

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**Clonación y expresión del fragmento
de la Dp71 implicado en su transporte
nuclear.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
PRESENTADA POR:

René Urzúa González



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Bulmaro Cisneros Vega.

Abril 2004



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.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la tutoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por su ayuda y por permitirme entrar al mundo de la biología molecular.

A la M. En C. Lizeth Fuentes Mera por su valiosa ayuda y paciencia.

Al M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres por sus valiosas ideas, sugerencias y su amistad.

A Pablo Gómez por su valiosa ayuda en el laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV

A todos mis maestros de Iztacala.

A mis compañeros del laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV

Esta Tesis la dedico a:

MIS PADRES: Por todo su apoyo durante toda mi vida, por su gran amor, por estar siempre a mi lado, por que gracias a ellos logro esta tesis. Muchas gracias.

A **Adriana:** Por que es mi gran amor y por ser para mi la mejor persona en todo el mundo.

A mis hermanos **Ernesto** y **Alberto** los quiero mucho.

INDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
EL GEN DMD Y SUS PRODUCTOS	2
Estructura de la distrofina y su función	3
Estructura de la Dp71 y su regulación	4
La proteína Dp71, estructura y localización subcelular	5
Transporte Nuclear	6
Clonación en <i>Escherichia coli</i>	7
Antecedentes directos	8
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	9
Amplificación por PCR	9
Clonación del fragmento de 554pb en el vector HTP TOPO	10
Caracterización de las clonas TOPO-Dp71	11
Subclonación del fragmento de 554pb en el vector pGFPb	12
Expresión de la proteína de fusión pGFPb-500 en la cepa BL21	13
Inmunodetección del producto de la construcción pGFPb-500	13
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIÓN	23
Referencias	24

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Vector de tránsito HTP TOPO	11
FIGURA 2. Amplificación del fragmento de la Dp71 de 554 pb	14
FIGURA 3. Caracterización de las clonas TOPO-Dp71	15
FIGURA 4. Fragmento de 554 pb liberado del vector de tránsito TOPO	16
FIGURA 5. Vector linearizado	17
FIGURA 6. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	18
FIGURA 7. Inducción de la construcción pGFPb-500	19
FIGURA 8. Inmunodetección de la proteína de fusión GFP-Dp71	20

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
C-terminal	Dominio carboxilo terminal
DAPC	Complejo de proteínas asociadas a distrofina
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMB	Distrofia Muscular de Becker
Dp71	Distrofina de peso molecular de 71 kDa
Dp116	Distrofina de peso molecular de 116 kDa
Dp140	Distrofina de peso molecular de 140 kDa
Dp260	Distrofina de peso molecular de 260 kDa

GFP	Proteína Verde Fluorescente
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilo bases
mA	miliamperes
Mb	Mega bases
NLS	Señal de localización nuclear
N-terminal	Dominio amino terminal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
U	Unidades

RESUMEN

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética neuromuscular progresiva ligada al sexo, causada por alteraciones en el gen *dmd*. Los defectos cognitivos y anormalidades cerebrales, presentes en 30% de los pacientes, están relacionados con la isoforma más abundante en el cerebro: la distrofina con peso molecular de 71 kDa (Dp71), que presenta procesamientos alternativos en los exones 71 y 78. Nuestro grupo de trabajo ha analizado la distribución subcelular de las variantes de la Dp71, mediante la construcción de proteínas de fusión entre la proteína verde fluorescente (GFP) y cada una de las 4 isoformas de la Dp71 (-71/+78, -71 /-78, +71/+78 y +71/-78). De manera interesante se ha observado que la isoforma -/+ presenta una localización predominantemente nuclear, mientras que la variante -/- solamente se distribuye en el citoplasma. Estos resultados sugieren que la Dp71 se transporta a núcleo. En estudios previos de nuestro laboratorio se localizó una secuencia de aminoácidos básicos en la región central de la Dp71 -/+ los cuales podrían constituir una secuencia de localización nuclear (NLS).

Para analizar si la Dp71 tiene una NLS se propuso la clonación y expresión de la región central de la Dp71 en un modelo bacteriano, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican la región de interés de la Dp71, resultando en un fragmento de 554 pb. Este fragmento de ADN se clonó en un vector de tránsito HTP TOPO y posteriormente se subclonó en el vector con pGFPb. Se realizaron ensayos de expresión de la construcción pGFPb-500 y se establecieron las condiciones óptimas para la inducción y expresión de la proteína de fusión GFP-500.

Clonación y expresión del fragmento de la Dp71 implicado en su transporte nuclear.

INTRODUCCIÓN

El gen DMD y sus productos

El gen DMD el cual se ubica en la banda 21 del brazo corto del cromosoma X (X p21) comprende 2.4 Mb del genoma humano. Este gen se transcribe en un mensajero de 14 Kb que a su vez se traduce en la proteína denominada distrofina, la cual tienen un peso de 427 kDa.

La regulación del gen DMD es compleja pues en su estructura contiene 7 promotores independientes, algunos de ellos de expresión tejido específica. Tres de estos promotores generan proteínas de longitud completa (427 kDa); un promotor muscular activo en músculo y células gliales, un promotor neuronal activo en neuronas de la corteza y la región CA del hipocampo, y un promotor de células de Purkinje que está activo en dichas células del cerebelo. Los mensajeros generados a partir de estos promotores difieren entre ellos sólo en el primer exón. De los 4 promotores intragénicos restantes, 3 de ellos son activos en SNC y codifican para las proteínas Dp140, Dp116 y Dp71, mientras que el cuarto promotor codifica para la proteína Dp260, que es activa en la retina (la nomenclatura hace referencia al peso molecular). (1).

Aunque existen algunos reportes de una quinta variante, la Dp40, cuyo transcrito abarcaría del exón 63 al exón 70 del gen de la distrofina grande, su identidad no ha sido debidamente validada (2).

Estructura de la Distrofina y su función

En base al análisis de la secuencia de aminoácidos en 1988, Kunkel y col. predicen la estructura de la distrofina de longitud completa y la dividen en 4 dominios bien definidos (2,3).

- Dominio amino terminal (N-terminal). Este dominio comparte homología en su secuencia con el dominio de unión a actina de la α - actinina de *Dyctiostelium*. (4). En este dominio se ha localizado un sitio de interacción con la actina, vía el sistema Ca-Calmodulina (5).

- Dominio semejante a espectrina. Consiste de 24 repetidos de triple hélice de 109 aminoácidos, cada uno le confieren una estructura de cordón, similar a la que presenta la espectrina.(4)

- Dominio rico en cisteínas. Este dominio contiene el sitio de interacción con la proteína β -dystroglicano, miembro del complejo de proteínas asociadas a la distrofina denominado DAPC (4); dentro de este dominio se localiza además un dominio WW, dos motivos EF “hand” que unen a calcio y un dominio ZZ que tiene como función la unión a la calmodulina, proteína reguladora de cinasas calcio dependientes.

- Dominio carboxilo terminal (C-terminal). Es la región más conservada entre las distrofinas. Mediante este dominio la distrofina interacciona con los miembros del complejo DAPC. Los subdominios H1 y H2 que forman una estructura de dos α hélices llamada “coiled coil”, participan en la interacción de la distrofina con la α -distrobrevina (4). Otro punto importante de mencionar es que este dominio es fosforilado por MAP cinasas, caseín cinasa 2 y por la CaM cinasa II (6), lo que sugiere que la distrofina podría estar implicada en procesos de transducción de señales.

En resumen la distrofina interacciona con el complejo DAPC a través de sus dominios ricos en cisteínas y carboxilo terminal y con la actina, por medio de su dominio N-terminal. La función del complejo distrofina-DAPC es la de preservar la integridad de la miofibra al servir como enlace entre los filamentos de actina y los componentes de la matriz extracelular. La importancia de la distrofina se hace evidente en pacientes con distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/DMB) en quienes la ausencia funcional de esta proteína causa la degeneración progresiva de las fibras musculares (2,3).

Estructura de la Dp71 y su regulación

La distrofina de longitud completa se expresa mayoritariamente en músculo, aunque también se presenta en bajos niveles en el SNC. En contraste, la proteína Dp71 es la distrofina más abundante en el SNC y prácticamente está ausente en músculo (7), lo que ha llevado a pensar a muchos investigadores que esta proteína pudiera estar involucrada en la generación de daños cognitivos que presentan un tercio de los pacientes con DMD/DMB. Sin embargo es poco lo que se conoce acerca de su función.

La expresión de esta proteína está dirigida a partir de un promotor constitutivo localizado entre los exones 62 y 63 del gen DMD, este gen se transcribe en un mensajero de 6.5 kb que se organizan en 16 exones.

A través del uso de sondas que reconocen secuencias del mensajero de la Dp71 se ha demostrado que esta distrofina es el principal producto del gen DMD en tejidos no musculares adultos, como son: hígado, bazo, testículos, cerebro, pulmón, riñón y estómago (8).

Una característica importante es que el mensajero de la Dp71 presenta sitios de procesamiento en los exones 71-74 y 78, lo que genera diferentes isoformas; el

procesamiento en los exones 71 – 74 no genera cambios en el marco de lectura de la proteína mientras que el “splicing” del exón 78 produce un corrimiento en el marco de lectura (9).

En 1995 el grupo de Peter Ray clonó las isoformas de “splicing” de la Dp71 a partir de cultivos de amniocitos humanos y demostró que se producen al menos 4 variantes +71/+78, +71/-78, -71/+78 y -71/-78 (9). La expresión de estas isoformas varía en función del tipo de tejido, mientras en cerebro, músculo, riñón, pulmón y testículos se expresan las isoformas +78 y -78, en hígado y corazón solo está presente la forma que carece del exón 78.

La proteína Dp71, estructura y localización subcelular

Para conocer la función de esta proteína es importante primero determinar su localización dentro de la célula. Inicialmente se había reportado que la Dp71 se asocia a la membrana celular de células Hep2 y células musculares de ratones *mdx* (10). En nuestro laboratorio se ha analizado la distribución subcelular de las variantes de “splicing”, mediante la construcción de proteínas de fusión entre la proteína verde fluorescente (GFP) y cada una de las 4 isoformas de “splicing” de la Dp71 -71/+78, -71/-78, +71/+78 y +71/-78. Se estudió por microscopía confocal la localización de las fusiones génicas en células HeLa transfectadas y se observó que la isoforma -71/+78 presenta una localización predominantemente nuclear mientras que la variante -71/-78 solamente se distribuyó en el citoplasma. Las isoformas +71/+78 y +71/-78 mostraron un patrón mixto de distribución, es decir se ubicaron tanto en el núcleo como en el citoplasma.(11)

Estos resultados nos sugieren que los aminoácidos codificados por los exones 71 y 78 pudieran contener secuencias de envío a núcleo. Sin embargo la presencia del exón 78

conduce a un transporte nuclear más eficiente que la presencia del exón 71. En base a estos resultados es importante analizar cual es el mecanismo que envía al núcleo a la Dp71.

Transporte Nuclear

El transporte hacia el núcleo de la mayoría de las proteínas con un peso menor de 40 kDa se lleva a cabo por difusión pasiva, sin embargo, para proteínas de peso superior el mecanismo está mediado por una secuencia señal (NLS, nuclear localization signal) la cual es reconocida por un heterodímero de importinas α y β . La importina α reconoce de manera específica a la NLS mientras que la importina β transporta al complejo sustrato-importinas hacia el poro nuclear y facilita su interacción con las nucleoporinas. La transferencia a través del poro es facilitado por proteínas como Ran, la cual participa como regulador, no solo de la interacción del complejo sustrato-importinas con las nucleoporinas sino también en la disociación de las importinas α y β que ocurre dentro del núcleo, lo que libera a la proteína transportada (12).

Existen vías de translocación nuclear mediadas solo por miembros de la familia de las β importinas. La importina β tiene la particularidad de reconocer secuencias de un grupo de proteínas de unión a ARNm, como la secuencia M9 o NLS2 de la hnRNP A. El complejo de importina β – M9 es reconocido directamente por las nucleoporinas en un proceso que requiere de la hidrólisis de GTP por Ran (13). De manera similar las proteínas β_3 y β_4 reconocen NLS's de algunas proteínas ribosomales (14).

El transporte nuclear puede ocurrir también de manera independiente de las importinas como es el caso de la β catenina, la cual interacciona directamente con la maquinaria del poro nuclear para su posterior entrada al núcleo (15).

Clonación en *Escherichia coli*

Cuando se establece un proceso de producción de proteínas recombinantes, el enfoque más usado es tratar de expresar la proteína de interés primero en *E.coli*. Los sistemas de expresión eucariontes alternativos se utilizan únicamente si el producto generado en bacterias es biológicamente inactivo después de la producción, debido a la falta de modificaciones esenciales post-traduccionales, plegamiento incorrecto o cuando la recuperación de la proteína nativa es muy baja. Los parámetros importantes para la producción exitosa de una proteína recombinante en *E. coli* incluyen una transcripción y traducción eficiente, estabilidad del vector de expresión y del ARN transcrito, localización, estabilidad proteolítica y plegamiento del producto génico adecuados, así como también un crecimiento celular óptimo (18).

El vector de expresión.

Un vector de expresión debe contener aparte del gen de interés, un origen de replicación, un gen que confiera resistencia a antibióticos (o alternativamente un marcador selectivo), un promotor y un terminador de la transcripción.

La mayoría de los vectores de expresión están basados en uno o dos sistemas de promotores. El promotor de *lac* de *E. coli* ofrece altos niveles de expresión de genes, puede ser inducido por la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y puede ser regulado para prevenir la expresión de proteínas que pueden ser tóxicas para la célula debido a una sobre-expresión.

Un sistema alternativo usa un promotor que es reconocido por la ARN polimerasa a partir del bacteriofago T7. Este promotor no es normalmente reconocido por la maquinaria de transcripción de *E. coli* y por lo tanto se puede obtener la clonación y expresión de genes

que codifican productos potencialmente tóxicos sin el riesgo de expresión descontrolada. Para inducir la expresión del gen de la polimerasa T7 se suministra un segundo plásmido compatible, un fago o una modificación en el cromosoma de *E. coli*. La expresión del gen de la polimerasa T7 usualmente se lleva a cabo por un choque térmico a 42° C (16).

ANTECEDENTES DIRECTOS.

Con la finalidad de analizar el mecanismo de entrada al núcleo de la Dp71, en nuestro laboratorio se está trabajando sobre el mapeo de su probable NLS. Debido a que la Dp71 carece de una región NLS típica, se analizó mediante la construcción de proteínas de fusión con la GFP, la localización subcelular de diferentes fragmentos de la proteína y de esta manera se encontró una región que conserva la localización nuclear, la cual abarca de los aminoácidos 288 a 463.

JUSTIFICACIÓN.

La localización nuclear de la Dp71 ofrece nuevas perspectivas para el estudio de su función celular. Como primer acercamiento para avanzar sobre este objetivo es necesario estudiar el mecanismo que transporta a la Dp71 al núcleo. Con esto como base, el presente trabajo tuvo como objetivo clonar y expresar el fragmento que conserva la localización nuclear, empleando un sistema procarionte, con la finalidad de realizar ensayos *in vitro* que lleven al conocimiento del mecanismo de translocación nuclear de esta proteína.

OBJETIVO GENERAL.

Clonar y expresar el fragmento protéico de la Dp71 involucrado en su localización nuclear.

Objetivos particulares

- 1) Construcción de un plásmido que exprese el fragmento involucrado en la migración nuclear de la Dp71, pGFPb-500.
- 2) Caracterización de la construcción pGFPb-500 por PCR y digestión enzimática.
- 3) Expresión de la proteína de fusión. GFP-500 en la cepa BL21 de E. coli.

MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación de un segmento de ADN. El principio de esta reacción se basa en la separación de la doble cadena de la hélice de ADN, el alineamiento y extensión de dos oligonucleótidos que funcionan como iniciadores (“primers”) que flanquean la región blanco del ADN. Estos tres pasos: desnaturalización, alineamiento de iniciadores y síntesis de ADN representan un ciclo de PCR. Si las nuevas cadenas sintetizadas se extienden a través de la región complementaria el otro iniciador, puede servir como sitio de unión al templado para una reacción de extensión del mismo. Como consecuencia ciclos repetidos de desnaturalización, alineamiento y síntesis de ADN generan una acumulación exponencial de un fragmento de ADN.

Para amplificar la región de 554pb de la Dp71 se empleó el plásmido pBSSK-Dp71-+ Δ Nhe I, el cual contiene la secuencia completa de la Dp71. Los iniciadores 500f (CTAGCTAGATGGTGGGAATAGC) y 500r (GTAGCTAGCTAGTTACTATTCAGG) contienen en ambos extremos los sitios de corte para la enzima NheI que sirvieron para su clonación. Para la reacción de PCR se utilizó 1 μ g de ADNc del plásmido, 200 ng de cada iniciador, 1.5 mM de MgCl₂ y 1U de la enzima Pfu turbo polimerasa. El programa de amplificación fue a 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos, durante 35 ciclos. Durante los últimos 10 minutos de elongación a 72° C se agregó un exceso de Taq polimerasa para agregar una cola de Adeninas la cual facilitaría la ligación en el vector HTP TOPO. El sistema favorece la clonación a través de la

hibridación de la base timidina (dT) proveniente del vector linearizado con la adenosina (dA) proveniente del fragmento de PCR.

Clonación del fragmento de 554pb en el vector HTP TOPO

Para la clonación del producto de PCR se utilizó el vector HTP TOPO (Invitrogen) (figura 1). La clonación se realizó preparando una mezcla de la siguiente manera: 4µl del producto de PCR, 1µl de solución 1.2 M de NaCl y 0.06 M de MgCl₂ y 1µl del vector TOPO, la mezcla se incubó durante 5 minutos para su ligación. Posteriormente se transformó la cepa DH5α con la reacción de ligación como se describe a continuación:

En 25 µl de bacterias competentes se adicionó el ADN de la ligación, manteniendo las bacterias en hielo durante 30 minutos, se transfirió el cultivo a un baño a 42° C durante 90 segundos y se volvió a colocar en hielo durante dos minutos. Se adicionaron 800 µl de medio LB sin ampicilina y se incubó a 37° C durante una hora. Finalmente, se espatularon 100µl de esta solución bacteriana en medio LB con ampicilina 100 µg /ml.

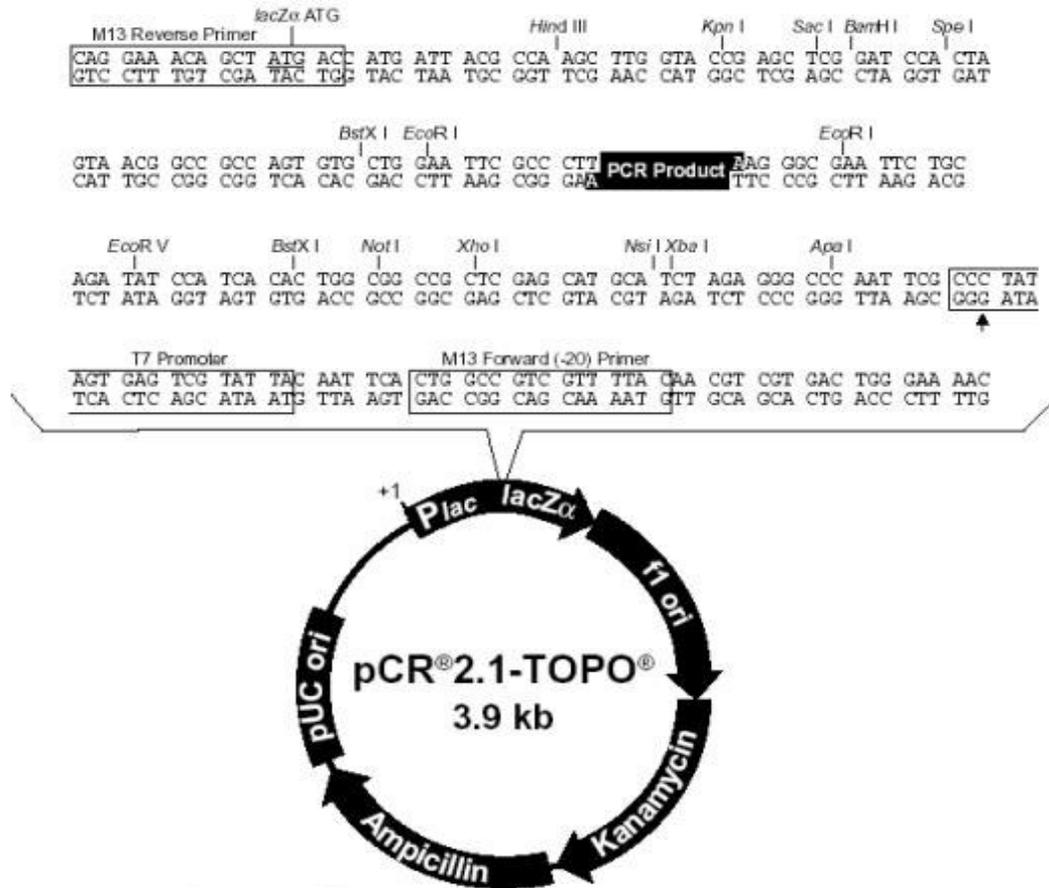


Fig 1. Vector de tránsito HTP TOPO. En este vector se clonó el fragmento de 554 pb de la Dp71 que contiene una probable región NLS.

Caracterización de las clonas TOPO-Dp71

Para caracterizar las clonas que portaban el plásmido de interés se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos 715' 5' CATGGTGGAAATATTGCACTCCG y 713' 5' TGCGTGAATGAGTATCATCGT, que reconocen una secuencia interna del fragmento de la Dp71 (exón 69 y exón 72 respectivamente). Se obtuvieron colonias positivas que generaron un fragmento de 206 pb. Los plásmidos candidatos se caracterizaron con la

enzima Stu I (New England Biolabs) agregando 2µl de solución amortiguadora NEB2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂), 1 µl de enzima Stu I (10U/µl), 5µl de ADN (4.73µg/µl) y 12µl de agua.

Subclonación del fragmento de 554pb en el vector pGFPb

El fragmento de 554pb (que contiene la probable región NLS) clonado en el vector TOPO, fue digerido con 5U de la enzima Nhe I a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente el producto de digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, y se purificó a partir del gel utilizando el “kit Qiaquick Gel Extraction System” (QIAGEN) para su posterior subclonación en el vector pGFPb. El vector fue linearizado con la enzima Nhe I bajo las condiciones antes mencionadas y purificado a partir del gel. El fragmento de ADN previamente purificado fue desfosforilado con la enzima CIP (New England Biolabs) de la siguiente manera: el ADN se suspendió en la solución amortiguadora NE 1X , agregando 0.5 unidades de enzima/µg de vector, posteriormente la reacción se incubó a 37° C durante 30 minutos. Una vez desfosforilado el ADN, éste se purificó usando el “kit Concert Gel Extraction System” de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (GIBCO-BRL).

La ligación del fragmento de 554pb y el vector se realizó con 5U/µl de la enzima T4ADN ligasa (Invitrogen) a 16°C durante toda la noche.

Expresión de la proteína de fusión pGFPb-500 en la cepa BL21

Para inducir la expresión de la proteína de fusión con IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) se realizó un ensayo de expresión de la siguiente forma:

Se inocularon 5 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina con la colonia de interés, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Enseguida se tomaron 2.5 ml del cultivo y se llevaron a un volumen total de 50 ml con LB con ampicilina; se incubaron nuevamente a 37°C hasta obtener una O.D. ₆₀₀ de 0.5-0.7. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml para el tiempo 0 (sin inducción), al resto del cultivo se le agregaron 50 μ l de IPTG 1 mM y se centrifugó 1 min. a 13000 rpm. Enseguida se resuspendió la pastilla en la solución amortiguadora a distintos tiempos (1, 2, 3, 4 hrs.) Se extrajeron las proteínas totales utilizando solución de lisis. Posteriormente se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en donde se verificó la aparición de una banda de aproximadamente 50kDa.

Inmunodetección del producto de la construcción pGFPb-500.

El gel obtenido a partir de la electroforesis fue transferido a una membrana de nitrocelulosa a 120 mA con TBS 1x durante toda la noche, posteriormente la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-T 1x, para realizar una inmunodetección tipo “Western Blot”, utilizando los anticuerpos H5A3 (que reconocen a Dp71 -/+), y anti-GFP. El revelado se realizó con el “kit ECL Western Blotting Analysis System” de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Amersham).

RESULTADOS

Amplificación por PCR de la región de ADN que codifica para los a.a. 288 – 463 de la Dp71

Con el fin de obtener un fragmento de la región central de la Dp71, se emplearon los oligonucleótidos 500F y 500R. Se estandarizaron las condiciones de amplificación y para evitar la integración de errores en la secuencia durante la PCR, se utilizó la polimerasa Pfu turbo, la cual tiene un sistema de corrección. El producto de amplificación de 554 pb se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. (Figura 2).

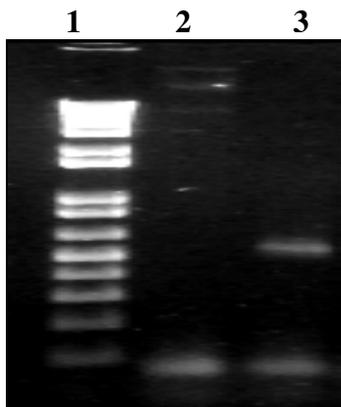


Fig. 2. Amplificación del fragmento de la Dp71 de 554 pb. Se muestra un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, se señala el producto amplificado de la Dp71 de 554 pb Carriles: 1 marcador de ADN; 2 control negativo; 3 fragmento de PCR de 554 pb.

Clonación del fragmento de la Dp71 de 554 pb en el vector de tránsito HTP TOPO

Una vez amplificado y purificado el fragmento de 554 pb de la Dp71 se clonó en el vector de tránsito HTP TOPO; esto con el propósito de obtener el fragmento de ADN con sitios de restricción adecuados para su posterior subclonación en el vector pGFPb.

La ligación del fragmento de 554 pb con el vector de tránsito HTP TOPO se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente, con este vector se transformó la cepa DH5 α .

Caracterización de las clonas TOPO-Dp71

Para caracterizar las clonas que portaban el plásmido TOPO-Dp71 se extrajo el ADN plasmídico y después se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos (Dp71f y Dp71 r) que reconocen una secuencia interna del fragmento de la Dp71. Las clonas positivas amplificaron un fragmento de 206 pb (Figura 3). Adicionalmente se comprobó la presencia del fragmento de 554 pb digiriendo el ADN plasmídico con la enzima Stu I (New England Biolabs), la enzima Stu I sólo corta dentro del fragmento clonado. Los productos de la restricción se visualizaron por medio de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio en donde se observó la linearización del vector, ya que en las clonas positivas existe el sitio para el corte de esta enzima (no se muestra la imagen).

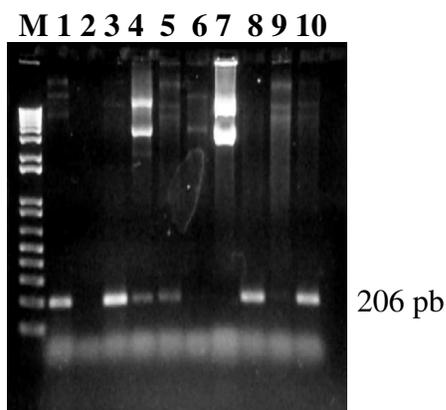


Fig. 3 Caracterización de las clonas TOPO-Dp71.

Se muestra un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M marcador de ADN; 1 control positivo; 2 control negativo; 3, 8 y 10 clonas positivas que generaron el fragmento esperado de 206 pb.

Subclonación del fragmento de 554pb en el vector pGFPb

Las clonas que generaron el fragmento de 554pb, se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina 100µg /ml para posteriormente extraer el ADN plasmídico y liberar mediante digestión con Nhe I el fragmento de 554 pb. El fragmento de la digestión se visualizó en un gel de agarosa (Figura 4), y se purificó para su posterior subclonación en el vector pGFPb. Para llevar a cabo la subclonación del fragmento de 554 pb el vector pGFPb se linearizó con la enzima Nhe I (Figura 5), se llevó acabo la ligación como se describe en Materiales y Métodos previamente. La reacción de ligación se utilizó para transformar a la cepa DH5α.

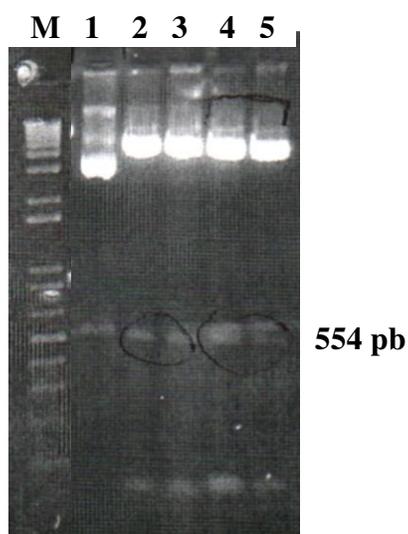


Fig. 4 Fragmento de 554 pb liberado del vector de tránsito TOPO mediante digestión con la enzima Nhe I. Se muestra un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio Carriles: M, marcador de ADN; 1 - 5 clonas que liberaron el fragmento.

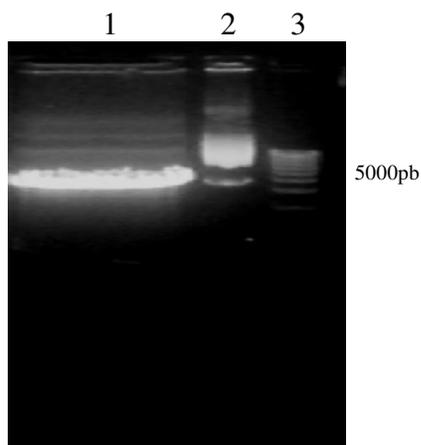


Figura 5 Vector linearizado Se muestra un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, Carriles: 1, Vector linearizado con un tamaño aproximado de 5000pb aproximadamente; 2 Vector sin linearizar; 3, Marcador de ADN.

Caracterización de las clonas pGFPb-500

Para caracterizar las clonas que portaban el plásmido de interés se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos para la Dp71 (ver Materiales y Métodos). Adicionalmente, los candidatos se probaron con la enzima Nhe I. Una vez caracterizadas las subclonas se verificó la dirección del fragmento dentro del vector para saber si la fusión estaba en el marco de lectura adecuado. Se realizó una digestión con las enzimas Kpn I y de Stu I, ya que el vector y el fragmento clonado poseen sitios únicos para estas enzimas respectivamente. Si la dirección del inserto era la correcta, al restringir se esperaba una banda de 1224 pb, mientras que de ser incorrecta la dirección del inserto, se observaría una banda de 1690 pb (datos no mostrados). Se obtuvieron 3 candidatos positivos.

Expresión de la proteína de fusión pGFPb-500 en la cepa BL21.

La cepa BL21 de *E. coli* se transformó con el vector pGFPb-500. La estandarización de las condiciones de inducción de los cultivos, se llevó a cabo variando la concentración del

inductor IPTG, así como la temperatura y tiempo de inducción. Se realizaron dos pruebas para visualizar la inducción de los cultivos, una de éstas se analizó por medio de electroforesis y la otra por la fluorescencia de la GFP generada por el estímulo con luz U.V. Los extractos bacterianos inducidos fueron sometidos a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. En la Figura 6 se observa la aparición de una banda tenue de aproximadamente 50 kDa que podría corresponder a la proteína de fusión GFP-Dp71.

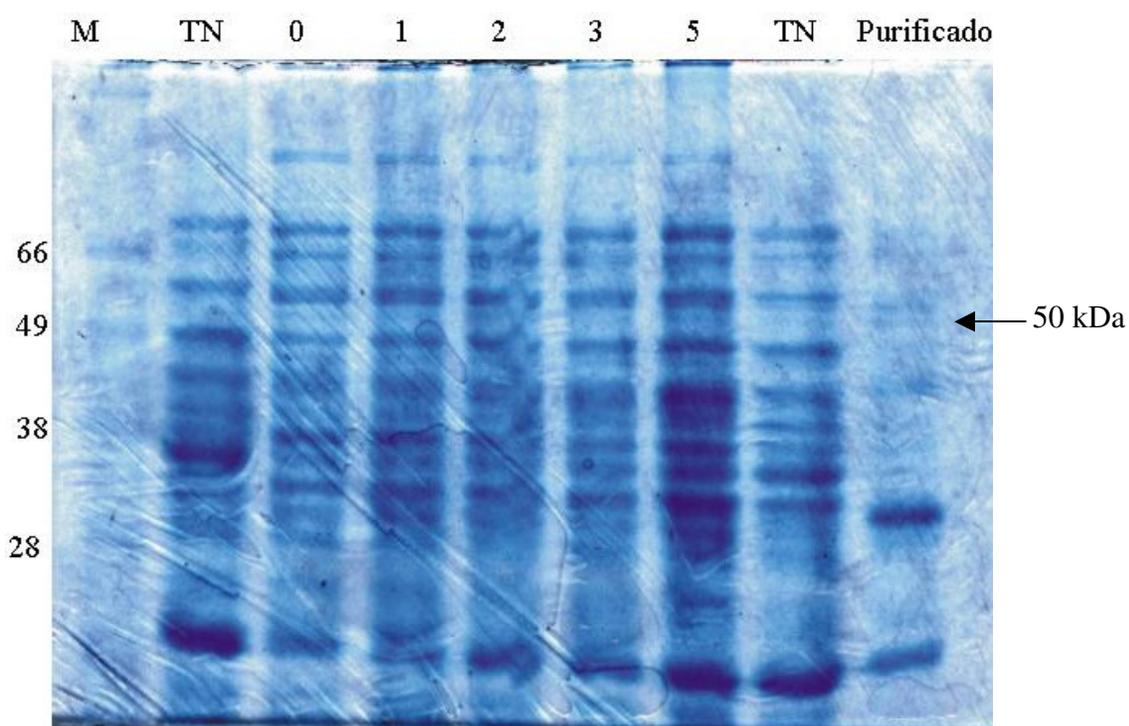


Fig. 6 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS PAGE teñido con azul de coomasie. Se observa una banda tenue de aproximadamente 50kDa a diferentes tiempos. M, Marcador; 0, 1, 2, 3, 5 horas; TN, toda la noche y purificado

Las bacterias de la cepa BL21 transformadas con la construcción pGFPb-500 fueron inducidas con IPTG para la expresión de la proteína de fusión. Los cultivos se incubaron a 32° C y por

diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 5 y toda la noche). Cada muestra se centrifugó para separar la fase líquida de la pastilla y posteriormente se estimularon con luz U. V. para observar el gradiente de expresión con respecto al tiempo (Figura 7).

Para confirmar la expresión de la proteína de interés se decidió realizar una inmunodetección tipo “Western Blot”

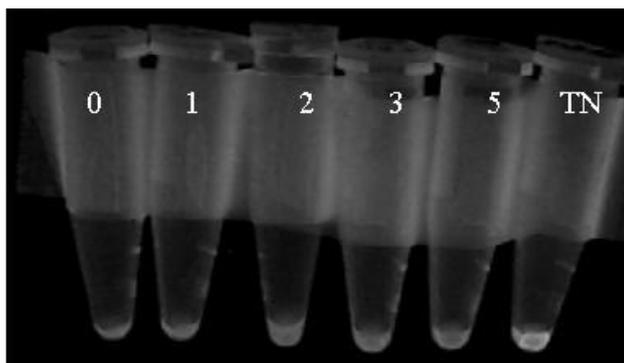


Fig. 7 Inducción de la construcción pGFPb-500 con IPTG a diferentes tiempos, 0, 1, 2, 3, 5 horas y toda la noche con luz U. V. Tiempo 0 sin IPTG. Se observa un incremento de la inducción con respecto al tiempo.

Inmunodetección del producto de la construcción pGFPb-500.

Debido a que en la electroforesis no se observa claramente el incremento de la banda de 50 kDa que corresponde a la expresión de la construcción GFP-500, se hizo una inmunodetección tipo “Western Blot”, en la que se observó un incremento de la expresión de la proteína mencionada con respecto al tiempo (Figura 8)

Con el uso de los anticuerpos H5A3 y anti-GFP se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína de fusión GFP-Dp71. En la figura 8 se observa una banda a la altura de 50 kDa que aparentemente se torna más intensa, a medida que el tiempo de inducción fue mayor la banda

es más intensa en la pastilla bacteriana (pellet) lo que sugiere que la proteína podría quedar atrapada en cuerpos de inclusión.

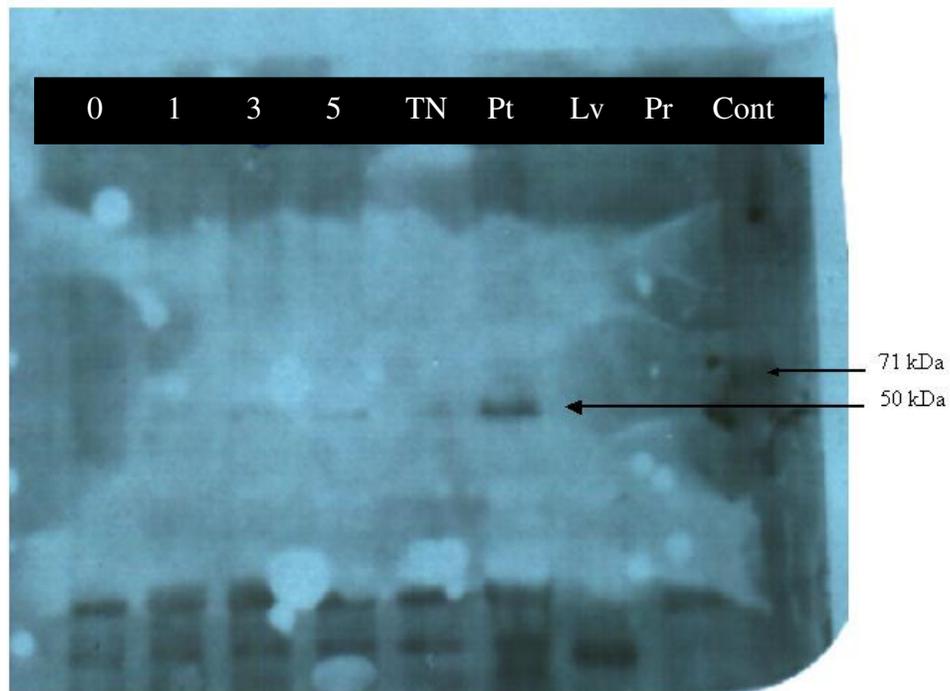


Fig. 8 Inmunodetección de la proteína de fusión GFP-Dp71 los cultivos se indujeron con el anticuerpo H5A3, a diferentes tiempos de inducción 0, 1, 2, 3, 5 horas, toda la noche, pastilla, lavado, purificado y control con Dp71. Se observa una banda de aproximadamente 50 kDa en la pastilla.

DISCUSIÓN

La proteína Dp71 es el producto más pequeño codificado por el gen *dmd*, el cual en su estado mutado es causa de la distrofia muscular de Duchenne. La Dp71 es la distrofina más abundante en el sistema nervioso central y en contraste, está prácticamente ausente en músculo esquelético, lo que ha llevado a pensar que esta proteína podría estar involucrada en las alteraciones cognitivas presentes en un tercio de los pacientes con esta distrofia.

La Dp71 sufre procesamiento alternativo en los exones 71 y 78, lo cual genera diferentes isoformas. Con la finalidad de definir si cada isoforma de la Dp71 presenta una función específica, nuestro grupo de trabajo analizó la distribución subcelular de cada variante de la Dp71 mediante la construcción de proteínas de fusión entre la proteína verde fluorescente (GFP) y cada una de las cuatro isoformas de la Dp71 (-71/+78, -71/-78, +71/+78 y +71-78). De manera interesante, se observó que la isoforma de la Dp71 -/+ presenta una localización celular predominantemente nuclear mientras que la variante -71/-78 se distribuyó exclusivamente en el citoplasma.

Tomando en consideración que solamente las proteínas con un peso menor a 40 kDa pueden transportarse de manera pasiva al interior del núcleo, es probable que la Dp71 presente una secuencia de localización nuclear (NLS), ya que tiene un peso de 71 kDa. Con base en lo anterior decidimos analizar cuál es el mecanismo que envía a la Dp71 hacia el núcleo. Como primer paso se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína Dp71, y se encontró que en su región central presenta una serie de aminoácidos básicos (arginina y lisina) que a pesar de que no constituyen una región típica de NLS, podrían por su carácter básico actuar como una NLS atípica. Las NLS son reconocidas por el complejo de importinas α y β ; el complejo trimérico (proteína nuclear-importinas α y β) es reconocido

por proteínas del complejo del poro nuclear para su posterior translocación al núcleo (12, 16, 17).

En este estudio se planteó clonar el fragmento central de la Dp71 (554 pb), que contiene la probable NLS atípica, para generar una fusión genética con la proteína reportera GFP en un sistema bacteriano. Lo anterior con la finalidad de sobre-producir la proteína de fusión pGFPb-500 para su posterior uso en experimentos de transporte nuclear *in vitro*.

Se utilizaron dos cepas bacterianas para clonar y expresar la construcción pGFPb-500. La cepa DH5 α fue utilizada debido a su capacidad de contener de manera estable DNA de plásmidos, mientras que la cepa BL21 se empleó debido a la característica que presenta de tener deficiencia en su sistema de proteasas, lo que permite expresar proteínas foráneas sin que sean reconocidas como moléculas extrañas a la bacteria.

Para obtener el plásmido pGFPb-500 se utilizó primeramente el vector de tránsito denominado HTP TOPO. La ventaja de este sistema de clonación es que el vector http TOPO se encuentra linearizado, presenta una timina que permite la ligación directa de los productos de PCR que a su vez contienen una adenina agregada de manera natural durante la reacción de la PCR por la DNA polimerasa Taq. De esta manera se logró insertar el fragmento central de la proteína Dp71 -/+ al vector HTP TOPO. Posteriormente, se liberó el fragmento del vector HTP TOPO mediante corte con la enzima Nhe I y se ligó enseguida en el vector pGFPb.

Una vez obtenida y caracterizada la construcción pGFPb-500 se realizaron los ensayos de expresión en bacteria. Se encontró que las condiciones óptimas para la producción de la proteína de fusión en la cepa BL21 de *E. coli* fueron las siguientes: temperatura de crecimiento de 32° C y 5 horas de inducción con IPTG 1 mM. La inmunodetección con el

anticuerpo H5A3 confirmó la expresión de la proteína de fusión en el sistema bacteriano BL21; no obstante, es necesario realizar la secuenciación de la construcción pGFPb-500 para corroborar la integridad de la secuencia y complementar los resultados obtenidos. De esta manera los ensayos posteriores en los cuales se utilizará la proteína de fusión purificada para analizar el transporte nuclear de la Dp71 estarán debidamente sustentados.

Durante el montaje de las condiciones de sobre-expresión de la proteína de fusión, se observó que la mayoría de ésta se detectaba en la pastilla bacteriana, lo que sugiere que queda atrapada en los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se forman dentro de la bacteria debido a que las proteínas de origen externo al ser sobre-producidas forman agregados insolubles. Para evitar su formación se recomienda utilizar condiciones de extracción desnaturalizantes, sin embargo, se corre el riesgo de que la proteína de interés pierda su conformación original en el proceso de re-naturalización de la muestra, lo cual sería una dificultad técnica al momento de utilizar a la proteína en estudios de interacción con las importinas.

Considero que este estudio sienta las bases para poder estudiar el mecanismo por medio del cual la Dp71 se transporta al núcleo.

CONCLUSIÓN

- 1) Las condiciones óptimas para la expresión de la construcción pGFPb-500 en la cepa BL21 de *E. coli* fueron las siguientes: inducción con IPTG 1mM, a 32° C durante 5 horas.
- 2) Es probable que el producto de la construcción pGFPb-500 se quede atrapado en cuerpos de inclusión de la bacteria.

REFERENCIAS.

- 1.- Sadoulet-Puccio H., Kunkel L. (1996) *Dystrophin and its isoforms*. Brain Pathology. **6**(1):25-35.
- 2.- Ahn A, Kunkel L. (1993) *The structural and functional diversity of Dystrophin*. Nat. Genetics. **3**(4):283-291.
- 3.- Fabbriozio E., Pons F., Robert A., Hugon G., Bonet-Kerrache A., Mornet D. (1994) *The Dystrophin superfamily: variability and complexity*. J. Muscle Res. Cell. Motil. **15**(6):595-606.
- 4.- Michalak M., Opas M. (1997). *Fucntions of Dystrophin and Dystrophin associated proteins*. Curr. Opin. Neurol. **10**(5):436-442.
- 5.- Winder S., Kendrick-Jones K. (1995) *Calcium/ calmodulina- dependent regulation of the NH₂ terminal F-actin binding domain utrophin*. FEBS Letters. **357**(2):125-128.
- 6.- Michalak M., Fu SY., Milner R., Busaan J., Hance J. (1996) *Phosphorylation of the carboxyl terminus region of Dystrophin*. Biochem. Cell. Biol. **74**(4):431-437.
- 7- Gorecki D., Barnard E. (1995) *Specific expression of G dystrophin in the brain*. Molecular. Neurosci. **6**(6):893-896.
- 8.- Rapaport D., Lederfein D., den Dunnen J., Grootsholten P., Van Ommen G., Fuchs O., Nudel U., Yaffe D. (1992) *Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of Duchenne muscular dystrophy gene*. Differentiation. **49**(3):187-193
- 9.- Austin R., Howard P., D'Souza V., Klamut H., Ray P. (1995) *Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71*. Hum. Mol.r Gene. **4**(9):1475-1483.
- 10.- Rapaport D., Greenberg D., Tal M., Yaffe D., Nudel U. (1993) *Dp71, the nonmuscle product of the DMD gene is associated with the cell membrane*. FEBS Letters. **328**(1-2):197-202.
- 11.- Gonzalez E., Moñtanez C., Ray P., Howard P., Garcia-Sierra F., Mornet D., Cisneros B. (2000) *Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71*. FEBS Letters. **482**(3):209-214.
- 12.- Gorlich D., Kutay U., (1999) *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.**15**(1):607-660.
- 13.- Bonifaci N., Moroianu J., Radu A., Blobel G. (1997). *Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein*. PNAS. **94**(10):5055-5060.
- 14.- Rout M., Blobel G., Aitchison J. (1997) *A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins*. Cell. **89**(5):715-725.
- 15.- Fagotto F., Gluck U., Gumbiner B. (1998) *Nuclear localization signal independent and importin/karyopherin independent nuclear import of β catenina*. Curr. Biol. **8**(4):181-190.
- 16.- Roberts B., Richardson W., Smith A. (1987) *The effect of protein context on nuclear localization signal function*. Cell. **50**(3):465-475.
- 17.- Turpin P., Ossareh-Nazari B., Dargemont C (1999). *Nuclear transport and transcriptional regulation*. FEBS Lettters. **452**(1-2):82-86.
- 18.- Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P., Stahl S. (2002) *Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli*. Biotechnol. Appl. Biochem. **35**(Pt 2):91-105.