



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN
HUMANO SOD1 G93A EN CELULAS GLIALES
DE RATA, PARA UN POSIBLE MODELO DE
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A:
MIGUEL ANGEL AGUILETA ESTRADA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA



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 esta 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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Angel Aguilera Estrada
FECHA: 10/ Marzo 05
FIRMA: 

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoytia con el apoyo de CONACYT (31750) y DGAPA (IN206100).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Ricardo Tapia por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y por su gran apoyo en todo tipo de problemas durante mi camino como biomédico.

También quiero agradecer a todos los compañeros del laboratorio que aún están o estuvieron: Iván, Fer, Paty, Naima, Xochitl, Carlos, Marina, Nadia, Vera, Mora, Luis, Bety, Chuy. Si no hubieran estado, el tiempo en el laboratorio no hubiera sido tan divertido.

Como olvidarme de todos los Massieu. Que siempre lograban ponerme de buen humor y me dieron su apoyo incondicional.

A mi familia por todo el apoyo recibido, en especial mi abuela, mi madre, Gaby, Gabo y mi padre.

A la familia Aguirre que han estado presentes desde que era un niño.

Y por último, a todos los amigos que serán mencionados en grupo por ser tantos. Los del gran equipo de futbol "el toque es nuestro" , los fundamentalistas (ya saben quienes son), los errantes y los de "la casa de mi mamá".

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
.Esclerosis lateral amiotrófica.....	6
.Posibles mecanismos causantes de la neurodegeneración en los mutantes de SOD1.....	7
1)Generación de radicales libres.....	7
2)Agregados proteicos nocivos a nivel celular.....	11
3)Acumulación de neurofilamentos.....	12
4)Excitotoxicidad.....	14
5)Muerte de las motoneuronas.....	16
ANTECEDENTES	18
OBJETIVO	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
.Aislamiento de RNA total.....	25
.Obtención del cDNA.....	26
.Clonación y mutagénesis dirigida.....	27
.Recuperación de EcoRV y clonación en el vector pORSVI/MCS...29	
.Transfecciones.....	30
RESULTADOS	33
.Obtención de mRNA y cDNA.....	33
.Clonación del cDNA en el vector pIJ2925.....	34
.Comprobación de la funcionalidad del PCR para la mutagénesis dirigida.....	35
.Secuenciación previa y posterior a la mutagénesis.....	36
.PCR sobre el plásmido pIJ2925 para recuperar el sitio EcoRV....37	
.Secuenciación del producto mutado pero en el plásmido pORSVI/SOD1G93A.....	37
.Comprobación de la transfección de las células utilizando a β - galactosidasa.....	38
.Comprobación mediante Westernblot.....	39
DISCUSIÓN	40
REFERENCIAS	42

Abreviaturas

A4V	mutación de la SOD1 en la cual el residuo 4 de alanina es sustituido por uno de valina.
ALS	amyotrophic lateral sclerosis (esclerosis lateral amiotrófica).
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato.
BHE	barrera hematoencefálica.
CAMP	monofosfato de adenosín cíclico.
DAG	diacil glicerol.
EAAT	excitatory amino acid transporter (transportador de aminoácidos excitatorios).
FALS	familial ALS (esclerosis lateral amiotrófica familiar).
G37R	mutación de la SOD1 en la cual el residuo 37 de glicina es sustituido por uno de arginina.
G85R	mutación de la SOD1 en la cual el residuo 85 de glicina es sustituido por uno de arginina.
G93A	mutación de la SOD1 en la cual el residuo 93 de glicina es sustituido por uno de alanina.
GFAP	glial fibrillary acidic protein (proteína fibrilar ácida glial).
I113T	mutación de la SOD1 en la cual el residuo 113 de Isoleucina es sustituido por uno de treonina.
IP ₃	inositol trifosfato.
IPTG	isopropil-1-tio-B-D-galactopiranósido.

KA	kainato.
NF-H	neurofilament heavy polypeptide (polipéptido pesado de neurofilamentos).
NF-L	neurofilament light polypeptide (polipéptido ligero de neurofilamentos).
NF-M	neurofilament medium polypeptide (polipéptido medio neurofilamentos).
NMDA	N-metil-D-aspartato.
pb	Pares de bases.
ROS	reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno).
RSV	Rous sarcoma virus.
SALS	sporadic ALS (esclerosis lateral amiotrófica esporádica).
SNC	sistema nervioso central.
SOD1	superoxide dismutase 1 (superóxido dismutasa 1).
UV	ultra violeta.

INTRODUCCIÓN

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una devastadora y hasta ahora incurable enfermedad neurodegenerativa, con una prevalencia de aproximadamente 5 por cada 100,000 individuos. Esta enfermedad fue descrita por vez primera en 1869 por el famoso neurobiólogo francés Jean-Martin Charcot, y se caracteriza por la pérdida selectiva de las motoneuronas inferiores en la médula espinal y las superiores de la corteza motora, terminando con la vida del paciente en un periodo que va de 2 a 5 años del inicio clínico, usualmente por paro respiratorio, debido a la pérdida en el control de los músculos que regulan la respiración, como el diafragma y los intercostales (Julien 2001, Cleveland et al. 2001). Los síntomas iniciales se caracterizan por un debilitamiento progresivo, que usualmente comienza en las extremidades inferiores y se propaga hasta las extremidades superiores, causando parálisis y dificultad en el habla.

Aproximadamente 10% de los pacientes con ALS son casos familiares (FALS), esto es que existe una historia familiar indicando que el padecimiento puede ser heredado en una forma autosómica dominante. De este 10%, un 20% tiene alguna de las más de 90 mutaciones descritas en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), (Rosen et al. 1993), mientras que el 90% restante pertenece a casos esporádicos (SALS). La única distinción entre ambos tipos de ALS es el factor de herencia, ya que tienen la misma sintomatología y patología.

Posibles mecanismos causantes de la neurodegeneración en los mutantes de SOD1

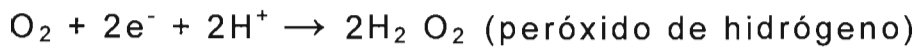
En los siguientes párrafos se discutirán algunas de las principales teorías y observaciones en diversos modelos de estudio de la ALS, y dado que el modelo que estamos siguiendo es el de mutantes en SOD1, los 5 puntos que se tratarán tendrán fundamento y/o suposiciones que involucren a la SOD1 mutada. Los 5 puntos a tratar son los siguientes: 1) Generación de radicales libres, 2) Agregados proteicos a nivel celular de SOD1, 3) Acumulación de neurofilamentos, 4) Excitotoxicidad Y 5) Muerte de las motoneuronas, tomando en cuenta el papel que desempeñan agentes proapoptóticos y antiapoptóticos.

1) Generación de radicales libres.

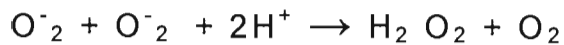
Todos los organismos aeróbicos necesitan del oxígeno para sobrevivir, sin embargo esto, paradójicamente es peligroso, ya que cada átomo de oxígeno tiene un electrón no apareado en la última órbita de valencia, lo que lo convierte en un radical libre. Existe una reducción continua del oxígeno en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria para producir energía y agua, este es un proceso relativamente seguro. Sin embargo la reducción univalente del oxígeno produce especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden causar una severa oxidación a cualquier molécula biológica causando importantes cambios que la llevarán a la pérdida de función. Es por esto que la célula cuenta con un arsenal de defensas, entre las cuales se encuentran enzimas como la catalasa, la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa, encargadas de convertir estos ROS en moléculas menos reactivas.

Ejemplos de la formación de algunas ROS.

l) La adición de un electrón al oxígeno molecular produce el anión superóxido, mientras que la reducción del superóxido produce peróxido de hidrógeno.

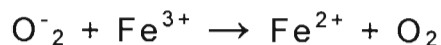
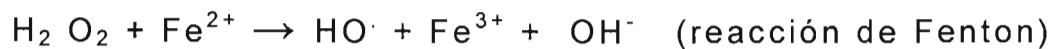


II) Generalmente el peróxido de hidrógeno es generado en las células pasando antes por la producción de superóxido.



Ésta es la reacción de dismutación, que puede darse espontáneamente, pero a un ritmo muy lento si se compara con la catálisis mediada por la SOD1.

III) Otra de las especies reactivas de oxígeno, los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que son de los más reactivos, pueden generarse en presencia de algunos iones metálicos. Esta transformación es conocida como la reacción de Fenton.



Los radicales $\cdot\text{OH}$ tienen la capacidad de oxidar varias moléculas orgánicas como fosfolípidos, creando un daño a la membrana celular o a otras especies químicas como los ácidos nucleicos, causando daño al ADN (Phillis 1994).

Hasta ahora no se ha podido determinar la causa de la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas en pacientes que tienen una ó más mutaciones en el gen de la SOD1, pero siendo ésta una enzima de

defensa contra el estrés oxidativo, es fácil pensar en hipótesis que involucren una disfunción en la catálisis, o bien, la adquisición de una función diferente. La SOD1, de 153 aminoácidos tiene una expresión y actividad ubicua que ha sido descrita ampliamente (Longo et al. 1996), su función radica en transformar el superóxido producido por errores en la fosforilación oxidativa, en peróxido de hidrógeno y agua. La catálisis de esta enzima se lleva a cabo en dos pasos asimétricos en los cuales un átomo de cobre alterna en sus estados oxidado y reducido mediado por el superóxido (figura1).

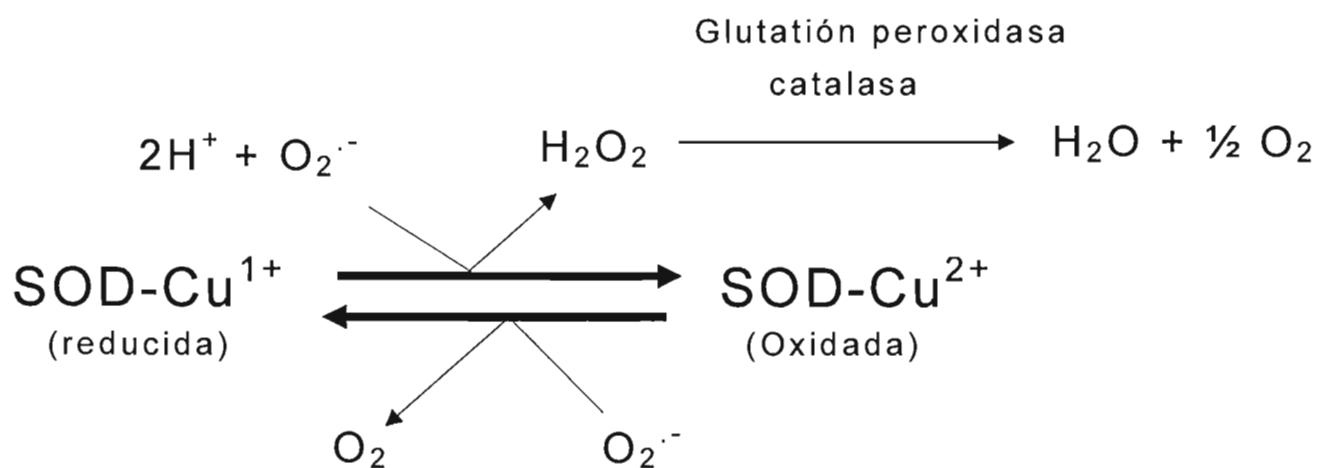


Figura1. Reacción catalítica normal de la SOD1

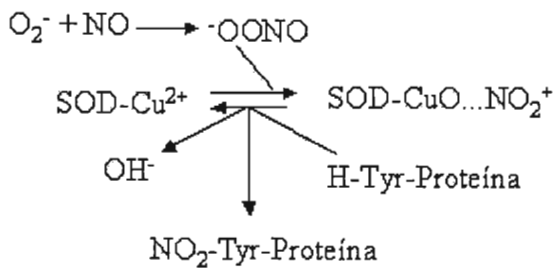
Otras ROS como el peroxinitrito (ONOO^-) se pueden formar en reacciones no enzimáticas entre el óxido nítrico (NO) y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, dando lugar a otro agente oxidante con capacidad nitrante. El peroxinitrito, además de su acción en el daño de estructuras celulares también inhibe a la SOD1 (MacMillan-Crow 1996), generando así un círculo de realimentación al no poder lidiar con el superóxido producido naturalmente.

Todos los efectos que generan las ROS son conocidos como estrés oxidante, que es un factor que participa en el envejecimiento y la neurodegeneración (Calabrese et al. 2000). Existe evidencia en el sistema nervioso de daño: a nivel de proteínas y en el material genético, por la presencia de grupos carbonilo y 8-hidroxi-2-desoxiguanosinas

respectivamente (Ferrante et al. 1997). Es por este tipo de evidencias que se han postulado algunas hipótesis sobre una catálisis aberrante mediada por la SOD1 mutada. Se cree que estas mutaciones pueden crear un mal plegamiento de la enzima, creando así un sitio activo en el cual entrarían sustratos no naturales como el óxido nítrico, que junto con el superóxido formaría peroxinitrito, oxidando y nitrando algunas proteínas u otros componentes celulares (figura 2A, (Cleveland 1999). Otra hipótesis sugiere que el cobre, uno de los grupos prostéticos de la enzima esté mediando la conversión de H_2O_2 en el radical $\cdot HO$ (figura 2B, (Cleveland 1999).

Otras observaciones sugieren una pérdida de afinidad de la SOD1 hacia el Zinc, lo que convertiría a la SOD1 en un productor de radicales libres, obteniendo electrones de antioxidantes celulares y formando superóxido (Beckman et al. 2000).

A



B

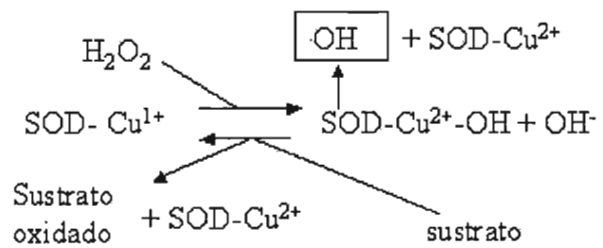


Figura 2: posibles mecanismos de catálisis aberrante mediada por la SOD1 mutada

2) Agregados proteicos nocivos intracelulares.

Como ya lo había mencionado, existen más de 90 mutaciones en la SOD1 que causan FALS, así que, se han empleado ratones transgénicos para realizar varios estudios sobre la progresión en esta patología. Dos tipos de estos ratones y comercialmente disponibles son el G93A y G85R. Por esto, varios de los estudios acerca de esta enfermedad involucran a estos ratones o la transfección de SOD1 mutante en varios tipos celulares.

Se ha observado que intracelularmente en ratones G93A y G85R hay grandes cantidades de agregados proteicos, al menos en células del SNC y se piensa que el mal plegamiento de la SOD1 causa estos cuerpos de inclusión en el citoplasma. Experimentalmente se ha comprobado que la transfección de SOD1 mutada genera en cultivos

neuronales estos agregados, pero esto no ocurre con la transfección de SOD silvestre (Durham et al. 1997). Estos mismos agregados se han detectado por inmunocitoquímica en modelos transgénicos de ratones y en pacientes con ALS (Bruijn et al. 1998). Además, existen evidencias de que este es un suceso temprano en la patología de la ALS (Johnston et al. 2000). Los agregados podrían tener varias consecuencias a nivel celular, como estar compitiendo por las chaperonas que ayudan en el correcto plegamiento de proteínas, y dada la estructura de estos se sugiere que son sustratos para la dineína, una proteína que participa en el transporte axonal lento, privando a la célula de factores tróficos que utilizan este mismo mecanismo de transporte (Cleveland 1999; Dupuis et al. 2000). Por otro lado, estos agregados pueden estar saturando la estructura celular encargada de la degradación de proteínas, el proteasoma, teniendo como resultado una acumulación de proteínas destinadas a ser degradadas.

3) Inclusiones de neurofilamentos

Una marca característica para ambos casos de esta enfermedad (SALS y FALS), es la presencia de neurofilamentos intermedios anormales en el soma y los axones de las motoneuronas (Hirano et al. 1984; Rouleau et al. 1996). Los neurofilamentos intermedios que se encuentran presentes en las motoneuronas están compuestos por tres polipéptidos uno ligero (NF-L, 61kDa), uno medio (NF-M, 90kDa) y otro pesado (NF-H, 115kDa), y es mediante la copolimerización de estas tres subunidades que se forman los filamentos intermedios. Existen diversos mecanismos mediante los cuales se podrían explicar las inclusiones de los neurofilamentos en la ALS, algunas de éstas incluyen una desregulación en la expresión de estos genes, modificaciones postraduccionales o mutaciones en los genes de estas tres subunidades.

Mediante estudios de hibridación *in situ* fue evidente la reducción de NF-L mRNA en las motoneuronas de casos con ALS (Wong et al. 2000). Y dado que NF-L es requerida para el ensamblaje y funcionamiento

correcto de los filamentos. La disminución de este puede generar la acumulación de NF-M y NF-H en el soma de las células (Williamson et al. 1998). Hay evidencia que la desorganización de los neurofilamentos y los defectos en el transporte intracelular pueden ser el resultado de modificaciones postraduccionales, y son de particular interés aquellas que involucran a la excitotoxicidad, ya que se ha observado que la excitotoxicidad puede causar una hiperfosforilación en los neurofilamentos (Ackerley et al. 2000). Aparte de estas modificaciones se sabe que NF-L es muy susceptible a la nitración, que generalmente es causada por el estrés oxidativo.

Aunque el mecanismo tóxico de las inclusiones neuronales no se ha podido comprobar, se sugiere que la formación de neurofilamentos anormales en el axón de las motoneuronas puede causar una estrangulación de estos, causando un deterioro al transporte axonal.

No todos los estudios de los neurofilamentos apuntan hacia algún tipo de toxicidad, de hecho algunos de los tratamientos terapéuticos más eficaces en cuanto a la supervivencia de ratones transgénicos involucran la sobre expresión de NF-H. Mediante este mecanismo se ha logrado prolongar la vida de los ratones transgénicos hasta en 6 meses (Couillard-Despres 1998). Aunque no se tiene claro el por qué de este efecto las opiniones tienden a la capacidad amortiguadora de NF-H en lidiar con un exceso de calcio en las células debido a la excitotoxicidad, de la cual se hablará posteriormente.

4) Excitotoxicidad.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC) de todos los mamíferos, pero bajo algunas circunstancias este neurotransmisor puede funcionar como una toxina.

Este neurotransmisor como todos, tiene receptores y por lo tanto la sobre estimulación de estos puede generar reacciones adversas e incluso causar neurodegeneración. Pero es debido a un eficaz sistema de recaptura que esto no ocurre. Sin embargo, está perfectamente demostrado que causando una liberación excesiva del glutamato o inhibiendo su recaptura *in vitro* (Tapia et al. 1999), este neurotransmisor produce una neurodegeneración.

En la patología del ALS, se ha postulado que el glutamato se encuentra elevado en el líquido cefalorraquídeo, cuando es comparado con los niveles basales de personas sanas (Rothstein et al.1991).

El glutamato tiene receptores en la presinapsis y en la postsinapsis, desencadenando diferentes respuestas fisiológicas. Existen dos grandes grupos de receptores para el glutamato. Los ionotrópicos, que al ser activados permiten el flujo de cationes como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y que son clasificados a su vez por su sensibilidad a distintos agonistas como el N-metil-D-Aspartato (NMDA), el α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y el Kainato (KA). Y los receptores metabotrópicos, que se encuentran por lo general acoplados a proteínas G que dirigen diversas cascadas de señales mediante segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP3), el diacilglicerol (DAG) y el monofosfato de adenosín cíclico (cAMP). De estos dos grandes grupos, el primero generalmente se encuentra en la postsinapsis y el segundo en la presinapsis.

La despolarización de la membrana neuronal luego de la activación de receptores a glutamato permite la entrada de Ca^{2+} a la célula mediante sus receptores como el NMDA y canales dependientes de voltaje. Así, una sobreestimulación excesiva de los receptores llevaría a una entrada masiva de Ca^{2+} , lo cual llevaría a una alteración de la homeostasis de

este catión, que puede causar la activación de proteasas, lipasas, etc... creando efectos indeseables a nivel celular.

Como se mencionó anteriormente, un proceso importante en la transmisión glutamatérgica es la recaptura del neurotransmisor una vez que activó a sus receptores. Esta recaptura es mediada por proteínas especiales llamadas transportadores, de los que hasta ahora se han identificado 5 diferentes tipos en el SNC: EAAC1 (acarreador de aminoácidos excitadores¹) localizado en neuronas glutamatérgicas; EAAT1 o GLAST (transportador de aminoácidos excitadores 1) localizado en astrocitos; EAAT2 o GLT1 (transportador de aminoácidos excitadores 2) también localizado en astrocitos; EAAT4 (transportador de aminoácidos excitadores 4) localizado en las dendritas de las células cerebelares de Purkinje y EAAT5 (transportador de aminoácidos excitadores 5) localizado en las células de Müller de la retina. La función de estos transportadores es la de llevar al glutamato en contra de su gradiente de concentración, del espacio sináptico al interior de la célula, para terminar con la activación de sus receptores y posteriormente transformarse en glutamina mediante una reacción enzimática.

Para el caso de las motoneuronas, la recaptura del glutamato se lleva a cabo principalmente por EAAT2, y la hipótesis de la excitotoxicidad en esta patología se planteó, entre otras evidencias, al observar que varios de los pacientes con SALS tenían una reducción en el transportador glial EAAT2, tanto en la corteza motora como en la médula espinal (Rothstein et al. 1995). Este decremento de transportador en la ALS puede ser debido en parte a la abundancia en especies de mRNA, resultado de errores en el procesamiento de los mismos, los cuales van desde retención de intrones a pérdida en alguno de los exones, (Lin et al. 1998). La proteína resultante será degradada rápidamente y/o producirá efectos dominantes negativos que podrían causar una pérdida en la actividad de EAAT2. Sin embargo, este hallazgo ha sido debatido en un estudio que muestra que los transcritos aberrantes de EAAT2 se encuentran en la misma proporción en pacientes con ALS y controles (Meyer et al. 1999).

En la ALS causada por mutaciones en la SOD1, el daño oxidativo podría estar causando la inactivación de EAAT2, basado en observaciones en las que algunas mutaciones en la SOD1 como A4V e I113T, junto con peróxido de hidrógeno inactivan al EAAT2, lo cual no sucede con la SOD1 silvestre (Trotti et al. 1999). Como otra posibilidad, existe una correlación entre la acumulación de agregados de la SOD1 mutante y la disminución del transportador EAAT2, lo que podría estar causando una disfunción general en los astrocitos que tendría como resultado bajos niveles de expresión en el transportador glutamatérgico (Cleveland et al. 1999).

5) Muerte de las motoneuronas

Se ha sugerido que la muerte de las motoneuronas en la ALS es mediante apoptosis, ya que se ha demostrado la fragmentación del ADN en estudios de hibridación *in situ* y la inmunoreactividad de proteínas proapoptóticas como Bax (Martín. 1999), así como la presencia de una proteína apoptótica que se encuentra en células cancerígenas de la próstata (Par-4), pero que en pacientes con ALS también se encuentra en la médula espinal (Pedersen et al. 2000). En ratones transgénicos con la SOD1 humana mutada, un modelo clásico de estudio de la FALS, se ha visto una expresión alterada de Bcl-2, una proteína que tiene efectos antiapoptóticos (Spooren y Hengerer; 2000). En este modelo de estudio se han hecho comparaciones de proteínas anti y proapoptóticas con ratones asintomáticos y con ratones que están comenzando con la parálisis. Los ratones asintomáticos tienen en comparación con ratones silvestres los mismos niveles de Bcl-2 y Bcl-xl junto con Bad y Bax, siendo los primeros proteínas antiapoptóticas y los siguientes proapoptóticas. A medida que los síntomas comienzan a aparecer los niveles de ambos grupos de proteínas se invierten, esto es, aumentan Bad, Bax y disminuyen Bcl-2 y Bcl-xl (Vukosavic et al. 1999). Se han realizado experimentos expresando este tipo de proteínas

antiapoptóticas, sin embargo aunque se ha logrado prolongar la vida de los ratones hasta en un mes, no ha sido suficiente para contrarrestar el resultado final de la enfermedad. En estos experimentos, se han aumentado los niveles de Bcl-2 mediante transgénesis (Kostic et al. 1997), y se han empleado inhibidores de caspasas, administrados de manera intraventricular, logrando hacer más lento el progreso de la enfermedad (Li et al. 2000). En cuanto a la activación de caspasas efectoras como la caspasa-1 y la caspasa-3, se ha visto, que a diferencia de la apoptosis que normalmente ocurre durante el desarrollo del SNC, en esta enfermedad la caspasa-1 está en su forma activa meses antes que la caspasa-3, y antes de que se pueda observar evidencia de muerte neuronal. Por el contrario, una vez que la caspasa-3 se encuentra en su forma activa, comienzan a aparecer los primeros indicios de muerte en las motoneuronas (Pasinelli et al. 2000). En cuanto a esta sucesión de eventos, cabe mencionar que esta activación secuencial de caspasas ocurre también en los astrocitos de ratones G93A y se ha propuesto que la activación de la caspasa-1 podría estar contribuyendo en un proceso de inflamación, causando una astrocitosis que tal vez exacerbara la muerte neuronal (Li et al. 2000; Pasinelli et al. 2000).

ANTECEDENTES

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, en la actualidad existen modelos de animales transgénicos que, debido a la expresión del gen humano SOD1 con alguna de las más de 90 mutaciones descritas, presentan síntomas y una muerte restringida a las motoneuronas que se asemeja a la ALS humana. Estos animales, generalmente ratones se generan mediante la microinyección de ovocitos en etapa pronuclear (Gordon et al., 1980) con el gen SOD1 humano previamente mutado y acoplado a un promotor, que es el del gen SOD1 silvestre humano. Dado que este promotor se expresa en todos los tipos celulares que conforman un organismo, el animal que se genere con este gen exógeno expresará la SOD1 mutada en todos sus tipos celulares. Es importante mencionar que la integración de este nuevo gen al genoma del animal hospedero se da como un fenómeno meramente al azar, esto es que se integrará en cualquier parte del genoma y en un número que varía desde 3-4 copias hasta 100-200 copias y que generalmente se da en arreglos "head to tail" (arreglos que van en ambas direcciones 5' - 3' y 3' - 5'), así que la cantidad de expresión de este nuevo gen está regida por el promotor seleccionado y por la cantidad de copias que se integre en el genoma. Para controlar la cantidad de copias del gen, durante la microinyección se calcula que en un volumen de 2pl exista el número de copias que se desea; se utiliza este volumen dado que es la cantidad que puede ser inyectada en un ovocito en esta parte del desarrollo embrionario.

Sabiendo lo anterior, el primer modelo de esta enfermedad fue un ratón transgénico que tiene la SOD1 humana mutada en G93A (Gurney et al 1994) y que se encuentra regida por su promotor humano sin ninguna modificación. Este modelo se encuentra disponible comercialmente y ha sido uno de los modelos más confiables para el estudio del progreso y nuevas terapias en la ALS. Junto con los ratones G93A existe otro

modelo que expresa el gen SOD1 murino con la mutación G85R (Ripps et al. 1996) y ahora se han generado ratas que expresan alguna de dos mutaciones en la SOD1 humana, G93A y H46R (Nagai et al. 2001 y Howland et al. 2002).

Entre estos dos modelos, en rata y ratón no parece existir ninguna diferencia en cuanto a la progresión y la muerte selectiva de las motoneuronas. Sin embargo el tamaño del animal es un factor que tiene limitaciones para algunos experimentos y por lo tanto una rata tiene ventajas sobre el ratón.

Como ya lo había mencionado, el promotor usado en estos modelos es el de la SOD1, ya sea del humano o ratón según sea el caso y dado que tiene una expresión ubicua no se sabe aún el por qué del daño selectivo a las motoneuronas. Por esto algunos investigadores se han preguntado que pasaría si se restringiera ésta expresión a un tipo celular específico y se han generado dos tipos de ratones transgénicos. El primero de estos es un ratón que únicamente expresa la SOD1 humana con la mutación G86R en los astrocitos empleando el promotor específico de la GFAP, una proteína utilizada como marcador de glia (Gong et al. 2000) y fue generado como apoyo a la hipótesis de la pérdida del transportador glial EAAT-2 como la causa principal en la muerte neuronal. Pero lo único que ocurrió con este ratón fue una marcada astrocitosis y ninguna muerte neuronal. El segundo tipo de ratón transgénico utilizó la SOD1 humana con la mutación G37R pero esta vez la expresión fue dirigida únicamente a las neuronas empleando el promotor de la cadena ligera de neurofilamentos NF-L (Pramatarova et al. 2001). Nuevamente, esta expresión restringida a un tipo celular no fue suficiente para causar una degeneración en las motoneuronas. Estos dos diferentes ratones transgénicos han creado más dudas acerca del daño causado por la mutación en la SOD1, ya que era de esperarse que en alguno de estos dos modelos se observara daño neuronal, dado que estas mutaciones son de carácter dominante. Existe otro modelo en el cual se desarrollaron ratones quiméricos, en los cuales una proporción de sus células tenían a la SOD1 mutada y otra proporción no. En este modelo

se sugiere que el ambiente que rodea a las motoneuronas es el posible causante de la ALS, de este ambiente se hace referencia a células no neuronales como astrocitos y microglía y considera que el gen mutante tiene que estar en estos tipos celulares para desencadenar los efectos de la SOD1 mutada (Clement AM et al. 2003). El modelo que no se ha podido generar es aquel que dirija la expresión de la SOD1 mutada solamente en los tipos celulares del SNC o en todos los demás tipos celulares con excepción del SNC, ya que, la expresión de un transgen es dependiente de su promotor y no existe un promotor que únicamente se exprese en el SNC o que no se exprese en éste. Sin embargo, existen otros mecanismos que regulan la transcripción, entre ellos el del operón lac, que ha sido muy estudiado. Es un sistema que emplean las bacterias para garantizar que no se transcriban genes dependiendo del medio en el que crecen. Esta es una ventaja adaptativa, ya que el organismo no gasta energía y recursos en enzimas que no cumplirán su función por no tener acceso al sustrato pertinente. Este sistema empleado por bacterias regula un operón, que es un conjunto de genes normalmente involucrados en una misma vía y utiliza un represor que se unirá a una secuencia específica que se encuentra entre el promotor del conjunto de genes y los genes. En presencia de un inductor, el represor se despegará de estas secuencias y dejará de ser un impedimento para la RNA polimerasa, que comenzará a transcribir los genes del operón. El inductor natural de este sistema es un sustrato para una enzima generada en la transcripción del operón, y por esto el represor estará cumpliendo su función hasta que sean requeridas las nuevas enzimas.

Descripción del operón Lac

Desde hace tiempo, las propiedades enzimáticas de microbios eran conocidas y se sabía que estos microorganismos podían ser “entrenados” para sintetizar un tipo nuevo de enzimas dependiendo del ambiente en que éste crecía. A este tipo de enzimas inducibles se les bautizó con el

nombre de adaptativas y la β -galactosidasa es una enzima perteneciente a este tipo, del cuál hoy en día se conoce a la perfección el sistema que le otorga las características de inducible.

La función de β -galactosidasa es la de hidrolizar a su sustrato natural, la lactosa, convirtiéndola en glucosa y galactosa para ser metabolizados por las vías regulares de la glucosa. Esta enzima no se encuentra presente hasta que en el medio exista lactosa como única fuente energética.

En 1946 Jacques Monod comenzó a estudiar el sistema mediante el cuál la *E. Coli* podía regular la producción de estas enzimas y cómo es que este microorganismo podía saber qué contenía el medio como fuente de carbono para no crear un arsenal de enzimas que fueran inútiles. 15 años después Monod y colaboradores dieron la solución a este fenómeno.

Lo primero que hicieron, debido a la reacción del organismo de sintetizar nuevas enzimas y suspender la producción de otras de acuerdo al medio fue la de llamar a estas "enzimas de inducción", y obviamente llamaron a aquellos compuestos como la lactosa inductores, ya que su presencia es suficiente para que se genere una nueva enzima. Encontraron también una gran variedad de β -galactósidos que podían inducir a la enzima, pero que no eran sustratos de ésta, así pues pensaron que el inductor no actuaba directamente en la enzima, sino con algún intermediario. Junto con esto hallaron una serie de mutantes que mantenían el nivel de expresión de β -galactosidasa al máximo aunque no hubiera ningún inductor en el medio y fue mediante experimentos de conjugación en los cuales se tenían bacterias silvestres (tenían reprimido al gen) y bacterias constitutivas (expresan el gen sin inductor) que pudieron generar el carácter de silvestres a las constitutivas. De estos experimentos se pudo deducir que al menos otro gen estaba involucrado y que durante la conjugación la bacteria que tenía el factor "F" (capacidad de transferir información genética a una bacteria que no posea este factor), en este caso la silvestre había podido transferir el represor a la otra bacteria en calidad de material genético y ahora ésta

podía ser inducida normalmente, sugiriendo que la bacteria constitutiva tenía algún error (mutación) en su represor. Dentro de estos experimentos había un grupo de bacterias que seguían siendo constitutivas aunque hayan conjugado con otras que no lo eran, entonces se postuló que existía una región entre la β -galactosidasa y su promotor en la cuál el represor actuaba, a esta región se le llamó operador, y la causa de que fueran constitutivas aún teniendo un represor funcional era que existía alguna mutación en la región que comprende al operador. A la fecha se conoce muy bien la estructura de este operón (figura 3) y se han hecho trabajos de mutagénesis dirigida para saber cuales son las bases más importantes en el operador, que comprende una región palindrómica de 26pb. Este operón bacteriano comprende un promotor que regula a tres genes, Lac Z que es la β -galactosidasa, Lac Y una permeasa que funciona permitiendo la entrada de lactosa y Lac A una transacetilasa. Entre el promotor y los tres genes está el operador que es el sitio donde se une el represor, éste se encuentra fuera del operón regido por su propio promotor.

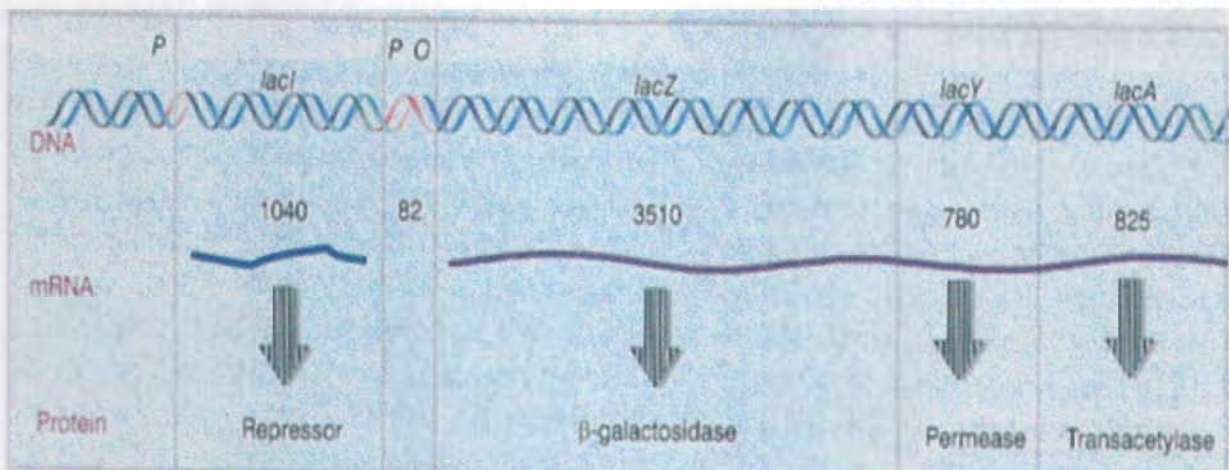
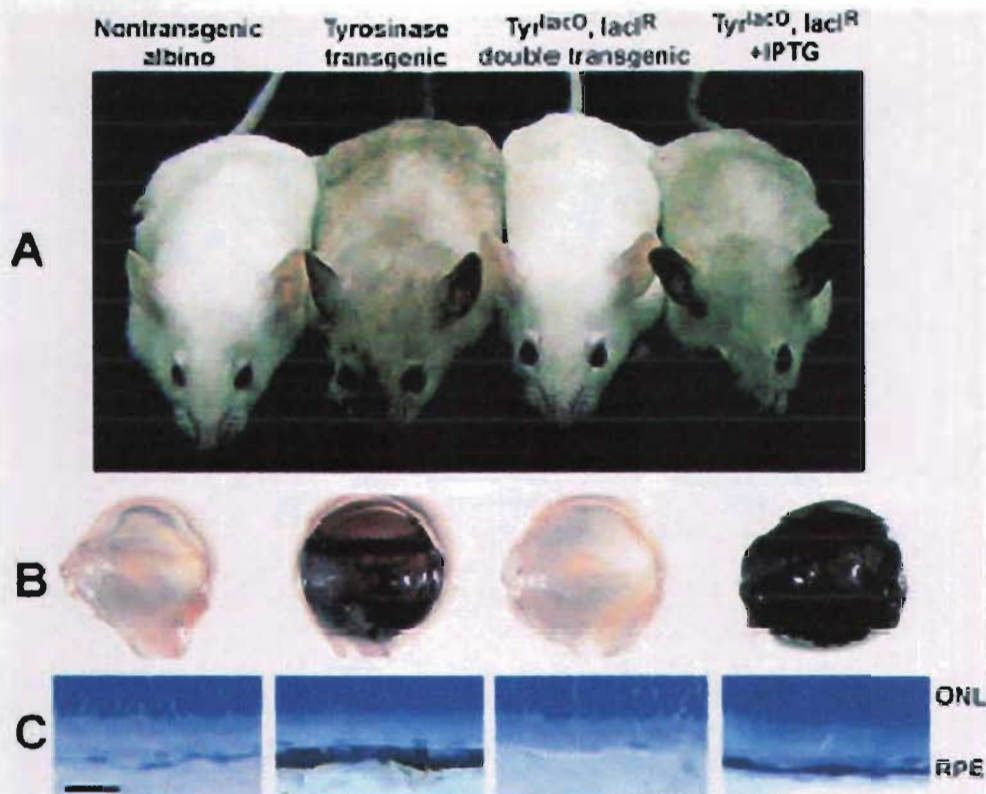


Figura 3: Estructura del operón Lac. En esta figura se encuentra de izquierda a derecha: el promotor de Lac I, Lac I, el promotor del operón y el operador, además de los tres genes que se sintetizan en un mismo transcrito. Junto con sus respectivos tamaños en cantidad de bases.

Dado que este sistema para regular genes podría ser de gran utilidad en el estudio de diversos procesos en los que se requiere que se prendan o apaguen genes según lo deseado, en 1987 se empleó el modelo del

represor (Lac I) junto con un gen reportero que tenía una secuencia operadora. Este modelo funcionó muy bien en células de mamífero transfectadas (Hu y Davidson., 1987). Sin embargo fue hasta 1997 que se intentó utilizar este sistema en un animal transgénico (Scrabble y Stambrook., 1997). Desgraciadamente, se observó que utilizando al represor acoplado al promotor de β -actina (promotor con expresión ubicua) era blanco de metilasas, y se sabe que un gen metilado no se expresa. El único sitio en el que se pudo observar la expresión del represor fue en los testículos del animal. Luego de una serie de análisis en cuanto a la secuencia del promotor y la del gen Lac I, observaron que tenía gran cantidad de islas CpG y 4 codones en la secuencia del gen que son poco utilizados en mamíferos. Las islas CpG son secuencias ricas en citosina y guanina y funcionan como sitios de metilación. Para lidiar con este problema se flanqueó al promotor con secuencias no codificadoras del gen de β -globina de conejo, añadiendo así una secuencia pobre en islas CpG y espaciando al gen represor del promotor. El siguiente problema fue resuelto cambiando una base de cada codón de los cuatro poco usados en mamíferos. Esto cambió la secuencia del represor pero no cambió a los aminoácidos correspondientes a cada codón, por lo que ahora se tenía un código diferente pero la misma proteína (Cronin et al. 2001). Gracias a estos cambios y utilizando un gen reportero, la tirosinasa (enzima empleada en la pigmentación), se comprobó la ubicua expresión de este represor y sus efectos reversibles cuando se utiliza el análogo de la lactosa IPTG (figura: 4).



Cronin et al. 2001

Figura 4: (A) La tirosinasa hace que la pigmentación de los ratones sea oscura. El primer ratón por ser albino no tendrá esta pigmentación (control). El segundo ratón es transgénico para la tirosinasa así que obtendrá la pigmentación oscura (segundo control). El tercer ratón es un doble transgénico, quiere decir que tiene a la tirosinasa más el represor y como puede observarse, sin la presencia del inductor el gen se mantiene reprimido y no adquiere el color oscuro. El cuarto ratón también es un doble transgénico pero esta vez recibe el inductor (IPTG), así que en este caso adquiere el color oscuro por no estar reprimido el gen de la tirosinasa.

(B) Disección de los ojos de cada uno de los ratones, mostrando el mismo nivel de pigmentación si se comparan con sus respectivos controles.

(C) Cortes de secciones de los ojos. ONL (capa nuclear externa) y RPE (epitelio de pigmento retinal), nuevamente se asemejan a sus controles.

OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo radica en comprobar la funcionalidad del modelo de represor Lacl^r en la regulación de una construcción que tiene al gen SOD1 humano con la mutación G93A, acoplado a un promotor viral (RSV) y separado por dos secuencias operadoras, que son el sitio en el cual se unirá el represor. Todo esto es con la finalidad de, desarrollar, en un futuro un animal transgénico al cual se le puede inducir este gen en distintas etapas del desarrollo y poder reprimirlo una vez que se desee, así poder obtener resultados en cuanto a la progresión de la ALS una vez que este gen está reprimido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de RNA total

Para la obtención del RNA se obtuvo mediante una jeringa, 5ml de sangre humana que fueron colectados en un tubo falcon de 15ml con EDTA 10mM, posteriormente se hizo una dilución 1:1 de la sangre con PBS (buffer muy común). En un tubo falcon con las mismas dimensiones y 3ml de ficol se vertió la dilución, teniendo cuidado de no mezclar ambas fases y posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 1500rpm. Esta centrifugación por gradiente me permitió separar glóbulos blancos de rojos y con una pipeta pasteur se colectaron únicamente los glóbulos blancos que están entre el suero y los glóbulos rojos.

Los glóbulos blancos fueron lisados en 1ml de Trizol (Gibco BRL) pipeteando repetidamente. Se incubó este lisado durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 0.2ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Se agitó el tubo durante 15 segundos y se centrifugó a 12,000g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Esta centrifugación permitió ver 3 fases en el tubo, la primera fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa en la cual permanece el RNA. Se separó esta última fase y se transfirió a un tubo limpio donde el RNA se

precipitó añadiendo 0.5ml de isopropanol por cada ml de Trizol, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y nuevamente se volvió a centrifugar a 12,000g durante 10 minutos a 4°C, el RNA queda en el fondo del tubo así que se tiró el sobrenadante y se lavó con etanol 75%. Posteriormente se realizó una centrifugación a 7,500g durante 10 minutos a 4°C y después se dejó secando ligeramente el RNA, dejando invertido y destapado el tubo cerca de un mechero, para resuspender el RNA en agua estéril y posteriormente guardar alícuotas a -70°C hasta ser utilizadas y correr una o dos muestras en un gel desnaturizante de agarosa con formaldehído y formamida para comprobar la integridad del RNA.

Obtención del cDNA de la SOD1 humana

Para obtener el cDNA se diseñaron 2 oligonucleótidos, que corresponden a los extremos 5' y 3' del mRNA y cDNA. El primero con un sitio de restricción Clal y que funcionaría como el oligonucleótido sentido con la siguiente secuencia ACCATCGATATGGCGACGAAGGCCGT y una Tm de 65.2°C, el segundo con un sitio EcoRV y funcionando como antisentido con la siguiente secuencia AACGATATCTTATTGGGCGATCCCAATTACACC y una Tm de 66.6°C, ambos están escritos en dirección 5' - 3'.

Para la síntesis de la primera cadena del cDNA, la reacción se hizo de la siguiente manera. 5.9µl de agua libre de RNAsas, 1µl de 10x StrataScript RT buffer, 0.6µl del oligonucleótido antisentido (100ng/µl), 1µl de dNTPs (40mM) y 1µl de RNA (1µg/µl). Para la alineación del templado y el oligonucleótido se incubó la reacción durante 5 minutos a 65°C y posteriormente se añadieron 0.5µl de StrataScript RT dando un volumen final de 10µl en la reacción y proceder incubando durante 15 minutos a 42°C. Lo siguiente fue amplificar este producto por medio de una PCR utilizando en la reacción experimental lo siguiente 40.0µl de agua estéril, 5.0µl de 10x ultra HF PCR buffer, 1.0µl de dNTPs (40mM), 1.0µl

del oligonucleótido sentido (100ng/ μ l), 1.0 μ l del oligonucleótido antisentido (100ng/ μ l), 1.0 μ l de la reacción experimental primera y 1.0 μ l de Pfu Turbo DNA polimerasa. Los ciclos se hicieron de la siguiente manera. 1 minuto a 95°C y después 40 ciclos de 95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 68°C 2 minutos y una fase final de 68°C 10 minutos. Luego de terminar con la PCR se corrió una muestra en un gel de agarosa al 1% y después de una tinción con bromuro de etidio se analizó en un transluminador UV.

Los ciclos y temperaturas de la PCR son condiciones estándar y a menos que se indique lo contrario en los experimentos subsecuentes, se utilizaron las mismas condiciones con excepción del alineamiento que depende de la TM de los oligos.

Clonación y mutagénesis dirigida

Durante este proceso se utilizó el vector pIJ2925, ya que además de tenerlo disponible en el laboratorio, es de un tamaño pequeño (2.8kb), una característica muy útil para la mutagénesis. Se digirió el vector con SmaI, aproximadamente 2 μ g de éste y se digirió el cDNA con EcoRV aproximadamente 1 μ g (lo que se obtuvo del PCR) durante 1 hora a 37°C y se calculó la cantidad de ambos para tener una concentración final de 20 μ g/ml (la concentración ideal para hacer una ligación) en una proporción de 5-1 cDNA y vector para utilizar una ligasa con su respectivo buffer y dejar la reacción toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día se realizó la transformación de bacterias competentes (E.Coli) utilizando toda la ligación y dejando reposar a las bacterias durante 30 minutos en hielo para después darles un choque térmico de 30 segundos a 42°C y pasarlas a hielo 5 minutos. Para la recuperación de las bacterias, se estabilizaron en un medio no selectivo durante una hora a 37°C en constante agitación y después se plaquearon

cajas petri con medio selectivo, que en este caso fue LB con ampicilina (200µg/ml). Al día siguiente se seleccionaron al azar varias colonias en las cuales se comprobaría mediante un ensayo de restricción que tuvieran el inserto en este caso el cDNA. Generalmente en este ensayo se utilizan las mismas enzimas que se usaron para la ligación, pero dado que se perdieron ambos sitios, EcoRV y SmaI debido a la clonación en el vector, me valí de otros sitios para comprobar la inserción del cDNA, estos sitios fueron EcoRI y BamHI que me daban 2 productos uno de aproximadamente 2.8kb y otro aproximadamente 500pb que correspondían al vector y al cDNA respectivamente.

Para la mutagénesis dirigida, se diseñaron dos oligonucleótidos perfectamente complementarios entre sí y teniendo una base no apareada con el templado que es la base a ser cambiada para generar la mutación G93A. El oligonucleótido sentido es CTGCTGACAAAGATGCTGTGGCCGATGTGTC y el antisentido corresponde a GACACATCGGCCACAGCATCTTTGTCAGCAG ambos escritos en la dirección 5' - 3' y purificados mediante un gel de poliacrilamida.

El método empleado para la mutagénesis esta basado en la completa síntesis del vector junto con el inserto partiendo de ambos oligonucleótidos que en su secuencia se incluye la mutación y empleando como templado al vector e inserto sin la mutación, previamente amplificado por una bacteria que metile el DNA (generalmente todas las cepas de E. Coli metilan el DNA a menos que se indique lo contrario). Lo siguiente es utilizar una enzima, DpnI que exclusivamente degrada el DNA metilado (aquel que no tenga la mutación). Para la reacción de PCR se emplearon las siguientes condiciones: 5µl de 10x reaction buffer (Stratagene), el volumen que contenga de (5-50ng) del templado, (125ng) del oligonucleótido sentido, y (125ng) del oligonucleótido antisentido, 1µl dNTPs (40mM) y se lleva a un volumen final de 50µl con agua estéril para después añadir 1µl de Pfu Turbo (una DNA polimerasa de muy alta fidelidad). Los ciclos

comprenden, desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, 12-18 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 68°C tomando en cuenta 2 minutos por kb de longitud, en este caso 6.5 minutos. Una vez concluida la reacción, el producto fue tratado directamente con 1µl de DpnI durante 1 hora para después transformar bacterias por choque térmico.

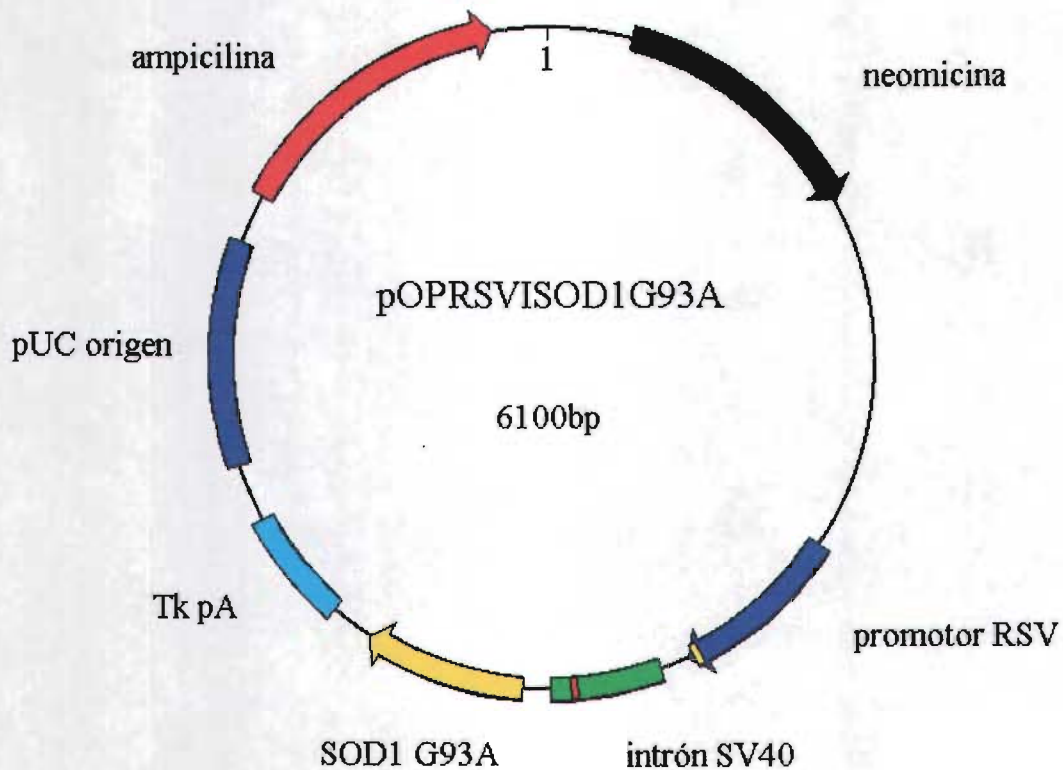
En esta ocasión hubo una disminución en la cantidad de ciclos, ya que siendo que se está sintetizando todo el plásmido se consume una gran cantidad de dNTPs y generalmente 15 ciclos son suficientes para este método de mutagénesis.

Recuperación de EcoRV y clonación en el vector pOPRSVI/MCS

Para el caso de la mutación elegida, el cambio de una base en la secuencia del cDNA no generó ningún sitio nuevo de restricción (de haberlo generado al cambiar una base, un análisis de restricción me indicaría casi por seguro que la mutación está presente.) y, por esta razón, el único método de selección fue la resistencia a ampicilina, así que, se seleccionó una colonia al azar y luego de hacer una miniprep se tomó este DNA como molde para otra reacción de PCR. En esta ocasión, al utilizar los oligonucleótidos con los sitios ClaI y EcoRV recuperaría el sitio EcoRV que se había perdido al ligarse con SmaI. Las condiciones fueron iguales que en la obtención del cDNA. Pero esta vez estaría amplificando al cDNA con la mutación deseada y recuperando los sitios de restricción originales.

Para clonar este cDNA mutado en el nuevo vector se digirió el vector y el inserto con EcoRV y ClaI durante 1 hora y con sus respectivos buffers. Luego de este periodo se volvió a calcular la cantidad de ambos para tener una concentración final de 20µg/ml y teniendo una proporción de 5:1 inserto:vector respectivamente. Nuevamente lo dejé toda la noche ligando y al siguiente día se volvió a transformar bacterias que fueron seleccionadas con ampicilina. De las colonias resultantes se tomaron 2 y

se mandó a secuenciar, utilizando el oligonucleótido antisentido. De las dos colonias el resultado era positivo así que, se preparó un cultivo de 1 litro para obtener una gran cantidad de esta nueva construcción, ahora llamada pOPRSVI/SOD1G93A.



Transfecciones

Para las transfecciones se utilizó una línea celular llamada C6, que fue generosamente provista por el laboratorio de la Dra. Herminia Pasantes. Esta línea celular es un glioma de rata que crece en forma fibroblastoide en condiciones estándar, 37°C y 5-7% CO₂. Es recomendable que las células para las transfecciones hayan tenido la menor cantidad de pases (transferencia del cultivo en distintas ocasiones) y en este caso las células C6 empleadas tenían cerca de 25 pases.

Una vez que obtuve una cantidad suficiente de ambas construcciones, el represor junto con SOD1G93A, sembré 1×10^5 células en cajas de cultivo de 6 pozos bajo condiciones estándar y al día siguiente se prepararon ambas construcciones para la transfección utilizando el método de fosfato de calcio (ampliamente descrito en Molecular Cloning de Sambrook y Maniatis). En este método se emplean 2 soluciones, HBS y $\text{CaCl}_2 2\text{M}$. HBS: 280mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12mM dextrosa, 50mM HEPES a un pH 7.05.

Ambos DNAs se alicuotaron a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para su utilización en este proceso que comprende tomar 220 μl del DNA a ser transfectado y 250 μl de la solución HBS para luego lentamente añadir 31 μl de $\text{CaCl}_2 2\text{M}$. Se incubó la preparación durante 30 minutos a temperatura ambiente hasta ver un precipitado en el tubo. Luego de esto a cada pozo de los cultivos celulares se le añadió un décimo de volumen de esta preparación teniendo en cuenta la cantidad de medio en el que estaban creciendo las células, en este caso cada pozo contenía 3ml de medio por ende se utilizaron 0.3ml de la preparación antes descrita.

Obviamente la descripción anterior del método debe ser ajustada según las condiciones que el investigador desee. En este caso el volumen de DNA tomado debía ser compartido entre dos plásmidos: 5'IC-Rvwtpvu-3'syn $\Delta\Delta$ NLSmini (el represor) y pOPRSVISOD1G93A (la SOD1 mutada), además de tomar en cuenta que generalmente se hacen duplicados y hasta triplicados según cada condición.

En estos experimentos se usaron triplicados y 5 grupos:

- 1) Únicamente SOD1G93A.
- 2) SOD1G93A junto con el REPRESOR en una proporción 1:2
- 3) SOD1G93A junto con el REPRESOR en una proporción 1:2 con 50 μM de IPTG
- 4) SOD1G93A junto con el REPRESOR en una proporción 1:3
- 5) SOD1G93A junto con el REPRESOR en una proporción 1:3 con 50 μM de IPTG

Todos los grupos se mantuvieron en condiciones estándar durante 5 días, para posteriormente realizar la detección de la SOD1 humana mediante un Westernblot, con un anticuerpo primario monoclonal adquirido en SIGMA, que únicamente reconoce a la SOD1 humana.

El Westernblot se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente bloquear y añadir los anticuerpos (primario y secundario) según las condiciones de cada uno y revelar mediante quimioluminiscencia.

El plásmido que contiene al represor tiene además un gen reportero, la β -galactosidasa. Así que luego de fijar unas células con glutaraldehído pude realizar un ensayo para detectar a este gen que indirectamente me estaría diciendo la efectividad de la transfección. Este ensayo es muy simple, comprende la fijación de las células y dejarlas incubando con el sustrato X-Gal toda la noche, para luego observar al microscopio la tonalidad azul esperada (Kyu Lim et al., 1989).

RESULTADOS

Los resultados se presentan en forma de figuras y descripción de ellas, en cuanto a cada uno de los pasos que se siguieron durante este trabajo.

Obtención de mRNA y cDNA.

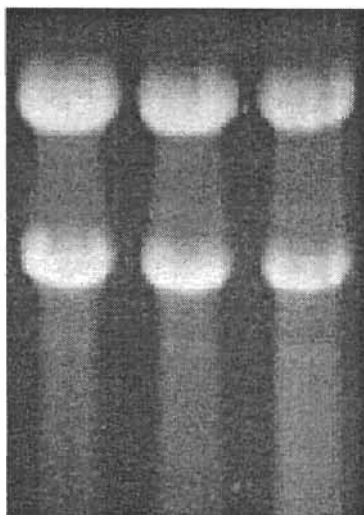


Figura 5

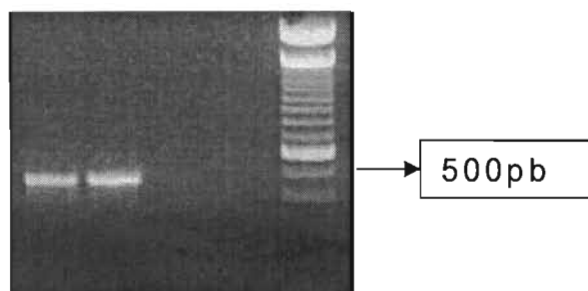


Figura 6

Figura 5: Gel desnaturizante de RNA total (obtenido de glóbulos blancos), comprobando la integridad de éste al observar en los tres carriles (misma extracción, diferente alícuota) al RNA de las subunidades grande y pequeña de los ribosomas.

Figura 6: Amplificación mediante RTPCR para obtener un producto de 475pb que corresponde con el cDNA de la SOD1 humana. Los primeros dos carriles muestran el producto amplificado y en el último tenemos un marcador de peso molecular en el cual marcado con una flecha esta la banda que corresponde a 500pb y continúa hacia abajo una de 400pb y 300pb respectivamente.

Clonación del cDNA en el vector pIJ2925.

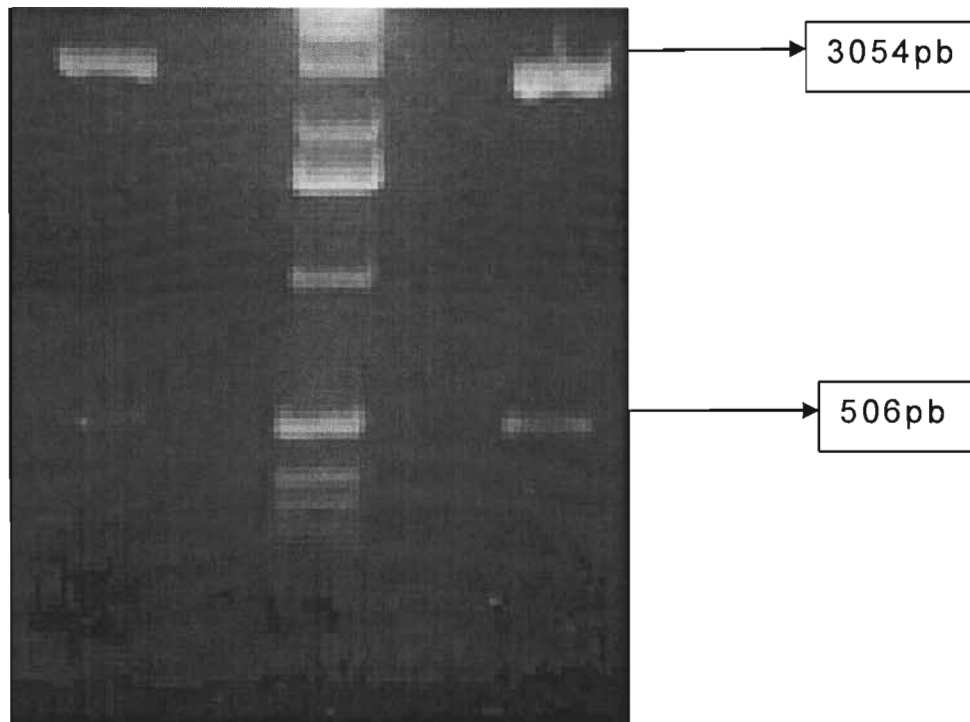


Figura 7: Análisis de restricción visto en un gel de agarosa al 1%, para la comprobación de la inserción del cDNA de la SOD1 en el vector pIJ2925. Dado que el inserto fue clonado como EcoRV y SmaI se perdieron estos sitios y me valí de otros dos sitios para comprobar la inserción del inserto, en este caso EcoRI y BamHI.

En el primer y último carril se observan 2 bandas, una de aproximadamente 2.8kb y la otra cercana a 500pb que corresponden al vector e inserto respectivamente. En el carril central se encuentra el marcador de peso y mediante flechas y recuadros indico los pesos de estas bandas, por ende puedo suponer que las bandas del primer y último carril corresponden a los pesos predichos.

Comprobación de la funcionalidad del PCR para la mutagénesis dirigida.

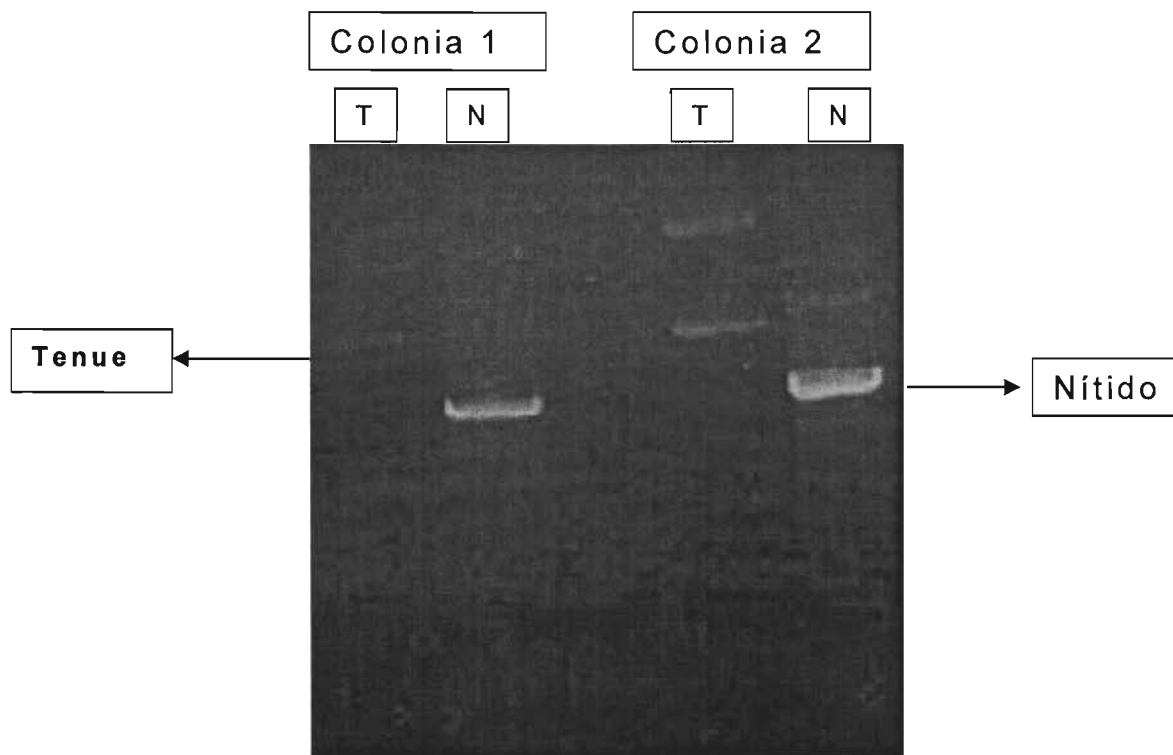


Figura 8: Antes de digerir el templado con la enzima DpnI, que en este caso corresponde al vector e inserto sin mutar, se corrió un gel de agarosa al 1% para comprobar que se amplificó un producto, el cual correspondería al templado pero en este caso con la mutación.

En este gel se pueden observar dos bandas nítidas correspondientes a la amplificación y en los carriles contiguos 2 bandas tenues que corresponden al templado que fue amplificado. Para este caso no se utilizó un marcador de peso, ya que el templado se extrajo de una bacteria y los patrones de plegamiento no permiten distinguir el plásmido por peso molecular. Cada par de carriles (comprenden un tenue y un nítido) corresponden a cada una de las dos colonias que se seleccionaron.

T: Tenue

N: Nítido

Secuenciación previa y posterior a la mutagénesis

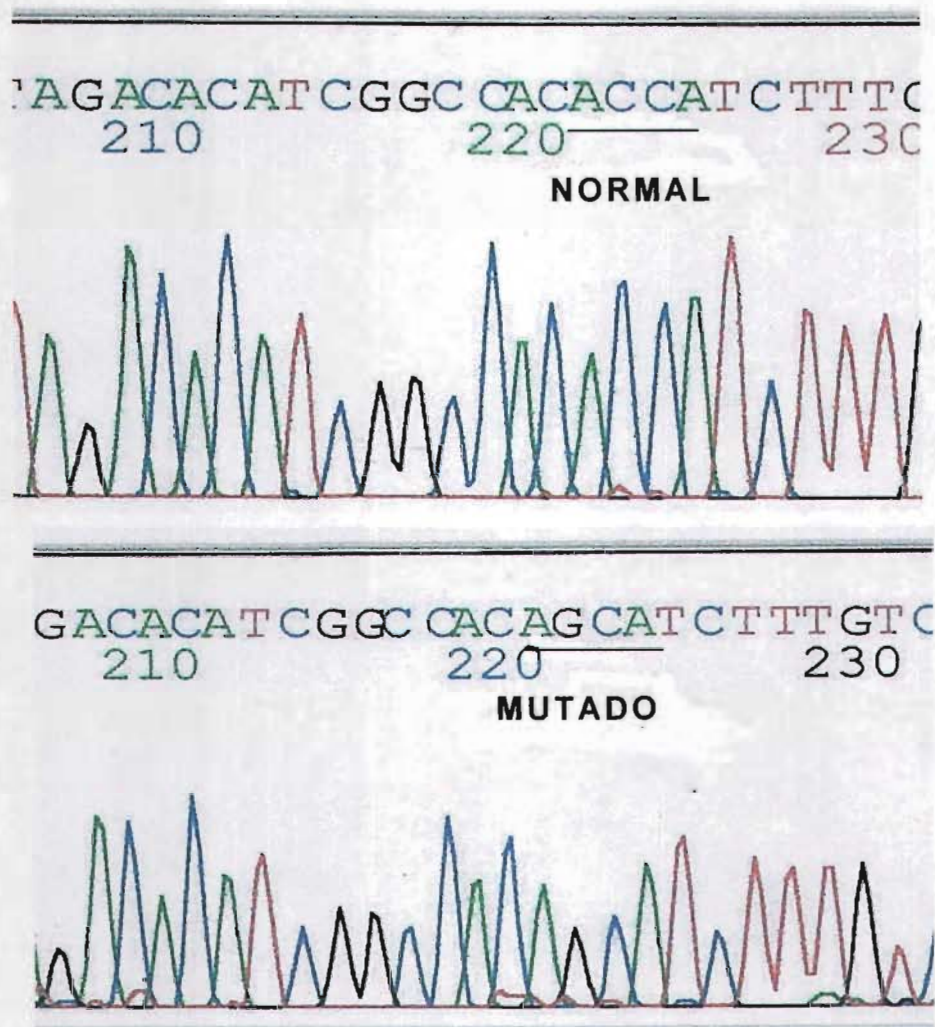


Figura 9: Comprobación de la efectividad en la mutagénesis. Se muestra únicamente la región en donde debe estar la mutación, pero en toda la secuencia no se encontró ninguna otra mutación que no fuera deseada, aunque si, la ausencia del sitio EcoRV, que posteriormente será recuperado.

ACC=Glicina

AGC=Alanina

PCR sobre el plásmido pIJ2925 para recuperar el sitio EcoRV.

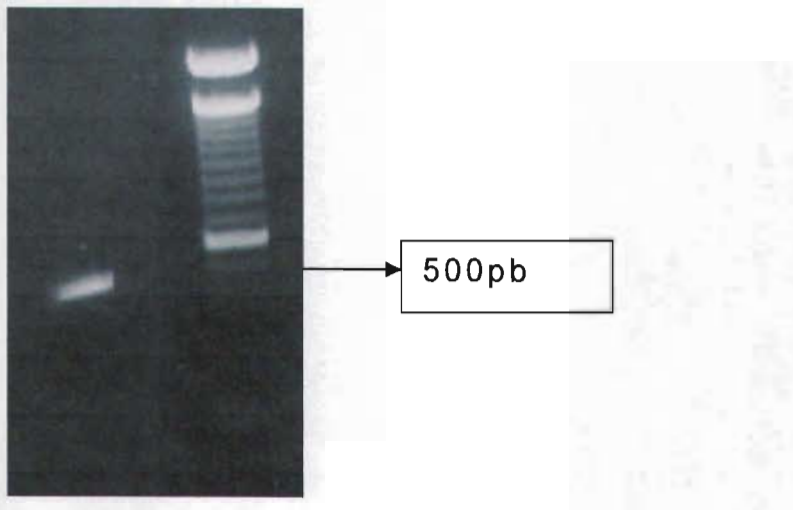


Figura 10: Para recuperar el sitio EcoRV se hizo un PCR tomando como templado al plásmido pIJ2925 con el inserto previamente mutado, y como se muestra en la foto el producto corresponde por peso molecular al cDNA de la SOD1.

Secuenciación del producto mutado pero en el plásmido pOPRSVI/SOD1G93A.

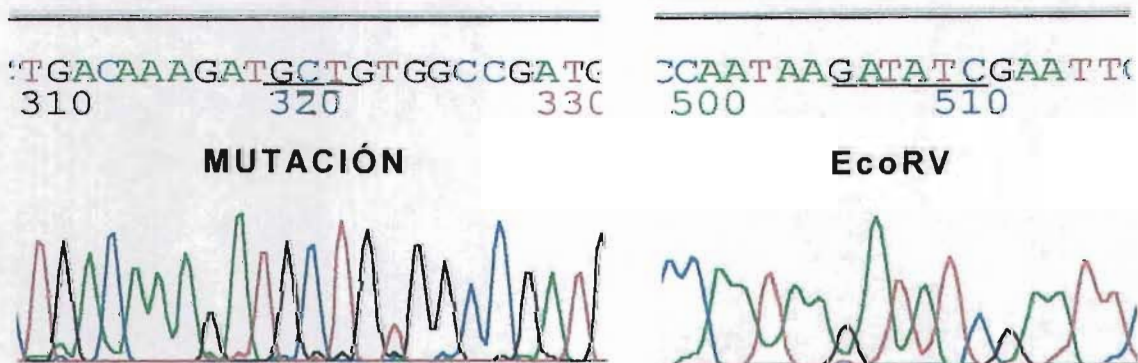


Figura 11: comprobación de la recuperación del sitio EcoRV y la continuidad de la mutación ahora en el plásmido pOPRSVI/MCS, que ha cambiado su nombre a pOPRSVI/SOD1G93A.

Comprobación de la transfección de las células utilizando a β -galactosidasa como reportero.

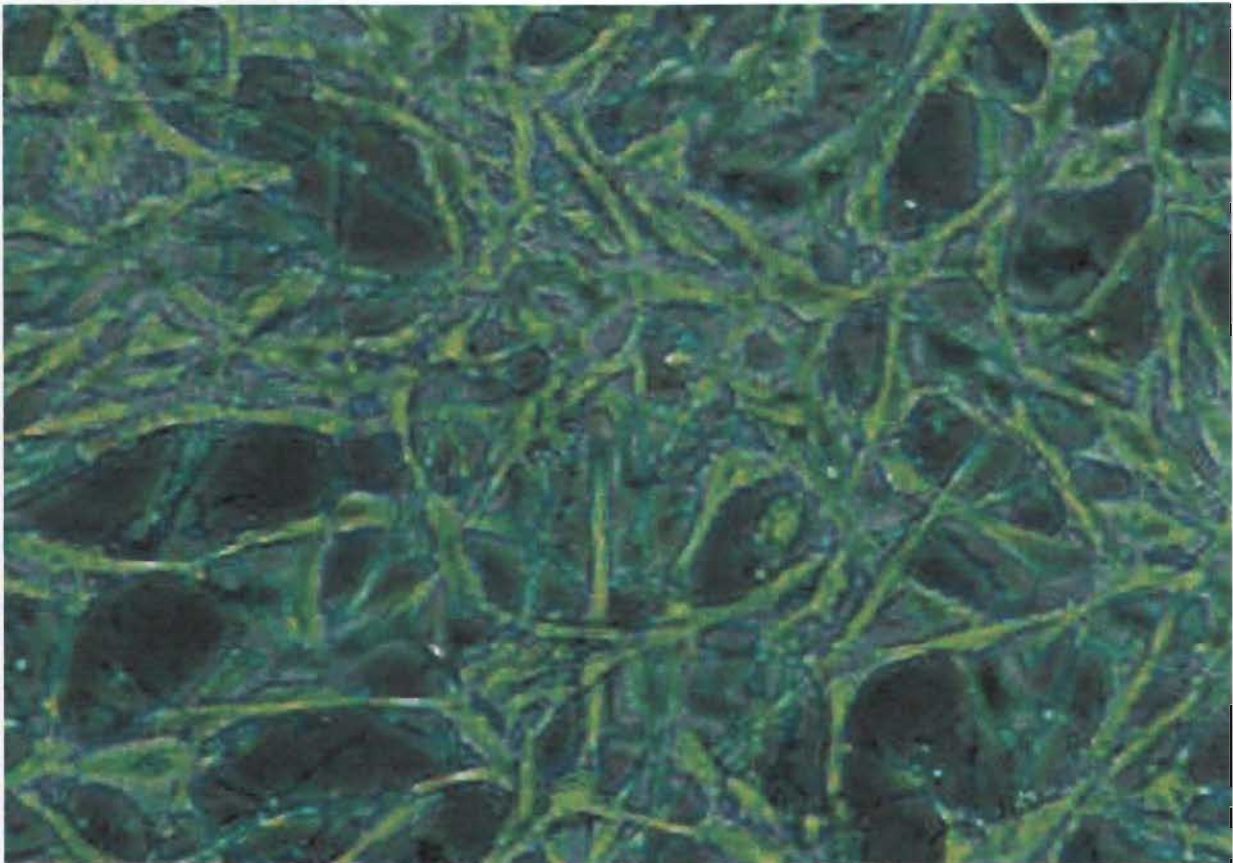


Figura 12: El plásmido que contiene al represor, 5'IC-Rvwtpvu-3'syn $\Delta\Delta$ NLSmini tiene además un gen reportero que es la β -galactosidasa, y utilizando el sustrato X-GAL. Las células (C6) transfectadas con esta construcción adquieren un color azul. En la foto, las proyecciones de las células muestran este color, así que podemos afirmar que la gran mayoría incorporó la construcción dándonos así una medida cualitativa de la efectividad de la transfección.

Desafortunadamente, la construcción con la SOD1 mutada no tiene un gen reportero, pero dado que el represor se incorporó muy bien, y ambas construcciones tienen similares tamaños podríamos suponer que la SOD1 se incorporó de igual manera.

Comprobación de la efectividad del represor mediante Westernblot.

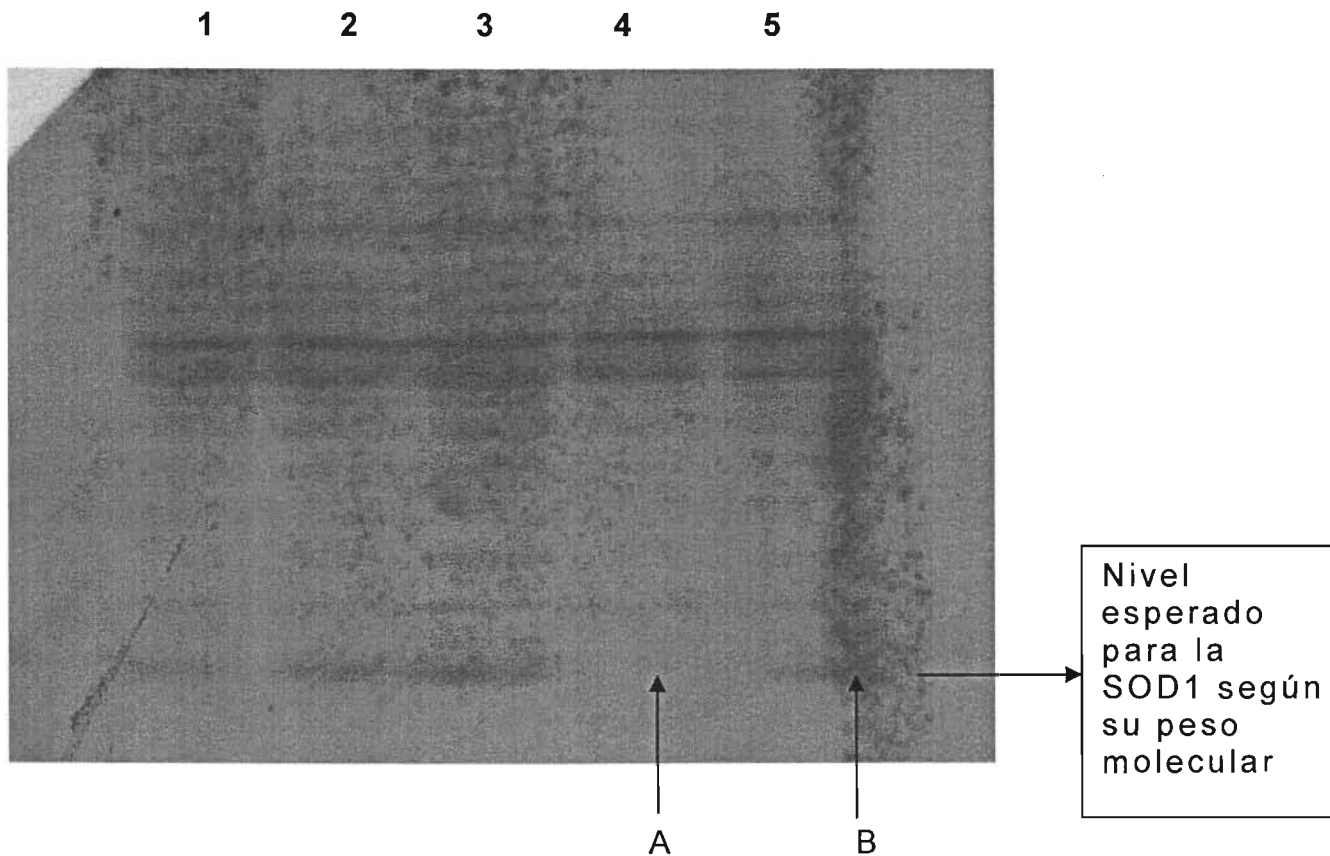


Figura 13: Westernblot de un extracto proteico total con 5 condiciones: primer carril el plásmido SOD1 únicamente; segundo carril, ambos plásmidos (represor y SOD1) en una concentración 2:1 respectivamente; tercer carril, ambos plásmidos con las concentraciones anteriores pero esta vez con IPTG 50 μ M; cuarto carril, ambos plásmidos en una concentración 3:1 represor y SOD1 respectivamente; quinto carril, ambos plásmidos con las concentraciones anteriores pero con IPTG 50 μ M.

Para todos los carriles la banda que corresponde a la SOD1 es la última, y es la que cambia con respecto a las distintas condiciones.

Marcado con flechas se encuentran los carriles que tienen la mayor diferencia, la flecha A es aquella que no tuvo un inductor y es por esto que no aparece una banda donde la flecha termina. En la flecha B se encuentran las mismas condiciones que en la flecha A pero esta vez al utilizar IPTG se puede ver una banda, correspondiente a la SOD1.

DISCUSIÓN

Dados los antecedentes y los resultados en este trabajo, hasta ahora *in vitro*, estoy convencido de la funcionalidad de este sistema. Desafortunadamente en la prueba del Westernblot el anticuerpo secundario es bastante sucio y aunque probé bloqueando más tiempo y utilizando una menor cantidad de anticuerpo secundario siempre obtenía bandas no deseadas. Aún así, se pueden observar diferencias en cuanto a la intensidad de la banda que corresponde a la SOD1 humana, estas diferencias son más evidentes cuando se utilizó una proporción de 3:1 represor:SOD1 y no son tan evidentes cuando se utiliza 2:1. Durante estos ensayos de transfecciones se probaron diversas proporciones de ambos plásmidos, teniendo muy poca represión en 1:1 y teniendo al gen totalmente reprimido al emplear 4:1 incluso subiendo la concentración de IPTG no es posible detectar a la SOD1 en los ensayos de Westernblot.

Durante las transfecciones, el cultivo se dejó incubando por un periodo de 3 días, que no fue suficiente para notar algún cambio morfológico o ver una muerte considerable en las células transfectadas. Sería interesante prolongar este tiempo de incubación y ver si ocurre muerte celular, además mediante inmunocitoquímica poder observar agregados de SOD1.

En un comunicado con la Dra. H. Scrable (Department of neuroscience, University of Virginia) acerca de los resultados que había obtenido, recibí una crítica que podría presentar un problema para mi modelo y es que su grupo no ha podido obtener buenos resultados utilizando promotores virales en animales transgénicos, probablemente debido a patrones de metilación durante el desarrollo. Aún no sé si ellos han utilizado algún promotor de RSV así que tendré que buscar información de éste *in vivo*, pero *in vitro* se ha demostrado la expresión de RSV en diversos tipos celulares (revisado en Smith R.L 2000). Si esto llegará a ser un problema existen dos soluciones, la primera y más obvia sería cambiar mi promotor y la segunda sería flanquearlo con "insulators".

Se eligió este sistema de regulación genética para ser aplicado a un modelo de ALS. Yo considero que tiene varias ventajas para este propósito. Una de ellas es la capacidad de “prender” y “apagar” a la SOD1 mutada en distintas etapas del desarrollo del animal. La segunda, es la ventaja de poder establecer, si una vez que el animal desarrolle los síntomas es necesario que el gen mutado se siga expresando o el daño inicial fue suficiente para llevar a este animal a las últimas consecuencias de la ALS, en este caso una parálisis total seguida por la muerte. La tercer ventaja es que este sistema posee varios inductores como son: Lactosa, alolactosa, IPTG, PNP-βGal, MTG entre muchos otros, así que no me sorprendería que se encontrara alguno que no atravesase la barrera hematoencefálica (BHE). De esta forma se puede ver que ocurre con un animal que expresa esta SOD1 mutante en todos los tipos celulares menos en el SNC. Esto me parece en particular interesante, debido a que, como se había mencionado, existen dos tipos de ratones transgénicos que expresan la SOD1 mutada en neuronas o astrocitos únicamente y ninguno de los dos desarrolla la enfermedad. Esto me ha llevado a pensar que posiblemente se trate de un estrés muscular el que cause la degeneración de las motoneuronas y no que estas mueran debido a la mutación en SOD1. Otra opción sería, una vez encontrado un inductor que no atravesase la BHE, utilizarlo mediante inyecciones intratecales o mediante una mini bomba osmótica para que únicamente las células del SNC expresen la SOD mutada.

Obviamente como todos los experimentos, existieron situaciones que implicaban retrasos y ajustes que se fueron haciendo durante el desarrollo de cada uno de estos.

Aún así espero en un futuro no lejano culminar el trabajo con la generación de un animal transgénico al cuál se le podrán obtener resultados discutibles.

REFERENCIAS

Ackerley S, Grierson AJ, Brownlee J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J. Cell Biol.* 150: 165-176. (2000).

Beckman JS, Estévez AG, Crow JP, Barbieto L. Superoxide dismutase and the death of motor neurons in ALS. *TINS* 24:S15-S20 (2000).

Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854 (1998).

Calabrese V, Bates TE, Giuffrida Stella AM. NO synthase and NO dependent signal pathway in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem. Res.* 25:1315-1341(2000).

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, García ML, Boillée S, Rule M, McMahon PA, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Julien JP, Goldstein LSB, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motoneurons in ALS mice. *Science* 302: 113-117 (2003).

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig disease: deciphering selective motoneuron death in ALS. *Nature reviews. Neuroscience.* 2:806-819(2001).

Cleveland DW. From Charcot to SOD1: Mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 24:515-520 (1999).

Cronin CA, Gluba W, Scrabble H. The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes & Development.* 15: 1506-1517 (2001).

Couillard-Després JS, Zhu Q, Wong PC, Price DL, Cleveland DW, Julien JP. Protective effect of neurofilament NF-H overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9626-9630 (1998).

Dupuis L, de Tapia M, Rene F, Lutz-Bucher B, Gordon JW, Mercken L, Pradier L, Loeffler JP. Differential screening of mutated SOD1 transgenic mice reveals early up-regulation of a fast axonal transport component in spinal cord motor neurons. *Neurobiol Dis.* 7:274-285 (2000).

Durham HD, Roy J, Dong L, Fligewicz DA. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:52-56 (1997).

Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial Amyotrophic lateral sclerosis. *J.Neurochem.* 69:2064-2074 (1997).

Gong YH, Parsadanian SA, Andreeva A, Snider WD, Elliot JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn Superoxide Dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motorneuron degeneration. *J. Neurosci.* 20: 660-665 (2000).

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:7380-7384 (1980).

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng H-X, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. Motor neuron degeneration in mice that express a human mutant Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775 (1994).

Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J.Neuropathol. Exp. Neurol.* 43: 461- 470 (1984).

Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, De Vito L, Psaltis G, De Gennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1604 (2002).

Hu MC, Davidson N. The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell.* 48: 555-566 (1987).

Johnston AJ, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12571-12576 (2000).

Jean-Pierre Julien. Amyotrophic lateral sclerosis: unfolding the toxicity of the missfolded. *Cell* 104:581-591(2001).

Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Bcl-2: Prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic sclerosis. *Science.* 277:559-562 (1997).

Kyu Lim, Chi-Bom Chae. A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for beta-galactosidase. *BioTechniques* vol.7 No.6 576-579 (1989).

Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olzewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 288:335-339 (2000).

Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20:589-602 (1998).

Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J.Biol.Chem.* 271:12275-12280.

Mac-Millan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allograft. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11853-8 (1996).

Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 58:459-471 (1999).

Meyer T, Fromm A, Munch C, Schwalenstocker B, Fray AE, Ince PG, Stamm S, Gron G, Ludolph AC, Shaw PJ. The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J.Neurol. Sci.* 170:45-50 (1999).

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21: 9246:9254 (2001).

Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Cleveland DW. Caspase-1 and 3 are sequentially activated in motoneuron death in Cu, Zn superoxide-dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13901-13906 (2000)

Pedersen WA, Luo H, Kruman I, Kasarskis E, Mattson MP. The prostate apoptosis response-4 protein participates in motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* 14:913-924 (2000).

Phillis JW. A radical view of cerebral ischemic injury. *Progr. Neurobiol.* 42:441-448 (1994).

Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-Specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motoneuron impairment. *J. Neurosci.* 21:3369-3374.

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:689-693 (1996).

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Fieglewics DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rhmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62(1993).

Rothstein JD, et al. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Ann. Neurol.* 30:224-225 (1991).

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38:73-84 (1995).

Rouleau GA, Clarke AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Fligewicz DA. SOD1 mutation is associated with accumulations of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39. 128-131 (1996).

Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular cloning a laboratory manual.* Second edition vol.3 16.32-16.34.

Scrabble H, Stambrook PJ. Activation of the lac repressor in the transgenic mouse. *Genetics.* 147: 297-304 (1997).

Smith RL, Traul DL, Schaack J, Clayton GH, Staley KJ, Wilcox CL. Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system. *Journal of virology* 74: 11254-11261 (2000).

Spooren WP, Hengerer B. DNA laddering and caspase 3-like activity in the spinal cord of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Cell. Mol. Biol.* 46:63-69.

Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F. On the relationship between extracellular glutamate hyperexcitation and neurodegeneration in vivo. *Neurochem. Int.* 34:23-31 (1999).

Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Hediger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat. Neurosci.* 2:427-433.

Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N, Przedborski S. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic sclerosis. *J. Neurochem.* 73:2460- 2468 (1999).

Williamson TL, et al. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95:9631-9636 (1998).

Wong N.K.Y, He B.P, Strong M.J. Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 972-982 (2000).