCCTCC
TACCTATATTCCTAGGGCACATTGAAGTTGTCAAATTTCTGATCGAGGCTTGCAAAGTGAATCC
TTTTGTCAAGGACAGGTGAGTAATATTTAATTCTAAAGGGAAGGAGGTCAGCCTTCCGGCCATT
GTGCATACACATGCAACAATGGCTCTCTCCGAGTCCTCTTTGCCTAACTGTGATCCCTGCTCCT
CACAGGTGGGGCAACATTCCCCTGGACGATGCTGTGCAGTTCAACCACCTGGAGGTGGTCAAAC
TGCTTCAAGATTACCATGACTCCTACTTGCTCTCTGAGACTCAAGCTGAGGCGGCAGCTGAGAC
CCTGTCCAAAGAGAATCTAGAGAGCATGGTATGAGCACAGGCCCAGGGGCAGTCCCTGCTTCAG
AAAAAGCATGAGCTGGCCACACATTTAACCCACAGCCACCAAAAATACTACGGCAAGCTGCTTC
CTTGGGGATCGACACAGCCATTTGGTGACACAGGCCAGTGTTTTCTGAGAATCAAAACGCCCCA
TCAGTTCAGTGCACAGCACAGAGAAAAGCCTCAATGGATACCTGAGCAGAGCTAGCTACAGAGA
CCTCCAGATACAGCTCGAGAGTAGCCCGGGTCTTTACCCAGGTCCCCTTTTCCTCTCTGAAGAA
ATCATCATGCCAACAAGCAACTTCCTTGGAGAGCCTCTAGCTACATGCATATGTATCTGCCGCA
GAGTAAGAGAAATGGGTGAGAGCCAAACCACGTGGCTTTAGAAGTCTGCGGAGATCTGTCCATC
TTAGCCAGGACACGCTGCTACTGCTGACAGCAATTTTATAGACAGAGTATTTTGTGTTCAAATA
AACTTTAATTACATGAATTATAATTTTTATTTTATATTTTGCTAAATTTAGTCGTTCTCTTTCT
CCCCTAAGGACATCATCAGTTATCACCATTGTAGCACCCAGGGTCAGACAAGTCCAAACTGAAT
ATTCCGCATACATATTCAACTGTTTCACCAGGTTTTCCTCAAACCAAAATACTGCTTTTATTAA
GTACATTCTGTGGCCAAGGGAGATGGGAGTTGTGGGTCTGAACAGGCTCCAAAATGGATTGTGT
AAAGTTGTCTTTTTTCTGGAGCTTTGAACTGTGGCAGATACACAGAAGGAACTTATCGAGGGTA
ACGTTTCTGGCACCAGAGCCATACATGTCTCCCTAGTGTCTCTTTCCCTTTGTCACATAACTGG
CACAATGGTTATGGCAAACTGCCTAGGTATCAGGTATCCAGAAGACAGATGGACTCAGAGTGGA
GATAGCTGCATCTGGGTTGGACTGACATCTCTAGTGCTGAGGTACAACTGAGGAAGCCAGAACC
CAAGAATCTGAGGTGCATCAGAGAAAAGGCCAAGCCTGTGGCTGCCACTCCTCCAGCCAGAGGT
AGAGAGCATTTACTCTAGAGAATCTGGTGAGCCCCCAAAACAAGTTACATGTGGATAAGGGACG
GGCCGAGAGGCAGGACCGCAGGACTGAACAGTCTAAGGTGTGTGGGCACAAGTAGAAGGACCCA
AAGAACTGGCCTGAGGAGGCGAATCCCCTGATGACCTAGGAAACTGGCGACTTTGGCTGTATAC
CTAGCTCTTACAGAGTAGGGCCCAGGGGAAGATGGCTACAATATTGCACAAAGGATCCCAACAG
AATTGTGAGAGCTACCAGTTGCTTGAAACAAAGTAAAATCGCTTTAGACACTAAGGACAGAAAG
CTGACCATGAGCACGATTCAGGGTCTTGGCCACATTAGAGGCCCTTGGGCACTTCGAGTCCTGA
GTGGGTTAGCAGCTCTCCATCCCAAAGAGCAAAAGCAGGTGCCACTGGGCCCCGGAAATCTGTC
TGTAGTGTGTGGATCACAGAGATCCGACTCACATCCACCAGGCTCAGCTTCTTTGCCTCATAGT
CCAGCAGCAGCCCCACCTTCTCTGGTTGCCCAATACCCTTAATTGGAGCTTTTTCGTTGGCCAA
CATGCTGTGCCACTTGCGCTGGGCATAGGAGAACACCCAGGAACGATCATCAGCACCAACGCAG
CTGTCCCGGGACATGTCCACGTCTGCCACTCCTATCCGGAACTGCTGGGAGCGCTTCACTGTTA
CCTCCCAGTAGTGTCTGCCACTGGTGACTGTGGTGTCTCCGAGCACCACTGCCCACTCCCGGAA
GCGCTCCAAATTCAGGGCCACCTTGGTGGGTTCCAGTCCCACCAAGCCATATTTGACACCCGTG
TCGCCTCTGAAGAGTGCCAGGCTGCTGTGGGCCGTTTTTTCTTCCAGTTTGAAACTGATGCCTG
AGGGCAGAGCAAAAAAGAACTCGTAAACCTAGGGCTGTGTTTGATCTGAAAGCTGTCCAGGCGA
TGACGGGAAATCGAGAAAAGTCAATGTCAAATGTTAACATGGAAAGAGCAGAGGTGCCGCTTTA
GTAAGACAGCCCTGGGAGCTGCAAATCACTGACTGGGGAAGCCAGAAGCCGGTGCCCCAGGTTT
GGAATCTTGCTAGATCAAGGCAGAGGGGAGAGAGGAGAAATGAGGAGTGGAGTTCTCTGATCGC
GCTCTGGGAATGACACGTTAACTACTTTGGAGTGACAGTAAAAAAGAAATATGCCTACCTCTCC

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

GGGATTCCACAGCAGGGACCCCCCATCGCTTGGTGCCCCAGCGGTACAACTTCCAACAGCGTGC
AAAGGGCAGCGCCATCTTGTGCCACAGATGCACGGGGCACGCCCCCAGGGGACACCGACCAATG
ACTGGTCCGCGCCCGGAGCACGTGGTGCGAGACGCGAGTGTCGTGAGAAATCGGTATCTCGGTG
ATTTCTAGTCTGGCGAGCTAGATCAATACGTGAAGAGACGTACTGATTATATCTCAACTAAGTA
GGATACCCCTCTCACACACACACACACCCAGAGAGCCTGTGTAAACAGAGTCTCTGATTTGTTT
GGTTTTGAAACAGGGTCTCCTGTAGCCTGGATTGGCCTGGAATTCATTATGTAGTCATGGCTGG
CCTCAATTTCATAAAAATCTACCTGCCTCTGCCACCCAAGTGCTGAGACTAAATTAATGCATGC
GATACCAAGTCTGGCAAGATAAAAGAAGTATTTTTTTAAAGTAGTTTAATCCGGGGGGGGCGGG
GGGAGTGACACACAGCCCTCAGGAGGCAGAGGCAGGCAGTTTTCTATGAGTTCGAGGCCAGTCT
GGTCTACATACCAAGTTCCAGGACAGGCAGAGCACCACACATTATTTAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAGCGTAAATCCGTTTCCCAGAGCCTCAGCATTCTCTTTGGACAGAATGTGTCTACATTCAA
GCTTACTGTTCTGTCTTCTGAGACAGAGTTACTATGTAACCTTTGCAGGCCTCAAACTCTAGAT
CCTGCTGCCTCAATTTCCCAAGTGCCAGGTTGTGCTCAGTTTTTTTTTGTTGTTTTTTTTTTGT
TGTTTTTGTTTTGTTTTTTTCGAGACAGGGTTTCTCTGTATATCAGTTTTTTATTATTATAGTT
TGAGACAGGGTCTCAAGGATCGGCCTGCCTCAGCCCGCGGAGTGCTGGGATTAACAACATGACT
TGTGCTCATTATTATTATTATTGTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT
ATTATTATTATTATTTTCGAGACAGGGTTTCTCTGTGAAGTCCTGGCTGTCCTGGAACTCACTC
TGTAGACCGGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCTGCCTGCCTCTGCCTCCCGAGTGCTGGGATAA
AAGGTGTGCGCCACCAACGCCCGGCTACCTCATTATTTTTTAATGTATAAATGAGCTTGAAAGT
GTGTGTGGGGTGGTGCAGTGACTCATTCTCTCCACTAGGGTTCAGTCAGGCCCAGCCTTTTCAG
CCCCGTAACTGTAGAGATGCAGGTTAACTTTTTTTTTCCCCTTCTAATTACAAAACTACTTTTA
ATACTTTGAGGTATGTCGCATACCTCAAAACTGGGAAGAGTAACCTCACTTTCCAGGAGTGGCC
CAGGGTAAGAGAGGAAGGAAACACGAGAGGGACCTGCTGCAGACTTGCAAATGCCGAAGGGAAG
GAACTGTATAGCACGGTGGGAAGGCTCTGGCGCATAGGCGAAGACCAAGAGGGTTGGTCACGAA
GCCGTTCTCGTTTGCCTTTTTCTGTTTCTGCTGCACGACCTCCGAGTCTCTCCGCCTGCGGGCG
GCAGAGGAAACCAATCGTTATCCCGGCGCTTCCCCTTAACCGAGTCGCTCTCCTTGCTCTGGGA
GAGCTCGCACTCAGGTACCGCGGTCCTGAAGCAGCTCCCACCTGCCTCGTTTGCATCCCATCTT
CCTCTTCTATTGACTTTTAAACGTCGGAGCAAAAATGTTGAGGGAATTTCCTCTAGAGAGGTTG
TGCCTGTTCTGCTAATGCTTCGGGTGTGGATAATGAAGAGGGAATGGTTTCAGAACTGGGTCTC
TGAAGCACCTATAGACTTGCGCCTTCTTATTCCCTGCCCTCATCATGACCACTGAGCTGTATTC
CTGGCCCTTTTTAAGATATGGTTGTTTGCTTGTTTTAATTTGTAGACGAGGTCTCACGAAGTTG
ACATTGGAACTCATACACACTGTAGCGTAGGGCAGCATTTGAACTGTGGACCTTTCTGGCGGAG
CCTCCTGAGTCTGGATTATAGGTATGTATCGCCAGTGGAAATACCTGCATTATTTTATACTCAT
TCAGAGAGTAGCTTCACCTGTCATTTCTTATATTACTTTACTTCTACCATCAAATAAACTTACC
TTCATCATTTAGATGATCTGTGTGCCTTATTTTTTTAAGATTTATTTTATTTTTAGTTATATAT
GTGGGGCGGGGGAGTCATAATATGTACATAAGTACAGGTGTCCTTGGAAACTGAAGAGACCACC
AGTTCCCCTGAGCTGGAGTTATCGTGGTTGTGAGTCCTGGGAACTGGACTTAGGTTCAGTATCA
AGCACAGAGCCATCTGTCCAGCCCACCTGCCTTATTGTTAACAAACAATCAATACTTAATATTT
CCATGCATCCTAGTGATCAAATGATAGAATTCGGCTTGACAAACAAAAGAGACATTTGAGGTAG
GGCTGGAGCTTAAGCACAAGCTCTAGGTTACCAAAAGAACGGAGAACTTCGGGAACCATAAGGG
ACACAGTATTGCAGAGGGAAACTGCGAGAATTTAAACATACTTGAGAAGTCAAGACTGGGCTGG
AGTGATGGCTCAGTGGTTAAGAGCACTGACTGCTCTTCCAGAGGTCCTGAGTTCAATTCCCAGT
AAGAACATGGTGGCTCACAATCACTTGTAATAAGATCTGATGCTCTCTTCTGGTGTGTCTGAAG
ATAGCTACAGTGTACTCACATAAATAAAATTAATAAATCTTTTTAAAATTTTTTTTAAAAAAGT
TGAGAGTTAATCATAAACAATCACATACACTATGAGGACATCTAGAGGGGTCTTTCAGATATCC
AGGAGCTGTTTAGGGCAACACGGGGTTGACAAATTAGATTCTCATGCAAAGGTAAAGTTGGAAG
CATCACAGAGCATGAAGTGGAGGGGGTAGGATGAGAAGCAGGGAAGCAGGGTCTTAGGCCACCA
GAGTCCTGAGGGAAAACATGGTGCGACCCAGCTGTGTAAGAGGCAGAAGGCTGATGAGATGGGG
CAGGAAGAAGGTAACCTGTAATTTTCTTAGTAGAGGACATAGAAGAAGCATGTTGAGTTTGGAG
GAGAGTAATTAAGTTTAGAGAAGCTGGATTTGAGATGTCTATGGGACAACCATGTGAAAATGTT
CTATAGGTGTATGGATATAGTTGTATTTATTCTTTGATAATTTCATCTATGTAGATAATGTATC
TTAGTCCTATGCACTTCAAAATTTCCCCTCCTGTCCCTCCCAACAACTCTCAACATATCTGCCT
TCCCCTCTCATTTCTTCCTCCTCATCTTCCTTTATAACCCACTGAATTTGATTGCTGCTGCCTG
TTGAAATGTTGTGCGGGTTCTGTAGCTGCAATGAGTTCATTGGCAGCAAGACTATGTCTGTCAT
GTCCAGAAGATGGTGTAACACTCCTTCGGGACTCCAGCTCTTACATACTCTATGTGTGTGTGTG

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TGTGTGTGTGTGTTCTGTCTTCATGCATACCAGAAGAGGGAATCAAATCCCATTTCTTTTTG
GGGGAGGGGTGTTCGCGACAGGGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTATCCTGGAACTCACTTTGTA
GACCAGGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCTGCCTGCCTCTGCCTCTCCGAGTGCTGGGATTAAAG
GCGTGTGCCACCATACCCAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATCCCACTTTGGAATGGTCC
TGCTGGGAATTGAACTCAGGACCTCTGGAAGAGCAGCCAGTGCTCTTAACTGCTGAGCCATCTC
TCCAGCCCCAGCTCTTACCCTCTTTCTGCCTCCTCTTCCATGATGTTCCCTGGTGGTGGCATAC
TGAATCTGGCAAGGTTGAAATATGAATGTAAACAGAAATATTTCAATTGCAGTTTGACAACATG
TCCTTTTTTGCAAGACAACAGTAGTATTTTCCCTCCTGGCGTCTTTTATGTCCCCAGCCATGAG
GATTTTGACCTGGTTTAGAATACCAGCCATGGCTTTTCTCCTGTGAAGCAGACCTCAAATCTAA
TTCAAAAGCAGTTCATAGCCTCATGACATTCATGCCACTATTGTACACCATGCCTGGCAGAGTT
TACCAATAAAGAATATCATTGATGGCTTGTCTCTCTCTTTTATTTTTTTAATTTAATTTATTTT
TTAAAATTTTTTAAAAATTTATTTACATTTCAAGTGTTATCCCCTTACCCAGTTTCCCCCCTGC
CAGAAACCCCCTATCCTATCTCTCCTTCCCCTGCTTCTATGAGGGTGTTCCTCCATCCACCCAC
CCACTCCTGCCTCCCCACCTTCGATTCCCCTACATTGGGACATCTATTGAGCCTTCATAGGACC
AAGGACCTCTCCTCCTATTGATGCCTGGCAAGGCCGTCCTCTCTACATATGCAGCTGAAGCCAT
GTGTACTCCTTGGTTGGTGGCTTAGTCCCTGGGAGCTCTGGGGGGTCTGGTTGGTTGATGTTGT
TGTTCTTCCTATGGGGTTACAAAACCCTTGATGGCTTGTCTCTTGCATAGTATCTCTGACACTA
TGTTATAGAGCCAGTGAGGAGGAAGTTTTCAGGTCAGTTCTAGCTGGATTTCTTTATGTCCTTC
AGTGGAAATATTCAGCAATAGAGTCTTACCAGCTAGCTCTGGTTGGCAACTGAAAGCAATGGCA
ATAGCCTGGGTTGTTTTGGGGACCTCTGGGCACTCGCTAAGCAATAACTTATGGGACTTCCATT
TAATAACTCATGTCTTCTGGGAAAGTATTGTCTATCAAACAACATATCCCTCCTTTTTTCATTT
CATCATCATCATCATCATTAATTATTATGATGATGTTCATTTTGGACAAGTTTCTCTTTTGTAG
GCCTGGCTGTCCTAGAACTCATTCTCAGGCTGTCCTCAAATTCACGGAGATCCTCCTGCCTCTG
CCTCCCAAGTGCTGAAATTAACAACATGACCCACTACCATCTGGCTCATTTTATTTTATTGTAT
TGTATTTTTTACTTTTTCTCTTTCTTTCTTTCTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG
GTTTTTCGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGTCCTGGAACTCACTCTGTAGACCAGG
CTGCCCTCGAACTCAGAGGTCCGCCTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCT

ACLARACIONES:

- Subrayado rosa: exones del gen Gls2, por orden del 1 al 18
- Letra en rojo: zonas 5'UTR y 3'UTR
- Subrayado en verde: sitios de reconocimiento LoxP
- Subrayado en azul claro: sitios de reconocimiento Frt

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Bibliografía

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Aledo JC, Segura JA, Medina MA, Alonso FJ, Núñez de Castro I, Márquez J. *Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development*. FEBS Lett. 1994; 341:39-42.

Aledo JC, Segura JA, Barbero LG, Márquez J. *Early differential expression of two glutaminase mRNAs in mouse spleen after tumor implantation*. Cancer Lett. 1998; 133:95-9.

Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez, J*. Identification of two human glutaminase loci and tissue specific expression of the two related genes*. Mamm Genome. 2000; 11: 1107-10.

Austin JC, Chacko SK, DiSanto M, Canning DA, Zderic SA. *A male murine model of partial bladder outlet obstruction reveals changes in detrusor morphology, contractility and Myosin isoform expression*. J Urol. 2004; 172: 1524-8.

Balda MS, Matter K. *The tight juntion protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression*. EMBO J. 2000; 19: 2024-33.

Benard G, Rossignol R. *Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics.* Antioxid Redox Signal. 2008; 10: 1313-42.

Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 1976; 72: 248–56.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Burds Connor, Aurora; *Gene targeting for beginners.* Feb 2006 http://www.sciencegateway.org/protocols/genetarget.pdf.

Campos JA, Aledo JC, Segura JA, Alonso FJ, Gómez-Fabre PM, Núñez de Castro I, Márquez J. *Expression of recombinant human L-glutaminase in Escherichia coli: polyclonal antibodies production and immunological analysis of mouse tissues*. Biochim Biophys Acta. 2003; 1648: 17-23.

Campos-Sandoval JA, López de la Oliva AR, Lobo C, Segura JA, Matés JM, Alonso FJ, Márquez J. *Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: affinity purification, kinetic and molecular characterization*. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39: 765-73.

Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Lobo C, Peñalver A, Márquez J. *Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. Neurochem Int.* 2015; 88: 1-5.

Cardona C, Sánchez-Mejías E, Dávila JC, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Vitorica J, Alonso FJ, Matés JM, Segura JA, Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Gutiérrez A, Márquez J. *Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. Glia.* 2015; 63: 365-82.

Castell LM, Poortmans JR, Newsholme EA. *Does glutamine have a role in reducing infections in athletes?* Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1996; 73: 488-90.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Castell L, Vance C, Abbott R, Ma´rquez J, Eggleton P. *Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity.* J Biol Chem. 2004; 279: 13305–10.

Chiu JF, Boeker EA. *Cow brain glutaminase: partial purification and mechanism of action.* Arch Biochem Biophys. 1979; 196: 493-500.

Chung-Bok MI, Vincent N, Jhala U, Watford M. *Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter*. Biochem J. 1997; 324 :193-200.

Conti F, Weinberg RJ. *Shaping excitation at glutamatergic synapses*. Trends Neurosci. 1999; 22: 451-8.

Curthoys, N.P., Kuhlenschmidt, T., Godfrey, S.S. *Regulation of renalammoniagenesis. Purification and characterization of phosphatedependent glutaminase from rat kidney*. Arch Biochem Biophys. 1976; 174: 82-89.

Curthoys NP, Watford, M. *Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism*. Annu Rev Nutr. 1995; 15:133-59.

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. *The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation.* J Biol Chem. 1998; 273: 30057-60.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

De la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. *A novel glutaminase isoform in mammalian tissues*. Neurochem Int. 2009; 55: 76-84.

De Berardinis, RJ, Cheng T. *Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer*. Oncogene 2010; 29: 313–24.

DeLaBarre B, Gross S, Fang C, Gao Y, Jha A, Jiang F, Song J J, Wei W, Hurov JB. *Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. Biochemistry*. 2011; 50: 10764-70.

Denoeud F, Kapranov P, Ucla C, Frankish A, Castelo R, y col. *Prominent use of distal 5' transcription start sites and discovery of a large number of additional exons in ENCODE regions*. Genome Res 2007; 17: 746–59.

Dredge BK, Polydorides AD, Darnell RB. *The splice of life: alternative splicing and neurological disease*. Nat Rev Neurosci 2001; 2: 43–50.

Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. *Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing*. Physiol Genomics. 1999; 1: 51-62.

Erecińska M, Silver IA. *Metabolism and role of glutamate in mammalian brain.* Prog Neurobiol. 1990; 35: 245-96.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Erickson JW, Cerione RA. *Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism?* Oncotarget. 2010; 1: 734-40.

Errera M, Greenstein JP. *Phosphate-activated glutaminase in kidney and other tissues.*J Biol Chem. 1949; 178: 495-502.

Friedman AD, Landschulz WH, McKnight SL. *CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells*. Genes Dev. 1989; 3: 1314-22.

Fonnum F. *Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain.* J Neurochem. 1984; 42: 1-11.

Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, y col. *c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism*. Nature 2009; 458: 762–5.

Gebhardt R, Williams GM. *Glutamine synthetase and hepatocarcinogenesis*. Carcinogenesis. 1995; 16: 1673-81.

Gómez-Fabre, P., Aledo, J.C., del Castillo-Olivares, A., Alonso, F. J., Núñez de Castro, I., Campos, J. A., y Márquez, J. *Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase*. Biochem. J. 2000; 345: 365-375.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Guan C, Ye C, Yang X, Gao J. *A review of current large-scale mouse knockout efforts.* Genesis. 2010; 48: 73-85

Haser, W.G., Shapiro, R.A., Curthoys, N.P. *Comparison of phosphate-dependent glutaminase obtained from rat brain and kidney*. Biochem. J. 1985; 229: 399-408.

Hasty P, Rivera-Pérez J, Bradley A. *The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells.* Mol Cell Biol. 1991; 11: 5586-91.

Häussinger D, Schliess F. *Glutamine metabolism and signaling in the liver*. Front Biosci. 2007; 12: 371-91.

Heini, H.G., Gebhardt, R., Brecht, A., Mecke, D. *Purification and characterization of rat liver glutaminase*. Eur J Biochem. 1987; 162: 541-546.

Hertz L. *Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters.* Prog Neurobiol. 1979; 13: 277-323.

Hoch RV, Soriano P. *Context-specific requirements for Fgfr1 signaling through Frs2 and Frs3 during mouse development.* Development. 2006; 133: 663-73.

Hogan A, Shepherd L, Chabot J, Quenneville S, Prescott SM, Topham MK, Gee SH. *Interaction of γ1-syntrophin with diacylglycerol kinase-ζ*. J Biol Chem. 2001; 28: 26526-33.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. *Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2*. Nature. 2000; 404: 298-302.

Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, y col. *Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 7455–60.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, y col. *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. Nat Genet. 2009; 41: 178–86.

Jacox E, Gotea V, Ovcharenko I, Elnitski L. *Tissue-specific and ubiquitous expression patterns from alternative promoters of human genes*. PLoS One 2010; 5: e12274.

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, y col. *Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays*. Science. 2003; 302: 2141–4.

Kanamori K, Ross BD. *In vivo activity of glutaminase in the brain of hyperammonaemic rats measured by 15N nuclear magnetic resonance*. Biochem J. 1995; 305: 329-36.

Kaneko T, Urade Y, Watanabe Y, Mizuno N. *Production, characterization, and immunohistochemical application of monoclonal antibodies to glutaminase purified from rat brain.* J Neurosci. 1987; 7: 302-9.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, y col. *Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes*. Genome Res. 2008; 16: 55–65.

Kong SE, Hall JC, Cooper D, McCauley RD. *Glutamine-enriched parenteral nutrition regulates the activity and expression of intestinal glutaminase.* Biochim Biophys Acta. 2000; 1475: 67-75.

Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. *Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95*. Science. 1995; 269: 1737-40.

Koscielny G, Le Texier V, Gopalakrishnan C, Kumanduri V, Riethoven J-J. *ASTD: the alternative splicing and transcript diversity database*. Genomics 2009; 93: 213–220.

Kovacevic Z, McGivan JD. *Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance*. Physiol Rev. 1983; 63: 547-605.

Kozak M. *The scannning model for translation: An update*. J Cell Biol. 1989; 108: 229–241.

Krebs HA. *Metabolism of amino acids IV. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymatic hydrolisis of glutamine in animal tissues.* Biochem. J. 1935; 29: 1951-1969.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Kvamme E. *Enzymes of cerebral glutamine metabolism*. En: *Glutamine metabolism in mammalian tissues*. Häussinger D, Sies H (Eds.). Berlin: Springer Verlag; 1984. p. 32-48.

Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. *Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain*. Neurochem Res. 2000; 25: 1407-19.

Kvamme E, Tveit B, Svenneby G. *Glutaminase from pig renal cortex. I. Purification and general properties.* J Biol Chem. 1970; 245: 1871-7.

Laake JH, Slyngstad TA, Haug FM, Ottersen OP. *Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures.* J Neurochem. 1995; 65: 871-81.

Lander ES. *The Heroes of CRISPR*. Cell. 2016; 164: 18-28.

Landry J-R, Mager DL, Wilhelm BT. *Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes*. Trends Genet. 2003; 19: 640–8.

Laterza OF, Hansen WR, Taylor L, Curthoys NP. *Identification of an mRNA-binding protein and the specific elements that may mediate the pH-responsive induction of renal glutaminase mRNA.* J Biol Chem. 1997; 272: 224818.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Lee JY, Yeh I, Park JY, Tian B. *PolyA_DB 2: mRNA polyadenylation sites in vertebrate genes*. Nucleic Acids Res. 2007; 35: D165–D168.

Lemckert FA, Sedgwick JD, Körner H. Gene targeting in C57BL/6 ES cells. Successful germ line transmission using recipient BALB/c blastocysts developmentally matured in vitro. Nucleic Acids Res. 1997; 25: 917-8.

Lewis BP, Green RE, Brenner SE. *Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 189–92.

Márquez J, López de la Oliva AR, Matés JM, Segura JA, Alonso FJ. *Glutaminase: A multifaceted protein not only involved in generating glutamate*. Neurochem Int. 2006; 48: 465–71.

Márquez J, Martín-Rufián M, Segura JA, Matés JM, Campos-Sandoval JA, y col. *Brain glutaminases*. BioMol Concepts. 2010; 1: 3–15.

Márquez J, Matés JM, Alonso FJ, Martín-Rufián M, Lobo C, Campos-Sandoval JA. *Canceromics studies unravel tumor's glutamine addiction after metabolic reprogramming*. Tumor Cell Metabolism: Patways, Regulation and Biology. 2015; 257-286.

Márquez J, Matés JM, Campos-Sandoval JA. *Glutaminases.* En Advances in Neurobiology. *The Glutamate/GABA/Glutamine Cycle: Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis*. Sonnewald U, Schousboe, A (Eds.). Viena: Springer Verlag; (en prensa).

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Márquez J, Tosina M, de la Rosa V, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Campos-Sandoval JA. *New insights into brain glutaminases: beyond their role on glutamatergic transmission.* Neurochem Int. 2009; 55: 64-70.

Martín-Rufián M, Nascimento-Gomes R, Higuero A, Crisma AR, Campos-Sandoval JA, Gómez-García MC, Cardona C, Cheng T, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Szeliga M, Albrecht J, Curi R, Márquez J, Colquhoun A, Deberardinis RJ, Matés JM. *Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells.* J Mol Med. 2014; 92: 277-90.

Masson J, Darmon M, Conjard A, Chuhma N, Ropert N, Thoby-Brisson M, Foutz AS, Parrot S, Miller GM, Jorisch R, Polan J, Hamon M, Hen R, Rayport S. *Mice lacking brain/kidney phosphate-activated glutaminase have impaired glutamatergic synaptictransmission, altered breathing, disorganized goal-directed behavior and dieshortly after birth.* J Neurosci. 2006; 26: 4660-71.

Matés JM, Pérez- Gómez C, Núñez de Castro I, Asenjo M, Márquez J. *Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death*. Int J Biochem Cell Biol. 2002; 34: 439-58.

Matsuno T, Goto I. *Glutaminase and glutamine synthetase activities in human cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma*. Cancer Res. 1992; 52: 1192-4.

McKeehan WL. *Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation*. Cell Biol Int Rep. 1982; 6: 635-50.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Márquez J, Rodríguez Quesada A, Núñez de Castro I. *Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth*. Mol Cell Biochem. 1992; 113:1-15.

Meertens LM, Miyata KS, Cechetto JD, Rachubinski RA, Capone JP. *A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARalpha.* EMBO J. 1998; 17: 6972-8.

Mock B, Kozak C, Seldin MF, Ruff N, D'Hoostelaere L, Szpirer C, Levan G,Seuanez H, O'Brien S, Banner C. *A glutaminase (gis) gene maps to mouse chromosome1, rat chromosome 9, and human chromosome 2.* Genomics. 1989; 5: 291-7. Erratum in: Genomics 1989; 5: 957.

Moreadith RW, Lehninger AL. *The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)+-dependent malic enzyme.*J Biol Chem. 1984; 259: 6215-21.

Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H,Nomura N, Ohara O. *Prediction of the coding sequences of unidentified humangenes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which codefor large proteins in vitro.* DNA Res. 1998; 5: 277-86.

Nagy, Andras; *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003 .

Nicklas WJ, Zeevalk G, Hyndman A. *Interactions between neurons and glia in glutamate/glutamine compartmentation.* Biochem Soc Trans. 1987; 15: 208-10.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Nimmo GA, Tipton KF. *Purification of soluble glutaminase from pig brain*. Biochem Pharmacol. 1980; 29: 359-67.

Nurjhan N, Bucci A, Perriello G, Stumvoll M, Dailey G, Bier DM, Toft I, Jenssen TG, Gerich JE. *Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man.* J Clin Invest. 1995; 95: 272-7.

Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Márquez J. *The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins*. FEBS Lett. 2001; 488: 116-22.

Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC. *Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain*. J Biol Chem. 2002; 277: 38939-44.

Patel, M., McGivan, J.D. *Partial purification and properties of rat liver glutaminase*. Biochem. J. 1984; 220: 583-590.

Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sánchez P, González ME, Márquez J, Matés JM. *Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells*. Biochem J. 2005; 386: 535-542.

Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, y col. *Genomic organization and transcriptional analysis of the human L-glutaminase gene*. Biochem J. 2003; 370: 771–84.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. *Deep surveying of altenative complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing*. Nat Genet. 2008; 40: 1413–1415.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nature Methods. 2011; 8: 785–6.

Porter LD, Ibrahim H, Taylor L, Curthoys NP. *Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene*. Physiol Genomics. 2002; 9: 157-66.

Poser I, Sarov M, Hutchins JR, Hériché JK, Toyoda Y, Pozniakovsky A, Weigl D, Nitzsche A, Hegemann B, Bird AW, Pelletier L, Kittler R, Hua S, Naumann R, Augsburg M, Sykora MM, Hofemeister H, Zhang Y, Nasmyth K, White KP, Dietzel S, Mechtler K, Durbin R, Stewart AF, Peters JM, Buchholz F, Hyman AA. *BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals.* Nat Methods. 2008; 5: 409-15.

Quesada, A. R., Medina, M.A., Márquez, J., Sánchez-Jiménez, F., Núñez de Castro, I. *Contribution by host tissues to circulating glutamine in mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells*. Cancer Res. 1988; 48: 1551-1553.

Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. *The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications.* Biochimie. 2015; 117: 119-28.

Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer *GPAhumanBcellmethylomeat100-basepairresolution* Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106: 671–8.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Ringwald M, Iyer V, Mason JC, Stone KR, Tadepally HD, Kadin JA, Bult CJ, Eppig JT, Oakley DJ, Briois S, Stupka E, Maselli V, Smedley D, Liu S, Hansen J, Baldock R, Hicks GG, Skarnes WC. *The IKMC web portal: a central point of entry to data and resources from the International Knockout Mouse Consortium*. Nucleic Acids Res. 2011; 39: D849-55.

Robinson MM, McBryant SJ, Tsukamoto T, Rojas C, Ferraris DV, Hamilton SK, Hansen JC, Curthoys NP. *Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES).* Biochem J. 2007; 406: 407-14.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Concentration of DNA solution. In: Nolan, C, eds. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. C1 p.

Sanders MM, Kon C. *Glutamine and glutamate metabolism in normal and heat shock conditions in Drosophila Kc cells: conditions supporting glutamine synthesis maximize heat shock polypeptide expression.* J Cell Physiol. 1992; 150: 620-31.

Sarantos P, Abouhamze A, Abcouwer S, Chakrabarti R, Copeland EM, Souba WW. *Cytokines decrease glutaminase expression in human fibroblasts.* Surgery. 1994; 116: 276-83; discussion 283-4.

Sarantos P, Ockert K, Souba WW. *Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression.* Arch Surg. 1993; 128: 920-4.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Sarantos P, Abouhamze A, Souba WW. *Glucocorticoids regulate intestinalglutaminase expression.* Surgery. 1992; 112: 278-83.

Segura, J.A., Aledo, J.C., Gómez-Biedna, S., Núñez de Castro, I., Márquez, J. *Tumor glutaminase purification*. Protein Expr Purif. 1995; 6: 343-351.

Shapiro RA, Farrell L, Srinivasan M, Curthoys NP. *Isolation, characterization and in vitro expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase*. J. Biol Chem. 1991; 266: 18792-18796.

Shen J. *13C magnetic resonance spectroscopy studies of alterations in glutamate neurotransmission.* Biol Psychiatry. 2006; 59: 883-7.

Shen J, Rothman DL, Behar KL, Xu S. *Determination of the glutamate-glutamine cycling flux using two-compartment dynamic metabolic modeling is sensitive to astroglial dilution.* J Cereb Blood Flow Metab. 2009; 29: 108-18.

Schousboe A. *Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission.* Neurochem Res. 2003; 28: 347-52.

Shuman S. *Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro*. J Biol Chem. 1991; 266: 20576-7.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Shuman S. *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.* J Biol Chem. 1994; 269: 32678-84.

Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, deJong PJ, Stewart AF, Bradley A. *A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function*. Nature. 2011; 474: 337-42.

Smith, M., Watford, M. *Rat hepatic glutaminase: purification and immunochemical characterization. Arch. Biochem*. Biophys. 1988; 260: 740-751.

Smith EM, Watford M. *Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase. Sequence similarity to kidney-type glutaminase.* J Biol Chem. 1990; 265: 10631-6.

Souba WW. *Glutamine and cancer*. Ann Surg. 1993; 218: 715-28.

Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, y col. *Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 7461–6.

Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E. *Purification of phosphate-dependent pig brain glutaminase.* J Neurochem. 1973; 20: 1217-24.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Szeliga M, Obara-Michlewska M. *Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases.* Neurochem Int. 2009; 55: 71-5.

Tang A, Curthoys NP. *Identification of zeta-crystallin/NADPH:quinone reductase as a renal glutaminase mRNA pH response element-binding protein*. J Biol Chem. 2001; 276: 21375-80.

Tress ML, Martelli PL, Frankish A, Reeves GA, Wesselink JJ, y col. *The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 5495–500.

Turner A, McGivan JD. *Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas*. Biochem J. 2003; 370: 403-408.

Vousden KH. *Alternative fuel: another role for p53 in the regulation of metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 7117–8.

Waagepetersen HS, Qu H, Sonnewald U, Shimamoto K, Schousboe A. *Role of glutamine and neuronal glutamate uptake in glutamate homeostasis and synthesis during vesicular release in cultured glutamatergic neurons.* Neurochem Int. 2005; 47: 92-102.

Wang GS, Cooper TA. *Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery*. Nat Rev Genet 2007; 8: 749–61.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Watford M. *Hepatic glutaminase expression: relationship to kidney-type glutaminase and to the urea cycle*. FASEB J. 1993; 7: 1468-74.

Watford M, Vincent N, Zhan Z, Fannelli J, Kowalski T, Kovacevic Z. *Transcriptional control of rat hepatic glutaminase expression by dietary protein level and starvation.* J Nutr. 1994; 124: 493-9.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, y col. *Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction.* Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 18782-7.

Yamashita R, Suzuki Y, Sugano S, Nakai K. *Genome-wide analysis reveals strong correlation between CpG islands with nearby transcription start sites of genes and their tissue specificity*. Gene. 2005; 350: 129–36.

Young RA, Hagenbüchle O, Schibler U. *A single mouse alpha-amylase gene specifies two different tissue-specific mRNAs*. Cell. 1981; 23: 451–8.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA