

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03062
12
?ej.

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL C.C.H. PROYECTO ACADEMICO DE LICENCIATURA, MAESTRIA Y DOCTORADO
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTRATEGIAS PARA EL AISLAMIENTO DEL ADNc DE LA PIROGLUTAMATO
AMINOPEPTIDASA MEMBRANAL (PGA II)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA
EL BIOLOGO

MANUEL SALVADOR RODRIGUEZ MEDINA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE	1
ABREVIATURAS	2
PRESENTACION	3
I .-INTRODUCCION	4
II .-COMUNICACION CELULAR	5
A) TIPOS DE COMUNICACION	5
B) ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA COMUNICACION QUIMICA	7
C) PEPTIDOS Y COMUNICACION CELULAR	9
D) METABOLISMO DE PEPTIDOS	9
III .-PEPTIDASAS	12
A) ENZIMAS MEMBRANALES	13
B) PROCESAMIENTO DE ENZIMAS MEMBRANALES	15
C) NEUROPEPTIDASAS	19
IV .-LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)	21
A) METABOLISMO DEL TRH	22
B) LA PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA MEMBRANAL (PGA II)	24
V .-OBJETIVOS	27
VI .-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
VII .-MATERIALES Y METODOS	30
VIII.-RESULTADOS	51
IX .-DISCUSION Y CONCLUSIONES	62
X .-REFERENCIAS	65

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACTH	Hormona Adenocorticotrópica
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario al ARN
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARN poly A	Acido ribonucleico poly Adenilado
CaM	Calmodulina
CRF	Factor liberador de Corticotropina
FMRF-amida	Péptido compuesto por Fenilalanina, Metionina, Arginina, Fenilalanina-amida.
GMPc	Guanosin monofosfato ciclico
GTP	Trifosfato de Guanosina
IP ₃	Inositol trifosfato
LHRH	Hormona liberadora de la Hormona Luteinizante
N-CAM	Molécula de adhesión celular
NPV	Nucleo Paraventricular
PE	Proliendopeptidasa
PGA I	Piroglutamato aminopeptidasa soluble
PK	Protein cinasa
PGA II	Piroglutamato aminopeptidasa membranar
POMC	Proopiomelanocortina
PRL	Prolactina
RE	Reticulo Endoplásmico
RER	Reticulo Endoplásmico Rugoso
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SRP	Partícula de reconocimiento del péptido señal
TnC	Troponina C.
TSH	Tirotropina
TRH	Hormona Liberadora de Tirotropina.
VIP	Péptido Vasoactivo Intestinal

PRESENTACION

El desarrollo de las técnicas de Ingeniería Genética ha permitido al hombre alcanzar un alto avance tecno-científico que utiliza para mejorar sus condiciones de vida. Muchos procesos fisiológicos son conocidos actualmente a nivel molecular; su aplicación médica mediata o inmediata no se ha hecho esperar.

En procesos de comunicación celular, conocemos ahora aspectos moleculares de las moléculas comunicadoras, de las receptoras y de las transductoras de las señales, en un sin número de casos. Esto ha permitido comprender múltiples aspectos de la regulación de procesos y deducir a través de modelos experimentales, alteraciones patológicas que se suscitan en determinados padecimientos.

En este trabajo se presenta la estrategia y los avances alcanzados para la clonación del ADMc de la enzima Piroglutamato aminopeptidasa membranal (PGA II), que degrada específicamente a la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH). Dicha hormona, es un tripéptido que juega un papel importante en el eje Hipotálamo-hipofisio-tiroideo, propiciando la liberación de Tirotropina (TSH) y Prolactina (PRL) de los tirotrópos y lactotrópos respectivamente. Este objetivo forma parte de un proyecto que estudia los mecanismos involucrados en la regulación a distintos niveles de la expresión de la neurona peptidérgica.

La base teórica de este trabajo considera conocimientos elementales de comunicación celular y el papel de los péptidos en la comunicación, posteriormente se proporcionan aspectos generales de las peptidasas membranales y su procesamiento, finalmente se provee información de la TRH y su metabolismo, así como los conocimientos más recientes sobre la PGA II. El trabajo termina con la presentación de la estrategia y los avances obtenidos en la clonación de la enzima, su discusión y conclusiones.

I.-INTRODUCCION

Para que ocurra el funcionamiento integral de un organismo, es indispensable la comunicación entre sus órganos, tejidos y células. La naturaleza de las señales que intervienen en dicha comunicación, es muy diversa; comprende lípidos, nucleótidos, polisacáridos, péptidos, proteínas y casi todas las combinaciones entre estas moléculas.

Los péptidos y proteínas participan activamente en la comunicación intra e intercelular. Numerosas moléculas de esta naturaleza funcionan como hormonas, regulando uno o más procesos fisiológicos. Sus funciones hormonales han sido ampliamente estudiadas en el sistema Endócrino y Neuroendócrino.

El avance de las técnicas de Ingeniería Genética ha permitido conocer a nivel molecular muchos procesos de comunicación y su regulación. Eventos importantes en la comunicación química son: la síntesis y liberación del mensaje, la recepción y transducción de éste hacia el interior de la célula y la generación de la respuesta celular, entre otros. Cuando una señal llega a su blanco, es importante la presencia de uno o varios mecanismos que permitan la eliminación o el retiro de la señal, por que, a menos que su acción sea requerida por un tiempo prolongado, la presencia de dicha molécula provocaría alteraciones en el funcionamiento celular.

Hasta la fecha, la Piroglutamato Aminopeptidasa Membranal (PGA II) constituye el único mecanismo de degradación de la Hormona Liberadora de Tirotropina, tripéptido ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC), que participa en el eje Hipotalamo-Hipofisario, estimulando la liberación de Tirotropina (TSH) y Prolactina (PRL). Diversos estudios han permitido deducir, además de la importancia de la PGA II en la degradación de la TRH, la regulación de su actividad enzimática durante algunos eventos fisiológicos.

El estudio de varios aspectos de la enzima como, su lugar de síntesis, sitios de unión a cofactores, sitio activo y regulación de su síntesis en distintos procesos, permitirá comprender mejor el papel de la PGA II en la regulación de la actividad de la TRH.

II.-COMUNICACION CELULAR

Las células en los organismos multicelulares necesitan comunicarse para poder regular su desarrollo y organización dentro de tejidos, para controlar su crecimiento y división, y para coordinar sus funciones. La coordinación de las funciones celulares, le permite al organismo mantener un control interno (homeostásis).

La comunicación química, se establece entre dos células gracias a moléculas mensajeras que viajan desde la célula generadora del mensaje hasta la célula receptora de éste (1). No todas las células son capaces de decodificar todos los mensajes; para que esto sea posible, necesitan tener moléculas receptoras específicas.

Cuando un mensaje llega a una célula, se transduce al interior, a través del receptor, via segundos mensajeros. Este segundo mensaje propiciará una respuesta celular mediata ó inmediata, dependiendo de la naturaleza del mensaje y del tipo celular.

A) TIPOS DE COMUNICACION

Podemos dividir a la comunicación celular en tres tipos: 1) la que se establece cuando un mensaje químico es enviado de una célula a otra célula o grupo de ellas; 2) la que se lleva a cabo a través de contacto celular directo; y 3) la que se establece por medio de uniones comunicantes (2) (FIG. 1 A).

De acuerdo a la distancia que recorre el mensaje químico, podemos dividir a la comunicación intercelular en tres tipos: 1) la comunicación endócrina, en la cual el mensaje es generado por una glándula y liberado a la circulación para su arribo a la célula blanco localizada a distancia; 2) la comunicación parácrina, en donde el mensaje es liberado localmente, actuando solo en células contiguas; y 3) la comunicación autócrina, en donde la molécula liberada actúa sobre la célula que la liberó (FIG. 1 B).

En la comunicación que se lleva a cabo a través de contacto celular directo, el mensaje que se encuentra sobre la superficie celular, es recibido por una molécula receptora que se encuentra en la célula con la que se establece la comunicación. Este tipo de comunicación es particularmente importante durante la activación de linfocitos T por antígenos que se encuentran en la superficie celular (3).

La comunicación que se establece por medio de uniones comunicantes se caracteriza por que el mensaje pasa de una célula a otra vecina a través de poros que atraviezan las membranas citoplásmicas de ambas células, manteniéndolas en comunicación. Este tipo de comunicación lo encontramos cuando se transmite un impulso eléctrico entre dos células nerviosas (sinápsis eléctrica) y en células epiteliales (4).

Dado el enfoque de este trabajo, analizaremos a fondo, solo la comunicación mediada por mensajeros químicos.

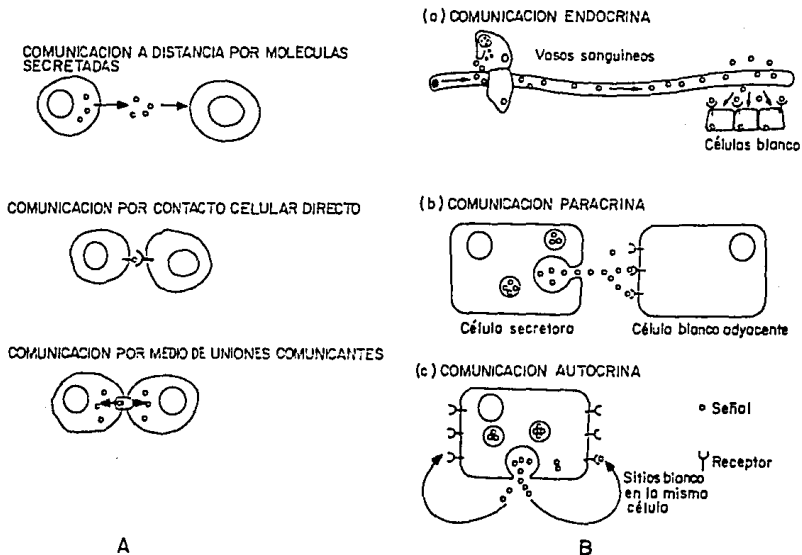


FIGURA 1.- TIPOS DE COMUNICACION CELULAR.- A) esquema de los tres tipos de comunicación entre células. B) tipos de comunicación química. Ver texto.

B).-ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA COMUNICACION QUIMICA

Las moléculas que participan en la comunicación química son: la molécula mensajera, la molécula receptora, las moléculas transductoras y amplificadoras del mensaje y el segundo mensajero generado (1, 2). A continuación son citados algunos ejemplos de estas moléculas.

La naturaleza de la molécula mensajera es variada, puede ser lipídica como los esteroides y las hormonas tiroideas, protéica como la insulina y la hormona de crecimiento ó peptídica como la oxitocina y la vasopresina (5).

Las moléculas receptoras ó simplemente receptor, son de naturaleza protéica en esencia, aunque algunos tienen modificaciones como glicosilaciones ó sulfataciones. Su función se especializa en el reconocimiento de mensajes que posteriormente son transducidos al interior celular (1, 2). Podemos clasificar a los receptores por la forma como transducen la señal: receptores acoplados a proteínas G (e.g. receptor β -adrenérgico. 6, 7), receptores acoplados a canales iónicos (e.g. receptores de acetilcolina y GABA₂. 8, 9) y receptores con actividad de cinasa (e.g. receptor para insulina. 10).

La transducción de la señal se lleva a cabo, a través de la generación de un segundo mensaje (FIG. 2), que es amplificado en el interior de la célula y que genera en ella una respuesta a corto, mediano y largo plazo dependiendo del tipo de mensaje. Dentro de los segundos mensajeros encontramos a los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc. 11), fosfoinosítidos (IP₃. 12) y el calcio (13) (FIG. 2).

Una señal transducida involucra en algunos casos (14) la activación de protein-cinasas (PK), las cuales además de amplificar la señal, constituyen un punto más de regulación. Podemos clasificar a las cinasas (FIG. 2), dependiendo del segundo mensajero que las activa: las dependientes de APMc (PK A) (15), de calcio-calmodulina (14), de diacilglicerol (PK C) y de GMPc (PK G)(16). Además de estas PKs, existen otras que no dependen de segundos mensajeros como las tirosinocinasas (14).

La fosforilación es un evento que se presenta sobre aminoácidos específicos que comunmente son serina, treonina ó tirosina. Dicha fosforilación permitirá la realización de una actividad, la inhibirá ó simplemente la modificará. El evento contrario sucede cuando una fosfatasa elimina la fosforilación realizada por la cinasa (17).

Algunas señales generan respuesta a mediano ó largo plazo, cuando el efecto regulador se suelta sobre una proteína que afecta la transcripción de uno o varios genes; a estas proteínas se les conoce

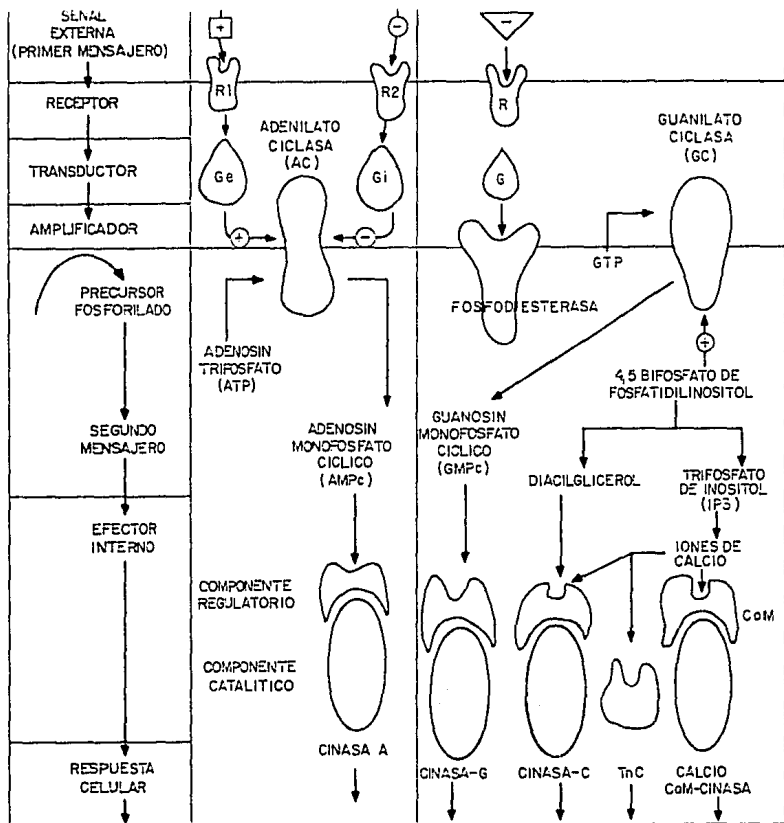


FIGURA 2.- MOLECULAS MEDIADORAS DE LA COMUNICACION CELULAR. Diagrama simplificado que muestra los principales elementos que participan en la transducción de señales en las que se afectan las vías del AMPc, GMPc y Fosfoinosítidos. CaM: Calmodulina, TnC: Troponina C.

como factores de transcripción. Dichos factores pueden ser activados via segundos mensajeros (18), primeros mensajeros (e.g. hormonas tiroideas, 19) o por proteincinasas (20).

Un factor de transcripción posee una región por donde es activado, otra por donde reconoce al ADN y otra por donde modifica la actividad transcripcional del gen. Algunos factores de transcripción son la familia fos y jun, c-myc, ras, receptor de hormonas tiroideas, etc.(19, 20). Algunos de ellos han recibido el nombre de terceros mensajeros, por que su activación depende de los segundos mensajeros.

De particular importancia resulta para este trabajo la comunicación que se lleva a cabo a través de péptidos, hecho por el cual nos centraremos a mencionar el papel de estas moléculas en la comunicación.

C) PEPTIDOS Y COMUNICACION CELULAR

Comúnmente se le llaman péptidos a pequeñas proteínas que constan de entre 2 y 50 residuos aminoacídicos unidos covalentemente entre sí por enlaces peptídicos. Existen un gran número de péptidos difundidos en la naturaleza; algunos de ellos tienen otras moléculas en su estructura además de los aminoácidos ó bien estos se encuentran modificados (acetilados, sulfatados, etc.); sin embargo, la estructura tridimensional y muchas de las propiedades biológicas están determinadas por las clases de aminoácidos presentes, el orden en el que están dispuestos en una cadena peptídica y la relación espacial de un aminoácido con otro (22).

Dentro de todas las funciones que realizan los péptidos, destaca su papel como intermediarios en la comunicación celular. Numerosos péptidos funcionan como hormonas, regulando uno ó más procesos fisiológicos (23). Las funciones hormonales de péptidos han sido mejor caracterizadas para aquellos secretados en el sistema neuroendócrino; algunos ejemplos de estos péptidos aparecen en la TABLA 1.

D) METABOLISMO DE PEPTIDOS

La mayoría de los péptidos biológicamente activos son sintetizados vía ribosomal a través de un precursor de alto peso molecular. Muchos precursores peptídicos han sido caracterizados, dentro de los cuales podemos citar al precursor del glucagon, la somatostatina, la gastrina, la neurofisiña

PEPTIDO	NO.DE AA	FUNCIONES MEJOR CARACTERIZADAS
TRH	3	Estimula la liberación de TSH en Hipófisis.
FMRF-amida	4	Efecto cardioregulator.
Encefalinas	5	Regula actividad neurotransmisora en SNC.
Oxitocina	9	Aumenta la contracción del músculo liso durante el parto y la evacuación de leche durante la lactancia.
Vasopresina	9	Constricción de vasos sanguíneos que aumentan la presión sanguínea.
LHRH	10	Estimula la liberación de LH y FSH de la Pituitaria.
Gastrina	17	Estimula la secreción de HCl en el estómago.
Secretina	27	Estimula el flujo de secreción pancreática
VIP	28	Estimula el flujo de secreción pancreática y regula actividad neurotransmisora en el SN.
Glucagon	29	Estimula la ruptura de glucógeno y eleva los niveles de glucosa en sangre.
Calcitonina	32	Inhibe la reabsorción de calcio en los huesos, disminuyendo el nivel de este ion en la sangre.
ACTH	39	Estimula la producción de hormonas suprarrenales.
CRF	41	Estimula la producción de ACTH de pituitaria.

TABLA 1.- Algunos péptidos que participan en la comunicación celular y sus funciones mejor caracterizadas (23, 24).

y al de las encefalinas, entre otros (25).

Un gen que codifica para un péptido es transcrito por la ARN polimerasa II utilizando una cadena templado. Los nucleótidos se incorporan a la cadena nueva, propiciando su crecimiento en dirección 5'-3'. Cuando la transcripción termina, el híbrido se disocia; de esta manera se genera el transcrito primario. Antes de salir del núcleo, el ARN precursor sufre varias modificaciones; en el extremo 5' se le añade un residuo de 7 metilguanósina y se metilan los primeros nucleótidos formando el

casquete "cap" ; en el extremo 3' en respuesta a la señal de poliadenilación (AAUAAA), el precursor es cortado para la adición de varias Adeninas (poly A); finalmente se eliminan las secuencias interruptoras ó intrones por medio del proceso conocido con el nombre de "splicing".

El ARN maduro (ARN mensajero) es transportado al citoplasma y posteriormente traducido en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER, 26), generando un prepropéptido, el cual, a través de la secuencia señal (secuencia rica en aminoácidos hidrofóbicos localizada en el extremo aminoterminal) y en conjunción con la partícula de reconocimiento de la señal (SRP), forman un complejo que es reconocido por un receptor (proteína de anclaje) que se encuentra en el RER (27)(FIG. 3). Posteriormente el prepropéptido es translocado hacia el lumen del retículo en donde se elimina el péptido señal; el ahora propéptido puede sufrir aquí modificaciones postraduccionales que principalmente son glicosilaciones.

Mas tarde el propéptido pasa al aparato de golgi donde continúa su procesamiento. En este compartimento las glicosilaciones previas se ramifican y algunos aminoácidos son fosforilados, acetilados ó sulfatados. En el golgi ocurren también algunos pasos de proteólisis y la compartimentalización de los precursores en vesículas, junto con las enzimas proteolíticas y modificadoras necesarias para generar a los péptidos activos (28).

Un precursor peptídico puede contener uno (e.g. proglucagon) ó varios mensajes. En el segundo caso, el mensaje puede originar un solo tipo de péptido (e.g. proencefalinas) ó distintos péptidos (e.g. proopiomelanocortina). En todos los casos, para que se origine el péptido es necesario el corte proteolítico del precursor; dicho corte se realiza generalmente en donde hay un par de aminoácidos básicos (29).

Los péptidos ya procesados se mantienen en las vesículas, listos para ser liberados en respuesta a un estímulo. La liberación se realiza por un mecanismo de exocitosis que involucra la fusión de la membrana vesicular con la plasmática (30, 31).

Una vez que los péptidos liberados al espacio extracelular han ejercido su acción, son eliminados por difusión, internalización ó degradación enzimática. Se ha postulado que el mecanismo más importante para eliminar péptidos es la degradación a través de enzimas, específicamente por peptidasas (32, 33).

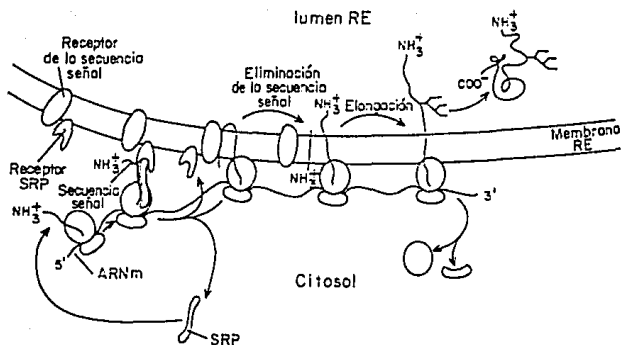


FIGURA 3.- TRANSLOCACION DE UNA PROTEINA DE SECRECION AL RER.

III.-PEPTIDASAS

La proposición de que la degradación de péptidos por peptidasas constituye el mecanismo principal de inactivación de péptidos, se debe a la labilidad de los péptidos a la hidrólisis enzimática (32, 33), a la rapidez con que ocurre el evento y a la posibilidad de regulación de la actividad de la enzima (34).

Las peptidasas se han encontrado en tres compartimentos distintos: fluidos extracelulares, citoplasma, ó membrana. Se han identificado diferentes tipos de enzimas que son capaces de degradar péptidos, de acuerdo a su localización, especificidad, etc, (35); actualmente se realizan estudios para determinar la relevancia fisiológica de los diferentes tipos de enzimas en la inactivación de los péptidos.

Las enzimas membranales (en particular las localizadas en la cara externa de la membrana plasmática) y las enzimas que se encuentran en los fluidos extracelulares son las enzimas importantes en la inactivación de péptidos liberados. De particular interés para este trabajo resultan las enzimas membranales, por lo que se presenta una revisión más profunda de ellas.

A).-ENZIMAS MEMBRANALES

Una enzima membranal puede localizarse espacialmente en la membrana en tres posiciones: periféricamente, unida a la membrana por interacciones no covalentes con otras proteínas; integralmente, unida a la membrana a través de uno o varios segmentos transmembranales y; anclada a la membrana covalentemente via una estructura lipídica (e.g. glicofosfatidil-inositol) (FIG. 4). Los grupos de enzimas que mejor se conocen son las enzimas integrales y las ancladas por fosfatidil-inositol (ver TABLA 2).

ENZIMA	ANCLAJE	PM (Kd)	LOCALIZACION
Fosfatasa Alcalina	PI	67	Tejidos Mamíferos
Acetilcolinesterasa	PI	67	Cerebro Drosófila
5'Nucleotidasa	PI	70	Tejidos Mamíferos
Fosfodiesterasa alcalina	PI	130	Tejidos Mamíferos
Dipeptidasa renal	PI	46	Riñón de Cerdo
Aminopeptidasa P	PI	91	Intestino de Rata
Sucrosa-Isomaltasa	I	140-120	Intestino de Rata
Endopeptidasa 24.11	I	90	Tejidos Mamíferos
Glucamilasa	I	125-135	Intestino de rata
Beta-Glucosidasa	I	160-160	Intestino de Cerdo
Dipeptidil-Peptidasa IV	I	130	Riñón de Rata
Aminopeptidasa N	I	160	Intestino de Rata
Aminopeptidasa A	I	170	Intestino de rata
ACE	I	170	Neuroepitelio
PK (Indep. AMPc)	P	?	Células en cultivo

Tabla 2.-Diferentes tipos de anclaje de Enzimas membranales. PI (fosfatidil-inositol), I (Integrales), P (periféricas), ACE (Enzima Convertidora de Angiotensina), PK (Protein cinasa). Se indica el peso molecular en kilodaltones de las enzimas, así como el peso de los monómeros en los dímeros (36, 37, 38).

Otro aspecto que es importante considerar en la localización de una enzima membranal, es la ubicación de su sitio activo. Bajo este criterio, las enzimas pueden estar ubicadas en la membrana en tres posiciones: con el sitio activo hacia el interior celular, hacia el interior de la membrana o hacia el exterior celular.

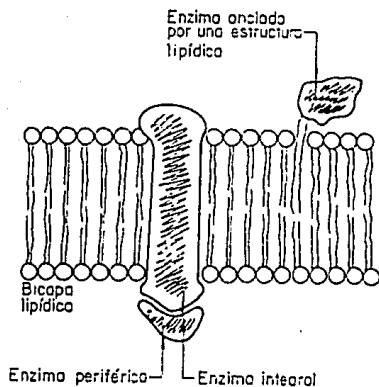


FIGURA 4.- LOCALIZACIÓN DE ENZIMAS MEMBRANALES. La figura muestra las posibilidades de localización de enzimas membranales.

Dada la ubicación del sustrato, el único tipo de enzima importante para la degradación de péptidos liberados es aquella cuyo sitio activo se localiza hacia fuera de la célula (39); a este tipo de enzima se le conoce como ectoenzima.

Las ectoenzimas pueden estar localizadas en la célula que secretó al péptido o en otra célula distinta, que puede ser la célula sobre la que el péptido ejerce su acción o una célula vecina (FIG. 5). En muchos casos se desconoce la localización celular exacta de una ectoenzima, sin embargo, empiezan a resolverse problemas de localización enzimática (39).

B).- PROCESAMIENTO DE ENZIMAS MEMBRANALES

Sin duda, el ensamble de membranas y organelos de una célula, con sus proteínas, lípidos y carbohidratos específicos es un evento extremadamente complejo; referirnos solo a proteínas no simplifica las cosas. Esta revisión presenta el mecanismo general de procesamiento de enzimas membranales y realiza solo los eventos que enriquecerán la discusión final.

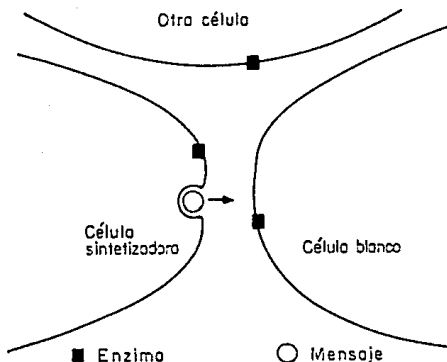


Figura 5.- LOCALIZACION DE ECTOENZIMAS. La figura ilustra los posibles lugares en donde puede estar localizada un ectoenzima.

Las ectoenzimas, así como otras proteínas de la membrana son sintetizadas via ribosomal (ver procesamiento de péptidos). Una vez en el RER, las proteínas son dirigidas al aparato de Golgi para posteriormente ser envesiculadas y enviadas hacia su destino correcto; es entonces cuando ocurre la fusión de la vesícula con la membrana plasmática y donde la proteína queda correctamente ubicada (FIG. 4).

¿Cuales son las formas posibles de encontrar a una enzima membranal? Existen 3 tipos de proteínas transmembranales que aparecen resumidas en la TABLA 2 y esquematizadas en la FIGURA 6, además de las proteínas periféricas y las ancladas a través de una estructura lipídica (FIG 4). Esto establece 5 posibilidades de encontrar a una enzima en la membrana (40, 41, 42).

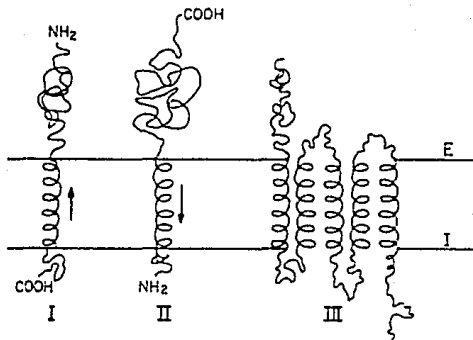


Figura 6.- TIPOS DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES. El esquema muestra los 3 posibles tipos de proteínas transmembranales. Ver TABLA 2. E-Exterior celular, I-Interior celular.

P.MEMBRANAL

CARACTERÍSTICAS Y EJEMPLOS

- | | |
|-----|--|
| I | Tienen un solo segmento transmembranal de residuos hidrofóbicos. Su amino está fuera y su carboxilo dentro. Ejemplos: Receptores a factores de crecimiento, receptores a hormonas peptídicas y moléculas de adhesión y reconocimiento célula-célula. |
| II | Tienen un solo segmento transmembranal de residuos hidrofóbicos. Su amino está dentro y su carboxilo fuera. Ejemplos: Receptor de transferrina y la subunidad beta de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ . |
| III | Posee varios segmentos transmembranales de residuos hidrofóbicos. Puede tener configuración amino afuera y carboxilo adentro ó viceversa. Ejemplos: receptores adrenérgicos y rodopsina. |

TABLA 2.-TIPOS DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANALES. Características y ejemplos de los diferentes tipos de proteínas transmembranales.

Existen señales en la proteína que le permiten ubicarse correctamente. Se ha propuesto la existencia de proteínas translocadoras (PT) en la membrana del RER (37), que reconocen aproximadamente 20 residuos aminoacídicos hidrofóbicos y no-iónicos, en distintas proporciones. Al ser translocados y de acuerdo a la naturaleza hidrofóbica de los residuos, éstos son ubicados en la membrana. El evento se repite sucesivamente hasta que la proteína completa haya sido translocada.

El modelo hipotético para la generación de proteínas ancladas por glicofosfatidilinositol (GPI) y con topología externa considera que el polipéptido es translocado completamente al lumen del RER. Una vez en este compartimento es eliminado el péptido señal y a través de un complejo enzimático, es removida una secuencia en el carboxilo terminal que permite la exposición de un nuevo extremo carboxilo, que se fusiona con una estructura de GPI previamente ensamblada (FIG. 7).

El procesamiento diferencial del ARNm, puede generar varias isoformas de proteínas membranales (43, 44, 45, 46, 47, 48, 49.). Dado que el objetivo de esta revisión no es agotar exhaustivamente el tema, se presentan solo algunos ejemplos que son ilustrativos.

Las N-CAM son proteínas que participan en la adhesión de célula a célula, varias isoformas de esta proteína son generadas por "splicing" alternativo del ARNm del gen N-CAM. Las isoformas varían en la longitud de su carboxilo terminal, lo que propicia diferentes formas de asociación a la membrana: una isoforma tiene un largo dominio intracelular; otra isoforma tiene un pequeño dominio intracelular; otra isoforma esta anclada via GPI y; dos isoformas diferentes entre sí son secretadas. El papel de las dos últimas no es claro (47).

La interleucina 4 (IL-4) estimula la proliferación de células B activadas, induce la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II), induce la secreción y expresión de Inmunoglobulinas G1 y E y la proliferación de linfocitos T durante la respuesta inmune. Sus actividades biológicas están mediadas por su receptor de alta afinidad. Se sabe que es posible encontrar al receptor bajo tres isoformas: una con dominio citoplásmico; otra sin dominio citoplásmico y una forma soluble. Se ha propuesto que la forma soluble del receptor, regula la actividad IL-4 al competir por la unión de esta molécula con con las formas membranales del receptor (46).

Otra posibilidad de generar diversas formas celulares de una proteína, puede ser debido al procesamiento postraduccional diferencial de dicha proteína. La proteína Qa-2 es una proteína similar

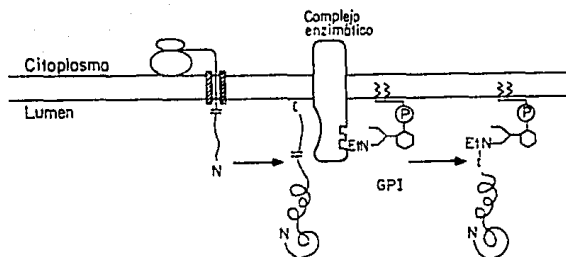


Figura 7.- PROCESAMIENTO EN RER DE PROTEINAS ANCLADAS POR GPI, CON TOPOLOGIA EXTERNA. La proteína translocada al lumen del RE es cortada en su extremo carboxilo para su unión con el GPI.

a antígenos de transplatación H-2, por lo que se ha sugerido la posibilidad de que tenga funciones relacionadas a dichos antígenos. Se ha descrito que el gen Q-7 genera dos formas de proteína Qa-2, una membranosa unida por fosfatidil inositol y una que se libera al espacio extracelular (43). En células derivadas de hígado se genera predominantemente la forma membranosa, mientras que en células transfectadas L, se genera solo la forma soluble (50). En estudios realizados en células T, se pudo observar que la activación de estas células inducía la reducción de la forma membranosa y al mismo tiempo se originaba un aumento de la forma soluble. Se ha propuesto que la forma liberada proviene de la forma membranosa, ya que es posible generar la primera, a través de fosfolipasa C específica para fosfatidil inositol (43); esto podría explicar en parte, la expresión tejido específica de una u otra forma membranosa (50).

Es necesario remarcar que para que una proteína membranosa sea ubicada de una u otra manera en la membrana ó incluso secretada, bastan algunos pequeños cambios en su secuencia, que

modifiquen la interpretación de la señal necesaria para enviarla al sitio destinado (45, 48). Ha sido posible incluso detectar, cambios en la ubicación de una proteína con la modificación de un solo aminoácido (50).

La forma como una proteína membranal se presente puede ser trascendental para la regulación de la actividad de la célula (46), tal como se aprecia en el ejemplo del receptor para IL-4. En el caso de las enzimas membranales sucede lo mismo; si una enzima, e.g. una peptidasa, no se encuentra ubicada correctamente, el efecto del péptido podría prolongarse y afectar el funcionamiento celular.

Las peptidasas han sido ampliamente estudiadas en el sistema neuroendócrino, debido al papel relevante que juegan en la degradación de péptidos que participan en la comunicación intercelular (51).

C).- NEUROPEPTIDASAS

La mayor parte de la información sobre neuropeptidasas proviene de estudios hechos con encefalinas, neurotensina, sustancia P, angiotensina y TRH (32).

Aunque en la sangre, el cerebro y otros tejidos de mamíferos se han identificado un gran número de peptidasas capaces de degradar *in vitro* a muchos neuropéptidos, es probable que un número relativamente limitado de ellas sea fisiológicamente importante (25). Cada una de las peptidasas es específica para determinados enlaces peptídicos y se ha demostrado que la mayoría de ellas tiene varios sustratos naturales y sintéticos *in vitro* (52, 53). Así, para cada neuropéptido existen varios enlaces que pueden ser hidrolizados por varias peptidasas. Los cortes de enlaces peptídicos pueden llevarse a cabo por enzimas solubles (presentes en el espacio extracelular ó en compartimentos intracelulares como el citosol, el lumen del RE, etc) ó por enzimas presentes sobre membranas celulares (plasmática, mitocondrial, etc).

Existen peptidasas que degradan péptidos a pH neutro, por lo que funcionan activamente en el citosol, mientras que en las vesículas de secreción donde el pH es ácido, su actividad es muy baja (54). Esto significa que la distribución subcelular de la actividad de estas enzimas no coincide con la de los neuropéptidos ya que solo alrededor de un 5% de la actividad total enzimática se localiza en el sinaptoplasma (55) mientras que la concentración del péptido en esta misma fracción es mayor del 50% del contenido total. Ejemplo de estas peptidasas es la aminopeptidasa soluble sensible a puromicina que hidroliza el enlace $\text{tir}^1\text{-gln}^2$ de las encefalinas ver FIG. 8 (54).

Existe la posibilidad de que las neuropeptidasas solubles participen en la degradación extracelular de péptidos si estas se liberaran al espacio sináptico junto con los neuropéptidos. Esto ya ha sido visto en la inactivación de neurotransmisores, tal es el caso de la acetilcolinesterasa de la glandula adrenal (56).

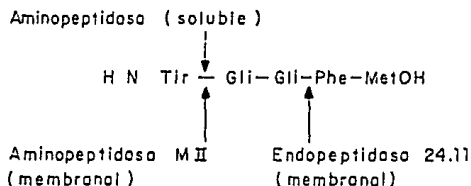


FIG. 8.- DEGRADACION ENZIMATICA DE LA Met-ENCEFALINA. Se muestran los lugares de corte de cada una de las enzimas que degradan a las encefalinas.

Evidencias actuales apuntan a algunas peptidasas asociadas a membranas como candidatos para la inactivación extracelular de los neuropéptidos. La aminopeptidasa MII y la endopeptidasa 24.11 (llamada anteriormente encefalinasa), pueden degradar e inactivar totalmente a las encefalinas (54, 57). Su distribución en el cerebro correlaciona, aunque no estrictamente con la distribución de las encefalinas y la de sus receptores (58, 59). Ambas enzimas se encuentran en la membrana plasmática de los sinaptosomas como ectoenzimas.

Por otra parte, se sabe que la endopeptidasa 24.11 actúa sobre distintos sustratos dependiendo de la región del cerebro en donde se encuentre, tal como ocurre, cuando actúa sobre sustancia P (60). Casi todas las neuropeptidasas degradan más de un solo sustrato, la excepción a esa generalización lo constituyen las piroglutamato aminopeptidasas capaces de degradar exclusivamente a la TRH, una de ellas se encuentra en suero (Tiroliberinas) y la otra en membranas sinaptosomales (PGA II) (61, 62).

Podemos resumir que los neuropéptidos pueden ser inactivados por un número limitado de péptidasas con grados variados de especificidad. Finalmente, lo que determina la acción de una peptidasa no es que sea específica para un determinado neuropéptido, sino más bien, que su localización celular y subcelular y sus propiedades catalíticas sean las apropiadas para actuar sobre éste.

IV.- LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA

La Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH) es un tripéptido de estructura pGlu-His-Pro-NH₂. Este se encuentra distribuido ampliamente en el SNC; en los mamíferos las más altas concentraciones de TRH se hallan en la eminencia media del hipotálamo (63); también se ha detectado en algunos núcleos hipotalámicos tales como el paraventricular, el dorsomedial y el supraquísmático, además de otras regiones cerebrales como bulbo olfatorio, núcleo acumbens, tallo cerebral, etc.(64).

La función o funciones desarrolladas por este péptido fueron estudiadas inicialmente en el hipotálamo de mamíferos (65, 66), en donde se encontró que participaba en el eje hipotálamo-hipofisario estimulando la liberación de tirotrópina (TSH) de los tirótrofos (67). Posteriormente fue sugerida su participación en la liberación de prolactina (PRL) de los lactótrofos, durante la lactancia y el ciclo estral (68).

La TRH liberada de la eminencia media del hipotálamo es vertida al sistema porta-hipotalámico-adenohipofisario, a través del cual alcanza la adenohipófisis, en donde interacciona con receptores de alta afinidad que se encuentran en la membrana plasmática de los tirótrofos. De esta forma se activa la vía del fosfatidil inositol (69), que provoca la liberación de TSH, la cual llega por medio de la circulación general, a la tiroides en donde estimula la secreción de las hormonas tiroideas (HT); la triiodotironina (T₃) y la tetraiodotironina (T₄), hormonas que afectan distintos procesos metabólicos. La T₄ ejerce a su vez un efecto retroalimentador negativo sobre la TRH y TSH (FIG. 9).

Recientemente se ha postulado que la TRH además de su papel como neurohormona funciona también como neuromodulador (70). Este hecho se ve apoyado en la amplia distribución del péptido en el SNC, su localización en las terminales nerviosas (que además responden a depolarización con alto potasio, liberando el péptido. 71, 72), y la presencia de receptores de alta afinidad en el cerebro (73). No obstante el papel neuromodulador de la TRH no es claro aún. Algunos de los efectos que

le atribuyen el papel de neuromodulador son el aumento del recambio de catecolaminas y la liberación de dopamina del hipotálamo y núcleo acumbens de rata (74, 75).

La TRH puede también ser una prohormona (76), debido a que el corte enzimático por una piroglutamato aminopeptidasa, genera un fragmento que posee actividad biológica: la Histidil-Prolina-Dicetopiperazina (His-Pro-DKP). Este metabolito resulta ser más efectivo que el mismo tripéptido en antagonizar la narcosis por etanol y elevar el GMPc cerebelar (76). Además posee una actividad de factor inhibidor de la prolactina y causa hipotermia, mientras que la TRH promueve los efectos contrarios.

La TRH también ha sido encontrada en el tracto gastrointestinal y en el páncreas de rata, específicamente en los islotes de Langerhans, en donde se ha postulado que el péptido puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad secretoria de estas células (76).

A).-METABOLISMO DE LA TRH

La TRH al igual que la mayoría de los péptidos caracterizados hasta el momento, es sintetizada vía ribosomal a través de un precursor de alto peso molecular y por lo tanto los pasos seguidos son los mismos descritos para el procesamiento de péptidos. El precursor de la TRH en la rata (77), tiene repetida la secuencia que codifica para este tripéptido 5 veces, las cuales se encuentran flanqueadas por los residuos dibásicos, que son los sitios de corte del precursor (78). Otros precursores de diferente tamaño y numeros de copias han sido identificados en otras especies (79, 80). La estructura del gen en la rata presenta 3 exones interrumpidos por dos intrones; en el primer exón se localiza la región 5' no traducida, el segundo exón contiene el péptido señal y una pequeña parte de la región amino terminal y en el tercer exón se localizan las 5 copias de la TRH, los péptidos intermedios y la región 3' no traducida. En la región regulatoria del gen se identificaron la caja TATA, una región que es reconocida por el factor de transcripción SP1, las secuencias reconocidas por los receptores de glucocorticoides y de hormonas tiroideas (81), así como la secuencia de control por ésteres de forbol (82).

La síntesis y el procesamiento del precursor de la TRH ocurre en el soma neuronal, el procesamiento continúa durante su trayecto a la terminal nerviosa (FIG. 9). Las modificaciones encontradas en la TRH madura son: la ciclización vía enzimática de la glutamina (83) para formar el

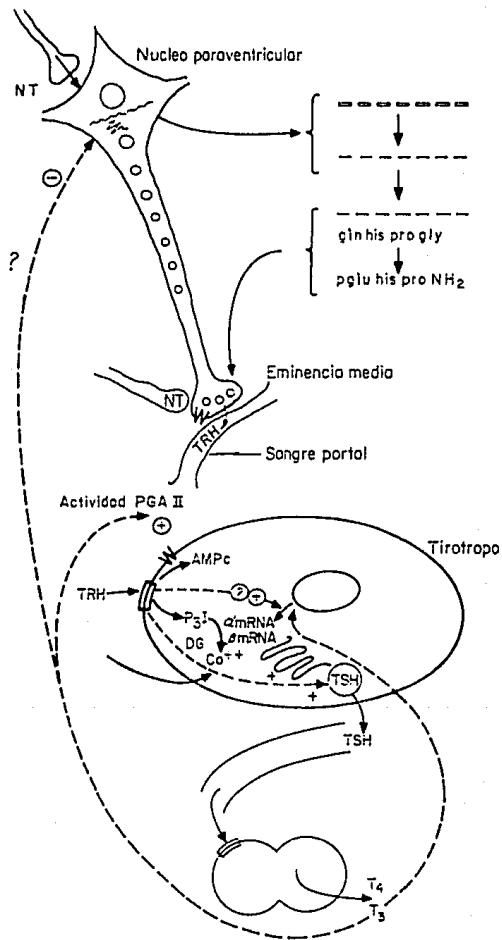


FIGURA 9.- METABOLISMO Y REGULACION DE LA TRH EN EL EJE NPV-ADENOHIPOFISIS-TIROIDEO

pGlu y la amidación de la prolina por medio de una enzima que oxida a la glicina, todavía presente en el extremo carboxilo terminal de la TRH, produciendo TRH y ácido glioxílico (84).

Una vez formada la TRH se almacena en las terminales nerviosas y se libera por un mecanismo dependiente de calcio, en respuesta a estímulos depolarizantes (71). El péptido liberado es reconocido por un receptor que se encuentra sobre la célula blanco.

La inactivación de sustancias activas una vez que han sido liberadas al espacio extracelular ocurre mediante internalización ó degradación. Para la TRH se ha encontrado que el mecanismo de recaptura no es el mecanismo responsable de la inactivación del péptido, dada su baja velocidad máxima (Vmax) (85).

La degradación de la TRH puede efectuarse in vitro por dos grupos de actividades diferentes: la eliminación del grupo piroglutamil del extremo amino ó la eliminación del amido del extremo carboxilo (FIG. 10). Para la primera actividad se han descrito tres enzimas: la piroglutamato aminopeptidasa membranal (PGA II) ; la enzima sérica tiroliberinasa que son metaloproteasas altamente específicas para TRH (86, 87) y; la enzima soluble piroglutamato aminopeptidasa I (PGA I) que es una tior proteasa que corta cualquier enlace pGlu-X (88). Para la segunda actividad existe una endopeptidasa soluble, la Prolil-endopeptidasa (PE), que corta después de prolina (89). Existen evidencias que indican que solo la Tiroliberinasa y la PGA II inactivan TRH, en suero y SCN respectivamente (90).

B).- LA PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA MEMBRANAL

La PGA II es una ectoenzima que ha sido localizada en la membrana plasmática de sinaptosomas (91, 92, 93). La PGA II es una metaloproteasa cuyos requerimientos son completamente diferentes a los de la PGA I (92).

La enzima ha sido detectada en el cerebro de varios mamíferos, siendo su actividad específica, ligeramente superior en cerebro de conejo (94). En el SNC de estas especies, la actividad enzimática está distribuida heterogeneamente, siendo mayor en bulbo olfatorio y corteza posterior (95). Otros tejidos donde ha sido encontrada actividad importante, es en la retina y médula espinal (96).

La ectoenzima es activa a pH neutro e inhibida por quelantes como la 1-10 fenantrolina (97). La enzima ha sido purificada a homogeneidad usando papaina ó tripsina para solubilizarla y se ha determinado un peso molecular de 230 Kd, peso muy semejante al de la tiroliberina (260 Kd) (92). Así mismo, se ha demostrado que en el sitio activo de la enzima hay residuos de tirosina, arginina e histidina, necesarios para la actividad catalítica (98).

La PGAII es altamente específica para hidrolizar TRH y no rompe el enlace pGlu-His de otros péptidos (97). Su Km para la TRH es de 40 micromolar, similar a la Km de la tiroliberina (50 micromolar). En general, sus propiedades son muy parecidas a las de la tiroliberina, por lo que se considera la posibilidad de que provengan de un mismo gen y que la generación de una forma membranar o una sérica sea debida a un procesamiento diferencial.

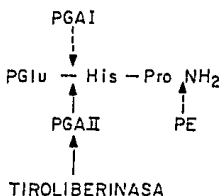


FIGURA 10.- VIA METABOLICA DE LA TRH. El esquema muestra los sitios de corte de las enzimas que degradan a la TRH.

La PGA II es una enzima que se encuentra a nivel celular, principalmente en neuronas (99). Sus propiedades y la localización regional, celular y subcelular de la PGA II hacen pensar en esta enzima como un fuerte candidato para inactivar extracelularmente a la TRH en el SNC; la evidencia más clara de esto, es que en ensayos *in vitro* con rebanadas de hipotálamo de rata, es posible recuperar una mayor cantidad de TRH liberado en presencia de un inhibidor específico de la enzima (100).

La regulación de la actividad de la PGA II es tejido específica (ocurre únicamente en adenohipofisis. 34, 101); se observan cambios en la actividad específica de la enzima en la adenohipofisis según el estado tiroideo del animal: en animales hipertiroideos se incrementa la actividad específica, mientras que en animales hipotiroideos disminuye. Aunque este comportamiento

se había descrito para la tiroliberina (102), no podemos pasar por alto que la regulación de la actividad de esta enzima, sugiere su relevancia en el control de la actividad de la TRH en distintas condiciones fisiológicas.

Trabajos realizados en una línea celular de retinoblastoma humano (Y-79) y utilizando un anticuerpo policlonal contra la PGA II de conejo, han sugerido que la actividad de la PGA II se puede regular a corto plazo a través de la fosforilación de la enzima vía proteína cinasa C (PKC). La fosforilación baja la actividad enzimática hasta un 10% del nivel control y su recuperación es posible hasta un 70% después de una hora (103).

En resumen, con todos los antecedentes antes mencionados, podemos destacar a la PGA II como la enzima importante para la degradación de la TRH liberada en el SNC. Por otro lado, surgen también preguntas muy interesantes: dado que existen casos en donde el procesamiento alternativo de un gen puede originar dos ó más formas moleculares de una proteína ¿Podrían la PGA II y la Tiroliberina, considerando la similitud de sus características, estar codificadas por el mismo gen?; asumiendo que la enzima es una proteína de membrana ¿Cómo es su anclaje a la bicapa?, ¿Es posible generar una forma liberada a partir de la enzima membranal?; considerando que en el SN, el lugar en donde se encuentra una molécula no necesariamente es el mismo lugar en donde es sintetizado, ¿Dónde es realmente sintetizada la enzima?, ¿Cuál es la distribución regional de la síntesis de la enzima?; algunas preguntas en relación con el TRH resultan más interesantes, ¿Cómo está coordinada la síntesis de la enzima con la síntesis y degradación de la TRH?; si la actividad de la enzima es regulada por eventos tales como la fosforilación, ¿Cuáles son los sitios de regulación en la enzima?. Estas preguntas son el motivo de la realización de este trabajo.

V.- OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

Los objetivos generales de este proyecto son:

- El estudio de la relación estructura-función de la PGA II, a través de la determinación del sitio activo, forma de interacción con la membrana y sitios de unión a cofactores.
- La relación de la PGA II con la tiroilberinasa (ya que es posible que ambas provengan de un mismo gen).
- La distribución regional de la síntesis de la enzima y regulación de la transcripción de la misma.

Para el cumplimiento de dichos objetivos se planteó la clonación de la secuencia nucleotídica que codifica para la PGA II. Debido a que la única sonda disponible es un anticuerpo policlonal de cuyo contra PGA II de conejo y a reserva de realizar oligonucleótidos sintéticos para ser utilizados con el mismo fin, se plantearon los siguientes objetivos específicos para esta primera fase del proyecto:

OBJETIVOS PARTICULARES:

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Caracterización de la sonda (anticuerpo contra la PGA II de cerebro de conejo) para rastrear a la enzima.
- La obtención de un banco de ADNc de cerebro de conejo
- Aislamiento de la secuencia específica (ADN complementario al ARN mensajero) de la PGA II, mediante:
 - a).-Utilización del anticuerpo específico contra la enzima
 - b).-Utilización de oligonucleótidos sintéticos correspondientes a la secuencia aminoacídica de la enzima.

VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo realizado se dividió en 2 partes, de acuerdo al diagrama de flujo (FIGURA 11), la caracterización del anticuerpo contra la PGA II y la construcción del banco de expresión.

Para la caracterización del anticuerpo contra la PGA II, se realizaron inmunoprecipitaciones, cromatografía de afinidad e inmunodetecciones en nitrocelulosa (Western blot), tanto de extractos crudos de cerebro y otros tejidos de conejo como de la línea celular de retinoblastoma humano Y-79. La caracterización del anticuerpo serviría para su utilización en el rastreo del banco de expresión.

Para la obtención del banco de ADN complementario de cerebro de conejo, se sintetizó DNAC utilizando como iniciador oligo dT y un hexámero que se une al templado aleatoriamente. El vector utilizado fué Lambda ZAP II y la amplificación se realizó en células de E. coli cepa X11-Blue.

Ambas partes fueron llevadas a cabo al mismo tiempo.

CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO CONSTRUCCION DEL BANCO DE EXPRESION

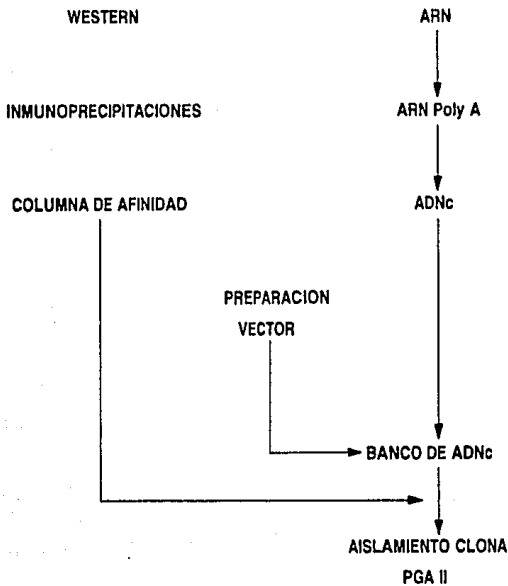


FIGURA 11.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

VII.- MATERIALES Y METODOS

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR METODO WILK et al. (104)

El fraccionamiento de células y tejidos fué realizado con la finalidad de obtener fracciones enriquecidas de actividad de PGA II. De acuerdo a este método se obtienen a partir de una fracción total (FT), una Fracción Soluble (FS) y otra Membranal (FM), fracción en donde se enriquece la actividad enzimática.

SOLUCIONES

Amortiguador fosfatos 1M pH 7.- Para preparar 500 ml, disolver 78.8 g (0.44 M) de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ó 31.23 g (0.44 M) de Na_2HPO_4 con 38.6 (0.56 M) de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. El pH debe de ser 7.

Amortiguador fosfatos 50 mM pH 7.- Diluir 1/20 el amortiguador 1M.

PROCEDIMIENTO

El tejido fraccionado es tratado de igual manera si son células en cultivo (Y-79) ó tejido cerebral.

- 1.- El tejido es homogenizado en solución amortiguadora de fosfato de sodio 50mM, pH 7, a 4°C.
- 2.- Centrifugar a 16,000 g. por 15 minutos a 4°C.
- 3.- Separar la fracción citosólica (sobrenadante) de la membranal (pastilla); esta última resuspendida en 100 ul de solución amortiguadora (incluyendo 1% NP-40).

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR METODO CHARLI et al. (95)

Al igual que el método previo, este fraccionamiento se realizó para obtener fracciones enriquecidas de PGA II. Aquí, se obtienen a partir de la Fracción Total (F1T) que es centrifugada a baja velocidad, una pastilla (Fracción Membranal F2M) y un primer sobrenadante (F3S), el cual es centrifugado a alta velocidad para obtener un segundo sobrenadante (F4S) y una pastilla final (F5M).

PROCEDIMIENTO

El tejido fraccionado es tratado de igual manera si son células en cultivo (Y-79) ó tejido cerebral.

- 1.- El tejido es homogenizado en fosfato de sodio 50 mM, pH 7, a 4°C (fracción 1).
- 2.- Centrifugar a 1,000 g. por 5 minutos a 4°C. Separar pastilla 1 y sobrenadante 1.
- 3.- La pastilla 1 es resuspendida en volumen mínimo de fosfato de sodio 50 mM, pH 7 (e.g. 200 ul), homogenizada y centrifugada a 3,000 rpm 15 minutos. Separar pastilla 2 (fracción 2) y sobrenadante 2.
- 4.- Los sobrenadantes 1 y 2 son juntados (fracción 3) y centrifugados a 16,000 g. por 15 minutos.
- 5.- Se separa el sobrenadante (fracción 4), de la pastilla (fracción 5).
- 6.- Se agrega a la fracción 5 NP-40 (1% final).

TRIPSINIZACION DE FRACCIONES SUBCELULARES (104)

La tripsinización fue realizada para determinar la capacidad del anticuerpo contra la PGA II, de detectar la enzima liberada y la unida a membrana, después de ser sometidos a este tratamiento enzimático. Cabe aclarar que dentro de los pasos de la purificación de la PGA II, a partir de la cual se elaboró el anticuerpo, se incluye un "rasurado" de membranas para liberar proteínas membranales por tripsinización ligera.

SOLUCIONES

Tripsina al 1%.- disolver la tripsina en 50 mM fosfato de sodio pH 7.5 (10 mg en 1 ml).

CaCl₂ 100 mM .- disolver el CaCl₂ (0.1109 g en 10 ml).

Inhibidor de tripsina al 1%.- disolver el inhibidor en 50 mM fosfato de sodio pH 7.5 (5 mg/ 500 ul).

PROCEDIMIENTO

- 1.- Tomar 2 mg de proteína (determinado por Lowry) de las fracciones que se deseen tripsinizar y ajustar el CaCl₂ a 1 mM y la tripsina al 0.01% en 500 ul de 50 mM fosfato de sodio pH 7.5 a 37°C.
- 2.- Hacer una cinética tomando 1/5 del total (100 ul) a los 10, 20, 30, 60 y 120 min. Depositar en un tubo con la cantidad adecuada de inhibidor de tripsina (15 mg de inhibidor por 20 mg de tripsina).
- 3.- Agitar y poner en hielo.

PROTOCOLO PARA INMUNOPRECIPITACION (105)

La inmunoprecipitación es una técnica que ofrece la posibilidad de seleccionar a través de un anticuerpo específico, la proteína deseada. Inicialmente se forma un complejo molecular entre el anticuerpo y el antígeno; posteriormente se agrega un segundo anticuerpo o proteína A acoplada a sepharosa, para facilitar la precipitación. Una vez precipitada, la muestra se corre en PAGE.

SOLUCIONES

Buffer de Inmunoprecipitación.(BI) 2X: Para 50 ml. A 20 ml de agua Estéril poner 2.5 ml amortiguador de fosfatos 1M (50 mM fosfato de sodio), 0.2 ml EDTA 0.5M (2mM EDTA), 1ml tritón x-100 al 2%, 500 mg deoxicolato de sodio (1% final), 5 ml SDS al 10% (1% final), 210 mg de NaF (100 mM), 35 mg de PMSF disuelto de volumen mínimo de et-OH (4 mM PMSF) y Vanadato de sodio 100 mM (puede ser omitido). Ajustar a 50 ml. pH 7.5.

Buffer de Unión.(BU) A 20 ml de agua estéril adicionar 1.5 ml de NaCl 5M (150 mM), 10 mg de Azida de sodio (0.02%), 1 g. BSA (2%), 0.5 ml tritón x-100 (1%) y ajustar a 50 ml con agua RNA. pH 7.5.

Proteína A- Sepharosa 4c LB. (PAS) Preparar 10% vol/vol proteína A- sepharosa en BU, lavar en BI, lavar en BU, resuspender en BU.

Sacarosa 0.9 M. Preparar en agua estéril.

Buffer de resuspensión de la muestra 2x.- (BRM) Para 25 ml agregar a 10 ml de agua, 0.38 g de tris-base, 5 ml de glicerol, 0.5g SDS, 0.25 mg de azul de bromofenol, ajustar a 25 ml. pH 6.8 con HCl. Al momento de usarse agregar 6 microlitros por cada 0.2 ml de muestra final de B-Mercaptoetanol.

Anticuerpo. El anticuerpo deberá de estar diluido 1 a 50 en Buffer de Unión.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Añadir 1 vol. (50 microlitros) de BI 2x frío a 50 microlitros de muestra (resuspendida en 50 mM fosfato de sodio). Poner los controles respectivos.
- 2.- Añadir 100 microlitros de anticuerpo 1:50 BU e incubar toda la noche a 4°C.
- 3.- Agregar 100 microlitros de PAS e incubar 2 h a 4°C.
- 4.- Centrifugar 15 min a 16,000 g a 4°C. Cuidadosamente aspirar el sobrenadante (a contra luz) y añadir 100 microlitros de BI a la pastilla. Resuspender.
- 5.- Poner colchón (300 microlitros) de 0.9 M sacarosa en eppendorf de 0.5 ml. Centrifugar 5 min a 4°C. Poner la muestra sobre el colchón cuidadosamente.
- 6.- Centrifugar 15 min a 16,000 g a 4°C.
- 7.- Remover el sobrenadante y resuspender la pastilla en BRM 1:1.
- 8.- Calentar la muestra por 2 min y correr PAGE con SDS 10%.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD (105)

La cromatografía de afinidad nos permite seleccionar a través de un soporte sólido, la molécula de nuestro interés. La técnica consiste en asociar Proteína A- Sepharosa a el anticuerpo deseado (anti PGA II), posteriormente la fracción celular es pasada por la cromatografía y una vez reconocida la molécula específica, es eluida y corrida en PAGE.

SOLUCIONES

PAS.- Lavar como se indicó para Inmunoprecipitación

Amortiguador PBS 10x - Para 500 ml disolver 50 g de NaCl, 1.250 g de KCl, 22.5 g de Na_2HPO_4 y 1.25 g de KH_2PO_4 , ajustar pH 7.3 con HCl cuando esté 1x.

1M etanolamina.- disolver 305 ul para 5 ml.

Glutaraldehído 1% - preparar 10 ml.

Solución GN.- (5 mM glicina pH 2.3/ 150 mM NaCl). Para 10 ml mezclar 50 ul de glicina 1M y 300 ul NaCl 5M.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Mezclar 100 ul de PAS (une 150 ug IgG) con 850 ul de PBS y 40 ul de anticuerpo contra la PGA II (2.6 mg de proteína son aproximadamente 400 ug de IgG).
- 2.- Incubar 1 h a temperatura ambiente, mezclándose suavemente.
- 3.- Lavar con 10 volúmenes de PBS dos veces y centrifugar 16,000 g 30 segundos.
- 4.- Resuspender en 900 ul de PBS y remover 25 ul de la resina, para control.
- 5.- Añadir lentamente 100 ul de glutaraldehido (grado microscopia electrónica) al 1% (0.1% final).
- 6.- Incubar 30 min a temperatura ambiente y centrifugar.
- 7.- Parar la reacción con 1 volumen de 1 M etanolamina, incubando por 30 minutos.
- 8.- Lavar con 10 volúmenes (dos veces) de PBS y tomar una alícuota de 25 ul de cromatografía para control.
- 9.- Lavar la columna con GN. Posteriormente lavar columna con PBS 3 veces (con 10 volúmenes) y almacenar columna en 1 ml de PBS. Tomar 25 ul.
- 10.-Las muestras guardadas son eluidas en BRM (Buffer de resuspención de muestra). Para correr el gel hervir 5 min.
- 11.-Incubar resina con 5 mg de tejido (problema y control) resuspendido en PBS, por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 12.-Montar columnas en puntas amarillas y lavar con PBS.
- 13.-Eluir con 100 ul de GN.
- 14.-Correr la mitad de las muestras en PAGE.
- 15.-Tefilr con Azul de Coomassie ó con plata.

INMUNOBLOTS (WESTERN BLOT, 105)

El Western, como comúnmente de le conoce a esta técnica, nos permite observar la o las proteínas que son reconocidas por un anticuerpo. Las fracciones celulares son sometidas a PAGE y transferidas a nitrocelulosa; una vez en este soporte, se incuba con el anticuerpo deseado (anti PGA II) y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a una enzima que permita el desarrollo de color (e.g. peroxidasa). Señalaremos que esta técnica, es la que más se asemeja a el rastreo de un banco de expresión, puesto que ambos son realizados en nitrocelulosa ó nylon, razón por la cual nos interesaba particularmente su estandarización.

SOLUCIONES

Solución TBST.- Para 500 ml disolver 4.4 g de NaCl, 5 ml de 1M Tris pH 8 y 2.5 ml de Tween 20 al 10%.

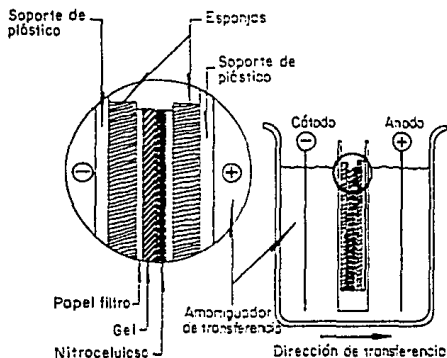
Solución TBS 5x .- Para 200 ml disolver 8.8 g de NaCl y 10 ml de Tris 1M pH 8.

Amortiguador de transferencia (Towbin) 5x.- Para un litro disolver 72 g de glicina y 15.15 g de Trizma base.

Amortiguador de transferencia (Towbin) 1x.- Para 2 litros disolver 2g de SDS, 400 ml de metanol y 400 ml de Towbin 5x. Degasar antes de usar.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Correr gel PAGE al 10%, de 1.5 mm de espesor (ver técnica), con las muestras problemas (de 30 a 80 μg) resuspendidas en un volumen de BRM 2x y con 6 μl de beta-mercaptoetanol por cada 0.2 ml final de muestra. No olvidar incluir 2 carriles con marcadores de peso molecular y los controles pertinentes.
- 2.- Sacar el gel y cortar un carril con marcador para teñirlo con azul de coomasie (ver técnica).
- 3.- Equilibrar el gel en amortiguador de transferencia de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Cortar papel whatman 3MM y membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm del tamaño exacto del gel y humedecerlos junto con las esponjas del minitransfer en amortiguador de transferencia.
- 5.- Montar el dispositivo de transferencia como se indica en la siguiente figura:



- 6.- Transferir toda la noche (16 h) a 20 volts en cuarto frío. Checar la polaridad y la corriente.
- 7.- Sacar transferencia, cortar el carril del marcador para su tinción con amido-black (ver técnica). Dejar secar la membrana a temperatura ambiente. Si se desea almacenar la membrana por corto tiempo, protegerla en una bolsa de plástico sellada y guardada a 4°C.
- 8.- Bloquear los sitios inespecíficos mediante la incubación de la membrana con TBST al 5% de leche baja en grasas (e.g. svelttes), por 3 horas a temperatura ambiente con agitación.
- 9.- Incubar con TBST/svelttes 5% con anti-PGA II (1/1000), esto equivale a 25 μl de anticuerpo para 25 ml de solución. La incubación es a temperatura ambiente por 3 h en agitación suave.
- 10.-Lavar 3 veces 10 minutos con 50 ml. de TBST/svelttes 5%.
- 11.-Incubar con TBST/svelttes 5% y 1/1000 (25 μl para 25 ml) de cuyo anti-conejo-peroxidasa, por 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave.
Nota.- puede utilizarse proteína A-peroxidasa (1/1000).
- 12.-Lavar 2 veces con 50 ml de TBST y 2 veces con 50 ml de TBS.

- 13.-Para revelar con diaminobenzidina (DAB), disolver 25 mg en 50 ml TBS 1x previamente (al menos 6 h) en el cuarto frío. El revelado hacerlo a temperatura ambiente agregando el DAB y 15 μ l de peróxido de hidrógeno. Parar la reacción con agua en abundancia.
Nota.- Sacar a disolver el DAB 1 h a temperatura ambiente antes de el revelado, si el DAB se llegara a oxidar demasiado, no servirá.

CRECIMIENTO DE CELULAS Y-79 (96)

La línea celular Y-79 es una línea derivada de retinoblastoma humano, en la que ha sido detectada actividad enriquecida de la PGA II. Esta línea ha sido utilizada en estudios de regulación de la enzima.

SOLUCIONES

Medio RPMI.- Disolver el medio en agua desionizada, agregar 2 g por litro de bicarbonato de sodio (grado cultivo). Ajustar el pH a 7.2. Filtrar por millipore (0.2 mm) y almacenar a 4°C en frasco bien cerrado. Para utilizarlo, agregar 15% de Suero Bovino Fetal inactivado por calor a 55°C durante 30 minutos. Agregar los antibióticos a 1x final.

Azul de tripano.- Prepararlo al 0.4% en PBS, se utiliza 1:1 con células en cultivo.

Mezcla de antibióticos 100x.- Penicilina 10,000 unidades por ml y estreptomycin 10g por ml. La concentración final deberá ser 100 u/ml y 100mg/ml respectivamente.

PROCEDIMIENTO

Toda la manipulación se realizó en campana de flujo laminar.

- 1.- Descongelar células a 37°C por 1 ó 2 minutos. Lavarlas 2 veces en un tubo de 15 ml estéril con medio RPMI, centrifugándolas a 1000 rpm durante 5 minutos en cada lavado. Sacar el medio sucio con pipeta estéril.
- 2.- Resuspender en 10 ml y sembrar en frascos de cultivo estéril. Las condiciones son 37°C y 5% de CO₂. El sembrado deberá cubrir la totalidad de la superficie de la caja.
- 3.- Tomar una alícuota y determinar viabilidad celular por tinción con azul de tripano 1:1.
- 4.- El medio se cambia 2 veces a la semana.

CONSERVACION DE CELULAS Y-79 (96)

Este método de conservación permite almacenar por tiempo prolongado la línea celular.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Crecer a fase logarítmica las células (cambio de medio un día antes).
- 2.- Contar las células y resuspender a 3×10^5 células por ml de medio RPMI con Dimetilsulfóxido al 10%.
- 3.- Almacenar en tubos especiales en nitrógeno líquido.
- 4.- Analizar viabilidad con azul de tripano a las 24 horas. La viabilidad debe de ser superior a 80%.

EXTRACCION DE RNA METODO DE CLORURO DE LITIO-UREA (106)

Este método de extracción de RNA, tiene ventajas sobre otros métodos de extracción en cuanto a rapidez y calidad de la muestra (no degradación).

SOLUCIONES

6M Urea- 3M LiCl.- Preparar con agua DEPC. Utilizar con material estéril para todo. Trabajar en campana ó en mechero. Filtrar, alícuotar en tubos estériles (50 ml.). Esta solución no se debe esterilizar porque precipita con carácter irreversible.

Solución TEDS. 0.1 M Tris.HCl pH 7.5, 0.01 EDTA, 0.1M DTT y 2% SDS. Esta solución puede prepararse a partir de los stocks de Tris 1M y EDTA 0.5M. Preparar con agua DEPC, filtrar, alícuotar, esterilizar. Ajustar volúmenes con agua RNA.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Macerar el tejido en mortero con nitrógeno líquido.
- 2.- Homogenizar (2 min a máx. velocidad) el tejido en solución de Urea-LiCl. Aprox. 15 ml / cerebro de rata (1.5g) ó 60 ml / cerebro de conejo dividido en 4 partes 15 ml/ cada uno. Transferir a tubos estériles para centrifugación (8 de 15 ml en conejo y 2 por cerebro de rata).
- 3.- Dejar el homogenado a -20°C toda la noche.
- 4.- Centrifugar 15 min a 4°C a 12,000 g. (sobrenadante DNA y proteínas).
- 5.- Decantar con cuidado. Limpiar las paredes con solución de Urea. Evitar que la pastilla se desprege.
- 6.- Resuspender y extraer la pastilla con solución TEDS + Fenol + Cloroformo. Cada pastilla de 8 ml extraerla con una solución (preparar 5 min antes) de 3 ml de TEDS- 3 ml. fenol saturado - 3 ml de Cl.
- 7.- Hacer una segunda extracción con Fenol-Cl (3 ml de cada uno) y otra solo con cloroformo.
- 8.- Precipitar con 1/10 de acetato de sodio 3M y 2.5 vol de etanol absoluto. Dejar toda la noche a -70.C.
- 9.- Centrifugar 6,000 g. a 4°C, lavar con etanol al 70% y secar al vacío.
- 10.-Resuspender en agua RNA (1ml un cerebro de rata y 3 ml uno de conejo). Almacenar a -70°C y leer a 230, 260, 280 y 320 nm.
- 11.-Checar en gel desnaturalizante Urea-ácido.

PRECIPITACION DE ARN CON CLORURO DE LITIO (107)

Esta precipitación se utiliza para limpiar el ARN de ADN.

SOLUCIONES

4 M LiCl-10 mM EDTA.- Preparar con agua DEPC. Utilizar material estéril para todo. Para 50 ml disolver 8.5 g de LiCl en agua DEPC y agregar 1 ml de EDTA 0.5 M. Esterilizar.

PROCEDIMIENTO

- 1.- A la muestra resuspendida en el máximo volumen de agua ARN posible, se le agrega un volumen de solución de LiCl (concentración final 2M LiCl-5 mM EDTA).
- 2.- Dejar precipitando a -20°C toda la noche, a -70°C 1 hora ó bien en baño de hielo seco-etanol por 20 minutos.
- 3.- Centrifugar a 16,000 g. a 4°C por 20 min. Secar al vacío y resuspender en agua ARN.
- 4.- Precipitar con un décimo de NaAc 3M, por 20 min en baño de hielo seco-etanol.
- 5.- Centrifugar a 16,000 g. a 4°C por 20 min. Secar al vacío y resuspender en agua ARN.
- 6.- Checar nuevamente la relación 260/230. En caso de guardar una relación cercano a 2.5, repetir el procedimiento.

SELECCION DE RNA POLY A+ (107)

La selección del RNA Poly A+, nos permite trabajar únicamente con RNA mensajero, es decir, aquel RNA que codifica para una proteína. Dado que se pretende construir un banco de expresión, se consideró necesaria esta selección de RNA.

Todas las soluciones deben de ser preparadas con agua DEPC, filtrados, alícuotados y esterilizados. Así mismo debe de recuperarse el volumen perdido con agua RNA.

SOLUCIONES PARA OLIGO dT

Solucion de lavado (SL) .-	2x :40 mM Tris, 1M NaCl, 2mM EDTA y 0.2% SDS.
	1x : 20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 1mM EDTA y 0.1% SDS.
SL con 0.1M NaCl.-	20 mM Tris, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS.
Sol. de elucion (SE) .-	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05% SDS.
Sol. de reciclaje (SR).-	0.1 M NaOH 1 ml 10N NaOH/100 ml.
	5 mM EDTA 1 ml 0.5M EDTA/ 100ml

FORMA DE PREPARADO DE SOLUCIONES:

Stock	SL 2x	SL 1x	0.1M NaCl	SE
1M Tris	4 ml	2 ml	2 ml	1 ml
5M NaCl	20 ml	10 ml	2 ml	-
0.5 M EDTA	0.4ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml
10% SDS	2 ml	1 ml	1 ml	0.5ml

Llevar a 100 ml. cada una de las soluciones.

NOTA IMPORTANTE.- El SDS debe de agregarse al momento de usarse porque precipita.

PROCEDIMIENTO: Eficiencia: 10 mg de RNA / ml de oligo dT celulosa

- 1.- Equilibrar la oligo dT celulosa en SL (2 columnas).
- 2.- Lavar cada columna (Punta azul con fibra de vidrio estériles) con:
 - a) Agua RNA (5 vol. de columna)
 - b) SR (3 vol. de columna, no más de 10 min en esta sol.)
 - c) Agua RNA (8 a 10 vol. de columna)
- 3.- Checar que el pH sea menor a 8 (6-7).
- 4.- Lavar cada columna con 5 vol. de SL (si se desea almacenar deberá de ser en esta solución, si se desea reciclar deberá de procederse como previamente se describió).
- 5.- Disolver el RNA en agua RNA (2 mg RNA en 0.5ml de Agua RNA para 0.5 ml de oligo dT celulosa).
- 6.- Calentar 5 min a 65°C. Agragar cantidad 1:1 de SL 2x. Dejar enfriar a temp. ambiente.
- 7.- Correr la muestra y coleccionar el fluido.
- 8.- Calentar a 65°C el volumen coleccionado. Dejar enfriar a temp. ambiente.
- 9.- Correr la muestra , coleccionar el fluido.(RNA poly A-).
- 10.-Lavar con 5 a 10 vol de SL. Leer OD a 260 cada fracción coleccionada, al principio deberá de diluirse la cantidad a leer (las primeras 2 ó 3 muestras).
- 11.-Lavar con 4 vol de 0.1M NaCl. Leer los fluidos a 260 nm.
- 12.-Eluir el poly A+ con 2 vol de SE. Guardar alícuota para lectura.
- 13.-Reseleccionar el Poly A+ para obtener poly A++. Utilizar la segunda columna. Repetir desde paso 6. Se agrega de nuevo SL 2x. Leer los fluidos a 260 nm.
- 14.-Precipitar con 1/10 de acetato de sodio 3M pH. 5.2 y 2.5 vol. de etanol a -20°C toda la noche.
- 15.-Centrifugar, secar pastilla. Resuspender en agua RNA. Almacenar precipitado en etanol.

Nota.- Las lecturas típicas deberán ser altas al principio (SL), bajarán y posteriormente subirán un poco con 0.1 M NaCl y volverán a bajar.

Rendimiento.- de 2mg de RNA total se obtienen 120 microgramos de Poly A+ y de ahí 85 microgramos de poly A++.

SINTESIS DE cDNA (105)

Para la construcción del banco de expresión, se sintetiza cDNA a partir del ARN Poly A+ seleccionado.

SOLUCIONES

Preparar 10 mililitros de cada una de las siguientes soluciones:

- 1 M Tris.Cl pH 8.2 a 42.C
- 1 M KCl
- 1 M MgCl₂
- 1 M Tris.Acetato pH 7.8
- 1 M Sulfato de amonio
- 1 M Acetato de potasio
- 1 M Acetato de magnesio
- 1 M DTT (tubo cellado) no esterilizar
- 200 mM DTT
- 5 mg/ml BSA libre de nucleasa (almacenar a -20°C)

** Todas estas soluciones deberán ser preparadas con agua RNA, filtradas y esterilizadas. Recuperar volúmenes perdidos por peso.

5x ATR.- para 1 ml. poner 0.470 ml de agua RNA, 0.250 ml 1 M Tris.Cl pH 8.2, 0.250 ml 1M KCl y 0.030 ml de 1M MgCl₂ en un tubo eppendorf estéril. Se recomienda preparar 10 ml. de la solución para que el margen de error sea menor. Almacenar amortiguador ATR en alícuotas a -20°C.

Oligo dT.- 0.5 mg/ml en amortiguador Tris-EDTA.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Preparar 10 microgramos de Poly A++ a concentración de 1 microgramo por microlitro.
- 2.- Calentar el RNA en un tubo eppendorf bien tapado 5 min. a 65°C y ponerlo inmediatamente en hielo.
- 3.- En un tubo por separado poner en el siguiente orden:
 - 80 microlitros agua RNA
 - 20 - 5 mM dNTPs (500 micromolar final c/u)
 - 40 - 5x ATR (1x final)
 - 10 - 200 mM DTT (10 mM final)
 - 20 - 0.5 mg/ml Oligo dT 12-18 (50 microg./ml final)
 - 10 - (10u) RNAsin (50 u/ml final)
- 4.- Mezclar por vortex, centrifugar a baja velocidad y adicionar la mezcla al tubo con RNA. Agregar 20 µl (20u) Transcriptasa Reversa (concentración final 1000 u/ml o sea 1/5 200 u en 0.2 ml). Mezclar. Remover 10 µl de la reacción a un tubo por separado que contenga 1 µl de P³² dCTP, para seguir la reacción radiactiva. Dejar ambos tubos a temperatura ambiente 5 min. Dejarlos a 42°C por 1.5 h. ó más si es necesario (45 min.más, determinarlo por incorporación cada 45 min).
Nota.- la alícuota es para determinar incorporación.
- 5.- Para parar la reacción add 1 microlitro de 0.5 M EDTA pH 8 a la reacción radiactiva y congelar a -20°C.
- 6.- Para parar la reacción principal agragar 4 µl de 0.5 M EDTA pH 8 y add. 100 microlitros de TE.

- 7.- Extraer con 0.3 ml de fenol. Vortex (Vx) Centrifugar a temp. amb. 1 min. para separar fases. Transferir la fase acuosa a tubo nuevo.
- 8.- Extraer con 0.6 ml de Cl. Separar fases.
- 9.- Add 125 microlitros de 7.5 M de acetato de amonio a la fase acuosa (conc. final 2- 2.5 M) y 0.950 de etanol al 95%. Ponerlo en baño de hielo seco etanol 1h. ó a -70°C toda la noche.
Centrifugar a 4°C. Pastilla blanca amarillenta visible.
Nota.-Acetato de amonio remueve oligo dT y oligos cortos del sobrenadante.
- 10.-Remover el sobrenadante, lavar con etanol al 70% centrifugar a 4°C 3 min. remover el sobrenadante (decantado). Secar al vacío.
- 11.-Resuspender en 284 microlitros de agua RNA.

Para determinar la incorporación, se toma una alícuota de la reacción radiactiva y se pone en 25 µl de DNA acarreador. Se colocan 10 microlitros de esta mezcla en 2 papeles (1 cm³) whatman No.3. Se secan perfectamente. Uno de los papeles se lava con 30 ml de TCA al 10% a 4°C y con 30 ml. de etanol frío a 4°C. Se seca el papel y se cuenta con líquido de centelleo P³² al igual que el papel que no fué lavado, se determina porcentaje de incorporación.

Para calcular el tamaño de los cDNA sintetizados se corre un gel alcalino de la reacción radiactiva. No olvidar poner marcadores de peso. (PBR 322/HinF 1 ó lambda/Hind III).

SINTESIS de cDNA DOBLE CADENA

SOLUCIONES

- 5x Amortiguador para segunda cadena (ASC)
- 5 mM B-NAD (-80°C)
- RNAsa H
- DNA ligasa de E.Coll
- DNA Polimerasa de E.Coll.
- 5x Amortiguador para T4 DNA ligasa y RNAsa A (ATA)
- 2 microgramos/ml RNAsa A (libre de DNAsas)
- T4 DNA polimerasa

Ribonucleasa A (libre de DNAsas). disolver RNAsa A en TE hervir 10 min. para remover DNAsas y almacenar alícuotado a -20°C. Diluir a 2 microgramos por ml cuando se necesite.

5x ASC para 2.5 ml. 562.5 agua RNA, 0.250 ml. 1M Tris.Cl pH 7.5, 1.250 ml. 1 M KCl, 62.5 microlitros de 1 M MgCl₂, 0.125 ml. 1M sulfato de amonio, 0.125 ml.1M DTT y 0.125 ml. de 5 mg/ml de BSA.

5x ATA para 2.4 ml. 0.864 ml. de agua RNA, 0.4 ml. 1M Tris.acetato pH 7.8, 0.8 ml. de 1M acetato de potasio, 0.120 ml. 1M acetato de magnesio, 6 microlitros de 1M DTT y 0.210 ml. de 5 mg/ml BSA.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Agragar a los 284 microlitros de RNA-cDNA en el siguiente orden:
 - 4 microlitros 5 mM dNTPs (50 micromol.de c/u).
 - 80 - 5x ASC
 - 12 - 5 mM B- NAD (150 mM final)
- 2.- Vx. Adicionar:
 - 4 - (4u) RNAsa H (10 u/ml final)
 - 4 - (20u) E.Coli DNA ligasa (50u/ml final)
 - 10 - (100u) - - polimerasa I (250 u/ml)Vol. final 400 microlitros.
- 3.- Mezclar, centrifugar a baja velocidad tomar 10 microlitros y ponerlos en tubo con 1 microlitro de dCTP P32 (1 microCi/microlitro).
- 4.- Incubar 12 a 16 h. a 14°C
- 5.- Determinar incorporación con 4 microlitros. Correr gel TBE agarosa 2 %. Tefir marcadores. Fijar con TCA 7%. Secar. Exponer hyperfilm.
- 6.- Extraer con 400 microlitros de fenol saturado. Separa fase acuosa. Add 200 microlitros TE. Pasar la fase acuosa a tubo nuevo.
- 7.- Extraer con cloroformo (900 microlitros).
- 8.- Dividir fases acuosas en dos tubos (300 microlitros en cada uno). Add 125 microlitros a c/u de 7.5 M acetato de amonio y 50 microlitros de etanol al 95%.. Dar baño hielo seco etanol 30 min. Centrifugar 10 min a 4°C.
- 9.- Secar al vacío. Resuspender cada pastilla en 21 microlitros de agua RNA. Juntar ambas pastillas.
- 10.- Agregar: (vol final 80 microlitros)
 - 5 ul 5mM dNTPs (310 micromolar de c/u)
 - 16 ul 5x ATA
 - 1 ul 5 mM NAD (62 mM final)
- 11.- Mezclar por Vx. Centrifugar para coleccionar y agregar:
 - 4 ul 2mg/ml RNAsa A
 - 2 ul (4u) RNAsa H (50 u /ml final)
 - 5 ul (20u) E.Coli DNA ligasa (250u/ml)
 - 3 ul (8u) T4 DNA polimerasa (100u/ml)
- 12.- Mezclar, incubar 45 min a 37°C
- 13.- Adicionar 120 microlitros de TE
- 14.- Extraer fenol (200 microlitros) 2 veces y add 100 microlitros de TE. Extraer Cl (600 microlitros).
- 15.- Precipitar con ET-OH/ Acetato de amonio.
- 16.- Almacenar a -70°C

PURIFICACION DE ADN DEL FAGO LAMBDA (PEQUEÑA ESCALA) (107)

La purificación de ADN del fago lambda a pequeña escala se realiza cuando se desea corroborar el patrón del fago o obtener insertos en poca cantidad.

SOLUCIONES

Solución SMC.- Filtrar ó esterilizar. Para 250 ml adicionar 1.75 g (0.7%) de Na_2HPO_4 , 0.75 g (0.3%) de KH_2PO_4 , 125 mg (0.05%) de NaCl , 250 mg (0.1%) de NH_4Cl , 250 μl (1 mM) de 1M MgCl_2 , y 250 μl (0.1 mM) de 100 mM CaCl_2 .

Solución SM.- Para 100 ml disolver 2 ml de 5M NaCl , 0.20 g de Sulfato de magnesio heptahidratado, 5 ml de 1M Tris-HCl pH 7.5 y 10 mg de gelatina.

Maltosa 20%.- Disolver maltosa y filtrarla en milipore 0.22 en condiciones estériles.

MgCl_2 1M.-Disolver cloruro de magnesio y esterilizar.

Tris 2M pH 7.5.- Disolver Tris, ajustar pH y esterilizar.

5M NaCl .-Disolver la sal y esterilizar.

SDS 10%.- Disolver SDS y esterilizar. Algunas veces precipita, si pasa esto calentar a 65°C. Como opción puede no esterilizarse si se prepara con agua especial y se callenta a 65°C por 60 min.

Solución TM.- 20 mM Tris pH 7.5 - 10 mM MgCl_2 . Para 100 ml disolver 2 ml de Tris 1M pH 7.5 y 1 ml de MgCl_2 1M. Esterilizar.

Solución TE.- 10 mM Tris pH 7.5 - 1 mM EDTA. Para 100 ml disolver 1 ml de Tris 1M pH 7.5 y 0.2 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Esterilizar.

ADNase I.-Preparar una solución que contenga 1 mg/ml de ADNasa I en 0.15 M NaCl y 50% de glicerol. El agua y el glicerol usados deben ser esterilizados previamente. Alicuotar y almacenar a -20°C.

ARNasa A.-Disolver la ARNasa pancreática a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM Tris pH 7.5 y 15 mM NaCl . Calentar a 100°C por 15 minutos . Dejar que se enfríe a temperatura ambiente. Alicuotar y almacenar a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Cultivar celular frescas de E. Coli (cepas usadas Y-1090, LE-392 ó XL1-Blue).
- 2.- Picar una placa de lisis con palillo despuntado estéril.
- 3.- Colocar el palillo en un tubo falcon de 50 ml estéril con 100 μl de células (0.8 O.D._{600nm}), más 100 μl SMC.
- 4.- Preincubar 20 min. a 37°C sin agitación.
- 5.- Agregar 3 ml. de LB pH 7.5, agregar 60 μl de maltosa 20% (2% final), y 30 μl de MgCl_2 1M (10 mM final).
- 6.- Incubar 43°C con agitación a 300 rpm.
- 7.- Al día siguiente sacar la muestra a un tubo estéril de 10 ml. Adicionar 50 μl de cloroformo por ml. de medio. Vortex a máxima velocidad por 1 min.
- 8.- Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a Temperatura ambiente.
- 9.- Sacar el sobrenadante con pipeta pasteur, sin debrisado celular y poner en tubo de 10 ml.

- 10.-Añadir 60 ul de Tris 1M pH 7.5, 30 ul ADNasa I 1 mg/ml y 20 ul de ARNasa A 10 mg/ml.
- 11.-Agitar 15 segundos y dejar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 12.-Agitar 5 segundos, dejar en hielo 30 minutos.
- 13.-Agregar 300 ul de 5M NaCl (0.5M final) y 300 mg de PEG₆₀₀₀ (10% final).
- 14.-Dejar en hielo 3 horas.
- 15.-Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C.
- 16.-Resuspender el precipitado en 400 ul de solución TM y pasar a tubo eppendorf.
- 17.-Añadir 600 ul de cloroformo. Vortex a máxima velocidad.
- 18.-Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Tomar el sobrenadante y ponerlo en tubo nuevo.
- 19.-Agregar 20 ul 5M NaCl (0.25M final), 16 ul de 0.5M EDTA pH 8 (0.2M final) y 12 ul de SDS 10% (0.3% final).
- 20.-Agitar manualmente por 2 min.
- 21.-Extraer fenol cloroformo 1:1 y cloroformo.
- 22.-Centrifugar 14,000 rpm 15 min a 4°C.
- 23.-Precipitar la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol frío, toda la noche a -20°C.
- 24.-Centrifugar a máxima velocidad a 4°C. Secar pastilla.
- 25.-Resuspender en 50 ul de TE. Almacenar a 4°C.

PURIFICACION DE ADN DEL FAGO LAMBDA (GRAN ESCALA)(107)

La purificación a gran escala de ADN del fago lambda se realiza cuando se desea amplificar el vector u obtener una clona en mucha cantidad.

SOLUCIONES

- CsCl densidad 1.3.-** disolver 3.124 g de CsCl en 6.876 ml de agua esteril bidestilada.
CsCl densidad 1.5.- disolver 4.541 g de CsCl en 5.459 ml de agua bidestilada esteril.
CsCl densidad 1.7.- disolver 5.624 g de CsCl en 4.376 ml de agua bidestilada esteril.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Infeccionar 1 ml de cultivo en fase estacionaria de células de E. Coli (XL1-Blue) con 0.3 ml de lisado primario con un titulo de entre 1×10^8 a 1×10^9 placas por ul (entre 10^{10} y 10^{11} final).
- 2.- Incubar a 37°C por 10 minutos.
- 3.- Inocular con lo anterior 1:1 de medio LB-10 mM MgCl₂ e Incubar a 37°C con agitación 200 rpm por toda la noche.
- 4.- Agregar 1 ml de cloroformo y agitar 10 min más a 37°C con 200 rpm.
- 5.- Centrifugar a 7000 rpm en rotor JA-10 a 4°C por 20 minutos, tomar el sobrenadante.
- 6.- Añadir 100 g de PEG₆₀₀₀ y 42.8 g de NaCl. Disolver gentilmente.
- 7.- Mantener en hielo (4°C) por 3 horas.

- 8.- Centrifugar a 7000 rpm a 4°C durante 20 min en JA-10.
- 9.- Descartar el sobrenadante.
- 10.- Resuspender los fagos en 5 ml de solución TM que contenga 100 ul de ADNasa I (100 ug total) y 50 ul de ARNasa A (500 ug total), ayudarse con pipeta pasteur.
- 11.- Extraer un par de veces con igual volumen de cloroformo para eliminar el PEG.
- 12.- Centrifugar a 7000 rpm 10 min en JA-20 en tubos de polypropileno de 15 ml.
- 13.- Hacer un gradiente discontinuo de CsCl tal como se indica. Hacerlo con cuidado para no romper el gradiente, montarlo con pipeta pasteur larga.



- Muestra
Solución TM
- 2 ml de CsCl densidad 1.3
- 2 ml de CsCl densidad 1.5
- 1.5 ml de CsCl densidad 1.7

- 14.- Ultracentrifugar durante 90 minutos a 15°C en rotor SW-40 ti a 36000 rpm.
- 15.- Tomar por punción (con fondo negro) con una jeringa la banda de los fagos. Por lo regular aparece entre la interfase de las densidades de 1.5 y 1.3.
- 16.- Dializar contra 2 l de solución TM por 3 horas a Temp. Ambiente ó a 4°C por toda la noche.
- 17.- Añadir 1 décimo de volumen de 5M NaCl, 1 centésimo del volumen de 20% SDS y llevar a 10 mM de EDTA.
- 18.- Extraer fenol/cloroformo-isoamilico. Centrifugar a 7000 rpm 4°C por 5 min en JA-20.
- 19.- Tomar fase acuosa y extraer con cloroformo-isoamilico en las mismas condiciones.
- 20.- Precipitar con 2 volúmenes de etanol. Al formarse la malla separar del resto por decantación con mucho cuidado. Lavar con etanol 70%. Secar al vacío.
- 21.- Resuspender en 1 ml de TE. No forzar resuspender.
- 22.- Valorar cantidad y calidad de ADN. Correr gel Agarosa 1% TBE. Leer OD_{260nm}.

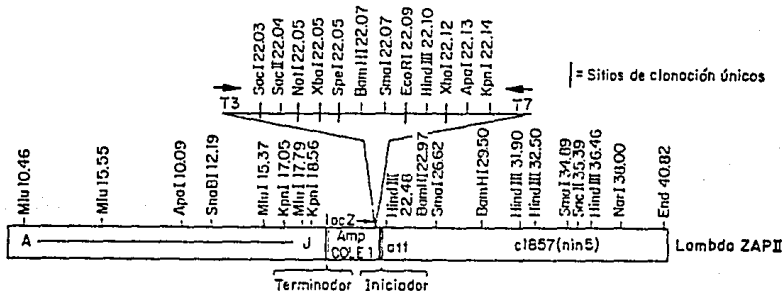
PREPARACION DEL VECTOR PARA CLONACION (105, 107)

PROCEDIMIENTO

- 1.- Una vez que se dispone del fago puro se prueba su patrón de restricción. En este caso nosotros probamos la restricción de 0.5 ug de ADN de fago con 2 u de Eco-RI, Sma-I ó Bam-HI. Las digestiones fueron corridas para analizar su patrón electroforético con respecto a un marcador de

peso molecular, en un gel 1% de Agarosa/Amortiguador Boyer's (ver protocolo). Los fragmentos generados son: Eco-RI 40.82 kb, Bam-HI 33.39, 6.5 y 0.9 kb y Sma-I 28, 8.3 y 4.6 (ver mapa de restricción).

- 2.- Posteriormente se digiere el vector con Eco-RI: 20 ug de ZAP II con 200u de enzima para una reacción final de 200 ul; incubar 30 minutos a 37°C, poner en hielo y checar la digestión en gel 1% de agarosa/Amortiguador Boyer's.
- 3.- Una vez checada la digestión, subir a 300 ul con TE y extraer fenol/cloroformo-isoamílico y cloroformo-isoamílico.
- 4.- Precipitar con 2 volúmenes de etanol y 1/10 3M acetato de sodio pH 7 20 minutos en baño de hielo seco-etanol. Lavar la pastilla con etanol al 70%.
- 5.- Centrifugar, decantar y secar al vacío. Resuspender el TE a 0.1 ug por ul.
- 6.- Montar la reacción de fosfatasa alcalina como sigue: 80 ul de DNA de vector, 10 ul de amortiguador CIAP, 9 ul de agua y 1 ul (24 u) de CIAP. Incubar 60 minutos a 37°C.
- 7.- Parar reacción con 1 ul de EDTA 0.5M y calentar 1h a 65°C.
- 8.- Extraer fenol/Cl y Cl
- 9.- Precipitar con acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol.
- 10.-Lavar pastilla con etanol al 70%. Recentrifugar y decantar. Secar al vacío. Resuspender en TE a 0.5 ug/ul (16 ul).
- 11.-Para checar, ligar 0.5 ug de ZAP fosforilado y defosforilado. Empaquetar y titular. El segundo reducirá la ligación y la eficiencia de empaquetamiento por 2 ó 3 ordenes de magnitud.



MAPA DE RESTRICCIÓN DEL FAGO LAMDA ZAP II

PREPARACION DE ADAPTADORES (105, 107)

Para la clonación de utilizaran adaptadores con varios sitios de restricción, que serán pegados al cDNA para su posterior introducción al vector.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Los oligonucleótidos sintéticos de 20 y 24 nucleótidos (20ámero y 24ámero) fueron purificados por Electroforesis en gel de Acrilamida al 20%/8M urea/TBE (ver técnica).
- 2.- La banda correspondiente fué observada en UV shadowing y cortada para su elución en 1 ml de agua especial toda la noche ó 3 h a 37°C en un tubo eppendorf.
- 3.- Purificar por columna de SEPACK de la siguiente manera:
 - a).-Lavar la columna con 10 ml de acetonitrilo
 - b).-Lavar la columna con 10 ml de agua
 - c).-Pasar cada oligo por separado (30-40 ug)
 - d).-Lavar con 3 ml de agua especial (se eluye la urea)
 - e).-Eluir el oligo con 3 ml de acetonitrilo 50% (usar agua especial).
 - f).-Secar al vacío.
- 4.- Como se eluye el colorante, lavar 3 veces con etanol. Centrifugar en cada lavado a 16,000 rpm 4°C y decantar.
- 5.- Secar el etanol remanente y resuspender a 1 ug/ul cada uno de los oligos.
- 6.- Calcular las nanomolas existentes de cada uno de los oligos. Del 20ámero 1nmol-6.6 ug y del 24ámero 1nmol-7.9 ug.
- 7.- Para el apareamiento, poner 2 nmolas de cada oligo, en tubo eppendorf. Llevar a 50 ul con TE.
- 8.- Calentar 10 min a 65°C, dejando enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos. El adaptador está ahora a 40 pmolas/ul, esto es 0.58 ug/ul.
- 9.- Para comprobar que el adaptador estaba bien realizado, se procedió a marcar radiactivamente mediante Kinación:
 - 2 ul (1 ug ó 80 picomolas) del adaptador
 - 4 ul agua especial
 - 1 ul de amortiguador de Kinasa 10x
 - 1.5 ul (100 uCi) gama ATP P³²
 - 1.5 ul Kinasa (15 u)
- 10.-Incubar a 37°C por 2 horas.
- 11.-Determinar incorporación a los 90 min (ver protocolo). En promedio las Incorporaciones obtenidas oscilaban entre un 20 y 30 % de incorporación.
- 12.-Llevar a 300 ul con TE e inactivar Kinasa por extracción fenol/cloroformo.
- 13.-Precipitar con 125 ul de acetato de amonio 7.5M y 950 ul de etanol al 95%. Baño hielo seco etanol por 20 min. Centrifugar 4°C por 15 min a 16,000 rpm. Secar a vacío. Resuspender en 10 ul de TE.
- 14.-Se verificar ahora los patrones de restricción. Se incuban a 37°C por 3 horas las siguientes reacciones:

Ligación	Kinado/Bam HI
Agua 2ul	Agua 7 ul
Adaptadores 4ul (32 pmolas)	Adaptador/kinado 1 ul (8 pmolas)
Amortiguador ligasa 10x 1 ul	Amortiguador Bam HI 10x 1 ul
10 mM ATP 1 ul (1 mM final)	Enzima Bam HI 1 ul (10 u)
T4 DNA ligasa 2 ul (2 u)	

Nota.- Inactivar ligasa

Ligado/Eco-RI
 Agua 7 ul
 Adap-ligado 1 ul (3 pmolas)
 Amortiguador Eco-RI 10x 1ul
 Enzima Eco-RI 1 ul (10 u)

Ligado/Bam HI
 Agua 7 ul
 Adap-ligado 1 ul (3 pmolas)
 Amortiguador Bam HI 10x 1 ul
 Enzima Bam HI 1 ul (10 u)

15.-Si los fragmentos esperados son los que a continuación se mencionan, el adaptador está bien. Estos son valorados en un gel de acrilamida 20%/8M urea/TBE que es expuesto a autorradiografía.

Reacción Oligonucleótidos originados
 Adaptador Kinado20+ y 24+ nt.
 Kinado digerido Bam HI.....8, 8+, 12+ y 16 nt.
 Kinado y Ligado.....44+, 24+ y 20+ nt.
 Ligado digerido Eco RI.....20+ y 24+ nt.
 Ligado digerido Bam HI.....12+, 16 y 16+ nt.

+ indica que es visible en autorradiograma.

	<i>EcoRI</i>		<i>BamHI</i>		<i>KpnI</i>		<i>NcoI</i>		
HO	AA	TTC	GAG	GAT	CCG	GGT	ACC	ATG	G
	S		CTC	CTA	GSC	CCA	TGG	TAC	C
									OH
Secuencia	Phe	Glu	Asp	Pro	Gly	Thr	Met		
Aminoácido									

ADAPTADOR UTILIZADO
 (Diseñado por Amersham)

CONSTRUCCION DEL BANCO DE EXPRESION CLONACION (107)

I.- LIGACION DE ADAPTADORES

PROCEDIMIENTO

1.- Descongelar el amortiguador de la T4 ADN ligasa, el agua especial y los adaptadores a 4°C.

2.- Se incuban a 15°C de 16 a 20 horas las siguientes reacciones:

	ADNc	Control (extremos rasurados)
ADN	4 ul (1 ug)	0.5 ul (0.5 ug)
Agua especial	2 ul	2.5 ul
Amortiguador	10x 2 ul	1 ul
Adaptador	5 ul (200 pmolas)	2.5 ul (100 pmolas)
ATP 10 mM	2 ul (1 mM final)	1 ul (1 mM final)
T4 ADN ligasa	5 ul (10 u)	2.5 ul (5 u)

3.-Parar la reacción con 1 ul de 0.5 M EDTA.

II.- ELIMINACION DE ADAPTADORES POR COLUMNA SEPHAROSA CL-4B

PROCEDIMIENTO

1.- Degasar la sefarosa CL-4B. Saturar con solución amortiguadora para la columna a temperatura ambiente.

2.- Lavar la columna con agua bidestilada y posteriormente con la solución amortiguadora. Montar la columna sin dejar burbujas de aire atrapadas.

3.- Lavar la columna con 2 volúmenes de solución amortiguadora.

4.- Pasar la muestra en un volumen pequeño (no más de 50 ul). Esperar a que la muestra entre a la columna.

5.- Pasar primero 100 ul de amortiguador y posteriormente todo el volumen que sea necesario, para colectar 20 - 25 fracciones.

6.- Las fracciones deberán ser colectadas en tubos eppendorf, de 3 en 3 gotas (aproximadamente 250 ul cada una).

7.- Contar 2 ul de cada fracción, poniendolos a secar en papel Whatman. Un pico debe de aparecer entre las fracciones 6 y 12.

8.- Juntar la primer mitad del pico y precipitar con 2.5 vol. de etanol (no agregar más sal).

9.- Precipitar el resto de las fracciones, juntandolas en grupos de 6.

10.-Resuspender en 50 ul de TE cada grupo de fracciones.

11.-Contar 1 ul de cada fracción y correr junto con marcadores, un gel de agarosa 1% TBE y otro de 20% acrilamida/8M Urea/TBE. Exponer el tiempo necesario a un film Kodak. Revelar.

Debe de comprobarse que en la fracción que contiene el ADNc no hay adaptadores.

Nota.- Cuando la muestra no está marcada el gel se corre posterior a el marcaje de la muestra.

III.-MARCAJE DEL DNac : KINACION (105)

PROCEDIMIENTO

1.- Se disponen las siguientes reacciones:

	ADNc	Control
Muestra	50 ul	50 ul
Solución TE	10 ul	10 ul
Amortiguador kinasa 10x	8 ul	8 ul
T4 Polinucleótido Kinasa	10 ul (100u)	10 ul (100u)
Gama ATP P ³² 100 uCi	2 ul	2 ul

2.- Incubar a 37°C 30 minutos.

3.- Determinar Incorporación (alrededor de 25%)

4.- Agragar 8 ul de 100 mM ATP frío para una concentración final de 10 mM.

5.- Incubar 10 minutos más a la misma temperatura.

6.- Extraer Fenol/Cloroformo

7.- Llevar a 300 ul con TE y precipitar con 125 ul de acetato de amonio 7.5 M y 950 ul de etanol al 95%.

8.- Baño hielo seco/etanol 15 minutos. Centrifugar 4°C a 16,000 rpm por 15 min.

9.- Secar y resuspender en 300 ul. Repetir precipitación con acetato de amonio. Resuspender en solución TE.

10.-Precipitar ahora con un décimo de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol.

11.-Lavar la pastilla con etanol al 70%.

12.-Centrifugar, decantar y secar al vacío. Resuspender en TE a 50 ng/ul (20 ul).

13.-Para checar el marcaje y la presencia de adaptadores, se digiere la muestra y el control (2 ul de c/u) con 10 u de Bam-HI por 3 horas a 37 °C.

14.-Correr un gel de agarosa 1% TBE y otro de acrilamida 20%/8M Urea/TBE. Correr en ambos geles, marcadores, marca libre diluida, cDNA y control digeridos y sin digerir.

15.-Exponer geles a película Kodak. Revelar.

No deben de existir adaptadores y la muestra no debe de estar dañada.

VIII.- RESULTADOS

Como se discutió en la estrategia experimental, los resultados se presentan en 2 partes, la primera de ellas corresponde a la caracterización del anticuerpo contra la PGA II y en la segunda parte se muestran los avances alcanzados para la construcción del banco de expresión.

CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO CONTRA LA PGA II

El anticuerpo a caracterizar, fué producido en cuyo (*Cavia porcellus*), contra la PGA II de conejo (*Oryctolagus coniculus*)(103). Como dicha enzima es una proteína membranal (92), distribuida heterogéneamente en el cerebro de mamíferos (94), se trabajó con extractos crudos de cerebro total. Debido a que ha sido posible detectar el enriquecimiento de la actividad de PGA II en fracciones membranales obtenidas por dos diferentes métodos (95, 104), se decidió realizar la inmunoprecipitación de dicha fracciones para correlacionar el enriquecimiento de la actividad enzimática con la proteína inmunodetectada.

INMUNOPRECIPITACION DE EXTRACTOS CRUDOS DE CEREBRO DE CONEJO.- Se realizaron inmunoprecipitaciones de las fracciones total (FT) y membranal (FM) de cerebro de conejo, obtenidas de acuerdo al método de Wilk et al (104). Con el objeto de probar si el anticuerpo reconocía de igual manera la proteína unida a membrana, que la liberada por tripsinización ligera (104), las fracciones antes mencionadas, fueron a su vez tripsinizadas por una hora a 37°C. Cabe mencionar que fué importante realizar el paso de tripsinización, ya que el anticuerpo fué generado con una preparación de PGA II cuya purificación contempló un paso de tripsinización ligera, para liberar a la enzima de la membrana. Los resultados muestran que dos proteínas de 45 y 34 Kd se encuentran enriquecidas en la FM, la cual, al ser tripsinizada y posteriormente reveladas, no se detectan las proteínas antes reconocidas por el anticuerpo en la FM (FIGURA R1 A). En la tripsinización de la FT, por el contrario, pueden observarse ambas proteínas, aunque la señal se encuentra empobrecida.

Para verificar este resultado y correlacionar el enriquecimiento de la actividad enzimática con la o las proteínas detectadas, extractos crudos de cerebro de conejo fueron fraccionados de acuerdo a los métodos Wilk et al y Charli et al. Las fracciones obtenidas: soluble (FS) y membranal (FM) por

el primer método y total (F1T), membranal 2 (F2M), total 3 (F3T), soluble 4 (F4S) y membranal 5 (F5M) por el segundo método, fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo contra la PGA II. Los resultados muestran proteínas de 45 y 48 kd enriquecidas en las fracciones membranales obtenidas por ambos métodos (ver FIGURA R1 B y TABLA R1); la actividad enzimática también se enriquece en estas mismas fracciones (Ver TABLA R2).

Los trabajos en donde el anticuerpo fué utilizado (103, 109), reportan que éste reconoce una proteína de 48 Kd. Debido a que en nuestros experimentos detectábamos más de una proteína, se decidió recurrir al "western blot" para verificar los resultados. Por otro lado, esta prueba, al igual que el rastreo del banco de expresión, es realizado sobre nitrocelulosa; esto permitió ensayar el funcionamiento del anticuerpo en este soporte (110). La inmunodetección se llevó a cabo, también con cerebro de rata (*Ratus norvegicus*), para probar la especificidad del anticuerpo; si éste llegara a reconocer a la PGA II de rata, podría ser utilizado en estudios que se realizaran con esta especie.

WESTERN BLOT DE EXTRACTOS CRUDOS DE CEREBRO DE CONEJO Y RATA.- Las inmunodetecciones se realizaron con extractos crudos de cerebro de conejo y rata, utilizando riñón y páncreas de rata como controles negativos (organos sin actividad de PGA II). Las fracciones membranales y totales obtenidas por el método de Wilk et al, fueron corridas en PAGE-SDS, transferidas a nitrocelulosa e incubadas con el anticuerpo contra la PGA II. Se observó predominantemente una proteína de 48 kd en la FT de cerebro de conejo, mientras que la FM de este mismo tejido no se observa ninguna proteína. En cerebro de rata solo es posible detectar en la FT una banda de 48 Kd. En riñón de rata se observan en ambas fracciones una banda de 20 Kd, que se enriquece en la FM. En páncreas de rata se detectaron proteínas de 48 y 45 kd. Ver FIGURA R2 y TABLA R1.

Por otro lado, fué posible detectar el enriquecimiento de la actividad de la PGA II en las FM de cerebro de rata y conejo (TABLA R2).

Pese a la contradicción de que el enriquecimiento de la señal en las fracciones totales de cerebro de rata y conejo, no correspondían con el enriquecimiento de la actividad enzimática en las fracciones membranales, el dato más relevante era el reconocimiento de proteínas enriquecidas en fracciones membranales de tejidos en donde la actividad de PGA II es despreciable o nula (riñón y páncreas). Este resultado nos llevó a realizar un "western blot" con células Y-79 y bulbo olfatorio,

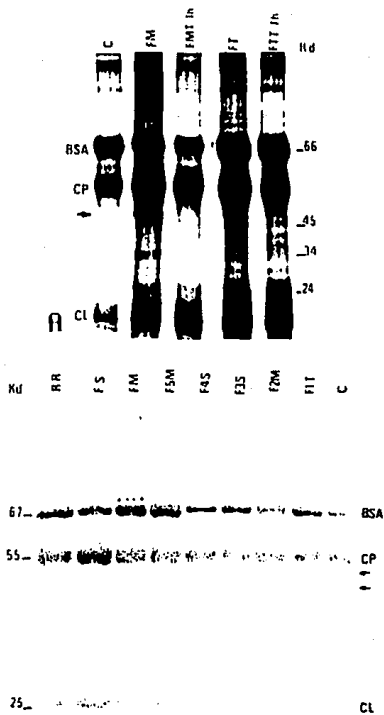


FIGURA R1.- IMUNOPRECIPITACION DE EXTRACTOS CRUDOS DE CEREBRO DE CONEJO. **A)** 100 ug de proteínas de fracción membranal (FM), total (FT), membranal tripsinizada (FMT) y total tripsinizada (FTT), fueron incubadas con el anticuerpo contra la PGA II y precipitadas con proteína A-Sepharosa. El control (C), o cero absoluto, fué realizado en las mismas condiciones, pero sin tejido. **B)** Se observan las inmunoprecipitaciones de las fracciones soluble (FS) y membranal (FM) obtenidas de cerebro de conejo de acuerdo al método de Wilk et al (104), así como las fracciones total (F1T), membranal 2 (F2M), soluble 3 (F3S), soluble 4 (F4S) y membranal 5 (F5M) obtenidas por el método de Charli et al (95). C - cero absoluto, RR - riñón de rata, BSA - albúmina sérica bovina, CP - cadena pesada del anticuerpo, CL - cadena ligera del anticuerpo, las flechas señalan las proteínas detectadas.

dado el enriquecimiento de actividad enzimática que ha sido reportado (95, 96), para esta línea celular y tejido respectivamente y por que la caracterización del anticuerpo fué realizado en la línea Y-79 (103).

WESTERN BLOT DE CELULAS Y-79 Y BULBO OLFATORIO.- Se fraccionaron A) células Y-79 y B) bulbo olfatorio de conejo, de acuerdo al método Charli et al (95), siendo posible detectar en Y-79 y Bulbo olfatorio proteínas de 45 y 48 Kd que no se enriquecían en la fracción 5 membranal (F5M), sino que presentaban un enriquecimiento en la fracción 4 soluble (F4S). C) Adicionalmente se fraccionaron células Y-79 de acuerdo al método Wilk et al (104). Se observó un enriquecimiento de las proteínas de 45 y 48 Kd en la fracción soluble. (Ver FIGURA R3 y TABLA R1).

No se detectó actividad de PGA II en la línea celular Y-79, pero sí un enriquecimiento de la actividad de esta enzima, en la fracción membranal de bulbo olfatorio (F5M).

Finalmente se decidió seleccionar la o las proteínas detectadas por el anticuerpo, mediante una cromatografía de afinidad, para confirmar resultados y llegar a concluir sobre ellos.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE PGA II.- Se realizó una cromatografía de afinidad para la PGA II y se pasaron por la columna extractos crudos de cerebro de conejo y riñón de rata. La columna pudo seleccionar una proteína de 45 Kd en cerebro de conejo y una adicional de 20 Kd en riñón de rata (ver FIGURA R6). No fué posible detectar actividad de PGA II en el eluido de la columna, pero sí en la muestra, previo al paso por la columna, debido a que la actividad de la enzima fué afectada con el amortiguador de elución. Ver TABLAS R1 y R2.

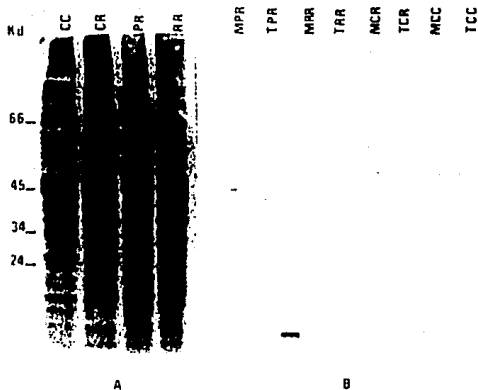


FIGURA R2.- WESTERN BLOT DE EXTRACTOS CRUDOS DE CEREBRO DE CONEJO Y RATA.- A) 100 ug de proteínas de tejidos de conejo y rata fueron corridos en PAGE-SDS, B) y transferidos e inmunodetectados con el anticuerpo contra la PGA II (dilución 1:1000). Fracciones total y membranal de cerebro de conejo (TCC y MCC), total y membranal de cerebro de rata (TCR y MCR), controles de riñón (TRR y MRR) y páncreas (TPR y MPR) de rata. Las flechas indican las proteínas detectadas.

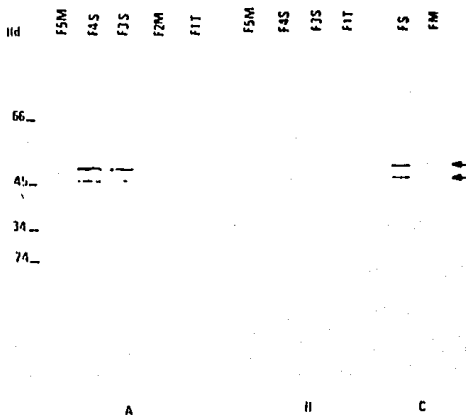


FIGURA R3.- WESTERN BLOT DE CELULAS Y-79 Y BULBO OLFATORIO .- A) Células Y-79 y B) bulbo olfatorio fueron fraccionados de acuerdo al método Charli et al. La figura muestra las fracciones 1 total (F1T), 2 membranal (F2M), 3 soluble (F3S), 4 soluble (F4S) y 5 membranal (F5M) de estos dos tejidos inmunodetectados con el anticuerpo contra la PGA II. C) Células Y-79 fueron también fraccionadas (fracciones soluble y membranal), por el método Wilk et al. e inmunodetectadas con el anticuerpo contra la PGA II. Las flechas señalan las proteínas detectadas.

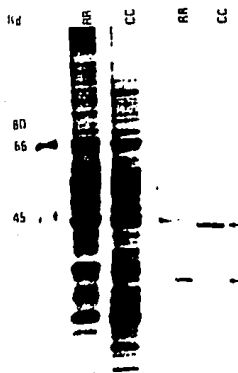


FIGURA R4.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE PGA II.- 100 μ l de PAS 4c LB se unieron a aproximadamente 400 μ g de IgG anti PGA II y posteriormente se incubó con 5 mg de tejido. Se observa que en cerebro de conejo (CC) se reconoce una proteína de 45 Kd y en riñón de rata (RR) adicionalmente es reconocida una proteína de 20 Kd.

TECNICA	TEJIDO	PROTEINAS RECONOCIDAS			ACTIVIDAD DE PGA II		
		FT	FM	FS	FT	FM	FS
INMUNOPRECIPITACION	CC	48,45	48,45	48,45	*	**	nd
		+ otras					
WESTERN	CC	48	-	nd	*	**	nd
	CR	48	-	nd	*	**	nd
	RR	20	20+	nd	-	-	nd
	PR	48,45	48,45	nd	-	-	nd
	Y-79	48,45	48,45	48,45+	-	-	nd
	BOC	48,45	48,45	48,45+	*	**	-
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	CC	45	nd	nd	*	nd	nd
	RR	45,20	nd	nd	-	nd	nd

TABLA R1.- RECOPLACION DE RESULTADOS DE LA CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO.- FT=fracción total, FM=fracción membranal, FS=fracción soluble, CC=cerebro de conejo, CR=cerebro de rata, RR=riñón de rata, PR=páncreas de rata, Y-79=línea celular, BOC=bulbo olfatorio de conejo, nd=no determinado, -=no existe, *=existe actividad, **=actividad enriquecida, +=proteína enriquecida.

TEJIDO	FRACCION TOTAL	FRACCION MEMBRANAL	FRACCION SOLUBLE
CEREBRO DE CONEJO	3.56	96	Nd
CEREBRO DE RATA	3.82	107	Nd
RIÑON DE RATA	0.005	0.02	Nd
PANCREAS DE RATA	<0.001	<0.001	Nd
Y-79	0.058	0.082	0.005
BULBO OLFATORIO DE CONEJO	6.9	186	Nd

TABLA R2.- ACTIVIDAD DE PGA II (método en referencia 95) EN DIVERSOS TEJIDOS Y LINEA CELULAR Y-79.- La actividad específica es reportada como picomoles de His-Pro-NH₂/min/mg de proteína.

AVANCES EN LA CONSTRUCCION DEL BANCO DE EXPRESION

Para la construcción del banco de expresión, primero se obtuvo ARN de cerebro de conejo (1 mg de ARN total por gramo de tejido), posteriormente se seleccionó ARN poly adenilado (85 µg de ARN poly A++ por cada 2 mg de RNA total), que sirvió para sintetizar el ADN complementario (ADNc).

SINTESIS DEL ADNc.- Se purificó ARN total de cerebro de conejo, por el método de cloruro de litio-urea, del cual, se seleccionó ARN poli-adenilado, mediante una columna de oligo-dT celulosa (FIGURA R5 A). A partir de este ARN poly-A, se sintetizaron la primera y la segunda cadena del ADNc, utilizando dos opciones como iniciadores: oligo dT (primer cadena 2.6 µg de cDNA/5 µg de ARN poly A+ y segunda cadena 2.3 µg de cDNA/2.6 µg de cDNA cadena sencilla) ó un hexánucleótido que se une al azar al templado (primer cadena 1.1 µg de cDNA/5 µg de ARN poly A+ y segunda cadena 1.1 µg de cDNA/1.1 µg de cDNA cadena sencilla), lográndose ADNc promedio de 4.4 kb con el primero y de 3 Kb con el segundo (ver FIGURA R5 B).

Posteriormente, el vector de expresión lambda ZAP II, se purificó y preparó para la clonación. Se realizaron además, las pruebas necesarias para confirmar la funcionalidad del mismo.

PREPARACION DEL VECTOR DE CLONACION.- El vector de clonación (lambda Zap II), fué amplificado, purificado y corroborado su patrón de restricción (FIGURA R6-A).

Por otro lado, se realizaron pruebas de digestión del vector, utilizando la enzima de restricción Eco-RI, así como de defosforilación del mismo. Se comprobó que Zap II era capaz de ser ligado y generar el 100% de placas azules en la infección de la cepa XL1-Blue. Por el contrario, el vector defosforilado no era capaz de ser ligado y por lo tanto, perdía su capacidad de infección (FIGURA R6 B).

Para la ligación del ADNc al vector, se utilizaría un adaptador, que fué diseñado por Amersham y reproducido en nuestro instituto.

SINTESIS DEL ADAPTADOR.- El adaptador fué sintetizado por la Unidad de Síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología UNAM. La purificación y corroboración del patrón de restricción se realizó en geles de Acrilamida 20%/8M Urea (datos no mostrados).

Una vez que el adaptador es unido al ADNc, se elimina el exceso de adaptadores, para que no interfieran en la ligación del ADNc al vector. Para este fin, se estandarizó una columna de exclusión molecular.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR PARA SEPARAR cDNA DEL ADAPTADOR.- La columna se preparó con Sepharosa CL-4B (Farmacia). El fraccionamiento permite delimitar que previo a la fracción 22 (aproximadamente 200 ul c/u) son excluidos ADN mayores a 1 Kb y que a partir de la fracción 24 aparece el adaptador (ver FIGURA R7 A y B).

Los pasos posteriores contemplan la ligación al vector, el empaquetamiento, la titulación y la expresión del banco de ADNc. El rastreo del banco aguardará hasta el momento en que se disponga de una buena sonda.

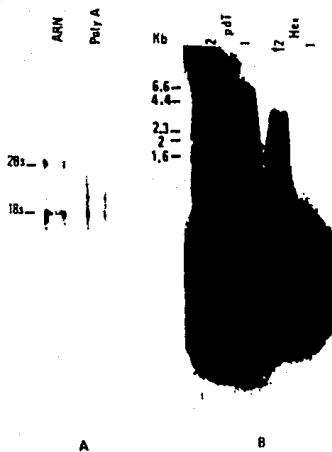


FIGURA R5.- SINTESIS DEL ADNc.- La figura muestra A) el ARN poly-A seleccionado del ARN purificado por el método de cloruro de litio-urea y B) la primera y la segunda cadena del ADNc sintetizado utilizando como iniciadores, oligo dT o un hexanucleótido que se une al azar al templado.

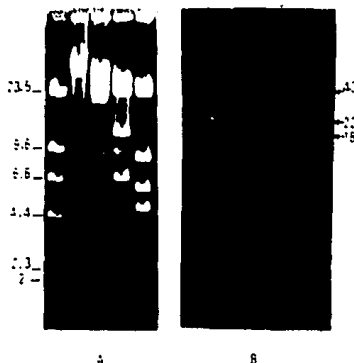


FIGURA R6.- PREPARACION DEL VECTOR DE CLONACION.- La parte A, muestra al fago lambda Zap II sin digerir (a) y b) digerido con Eco-RI (22 y 18 Kb),c) Bam-HI (6.5, 11.3 y 22 Kb) y d) Sma-I (4.6, 5.9, 8.2 y 22 Kb). La parte B muestra el vector digerido con Eco-RI (a); digerido con Eco-RI y ligado (b); digerido con Eco-RI y defosforilado (c); y digerido con Eco-RI, defosforilado y ligado (d). Geles Boyer's/1% Agarosa.

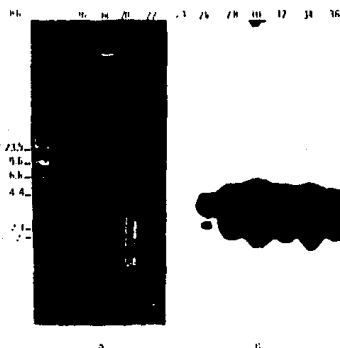


FIGURA R7.- ELIMINACION DEL ADAPTADOR- Columna de Sepharosa CL-4B. La columna fué lavada con solución TE y las fracciones colectadas con el mismo amortiguador. A) Fracciones que contienen ADN de más de 1 Kb, gel agarosa 1%/ TBE, teñido con bromuro de etidio. B) Fracciones que contienen el adaptador, gel de acrilamida 20%/8M Urea, exposición autorradiografica por 1 h a -70°C.

DISCUSION

Los resultados de la caracterización del anticuerpo, indican que éste reconoce por lo menos 3 proteínas: una de 45 Kd y otra de 48 Kd detectadas por inmunoprecipitación y western de cerebro de conejo, cerebro de rata, sinaptosomas de cerebro de conejo (datos no mostrados), bulbo olfatorio de conejo y de la línea celular Y-79; y una tercer proteína de 20 Kd es reconocida por el anticuerpo en riñón de rata, por medio de western y columna de afinidad.

Otras proteínas que son reconocidas en las inmunoprecipitaciones (34 Kd, 80 Kd, y mayores), no son reconocidas por western; sin embargo, no necesariamente se trata de un reconocimiento específico por parte del anticuerpo; consideramos la posibilidad de una precipitación inespecífica, ocasionada por el arrastre de proteínas asociadas a las proteínas reconocidas específicamente. Por otro lado, es factible, que existan mejores condiciones para el reconocimiento de epitopes en solución, que de epitopes unidos a la membrana de nitrocelulosa, puesto que en este último caso, se establece una interacción entre la proteína y la membrana, que podría afectar el reconocimiento por parte del anticuerpo.

Con respecto a la actividad de la PGA II de las muestras analizadas, el enriquecimiento de dicha actividad, no correspondió con el enriquecimiento de la señal en las inmunodetecciones. Esto quiere decir que las proteínas detectadas, no guardan relación con la PGA II, puesto que no existe correlación con la actividad de la enzima. En el único caso que parecen correlacionar los enriquecimientos de actividad con presencia de la proteína reportada de 48 Kd, es en la inmunoprecipitación de cerebro de conejo, sin embargo, también se observa el enriquecimiento de otras proteínas, que no guardan relación con el peso molecular reportado para la enzima (109). Se establece por lo tanto, que el anticuerpo está reconociendo más de una proteína, lo cual nos hace descartar la posibilidad de utilizar dicho anticuerpo como sonda para el rastreo del banco de expresión, puesto que además, no hay evidencia de que alguna de estas proteínas sea la PGA II.

Es de vital importancia destacar, que en los trabajos en donde se utilizó el anticuerpo para estudiar la regulación de la PGA II (103, 109), se puede apreciar una segunda banda de aproximadamente 45 Kd (la primera es de 48 Kd), que fue ignorada en la discusión. Ambas bandas son las mismas que hemos detectado en la línea celular Y-79, Bulbo olfatorio de conejo y cerebro de conejo.

Para poder rastrear el banco con otra sonda, además del anticuerpo, existe la posibilidad de utilizar un oligonucleótido sintético deducido de la secuencia primaria de la enzima, por lo cual se intentó secuenciar la proteína (trabajo del Dr Wilk). En uno de los intentos, fué secuenciada una parte de la Creatinin Kinasa, que se co-purificó con la PGA II (111), a través del mismo método que se utilizó para purificar la PGA II con la que se realizara el anticuerpo. Este hecho nos permite sugerir la posibilidad de que el anticuerpo reconoce a la Creatinin Kinasa, aunque los pesos moleculares detectados en nuestros experimentos, no correspondan con los reportados para esta enzima (dímero formado de monómeros de 41 Kd), no descartamos la posibilidad de que las proteínas adicionales que fueron detectadas, correspondan a algunas de las isoformas (112, 113) de dicha enzima ó a proteínas relacionadas a ella.

Por otro lado resulta difícil comprender como es que un anticuerpo policlonal, no afecta la actividad de la PGA II cuando se encuentra unido a la enzima (111), ya que, es muy alta la probabilidad de que un anticuerpo de esta naturaleza reconozca un gran porcentaje de los epítopes de la proteína; sin embargo, es posible aunque muy poco probable, que el sitio activo de la enzima se encuentre en el interior de la molécula, y por lo tanto protegido. Todo esto junto con los resultados mencionados anteriormente refuerzan la idea de que el anticuerpo no está dirigido contra la PGA II.

La hipótesis de que la enzima membranal (PGA II) se origina del mismo gen que la enzima soluble (Tirofibrinasa), sigue siendo un modelo atractivo de estudio. Reportes previos (103, 104) indican que la proteólisis ligera no afecta la actividad de la PGA II liberada, con lo cual podemos deducir que su dominio de anclaje podría ser independiente del dominio activo. Este hecho nos lleva a proponer la hipótesis, de que ambas enzimas podrían ser generadas por el mismo gen, a través de un splicing alternativo del ARNm primario. Múltiples ejemplos de genes que generan formas solubles y membranales por esta vía han sido descritos (43 - 49). Resulta más difícil proponer, la existencia de una proteasa que libere la forma membranal, para generar la forma soluble; a la fecha esto solo ha sido observado en proteínas ancladas vía IP_3 , que son liberadas por PLC (115). Una tercera posibilidad es el procesamiento postraduccional diferente que la enzima pudiese tener, para generar ambas formas enzimáticas.

En conclusión, el anticuerpo es inespecífico para la PGA II, puesto que reconoce varias proteínas de diferente peso molecular, según el tejido inmunodetectado. Además, la inmunodetección de las

proteínas no guarda relación con la actividad de la enzima, ya que en tejidos donde no hay actividad de PGA II, pudieron detectarse proteínas; por el contrario, fracciones en donde había actividad enzimática, no existía proteína alguna detectada. Por lo tanto, el rastreo del banco tendrá que esperar a que se disponga de una sonda adecuada.

Cabe señalar que otras estrategias para la clonación de la PGA II han sido consideradas: la posibilidad de realizar y caracterizar otro anticuerpo ha sido descartada, por que consideramos que aunque se llegara a obtener un anticuerpo específico, el rastreo del banco con este tipo de sonda (110) representa un alto riesgo de fracaso; la transfección a oocitos de Xenopus (116) utilizando como sonda la actividad de PGA II, es una opción que no será tomada debido, dentro de otras razones, a que no se dispone de la metodología adaptada y el implementarla representa un esfuerzo tan intenso como el aislamiento de la clona específica; la opción más viable y en la que se está trabajando, es en la purificación y secuenciación de la enzima para el diseño de oligonucleótidos sintéticos, para ser utilizados como sonda.

Con respecto al banco de expresión, a la fecha se cuenta con el cDNA, con el vector listo para clonar, con el adaptador preparado y con el método de eliminación del adaptador estandarizado; la conclusión de éste está en proceso.

REFERENCIAS

- 1.- Darnell, J., J.H. Lodish, D. Baltimore, 1990. Cell to Cell Signaling: Hormones and Receptors. In: Molecular Cell Biology Scientific American Books. N.Y. pag. 709-762.
- 2.- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, 1989. Cell Signaling. In: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing. Inc. N.Y. and London. pag. 628-724.
- 3.- Tonegawa, S., 1985. The Molecules of the Immune System. Sci-Am. 253: pag. 122-131.
- 4.- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, 1989. The Nervous System. In Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing. Inc. N.Y. and pag. 1059-1136.
- 5.- Iversen, L.L., 1991. Signals are sent from one Neuron to another by diverse Chemical Transmitters. Sci. Am. 240: pag. 100-109.
- 6.- Ross, E.M., 1989. Signal Sorting and Amplification Through Protein Coupled Receptors. Neuron 3: pag. 141-152.
- 7.- Weiss, E.R., et al, 1988. Receptor Activation of Proteins. FASEB J. 2: pag. 2841-2848.
- 8.- Krueger, B.K., 1989. Toward an Understanding of Structure and Function of Ion Channels the FASEB J. 3: pag. 1906-1914.
- 9.- Unwin, N., 1989. The Structure of ion Channels in Membranes of Excitable Cells. Neuron 3: pag. 665-676.
- 10.- Ullrich, A. and J. Schelessinger, 1990. Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity Cell 61: pag. 203-212.
- 11.- Berridge, M.S., 1991. The Molecular Basis of the Communication within the Cell. Science 257: pag. 118-124.
- 12.- Berridge, M.S. and R.F. Truine, 1984. Inositol Triphosphate, a novel second messenger in Cellular Signal Transduction. Nature 312: pag. 315-320.
- 13.- Berridge, M.S. and C.W. Taylor, 1988. Inositol Triphosphate and Calcium Signaling, Cold-Spring-Harbor-Symp-Quant-Biol. 53, pt 2: pag. 927-933.
- 14.- Nestler, E.J. and P. Greengard, 1989. Protein Phosphorylation and the Regulation of Neuronal Function. In Basic Neurochemistry: Molecular Celular and Medical Aspects. Raven Press., editor Raven Press. N.Y. pag. 373-398.
- 15.- Taylor, S.C., J.A. Buechler, and W. Yonemoto, 1990. cAMP - Dependent Protein Kinase; frame work for a diverse family of regulatory enzymes. Annu. Rev. Biochem. 59: pag. 971-1005.
- 16.- Kikkawa, U., A. Kishimoto, and Y. Nishizuka, 1989. The Protein Kinase C family; heterogeneity and its implications. Annu. Rev. Biochem. 58: pag. 31-44.
- 17.- Carter, D.A., and D. Murphy, 1991. Rapid Changes in Poly(A) tail length of Vasopressin and Oxytocin mRNAs from a Common. Early Component of Neurohypophysial Peptide Gene Activation Following Physiological Stimulation. Neuroendocrinology 53: pag. 1-6.
- 18.- Waterman, M., and G.H. Murdoch, 1985. Cyclic AMP Regulation of Eucaryotic Gene Transcription by two Discrete Molecular Mechanisms. Science 225: pag. 267-269.
- 19.- Evans, R.M., 1988. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. Science 240: pag. 889-895.
- 20.- Morgan, J.I., and T. Curran, 1988. Calcium as a Modulator of the Immediate - early gene cascade in neurons. Cell Calcium 9: pag. 301-311.

- 21.- Sheng, M., and M.E. Greenberg, 1990. The Regulation and Function of C-fos and other Immediate - early genes in the Nervous System. *Neuron* 4: pag. 477-485.
- 22.- Lehninger, A.L., 1983. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ed. Omega. Barcelona, pag. 97-124.
- 23.- Barker, J.L., et al, 1980. The Role of peptides in Neuronal Function. Marcel Dekker Inc. USA.
- 24.- Aréchiga, H., et al, 1983. Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas. Publicaciones UNAM, Méx.
- 25.- Millar, R.P., et al, 1980. Neuropeptides Biochemical and Physiological Studies. Churchill Livingstone. N.Y.
- 26.- Gierasch, L.M., 1989. Signal Sequences. *Biochemistry* 28: pag. 923-930.
- 27.- Rapoport, T.A., 1990. Protein Transport Across the ER Membrane *TIBS* 15: pag. 355-358.
- 28.- Fisher, J.M., et al, 1988. Múltiple Neuropeptides Derived from a Common Precursor are Differentially Packaged and Transported. *Cell* 54: pag. 813-822.
- 29.- Mains, R.E., et al, 1990. Cellular and Molecular Aspects of Peptide Hormone Biosynthesis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 11: pag. 52-89.
- 30.- Knight, D.E., Grafenstein, H.U., Athay de C.M., 1989. Calcium dependent and Calcium independent Exocytosis. *TINS* 12: pag. 451-458.
- 31.- Kelly, R.B., 1988. The Cell Biology of the Nerve Terminal. *Neuron* 1: pag. 431-438.
- 32.- McKelvy, F.G., 1983. Enzymatic Degradation of Brain Peptides. In: *Brain Peptides*. John Wiley and Sons, N.Y., pag. 117-133.
- 33.- Charli, J.L., et al, 1989. Pyroglutamyl Peptidase II Inhibition Specifically Increases Recovery of TRH Release from rat Brain Slices. *Neuropeptides* 14: pag. 191-196.
- 34.- Ponce, G., et al, 1988. Tissue specific regulation of PGAlI activity by thyroid hormones, *Neuroendocrinology*. 48: pag. 211-213.
- 35.- Lynch, D.R. and Snyder, S.H., 1986. Neuropeptides: Múltiple Molecular Forms, Metabolic Pathways, and Receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55: pag. 773-799.
- 36.- Semenza, A., 1986. Anchoring and Biosynthesis of Stalked brush border membrane proteins: Glycosidases and Peptidases of Enterocytes and Renal Tubull. *Ann. Rev. Cell Biochem.* 2: pag. 250-313.
- 37.- Ferguson, M.A.S., 1988. Cell-Surface anchoring of proteins via Glycosyl-Phosphatidylinositol Structures. *Ann. Rev. Biochem.* 57: pag. 285-320.
- 38.- Cross, G.A.M., 1990. Glycolipid Anchoring of plasma membrane proteins. *Annv. Rev. Cell. Biol.* 6: pag. 1-39.
- 39.- Turner, A.J., 1988. Metabolism of Neuropeptides. *ISI Atlas of Science: Pharmacology*. pag. 362-366.
- 40.- Low, M.G. and Salliel, A.R., 1988. Structural and Functional Roles of Glycosyl-Phosphatidylinositol in Membranes. *Science*. 239: pag. 268-275.
- 41.- Singer, S.S., 1990. The Structure and Insertion of Integral proteins in membranes. *Annv. Rev. Cell. Biol.* 6: pag. 247-296.
- 42.- Lisanti, M.P. and Rodríguez-Boulan, E., 1990. Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial Cells. *TIBS*. 15: pag. 113-118.

- 43.- Stroynowski, I., Soloski, M., Low, M.G. and Hood, L., 1987. A Single Gene Encodes Soluble and Membrane-Bound Forms of the Major Histocompatibility Qa-2 Antigen: Anchoring of the Product by a Phospholipid Tail. *Cell*. 50: pag. 759-768.
- 44.- Caras, I.W. and Weddell, G.N., 1989. Signal Peptide for Protein Secretion Directing Glycophospholipid Membrane Anchor Attachment. *Science*. 243: pag. 1196-1198.
- 45.- Berger, J., Micanovic, R., Greenspan, R.J. and Udenfriend, S., 1989. Conversion of placental alkaline phosphatase from a phosphatidylinositol-glycan-anchored protein to an integral transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: pag. 1457-1460.
- 46.- Mosley, B., Beckmann, M.P., March, C.J., Idzerda, R.L., Gimpel, S.D., VandenBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J., Wignall, J.M., Smith, C., Gallis, B., Sims, J.E., Urdal, D., Widner, M.B., Cosman, D. and Park, L.S., 1989. The Murine Interleukin-4 Receptor: Molecular Cloning and Characterization of Secreted and Membrane Bound Forms. *Cell*. 59: pag. 335-348.
- 47.- Doherty, P., Barton, C.H., Dickson, G., Seaton, P., Rowett, L.H., Moore, S.E., Gower, H.J. and Walsh, F.S., 1989. Neuronal Process Outgrowth of Human Sensory Neurons on Monolayers of Cells Transfected with cDNA for Five Human N-CAM Isoforms. *Cell Biology*. 109: pag. 789-798.
- 48.- Kehry, M., Ewald, S., Douglas, R., Sibley, C., Raschke, W., Fambrough, D. and Hood, L., 1980. The Immunoglobulin μ Chains of Membrane-Bound and Secreted IgM Molecules Differ in Their C-Terminal Segments. *Cell*. 21: pag. 393-406.
- 49.- Giblin, P., Ledbetter, J.A. and Kavathas, P., 1989. A secreted form of the human lymphocyte cell surface molecule CD8 arises from alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: pag. 998-1002.
- 50.- Waneck, G.L., Stein, M.E. and Flavell, R.A., 1988. Conversion of a PI-Anchored Protein to an Integral Membrane Protein by a Single Amino Acid Mutation. *Science*. 241: pag. 697-699.
- 51.- Hokfelt, T., 1991. Neuropeptides in Perspective: The Last Ten Years. *Neuron*. 7: pag. 867-879.
- 52.- Schwartz, J.C., 1983. Metabolism of enkephalins and the inactivating neuropeptidase concept. *Trends Neurosci.* 8: pag. 143-151.
- 53.- McKelvy, J.F., et al, 1982. Neuropeptide degradation. In: *Molecular genetic Neuroscience* (F.O. Schmitt, S.J. Bird and F.E. Bloom, eds.). Raven Press. N.Y., pag. 189-199.
- 54.- White, J.D., et al, 1985. Biochemistry of peptide-secreting neurones. *Physiol. Rev.* 65: pag. 553-606.
- 55.- Hui, K.S., et al, 1981. Regional and Subcellular distribution of Met and Leu-enkephalin degrading activity in rat brain. *Neuropeptides*. 1: pag. 167-173.
- 56.- Chubb, I.W. and Smith, A.D., 1975. Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 191: pag. 263-269.
- 57.- Schwartz, J.C., et al, 1981. Biological inactivation of enkephalinase and the role of enkephalin dipeptidyl Carboxypeptidase. *Life Sci.* 29: pag. 1715-1740.
- 58.- Hersh, L.B., 1985. Characterization of membrane bound aminopeptidases from rat brain. Identification of the enkephalin degrading aminopeptidases. *Neurochem.* 44: pag. 1427-1435.

- 59.- Waksman, G., et al, 1986. Autoradiographic distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of μ opiod receptors in rat brain. PNAS USA. 83: pag. 1523-1527.
- 60.- Littlewood, G.M., et al, 1988. Neuropeptides and their peptidases: Functional considerations. Neurochem. Int. 12: 383-389.
- 61.- Bauer, K., 1983. Biomedical prupertes of TRH-inactivating enzymes. In: TRH. (E. C. Griffiths and G.M. Bennett, eds.) Raven Press. N.Y., pag. 103-107.
- 62.- Torres, H., et al, 1986. Subcellular distribution of the enzymes degrading TRH and metabolites in rat brain. Neurochem. Int. 9: pag. 103-110.
- 63.- Brownstein, M.J., et al, 1974. Thyrotropin releasing Hormone in specific nucleic of rat brain. Science. 185: pag. 267-269.
- 64.- Holdfelt, F., et al, 1979. Localization of Hypophysiotropic peptides and other biologically active peptides within the brain. Ann. Rev. Physiol. 41: pag. 587-602.
- 65.- Schally, A.V., et al, 1969. Isolation and properties of TRH. J. Mol. Chem. 244: pag. 4077-66.- Burgus, R., et al, 1970. Characterization of ovine hypothalamic hipophysiotropic TSH releasing Factor. Nature. 226: pag. 321-325.
- 67.- Aizawa, T. and Greer, M.A., 1981. Delineation of the hypothalamic area controlling Thyrotropin secretion (TSH): stimulation by a hypothalamic peptide (TRF). Endocrinol. 73: pag. 564-572.
- 68.- Plotsky, P.M. and Neill, J.D., 1982. Interactions of Dopamine and Thyrotropin Releasing Hormone in the regulation of Prolactin release in lactating rats. Endocrinology 111: 1, pag. 168-173.
- 69.- Martínez de la Escalera, G. and Weiner, R.J., 1988. Mechanism(s) by wich the transient removal of Dopamine regulation potentiates the Prolactin-releasing action of Thyrotropin Releasing Hormone. Neuroendocrinol. 47: pag. 186-193.
- 70.- Jackson, I.M.D. and Lechan, R.M., 1987. Thyrotropin Releasing Hormone in: Brain Peptides Update (Martin, J.B., et al) Vol. 1. John Wiley and Sons., pag. 107-118.
- 71.- Méndez, M., et al, 1987. Regional distribution of in vitro release of Thyrotropin Releasing Hormone in rat brain, Peptides. 8: pag. 291-298.
- 72.- Irluchisima, T. and Wilber, J.F., 1987. Thyrotropin Releasing Hormone and Histidyl-Proline DKP: Stimulation of secretion from hypothalamic fragments in vitro by depolarizing Agents. Endocrinol. 120: 3, pag. 915-918.
- 73.- Ogawa, N. et al, 1982. Characteristics of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors in rat brain. Peptides 3: pag. 669-677.
- 74.- Horst, W.D., et al, 1979. Influence of Thyritropin Releasing Hormone on the synaptic availability of Catecholamines in brain. In: Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and other peptides (Colluct, R., et al) Raven Press, N.Y., pag. 141-143.
- 75.- Kerwin, R.W. and Pycocck, C.J., 1979. Thyrotropin Releasing Hormone stimulateds release of H-Dopamine from slices of rat nucleus accumbens in vitro. J. Pharmacol. 67: pag. 323-325.
- 76.- Brewster, D., et al, 1983. Species variations in TRH inactivation: advantages of stable analogues. In: Thyrotropin Releasing Hormone. Raven Press. N.Y., pag. 109-118.

- 77.- Lechan, R., et al, 1986. TRH Precursor: Characterization in rat brain. *Science*. 231: pag. 159-161.
- 78.- Turner, A.J., 1984. Neuropeptide processing enzymes. *TINS*. July., pag. 258-260.
- 79.- Richter, K., et al, 1984. Biosynthesis of TRH in the Skin of *Xenopus laevis* parhal sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO. J.* 3: pag. 617-621.
- 80.- Kuchler, K., et al, 1990. Two precursors of TRH from Skin of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265: pag. 11731-11733.
- 81.- Lee, S.L., et al, 1988. Structure of the gene encoding rat TRH. *J.B.C.* 262: pag. 16604-16609.
- 82.- Goodman, R.H., 1990. Regulation of Neuropeptide gene expression. *Annv. Rev. Neurosci.* 13: pag. 111-127.
- 83.- Busby, W.H., et al, 1987. An enzyme that converts Glutamyl peptides into pyroglutamyl peptides. *J. Biol. Chem.* 262: pag. 8532-8535.
- 84.- Mains, R.E., et al, 1985. Hormonal drug and dietary factors affectin peptidyl glycine alfa amidating monooxygenase activity in various tissues of the adult male rat. *Endocrinol.* 116: pag. 2505.
- 85.- Charil, J.C., et al. Accumulation of TRH by rat hypothalamic Slices. *J. Neurochem.* 42: pag. 981-986.
- 86.- Garat, B., Miranda, J., Charil, J.L. and Joseph-Bravo, P., 1985. Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino-peptidase degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides.* 6: pag. 461-469.
- 87.- Taylor, W.L. and Dixon, J.E., 1978. Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol.Chem.* 253: pag. 6934-6940.
- 88.- Prasad, C. and Peterkofsky, A., 1976. Demonstration of pyroglutamyl peptidase and amidase activities toward thyrotropin-releasing hormone in hamster hypothalamus extracts. *J. Biol. Chem.* 251: pag. 3229-3234.
- 89.- Orłowski, M., Wilk, E., Pearce, S. and Wilk, S., 1979. Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit. *J. Neurochem.* 33: pag. 461-469.
- 90.- Charil, J.L., et al, 1989. Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically recovery of TRH release from rat brain slices. *Neuropeptides.* 14: pag. 191-196.
- 91.- Joseph-Bravo, P., et al, 1979. Degrading LHRH and TRH. *Brain Res.* 166: pag. 321-329.
- 92.- O'Connor, B. and O'Cuinn, G., 1984. Localization GT a Narrow Specificity Thyroliberin Hydrolyzing Piroglutamate Aminopeptidase in Synaptosomal membranes of Guinea pig Brain. *Eur. J. Biochem.* 144: pag. 271-278.
- 93.- Charil, J.L., et al, 1988. The Narrow Specificity Pyroglutamate Amino Peptidase degrading TRH in rat brain is an Ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 13, 2: pag. 237-242.
- 94.- Wilk, S., Friedman, T.C. and Wilk, E.K., 1986. Purification and Properties of Rabbit Brain Thyroliberinase, a membrane bound. TRH degrading enzyme. *FASEB Abstract Form.* (April 1986).
- 95.- Vargas, M.A., et al, 1987. Regional distribution of the membrane bound Pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79: pag. 311-314.
- 96.- Wilk, S., et al, 1988. Occurrence of PPII, a Specific TRH degrading enzyme in Rabbit Retinal Membranes and in Human Retinoblastoma Cells. *Neuropeptides* 12: pag. 43-47.

- 97.- O'Connor, B. and O'Cuinn, G., 1985. Purification of and Kinetic studies on a Narrow Specificity Synaptosomal Membrane Pyroglutamate Aminopeptidase from Guinea pig Brain. *Eur. J. biochem.* 150: pag. 47-52.
- 98.- O'Connor, B. and O'Cuinn, G., 1987. Active Site Studies on a Narrow Specificity Thyroliberin Hydrolysing Pyroglutamate Aminopeptidase Purified from Synaptosomal Membrane of Guinea pig. *Brain. J. Neurochem.* 48: pag. 676-680.
- 99.- Wilk, S., Tiedman, T.C. and Kline, T.B., 1985. Pyroglutamyl Diazomethyl Ketone: Potent Inhibitor of Mammalian Pyroglutamyl Peptide Hydrolase. *Biochem, Biophys. res. Commun.* 130: pag. 662-668.
- 100.- Charli, J.L., et al, 1989. Pyroglutamyl Peptidase II Inhibition Specifically Increases Recovery of TRH Release from Rat Brain Slices. *Neuropeptides.* 14: pag. 191-196.
- 101.- Bauer, K., 1988. Degradation and Biological Inactivation of TRH: Regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochemic.* 70: pag. 69-74.
- 102.- Bauer, K., 1976. Regulation of degradation of TRH by the thyroid hormones. *Nature.* 259: pag. 591-593.
- 103.- Suen, Ch.Sh. and Wilk, S., 1991. Inhibition of Pyroglutamyl Peptidase II synthesis by phorbol Ester in the -79 Retinoblastoma Cell, *Endocrinology.* 128, 4: pag. 2169-2174.
- 104.- Wilk, S. and Wilk, E., 1989. Rabbit Brain Pyroglutamyl peptidase II, a membrane-bound TRH degrading enzyme. Purification and Specificity Studies In: *Recent Advances in Biomedical Significance of TRH.* Annals of the N.Y. Academy of Sciences. 553: pag. 556-558.
- 105.- Ausubel, et al, 1990. *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley Intescience. N.Y.
- 106.- Covarrubias, L., et al, 1989. Neuronal TRH synthesis: Developmental and Circadian TRH in RNA Levels. *BBRC.* 151, 1: pag. 615-622.
- 107.- Maniatis, T., 1982. *Molecular Cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- 108.- Lowry, O.H., et al, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *JBC.* 193: pag. 265-275.
- 109.- Suen, Ch.Sh. and Wilk, S., 1990. Rapid inactivation and Phosphorylation of Pyroglutamyl Peptidase II in -79 Human Retinoblastoma Cells after Exposure to Phorbol Ester. *Endocrinology.* 127, 6: pag. 3036-3046.
- 110.- Linfang, W., et al, 1990. Cloning and Identification of a Rabbit Sperm membrane protein gene. *Proc. CAMS and PUMC.* 5, 1: pag. 4-8.
- 111.- Wilk, S., 1992. *Comunicación Personal.*
- 112.- Hass, R.C., Korenfeld, C., Zhang, Z., Perryman, B., Roman, D. and Strauss, A.W., 1989. Isolation and Characterization of the Gene and cDNA Encoding Human Mitochondrial Creatine Kinase. *J. Biol. Chemistry.* 264, 5: pag. 2890-2897.
- 113.- Trask, R.V., Strauss, A.W. and Billadello, J.J., 1988. Developmental Regulation and Tissue-specific Expression of the Human Muscle Creatine Kinase Gene. *J. Biol. Chemistry.* 263, 32: pag. 17142-17149.
- 114.- Redondo, J.L., Charli, J.L. y Joseph-Bravo, P. Datos no publicados.
- 115.- Futerman, A.H., et al, 1985. Solubilization of Membrane-Bound Acetylcholinesterase by a Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C. *J. of Neurochem.* 45, 5: pag. 1487-1494.