



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

.....

FACULTAD DE CIENCIAS

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE UN ARN MENSAJERO QUE
CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-
LIKE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

**MARÍA DEL ROSARIO
GONZAGA PÉREZ**



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: MED. CIR. BENITO ANTÓN PALMA

MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Clonación y caracterización de un ARN mensajero que codifica a una proteína Rheb-like”

realizado por **Gonzaga Pérez María del Rosario**, con número de cuenta **093299484** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr.	Luis Felipe Jiménez García	
Propietario	Dra.	América Nitxin Castañeda Sortibrán	
Tutor(a) Propietario	Med. Cir.	Benito Antón Palma	
Suplente	Dr.	René de Jesús Cárdenas Vázquez	
Suplente	Q.F.B.	Maura Epifanía Matus Ortega	

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 9 de agosto del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

1. Datos del alumno

Gonzaga
Pérez
María del Rosario
13 15 76 76
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
093299484

2. Datos del asesor

Médico cirujano
Benito
Antón
Palma

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
América Nitxin
Castañeda
Sortibrán

5. Datos del sinodal 3

Dr.
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

6. Datos del sinodal

Q.F.B.
Maura Epifanía
Matus
Ortega

7. Datos de la tesis.

Clonación y caracterización de un ARN mensajero que codifica a una proteína
Rheb-like
76 p
2008

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres por su total y absoluta confianza y apoyo.

Gracias padre por tu comprensión y ayuda, por darme todas las herramientas para poder caminar por la vida. A mi madre por los grandes sacrificios, los desvelos, los consejos, por saber que siempre puedo contar contigo.

A mis hermanos, en especial a Miriam por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles de mi carrera, a María Elena por su ayuda incondicional, a mis sobrinos por su cariño.

A mis amigas, que siempre me ha dado ánimo para poder conseguir mis objetivos y por estar cuando las necesité. Sugela y Noemí gracias por su amistad en todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e Instituciones que han contribuido a que este trabajo se pueda llevar a cabo. A CONACYT-SEP proyecto 2004-CO1-47804, a la Fundación Gonzalo Ríó Arronte A.C, INPRFM-2040.

A Maura Matus por la acertada guía y por su contribución a mi formación académica, por la ayuda incondicional y la amistad durante estos años.

Al Dr. Benito Antón por haber aceptado en su grupo de trabajo, por la confianza en mí depositada. A Juan Carlos Calva por sus consejos y sugerencias y a mis compañeros de laboratorio.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1a. Superfamilia de proteínas Ras	4
1b. Características estructurales y propiedades funcionales de las proteínas Ras	5
II. ANTECEDENTES	10
2a. Expresión de la proteína Rheb	10
2b. Características estructurales de la proteína Rheb	10
2c. Propiedades funcionales de la proteína Rheb	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	21
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	25
A. Rastreo inmunológico a partir de un banco de expresión de ADNc de cerebro total de ratón adulto	25
1. Recuperación de bacterias a partir del respaldo y crecimiento de bacterias para propagar el fago	26
2. Titulación del fago de ayuda (Helper)	27
3. Titulación de la biblioteca	28
4. Recuperación de placas líticas	29
5. Rastreo inmunológico	30
6. Recuperación de material inmunoreactivo	31
7. Amplificación del material inmunopositivo	31
8. Escisión <i>in vivo</i>	32

9. Preparación de células competentes por cloruro de calcio	33
B Purificación del plásmido	34
C Análisis de restricción enzimática	34
D Amplificación por PCR	35
E Secuenciación de ADN por el método de incorporación terminal de nucleótidos marcados con fluorescencia	37
F Análisis de la secuencia obtenida	41
G Modelo de administración en roedores	42
1. Administración farmacológica	42
2. Extracción y análisis de ARN total	43
3. RT-PCR	44
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1 Identificación y clonación de una colonia bacteriana inmunopositiva a partir del rastreo inmunológico	48
6.2 Aislamiento y caracterización parcial de un ADNc	49
6.3 Análisis de la secuencia nucleotídica y proteica del ADNc clonado	51
6.4 Análisis de homología estructural del ADNc clonado	53
6.5 Localización de la secuencia del ADNc en el genoma de ratón, rata y humano	59
6.6 Caracterización de la expresión neuroanatómica del ARNm Rheb-like	61
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	70
VIII. REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Regulación de las proteínas Ras	5
Figura 2	Estructura del dominio de las proteínas Ras	6
Figura 3	Procesamiento de la caja CAAX	7
Figura 4	Modelo de la estructura de Rheb	12
Figura 5	Mapa del vector pBluescript® SK ⁻	26
Figura 6	Representación esquemática de un sistema de secuenciación de ADN basada en capilar	38
Figura 7	Inmuno Blot con el 2 ^o Ab marcado con I ¹²⁵	48
Figura 8	Análisis electroforético en geles de agarosa mostrando el tamaño molecular del ADNc clonado	50
Figura 9	Secuencias correspondientes del ADNc clonado	52
Figura 10	Representación esquemática del formato del GenBank del alineamiento estructural entre nuestra secuencia de ARNm y las secuencias de ARNm's reportados en la base de datos del GenBank	54
Figura 11	Dibujo esquemático del análisis estructural de nuestra secuencia de ARNm	57
Figura 12	Registro en la base de datos del GenBank de la secuencia primaria de nucleótidos del ARNm y de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada	58
Figura 13	Localización de la secuencia de Rheb-like en el genoma del ratón	59
Figura 14	Localización de la secuencia de Rheb-like en el genoma de rata	60
Figura 15	Localización de la secuencia de Rheb-like en el genoma de humano	61
Figura 16	Dibujo esquemático del diseño de los oligonucleótidos para la amplificación del ARNm clonado	63

Figura 17	Análisis electroforético para la identificación de los productos de amplificación del ARNm que codifica para la proteína Rheb-like con el tratamiento de solución salina (i. p. SSI)	64
Figura 18	Análisis electroforético para la identificación de los productos de amplificación del ARNm que codifica para la proteína Rheb.like con el tratamiento de pentilentetrazol (i. p. 40 mg/kg)	66
Figura 19	Análisis electroforético para la identificación de los productos de amplificación del ARNm que codifica para la proteína Rheb-like con el tratamiento de cocaína (i. p. 10 mg/kg)	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Volumen de carga de la muestra de restricción enzimática en el gel de agarosa para la electroforesis	35
Tabla 2	Concentraciones en el tubo de reacción de PCR	36
Tabla 3	Programa de amplificación	36
Tabla 4	Volumen de carga de la muestra del producto de PCR en el gel de agarosa	37
Tabla 5	Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores complementarios que flanquean al inserto y los internos del ADNc clonado a partir de la secuencia parcial obtenida	39
Tabla 6	Protocolo de marcaje de los productos de PCR	40
Tabla 7	Programa de marcaje de los productos de PCR	40
Tabla 8	Tejidos disectados para extracción de ARN total	43
Tabla 9	Volumen de la carga de la muestra de ARN total en el gel de agarosa	44
Tabla 10	Mezcla del tubo para la reacción de transcripción reversa	44
Tabla 11	Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación de Rheb-like y control	45
Tabla 12	Concentraciones del tubo de reacción de PCR	46
Tabla 13	Programa de amplificación	46
Tabla 14	Volumen de la carga de la muestra del producto de PCR en el gel de agarosa	47
Tabla 15	Secuencias que produjeron un alineamiento significativo con la secuencia del ADNc clonado	55

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR	- Región no codificante 3'
5' UTR	- Región no codificante 5'
ADN	- Ácido desoxiribonucleico
ADNc	- Ácido desoxiribonucleico complementario
ARNm	- Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
COS7	- Células de riñón de mono
CSF-1	- Factor estimulador de colonia 1
DMF	- Dimetilformamida
ddNTPs	- Nucleótido didesoxi trifosfato
EGF	- Factor de crecimiento epidérmico
GAP	- Proteína de activación de GTPasa
GDP	- Guanosina difosfato
GTP	- Guanosina trifosfato
GTPase	- Enzima que convierte GTP en GDP
HEK293	- Células de riñón de embrión humano 293E
Icmt	- Isoprenilcisteina carboxil metiltransferasa
IPTG	- Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
kb	- kilobase
kDa	- kiloDalton. Unidad de masa molecular
LB	- Luria-Bertani
MEFs	- Fibroblastos embrionarios de ratón
MgSO ₄	- Sulfato de magnesio.
OD ₆₀₀	- Densidad Óptica medida a longitud de onda de 600 nm
ORF	- Marco de lectura abierto
PCR	- Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	- Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PTZ	- Pentilentetrazol
Rcl	- Ras y la enzima convertidora del factor a.
Rheb	- Homóloga a Ras enriquecida en el cerebro
RPT	- Palmitoiltransferasa localizada en el Retículo endoplasmático
S6K	- cinasa S6 ribosomal
TSC 1	- Complejo de esclerosis tuberosa 1
TSC 2	- Complejo de esclerosis tuberosa 2
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosido

RESUMEN

En el laboratorio se desarrolló un proyecto de investigación orientado hacia la identificación, aislamiento y caracterización de nuevas moléculas neuroactivas, basado en tecnologías inmunomoleculares de identificación y clonación de ARN mensajeros. Empleando esta técnica de rastreo inmunológico se detectó, identificó y se aisló una molécula de ARNm a partir de una biblioteca de expresión de ADNc de cerebro total de ratón. Se caracterizó la secuencia primaria de este ARNm, que consta de 1541 nucleótidos de longitud, con un marco de lectura abierto de traducción de 552 nucleótidos, el cual codifica para una proteína de 184 aminoácidos. La comparación de la secuencias del ARNm dio como resultado una identidad de más del 90% de la secuencia del ARNm de Ras-Homolog Enriched in Brain del organismo *Mus musculus*. La secuencia del ADNc se reportó por nuestro grupo en la base de datos del GenBank con el número de acceso AY197373. La proteína Rheb se encuentra dentro de la superfamilia de proteínas Ras, mostrando secuencias consenso que la colocan dentro de esta superfamilia y Rheb se define como una nueva y única familia dentro de la superfamilia de proteínas Ras, Rheb ha tomado importancia ya que participa en la regulación y ciclo celular. A pesar de su importancia biológica, su distribución y expresión no ha sido establecida completamente, por lo que en nuestro laboratorio, para iniciar el estudio de la actividad funcional de Rheb se llevaron a cabo estudios de RT-PCR en áreas neuronales y órganos periféricos de ratón para identificar la expresión de Rheb por estímulos específicos. Los patrones de expresión de los estudios de RT-PCR para el gen Rheb en condiciones fisiológicas (i. p. SSI) mostraron que la expresión del ARNm de Rheb es expresado ampliamente en todas las áreas

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

neuronales examinadas (bulbo olfatorio, cerebelo, corteza, estriado, hipocampo, médula espinal, ojos, tálamo-hipotálamo y tallo cerebral); también fue detectado en tejidos periféricos como corazón, hígado, músculo esquelético, páncreas, riñón y glándulas suprarrenales. En el grupo de animales tratados con PTZ (i. p. 40 mg/kg), la expresión del ARNm se mantuvo en áreas neuronales, cambiando su patrón de expresión a la baja en hígado y pulmón. En el grupo tratado con cocaína (i. p. 20 mg/kg), no hubo cambios significativos en la expresión del ARNm de Rheb en las áreas neuronales, en cuanto a los órganos periféricos, se observa expresión en pulmón.

La expresión del ARNm de Rheb en forma constitutiva en condiciones fisiológicas, sugiere su participación en funciones esenciales en el SNC y órganos periféricos. Al modificarse su expresión en hígado, pulmón (PTZ) y pulmón (cocaína) sugiere su participación en procesos metabólicos.

I. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos estamos formados por una o más células, estas células reciben y responden a señales de su ambiente. Muchos eucariontes unicelulares responden a moléculas de señalización secretadas por otras células, permitiendo una comunicación célula a célula. En organismos multicelulares, la comunicación entre células alcanza un nivel más complejo. Mientras que las células de procariontes y eucariontes unicelulares son autónomas, el comportamiento de cada célula individual en plantas y animales multicelulares es cuidadosamente regulado para satisfacer las necesidades de todo el organismo, el cual está acompañado de una variedad de moléculas de señalización que son secretadas o expresadas en la superficie celular y se unen a los receptores expresados por otras células, integrando y coordinando las funciones de muchas células individuales que forman un organismo más complejo (Cooper, 2000). El desarrollo de una diversidad y especialización a nivel celular ha sido una pieza fundamental en el desarrollo del proceso evolutivo.

Una respuesta común para señales extracelulares es la que involucra cambios en el programa y rutas de la expresión genética. La transducción de señales en eucariontes es iniciada por la interacción del ligando y el receptor, y por moléculas efectoras que actúan como segundos mensajeros al transmitir la señal y/o amplificarla en el interior de la célula. Muchos de estos ligandos identificados en mamíferos son proteínas solubles, péptidos o moléculas orgánicas pequeñas, algunos se encuentran anclados en la superficie celular (Lewin, 2000; Karin, 1992). Mientras la estructura y la naturaleza química de los ligandos varían enormemente, sus receptores pueden ser

agrupados dentro de un número reducido de familias por sus características estructurales.

Una de estas familias de receptores es la de tirosina cinasas transmembranales. Aunque estas proteínas varían en estructura, todas contienen un dominio catalítico conservado dentro de su región COOH-terminal citoplasmático responsable de la fosforilación de residuos de tirosina. El dominio NH₂-terminal de estas proteínas es extracelular y algunos están enlazados covalentemente a una segunda cadena de polipéptido. El dominio extracelular contiene el sitio de unión a los ligandos que incluyen una variedad de factores de crecimiento como EGF (Factor de Crecimiento de Epidermal), PDGF (Factor de Crecimiento derivado de plaquetas), CSF-1 (Factor estimulador de colonia¹). Las proteínas Ras son mediadores en estas cascadas de señalización por unión de factores de crecimiento a los receptores transmembranales de tirosina cinasas.

1a. Superfamilia de proteínas RAS

Las proteínas Ras, también conocidas como “GTPasas, proteínas G pequeñas y proteínas G de bajo peso molecular”. Son proteínas monoméricas con una masa molecular de 20-40 kDa que se unen e hidrolizan al nucleótido guanina (Paduch *et al*, 2001; Takai *et al*, 2001). Varios estudios han mostrado que las proteínas G pequeñas regulan no sólo la proliferación celular, sino también diferenciación, morfología y apoptosis celular. También se ha mostrado que las proteínas G pequeñas son elementos reguladores de las funciones de inflamación para leucocitos fagocíticos y que regulan respuestas biológicas de leucocitos como adhesión, migración celular, secreción y producción de superóxido (Bernard *et al*, 1999). Las proteínas G pequeñas se encuentran presentes en eucariontes desde levaduras hasta humanos. Muchas

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

proteínas G pequeñas están localizadas tanto en el citosol como en las membranas; su localización es mediada por las modificaciones post-traduccionales con lípidos (Takai *et al*, 2001).

1b. Características estructurales y propiedades funcionales de las proteínas Ras

La proteína Ras es una proteína globular monomérica de 189 aminoácidos, actúa como un interruptor en estado de reposo (off) es encontrado en un complejo con GDP y en un estado activo (on) tiene una molécula de GTP unida a ella. La transición entre los estados activo e inactivo está ayudada por proteínas reguladoras, de al menos, tres distintas familias. La actividad GTPasa intrínseca baja es acelerada por la unión de una proteína activadora de GTPasa (GAP), la cual tiene influencia en la duración de la forma de unión a GTP. La liberación y la subsiguiente unión del nucleótido de guanina son promovidos por el factor de intercambio del nucleótido de guanina (GEF, también llamado GEP) como se esquematiza en la figura 1.

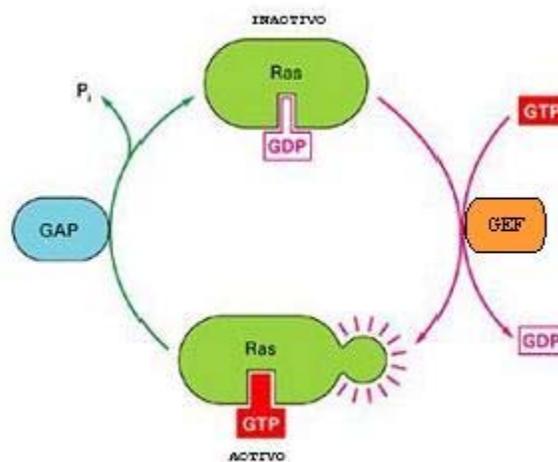


Figura 1. **Regulación de las proteínas Ras.** La actividad de las proteínas Ras está regulada por un ciclo de unión al nucleótido guanina y su hidrólisis. En el estado activo Ras unido a GTP y en el estado inactivo unido a GDP. GEF promueve la disociación de GDP y actúa como un regulador positivo y GAP promueve la hidrólisis de GTP y actúa como un regulador negativo (figura modificada de Alberts *et al*, 2002).

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

H-Ras y K-Ras fueron los primeros identificados como oncoproteínas virales (v-Ras) del virus de sarcoma murino de Harvey y Kirsten, y se encontró que son responsables de la transformación celular (Macaluso *et al*, 2002). Todas las proteínas Ras contienen una caja CAAX terminal en la posición 186-189; donde la “C” representa una cisteína, “A” representa un aminoácido alifático (leucina, isoleucina o valina) y “X” que puede ser metionina, serina, leucina o glutamina en la figura 2 se esquematiza la disposición de los dominios de la proteína Ras.

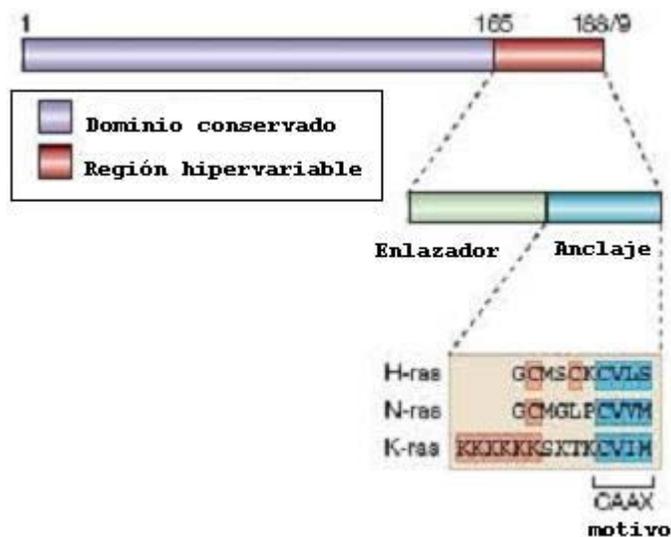


Figura 2. **Esquema de los dominios de las proteínas Ras.** El dominio catalítico del amino terminal (aminoácidos 1-165) de las proteínas Ras está conservado altamente (90-100% de identidad). La secuencia del extremo carboxilo terminal diverge significativamente y es el dominio hipervariable (HVR). El dominio HVR comprende la secuencia de anclaje muy bien caracterizada que opera como señal de tráfico de Ras (figura modificada de Hancock, J.F., 2003).

Las modificaciones post-traduccionales comienzan en el aminoácido 186, aumentando la hidrofobicidad de la región COOH-terminal de la proteína permitiendo su internalización en la membrana plasmática. La localización en la membrana de la

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

proteína es esencial para su función. Entre las modificaciones post-traduccionales se encuentran la farnesilación del C-186 por el corte de los tres aminoácidos siguientes (AAX), seguido por la metilación del C-186 y finalmente la palmitoilación de los residuos de cisteína en la región 165-186, como se observa en la figura 3 (Macaluso *et al*, 2002). Cinco dominios discontinuos (5-63, 77-92, 109-123, 139-165 y 186-189) son esenciales para la actividad de Ras. Mutaciones puntuales en los codones 12, 13, 59, 61, bloquean la actividad GTPasa, conduciendo a la activación constitutiva y a la proteína oncogénica. Las mutaciones en el codón 186 inactivan a la proteína Ras bloqueando su inserción en la membrana donde están localizados sus reguladores y efectores (Bos, 1989).

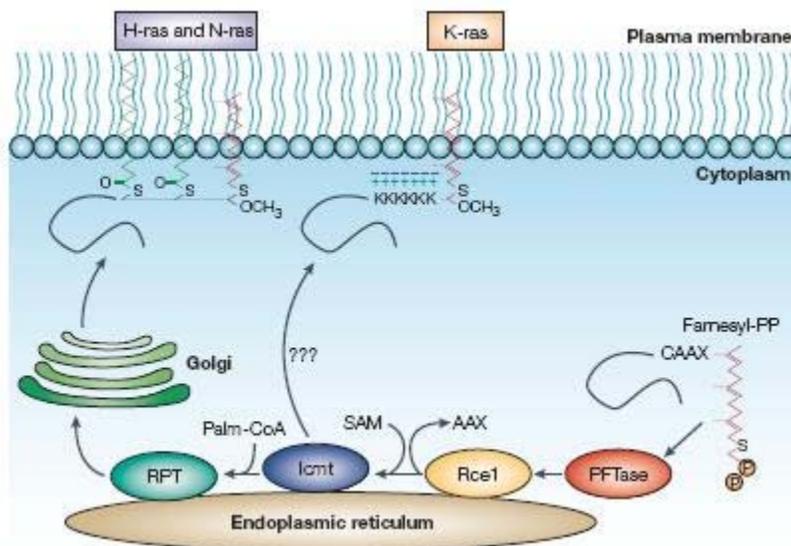


Figura 3. **Procesamiento de la caja CAAX.** El procesamiento de la caja CAAX es secuencial, es iniciada en el citosol por la proteína farnesil transferasa (PFTasa), la cual añade un grupo farnesil (farnesil-PP) al residuo de cisteína de la caja CAAX. El proceso es completado sobre el lado citosólico del retículo endoplasmático (ER) por las enzimas Rce1 (enzima convertidora de Ras) y Icm1 (Isoprenilcisteína carboxil metiltransferasa), la cual remueve el tripéptido AAX y metila con S-adenosilmetionina (SAM), respectivamente (figura tomada de Hancock, J.F., 2003).

La proteína Ras modera respuestas celulares en varios mitógenos y/o factores de diferenciación (por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas, señales de adhesión celular) y en estímulos externos, como irradiaciones de UV, estrés osmótico, entre otros. Estos estímulos activan una serie de vías de transducción de señales que pueden ser independientes o interconectadas en diferentes puntos. Ras es activada después de la interacción de varios factores de crecimiento (por ejemplo EGF, PDGE, etc.) con sus receptores de tirosina cinasas, que interactúan con sus ligandos, se autofosforila en la tirosina (Macaluso *et al*, 2002).

Se han aislado sistemáticamente muchas proteínas G pequeñas por métodos de biología molecular y bioquímicos. Más de 170 proteínas pequeñas han sido identificadas formando una superfamilia, cuyos miembros están clasificados estructuralmente dentro seis familias:

- **Familia Ras:** los miembros de la subfamilia Ras (proteínas Ras) regulan principalmente la expresión génica.
- **Familia Rho:** los miembros de la subfamilia Rho/Rac/cdc42 (proteínas Rho/Rac/cdc42) regulan la reorganización del citoesqueleto y la expresión génica.
- **Familia Rab:** los miembros de la subfamilia Rab (proteínas Rab) regulan el tráfico de vesículas intracelulares.
- **Familia Sar1/Arf:** los miembros de la subfamilia Sar1/Arf (proteínas Sar1/Arf), también regulan el tráfico de vesículas intracelulares.

- **Familia Ran:** los miembros de la subfamilia Ran (proteínas Ran) regulan el transporte nucleocitoplasmático durante las fases G₁, S y G₂ del ciclo celular y la organización de microtúbulos durante la fase M.
- **Familia RGK:** los miembros individuales de esta subfamilia lo comprenden las proteínas Rad, Gem/kir, Rem y Rem2, las cuales han sido implicadas en funciones importantes como la regulación de la actividad de canales de calcio dependientes de voltaje y la remodelación de la forma celular (Takai *et al*, 2001; Ehrhardt *et al*, 2002; Beguin *et al*, 2005).

Rheb (por sus siglas en inglés, Ras Homologue Enriched in Brain), es otra molécula relacionada a las proteínas Ras, fue aislada de la rata por técnicas de clonación diferencial para identificar genes que son inducidos rápidamente en neuronas por actividad sináptica (Yamagata *et al*, 1994).

En el presente trabajo se describe una proteína GTPasa denominada Rheb-like de ratón (*Mus musculus*), que presenta características que la colocan dentro de la familia Rheb, la cual pertenece también a la familia de las proteínas Ras.

II. ANTECEDENTES

2a. Expresión de la proteína Rheb

La familia Rheb se define como una nueva y única familia dentro de la superfamilia de proteínas Ras (Takai *et al*, 2001; Urano *et al*, 2000). *Rheb* fue identificado inicialmente como un gen cuya expresión es incrementada en el cerebro de rata por la actividad sináptica dependiente de NMDA en el modelo de potenciación a largo plazo. La inducción rápida y transitoria del ARNm de *Rheb* fue detectado en células granulares del hipocampo por convulsiones eléctricas y en la actividad sináptica dependiente de NMDA (Yamagata *et al*, 1994). La expresión de *Rheb* fue inducida mediante la administración de suero fetal de bovino al 20% en fibroblastos. Su expresión, también, fue inducida en células PC12 en cultivo después de la administración de factores de crecimiento como EGF o FGF, estos datos sugieren que Rheb es regulado como un gen de expresión inmediata (Yamagata *et al*, 1994). La aplicación de radiación UV incrementa la expresión de *Rheb* en fibroblastos humanos (Kita *et al*, 2000). La expresión de *Rheb* ha sido detectada en distintas áreas del cerebro de rata (corteza cerebral y cuerpo estriado) en el modelo de isquemia cerebral (Kinouchi *et al*, 1999).

2b. Características estructurales de la proteína Rheb

Todas las proteínas Rheb contienen cajas denominadas G1-G5, que son intervalos cortos de secuencias involucradas en el reconocimiento de base y los fosfatos de las guaninas. Se han identificado tres características estructurales claves que definen a la familia Rheb (Urano *et al*, 2000). En primer lugar, un aminoácido de arginina que corresponde a la glicina en la doceava posición de Ras, la cual está conservada en

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

todos los homólogos de Rheb. Segundo, tienen un dominio efector (G2) muy similar, en los cuales 10 de 17 aminoácidos son idénticos, y 4 de los aminoácidos restantes son similares. Tercero, todos terminan con el motivo CAAX (C es cisteína, A es un aminoácido alifático y X, que generalmente es metionina, alanina, serina, glutamina o cisteína) que es requerido para la farnesilación. Se ha demostrado que Rheb es farnesilada en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y en células de mamíferos (Urano *et al*, 2000; Mach *et al*, 2000; Yang *et al*, 2000; Panepinto *et al*, 2002; Yang *et al*, 2001).

La actividad bioquímica para unir nucleótidos de guanina ha sido reportada para Rheb de rata, *S. pombe* y *Drosophila* (Yamagata *et al*, 1994; Patel *et al*, 2003; Tabancay *et al*, 2003). La proteína Rheb de *S. pombe* purificada mostró unirse a GDP con una proporción aproximada de una molécula de GTP por molécula de Rheb. La unión es específica a nucleótidos de guaninas en presencia de un exceso de GDP frío o GTP. Rheb tiene una actividad GTPasa intrínseca que es detectada por la generación de GDP a partir de GTP radioactivo (Tabancay *et al*, 2003).

Yu *et al* (2005) reportaron la estructura tridimensional de Rheb humano en los complejos con GDP, GTP y GppNHp [5'-(β,γ imidato) trifosfato] (ver figura 4), lo cual reveló características estructurales nuevas de Rheb y proporciona bases moleculares para conocer sus distintas propiedades. Ahora se sabe que durante el ciclo GTP/GDP, el interruptor I de Rheb sufre cambios conformacionales; mientras que, el interruptor II mantiene una conformación estable, inusualmente extendida, que difiere significativamente de la conformación α -hélice que existe en otras GTPasas. La única conformación del interruptor II resulta de un desplazamiento de la Gln⁶⁴ (equivalente a la Gln⁶¹ catalítica de Ras), haciéndolo incapaz de participar en la hidrólisis de GTP y de

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

tal manera que se justifica la actividad GTPasa intrínseca baja de Rheb. Este rearrreglo crea un espacio para el acomodamiento de la Arg¹⁵, evitando el contacto con el residuo catalítico, esto explica por que no está involucrado en la hidrólisis de GTP. A diferencia de Ras, el motivo del fosfato de GTP en Rheb es protegido por la Tyr³⁵ conservada del interruptor I que guía al cierre del sitio de unión de GTP, lo cual parece prohibir la inserción de un dedo de arginina potencial de la proteína activadora GTPasa. Con los resultados genéticos, bioquímicos, biológicos y junto con los datos estructurales se propone que Rheb utiliza un nuevo mecanismo de hidrólisis que utiliza la Asn¹⁶⁴³ del dominio de la proteína activadora GTPasa TSC 2 en lugar de la Gln⁶⁴ de Rheb como residuo catalítico.

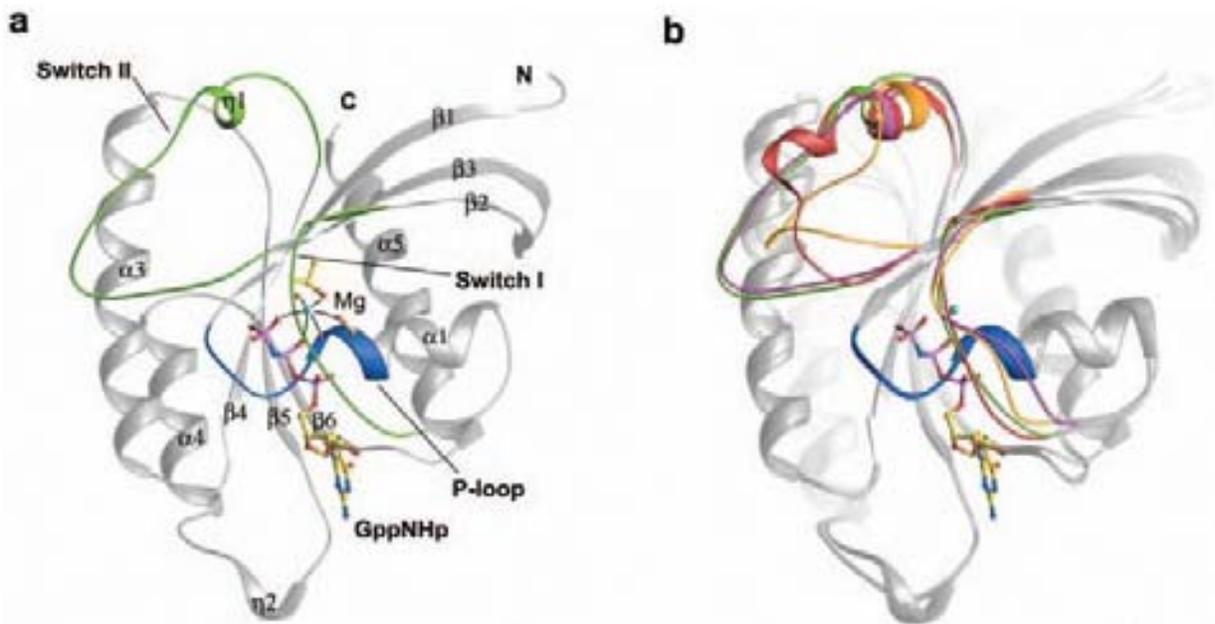


Figura 4. **Modelo de la estructura de RHEB.** *a*: Estructura completa del complejo RHEB-GppNHp. Los elementos de la estructura secundaria de RHEB son llamados igual a los de Ras humano, excepto a la α -hélice2 que es reemplazada por una 3_{10} -hélice corta (η_1). Los interruptores I y II están coloreados en verde y el asa P está en azul. La unión de GppNHp es mostrada como un modelo de bolas y barras, el ión Mg^{2+} como una esfera cian, y las dos moléculas de agua conservadas como esferas rojas. *b*: La comparación de RHEB con otras Ras muestra las diferencias conformacionales en las regiones del interruptor I y II. El complejo RHEB-GppNHp se muestra en verde, el complejo RHEB-GDP en magenta, el complejo Ras-GppNHp en rojo, y el complejo Ras-GDP en oro. El asa P es coloreado en azul. (Figura tomada de Yu *et al*, 2005).

2c. Propiedades funcionales de la proteína Rheb

▪ *Mutantes de Rheb dominantes*

Clark *et al* (1997), Mach *et al* (2000) y Tabancay *et al* (2003) construyeron mutantes para caracterizar las funciones de Rheb, a partir de las mutantes conocidas para Ras que la convierten en su forma activa constitutivamente o mutantes dominantes negativos. Se introdujo una mutación Q61L en Rheb, la cual no generó una proteína Rheb activa constitutivamente (Mach *et al*, 2000; Clark *et al*, 1997; Tabancay *et al*, 2003). Para identificar mutantes dominantes negativos se hizo un rastreo al azar de una biblioteca de mutantes de Rheb generada por mutagénesis con PCR (Tabancay *et al*, 2003). El rastreo se basó en el hallazgo de que la inhibición de la señalización de Rheb conduce al arresto del crecimiento y la inducción del gen *fnx 1* (Mach *et al*, 2000; Tabancay *et al*, 2003). Así, se diseñó una cepa conteniendo como reportero al gen *LacZ* bajo el control del promotor de *fnx 1*. La biblioteca de mutantes SpRheb fue expresada en esta cepa. Múltiples ciclos de rastreos cubrieron 25,000 transformantes que condujeron a la identificación de la mutación D60V. Para ver la potencia del efecto de la dominante negativa se sustituyó D60 por todos los aminoácidos posibles; se identificaron dos mutaciones D60K y D60I. La expresión de estas mutantes en *S. pombe* guiaron a la acumulación de células en la fase G_0/G_1 (Tabancay *et al*, 2003).

Para discernir el mecanismo del efecto del dominante negativo, las proteínas mutantes fueron purificadas y se analizaron sus propiedades bioquímicas. Todas las mutantes dominantes negativas, D60K, D60I y D60V, perdieron la habilidad para unir GTP (Tabancay *et al*, 2003).

▪ *El complejo Tsc1/Tsc2 actúa como una proteína activadora GTPasa de Rheb*

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es una enfermedad autosómica dominante con una prevalencia de 1 en 6000-10 000 nacimientos, y se caracteriza por el desarrollo de hamartomas, las cuales son crecimientos semejantes a tumores encontrados en una variedad de tejidos y órganos. En la década pasada, se desarrollaron progresos considerables en el conocimiento de la genética molecular de TSC con la identificación de los dos genes supresores de tumores *tsc1* y *tsc2* (Complejo de esclerosis tuberosa 1 y 2) (Kwiatkowski, 2003; Sparagana y Roach, 2000; Li *et al*, 2004); mutaciones tanto en *tsc1* como en *tsc2* causan la enfermedad. Los genes *tsc1* y *tsc2* codifican para las proteínas TSC1 (130 Da) y TSC2 (200 Da) también conocidos como hamartina y tuberina, respectivamente, forman un complejo y tienen función conjunta. TSC2 tiene una región de interacción con hamartina en su N-terminal. En el C-terminal, existe un dominio común a las proteínas activadoras GTPasas de Ras. Este dominio es llamado GAP (Van Slegtenhorst *et al*, 1997).

Estudios recientes han establecido que el complejo TSC1/TSC2 funciona como un GAP para Rheb. Esta actividad GAP de TSC2 se probó expresando el complejo TSC1/TSC2 en células HEK293. El complejo TSC1/TSC2 exhibió una estimulación dramática de la actividad GTPasa de Rheb. La actividad GAP parece requerir ambas proteínas TSC1 y TSC2, ya que solo un incremento pequeño de GTPasa fue observado con TSC1 o TSC2, por separado. La actividad GAP requiere la proteína TSC2 completa, tanto la región N-terminal como la C-terminal; ya que contienen un dominio homólogo a las GAP, y co-expresado con TSC1 exhiben actividad GAP. En forma conjunta, se construyeron mutantes R1701Q y R1703Q en TSC2; cuyas mutaciones se han encontrado en pacientes con TSC, donde se destruye la actividad GAP. Estos

resultados confirman que el complejo TSC1/TSC2 exhibe una actividad GAP para Rheb (Inoki *et al*, 2003).

También se ha observado que la proporción de GTP/GDP unido a Rheb en células de mamíferos es inusualmente alta. Esto se demostró por medio de una inmunoprecipitación de Rheb en líneas celulares de mamíferos utilizando un anticuerpo anti-Rheb y examinando la proporción de GTP/GDP. Se encontró que aproximadamente el 25% de Rheb está unido GTP, un porcentaje más alto comparado con las proteínas Ras y Rap. Sin embargo, el aumento de la expresión de Rheb aumentó la proporción de GTP/GDP, esto sugiere que la cantidad de GAP está limitada o que la actividad GAP del complejo TSC1/TSC2 está regulada (Im *et al*, 2002).

- *Rheb juega un papel crítico en la regulación del crecimiento celular y progresión del ciclo celular en S. pombe, Drosophyla melanogaster y células de mamíferos.*

Se inhibió la expresión de Rheb colocando el gene bajo el control del promotor nmt que es represible por la administración de tiamina. Esto promovió una acumulación de células en la fase G₀/G₁ y la inhibición del crecimiento celular (Mach *et al*, 2000; Yang *et al*, 2001). Las células acumuladas son pequeñas y se asemejan a las observadas en la inanición de nitrógeno; en donde, las células son pequeñas, redondas con un contenido de ADN 1N (Mach *et al*, 2000; Yang *et al*, 2001). La expresión de los genes *fnx1* y *mei2* es inducida por la inanición de nitrógeno; la expresión de estos dos genes se probó en una mutante de Rheb hipersensible a niveles de nitrógeno en el medio, dando como resultado un incremento en su expresión, igual al que se observó en la inanición de nitrógeno, cuando la expresión de Rheb fue inhibida, estos resultados sugieren que Rheb es importante en la progresión del ciclo celular (Yang *et al*, 2001).

Un papel similar de Rheb en el crecimiento celular y progresión del ciclo celular se observó inhibiendo la expresión de Rheb en una línea celular cultivada de tejido de *Drosophyla* S2. La expresión de Rheb fue inhibida por el uso de siRNA, donde se observó una acumulación dramática de las células en la fase G₀/G₁. El análisis de citometría de flujo mostró que las células acumuladas tienen un tamaño pequeño. Por otro lado, la sobreexpresión de Rheb en células S2 llevan a un aumento significativo de células en la fase S y un aumento ligero en el tamaño celular (Patel *et al*, 2003).

Se identificaron mutantes de Rheb en *Drosophyla melanogaster* en forma independiente por tres grupos; Patel y colaboradores, en particular, rastrearon colecciones de mutantes de inserciones del elemento P para identificar genes cuya sobreexpresión en el intestino posterior causa una alteración morfológica en este órgano. Esto llevó a la identificación de un alelo que se designó AV4 que tiene un elemento P insertado en la región 5' hacia arriba del gene *Rheb* en *Drosophyla melanogaster*. El uso del conductor GMR-GAL4 habilita la sobreexpresión de Rheb en el disco imaginal desarrollado, el cual resulta en un aumento dramático en el tamaño de la cabeza y ojos en el adulto. La sobreexpresión de Rheb también promueve el crecimiento en las alas y en las glándulas salivares. En el caso de las alas, la sobreexpresión de Rheb aumenta su tamaño celular, contándose el número de células de las alas por medio del conteo del número de vellos (Patel *et al*, 2003). Se han generado clones de moscas que tienen deficiencia en la expresión de Rheb en la cabeza y ojos. Estos clones tienen cabezas y ojos pequeños. Adicionalmente, se encontró que *Rheb* es un gene esencial y las mutantes de *Rheb* homocigotos detienen el crecimiento después de

alcanzar el primer estadio larval (Patel *et al*, 2003; Saucedo *et al*, 2003; Stocker *et al*, 2003).

- *Rheb es un componente de la señalización de insulina/TOR/S6K*

La insulina es la hormona conocida más potente, promueve la síntesis y el almacenaje de carbohidratos, lípidos y proteínas; inhibe la degradación de éstos y posteriormente los libera en la circulación. A nivel celular, la acción de la insulina es caracterizada por diversos efectos: cambios en el tráfico de vesículas, estimula proteínas cinasas y fosfatasas, promueve el crecimiento y diferenciación celular, y la activación o represión de la trascrición (Saltiel y Pessin, 2002), sugiriendo que los efectos individuales de la hormona requiere de señalización múltiple. Por otro lado, TOR (por sus siglas en inglés, target of rapamycin) es un elemento central en la vía de señalización involucrada en el control del crecimiento y proliferación celular en todos los organismos que expresan la proteína, la función de TOR es controlada por la disponibilidad de nutrientes, lo cual asegura la síntesis de la proteína que es reprimida cuando los precursores de los aminoácidos son insuficientes. En organismos simples, la disponibilidad de nutrientes parecer ser el factor principal para la actividad de TOR. En metazoos, TOR integra señales que se originan de los precursores de aminoácidos, de la energía celular, y de los receptores de varias hormonas y factores de crecimiento (Harris y Lawrence Jr., 2003). Por lo que Patel y colaboradores, consideraron la posibilidad de que *dRheb* (homólogo de Rheb en *Drosophila melanogaster*) debe de tocar la vía de señalización de insulina y TOR, encontraron que mutantes de Rheb heterocigotos exhiben hipersensibilidad a rapamicina, un inhibidor de TOR; donde el tiempo de eclosión se retrasó en la mutante Rheb comparado con el tipo silvestre por la administración de rapamicina (Patel *et al*, 2003). El crecimiento y el fenotipo del ciclo

celular al sobreexpresarse Rheb es similar a los causados por la hiperactivación de la señalización de insulina/fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI(3)K); por lo que probaron el lípido PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromome ten) que antagoniza la función cinasa de (PI(3)K) y suprime el crecimiento cuando es sobreexpresada. La coexpresión de Rheb suprimió la inhibición de crecimiento mediado por *PTEN* en el ojo adulto. De forma similar, la expresión de Rheb suprimió la inhibición de crecimiento observado cuando *TSC1* y *TSC2* se sobreexpresaron (Saucedo *et al*, 2003; Stocker *et al*, 2003). Moscas homocigóticas para un alelo nulo de *TSC1*, no sobrevivieron más allá del segundo estadio larvar. La letalidad de moscas nulas para *TSC1* fue rescatada parcialmente cuando Rheb es heterocigoto (Zhang *et al*, 2003). La habilidad de Rheb para inducir crecimiento celular se probó en ausencia de TOR. La pérdida de TOR causó una reducción marcada en el tamaño celular y un aumento en la población de células en G₁. El efecto de la sobreexpresión de Rheb fue atenuado parcialmente por una mutación en S6K. La reducción de la actividad de S6K se observó, en extractos de larvas de mutantes de Rheb, mientras que la expresión de Rheb resultó en un aumento en la actividad de S6K (Saucedo *et al*, 2003; Stocker *et al*, 2003).

En células de mamíferos también se ha investigado la participación de Rheb en la vía de señalización insulina/TOR/S6K. La transfección transitoria de Rheb1 o Rheb2 en células HEK293 resultó en un incremento de la fosforilación de S6K (Tabancay *et al* 2003; Tee *et al*, 2003; Inoki *et al*, 2003; Castro *et al*, 2003, Garami *et al*, 2003). Se investigó la señalización mediada por PI3K, se coexpresó Rheb y Akt, un blanco corriente abajo de PI3k, en células HEK293E y se hizo un ensayo de actividad cinasa,

donde Rheb no estimuló la fosforilación de Akt. La sobreexpresión de Rheb quizás promueve la señalización de mTOR a través de una vía de señalización regulada por nutrientes, por lo que se investigó, si Rheb promueve la activación de S6K1 en ausencia de aminoácidos. El incremento de la actividad de S6K por la expresión transitoria de Rheb fue inhibida por la adición de rapamicina, pero no por la adición de wortmannin, un inhibidor de P13K (Patel *et al*, 2003; Saucedo *et al*, 2003; Stocker *et al*, 2003).

- *Importancia de Rheb en enfermedades genéticas y cáncer*

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es un síndrome del gen supresor de tumor con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, muchos de los cuales, están relacionados a la edad. Frecuentemente se manifiestan a edad temprana con ataques epilépticos infantiles y túbulos corticales cerebrales, y algunos pacientes presentan retraso mental y autismo. Otras lesiones en el cerebro incluyen nódulos subependimarios, astrocitomas de células gigantes subependimarias (SEGAs) y hamartomas retinianos. Algunos pacientes frecuentemente desarrollan lesiones en la piel, incluyendo angiofibromas faciales, máculas hipomelánicas, fibromas ungueales y parches lijosos. En el riñón se desarrollan frecuentemente angiomiolipomas benignos y quistes; las angiomiolipomas malignas y carcinomas renales son menos comunes. Las lesiones cerebrales y renales causan la más alta morbilidad y mortalidad entre pacientes con TSC (Astrinidis y Henske, 2005).

El conocimiento de que Rheb sirve como blanco de la actividad GAP de TSC1/TSC2 puntualiza la importancia de Rheb en la patogénesis de esta enfermedad genética; esto se encuentra soportado por la activación constitutiva de S6K que es

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

detectado en MEFs (células de fibroblastos embrionarios de ratón) nulas de TSC (kwiatkowski *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003).

La identificación de Rheb y TOR como blancos hacia abajo del complejo TSC1/TSC2, no sólo proporciona la comprensión dentro de los mecanismos moleculares de estos supresores de tumores, sino que también sugiere drogas nuevas para la intervención terapéutica para el síndrome de TSC. Como blanco directo del complejo TSC1/TSC2, Rheb proporcionaría una droga más específica contra TSC. Esta posibilidad es atractiva ya que Rheb requiere farnesilación para su localización y actividad.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", sitio en el que se realizó el presente trabajo de tesis de licenciatura, se desarrolló un proyecto de investigación orientado hacia la identificación, aislamiento y caracterización molecular del precursor o precursores de las endomorfina (EMs), así como también de nuevas moléculas neuroactivas, basado en tecnologías inmunomoleculares de identificación y clonación de ARN mensajeros. La endomorfina 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, EM-1) y endomorfina 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, EM-2) son dos péptidos aislados del cerebro de bovino (Zadina *et al*, 1997) y posteriormente del cerebro de humano, tienen la más alta afinidad y selectividad de reconocimiento por el receptor opioide μ (MOP-R) (Zadina *et al*, 1997). EM-1 y EM-2 tienen una potente actividad antinoceptiva en una variedad de modelos animales de dolor agudo, neuropático y alodínico. Estudios en ratones han mostrado que la administración intracerebroventricular de EM-1 y EM-2, producen una potente antinocicepción con similar potencia a la morfina (Coventry *et al*, 2001; Yamaguchi *et al*, 1998).

Para desarrollar el objetivo general del proyecto sobre la identificación del precursor o precursores de las EMs se requirió generar previamente dos anticuerpos policlonales de conejo con alta especificidad y selectividad de reconocimiento inmunológico por las secuencias sintéticas de las EMs, denominados C-14 y C-16. Se desarrollaron ensayos para evaluar y validar su especificidad inmunológica, y su capacidad para identificar material inmunoreactivo a las EMs en material proteico de alta masa molecular.

Sin embargo, durante el estudio del rastreo inmunológico dirigido a la identificación y clonación del precursor o precursores de las EMs anteriormente mencionadas, se identificó de manera inesperada un clon de ADNc como un falso inmunopositivo. El análisis inicial de la homología estructural de la secuencia nucleotídica de este ADNc arrojó como resultado una identidad con ARNm's de la familia de Ras-Homolog Enriched in Brain (RHEB) del organismo *Mus musculus* (ratón). De acuerdo a este marco del hallazgo experimental inesperado, fue necesario replantear y dirigir estudios iniciales de homología estructural para identificar secuencias consenso dentro de esta secuencia, las cuáles, al estar presentes en proteínas ya caracterizadas podríamos sugerir funciones biológicas de nuestra secuencia de ADNc que transcribe para un ARNm.

IV. OBJETIVO GENERAL:

→ El objetivo de este trabajo es analizar *in silico* la estructura primaria del ADNc clonado en nuestro laboratorio, así como su expresión en el Sistema Nervioso Central del roedor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

→ Aislar y amplificar el clon que contiene el inserto de ADNc.

→ Caracterizar la longitud molecular del ADNc clonado mediante un análisis electroforético en geles de agarosa.

→ Caracterizar molecularmente la estructura primaria de nucleótidos del ADNc clonado mediante la metodología de secuenciación nucleotídica automatizada por electroforesis capilar.

→ Determinar la homología e identidad estructural *in silico* de la secuencia nucleotídica y proteica que codifica para el ADNc por medio de análisis comparativos estructurales en el programa Blast Nucleotide y Blast Protein en la base de datos del GenBank.

→ Caracterizar la expresión anatómica del ARNm de Rheb-like en el Sistema Nervioso Central del roedor mediante estudios de RT-PCR.

→ Identificar áreas neurales candidatas en el Sistema Nervioso Central del roedor que expresen el gen de Rheb-like en condiciones fisiológicas “basales” para iniciar estudios de caracterización funcional de la proteína Rheb-like.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

- Determinar si la expresión neural de este ARNm es regulada por la inducción de estímulos específicos en el Sistema Nervioso Central del ratón.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Rastreo inmunológico a partir de un banco de expresión ADNc del cerebro total de ratón adulto

Se empleó una biblioteca de expresión de ADNc de cerebro total de ratón adulto (*Mus musculus*) de Strategene, Cat. 937319, el cual tiene un porcentaje alto (arriba del 80%) de los ADNc clonados orientacionalmente, con un tamaño promedio de 1.8 pb en el sistema plasmídico pBlueScript SK (+/-) subclonado a su vez, en el sistema del vector del fago lambda Uni-ZAP XR. El vector Uni-ZAP XR puede ser rastreado con sondas de ADN o de anticuerpos y permite la excisión *in vivo* del fagemido pBluescript® permitiendo que el inserto sea caracterizado en un sistema plasmídico. El sitio múltiple de clonación (MCS) del fagemido está flanqueado por los promotores T3 y T7 y una selección de 6 sitios iniciadores diferentes para la secuenciación de ADN, como se observa en la figura 6.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

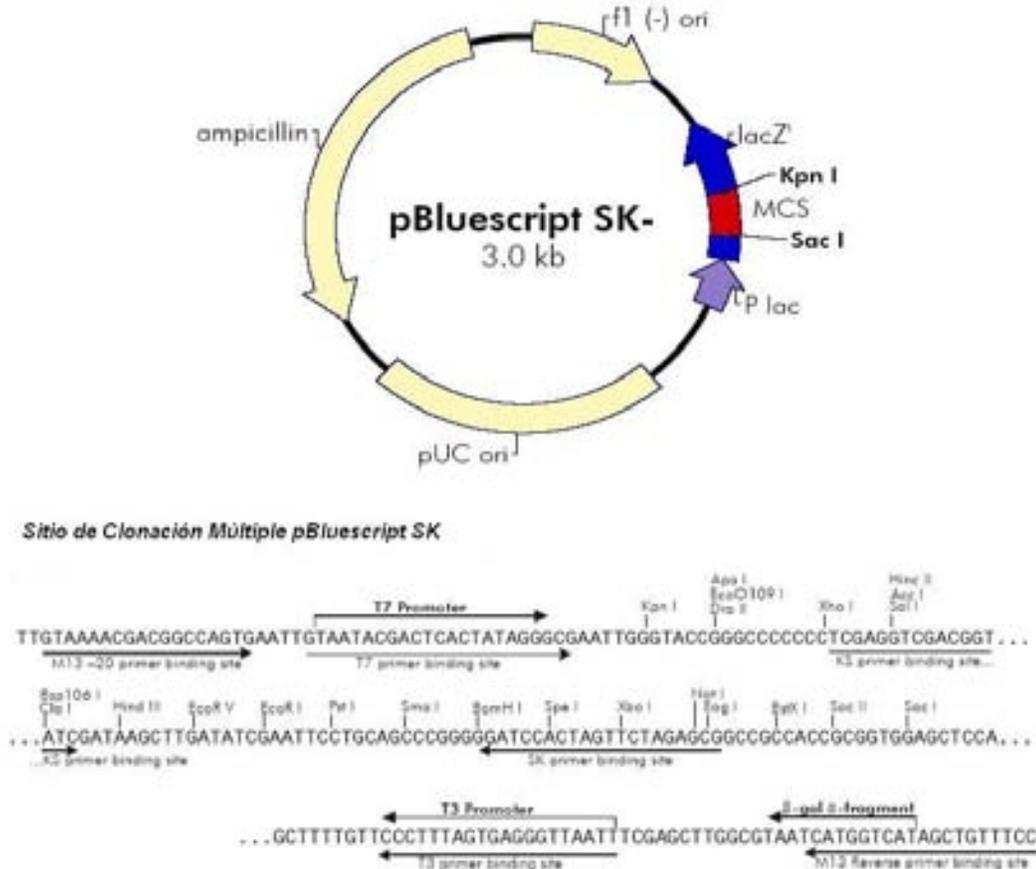


Figura 5. Mapa del vector pBluescript® SK-. El mapa del vector pBluescript muestra los sitios de replicación f1 y pUC; así como el gen de resistencia a ampicilina. En la parte de abajo se muestra el sitio de clonación múltiple (MCS) que se encuentra flanqueado por los sitios promotores T3 y T7, la secuencia del ADNc está insertada con el marco de lectura en forma correcta cerca del sitio del promotor *lac* de bacteria para encontrar de forma inmediata marcos de lectura abiertos de traducción correctos, la secuencia mostrada abarca los nucleótidos 601 al 826.

1. Recuperación de bacterias a partir del respaldo y crecimiento de bacterias para propagar el fago

Las bacterias hospederas fueron recuperadas a partir de un respaldo en glicerol a -70°C . Se recuperaron las bacterias XL1-Blue MRF' tomando un raspado del respaldo con una asa estéril. Este raspado se inoculó en una caja Petri con medio LB y tetraciclina (5 mg/ml). Se incubó toda la noche a 37°C .

Para amplificar el fago se inoculó una sola colonia del cultivo fresco anterior en 50 ml de medio LB suplementado con 0.2% (p/v) de maltosa y MgSO_4 10 mM, se dejó

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

crecer toda la noche a 30°C con agitación vigorosa. El cultivo se centrifugo a 4000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente en 10 ml de MgSO₄ 10 mM.

2. Titulación del Fago de ayuda (Helper)

Se transfirió una colonia de XL1-Blue MRF' a medio LB en un tubo cónico de 50 ml. Se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar un crecimiento de OD₆₀₀ de 1.0. Posteriormente se diluyó el fago ExAssist[®] de interferencia-resistencia (diluciones 1:10 - 1:10 000) en una solución amortiguadora SM [100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ · 7H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)] y se mezcló con 1 µl de cada dilución en 200 µl del cultivo anterior (XL1-Blue MRF' a OD₆₀₀ de 1.0). Se incubó el fago de ayuda y la cepa XL1-Blue MRF' por 15 minutos a 37°C para que se llevara a cabo la infección. Se adicionaron 3 ml de agar suave NZY (NaCl 5g, MgSO₄ 2g, extracto de levadura 5g, NZ amina 10g) y se vertió inmediatamente en las cajas Petri con agar NZY. Se invirtieron las cajas y se incubaron durante toda la noche a 37°C. De la dilución 1:1000, se obtuvieron 939 placas líticas.

Para determinar el título [en unidades formadoras de placas líticas por caja por mililitro (pfu/ml)] se usó la siguiente fórmula, con el resultado de la dilución 1:1000.

$$\left[\frac{\text{Número de placas (pfu)} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrado}} \right] \times 1000 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$$

Donde el volumen sembrado (en microlitros) se refiere al volumen del fago de ayuda adicionada a las bacterias.

Sustituyendo:

$$\left[\frac{939 \times 1000}{1 \mu l} \right] \times \frac{1000 \mu l}{ml} = 0.939 \times 10^9 \frac{\mu l}{ml}$$

3. Titulación de la biblioteca

Se propagó la cepa XL1-Blue MRF' en una caja Petri con medio LB y tetraciclina frescos. Se incubó durante toda la noche a 37°C. A partir de una sola colonia hospedadora XL1-Blue MRF' del cultivo anterior se inoculó 50 ml de medio LB en un matraz estéril. Se incubó con agitación a 37°C por 6 horas. El cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente la pastilla formada en 10 ml de MgSO₄ 10 mM estéril. Posteriormente se diluyeron las bacterias XL1-Blue MRF' a una OD₆₀₀ de 0.5 con MgSO₄ 10 mM estéril.

Para determinar el título de la biblioteca se mezclaron los siguientes componentes: 1 μl de las diluciones de la biblioteca (1:10 000, 1:100 000 y 1:1000 000), 200 μl de bacterias XL1-Blue MRF' a una OD₆₀₀ de 0.5. Se incubó la mezcla a 37°C por 15 minutos para que se llevara a cabo la infección. Para observar la formación de placas líticas, se adicionaron los siguientes componentes: 3 ml de agar suave NZY (fundido y enfriado a ~48°C), 15 μl de IPTG 0.5M (en agua) y 50 μl de X-gal [250 mg/ml en DMF). La mezcla se vertió sobre cajas de Petri con agar NZY, se dejó solidificar por 10 minutos, las placas invertidas se incubaron a 37°C por 6-8 horas o hasta la aparición de placas líticas visibles. Se contaron las placas líticas.

4. Recuperación de placas líticas

Se combinó el equivalente de 5×10^4 pfu/placa y 600 μ l de cultivo fresco de bacterias XL1-Blue MRF' a una OD₆₀₀ de 0.5. Se incubó a 37°C por 15 minutos para que se llevara a cabo la infección. Posteriormente se adicionó 6.5 ml de agar suave NZY (a ~48°C) a la mezcla de bacterias y fago. Se sembró el cultivo en una caja Petri con agar NZY. Dando una agitación suave a la caja para que las bacterias se distribuyeran homogéneamente. Se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C por 8 horas.

Posteriormente se enfriaron las placas a 4°C por 2 horas para evitar que el agar suave se pegara a la membrana de nitrocelulosa para el siguiente paso.

Se colocó una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® Transfer Médium 0.2 μ m, BIORAD Cat. 162-0150) dentro de cada caja de agar NZY por 2 minutos para transferir las partículas del fago a la membrana.

Se desnaturalizó el ADN unido a la membrana sumergiéndola en una solución de NaCl 1.5 M y una solución de desnaturalización NaOH 0.5 M por 2 minutos. Se neutralizó la membrana de nitrocelulosa sumergiéndola en una solución NaCl 1.5 M y una solución de neutralización Tris-HCl 0.5 mM (pH 8.0.) por 5 minutos. Se lavó la membrana de nitrocelulosa sumergiéndola en una solución Tris-HCl 0.2 M (pH 7.5) y una solución amortiguadora 2 \times SSC (175 g de NaCl, 88. g de citrato de sodio a pH 7.0) por 30 segundos. Se secó brevemente a la membrana con papel filtro. Se almacenaron las cajas con los cultivos originales de la transferencia a 4°C para su rastreo posterior.

5. Rastreo inmunológico

Se colocó una membrana de nitrocelulosa tratada y numerada (ver 5.1) sobre una caja con cultivo bacteriano para permitir la transferencia del material proteico bacteriano, incubando por 3.5 horas a 37°C. Se marcó la orientación de las membranas de nitrocelulosa haciendo un orificio con una aguja en varios sitios. Después del tiempo de incubación se retiraron las membranas para llevar a cabo el rastreo inmunológico. Se colocó una segunda membrana de nitrocelulosa húmeda y marcada previamente en la caja con LB-agar, para llevar a cabo un duplicado.

Las membranas con el material proteico bacteriano se expusieron a una atmósfera de cloroformo saturada por 10 minutos. Se transfirieron las membranas en papel filtro para secar el resto de humedad de cloroformo.

Se sumergieron las membranas de nitrocelulosa en una solución amortiguadora de lisozima y se incubaron a temperatura ambiente con agitación moderada por 1 hora.

Se removió los restos de bacterias frotando suavemente la membrana sumergida en la solución de lisozima.

Se lavaron las membranas dos veces cada 10 minutos en TBST [Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, Tween 20 0.05% (v/v)]. Se sumergieron las membranas en una solución bloqueadora de TBS con 1% de albúmina sérica bovina y se incubaron a temperatura ambiente con agitación moderada por 1 hora.

Las membranas se incubaron por dos horas en una solución de TBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM) con los anticuerpos C-14 contra EM-1 y C-16 contra EM-2 (1:20 en TBST), cada uno por separado y por duplicado. Se lavaron las membranas cinco veces cada 5 minutos en 8 ml/membrana de TBST para remover residuos de los

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

anticuerpos. Se transfirieron las membranas en 8 ml/membrana de solución TBST conteniendo el anticuerpo anti-IgG (Amersham) de conejo marcado radiactivamente con I^{125} (1:250) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación moderada por 2 horas. Se lavaron las membranas cinco veces cada 5 minutos en 8 ml/membrana de TBST para remover residuos del anti-IgG marcado con I^{125} . Se removió el resto de Tween 20 dando un lavado final en 8 ml/membrana de TBS. El revelado de las membranas se realizó exponiéndolas a películas X-O-MAT (Kodak) por 7 días y revelado con D-19 Developer (Kodak). La evidencia de material inmunoreactivo a las endomorfinas se localizó por la presencia de puntos oscuros.

6. Recuperación de material inmunoreactivo

La recuperación de material inmunoreactivo se llevó a cabo a través de la confrontación de la membrana de nitrocelulosa con su correspondiente caja de cultivo original, extrayendo el cultivo bacteriano con una pipeta pasteur. Posteriormente, se disolvió en 1 ml de SM, $MgSO_4$ 10 mM con 1000 μ l de cloroformo y se guardó a 4°C.

7. Amplificación del material inmunopositivo

Se inoculó una colonia bacteriana de la cepa XL1-Blue MRF' en 50 ml de medio LB a 30°C con agitación durante toda la noche. Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla formada en 25 ml de $MgSO_4$ 10 mM midiéndose la OD_{600} de esta suspensión de bacterias y posteriormente se diluyó a una OD_{600} de 0.5 en $MgSO_4$ 10 mM. Se combinaron diluciones de 1:5 de la suspensión del fago que originó una placa inmunopositiva con 600 μ l de la suspensión de bacterias XL1-Blue MRF' a una OD_{600} de 0.5 en tubos de

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

polipropileno Falcon® 2059. Se incubaron los tubos por 15 minutos a 37°C para que se llevara a cabo la infección. Posteriormente, se mezcló 6.5 ml de agar suave NZY con cada una de las soluciones de bacterias infectadas y se expandió uniformemente dentro de cajas Petri con agar NZY fresco. Se invirtieron las cajas y se incubaron a 37°C por 8 horas. Por último se cubrieron las cajas con 8 ml de solución amortiguadora SM. Se almacenaron las cajas a 4°C durante toda la noche para que el fago se esparciera en la solución amortiguadora SM.

Se recuperó la suspensión del bacteriofago de cada caja y se juntaron en un tubo de polipropileno estéril. Se lavaron las cajas con 2 ml adicionales de solución amortiguadora SM y se juntaron todos los lavados. Se adicionó cloroformo a una concentración final de 5% (v/v). Se mezcló y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se removió el resto de bacterias por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos, recuperándose el sobrenadante y se transfirió a un tubo de polipropileno estéril y se adicionó cloroformo a una concentración final de 0.3% (v/v) y se almacenó a 4°C.

8. Escisión *in vivo*

El siguiente procedimiento se hizo para separar el plásmido pBluescript del vector Uni-ZAP XR.

Se tomó una alícuota de la disolución del fago obtenido en el procedimiento anterior (punto 7) para transformar una disolución de bacterias *E. coli* de la cepa SOLR, a una OD₆₀₀ de 1.0 en MgSO₄ 10 mM, por el método que describe a continuación:

En un tubo de polipropileno se mezclaron 200 µl de la suspensión de bacterias XL1-Blue MRF' a una OD₆₀₀ de 1.0, 250 µl de la solución de fago y 1 µl del fago de ayuda

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

ExAssist (fago helper). La mezcla se incubó a 37°C por 15 minutos para que el fago infectara a las bacterias. Se adicionó 3 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación por 3 horas. Posteriormente se calentó el tubo a 65°C por 20 minutos para la lisis de las bacterias. Se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Se decantó el sobrenadante dentro un tubo de polipropileno estéril. Este sobrenadante contiene el plásmido pBluescript que se guardó a 4°C para su empleo posterior.

9. Transformación de células competentes

Para amplificar el plásmido pBluescript con los insertos de ADNc se utilizó bacterias *E. coli* de la cepa SOLR, la cual se propagó en una caja Petri con medio LB fresco se incubó toda la noche a 37°C. A partir de ≈ 10 colonias del cultivo anterior se inoculó 50 ml de medio LB y se dejó crecer hasta alcanzar una OD. de 1.0 a 600 nm. El cultivo se dejó 10 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron las células por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 5 ml de CaCl₂ 0.1 M frío. Las células se mantuvieron en hielo por 30 minutos y nuevamente se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Las células de resuspendieron en 2.0 ml de CaCl₂. Se alicuotaron 200 μ l en tubos de 2.0 ml. Se añadieron ≈ 50 ng del ADN plasmídico pBluescript de interés, se incubó en hielo por 30 minutos y después se sometieron a un choque térmico a 42°C por 90 segundos inmediatamente se transfirieron en hielo por 2 minutos. Posteriormente se añadió a cada tubo 800 μ l de medio LB en condiciones de esterilidad y se incubó a 37°C por 45 minutos. Se plaquearon 200 μ l de la mezcla de transformación en cajas Petri con medio LB-amp y se mantuvieron en incubación a 37°C hasta obtener colonias transformantes (modificado de Sambrook *et al*, 2002)

B. Purificación del plásmido

El plásmido pBluescript fue extraído de las bacterias por el método de lisis alcalina descrito por Birnboim-Doly (1979), seguido por la separación del ADN plasmídico mediante su unión a una columna de resina de intercambio iónico QIAGEN [QIAGEN Plasmid Mini Kit (100), Cat.12125]. Una noche antes las bacterias transformadas se sembraron en 5 ml de medio líquido LB-amp. Las bacterias se recuperaron por centrifugación durante 4 minutos a 4,000 rpm y se siguió el protocolo de acuerdo al proveedor.

C. Análisis de restricción enzimática

Para conocer el tamaño del inserto del ADNc en el plásmido se realizó un análisis de restricción utilizando las enzimas *Xho I* y *Xba I* proporcionados por Gibco BRL (Cat. 15231-012 y Cat.15226-012, respectivamente), las restricciones se llevaron a cabo a 37°C durante 3 horas en un volumen total de 20 µl cada una, se empleó el amortiguador REACT 2, cat. Y92500 [50 mM de Tris-Hcl (pH 8.0), 10 mM de MgCl₂, y 50 mM de NaCl]. Los productos de las reacciones se analizaron separando los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa (Gibco BRL®) al 1% visualizados en un analizador de imágenes Image Station (Kodak 440-CF).

Todas las electroforesis se llevaron a cabo en la solución amortiguadora TAE 1X (Tris-acetato) en geles de agarosa al 1% se tiñieron con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se corrió a 90V por 1 hora y se cargó en cada pozo 15 µl totales y 10 µl de marcador de peso molecular (1 kb Invitrogen, Cat. 10381-010) como se muestra en la tabla 1.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 1. Volumen de carga de la muestra de restricción enzimática en el gel de agarosa para la electroforesis

	Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6
	Plásmido sin cortar	MW	Plásmido con Xho I	Plásmido con Xba I	MW	Plásmido con Xho I/Xba I
ADN	2.0 µl	3.0 µl	10 µl	10 µl	3.0 µl	10 µl
SB5X: Sol. de carga de la muestra	3.0 µl	2.0 µl	3.0 µl	3.0 µl	2.0 µl	3.0 µl
Agua milliQ	10.0 µl	5.0 µl	2.0 µl	2.0 µl	5.0 µl	2.0 µl
Volumen total	15.0 µl	10.0 µl	15.0 µl	15.0 µl	10.0 µl	15.0 µl

D. AMPLIFICACIÓN POR PCR

Con el objetivo de comprobar que el ADNc clonado contiene un solo inserto se llevó a cabo una amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimera) empleando como oligonucleótidos iniciadores secuencias complementarias a los sitios promotores consenso de la ARN polimerasa el iniciador “forward” T3 (5'-TAACCCTCACTAAAGGGA-3') (Gibco BRL, Cat. 18417-014) (Promoter Sequencing Primer, Gibco BRL®, 5 µg/ml. Cat. 18417-014) y el iniciador “reverse” T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (Promotor Sequencing Primer, Gibco BRL®, Cat. 18416-016) del vector, en un termociclador MastercyclerGradient (Eppendorf). Para la reacción de amplificación se usaron las concentraciones señaladas en la tabla 2, el kit utilizado para la PCR fue de Promega, Cat. M8291.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 2. Concentraciones en el tubo de reacción de PCR.

REACCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD
H ₂ O milli Q	-----	8.6 µl
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM	1.2 µl
Buffer PCR 5X GoTaq Flexi	1X	4.0 µl
dNTP's Mix 2.5 mM New England BioLabs, Cat. N0446S	0.25 mM	2.0 µl
Primer T7 (5µg/ml)	1 µM	1.0 µl
Primer T3 (5µg/ml)	1 µM	1.0 µl
GoTaq 5 U/µl	1.0 U	0.2 µl
DNA plasmídico	100 ng	2.0 µl
Vol. total	20.0 µl	20.0 µl

Las condiciones de amplificación se estandarizaron de acuerdo a la temperatura de alineamiento de los iniciadores, el programa que se utilizó se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Programa de amplificación.

	Temperatura °C	Tiempo	No. ciclos
Primer ciclo	96	1 minuto	1
Desnaturalización	96	30 segundos	
Alineamiento	49	30 segundos	25
Extensión	65	5 minutos	
Último ciclo	72	7 minutos	1

Se cargo en cada pozo 10 µl totales como se señala en la tabla 4.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 4. Volumen de la carga de la muestra del producto de PCR en el gel de agarosa.

	Pozo 1	Pozo 2
	MW (1 kb DNA Ladder)	Producto de PCR
ADN	3.0 μ l	4.0 μ l
SB5X	2.0 μ l	2.0 μ l
Agua milliQ	5.0 μ l	4.0 μ l
Volumen total	10.0 μ l	10.0 μ l

E. Secuenciación de ADN por el método de incorporación terminal de nucleótidos marcados con fluorescencia

Con el objetivo central de conocer la secuencia de nucleótidos del inserto de ADN clonado se llevó a cabo un análisis de secuenciación.

En la secuenciación automatizada se corre una sola reacción con los cuatro didesoxinucleósido trifosfato que contienen un marcador fluorescente diferente. Cuando se excitan por un láser de argón, cada uno de los marcadores fluorescentes emite una luz en una longitud de onda diferente. La luz resultante emitida es detectada por un fotomultiplicador; la cual es almacenada en una computadora que colecta y analiza los datos, como se muestra en la figura 7 (Williams *et al*, 2001). Los secuenciadores automáticos están divididos en dos grupos: en el primer grupo se encuentran los que usan geles de poliacrilamida convencional para separar los productos de secuenciación y en el segundo grupo los que usan el sistema de capilaridad, desarrollado recientemente. En los secuenciadores de sistemas basados en gel de poliacrilamida, similar al utilizado en la secuenciación manual, separan los fragmentos de ADN marcado con fluorescencia por electroforesis a través de su desnaturalización en el gel de poliacrilamida. La longitud de los geles varían de 12 a 60 cm aproximadamente y el

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

número de bases secuenciado está en función de la longitud del gel y el tiempo empleado en la electroforesis (Grahm, 2001). Los secuenciadores basados en el sistema de capilaridad utilizan un arreglo o un solo capilar llenados con poliacrilamida o polímeros desarrollados especialmente, donde se lleva a cabo la electroforesis. Este último método se empleó en este trabajo, como se describe a continuación.

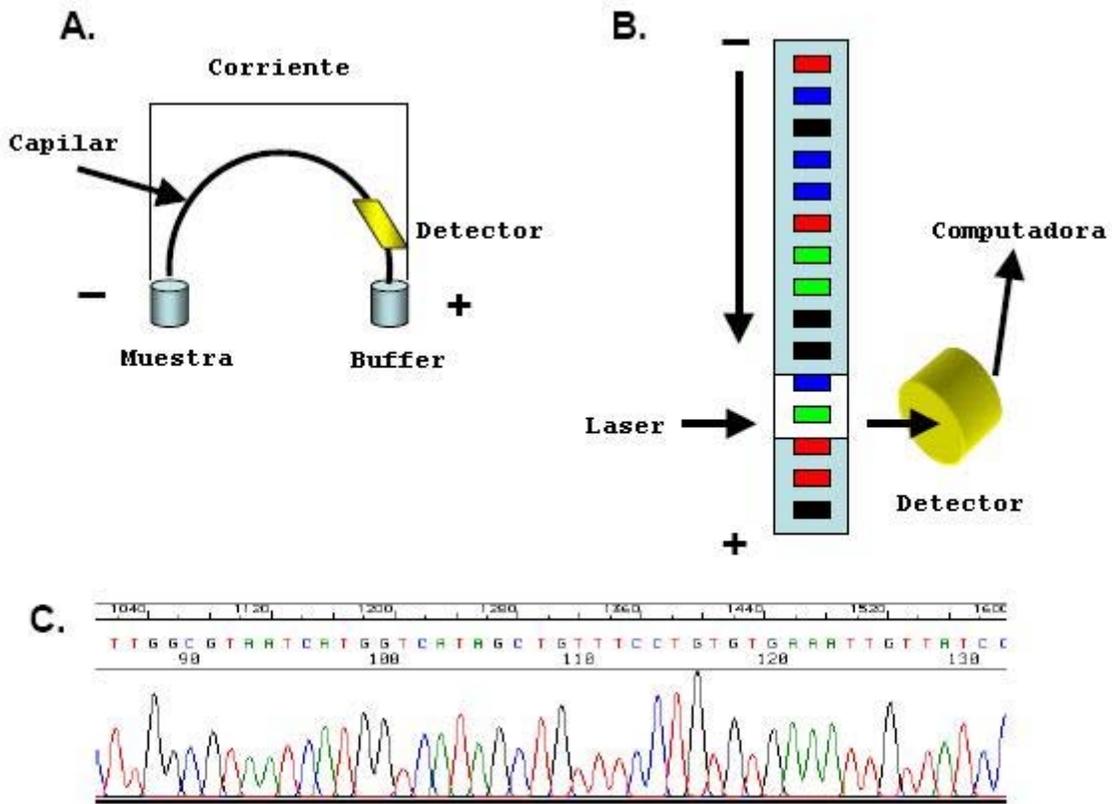


Figura 6. **Representación esquemática de un sistema de secuenciación de ADN basada en capilar.** **A)** Se ejecuta una sola reacción de secuenciación con los cuatro didesoxinucleósidos terminadores de cadena y el primer (iniciador o cebador). Los productos son mezclados y sujetos a electroforesis en capilar. La reacción de secuenciación es colocada en el recipiente de la muestra y el amortiguador de electroforesis es colocado en el segundo recipiente, el capilar es llenado con el polímero, y la corriente es aplicada a través del capilar. **B)** Las cadenas de ADN migran a través del capilar, cuando los fragmentos de ADN pasan por el láser se excitan. La luz emitida es detectada por un fotomultiplicador, el cual se encuentra conectado a una computadora que colecta y analiza los datos. **C)** Se muestra un ejemplo de una secuencia obtenida por el método automático de secuenciación, cada pico coloreado representa un nucleótido en la secuencia de ADN.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

En el estudio inicial de secuenciación de ambas cadenas de ADN del inserto, se utilizaron 500 ng de ADN plasmídico, los oligonucleótidos iniciadores T3 “forwad” y T7 “reverse” (Gibco BRL®) complementarios que flanquean al inserto de ADNc en el vector. Para los estudios subsiguientes de secuenciación se emplearon oligonucleótidos internos diseñados a partir de la secuencia parcial del ARNm obtenida en la secuenciación inicial con el objetivo de ampliar la región del marco de lectura abierta (ORF), así como también las regiones no traducidas 5’ y 3’ (UTR). En la tabla 5 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron utilizando el programa Vector NTI v5.0, que permite comprobar la ausencia de formación de dímeros y horquillas, así como la obtención de la temperatura óptima de alineamiento (Tm) y el porcentaje de pirimidinas (G+C).

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores complementarios que flanquean al inserto y los internos del ADNc clonado a partir de la secuencia parcial obtenida.

OLIGO	SECUENCIA
T3	5'-TAACCCTCAATAAAGGGA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
22A2(1)1	5'-AAC CAG GAA CCA TGT TAG AT- 3'
22A2(1)2	5' ACT TGT AAA TAA AAT AGC TGC A- 3'

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Para la reacción de marcado de los fragmentos de PCR se utilizó el kit ABI PRISM® BigDye™ (Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Versión 2.0). El protocolo a seguir fue el recomendado por el fabricante y se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Protocolo de marcaje de los productos de PCR. En cada caso se utiliza de iniciador T3 o T7 para un volumen total de 20 μ l.

REACCIÓN		CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD
Terminator Reaction Mix	Ready	8.0 μ l	8.0 μ l
DNA plasmídico		200-500 ng	3.5 μ l
Primer T3 (5 μ g/ml)		3.2 pmol	4.0 μ l
Primer T7 (5 μ g/ml)		3.2 pmol	4.0 μ l
H ₂ O milli Q		*****	4.5 μ l
Vol. total		20.0 μ l	20.0 μ l

El marcado de los fragmentos se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

Tabla 7. Programa de marcaje de los productos de PCR.

	Temperatura °C	Tiempo	No. ciclos
Primer ciclo	95	5 minutos	1
Desnaturalización	95	10 segundos	
Alineamiento	50	5 segundos	25
Extensión	60	4 minutos	
Último ciclo	60	7 minutos	1

Una vez finalizada la reacción las muestras se purificaron en columnas de gel para purificar ADN (CENTRI-SEP Spin Columns, Princeton separations, Cat. CS-901).

Las columnas se hidrataron previamente por 2 horas con agua milliQ, drenándose por gravedad (~300 µl) y el exceso de agua es removido por centrifugación. La reacción total de marcado es aplicada en la columna y recuperada por centrifugación a 2.800 rpm durante 2 minutos. La muestra recuperada fue secada en una bomba de vacío, sin aplicar calor. Las muestras se resuspendieron en 20 µl de Terminator Ready Reaction. Los productos marcados y purificados se secuenciaron mediante la incorporación de nucleótidos fluorescentes terminales basado en el método de secuenciación nucleotídica reportado originalmente por Sanger y colaboradores, 1977 y modificado por Applied Biosystems empleando un secuenciador automatizado de un capilar (310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) (figura 8).

F. Análisis de la secuencia obtenida

Para analizar las secuencias de ADN obtenidas se utilizó el programa Bioedit versión 5.0.6. Cada una de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las reacciones de secuenciación se ensambló utilizando el programa Bioedit (Biological sequence alignment editor).

Para obtener la identidad y homología a nivel de ácidos nucleicos del ADNc clonado, con secuencias reportadas en la base de datos públicos, se utilizaron los programas Blast Nucleotide y Blast Protein de la base de datos del Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La comparación y edición (ensamblaje y transducción) de la secuencia de ADNc se realizó empleando el programa Vector NTI v5.03 (Informax Inc).

G. Modelo de administración en roedores

Se utilizaron 24 ratones machos BALB/c de 8-12 semanas de edad con un peso promedio entre 20-25 g fueron mantenidos a 20-30°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a alimento y agua. Se formaron 3 grupos de 8 ratones cada grupo. Los experimentos fueron ejecutados durante el ciclo de luz.

1. Administración farmacológica

Los fármacos utilizados fueron pentilentetrazol (Sigma, Poole, UK) y cocaína comprado a la compañía Cerilliant (USA). El pentilentetrazol (PTZ) fue disuelto en agua destilada en una concentración de 40 mg/kg y la cocaína fue disuelta en solución salina al 9% a una concentración de 10 mg/kg y utilizando como control solución salina al 9%. Los 2 tratamientos (PTZ y cocaína) y el control (SSI) fueron administrados intraperitonealmente.

Cada grupo experimental se sujetó a un esquema de administración de una dosis diaria por 5 días de pentilentetrazol (40mg/kg), cocaína (10 mg/kg) y el grupo control recibió la administración de solución salina (SSI) por vía intraperitoneal. El tiempo de observación al administrar PTZ y cocaína fue limitada a 30 minutos. Al recibir la 5° dosis del fármaco, los sujetos de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical 1 hora después y disectándose inmediatamente tejido de regiones neurales y órganos periféricos, los cuales se muestra en la tabla 8, tanto de los grupos experimentales como el grupo control.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 8. Tejidos disectados para extracción de ARN total.

REGIONES NEURALES	ÓRGANOS PERIFÉRICOS
Bulbo olfatorio	Bazo
Cerebelo	Corazón
Corteza	Hígado
Cuerpo estriado	Músculo esquelético
Hipocampo	Páncreas
Ojos	Pulmón
Tálamo-hipotálamo	Riñón
Tallo cerebral	Glándulas suprarrenales

2. Extracción y análisis de ARN total

A partir de cada uno de los tejidos disectados se extrajo el ARN total utilizando un reactivo de extracción de ARN total disponible comercialmente Tri-Pure[®] Isolation Reagent (Roche, Cat. 11-667-165-001). Para realizar la extracción se pesaron entre 50-100 mg de tejido tratando de evitar la descongelación de éste. El tejido fue homogenizado utilizando un homogenizador Tissumizer SDT-1810 por 60 segundos e incubando por otros 60 segundos en hielo. El homogenizado fue transferido a tubo Eppendorf de 2.0 ml libres de ARNasas, se agregó 1 ml de Tri-Pure[®] Isolation Reagent por cada 50-100 mg de tejido y se siguió el protocolo de acuerdo al fabricante. El ARN total se alicuotó y se guardó a -80°C .

El ARN total extraído se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La electroforesis se llevó a cabo en la solución amortiguadora TAE 1X a 60V durante 1 hora. El gel de agarosa al 1% se tiñó con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio y se cargo en cada pozo 10 μl totales como se señala en la tabla 9.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 9. Volumen de la carga de la muestra de ARN total en el gel de agarosa.

	Pozo 1	Pozos
	MW	ARN total
Ácidos Nucleicos	1.0 μ l	2.0 μ l
SB 5X	2.0 μ l	2.0 μ l
Agua milliQ	7.0 μ l	6.0 μ l
Volumen total	10.0 μ l	10.0 μ l

Finalmente se cuantificó el ARN total por espectrofotometría en el aparato Eppendorf BioPhometer a una densidad óptica de 260 nm y el coeficiente 260nm/280nm.

3. RT-PCR

Se cuantificó y verificó la calidad del ARN total obtenido; el cual fue entre 1.6-1.8 de pureza, para llevar a cabo estos últimos ensayos de RT-PCR: 2 μ g de ARN total fue utilizado en una reacción estándar, en la tabla 10 se indican los reactivos y cantidades utilizadas, la enzima que se usó para la reacción de RT fue de New England BioLabs (Cat. M0253S).

Tabla 10. Mezcla del tubo para la reacción de transcripción reversa.

REACCIÓN	CANTIDAD
Buffer de reacción 10X M-MuL RT	2.0 μ l
Random Primer 9 (New England BioLabs, Cat. S1254S)	1.0 μ l
dNTP's 100 mM Mix (New England BioLabs, Cat. N0446S)	1.0 μ l
M-MuL RT	1.0 μ l
ARN total (2 μ g)	15.0 μ l
Vol. total	20.0 μ l

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Se prepararon los 2.0 µg de ARN total en 15 µl de agua libre de ARNasa se desnaturalizó a 65°C por 10 minutos y se pasó a hielo 2 minutos. La mezcla se incubó a 37°C por 60 minutos. Para detener la reacción se incubó a 95°C por 5 minutos y se colocó en hielo.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos iniciadores dirigidos a la región 5'UTR (región 5' no codificante) y a la región ORF (marco de lectura abierto) de la secuencia de Rheb-like, dando productos de 539 y 452 nucleótidos de longitud; las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores se muestran en la tabla 11. Se utilizó como control la expresión del gen constitutivo G3PDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron utilizando el programa Vector NTI v5.0.

Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación de Rheb-like y el control.

OLIGO	SECUENCIA
O2(1)S-1	5'- GCCACCAAGATGCCTCAGTCCAAG -3'
O2(1)A-1	5'- CCTTGTGAAGCTGCTCCATCAATC -3'
O2(1)S-2	5'- AAAGTTATCCATGGCAAGTTGTTG -3'
O2(1)A-2	5'- GGTGAACTCATTGGACAGAGTCA -3'
G3PDF	5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'
G3PDR	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

Para la reacción de PCR se utilizaron las concentraciones señaladas en la tabla 12 para ambos juegos de oligonucleótidos iniciadores.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 12. Concentraciones del tubo de reacción de PCR.

REACCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD
H ₂ O milli Q	-----	4.7 µl
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM	1.2 µl
Buffer PCR 5X Green GoTaq	1X	4.0 µl
dNTP's Mix 10 mM New (England BioLabs, Cat. N0446S)	0.2 mM	2.0 µl
Primer 1	1 µM	2.0 µl
Primer 2	1 µM	2.0 µl
GoTaq 5 U/µl	0.5 U	0.1 µl
cDNA		4.0 µl
Vol. total	20.0 µl	20.0 µl

Las condiciones de amplificación se estandarizaron de acuerdo a la temperatura de alineamiento de los iniciadores y el control, el programa que se utilizó se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Programa de amplificación.

	Temperatura °C	Tiempo	No. ciclos
Primer ciclo	94	3 minuto	1
Desnaturalización	94	1 minuto	
Alineamiento	55.5	1 minuto	30
Extensión	72	1:30 minutos	
Último ciclo	72	10 minutos	1

Los productos de las reacciones de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % a 90V durante 90 minutos. Al gel de agarosa al 1.5% y el buffer de electroforesis se les incorporó previamente bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

cargó en cada pozo 5 μ l directos de la reacción de PCR, en la tabla 14 se señala la cantidad de marcador de peso molecular (100 pb Invitrogen, Cat. 10380-012) que se cargó en cada pozo.

Tabla 14. Volumen de la carga de la muestra del producto de PCR en el gel de agarosa.

	Pozo 1	Pozos
	MW	Producto de PCR
ADN	1.5 μ l	5.0 μ l
SB5X	1.0 μ l	*****
Agua milliQ	2.5 μ l	*****
Volumen total	5.0 μ l	5.0 μ l

VI.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación y clonación de una colonia bacteriana inmunopositiva a partir del rastreo inmunológico

Como resultado del empleo de la técnica de rastreo inmunológico, que se implementó en el laboratorio, se detectó, identificó y se aisló un clon bacteriano transformado con la biblioteca de expresión de ADNc de cerebro total de ratón. Este proyecto de tesis se centró en la caracterización de este clon bacteriano denominado 2.1 en la figura 8 se muestra la colonia bacteriana transformante inmunopositiva. Este clon fue purificado y amplificado para los siguientes estudios de caracterización estructural primaria.

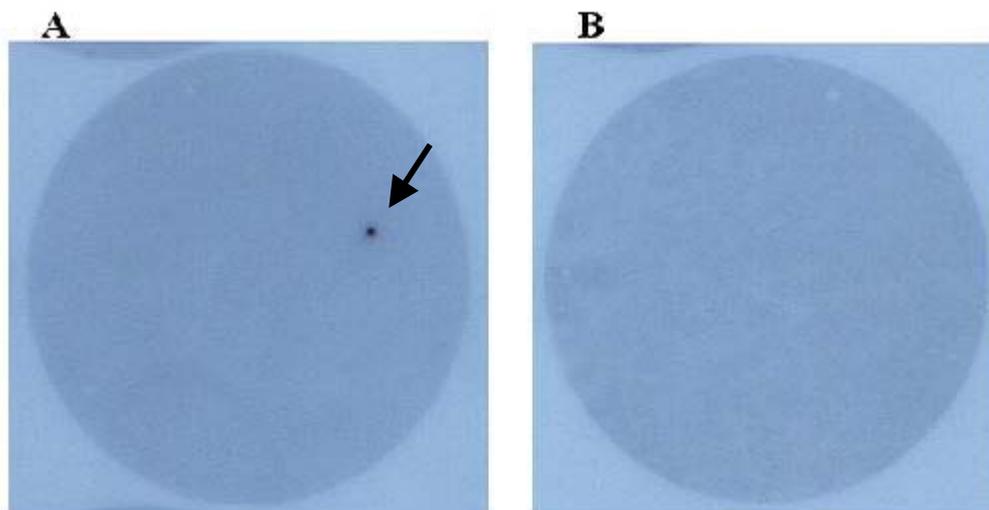


Figura 7. **Inmuno Blot con el 2° Ab marcado con I^{125}** . Fotografías representativas de placas autoradiográficas correspondientes a las membranas de nitrocelulosa mostrando el resultado del rastreo inmunológico. **A** Se muestra señal de la colonia de bacterias transformantes inmunopositiva. **B** Control de colonias de bacterias transformantes.

5.2 Aislamiento y caracterización parcial de un ADNc

El siguiente paso fue realizar un análisis de restricción enzimática para liberar el inserto del ADNc clonado, utilizando las enzimas *Xba* I y *Xho* I el cual dio como resultado la liberación de dos insertos, la longitud de los insertos liberados fue de aproximadamente 1.4 y 0.2 kb (ver figura 8A), respectivamente. En el primer carril del gel de la figura 8A se observa el plásmido denominado 2.1 con el inserto de ADNc en su forma nativa. En el carril 3 se observan dos bandas que es resultado de la digestión enzimática con *Xho* I; esto permite deducir que el inserto de ADNc tiene dos sitios de corte para esta enzima. En el carril 4 se observa una sola banda utilizando la enzima *Xba* I, por lo que el plásmido tiene un sitio único para esta enzima y la longitud molecular corresponde al plásmido y el inserto de ADNc en forma linear de aproximadamente 5.0 kb. En el último carril (6) se pueden observar tres bandas, la primera corresponde al plásmido vacío en forma linear con un tamaño molecular de 3.0 kb aproximadamente, el cual corresponde con el reportado por Stratagene (fabricante de la biblioteca). Las últimas dos bandas, una de 1.4 y 0.2 kb, respectivamente, corresponden al ADNc clonado en el vector. En los carriles 2 y 5 se encuentran los marcadores de tamaño molecular.

Para confirmar la longitud total del inserto de ADNc se llevo a cabo un análisis de PCR utilizando los iniciadores T3 y T7 que flanquean al inserto clonado en el vector pBluescript, dando como resultado la amplificación de un producto con una longitud de aproximadamente 1.6 Kb, (ver figura 8 B), el cual corroboró que se trata de un solo inserto de ADNc clonado en el plásmido.

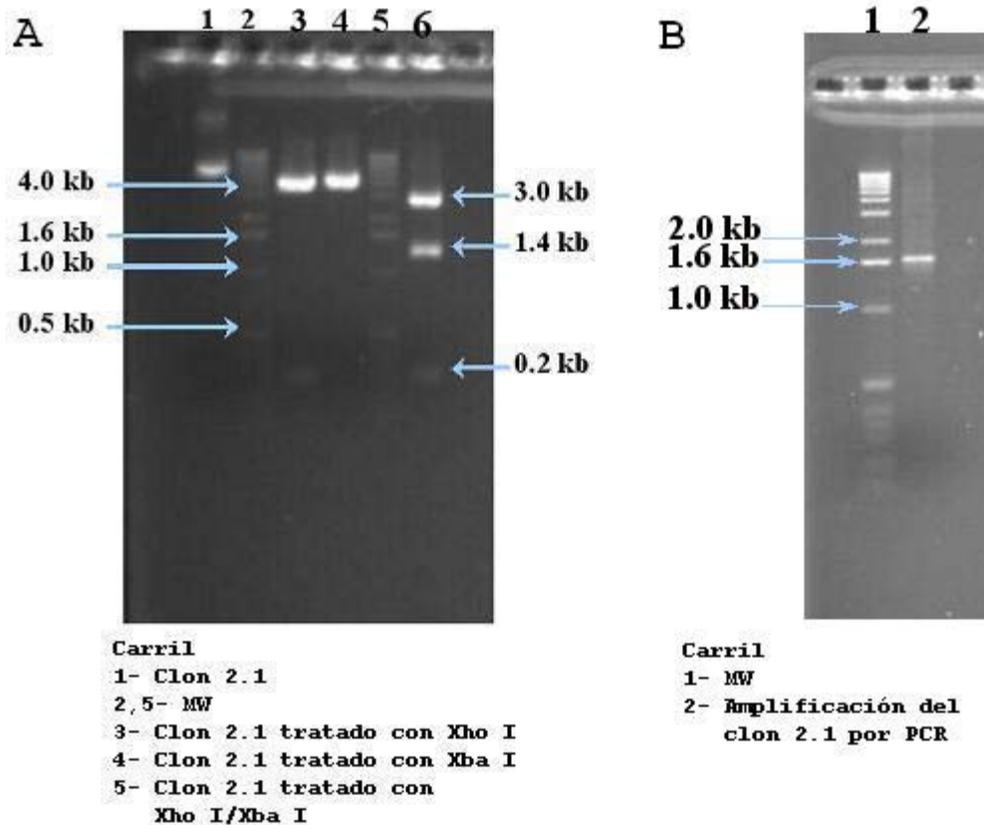


Figura 8. **Análisis electroforético en geles de agarosa mostrando el tamaño molecular del ADNc clonado.** A) Análisis de la restricción enzimática en los sitios de clonación 5' y 3' del inserto de ADNc, con las enzimas de restricción Xba I y Xho I, respectivamente, permitiendo la identificación de dos insertos de 1.4 y 0.2 kb aproximadamente. B) El análisis de PCR, confirmó una longitud molecular similar para el clon 2.1, empleando los oligonucleótidos iniciadores complementarios a los sitios promotores T3 y T7 que flanquean al inserto del ADNc clonado.

Con esta información preliminar sobre el tamaño molecular del inserto de ADNc clonado (1.6 Kb, aproximadamente) se procedió a caracterizar la estructura primaria de ambas cadenas de la secuencia nucleotídica total de esta molécula mediante la técnica de terminadores didesoxi marcados (método Sanger), con la utilización de oligonucleótidos iniciadores complementarios a los sitios promotores T3 y T7 que flanquean al vector pBluescript y ddNTPs marcados con diferentes fluoróforos en una reacción de PCR. Así, se llevó a cabo la secuenciación bi-direccional del inserto de ADNc a partir de sus extremos 5' y 3'.

El inserto de ADNc fue secuenciado en un aparato automático 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) obteniéndose un fragmento de 547 nucleótidos en el extremo T3 y 596 nucleótidos en el extremo T7, por lo que no se obtuvo la secuencia completa del inserto, ya que en el análisis de restricción enzimática se obtuvo un inserto de 1.6 kb aproximadamente de longitud. Para obtener la secuencia completa del ADNc fue necesario diseñar oligonucleótidos iniciadores internos a partir de la secuencia de nucleótidos parcial obtenida con los oligonucleótidos iniciadores T3 y T7 (ver Materiales y Métodos). Empleando estos iniciadores internos, el inserto del ADNc clonado fue secuenciado completamente en ambos extremos.

5.3 Análisis de la secuencia nucleotídica y proteica del ADNc clonado

El análisis estructural de la secuencia nucleotídica se llevó a cabo en el programa Vector NTI v5.0. El inserto de ADNc clonado presentó una longitud de 1541 nucleótidos (ver figura 9), la secuencia presenta las características de los ARNm's maduros: tiene un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) de 552 nucleótidos que comienza en el nucleótido 126 del extremo 5' del ADNc. La secuencia del triplete ATG corresponde a la secuencia consenso del sitio de inicio de la traducción. El marco de lectura abierto es seguido por un codon de terminación TGA y 861 nucleótidos de secuencia 3' UTR con una cola de poli (A)* que es característica de los ARNm maduros. El marco de lectura abierto (ORF) codifica para una proteína deducida de 184 aminoácidos. En la figura 9, también se muestra la secuencia de 184 aminoácidos de la proteína codificada deducida.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

De acuerdo a estos resultados de caracterización estructural primaria del ADNc se deduce que se clonó un ADNc que codifica para un ARNm completo.

```
1 CGGCACGAGCCGCGCTGCTCTGTATGCCGCGTTCTCCCGGCGCAGCCGCGCCGATAGTCTGAGCCGGAG
                                                                 M P Q S K
71 GAGCCGCCGCGCGCGGTTAATGTGGTTGGGTGCGGGCTGAGCAGGCCACCAAGATGCTCCTCAGTCCAAG
  S R K I A I L G Y R S V G K S S L T I Q F V E
141 TCCCAGGATCGCCATCCTGGGCTACCGGTCTGTGGGAAAGTCTCATTGACAATTCAGTTTGTGAAG
  G Q F V D S Y D P T I E N T F T K L I T V N G Q
211 GCCAATTTGTTGATTCTACGATCCAACCATAGAGAACACGTTTACCAAGTTGATCACGGTAAATGGTCA
  E Y H L Q L V D T A G Q D E Y S I F P Q T Y S
281 AGAGTATCATCTTCAGCTGTAGACACAGCGGGCAGGATGAATATTCCATTTTCTCAGACATACTCC
  I D I N G Y I L V Y S V T S I K S F E V I K V
351 ATAGATATTAATGGTTATATTCTTGTGTATTCTGTTACATCAATCAAAAGTTTGAAGTAATTAAGTTA
  I H G K L L D M V G K V Q I P I M L V G N K K D
421 TCCATGGCAAGTTGTTGGATATGGTGGGAAAGTGCAGATACCTATTATGTTGGTTGGAAATAAGAAGGA
  L H M E R V I S Y E E G K A L A E S W N A A F
491 CCTGCATATGGAAAGGTGATCAGCTATGAAGAAGGAAAGGCTTTGGCAGAATCTTGAATGCAGCTTTT
  L E S S A K E N Q T A V D V F K R I I L E A E
561 TTGAATCTTCTGCTAAAGAAAATCAAACGCTGTTGATGTTTTTAAAAGGATAATTTTGAAGCAGAAA
  K I D G A A S Q G K S S C S V M ***
631 AGATTGATGGAGCAGCTTCACAAGGAAAGTCTTCGTGCTCGGTGATGTCACAATTCTGCTGCAGAGCCTG
701 CGGACACTGGGGATATATCCACCTGAGGAAGCAAACCTGCCCGTCATCCTTGAAGATAAAACTATGCTTC
771 TGTTTTCTTCTGTTAACCTGAAAGATGTCATTTGGGTGAGGGTCTCCCTTTCAGATTATGTTAACGT
841 CTGACTCTGTCCAAATGAGTTCACCTCCATTTTCAAATTTTAAACAATCATATTTCAATTTATATATTG
911 TATTTCTTAATATTATGACCAAGAATTTTATCGGCATTAATTTTTCAGTGTAGTTTGTGTTTAAATA
981 ATGTAATCATCAAATGATACACATGTTACTACTATTAAGGCTTCAATATATCAGTGTTTATTTTCT
1051 ATTGTGTTAAATGTATACTTGTAAATAAAATAGCTGCAAACCTTAAGCCTTTGAGCTACTTGGTGTGGTT
1121 TTTAAACCAGGAACCATGTTAGGATGGGGCATGGGCGTGCACATCGTTTGTGTTTGTGTTGCTTTT
1191 TCGAGACAGGGTTTCTCTATGTAACAGCACTGGCTGTCTGGAACCCACTCTGTAGACCAGGCTGTCCCTC
1261 GAACTCGAGATTTGCCTGCCTCTGCCTCCCAAGTGCTGGGATTAAGGCGTGCACCACCACTGCCTGGCT
1331 GTACAGTGTCCCTGGTCTATTAACCCCGGCTACTTTTACCTCACTTGGCCCCAACACCTCCCTCTTAC
1401 ATTTTCACATTCTCTCTGCATCCAGTTATTGCCTCCTGTTGGCATGTTAGTTCATCTGGTCTCTATCTT
1471 CCGTGTAACTGCAGTGGCCATGTCATGCCTATAAAACAGTATTTTACTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1541 A
```

Fig. 9. **Secuencias correspondiente al ADNc completo clonado.** La secuencia nucleotídica corresponde a 1541 pb, con un marco de lectura abierto de traducción de 552 nucleótidos. Tiene un codon de inicio y un codon de paro de la traducción (color rosa); en los extremos se encuentran las regiones no codificantes 5' y 3', respectivamente. En la región 3' tiene una secuencia de poli (A)* (color rojo). El marco de lectura abierto de traducción codifica para la secuencia primaria de una proteína deducida de 184 aminoácidos (letras en azul).

5.4 Análisis de homología estructural del ADNc clonado

Con el objetivo de obtener un análisis de identidad del ADNc clonado se realizó una búsqueda del tipo BLASTN con la secuencia nucleotídica obtenida de la secuenciación automática. Esta búsqueda dio como resultado una identidad estructural completa en la región 5' UTR y a la región codificante del 100% en 1088 nucleótidos a la secuencia del ARNm de Ras-homolog enriched in Brain del organismo *Mus musculus*, del grupo IMAGE; 98% en 1074 nucleótidos a la secuencia del ARNm de Ras-homolog enriched in Brain (Rheb) del organismo *Mus musculus*, reportado por Watanabe *et al* y 92% en 996 nucleótidos a la secuencia del ARNm Ras-homolog enriched in Brain del organismo *Homo sapiens*, del grupo IMAGE; siendo estos tres los resultados más representativos, con una identidad estructural alta (mayor a 90%). En la figura 10 se observa en forma esquemática el resultado del análisis estructural en la base de datos del GenBank. En la tabla 15 se muestra un análisis de identidad hecho recientemente (marzo de 2008), donde a partir del registro de nuestra secuencia se han integrado muchas más secuencias, también con un alta homología; esto es debido a los grandes proyectos de secuenciación de genomas que han progresado rápidamente. Sin embargo, hasta ese momento nuestra secuencia sigue siendo el único ARNm completo reportado.

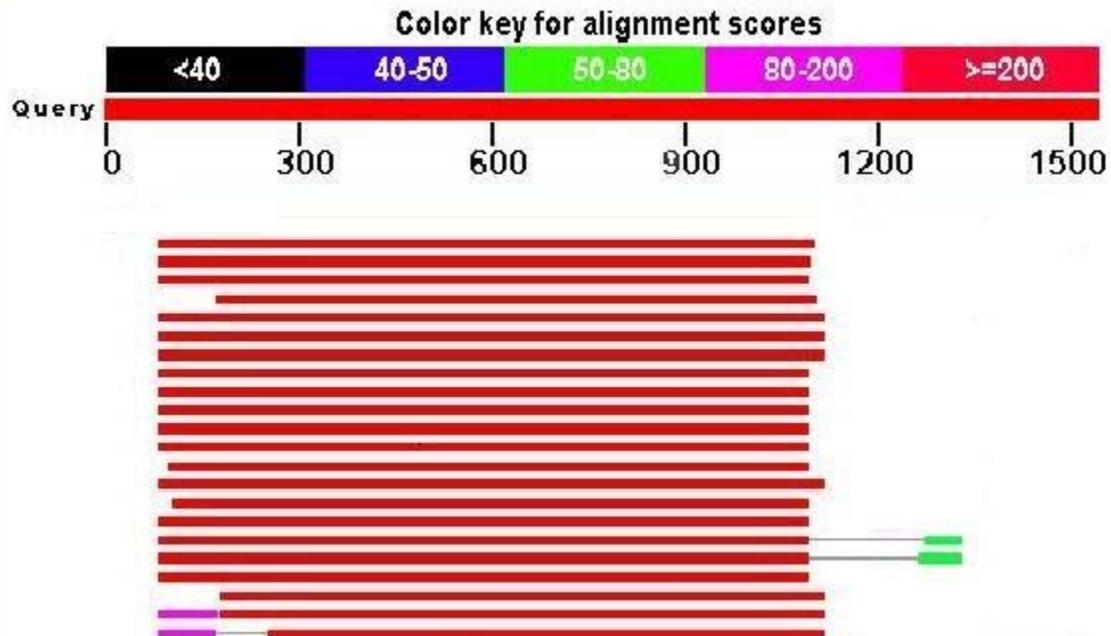


Figura 10. **Representación esquemática del formato del GenBank del alineamiento estructural entre nuestra secuencia de ARNm y las secuencias de ARNm's reportadas en la base de datos.** La longitud de nuestra secuencia de ARNm está representada por la línea roja gruesa en la parte superior, está subdividida en números que representan el tamaño de la secuencia en forma progresiva de residuos de nucleótidos en la orientación 5' – 3' de izquierda a derecha. Los índices numéricos de homología estructural están definidos arbitrariamente por el programa por una clave de cinco colores diferentes que dividen el intervalo de marcas en cinco grupos. El rojo indica una homología muy alta (>=200 nucleótidos) y el negro una muy baja (<40). Los colores restantes indican índices de homología intermedias.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Tabla 15. Secuencias que produjeron un alineamiento significativo con la secuencia del ADNc clonado.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_053075	Mus musculus RAS-homolog enriched in brain (Rheb), mRNA	2789	2789	98%	0.0	99%
AK151213.1	Mus musculus bone marrow macrophage cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:I830026O08 product:RAS-homolog enriched in brain, full insert sequence	2023	2023	71%	0.0	100%
BC012273.1	Mus musculus RAS-homolog enriched in brain, mRNA (cDNA clone MGC:18654 IMAGE:3710454), complete cds	2010	2010	70%	0.0	100%
AB039919.1	Mus musculus rheb mRNA for Ras homolog, complete cds	1941	1941	70%	0.0	99%
AC137938.12	Mus musculus chromosome 5, clone RP24-365C2, complete sequence	1722	3476	87%	0.0	100%
XM_982185.1	PREDICTED: Mus musculus RAS-homolog enriched in brain (Rheb), mRNA	1716	1716	60%	0.0	100%
BC088857.1	Rattus norvegicus Ras homolog enriched in brain, mRNA (cDNA clone MGC:105484 IMAGE:7307969), complete cds	1642	1642	70%	0.0	94%
NM_013216.1	Rattus norvegicus Ras homolog enriched in brain (Rheb), mRNA >gb U08227.1 RNU08227 Rattus norvegicus Sprague-Dawley Ras-related protein (rheb) mRNA, complete cds	1642	1642	70%	0.0	94%
XM_519513.2	PREDICTED: Pan troglodytes Ras homolog enriched in brain, transcript variant 6 (RHEB), mRNA	1550	1550	72%	0.0	91%
NM_005614.3	Homo sapiens Ras homolog enriched in brain (RHEB), mRNA	1548	1548	72%	0.0	91%
XM_001142213.1	PREDICTED: Pan troglodytes Ras homolog enriched in brain, transcript variant 5 (RHEB), mRNA	1531	1531	72%	0.0	91%
BC016155.1	Homo sapiens Ras homolog enriched in brain, mRNA (cDNA clone MGC:1391 IMAGE:3528583), complete cds	1526	1526	70%	0.0	92%
BC107705.1	Homo sapiens Ras homolog enriched	1526	1526	70%	0.0	92%

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	in brain, mRNA (cDNA clone MGC:111559 IMAGE:6615350), complete cds					

A pesar de que nuestra secuencia presenta una identidad alta con las secuencias de Rheb de los organismos antes mencionados difiere significativamente en la región 3' UTR (ver figura 10), siendo nuestra secuencia de ARNm completo y de longitud mayor en esta región hasta el momento reportado en la base de datos del GenBank. La relevancia de este hallazgo radica en que las regiones no codificantes tienen papeles cruciales en la regulación post-traducciona l de la expresión genética como modulación del transporte de ARNm fuera del núcleo, localización subcelular y estabilidad y, en particular la región 3'UTR regula la estabilidad del ARNm por medio de elementos como secuencias ricas en AU (ARES, por sus siglas en inglés), los cuales promueven un decaimiento del ARNm en respuesta a una variedad de señales intra y extracelulares específicas (Mignone, *et al*, 2002). En la figura 11 se resume el resultado de la identidad estructural de nuestro ARNm en forma esquemática.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

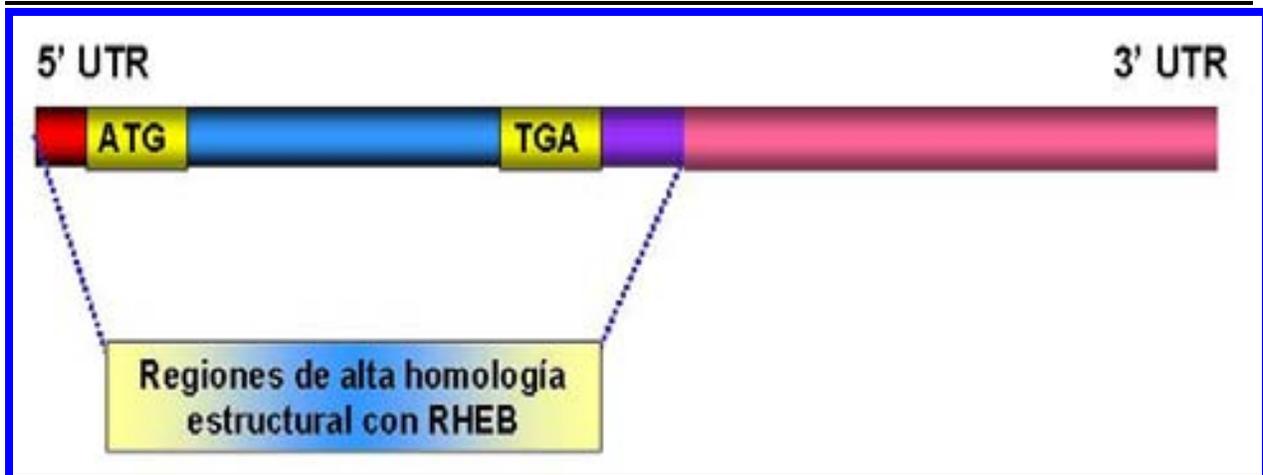


Figura 11. Dibujo esquemático del análisis estructural de nuestra secuencia de ARNm. Nuestro ARNm muestra diferencias con las otras secuencias clonadas de ARNm's que codifican para proteínas Rheb, principalmente en la región 3'-UTR ya que nuestra secuencia es más larga. Todas las características estructurales antes mencionadas de esta ARNm sugieren que es un transcrito completo.

Con estos resultados la secuencia de ARNm se registró en la base de datos del GenBank con el número de acceso AY197373, la cual denominamos RHEB-like en la figura 12 se muestra una copia del registro (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

En cuanto a la secuencia de aminoácidos, el análisis estructural obtuvimos como resultado 100% de identidad de la proteína Rheb de *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*; y 99% de identidad de *Mus musculus*.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

NCBI Nucleotide

Search Nucleotide for [] Go Clear

Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

Range from begin to end Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: AY197373 Reports Mus musculus RHEB... [g:28566179] Link

Features Sequence

LOCUS AY197373 1541 bp mRNA linear ROD 26-FEB-2003

DEFINITION Mus musculus RHEB-like protein mRNA, complete cds.

ACCESSION AY197373

VERSION AY197373.1 GI:28566179

KEYWORDS

SOURCE Mus musculus (house mouse)

ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1541)
Anton, B., Matus, H., Leff, P., Calva, J.C., Acevedo, R., Retana, I., Gonzaga, R., Martinez, C., Sanchez-Lopez, R. and Alagon, A.
Cloning of a 1541 bp cDNA encoding a complete mouse brain mRNA similar to the family of mRNAs coding for the Mus musculus RAS homolog enriched in brain proteins (RHEB)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1541)
Anton, B., Matus, H., Leff, P., Calva, J.C., Acevedo, R., Retana, I., Gonzaga, R., Martinez, C., Sanchez-Lopez, R. and Alagon, A.
Direct Submission
Submitted (16-DEC-2002) Lab. Neurobiologia Molecular y Neuroquimica de Adicciones, Instituto Nacional de Psiquiatria, Calz. Mexico-Xochimilco # 101, D.F. 14370, Mexico

FEATURES
source
1..1541
/organism="Mus musculus"
/mol_type="mRNA"
/strain="BALB/c"
/db_xref="taxon:10090"
/chromosome="10"
/clone="2(1)"
/sex="male"
/tissue_type="whole brain"
/clone_lib="UNIZAP-XR Stratagene Cat. # 937319"
126..680
/note="similar to Mus musculus RAS homolog enriched in brain protein (RHEB)"
/codon_start=1
/product="RHEB-like protein"
/protein_id="AA043226.1"
/db_xref="GI:28566180"
/translation="MPOSKRKIALGYSVSGKSSLTIOFVEGQFVDSYDPTIENTFT KLITVNGQEHLLQLVDTAGQDEYSIFPQYISIDINGYILVYSVTSIKSFEVIVKMGK LLDNIVGKQVQIPILVGNKKDLHNERVISYEEGKALAESWNAAPLESSAKENQTAVDVF KRILLEAEKIDGAASOGKSSCSVH"

ORIGIN
1 eggcaccgagc cgcctgtctc tgtatgccgc gttctcccgg cgcagccgcc gccgatagtc
61 tgagccggag gagccggcgc cgcgcgggtt aatgtgggtg ggtcggggct gagcaggcca
121 ccaagatgcc tcagtcacaag tcccgggaag tcgccatcct gggctaccgg tctgtgggaa
181 agtccctcatt gacaattcag ttgtttgaag gccaatttgt tgattccac gatccaacca
241 tagagaaacac gttcaccacg ttgatccagg taatagggtca agagtatcat ctccagcttg
301 tagacacagc ggggcaggat gaatattcca ttttctctca gacatactcc atagatatta
361 atggttatata tcttgtgtat tctgtttacat caatcaaaag ttttgaagta attaaagtta
421 tccatggcaaa gttgttggat atggtgggga aagtgccagat acctattatg ttggttggaa
481 atcaagaagga cctgcatacg gaacgggtga tccgctatga agcaaggaaag gctttggcag
541 aatctttggaa tgcagctttt ttggaatctt ctgctaaaga aaatcaaaact gctgttggat
601 tttttaaaagc gataattttg gaagcagaaa agattgatgg agcagcttca caaggaaagt
661 cttcgtgtctc ggtgatgtga caattctgct ccagagcctg cggcacctgg ggatatttc
721 caactggagga agcaaaactgc ccgtracatc tgaagataaa actatgcttc tgttttcttc
781 tghtaaacctg aaagatgtca ttgggtccag gggctcctccc ctttccagatt atgttaacgt
841 ctgactctgt ccaaatgagt tcaactccat tttcaaattt taacaacata tttttcaat
901 ttatataattg tatttcttaa tattatgacc aagaatttta tggccttca tttttcagt
961 gtatgtttgtt gtttaaaata atgtaacat caaaatgata cacatgttac actactatta
1021 actaggcttc aatataatcag tgtttatttc attgtgttaa atgtatactt gtaaaataaa
1081 tagctgcaaaa ccttaagcct ttgagctact tgggttggtt tttaaacag gaaccatggt
1141 aggatgggggc atggggcgtgc acatcgtttg tttttgtttt gtttgccttt tcgagacagg
1201 gtttctctat gtaacagcac ttgctgtctc ggaaccccat ctgtagacaa ggcctgtctc
1261 gaactcgaga ttgctcctgcc tctgctctcc aagtgctggg attaaagcgc tgcaccacca
1321 ctgcctgggt gtaacagtgtt cctgtgtctt attaaacccc gctactttta cctcacttgg
1381 ccccaaacctc tccctcttac attttccatc tctctctctc atccagttat tgcctcctgt
1441 tggcctgtta gttcaatcgg tctctatctt ccgtgttaac tgcagtgctc atgtcatgcc
1501 tagtcaaacag tattttactg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Figura 12. Registro en la base de datos del GenBank de la secuencia primaria de nucleótidos del ARNm y de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Clave de acceso AY197373 (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

5.5 Localización de la secuencia del ARNm en el genoma de ratón, rata y humano

Como siguiente paso se realizó un análisis de búsqueda de nuestra secuencia nucleotídica a nivel genoma en ratón, rata y humano con el objetivo de ubicar su identidad a nivel genómico.

En el ratón el gen de Rheb está localizado en el brazo corto del cromosoma 5 como se observa en el ideograma (esquema del lado izquierdo de la figura 13); nuestra secuencia presentó una identidad del 100% con la secuencia genómica del gen *Rheb*.

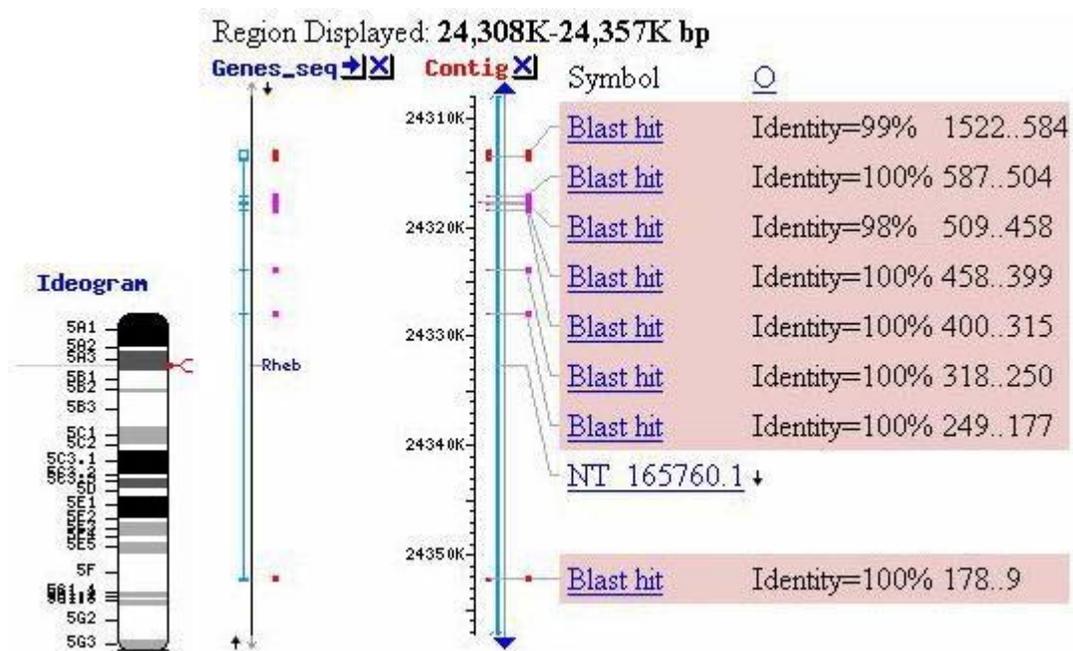


Figura 13. Localización de la secuencia de Rheb-like en el genoma del ratón. El gen de Rheb-like está localizado en el cromosoma 5 del ratón con una identidad del 100%.

En la rata, el gen de Rheb-like está localizado en el extremo del brazo corto del cromosoma 4 con una identidad alta de 94% (ver figura 14).

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

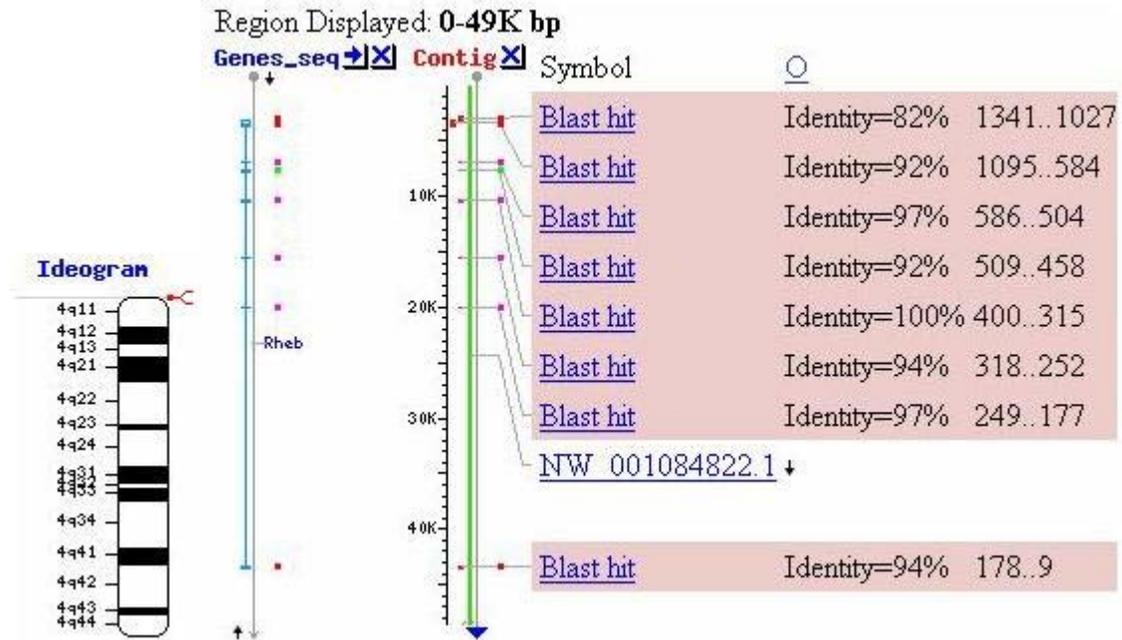


Figura 14. **Localización de la secuencia de Rheb-like en el genoma de rata.** El gen de Rheb-like está localizado en el cromosoma 4 del ratón con una identidad del 94%.

En el genoma de *Homo sapiens* está localizado en los cromosomas 7, 10 y 22. En el cromosoma 7 se encuentra en la región del brazo largo, el cual presentó una identidad de 96%; en el cromosoma 10 está localizado cerca del centrómero y se encuentra repetida con una identidad del 91% y también se encuentra en el cromosoma 22, donde presentó una identidad de 87% (ver figura 15). Dado que el gen de Rheb se encuentra en 3 cromosomas diferentes en humano y está conservada en estas tres especies cercanas evolutivamente podemos sugerir que tiene una función biológica esencial.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

regulada por el incremento en la actividad de excitabilidad neuronal del sistema nervioso central, nuestro siguiente objetivo experimental fue determinar si la expresión del gen que codifica para el ARNm de Rheb-like clonado en nuestro laboratorio es regulada por el proceso de administración sistémica (i.p.) del fármaco pentilentetrazol (PTZ), que es un agente químico usado experimentalmente para inducir despolarización generalizada del SNC y convulsiones tónico-clónicas en el roedor y paralelamente, evaluó la administración crónica de cocaína, la cual induce cambios en la expresión genética en neuronas específicas dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) en mamíferos.

Para llevar a cabo este objetivo se realizó un estudio comparativo mediante RT-PCR de punto final de la expresión del ARNm de Rheb-like. Para este estudio se utilizó como control la expresión del gen constitutivo Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (G3PDH) y para la amplificación del gen de Rheb-like se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos iniciadores. El primer juego amplifica un producto de 539 pb y el segundo juego amplifica un producto de 452 pb como se muestra esquemáticamente en la figura 16.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

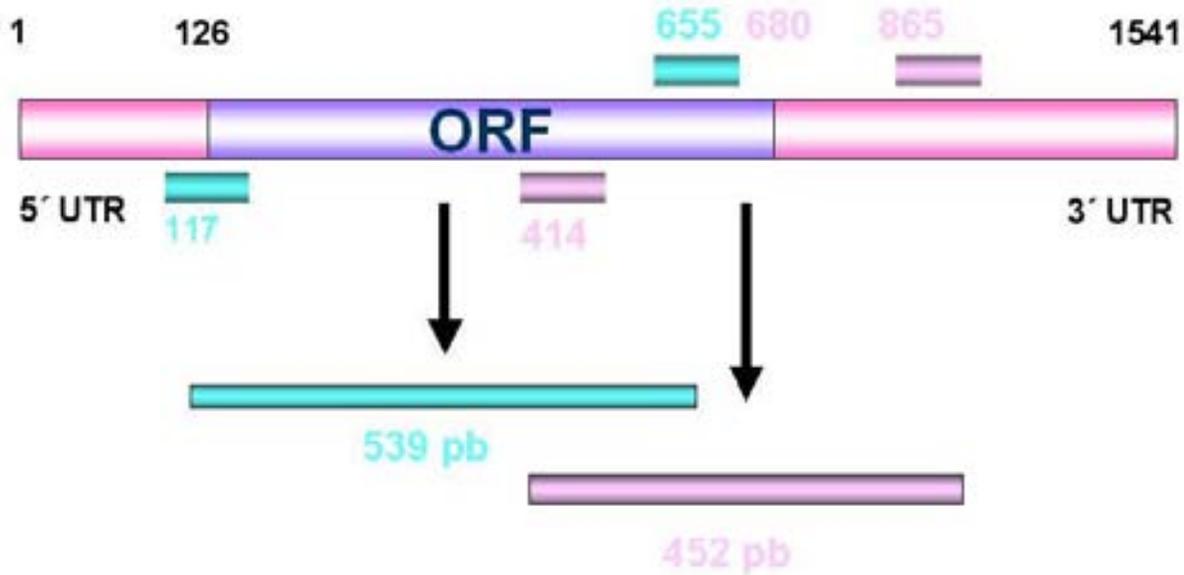


Figura 16. Dibujo esquemático del diseño de los oligonucleótidos para la amplificación del ARNm clonado.

Se llevó a cabo la amplificación del ARNm de Rheb-like como se observa en la figura 17, los patrones de expresión del de los estudios de RT-PCR para el gen correspondiente a Rheb-like en condiciones fisiológicas (i. p. SSI) mostraron que Rheb-like es expresado ampliamente en todas las áreas neuronales examinadas (bulbo olfatorio, cerebelo, corteza, estriado, hipocampo, médula espinal, ojos, tálamo-hipotálamo y tallo cerebral); también fue detectado en tejidos periféricos como corazón, hígado, músculo esquelético, páncreas, riñón y glándulas suprarrenales. En el tejido donde no se detectó expresión fue el pulmón (inhibición). En el caso de bazo, no se obtuvo ARN total de buena calidad para la reacción de transcripción reversa (RT) ya que no hubo amplificación en el control y tampoco para el gen de Rheb-like, por lo que no podemos decir si hubo variación en su expresión.

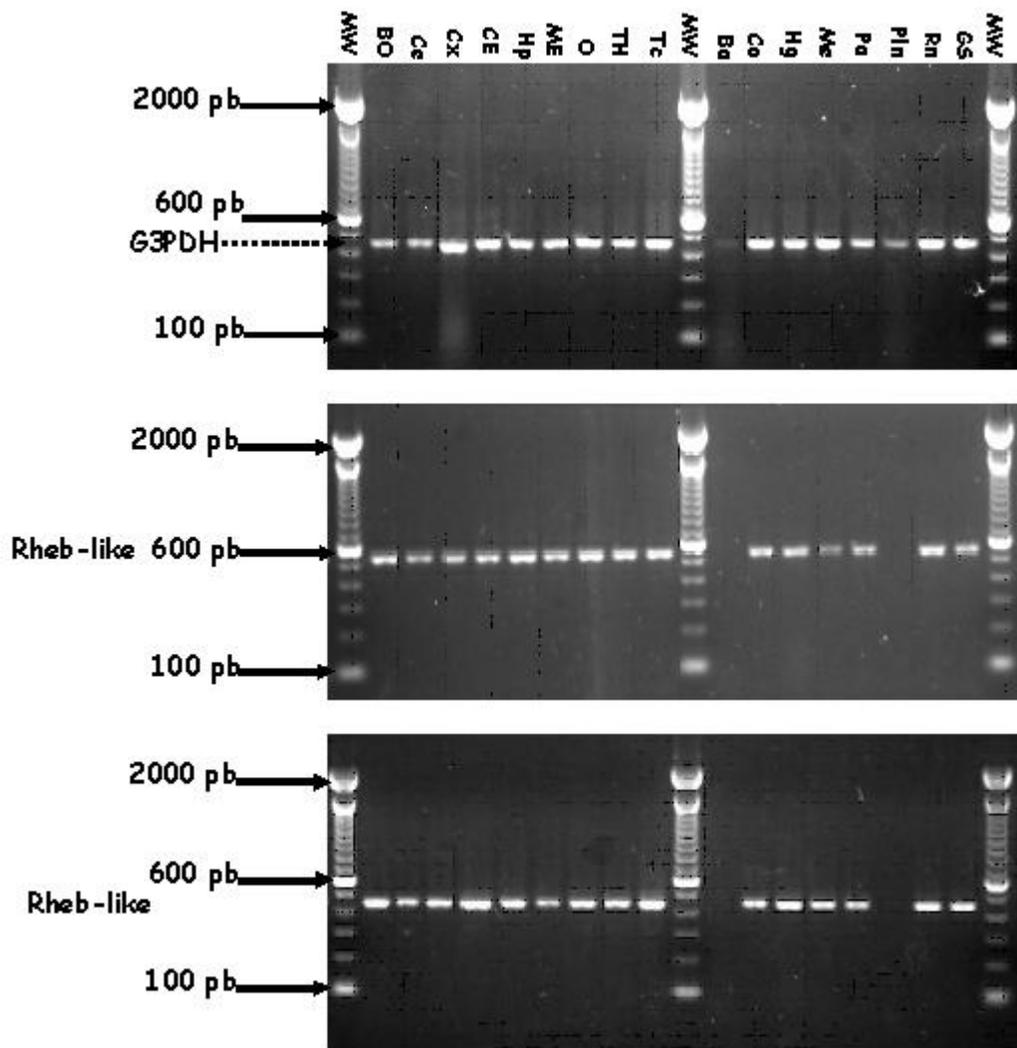


Figura 17. Análisis electroforético para la identificación de los productos de amplificación del ARNm que codifica para la proteína Rheb-like con el tratamiento de solución salina (i. p SSI). En la parte superior se muestra la amplificación del control, el gen constitutivo G3PDH con un producto de 452 pb. En la parte inferior se muestra la amplificación con los productos de 532 y 452 pb, respectivamente del gen de Rheb-like en las áreas neurales (BO, bulbo olfatorio; Ce, cerebelo; Cx, corteza; Hp, hipocampo; ME, médula espinal; O, ojos; TH, tálamo-hipotálamo; Tc, tallo cerebral) y órganos periféricos (Ba, bazo; Co, corazón; Hg, hígado; Me, músculo esquelético; Pa, páncreas; Pln, Pulmón; Rn, riñón; GS, glándula suprarrenales).

El hecho de que Rheb-like se exprese en regiones múltiples del sistema nervioso central, nos permite sugerir que tiene una participación importante en el funcionamiento del SNC. Su expresión en tejidos periféricos permite sugerir que participa en la regulación metabólica.

En la figura 18 se observan los patrones de expresión del gen Rheb-like en condiciones estímulo-específico del tratamiento con PTZ (i. p. 40 mg/kg), la expresión se mantuvo en áreas neuronales (bulbo olfatorio, cerebelo, corteza, estriado, hipocampo, médula espinal, ojos, tálamo-hipotálamo y tallo cerebral); en cuanto a los órganos periféricos la expresión del ARNm dARNm de Rheb-like se fue a la baja en hígado y el pulmón permaneció sin cambio, con respecto al control con SSI. Con respecto al órgano de páncreas no se obtuvo ARN total de buena calidad para la reacción de transcripción reversa (RT); ya que tampoco hubo amplificación en el control y en el gen de Rheb-like, por lo que no podemos concluir si hubo variación en su expresión.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

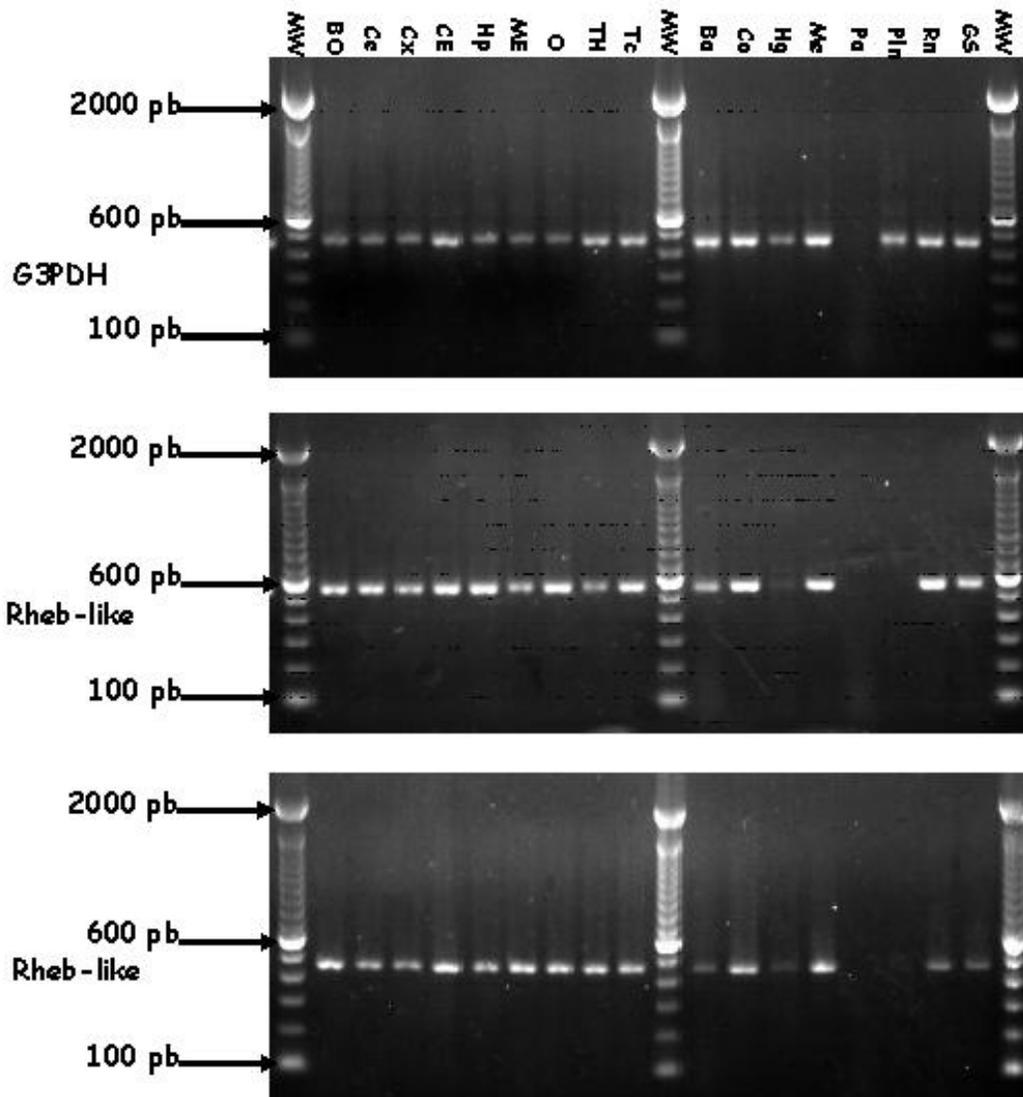


Figura 18. Análisis electroforético para la identificación de los productos de amplificación del ARNm que codifica para la proteína Rheb-like con el tratamiento de pentilentetrazol (i. p. 40 mg/kg). En la parte superior se muestra la amplificación del control, el gen constitutivo G3PDH con un producto de 452 pb. En la parte inferior se muestra la amplificación con los productos de 532 y 452 pb, respectivamente del gen de Rheb-like en las áreas neurales y órganos periféricos.

En la figura 19 se observan los patrones de expresión del gen de Rheb-like en condiciones de estímulo-específico con el tratamiento de cocaína (i. p. 10 mg/kg). En las áreas neuronales la expresión de Rheb-like se mantuvo sin modificación significativa en la expresión (bulbo olfatorio, cerebelo, corteza, estriado, hipocampo, médula espinal, ojos, tálamo-hipotálamo y tallo cerebral). En los órganos periféricos la expresión del ARNm se indujo en pulmón. En el órgano de páncreas no se obtuvo ARN total de buena calidad para la reacción de transcripción reversa (RT); ya que tampoco, hubo amplificación en el control y en el gen de Rheb-like, por lo que no podemos concluir si hubo variación en su expresión. En cuanto al bazo, en este tratamiento, si se obtuvo ARN total de buena calidad ya que podemos observar (ver figura 19) la amplificación del control (el gen constitutivo G3PDH); la expresión del gen de Rheb like.

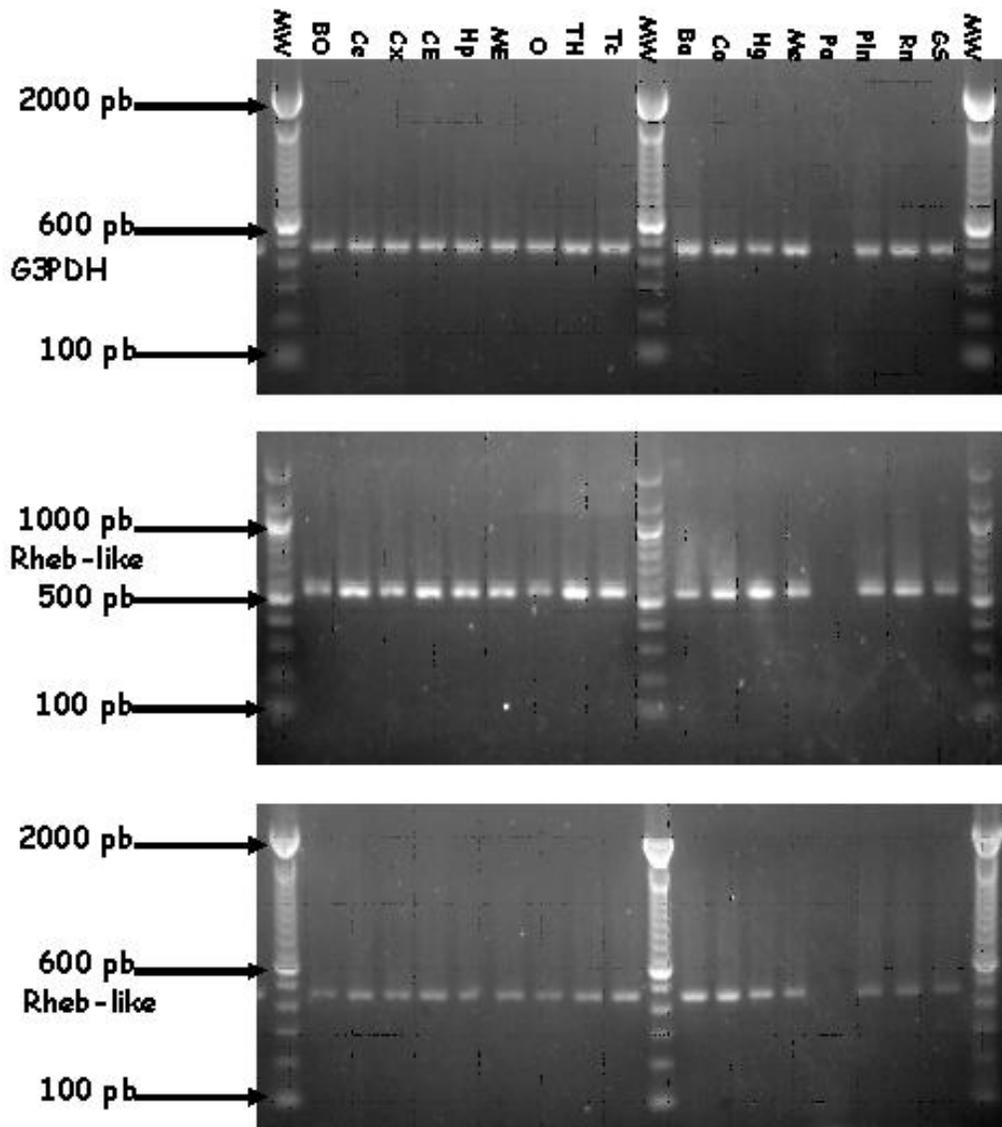


Figura 19. Análisis electroforético para la identificación de los productos de amplificación del ARNm que codifica para la proteína Rheb-like con el tratamiento de cocaína (i. p. 10 mg/kg). En la parte superior se muestra la amplificación del control, el gen constitutivo G3PDH con un producto de 452 pb. En la parte inferior se muestra la amplificación con los productos de 532 y 452 pb, respectivamente del gen de Rheb-like en las áreas neurales y órganos periféricos.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Cabe señalar que los resultados obtenidos coincidieron en dos ensayos individuales empleando iniciadores que amplifican regiones distintas del ARNm de Rheb-like.

La expresión de Rheb-like en forma constitutiva, en condiciones fisiológicas, sugiere su participación en funciones esenciales en el SNC y en órganos periféricos. Al modificarse su expresión en hígado y pulmón (PTZ), sugiere su participación en procesos inmunológicos y metabólicos (Tortora, 2002).

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las proteínas que unen e hidrolizan GTP (GTPasas) están involucradas en el control de diversos procesos celulares de los seres vivos; incluyendo crecimiento, diferenciación y motilidad celular. Nosotros caracterizamos una GTPasa en el organismo *Mus musculus*, la cual denominamos Rheb-like.

A partir del análisis electroforético se mostró que el tamaño molecular del inserto del ADNc de 1.6 kb aproximadamente, confirmado posteriormente con la secuenciación del inserto de ADNc por electroforesis en capilar. Se confirmó que la secuencia se encontraba orientada en el sentido 5'→3', lo cual se verificó con la presencia de la cola de poli (A)* en el extremo 3'UTR. Otro elemento asociado a la cola de poli (A)* es la secuencia AAUAAA secuencia consenso del sitio de poliadenilación. Todas las características estructurales antes mencionadas de este ARNm sugieren que es un transcrito completo y por lo tanto es expresada y funcional; por lo que se registró en la base de datos del GenBank con el número de acceso AY197373.

En el análisis de homología estructural, la secuencia de nuestro ARNm, mostró una alta homología estructural en la región 5'-UTR y región codificante de los ARNm's que codifican para la familia de las proteínas Rheb. Nuestra secuencia es de una longitud más larga en el extremo 3'-UTR que las secuencias previamente reportadas hasta el momento.

Por medio de este trabajo experimental se clonó un ADNc que codifica para un ARNm completo y en nuestros estudios iniciales de expresión génica por medio de RT-PCR de punto final sugieren que el ARNm se expresa tanto en condiciones fisiológicas

“basales”, como en condiciones de estimulación química; lo cual, implica activación despolarizante en múltiples áreas del sistema nervioso central del ratón. Este resultado sugiere que su participación es esencial en la función general del sistema nervioso central del roedor, ya que la vía señalización en el cual participa TSC/Rheb juega un papel crítico en el control del crecimiento y ciclo celular y Rheb, también, controla la actividad de TOR, en donde la vía TSC/Rheb/TOR es determinante en el crecimiento durante el desarrollo, regulando numerosas funciones incluyendo traducción, procesamiento de ARNm's, estabilidad de proteínas y la organización de los filamentos de actina (Inoki *et al*, 2005) por lo que se explica la expresión del ARNm de Rheb en numerosos estudios.

Por otro lado, el ARNm de Rheb se exprese tanto en condiciones “basales” como en condiciones de despolarización aumentada, sugiere que la expresión de este gen no parece estar regulada por los estímulos específicos, al menos por los utilizados en nuestro estudio. Este dato contrasta con los reportes previos, donde se ha demostrado que la expresión de Rheb es inducida de manera estímulo-específico (por ejemplo, isquemia cerebral y despolarización eléctrica).

Para poder sugerir que existe una aumento o inhibición de la expresión del ARNm se podría analizar mediante estudios de RT-PCR en tiempo real para cuantificar con precisión los patrones de expresión del gen que codifica para la proteína Rheb-like. Adicionalmente, se podría determinar la expresión diferencial del ARNm inducida por estímulos diferentes (v.g. hipoxia cerebral, daño neurodegenerativo por neurotoxinas como al ácido kaínico, etc.), con el fin de abundar en la caracterización de esta proteína.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

La localización neuroanatómica y celular del ARNm que codifica para esta proteína Rheb-like se analizaría por medio de hibridación *in situ*. Se plantearían estudios de interferencia de traducción de este ARNm en el hipocampo del roedor para determinar el papel funcional de esta proteína Rheb-like en el proceso de aprendizaje y la memoria en el modelo de roedor.

VIII. REFERENCIAS

- Astrinidis, A. and Henske, E.P. (2005). Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene*. **24**:7475-7481.
- Beguín, P., Mahalakshmi, R.N., Nagashima, K., Cher, D.H Kuwamura, N., Yamada, Y., Seino, Y., Hunziker, W. (2005). Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G protein Rem2. *Biochemistry Journal*. **390**:67-75.
- Bos, J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review: *Cancer Res*. **49**(17): 4682-4689.
- Castro, A.F., Rebhun, J.F., Clark, G.J., Quilliam L.A. (2003). Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) y promueve S6 Kinase activación in a rapamycin- and farnesylation dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(35):32493-32496.
- Clark, G.J., Kinch, M.S., Rogers-Graham, K., Sebt, S.M., Halmiton, A.D., Der, C.J. (1997). The Ras-related Protein Rheb Is Farnesylated and Antagonizes Ras Signaling and Transformation. *J. Biol. Chem*. **272**(16):10608-10615.
- Cooper, G. (2000). *The Cell. A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Coventry T.L., Jessop D.S., Finn, D.P., Crabb, M.D., Kinoshita H., Harbuz M.S. (2001). Endomorphins ana activation of the hypothalamo-pituitary adrenal axis. *J. Endocrinol*. **169**(1):185-193.
- Ehrhardt, A., Ehrhardt, G.R.A., Guo, X., Schrader, W. (2002). Ras and relatives: job sharing and networking keep an old family together. *Experimental Hematology*. **30**:1089-1106.
- Garami, A., Zwartkruis, F.J.T., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S.C., Hafen, E., Bos, J.L., Thomas, G. (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular Cell*. **11**:1457-1466.
- Grahm, C.A., Hill, A.J. (2001). Introduction to DNA sequencing. *Methods in Molecular Biology*. **167**:1-12.
- Green, A.J., Yates, J.R., Kwiatkowska, J., Henske, E.P., Short, M.P., Haines, J.H., Jozwiak, S., Kwiatkowski, D.J. (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*. **277**(5327):805-808.
- Hancock, J.F. (2003). Ras proteins: different signals from different locations. *Molecular Cell Biology*. **4**:373-384.
- Harris, T.E., Lawrence Jr., J.C. (2003). TOR Signaling. *Science's Stke*. **212**(15):1-14.
- Im, E., von Lintig, F.C., Chen, J., Zhuang, S., Qui, W., Chowdhury, S., Worley, P.F., Boss, G.R., Pilz, R.B. (2002). Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells. *Oncogene*. **21**(41):6356-6365.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., Guan, K-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP actividad and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*. **17**:1829-1834.

Inoki, K., Corradetti, M.N., Guan, K.L. (2002). Disregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nature Genetic*. **37**:19-24.

Karin, M. (1992). Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J*. **6**:2581-2590.

Kita, Kwu, Y-P., Sugaya, S., Moriya, T. Nomura, J. Takahashi S., Yamamori, H., Nakajima, N., Suzuki, N. (2000). Search for UV-Responsive Genes in Human Cells by Differential mRNA Display: Involvement of Human Ras-Related GTP-Binding Protein, Rheb, in UV Susceptibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **274**:859-864.

Kinouchi, H., Arai, S., Kamaii, H., Izaki, K., kunizuka, H., Mizoi, K., Yoshimoto, T. (1999). Induction of Rheb mRNA following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuroreport*. **10**(5):1055-1059.

Kwiatkowski, D.J., Zhang, H., Bandura, J.L., Heiberger, K.M., Glogauer, M., el-Hashemite, N., Onda, H. (2002). A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Hum. Mol. Genet*. **11**(5):525-534.

Kwiatkowski, D.J. (2003). Rhebbing up mTOR new insights on TSC1 and TSC2, and the pathogenesis of tuberous sclerosis. *Cancer Biol Ther*. **2**(5):471-476

Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press Inc. New York. Cap. 12, 26.

Li, Y., Corradetti, M.N., Inoki, K., Guan K-L. (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences*. **29**(1):32-38.

Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., Russo, A. (2002). Ras Family Genes: An interesting link between cell cycle and cancer. *Journal of Cellular Physiology*. **192**:125-130.

Mach, K.E., Furge, K.A., Albright, C.F. (2000). Loss of Rhb1, a Rheb-related GTPase in fission yeast, causes growth arrest with a terminal phenotype similar to that caused por nitrogen starvation. *Genetics*. **155**(2):611-622.

Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. **3**(3):1-10

Paduch, M., Jeleń, F., Otlewski, J. (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta biochimica Polonica*. **48**(4): 829-850

Panepinto J.C., Oliver, B.G., Amlung, T.W., Askew D.S., Rhodes, J.C. (2002). Expression of the *Aspergillus fumigatus* rheb homologue, rhbA, is induced by nitrogen starvation. *Fungal Genet Biol*. **36**(3):207-214.

Patel, P.H., Thapar, N., Guo, L., Martínez, M., Maris, J., Gau, C.L. Lengyel, J.A: Tamanoi, F. (2003). *Drosophila* Rheb GTPase is required for cell cycle progresion and cell growth. *J. Cell Sci*. **116**(17):3601-3610.

Saltiel, A.R., Pessin, J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology*. **12**(2):65-71.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Sambrook, J., Russel, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3Rded. Cold Spring, N.Y. ColdSpring Harbor Laboratory Press.

Saucedo, L., Gao, X., Chiarelli, D.A., Li, L., Pan, D., Edgar, B.A. (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nature Cell Biology*. **5**(6):566-571.

Shamji, A.F., Nghiem, P., Schreiber, S.L. (2003). Integration of Growth Factor and nutriente signslng: implications for cancer biology. *Molecular Cell*. **12**:271-280.

Sparagana, S.P., Roach, E.S. (2000). Tuberous sclerosis complex. *Curr. Opin. Neurol*. **13**(2):115-119.

Stocker, H., Radimerski, T., Schindelholz, B., Wittwer, F., belawat, P., Daram, P., Breuer, S., Thomas, G., Hafen, E. (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nature Cell Biology*. **5**(6):559-566.

Tabancay Jr., A.P., Gau, C.L., Machado, I.M., Uhlmann, E.J., Gutmann, D.H., Guo, L., Tamanoi, F. (2003). Identification of Dominant Negative Mutants of rheb GTPase and Their Use to Implicate the Involvement of Human Rheb in the Activation of p70S6K. *J. Biol. Chem*. **278**(41):39921-39930.

Takai, Y., Takuya, S., Takashi, M. (2001). Small GTP-Binding Proteins. *Physiology Review*. **81**:153-208

Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., Blenis, J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene productos, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current Biology*. **13**:1259-1268.

Tortora, G. J. 2002. *Principles of anatomy and physiology*, 7^a edición. Editorial Oxford University. USA.

Urano, J., Tabancay A.P., Yang, W., Tamanoi, F. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Rheb G-protein Is Involved in Regulating Canavanine Resistance and Arginine Uptake. *J. Biol. Chem*. **275**(15):11198-11206.

van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J., Burley, M., Jeremiah, S., Woodward, K., Nahmias, J., Fox, M., Ekong, R., Osborne, J., Wolfe, J., Povey, S., Snell, R.G., Cheadle, J.P., Jones, A.C., Tachataki, M., Ravine, D., Sampson, J.R., Reeve M.P., Richardson, P., Wilmer, F., Munro, C., Hawkins, T.L., Sepp. T., Ali, J.B., Ward, S., Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. (1997) Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*. **277**(5327):805-8.

Williams, A., Ceccarelli, and Wallace. 2001. *Genetic Engineering*. 2nd. Springer. New York.

Ya-Chiejh, H., Joshua, J., Chern, Y.C., Mingyao, L., Kwang-Wook, C. (2008). Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *J. Inest. Dermatol*. **128**(4):980-987.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ARN MENSAJERO QUE CODIFICA A UNA PROTEÍNA RHEB-LIKE

Yamagata, K., Sanders, L.K., Kaufmann, W.E., Yee, W., Barnes, C.A., Nathans, D., Worley, P.F. (1994). *rheb*, a growth factor- and synaptic activity- regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J. Biol. Chem.* **269**:16333-16339.

Yamaguchi, T., Kitagawa, K., Kuraishi, Y. (1998). Itch-associate response and antinociception induced by intracisternal endomorphins in mice. *Jnp. J. Pharmacol.* **78**(3):337-343.

Yang, W., Urano, J., Tamanoi, F. (2000). Protein farnesylation is critical for maintaining normal cell morphology and canavanine resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *J.Biol. Chem.* **275**(1):429-438.

Yang, W., Tabancay Jr., A.P., Urano, J., Tamanoi, F. (2001). Failure to farnesylate Rheb protein contributes to the enrichment of G0/G1 phase cells in the *Schizosaccharomyces pombe* farnesyltransferase mutant. *J. Biol. Chem.* **41**(6):1339-1347.

Yu, Y., Li, S., Xu, X., Li, Y., Guan, K., Arnold, E., Ding J. (2005). Structural Basis for the unique biological function of small GTPase RHEB. *J. Biol. Chem.* **280**(17):17093-17100.

Zadina, J. E., Hackler. L., Ge. L-J., Kastin, A. J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature.* **386**: 499-502

Zhang, H., Cicchetti, G., Onda, H., Koon, H.B., Asrican, K., Bajraszewski, N., Vázquez, F., Carpenter, C.L., Kwiatkowski, D.J. (2003). Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts P13K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J. Clin. Invest.* **112**(8):1223-1233.