



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE SITIOS DE
FOSFORILACION DE LA FILAMINA HUMANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

RICARDO URIBE RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2005

m.344507



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

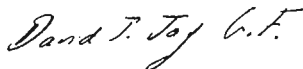
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

Jurado asignado:

- Presidente: Prof. Elpidio García Ramírez
Vocal: Prof. María Elena Ibarra Rubio
Secretario: Prof. David John Jay Gómez - Farías
1er. Suplente: Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes
2o. Suplente: Prof. María Eugenia de La Torre Hernández

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.



Dr. David John Jay Gómez - Farías

ASESOR



M. en C. María Elizabeth García Plascencia

SUPERVISOR TÉCNICO



Ricardo Uribe Rodríguez

SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo de investigación fue apoyado con un donativo realizado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyecto No. U40188-Q.

Al Dr. David John Jay Gómez-Farías por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su confianza, apoyo y enseñanza.

A la M. en C. María Elizabeth García Plascencia por su enseñanza, su paciencia y por sus valiosos consejos dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Elpidio García y a la Dra. Ma. Elena Ibarra por sus valiosas correcciones y útiles comentarios a este trabajo.

DEDICATORIA.

A mis padres que han dado todo por mí, por todo su amor, su cariño, su dedicación, su ayuda, su apoyo, sus desvelos y sus consejos. Sin ustedes este logro no sería posible. Los quiero mucho.

A mi hermana Laura, a mi hermano Guillermo y a mi hermana Cristina, los cuales me han ayudado y enseñado. Los quiero mucho.

A mis abuelos, que siempre los he admirado por lo bueno que han hecho.

A mi familia, que siempre me ha apoyado y aconsejado.

A Cristina, por todo su amor, su cariño, sus consejos, su ayuda en todo momento, su comprensión, su sonrisa. Por cada uno de los momentos que hemos vivido juntos. Por hacer especial cada día de mi vida. Por todo lo que queremos y solo tú y yo comprendemos. Te amo.

A mis amigos Alonso, Jorge, Noé y Rainier, con los cuales pasé momentos inolvidables en el CCH.

A George, Carlos Boites, Liliana, Oscar, Daniel, Rocío, Raúl, Hugo, Rafael, Vanesa, Rosalba, Perla, Tamara, Karla y Francisco por ser buenos amigos y compañeros en todo momento. Gracias por todos sus consejos y ejemplos.

A Gaby, Alejandra y Elizabeth por brindarme su amistad y ayuda en distintos momentos de la carrera.

A los integrantes de la UIMIQ en el Centro Médico Siglo XXI.

A la banda del volley.

I. Índice

	Página
I. Índice	5
II. Abreviaturas	7
III. Resumen	8
IV. Antecedentes	10
• La plaqueta	10
• El citoesqueleto de la plaqueta	12
• La actina	13
• La filamina	15
• Interacción de la filamina con otras proteínas	18
• Regulación de la filamina por fosforilación	21
• Deficiencias en la filamina A	22
V. Planteamiento del problema	24
VI. Hipótesis	24
VII. Objetivo general	24
VIII. Objetivos particulares	25
IX. Materiales y métodos	26
• Reacciones de PCR y mutagénesis dirigida basada en PCR	26
• Expresión de los péptidos nativo y mutado	30
• Identificación de los péptidos nativo y mutado mediante anticuerpos	31
• Fosforilación de los péptidos nativo y mutado	32
X. Resultados	34
XI. Discusión	40

XII. Conclusiones	43
XIII. Bibliografía	44
XIV. Anexo	51

II. ABREVIATURAS

ABD	Dominio de unión a actina ("Actin Binding Domain")
ABP	Proteínas de unión a actina ("Actin Binding Proteins")
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín mono fosfato
AMPc	Adenosín mono fosfato cíclico
CvHSP	Proteína cardiovascular de choque térmico ("Cardiovascular heat-shock protein")
F- actina	Actina filamentosa
FcyR	Fracción cristalizable gamma R
FLNA	Filamina A
GP-Ib α	Glicoproteína Ib α
HRP	Peroxidasa de rábano ("Horsh radish peroxidase")
IPTG	Isopropil tiogalactósido
kDa	kilo Daltones
N-terminal	Amino terminal
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína Cinasa dependiente de AMPc
SB	Buffer de carga ("Sample buffer")
SCA	Sistema canalicular abierto
St	Estándar Dual Color
STE	Solución Tris - EDTA
T 167	Treonina 167

III. RESUMEN

La plaqueta es una célula sin núcleo que deriva de los megacariocitos. Cuando la plaqueta se ve sometida a estímulos externos, sufre cambios en su estructura y función. Estos cambios se acompañan de modificaciones en el citoesqueleto. El citoesqueleto está formado por distintas clases de proteínas, entre las que destaca la actina. Los cambios en la estructura del citoesqueleto están acompañados de procesos de gelificación/desgelificación de la malla periférica de actina, es decir, la actina asociada a la membrana citoplásmica. En este sentido, la filamina es la principal proteína entrecruzadora de filamentos de actina y de su integridad depende la conformación de esta estructura subcelular.

La filamina (ABP-280, filamina no muscular o FLNA) es un homodímero de 280 kDa, la cual promueve la ramificación ortogonal de filamentos de actina y además une los filamentos de actina a glicoproteínas de membrana en respuesta a diversos estímulos exógenos y fisiológicos.

Estudios previos han indicado que la filamina está regulada por un proceso de fosforilación/desfosforilación en regiones específicas de la proteína. Sin embargo, hasta la fecha, aún no se han identificado ni caracterizado todos los posibles sitios de regulación por este mecanismo de modificación postraduccional. En este estudio se propuso identificar un sitio potencial de fosforilación, cuya participación en la unión a actina fue previamente sugerido en la literatura.

Esto se realizó mediante la generación de proteínas recombinantes en forma nativa y mutada. Así mismo, el análisis por mutagénesis dirigida en el residuo de treonina 167, previamente propuesto como sustrato potencial para

cinasa dependiente de AMPc (PKA), permitió confirmar que este residuo efectivamente es un sitio sujeto a fosforilación.

Como se discute en el presente trabajo, este es un suceso crucial durante la reorganización del citoesqueleto de actina en la plaqueta.

IV. ANTECEDENTES.

Las plaquetas.

Las plaquetas son estructuras celulares sin núcleo que se forman en la megacariocitopoyesis a nivel de la médula ósea por fragmentación de la membrana plasmática de los megacariocitos, para posteriormente distribuirse por el torrente sanguíneo. En condiciones de reposo tienen una forma discoide con un diámetro de 2 a 3 μm y con una vida media en la circulación sanguínea de 6 a 10 días [1] [Figura 1]. Las plaquetas contienen una variedad de organelos de almacenamiento que contribuyen a su función homeostática por la liberación de sus contenidos a los espacios extracelulares. Existen dos tipos principales de gránulos secretorios: los gránulos alfa (que son la población más prominente en tamaño y número) y los gránulos densos. Los gránulos densos contienen un almacén de ATP, ADP, calcio y magnesio. En el interior de las plaquetas se encuentran pequeñas cantidades de casi todas las proteínas plasmáticas, por lo que las concentraciones circulantes de éstas determinan sus niveles plaquetarios [2].

Los principales organelos de la plaqueta son la membrana plasmática, el citoesqueleto, el sistema canalicular abierto (SCA), el sistema tubular denso y los gránulos. Sin embargo, están presentes otros, incluyendo mitocondrias y gránulos de glucógeno.

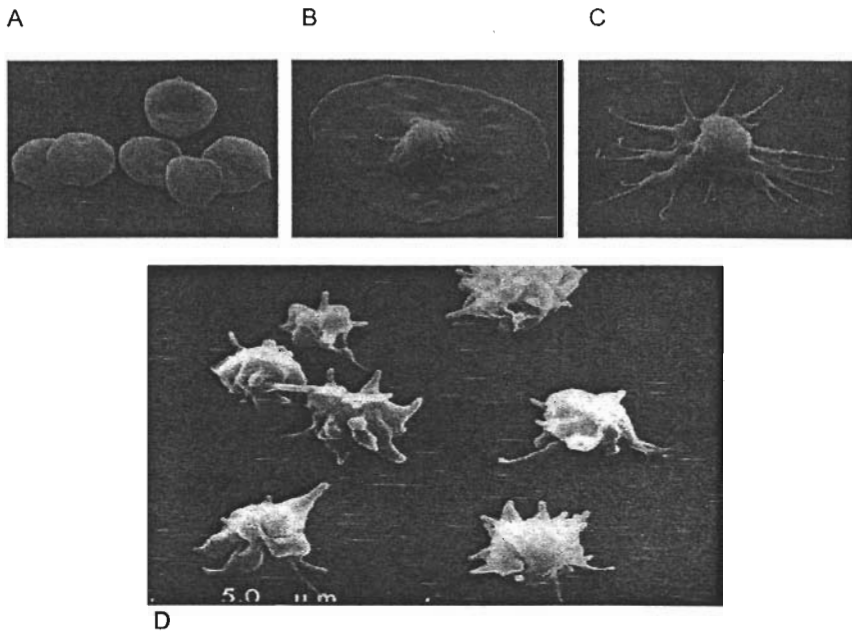


Figura1. Micrografía electrónica de plaquetas. Normalmente las plaquetas tienen forma de disco (A), pero al ser activadas, cambian su forma (B) hasta formar pseudópodos (C y D) [19].

En plaquetas en reposo y activadas se han descrito varios constituyentes del citoesqueleto, incluyendo a los filamentos de actina, al anillo marginal de microtúbulos, moléculas de miosina y proteínas de unión a actina (ABP), como la α -actinina, vinculina, talina, espectrina y la filamina [3-12]. Las plaquetas circulan en un estado inactivado a través de un complejo sistema vascular rodeado de una monocapa de células endoteliales. En respuesta al daño de las paredes de los vasos sanguíneos, alteraciones en el flujo de la sangre o estímulos químicos, las plaquetas manifiestan una triada de respuestas funcionales: adhesión, secreción y agregación. La activación de las plaquetas resulta en cambios rápidos y únicos en la morfología de esta célula y en la secreción del contenido de los distintos gránulos, los cuales contribuyen a

la agregación plaquetaria. Para llevar a cabo estas respuestas, se requiere de una serie de reorganizaciones del citoesqueleto plaquetario, los cuales incluyen el entrecruzamiento de los filamentos de actina por filamina [13].

El citoesqueleto de la plaqueta.

El citoesqueleto de la plaqueta consiste en una red de estructuras filamentosas que mantienen la estructura de la plaqueta, estando la reorganización de estas estructuras implicada en las respuestas de la plaqueta a la activación. Contiene las proteínas contráctiles actina y miosina, proteínas implicadas en la formación de los microtúbulos (principalmente la tubulina), y otras asociadas a éstas [14,15]. La actina se encuentra (en las plaquetas no activadas) tanto en la forma polimerizada, actina-F (40-50%), como en la forma monomérica, actina-G. Los monómeros poseen un peso molecular de 44 kDa y pueden ser del tipo α ó γ . La nucleación es impedida, esencialmente, por: 1) la profilina, que forma un complejo con la G-actina, y 2) en presencia de calcio, por la gelsolina, que protege la extremidad de pequeños polímeros de actina ya formados [14].

Cuando las plaquetas son activadas, una cantidad adicional de actina polimeriza y se asocia a otras proteínas, tales como la tropomiosina, la α -actinina y la filamina, lo que determina la organización de estos filamentos en una red tridimensional periférica y la formación de haces, originando filopodia y lamelipodia. Estas reorganizaciones de la actina son responsables del cambio de forma de las plaquetas, el cual caracteriza su activación en el aspecto morfológico. La contracción de los filamentos periféricos hace que los gránulos

dispersos en el citoplasma ocupen una posición central, y simultáneamente liberen sus contenidos vía SCA [17].

La fuerza contráctil es generada cuando la miosina es fosforilada e interactúa con los filamentos de actina. La miosina plaquetaria, tal como la miosina del músculo esquelético, está constituida por 6 cadenas polipeptídicas. El funcionamiento del sistema actina-miosina plaquetario es, en la mayor parte de sus aspectos, similar al observado en el músculo esquelético. En las plaquetas en reposo, los microtúbulos son los únicos componentes del citoesqueleto visibles al microscopio electrónico. Son estructuras tubulares constituidas por 13 subfilamentos de tubulina y cada subfilamento es una sucesión alternada de tubulinas α y β , proteínas globulares con un peso molecular 55kDa. El haz de microtúbulos, responsable del mantenimiento de la forma discoide de las plaquetas en reposo, se deforma durante el proceso de activación, se fragmenta transitoriamente y se re-ensambla en una posición más central, circundando los gránulos plaquetarios [14, 15].

La red de actina cortical en las plaquetas presenta semejanzas con el citoesqueleto de actina de los eritrocitos. En las plaquetas, esta red consiste en filamentos de actina entrecruzados en una red bidimensional. Una diferencia decisiva entre el citoesqueleto de las plaquetas y de los eritrocitos, es la presencia en las plaquetas de una segunda red de filamentos de actina organizada por entrecruzamientos de actina en un gel tridimensional [18].

La actina.

La actina es un polipéptido de cadena simple, con un peso molecular de 43 kDa. Esta proteína es expresada por 6 genes que codifican para 6 proteínas

distintas, las cuales varían en un número pequeño de aminoácidos. Las tres clases de actina humana se clasifican como tipo α , β y γ , basadas en la diferencia que hay entre sus puntos isoeléctricos. La actina es una de las proteínas más abundantes de los tejidos humanos y es expresada ampliamente en casi todos los tipos de células eucariotas. En células no musculares, en especial aquellas que son sometidas a movimientos rápidos o que resisten fuerzas mecánicas, como las plaquetas, la actina se encuentra en altas concentraciones cerca de la superficie de la membrana. En células que no son musculares, la actina se agrupa dando una variedad de estructuras, incluyendo redes isotrópicas de actina en el espacio del citoesqueleto, haces de filamentos de actina contráctil, también llamados fibras de tensión y arreglos de filamentos paralelos altamente organizados [Figura 2.][21].

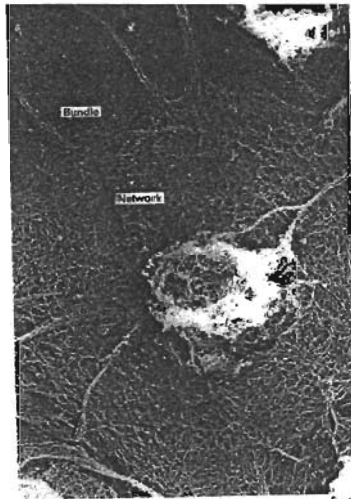


Figura 2. Micrografía del citoesqueleto de la plaqueta. Los haces de actina salen de la célula para formar filopodia. En la región interna de la célula, los filamentos de actina forman una red que llena el citosol [21].

En plaquetas en reposo un 35- 40% de la cantidad de actina se encuentra organizada como filamentos [16]. Los filamentos tienen dos cadenas de G-actina enrolladas en espiral. Cuando hay estímulos externos ó fisiológicos ocurre una rápida reorganización de actina en filamentos formando un citoesqueleto complejo. La plaqueta tiene que ser sometida a complicados rearrreglos, responsables de un gran repertorio de cambios de forma en esta célula durante una reacción de coagulación. Para llevar a cabo las reorganizaciones en el citoesqueleto de la plaqueta, se necesitan varias proteínas que polimericen a la actina, que la organicen y entrecrucen. Son alrededor de 11 proteínas que entrecruzan a la actina, pero de todas ellas, destaca una proteína, la filamina A (FLNA), por ser la proteína entrecruzadora de actina más potente y la más abundante [21,22].

La filamina

La filamina fue purificada por primera vez por Hartwig y Stossel [23] y posteriormente ellos mismos la describieron en 1990 [24]. Existen tres isoformas de la proteína en mamíferos, (A, B y C). La filamina A se encuentra distribuida principalmente en células no musculares y que tienen una rápida reorganización del citoesqueleto (por ejemplo células blancas). La filamina B se encuentra principalmente en células musculares y la filamina C se encuentra en músculo esquelético y cardíaco en la edad adulta. La organización génica de los tres genes de filamina es altamente conservada. Los tres isotipos de filamina muestran entre sí un 60% - 80% de homología en las secuencias completas, con excepción de las dos regiones bisagra, las cuales muestran grandes divergencias [25]. La filamina A es una fosfoproteína con estructura

homodimérica con un peso molecular de 280 kDa que en su región N-terminal (compuesta por 275 aminoácidos), tiene un dominio de unión a actina (ABD), seguido por 24 segmentos repetitivos de aminoácidos (cada repetición consta de 100 aminoácidos) los cuales tienen forma de hojas β plegadas antiparalelas, dos regiones bisagra (susceptibles a degradación por calpaína) y una región C-terminal. La dimerización de la filamina se da en la región C-terminal, mediante puentes de hidrógeno. Este enlace facilita la formación de una estructura flexible en forma de V, la cual es esencial para su función. [Figura 3]. El dominio de unión a actina está compuesto de dos dominios homólogos a calponina (una proteína que une actina, tropomiosina y calmodulina), CH1 y CH2. Cada dominio CH es una región de 110 aminoácidos y consiste básicamente en 4 α -hélices principales, cada una compuesta de 11-18 aminoácidos conectada por largos "loops". Estos sitios de unión a actina se parecen mucho a los de otras proteínas de unión a actina, tales como la β espectrina, la α -actinina, la calponina y la distrofina [25,26].

La filamina es capaz de unirse a todas las isoformas de la actina. Esta proteína puede inducir ramificaciones ortogonales de gran ángulo. Los ángulos formados entre los monómeros de filamina son inversamente proporcionales a la concentración de la filamina en plaquetas [20]. La formación de haces paralelos de filamentos de actina es promovida cuando la proporción molar de filamina a actina es 1:10-50 mientras que una estequiometría de 1:150-740 lleva a la formación de redes ortogonales de actina. Existen varios tipos de entrecruzamiento de la actina causados por la filamina: de tipo X, T ó Y. El mecanismo por el cual la filamina promueve la ramificación no está completamente entendido.

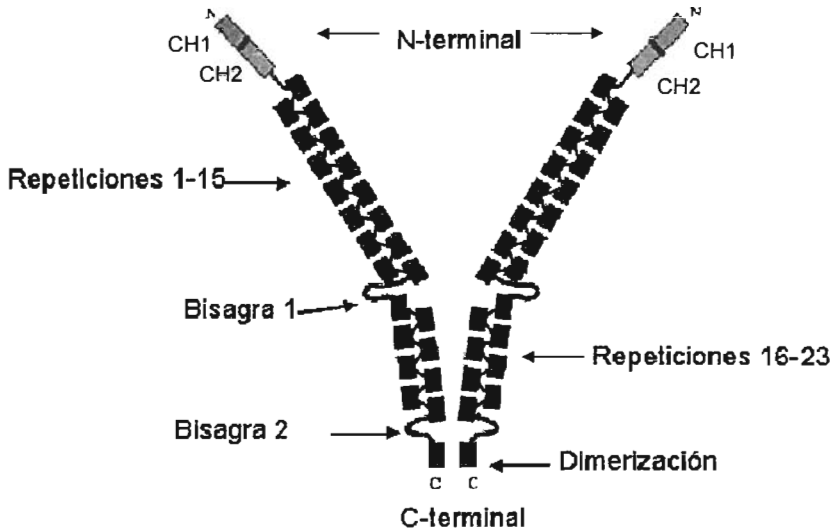


Figura 3. Modelo esquemático de la filamina A humana. Cada monómero contiene tres regiones: el dominio de unión a actina, las repeticiones 1 a 23 que incluyen las dos regiones bisagras y la repetición 24, la cual se une a la membrana.

Lo que es claro, es que la filamina tiene que estar como homodímero y tener el dominio de unión a actina intacto [20]. La filamina está ubicada en puntos donde los filamentos se intersectan o donde ellos están en contacto con la membrana celular [Figura 4] [26].

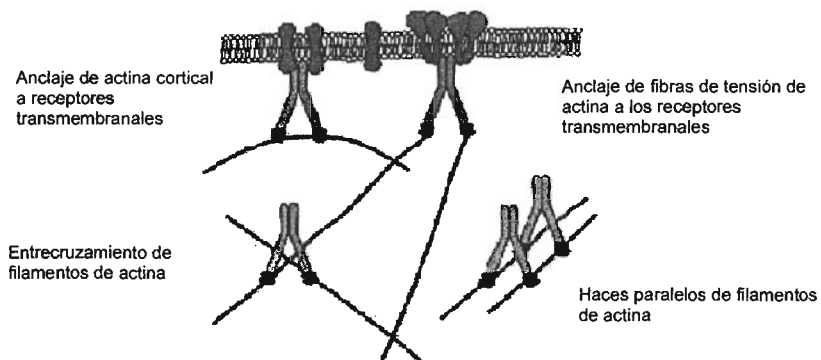


Figura 4. Modelo esquemático de las funciones de la filamina en el entrecruzamiento de actina y unión a receptores transmembranales. La filamina une a los filamentos de actina en redes ortogonales y en haces paralelos, dependiendo de la concentración de la filamina y del isotipo. La filamina se une a receptores transmembranales mediante el sitio C-terminal [26]

Interacción de la filamina con otras proteínas

En los últimos años, se ha encontrado que una amplia variedad de proteínas se unen a la FLNA, incluyendo receptores transmembranales y moléculas de señalización. Hasta ahora se han encontrado alrededor de 20 macromoléculas que se unen a la filamina [26,27]. Existen más interacciones de proteínas en el extremo C-terminal de la filamina que en el extremo N-terminal. En la tabla 1 se muestran las moléculas que interactúan con la filamina y en la figura 5 se esquematiza la ubicación de la interacción entre proteínas y receptores con la filamina. No existe una homología básica entre los distintos dominios de unión de las proteínas que se asocian a la filamina. Hasta ahora se conoce muy poco sobre la regulación de las interacciones entre las proteínas y la filamina. El campo que ha tenido más resultados en la

explicación de estas interacciones ha sido la regulación por fosforilación de la filamina.

Tabla 1. Proteínas intracelulares asociadas con Filamina A

Proteína	# de repetición en el que se une
Proteínas transmembranales	
GP-Ib α [28]	17-19
Integrinas β 1A, β 1D, β 2,3,7 [29][30]	20-24
Fc γ RI [31]	No determinado
Factor tisular [32]	23-24
Receptor de dopamina D2,3 [33]	16-19
(D)presinilina 1,2 [34]	21-24
Receptor de Furina [35]	13-14
Calveolina 1 [36]	22-24
Canal de potasio Kv4.2 [37]	C-terminal
Proteínas de señalización	
Ral A, Rho A, Rac 1, Cdc42 [38]	24
Receptor de Andrógeno [39]	16-19
Proteínas citoplasmáticas y de citoesqueleto	
Cv HSP [40]	23-24
Granzima B [41]	20-24
F- actina [42]	N – terminal

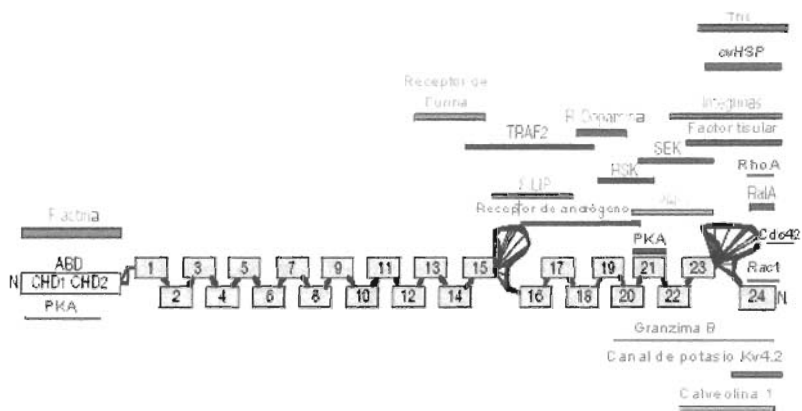


Figura 5. Representación esquemática de las regiones de interacción de la Filamina. Como se puede ver, la mayoría de las interacciones se dan en la región C-terminal, la cual está unida a membrana celular. El sitio N-terminal sólo se une con los filamentos de actina [27].

Regulación de la filamina por fosforilación

Como ya se mencionó, la filamina es una fosfoproteína, que teóricamente tiene 33 sitios fosforilables por PKC, 30 sitios por casein cinasa II, 3 sitios por PKA y un sitio por una tirosin cinasa [46]. Paulatinamente se han encontrado los sitios que son fosforilables por las cinasas citadas anteriormente. En 1983, Stracher et al, encontraron que al desfosforilar filamina de plaquetas frescas con fosfatasa alcalina de *E.coli*, la filamina pierde su actividad de entrecruzar actina y pierde su afinidad por ella [42]. Posteriormente, en 1994, Stracher y Jay publicaron que al degradar a la filamina con calpaína, obtienen dos fragmentos, uno de 190 KDa y otro de 90 KDa. Al fosforilar los dos fragmentos con PKA, encontraron que solamente el fragmento de 90 KD incorpora ^{32}P [44]. Ese mismo año, Stracher y Jay también publicaron que entre más fosforilada está la filamina, se protege más contra el corte por calpaína [46]. Posteriormente, Jay y colaboradores determinaron que de los dos sitios de fosforilación por PKA en la región C-terminal probables, el único sitio de fosforilación por PKA en esta región de la filamina es el sitio Serina 2152 [45,48]. Al encontrar este sitio de fosforilación, sólo quedaba por determinar un sitio de fosforilación por PKA en el extremo N-terminal propuesto por la literatura. Anteriormente se había propuesto que el sitio probable de fosforilación por PKA en la región N-terminal era el aminoácido treonina 167 [44].

Deficiencias en la filamina A

Se ha encontrado que distintas mutaciones en el gen de la filamina ubicado en el cromosoma Xq28, producen una serie de malformaciones congénitas, como 2 tipos de síndrome otopalatodigital (OPD), displasia frontometáfiseal (FMD), síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de rodillas Melnick (MNS) y Heterotropía Periventricular (PVNH), la cual afecta generalmente a mujeres [26]. Como ejemplo de la importancia de estas mutaciones, las mujeres con PVNH presentan casos de ataques epilépticos debido a la acumulación de neuronas que no se desplazaron a los ventrículos laterales del cerebro [Figura 5]. También presentan problemas vasculares prematuros.

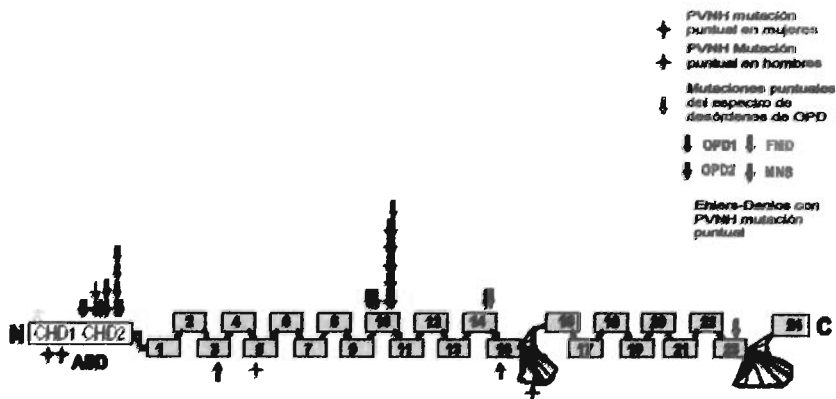


Figura 4. Mutaciones identificadas en la filamina. Se han encontrado diversas mutaciones en el gen de la filamina, las cuales son causantes de distintos síndromes y desórdenes en estructuras del cuerpo humano. Los más comunes son la PVNH, los dos desórdenes OPD, FMD, MNS y Ehlers-Danlos. Como se aprecia, estas mutaciones se presentan con mayor frecuencia en el Extremo N-terminal y en la repetición número 10 [26].

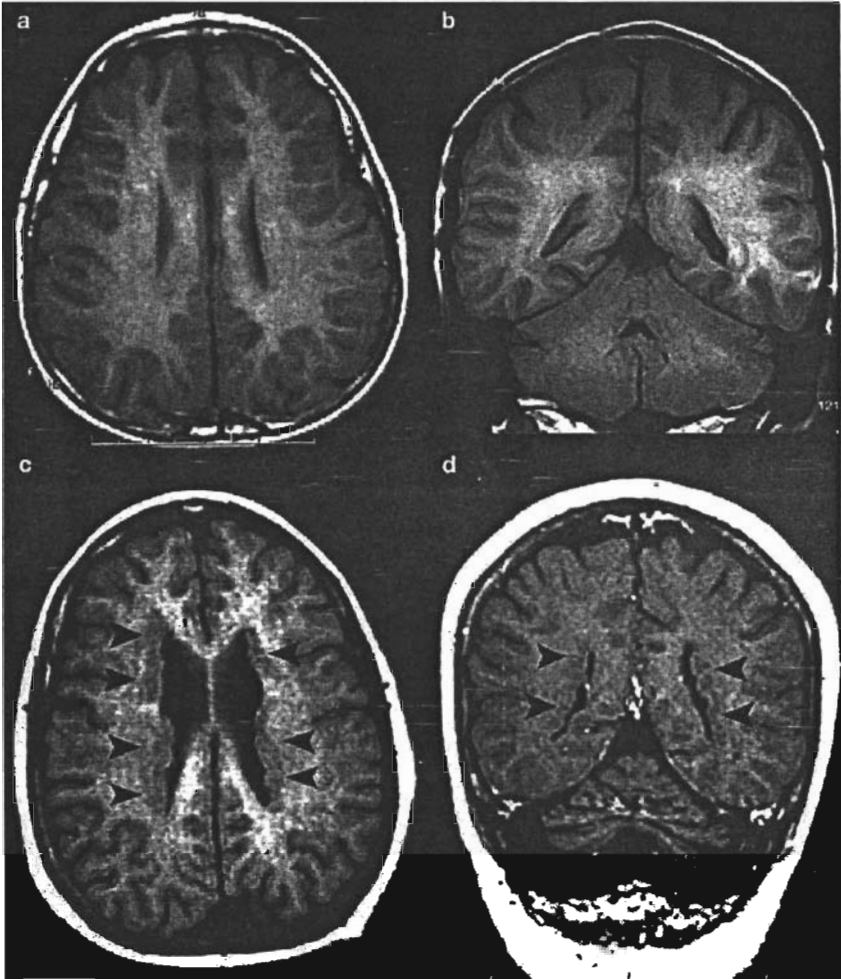


Figura 5. Imágenes de resonancia magnética de cerebro normal (a y b) y con Heterotropía Periventricular (c y d). Las flechas indican la posición de las neuronas que no migraron a la corteza durante el desarrollo temprano [26].

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora, no se sabe el mecanismo de regulación involucrado en la unión de filamina a actina. Por estudios anteriores, sabemos que cuando se desfosforila la filamina, esta pierde su afinidad por actina [42]. Como se sabe, el sitio de unión a actina está ubicado en la región N-Terminal de la filamina. Previamente se ha demostrado que la región N-terminal de la filamina, obtenida en forma recombinante, tiene un sitio de fosforilación por PKA, pero no se sabe exactamente en qué residuo se lleva a cabo la fosforilación. Se ha propuesto a la treonina 167 como un residuo potencialmente susceptible a fosforilación por PKA [44]. Para confirmar esta propuesta, se realizó una mutación puntual dirigida para conocer si la treonina 167 es o no el residuo blanco de la PKA. La clonación y expresión de la proteína nativa y mutada se llevó a cabo en el sistema de pCRT7/NT - *E. coli* BL21 [DE3].

VI. HIPÓTESIS

El residuo treonina 167 de la filamina A humana (obtenida de forma recombinante) es susceptible a ser fosforilado por PKA.

VII. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el sitio de fosforilación por PKA propuesto para la región N-terminal de la filamina A humana es el residuo treonina 167.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar un fragmento de 609 pb de la región N-terminal de la filamina A humana, en donde está ubicado el codón que codifica a la treonina 167.
- Modificar, mediante mutagénesis dirigida, el triplete que codifica la treonina 167 para obtener alanina (ACC → GCC).
- Corroborar la mutación mediante análisis de secuencia por medio de secuenciación fluorescente automática por reacción de terminación de cadena por didesoxinucleótidos.
- Expresar los péptidos nativo y mutado en bacterias *E. coli* BL21 [DE3].
- Identificar los péptidos recombinantes por medio de anticuerpos anti filamina y anti Xpress.
- Fosforilar los dos péptidos con [γ - ^{32}P] ATP mediado por la subunidad catalítica de PKA.
- Comparar la incorporación de ^{32}P de los dos péptidos.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas:

Para la propagación de los plásmidos se usó la cepa *E. coli* XL GOLD (Stratagen). Para la expresión de los péptidos nativo y mutado se usó la cepa *E. coli* BL21 [DE3] [50].

Los plásmidos usados fueron los siguientes:

El plásmido pBluescript SK+, el cual contiene la secuencia completa de la filamina humana. Este plásmido fue proporcionado generosamente por el Dr. Hartwig [25].

Para la expresión de los péptidos recombinantes se utilizó el plásmido pCRT7/NT (Invitrogen).

Anticuerpos:

Anticuerpo monoclonal anti Xpress (Invitrogen). [Ver anexo]

Anticuerpo policlonal anti ratón marcado con HRP (Zymed).

Anticuerpo policlonal anti ABP (180kD) (hecho en nuestro laboratorio).

Anticuerpo policlonal anti conejo marcado con HRP (Zymed).

Enzimas:

Subunidad catalítica de la PKA (New England BioLabs)

Enzima de restricción Dpn I (Stratagene)

Enzima de restricción Cla I (New England Bio Labs)

Los reactivos utilizados en este estudio fueron de la mayor pureza comercialmente disponible.

Reacciones de PCR y mutagénesis dirigida basada en PCR: Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el plásmido pBluescript SK+ como molde

para obtener el fragmento de interés de 609 pb. La PCR se llevó a cabo en un bloque de calentamiento programable (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) iniciando la reacción a 94° C por un minuto y seguido de 30 ciclos de 94° C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos y 72° C por 1 minuto, seguido de un paso final de 72° C por 7 minutos. Para la amplificación se utilizaron los siguientes oligos: (5'-GGCGGCGTCGACACGCGG 3') y (5' GTCAGGGCTTGCTGGCGTCCCAAGA 3'). Se utilizaron 0.2 µM de cada oligo, 5 ng de DNA, 1X de Buffer GeneAmp (Perkin-Elmer), 1.5 mM de MgCl₂, 2.5 unidades de taq polimerasa (Perkin-Elmer) y 200 µM de dNTP's en un volumen final de 100 µL.

Los productos obtenidos después de la reacción de PCR fueron ligados directamente al vector de expresión pCRT7/NT, obteniéndose el plásmido pCRT7/NT-N2 [19–221].

Para introducir la mutación puntual se realizó una PCR utilizando al plásmido pCRT7/NT-N2 [19–221] como molde y utilizando el kit Quickchange de mutagénesis dirigida (Stragene). Para introducir la mutación se realizaron varios ensayos con distintas condiciones, las cuales se muestran a continuación:

Ensayo 1:

Condiciones de amplificación: un paso de 2 minutos a 95° C seguido de 18 ciclos de 95° C por 50 segundos, 60° C por 30 segundos y 68° C por 6 minutos con 10 segundos y un paso final de 7 minutos a 68° C.

Se usaron 0.2 µM de cada oligo, 10 ng de DNA molde, 1X de buffer de reacción, 2.5 unidades de Pfu DNA polimerasa, 50 µM de dNTP's y 3µL de Quick Solution en un volumen final de 50 µL.

Ensayo 2:

Condiciones de amplificación: un paso de 2 minutos a 95° C seguido de 18 ciclos de 95° C por 50 segundos, 60° C por 20 segundos y 68° C por 6 minutos con 10 segundos y un paso final de 7 minutos a 68° C.

Se usaron 0.2 µM de cada oligo, 10 ng de DNA molde, 1X de buffer de reacción, 2.5 unidades de Pfu DNA polimerasa, 50 µM de dNTP's y 3µL de Quick Solution en un volumen final de 50 µL.

Ensayo 3:

Condiciones de amplificación: un paso de 2 minutos a 95° C seguido de 18 ciclos de 95° C por 50 segundos, 60° C por 30 segundos y 68° C por 6 minutos con 10 segundos y un paso final de 7 minutos a 68° C.

Se usaron 0.2 µM de cada oligo, 10 ng de DNA molde, 1X de buffer de reacción, 2.5 unidades de Pfu DNA polimerasa, 50 µM de dNTP's y 4µL de Quick Solution en un volumen final de 50 µL.

Ensayo 4:

Condiciones de amplificación: un paso de 2 minutos a 95° C seguido de 18 ciclos de 95° C por 50 segundos, 60° C por 20 segundos y 68° C por 6 minutos con 10 segundos y un paso final de 7 minutos a 68° C.

Se usaron 0.2 µM de cada oligo, 10 ng de DNA molde, 1X de buffer de reacción, 2.5 unidades de Pfu DNA polimerasa, 50 µM de dNTP's y 4µL de Quick Solution en un volumen final de 50 µL.

Los oligos usados para introducir la mutación T167A fueron 5' GCCAAGAAGCAGGCCCCCAAGCAGA y 3' TCTGCTTGGGGGCCTGCTTCTTGGC.

A cada uno de los ensayos se le aplicó el siguiente procedimiento:

Después de la reacción de amplificación, la mezcla fue tratada con 1 μ L de la enzima Dpn I, con la finalidad de digerir el DNA metilado proveniente del DNA parenteral. La digestión del DNA con enzimas de restricción se realizó como se describe en Sambrook et al [43].

Los productos obtenidos fueron utilizados para transformar la cepa de *E.coli* XL GOLD. Se tomaron 45 μ L de una suspensión de *E.coli* XL GOLD y se mezclaron con 2 μ L de β - mercaptoetanol puro por 10 minutos a 4° C con el objetivo de mejorar la eficiencia de la transformación de la cepa. Una vez concluido este tiempo se adicionó el DNA obtenido del PCR anterior. Las bacterias se transformaron incubándose por 30 minutos en hielo y posteriormente 30 segundos a 42° C. Se agregaron 500 μ L de medio NZY Broth y se incubaron a 37° C y a 250 rpm por una hora. Concluido el tiempo, las bacterias se centrifugaron y se descartó casi todo el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en el sobrenadante restante y se sembraron en una placa de agar con ampicilina imMedia de Invitrogen. La placa se incubó a 37° C por 16 horas. Al término de la incubación, se apreció el crecimiento de colonias en la placa, de las cuales se tomaron 6 colonias y se crecieron en 3 mL de medio líquido con ampicilina imMedia de Invitrogen por 12 horas. Se realizó un miniprep con el kit Rapid Plasmid Miniprep System de Marligen Bioscience INC para obtener el DNA del plásmido. Una vez obtenido el DNA, se tomó una alícuota (250 ng) para hacer el análisis de secuencia y el resto se guardó a -20° C.

El plásmido mutado (T167A) obtenido se denominó pCRT7/NT-N2* [19–221] y se caracterizó por digestión con la enzima de restricción Cla I, además de ser analizado por secuenciación automática fluorescente directa.

Para llevar a cabo el análisis de secuencia, se realizó un PCR de terminación con didesoxinucleótidos. Las condiciones de la PCR son las siguientes:

Un ciclo de 95° C por cinco minutos, seguido por 25 ciclos de 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos y 60° C por 4 minutos. Una vez concluido la PCR, el DNA es purificado por filtración en columnas de sephadex (Princeton) para eliminar el exceso de reactivos, con la finalidad de tener una muestra limpia y obtener un buen análisis. El secuenciador utilizado es un ABI PRISM modelo 310.

Expresión de los péptidos nativo y mutado: Para la expresión de los péptidos en *E.coli* BL21 [DE3], las bacterias se transformaron (como se indicó anteriormente) con los plásmidos Nativo y Mutado previamente obtenidos. Las bacterias se sembraron en agar líquido con ampicilina imMedia de Invitrogen y se dejaron crecer hasta alcanzar una D.O._{600nm}=1. Luego, el cultivo fue inducido con 0.6 mM de Isopropil tiogalactósido (IPTG). Una hora después de haber adicionado el IPTG se añadió rifampicina (200 µg/mL) para inhibir la síntesis de proteína endógena de *E.coli*. BL21 [DE3]. Se toman alícuotas de 200 µL a los tiempos indicados en resultados para analizarlas en un gel SDS-PAGE al 12.5%. A las 3 horas de incubación, las bacterias fueron recolectadas, centrifugándolas a 10500 g por 1 minuto y lavadas dos veces con buffer STE (0.1M de NaCl, 10mM de Tris-HCl y 1mM EDTA a pH 7.4). Posteriormente,

para inhibir a las proteasas tales como la tripsina, quimiotripsina, cistein proteasas y serin proteasas, se agrega 1 mM de PMSF. Para obtener una preparación cruda del péptido recombinante, las bacterias fueron rotas por choque térmico (congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas en agua a 37° C) y sonicación. Después se centrifugaron a 10500 g por 15 minutos para precipitar los restos de bacteria. Se rescató el sobrenadante y se tomaron alícuotas para analizar las proteínas mediante SDS-PAGE. Esta es la preparación que se utiliza en los ensayos de fosforilación.

Identificación de los péptidos nativo y mutado con distintos anticuerpos:

Se realizó un Western Blot para confirmar si el antisuero antifilamina de 180 kDa, obtenido anteriormente en el laboratorio, identificaba a los péptidos recombinantes obtenidos como parte de la filamina A. También se utilizó anticuerpo anti Xpress para identificar un epítipo que el plásmido anexa al péptido cuando es expresado (ver anexo).

Para corroborar que el antisuero antifilamina de 180 kDa reconoce a la filamina humana, se tomó una muestra de plaquetas frescas obtenidas siguiendo el método de Rosenberg [47]. El Western Blot se lleva a cabo de la siguiente manera:

Las proteínas separadas electroforéticamente, fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa (Mycron Hybond) por una hora en una cámara de transferencia Bio-Rad con un buffer de transferencia (ver anexo).

Al término de la electro-inmuno-transferencia, el papel de nitrocelulosa se bloquea con una solución de bloqueo al 5% (ver anexo) por 20 minutos. Posteriormente el papel de nitrocelulosa bloqueado se incubó con el anticuerpo

primario correspondiente por 12 horas en frío. Concluidas las 12 horas de incubación, el papel de nitrocelulosa se lava 3 veces con PBS pH 7.2. Cada lavado es de 20 minutos. Una vez llevados a cabo los lavados, el papel de nitrocelulosa se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos secundarios llevan acoplados la peroxidasa de rábano. La incubación se lleva a cabo por una hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, el papel de nitrocelulosa se lava 3 veces con PBS pH 7.2. Cada lavado es de 20 minutos. Concluidos los lavados, el papel de nitrocelulosa se revela con una solución de 4-Cloro- α -naftol (0.3% 4-Cloro- α -naftol en metanol-PBS) y unas gotas de agua oxigenada al 30%. La reacción se detiene con H₂O bidestilada.

Fosforilación de los péptidos nativo y mutado: Para comprobar si el sitio de fosforilación por PKA es la Treonina 167, se realiza un experimento de incorporación de ³²P.

Para los ensayos de fosforilación se usó un medio que contenía 10mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1mM de MgCl₂, 0.2 mM de [γ -³²P] ATP (0.1 μ Ci/nmol) y 100 U de la subunidad catalítica de la PKA.

Las preparaciones crudas de los péptidos Nativo y Mutado fueron extraídos directamente de *E.coli* BL21 [DE3] como se indica anteriormente.

La cantidad de péptido a utilizar se determinó por medio de la intensidad de la banda mostrada en el gel de expresión del péptido teñido con azul de Coomasie. La cantidad aproximada de péptido fue de 15 μ g/ ensayo.

Las muestras son incubadas a 30° C por una hora.

Al término del experimento, las muestras se resuspenden en SB y se hierven a 100° C por tres minutos y se centrifugan a 10500 g por 30 segundos. Las muestras se cargan en un gel SDS-PAGE al 12.5% por una hora 45 minutos. Posteriormente se realiza un Western Blot que se incuba con anticuerpo anti Express. Una vez revelado el Western Blot se deja secar y se marcan los carriles, los pesos moleculares y la altura de la banda obtenida con tinta china que está mezclada con [γ -³²P] ATP. Para poder ver si las bandas obtenidas incorporan ³²P por PKA, el Western Blot marcado se expone por 4 horas a una pantalla del equipo CYCLONE (Perkin - Elmer). Terminado el tiempo de exposición, la película se analiza en este mismo equipo.

X. RESULTADOS

Para introducir la mutación se realizaron 4 ensayos, de los cuales solo en el ensayo 4 se obtuvo un resultado satisfactorio. Las secuencias del DNA nativo y mutado se muestran en la figura 7.

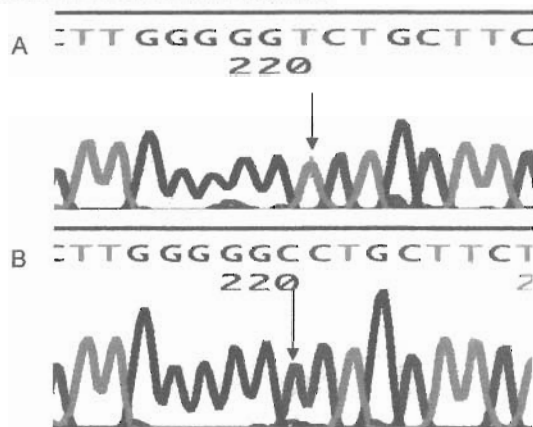


Figura 7. Electroferograma de un fragmento de la secuencia los plásmidos ρ CRT7/NT-N2 [19–221] y ρ CRT7/NT-N2* [19–221]. Se muestra la secuencia en donde se introdujo la mutación puntual. Esta es la secuencia reversa de la cadena complementaria. La mutación modifica la síntesis del aminoácido treonina codificada por el codón ACC (GGT en la cadena complementaria leída en reversa) por la síntesis del aminoácido alanina codificado por el codón GCC (GGC en la cadena complementaria leída en reversa).

Una vez obtenida la mutación puntual T167A, se expresan los péptidos nativo y mutado en *E.coli* BL21 [DE3]. El curso temporal de la expresión de los péptidos se muestra en la figura 8.

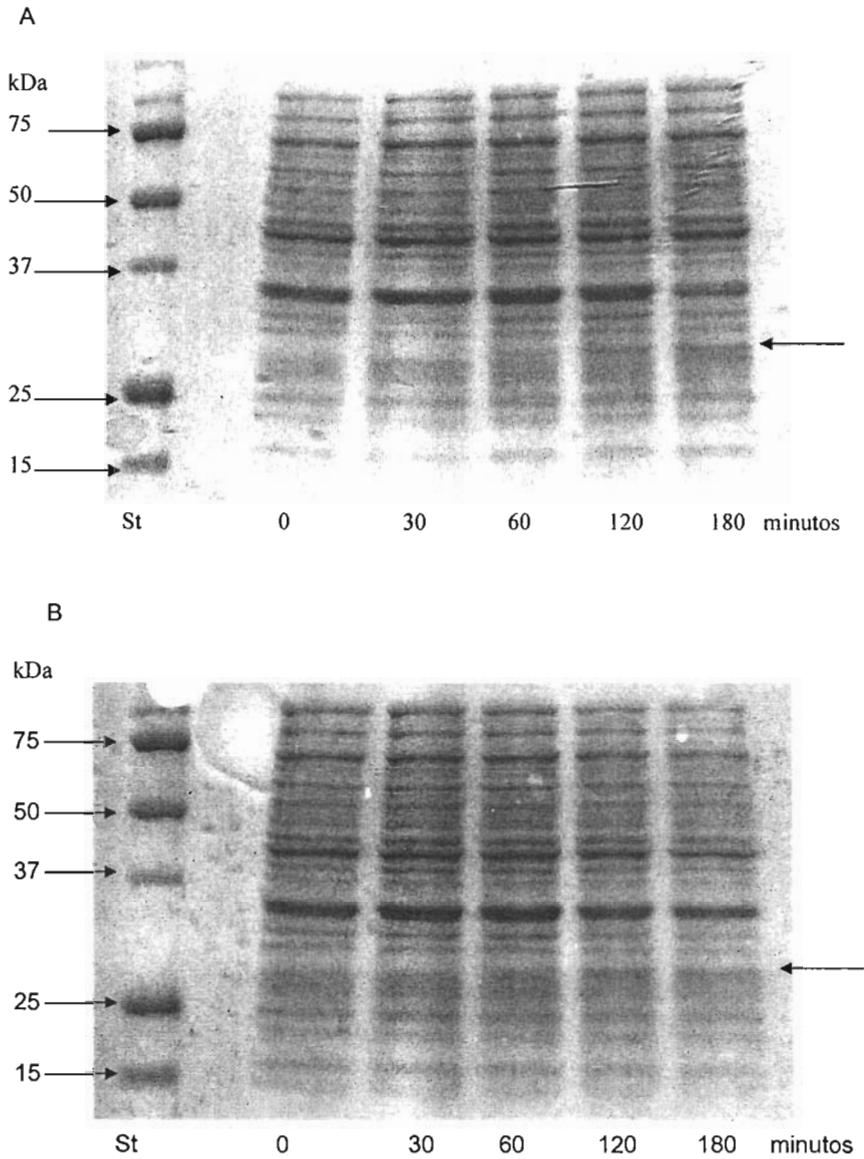


Figura 8. SDS-PAGE Acrilamida 12.5%. Curso temporal de la expresión de los péptidos Nativo y Mutado. Los extractos celulares fueron preparados y analizados con SDS-PAGE al 12.5%. A) Péptido Nativo B) Péptido Mutado. St = Estándar dual color de Bio Rad. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del estándar. La flecha de la derecha indica la banda correspondiente a los péptidos sintetizados.

Mediante los geles obtenidos, se pudo apreciar que la expresión del péptido comenzó desde la primera hora de inducción, pero a las tres horas se obtuvo una buena expresión del péptido.

Para confirmar la identidad de los péptidos recombinantes, se corrió un gel SDS-PAGE al 12.5% con las siguientes muestras: péptido Nativo, péptido Mutado, *E.coli* BL21 no transformada y una muestra de plaquetas frescas para la identificación de la FLNA. Posteriormente se realizó una electro inmovilización a un papel de nitrocelulosa, el cual se incubó con el antisuero anti FLNA 180 kDa. Asimismo se realizó otro Western Blot con las mismas muestras pero incubándolo con anticuerpo anti Xpress, con la finalidad de comprobar la expresión del péptido producido por el plásmido. El resultado de los 2 Western Blots se muestra en la figura 9.

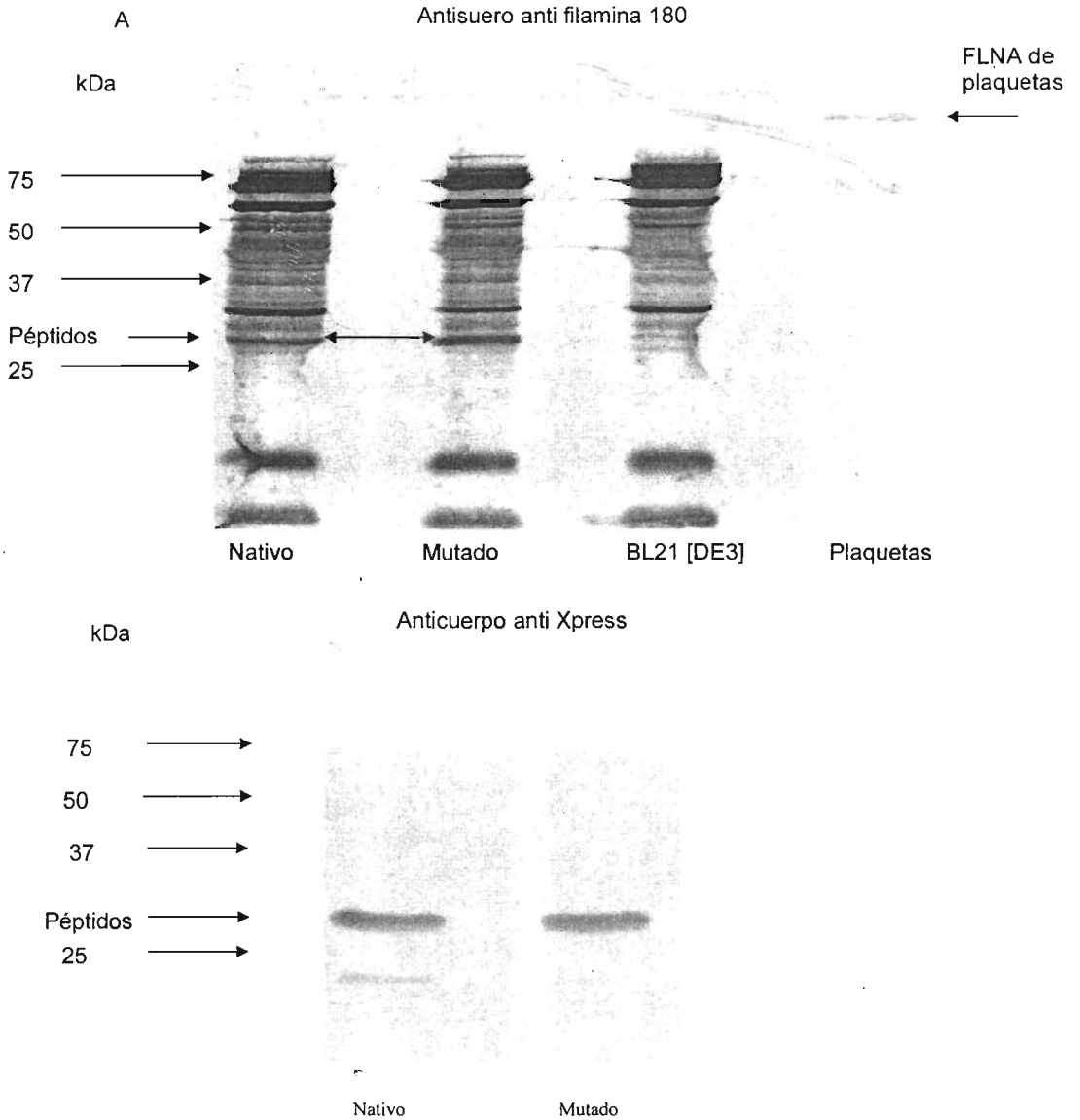


Figura 9. Western Blot para la identificación de los péptidos recombinantes. A) El Western Blot es incubado con el anti suero anti filamina 180. La flecha señala la ubicación de la banda del péptido, la cual no aparece en la muestra de *E.coli* BL21 no transformada. El anticuerpo también reconoce a la filamina de plaquetas frescas. B) El Western Blot es incubado con anticuerpo anti Xpress que confirma la expresión del péptido producido por el plásmido. El carril izquierdo muestra el péptido nativo y el carril derecho muestra el péptido mutado. La banda no se presenta en *E.coli* BL21 no transformada, ni en plaquetas frescas (datos no mostrados).

Una vez que se comprobó que los distintos anticuerpos reconocen al péptido sintetizado, se hace un experimento de fosforilación, para comprobar que el sitio propuesto anteriormente es el sitio de fosforilación por PKA en el extremo N-terminal de la filamina.

La fosforilación por PKA se hizo de acuerdo a lo descrito en "Materiales y Métodos".

Los resultados de la electro inmuno transferencia y el autorradiograma se muestran en la figura 10.

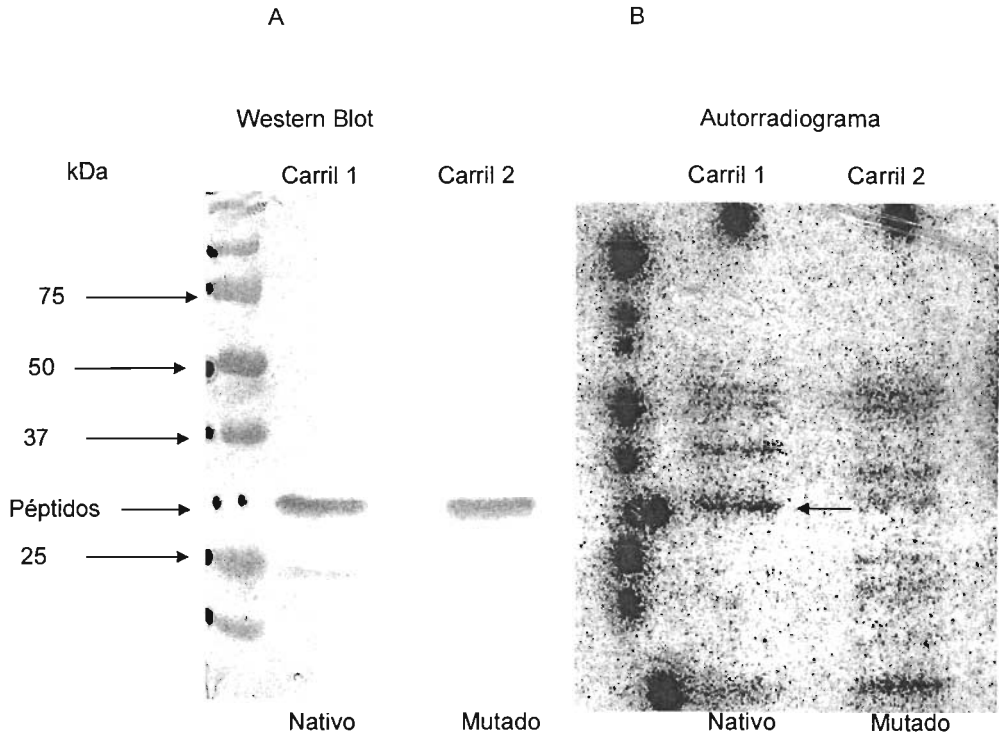


Figura 10. Fosforilación del fragmento N-terminal por PKA. A) Western Blot de los péptidos Nativo y Mutado revelados con anticuerpo anti Xpress (1:500). B) Se muestra el auto radiograma del Western Blot. La flecha indica la posición del péptido nativo que incorpora ^{32}P . El péptido Mutado no muestra incorporación de ^{32}P . Los pesos moleculares (expresados en kDa) se encuentran en el lado izquierdo.

La imagen de la figura sugiere que el péptido Nativo es el único que incorpora ^{32}P . Esto nos dice que el sitio de fosforilación propuesto es un sustrato de la PKA.

XI. DISCUSIÓN

Trabajos anteriores habían demostrado que el dominio N-terminal de la filamina presentaba un sitio de fosforilación por PKA *in Vitro* y postulaban que la PKA podría fosforilar a la treonina 167, ya que formaba parte de una secuencia de fosforilación para esta cinasa [44]. Para comprobar que la treonina 167 es un sitio blanco de la PKA, se clonó un fragmento de la FLNA de 609 pb, el cual contenía el sitio de unión a actina y la T167. Una vez clonado el fragmento, se introdujo una mutación puntual (T167A). Cabe señalar que este fragmento también incluye otro sitio treonina-prolina, pero no tiene la secuencia consenso para fosforilación por PKA y su función permanece desconocida.

Los clones obtenidos se caracterizaron por medio de análisis de restricción y secuenciación directa. Los péptidos recombinantes obtenidos se analizaron por medio de SDS-PAGE y Western Blot. El Western Blot demostró que los péptidos recombinantes expresaban epítopes que son reconocidos por un antisuero anti FLNA de 180 kDa [44], que también reconoció a la FLNA en plaquetas frescas.

Para el experimento de fosforilación se utilizó el anticuerpo anti Xpress. El autorradiograma mostrado en la figura 10 indicó que solo el péptido Nativo fue capaz de incorporar ^{32}P . La única diferencia existente entre estos dos péptidos es la sustitución de la treonina 167 por alanina, lo cual confirma que este aminoácido es un sustrato adecuado para fosforilación por PKA.

Al identificar este sitio de fosforilación en el extremo N-terminal de la filamina A, podemos pensar que puede existir una regulación por un proceso de fosforilación/desfosforilación. Anteriormente se había demostrado que al cortar a la filamina (obtenida de plaquetas) en las regiones bisagra con

calpaína, se obtiene un fragmento de 190 kDa (N-terminal) y otro de 90 kDa (C-terminal) [44]. Al intentar fosforilar los dos fragmentos, sin embargo, solamente el fragmento de 90 kDa pudo ser fosforilado por PKA, siendo ambos insensibles a PKC. Por otro lado, se sabe que al tratar a la filamina con fosfatasa alcalina de *E.coli*, la filamina pierde su capacidad de entrecruzar actina y pierde afinidad por esta [40]. Sin embargo, la naturaleza del sitio no fue establecida. En un trabajo posterior, Jay y Stracher expresaron en *E.coli* el fragmento N-terminal de la filamina y posteriormente lo fosforilaron. Ellos señalaron que la T167 formaba parte de una secuencia consenso de la PKA [44]. El fragmento de FLNA N-Terminal aislado de *E.coli* pudo ser fosforilado, ya que la bacteria no tiene los mecanismos celulares de fosforilación que caracterizan a las células superiores. Una propuesta es que la filamina es fosforilada postraduccionalmente en el megacariocito. En este caso, es posible que la T167 proporcione algún tipo de estructura que favorezca la unión a actina. El tipo de cambio subyacente es desconocido.

Se sabe que cuando el sitio S2152 (ubicado en la región C-terminal) no está fosforilado, la filamina puede ser degradada por calpaína. Por el contrario, si el sitio S2152 está fosforilado, la filamina no puede ser degradada por calpaína [45,48]. Hasta ahora, no sabemos si la fosforilación de T167 proporcione algún tipo de protección a la filamina.

En este momento solo podemos decir que, los resultados obtenidos por otros investigadores y los de este trabajo, sugieren que la fosforilación de T167 pueda participar en la regulación de la unión a actina. Al encontrar los sitios de regulación de la filamina y sus reguladores, podremos explicar los distintos mecanismos celulares en los cuales la filamina está implicada. El encontrar los

sitios de fosforilación, permite tener una base para explicar las implicaciones fisiopatológicas de las distintas mutaciones encontradas en isoformas de la FLNA aislada de pacientes. Por ejemplo, se ha encontrado una mutación en la Glutamina 170 (G170P), que confiere un fenotipo particular: hidrocefalia, estatura pequeña, huesos arqueados, dedos anormales y paladar partido [50]. Esta mutación se presenta a tres aminoácidos de la T167, dentro de la secuencia consenso de la PKA, lo que podría resultar en una fosforilación inefectiva del aminoácido.

Por lo antes dicho, podemos pensar que es importante seguir con el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la interacción FLNA-actina. De esta manera, podremos acercarnos más al entendimiento de los procesos que subyacen a los cambios de forma y movimiento celular mediados por el citoesqueleto.

XII. CONCLUSIONES

- Se clonó un fragmento de 609 pb de la región N-terminal de la filamina.
- Se obtuvo la mutación puntual de T167 → A167 del fragmento de N-terminal de 22 kDa.
- Se expresaron los péptidos Nativo y Mutado.
- Se identificó a los péptidos recombinantes como parte de la Filamina A mediante un anticuerpo anti filamina A y además los péptidos fueron reconocidos por el anticuerpo anti Xpress.
- De los resultados de incorporación de ^{32}P , podemos decir que el aminoácido treonina 167 de la filamina A, obtenido de forma recombinante, es un sitio fosforilable por PKA.
- Probablemente la fosforilación de la treonina 167 está involucrada en la regulación de la unión a actina.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg WM, Bainton DF. 1995. Megakaryocyte and platelet structure. Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, eds. Hematology: Basic principles and practice, 2° ed. New York: Churchill Livingstone p.p. 1516-24.
2. Stenberg PE, Shuman MA, Levine Sp, Beinton DF. 1984. Redistribution of alpha granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. J Cell Biol. 98: 748-60.
3. Rosenberg S, Stracher A, Lucas RC. 1981. Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. J. Cell Biol. 91:201-11.
4. Jenkins CSP, Maimon J, Puskin EG. 1984. Platelet cytoskeleton: Immunofluorescence studies on thrombin-activated platelets. J. Lab. Clin. Med. 104:563-73.
5. Debus E, Weber K, Osborn M. 1981. The cytoskeleton of blood platelets view by immunofluorescence microscopy. Eur. J. Cell Biol. 24:45-52.
6. Tanaka K, Onji T, Okamoto K, Matasusake T, Taniguchi H, Shibata N. 1984. Reorganization of contractile elements in the platelet during clot retraction. J. Ultrastruct Res. 89: 98-109.
7. Tanaka K, Shibata N, Okamoto K, Matsusaka T, Fukuda H, Takagi M, Fujii N, Toya N, Onji T. 1986. Reorganization of myosin in surface-activated spreading platelets. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 97: 165-86.
8. Tanaka K, Itoh K. 1998. Reorganization of stress fiber like structures in spreading platelets during surface activation. J. Struct. Biol. 124:13-41.

9. Sixma JJ, van der Berg A, Jockusch BM, Hartwig J. 1989. Immunoelectron microscopic localization of actin, α -actinin. Actin-binding protein and myosin in resting and activated human blood platelets. *Eur J Cell Biol.* Apr; 48(2):271-81.
10. Bearer EL. 1995. Cytoskeletal domains in the activated platelet. *Cell Mot. Cytoskeleton* 30: 50-66.
11. Takubo T, Hino M, Susuki K, Tatsumi N. 1998. Localization of myosin, actin, α -actinin, tropomyosin and vinculin in surface-activated, spreading human platelets. *Biothec Histochem* 73(6): 310-15.
12. Hartwig JH, De Sisto M. 1991. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: Structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol.* 112: 407-25.
13. Joseph Loscalzo, Andrew I. Schafer. 1994. *Thrombosis and hemorrhage.* Published by Lipincott Williams and Wilkins; p.247-250.
14. Collier BS. Disorders of platelets. 1984. In OD Ratnoff, CD Forbes (editors). *Disorders of hemostasis.* Orlando, Grune & Stratton; p. 73-176.
15. Fox JE, Reynolds CC, Johnson MM. 1987. Identification of glycoprotein Ib β as one of the major proteins phosphorylated during exposure of intact platelets to agents that activate cyclic AMP-dependent kinase. *J Biol Chem.*; 262: 12627-12631.
16. Cerecedo Mercado Doris Atenea. 2002 Participación del citoesqueleto en la activación y adhesión plaquetaria in Vitro. Tesis de Doctorado.
17. Monteiro, M.C., O'Connor, J.E. and Martínez, M. 2001. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y

- Funcionales de las Plaquetas. Rev Diagn Biol., July-Sept. vol.50, no.3, p.111-136.
18. Alberts et al. 2000 Molecular Cell Biology. Capítulo 22 Pág.1000-1002.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mboc4/ch16f47.jpg>
20. Stossel, T.P. Candeelis J., Cooley L., Hartwig JH. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nature Rev. Mol. Cell. Biol. 2, 138 –145.
21. Paul A. Janmey, Jay X. Tang and Christoph F. Schmidt. Actin Filaments Biophysics Textbook online: www.biophysics.org/education/janney.pdf
22. Brotschi, E.A. Hartwig, J. H. & Stossel, T.P. 1978. The gelation of actin by actin-binding protein. J. Biol. Chem. 253. 8988- 8993.
23. Bennett, J. Zaner, K. & Stossel, T. 1984. Isolation and some properties of macrophage α -actinin: evidence that is not an acting gelling protein. Biochemistry 23. 5081 – 5086.
24. Hartwig, J. & Stossel, T. 1975. Isolation and properties of actin, myosin and a new acting binding protein in rabbit alveolar macrophages. J. Biol. Chem. 250, 5696-5705.
25. Gorlin, J. B., Yamin, R., Egam, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., and Hartwig, J. H. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. J. Cell. Biol. 111, 1089-1105.
26. Arjan van der Flier, Arnoud Sonnenberg. 2001. Structural and functional aspects of filamins. Biochimica et Biophysica Acta 1538 99-117.

27. Yuanyi Feng and Christopher A. Walsh. 2004. The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signaling. *Nature cell biology*, Vol. 6, n11, 1034-1038. Review.
28. T. Takafuta, G. Wu, G.F. Murphy, S.S. Shapiro. 1998. Human β filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Ib alpha, *J. Biol. Chem.* 273: 17531-17538.
29. D.T. Loo, S.B. Kanner, A. Aruffo. 1998. Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction, *J. Biol. Chem.* 273: 23304 - 23312.
30. C.P. Sharma, R.M. Ezzell, M.A. Amout. 1995. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta2-integrin subunit CD18, *J. Immunol.* 154: 3461 - 3470.
31. Y. Ohta, T.P. Stossel, J.H. Hartwig. 1991. Ligand-sensitive binding of actin-binding protein to immunoglobulin G Fc receptor I (Fc γ RI), *Cell* 67: 275 - 282.
32. I. Ott, E.G. Fischer, Y. Miyagi, B.M. Mueller, W. Ruf. 1998. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280, *J. Cell Biol.* 140: 1241 - 1253.
33. M. Li, J.C. Bermak, Z.W. Wang, Q.Y. Zhou. 2000. Modulation of dopamine D (2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280), *Mol. Pharmacol.* 57: 446 - 452.
34. W. Zhang, S.W. Han, D.W. McKeel, A. Goate, J.Y. Wu. 1998. Interaction of presenilins with the Filamin family of actin binding proteins, *J. Neurosci.* 18: 914 - 922.
35. G. Liu, L. Thomas, R.A. Warren, C.A. Enns, C.C. Cunningham,

- J.H. Hartwig, G. Thomas. 1997. Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol.* Dec 29; 139(7):1719-33.
36. Stahihut, M & van Deurs, B. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for calveolin-1: evidence for the organization of calveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11: 325-337.
37. Petrecca, K. Miller, D. & Shiner, A. 2000. Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin binding protein, filamin. *J. Neurosci.* 20: 8736-8744.
38. Y. Ohta, N. Suzuki, S. Nakamura, J.H. Hartwig, T.P. Stossel. 1999. The small GTPase F-actin targets filamin to induce filopodia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2122-2128.
39. D.M. Ozanne, M.E. Brady, S. Cook, L. Gaughan, D.E. Neal, C.N. Robson. 2000. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol. Endocrinol.* 14: 1618-1626.
40. Krief S, Faivre JF, Robert P, Le Douarin B, Brument-Larignon N, Lefrere I, Bouzyk MM, Anderson KM, Grellier LD, Tobin FL, Souchet M, Bril A. 1999. Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem.* Dec 17; 274(51): 36592-600.
41. K.A. Browne, R.W. Johnstone, D.A. Jans, J.A. Trapani. 2000. Filamin (280-kD actin binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis, *J. Biol. Chem.* 275: 39262-39266.

42. Zhuang Qing-Qi, Rosenberg S., Lawrence J. and Stracher A. 1984. Role of actin binding protein phosphorylation in platelet cytoskeleton assembly. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 118, Issue 2 , Pages 508-513.
43. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
44. Jay, D., and Stracher, A. 1994. Expression in *Escherichia coli* and phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase of the N-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 764–771.
45. D. Jay, E.J. Garcia, J.E. Lara, M.A. Medina, M. de la Luz Ibarra. 2000. Determination of a cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the C-terminal region of human endothelial actin-binding protein, *Arch. Biochem. Biophys.* 377: 80-84.
46. Wu, M. P., Jay, D., and Stracher, A. 1994. Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin binding protein. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40: 351–357.
47. Sharon Rosemberg.1992. Purification and characterization of platelet actin, ABP and α -actinin. *Methods in Enzymology*. Vol. 215, 58-76.
48. D. Jay, E.J. García and M. de la Luz Ibarra. 2004. *In situ* determination of a PKA phosphorylation site in the C- terminal region of filamin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 260, 49-53.

49. Tabor, S. and Richardson, C.C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 1074-1078.

50. Stephen P. Robertson et al. 2003. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans.

Nat Genet. Apr; 33(4):487-91.

XIV. ANEXO

- Solución de bloqueo

Pesar 5g de leche descremada en polvo, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100mL.

- Buffer de fosfatos (PBS) pH 7.2.

Pesar exactamente:

Cloruro de Potasio	0.25g
Cloruro de sodio	10.0g
Fosfato dibásico de sodio	1.44g
Fosfato monobásico de potasio	0.25g

Disolver en 500mL de agua bidestilada, ajustar el pH y llevar a volumen de 1000mL con agua bidestilada.

- Solución 10X

Disolver en H₂O 30.0g de Tris y 144.0g de glicina hasta llegar a un litro.

- Buffer de corrida

Medir 10 mL de SDS al 10% y agregarlos a 100 mL de solución 10X. Aforar a 1L con agua bidestilada.

- Buffer de transferencia

Pesar exactamente 3.03g de Tris y 14.4g de Glicina. Mezclarlos con 200 mL de Metanol y aforar a 1L con agua bidestilada.

- Anticuerpo Anti Xpress

El anticuerpo Anti Xpress reconoce un epítoto que el plásmido pCRT7/NT anexa al péptido. El epítoto tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: asparagina, leucina, tirosina, asparagina, asparagina, asparagina, asparagina, lisina.