

2011 Octubre, 2(3): 1-1

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN CONDICIONAL DEL GEN RHBDD2 PARA SU SOBREENPRESIÓN EN UN RATÓN TRANSGÉNICO

E Lacunza^{1,2,3}, MC Abba^{1,3}, CM Aldaz²

1 CINIBA, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

2 The University of Texas MD Anderson Cancer Center. Science Park, Department of Molecular Carcinogenesis.

3 Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

E-mail: ezequiellacunza@hotmail.com

Introducción

En estudios previos hemos identificado al gen *RHBDD2* sobreexpresado en carcinomas invasores de mama. Hasta el momento se desconoce el rol funcional de dicha alteración aunque existen evidencias de que podría determinar un fenotipo favorable para las células tumorales.

A fin de analizar *in vivo* las consecuencias biológicas de la sobreexpresión del gen *RHBDD2*, se llevó a cabo la construcción de un sistema de expresión condicional, para su inyección en células madres embrionarias de ratón. Este modelo permitirá inducir la sobreexpresión de *RHBDD2* de manera temporal y tejido específica.

Objetivos

Desarrollar un sistema de sobreexpresión del gen *RHBDD2* *in vivo*.

Materiales y Métodos

La secuencia codificante del gen *RHBDD2* se obtuvo mediante la técnica de PCR a partir del plásmido poTB7 que contiene al ADNc total de *RHBDD2*. Para ello se diseñaron cebadores, flanqueantes de la región ORF, en cuyos extremos 5' se adicionaron los sitios de restricción de las enzimas *Sall* y *BamHI*. Se empleó la enzima *T4* ligasa para clonar el inserto, el cual contiene el ADNc de *RHBDD2*, en el vector de transporte *RFNLI*, previamente cortado con las enzimas *Sall* y *BamHI*. El plásmido resultante fue verificado mediante secuenciación directa, aislado y purificado por el método de Midiprep. Se lo incubó con las enzimas *KpnI* y *NheI* para obtener un nuevo inserto con regiones homólogas al Vector de Base Rosa26. El Vector de Base Rosa26, el cual contiene un promotor *CAGGS* y un cassette *lox-STOP-lox* fue transformado por electroporación en las células SW102 de *E coli*, previamente tratadas para hacerlas electrocompetentes. Las células con el Vector de Base en su interior fueron transformadas por electroporación con el nuevo inserto proveniente del plásmido *RFNL*. Se plaqueó luego con los antibióticos de selección ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina y se incubó a 32° 48hs. Se verificaron las colonias recombinantes, se amplificaron y se aisló y purificó al plásmido recombinado.

Resultados

Mediante la tecnología de clonación y recombinación génica se clonó al cDNA del gen *RHBDD2* en el plásmido de transporte *RFNLI*, el cual fue verificado por secuenciación directa. Se obtuvo luego el inserto recombinante para clonar en el vector de Base Rosa 26. Finalmente, se obtuvo al plásmido recombinado, que contiene al sistema *CreLoxP* y al gen *RHBDD2*, constituyendo un constructo de expresión condicional.

Conclusiones

Como etapa previa y fundamental en la obtención de un ratón transgénico que exprese de manera condicional al gen *RHBDD2*, se desarrolló un constructo que contiene al gen, precedido por el cassette *lox-STOP-lox* y el promotor *CAGGS*. Este sistema de sobreexpresión condicional permitirá, en una siguiente etapa, simular el rol biológico de *RHBDD2* en la glándula mamaria del ratón *in vivo*.