

Universidad Nacional Autónoma de México
"Por mi Raza Hablará el Espíritu"

Instituto de Biotecnología
Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Caracterización bioquímica del dominio de unión a nucleótidos cíclicos del intercambiador Na^+/H^+ específico para espermatozoide de mamífero.

Tesis

Francisco Romero Corpus
Dirige: Dr. Takuya Nishigaki.



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.

Este trabajo fue realizado bajo el proyecto DGAPA/UNAM IN211907, IN221110, CONACyT-Mexico 56660 y 128566. Conté con beca de posgrado del CONACyT CVU: romer.fc.

Índice de contenido.

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
I. Introducción.....	7
El óvulo.....	7
El espermatozoide.....	8
Comunicación celular.....	9
La capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosomal.....	10
Capacitación.....	10
Hiperactivación del Flagelo.....	11
La reacción acrosomal.....	12
El calcio.....	13
II. Antecedentes.....	17
Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺	17
Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ expresado específicamente en el espermatozoide (sNHE).....	18
Cyclic Nucleotide Binding Domain: CNBD.....	21
III. Justificación.....	23
IV. Hipótesis.....	24
V. Objetivo General.....	24
Objetivos Particulares.....	24
VI. Materiales y Métodos.....	25
Expresión Heteróloga de proteínas recombinantes.....	25
Escherichia coli.....	25
Células de mamífero.....	26
Comparación de dos sistemas de expresión heteróloga.....	27
Material Biológico.....	28
Ratones CD1.....	28
DH5 α	28
XL1Blue.....	28
BL21(DE3).....	29
CHO.....	29
Plásmidos empleados para la clonación y expresión de las proteínas recombinantes.....	29
Soluciones.....	30
Técnicas.....	30
Separación de Células espermatogénicas por sedimentación.....	30
Extracción de RNA total mediante el método fenol:tiocianato de guanidino:cloroformo.....	32
Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	32
Purificación de DNA mediante geles de agarosa.....	33
Transformación de células quimiocompetentes.....	34
Obtención de cDNA a partir del RNA total mediante RT-PCR.....	34
Reacción en cadena de la polimerasa: la PCR.....	35
Amplificación del fragmento C-terminal del sNHE mediante PCR.....	36
Clonación del C-terminal del sNHE en el vector pJET1.2.....	36
Extracción de DNA plasmídico.....	37
Amplificación de 10 fragmentos del C-terminal.....	38
Amplificación por PCR de los genes de las proteínas fluorescentes CFP, YFP y mCherry.....	38
Purificación y renaturalización de cuerpos de inclusión.....	39
Purificación de proteínas recombinantes por columna de Ni ²⁺	40
Purificación de proteínas de cuerpos de inclusión por Ni ²⁺	40

Cuantificación de proteína recombinante mediante espectroscopía de fluorescencia.....	41
Anisotropía como un reportero de unión.....	42
Expresión del CNBD del sNHE en un sistema heterólogo.....	43
Construcción de un vector que exprese el CNBD en un sistema procarionte y eucarionte.....	43
pRSETb(+)-CFP-CNBD	43
pRSETb(+)-CFP-CNBD-YFP.....	45
pcDNA(-)(proRBS)-CFP-CNBD-YFP.....	46
VII. Resultados.....	48
Clonación del dominio CNBD del sNHE: Purificación de RNA total y rt-PCR.....	48
Clonación del dominio CNBD del sNHE.....	49
Selección de 10 fragmentos diferentes que contienen el dominio predicho del CNBD del sNHE.	49
.....	49
Construcciones quiméricas de 10 fragmentos del CNBD y una proteína Cian fluorescente.....	52
Expresión de la proteína recombinante en E. coli.	57
Ensayo de unión entre CFP-CNBD y 8-Fluo-cAMP.....	58
Construcciones quiméricas de 10 fragmentos del CNBD y dos proteínas fluorescentes en un sistema eucarionte.....	64
Vector de expresión en bacteria y células de mamífero.....	65
Expresión de una proteína recombinante en un sistema procarionte como en un sistema eucarionte.....	66
VIII. Discusión.....	68
Preparación de plásmidos de expresión.....	68
Ensayo de unión.....	69
Estabilidad del dominio citoplasmático en el C-terminal del sNHE.....	70
El complejo del sNHE y sAC.....	71
Función del sNHE en humano y ratón.....	72
IX. Conclusiones.....	73
X. Perspectivas.....	74

Abreviaturas.

[Ca²⁺]_i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina (del inglés, “Bovine Serum Albumin”).
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina (del inglés, “Cyclic Adenosine Monophosphate”)
CatSper	Canal Catiónico del Espermatozoide (del inglés, “Cation Channel of Sperm”)
Cav	Canal de Ca ²⁺ modulado por Voltaje (del inglés, “Voltage-sensitive Calcium channel”)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CFP	Proteína Fluorescente Cian (del inglés, “Cyan Fluorescent Protein”)
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos (del inglés, “Cyclic nucleotide binding domain”)
DAG	Diacilglicerol
EAG	Ether-à-go-go
Em	Potencial de membrana
Epac	Proteína intercambiadora directamente activada por cAMP (del inglés, “Exchange protein directly activated by cAMP”).
ER	Retículo Endoplásmico (del inglés, “Endoplasmic Reticulum”)
ERG	EAG-related gene
FRET	Transferencia de energía resonante (del inglés, “Fluorescent resonance energy transfer”)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (del inglés, “High density lipoproteins”)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología
NHE	Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ (del inglés, “Na ⁺ /H ⁺ exchanger”)
PBC	Casete de unión a fosfato (del inglés, “Phosphate binding cassette”)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pHi	Potencial de Hidrógeno intracelular
PKA	Proteína Cinasas A (del inglés, “Protein Kinase A”)
RA	Reacción Acrosomal
sAC	Adenilato Ciclasa soluble (del inglés, “Soluble Adenylate Cyclase”)
sNHE	Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺ específico de espermatozoide (del inglés, “sperm-specific Na ⁺ /H ⁺ exchanger”)
TM	Transmembranal
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia (del inglés, “transfer Ribonucleic acid”)
Tx-100	TritónX-100
YFP	Proteína fluorescente amarilla (del inglés, “Yellow Fluorescent Protein”)
ZP	Zona Pelúcida

Resumen.

La fecundación es el evento biológico con mayor importancia para la preservación de una especie de reproducción sexual. El espermatozoide es un gameto masculino, cuya motilidad es esencial para llegar al sitio adecuado y fecundar al óvulo. Se sabe que la regulación del pH intracelular (pH_i) es fundamental para la motilidad del espermatozoide. Los intercambiadores de sodio protón (NHE) son proteínas que catalizan el intercambio de Na^+/H^+ a través de la membrana biológica, por lo que juegan un papel crucial en la regulación del pH_i . En el año 2003, Garbers y colaboradores clonaron un NHE específico de espermatozoide (sNHE) y mostraron su importancia para la regulación de la motilidad del espermatozoide generando una línea de ratón nulo del sNHE, lo cual causó infertilidad masculina debido a defectos en la motilidad del espermatozoide. A diferencia de los NHE somáticos, el sNHE tiene un dominio predicho de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) en el carboxilo terminal, lo que sugiere que un nucleótido cíclico regula la actividad del sNHE.

Para determinar si el CNBD supuesto tiene una contribución funcional en este intercambiador, decidimos expresar solamente el dominio citoplasmático del sNHE ya que no se ha logrado expresar funcionalmente la proteína completa en un sistema heterólogo. Primero, clonamos el C-terminal del sNHE desde células espermatogénicas de ratón mediante RT-PCR. Debido a que existe un reporte en el que cambia la estabilidad del CNBD de una proteína sensible a cAMP que intercambia GTP por GMP (EPAC) dependiendo de agregar o eliminar péptidos extremos del CNBD, decidimos preparar 10 distintos fragmentos a partir del C-terminal del sNHE variando 5 sitios en el N- y 2 sitios en el C-terminal del CNBD.

Recientemente, en nuestro grupo desarrollamos un ensayo de unión entre una proteína fusionada con CFP (proteína fluorescente cian) y un análogo de cAMP marcado con fluoresceína (8-Fluo-AMPC) mediante FRET (transferencia de energía entre fluoróforos), el cual nos permite estudiar la interacción molecular por espectrofluorimetría convencional. Para aplicar este método, decidimos fusionar los 10 fragmentos del C-terminal del sNHE con CFP. Además del ensayo de unión, el uso de CFP nos proporciona otras ventajas experimentales: incremento de solubilidad y visualización de las proteínas. La última característica nos facilita estimar el nivel de expresión de proteínas, determinar la concentración de proteína (incluso en una muestra de proteína no purificada) y localizar la proteína en el proceso de la purificación.

Para preparar las 10 construcciones de proteínas quiméricas (CFP-CNBDs) de manera eficiente, construimos una proteína quimérica CFP-mCherry (una proteína fluorescente roja) usando el vector pRSET, el cual genera un alto número de copia en bacteria y tiene el promotor T7. Esta característica nos permite expresar la proteína recombinante en una cepas de *E. coli* (DE3), una cepa que expresa RNA polimerasa T7, como BL21(DE3) sin agregar IPTG. Una ventaja de evitar el IPTG para inducir la expresión de la proteína recombinante destaca en que esta molécula interviene de alguna manera en la formación del cromóforo de la proteína fluorescente indicando así que el plegamiento o el ambiente para la formación del cromóforo se altera. De esta manera, las colonias de *E. coli* con CFP-mCherry brillan de color rojo en caja petri. Posteriormente, sustituimos mCherry por uno de los 10 fragmentos del CNBD por digestión y ligación. Seleccionamos las colonias mediante un código de color: las colonias con el fragmento del CNBD de sNHE brillan verde y las colonias con el plásmido de mCherry siguen brillando de color rojo. Utilizando este sistema, generamos 10 construcciones de CFP-CNBDs de manera muy eficiente reduciendo el costo laboral y el gasto económico de la clonación.

Realizamos el primer intento de la expresión de proteínas con 10 mL de cultivo de bacteria usando 8 construcciones de CFP-CNBDs. Obtuvimos resultados positivos que sugieren la unión específica al cAMP en el ensayo de FRET. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que hubo un error en el procedimiento del ensayo de unión y además confirmamos, con SDS-PAGE, que las proteínas preparadas para el ensayo de unión fueron degradadas. Posteriormente, encontramos que las proteínas completas de todas las construcciones de CFP-CNBDs permanecen

en cuerpos inclusión en bacteria, es decir, que no obtuvimos ninguna proteína completa en la fracción soluble de bacteria usando el método de sonicación.

Con base en lo anterior, intentamos recuperar una proteína soluble y estable de la fracción insoluble a través del tratamiento de desnaturalización con urea y renaturalización por disminución de urea. Aunque CFP se renaturalizó durante este procedimiento, la proteína quimérica se volvió insoluble poco tiempo después de la purificación.

Para incrementar la solubilidad, decidimos fusionar una segunda proteína fluorescente en el C-terminal del CNBD. Utilizando el mismo tipo de sistema de selección por color en caja, generamos 5 construcciones que expresan la proteína recombinante CFP-CNBD-YFP. Sin embargo, tuvimos el mismo problema de solubilidad de las proteínas, lo cual sugiere que el CNBD del sNHE necesita una chaperona para que se pliegue correctamente.

Para expresar la proteína recombinante CFP-CNBD-YFP en un sistema eucarionte, construimos un plásmido quimérico de un vector de expresión en eucarionte pcDNA3.1 insertando el sitio de unión a ribosoma (RBS) de bacteria de pRSET. Usando el nuevo vector, logramos expresar una proteína recombinante tanto en *E. coli* (BL21(DE3)) así como en cultivo de células eucariontes (CHO). Este nuevo sistema nos permite seguir utilizando el código de color para construir de manera eficiente el plásmido en bacteria y posteriormente expresar las proteínas recombinantes en células eucariontes. Actualmente, me encuentro preparando las quimeras que serán transfectadas en el cultivo de células CHO las cuales nos permitirán verificar si la solubilidad de las proteínas recombinantes se verá favorecida.

I. Introducción.

La fecundación es el proceso biológico con mayor importancia para la preservación de una especie de reproducción sexual, la cual depende de un complejo diálogo molecular establecido entre dos gametos haploides, el espermatozoide y el óvulo, para producir un individuo diploide único. Además, ambos gametos deben responder de manera concertada a estímulos fisiológicos para el éxito de la fecundación.

El óvulo.

El óvulo (Figura 1), la célula sexual femenina, posee una gran cantidad de citoplasma, en el cual se encuentran moléculas de herencia materna como: proteínas, ribosomas, tRNA, mRNA y factores morfogenéticos, todos estos elementos necesarios para formar un nuevo individuo ¹.

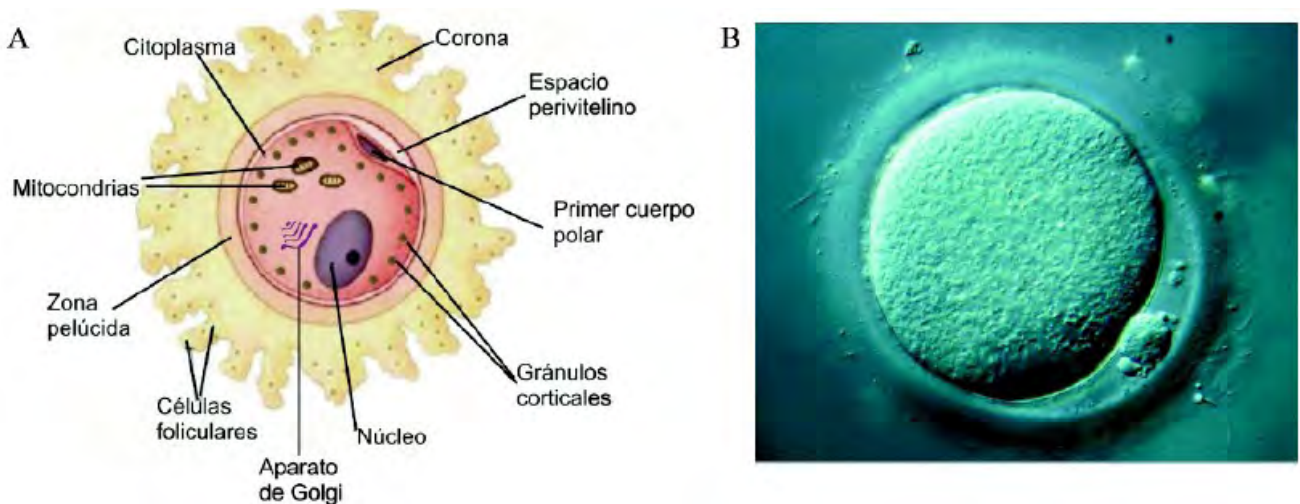


Figura 1. Representación de la célula sexual femenina ¹. En el panel A se señalan las principales estructuras que conforman a este gameto; se muestra que está cubierto por una capa extracelular constituida de glicoproteínas llamada zona pelúcida; ésta, a su vez, está rodeada por células foliculares que forman la capa de la corona. El óvulo posee un núcleo haploide, nucléolo, mitocondrias, aparato de Golgi y gránulos corticales. En el panel B se muestra una micrografía de un óvulo humano.

El espermatozoide.

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se da la diferenciación y maduración de los gametos masculinos que se denominan espermatozoides. En mamíferos este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos que se encuentran en los testículos. En estos túbulos se encuentran las células llamadas espermatogonias, las cuales proliferan continuamente por mitosis, hasta que el organismo alcanza su madurez sexual y entonces estas células dejan de proliferar, aumentan su tamaño y se diferencian en espermatocitos de primer orden. En estos últimos se produce la meiosis I que da lugar a dos espermatocitos de segundo orden, los cuales desarrollan la meiosis II que finalmente resulta en la producción de cuatro espermátidas. Las espermátidas son células haploides que se diferencian en espermatozoides: durante la diferenciación, entre otros cambios, se observa una reducción en el volumen del citoplasma, compactación del DNA (ácido desoxirribonucleico), se forma la cabeza del espermatozoide y las mitocondrias se agrupan en la pieza media del flagelo de la célula (Figura 2). Posteriormente, los espermatozoides se desplazan al epidídimo, donde completan su proceso de maduración y adquieren la capacidad de moverse ².

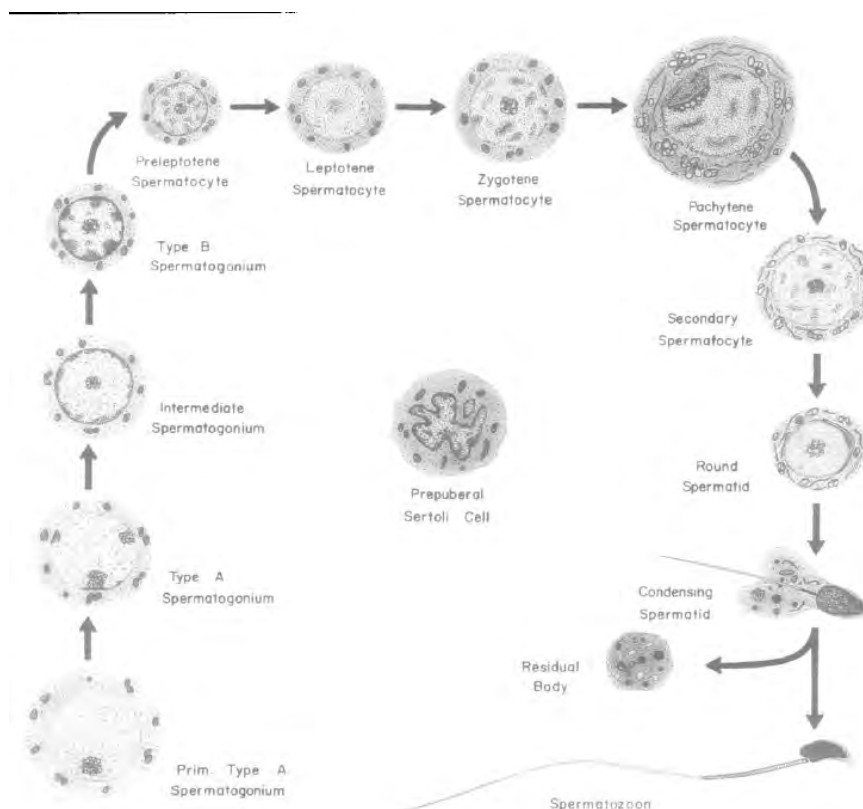


Figura 2. Diagrama esquemático de la espermatogénesis en ratones adultos, se muestra el volúmen relativo y las características anatómicas de las células germinales.

El espermatozoide es la célula sexual masculina (Figura 3), la cual se constituye principalmente por la cabeza y el flagelo. La función del espermatozoide está constituida a fin de cumplir el objetivo de llevar la información genética al óvulo. En la cabeza se encuentra el núcleo haploide en un espacio de aproximadamente 2-5 μm de diámetro. Por arriba del núcleo se encuentra la vesícula acrosomal (vesícula ácida derivada del aparato de golgi) que contiene enzimas hidrolíticas (hialuronidasa y acrosina, entre otras) y proteínas de fusión con el óvulo. Debajo del núcleo se encuentra la envoltura nuclear redundante el cual cumple la función del reservorio de Ca^{2+} como el retículo endoplásmico ³.

El flagelo está formado principalmente por el axonema, el cual es la maquinaria de propulsión del espermatozoide. El axonema posee dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos asociados con dineínas. Las dineínas son ATPasas y motores moleculares como miosina y cinesina que producen la fuerza motriz. El flagelo del espermatozoide se divide en tres partes, representadas en el panel A de la figura 3, 1) la pieza media, 2) la pieza principal y 3) la pieza final. En la pieza media y la pieza principal el axonema está rodeado por la fibra densa externa. Este citoesqueleto está rodeado por mitocondrias en la pieza media, mientras por la vaina fibrosa (otro citoesqueleto compuesto principalmente por AKAP-3 y AKAP-4) en la pieza principal. La pieza final se caracteriza por carecer de mitocondrias y de estos dos tipos de citoesqueleto ⁴.

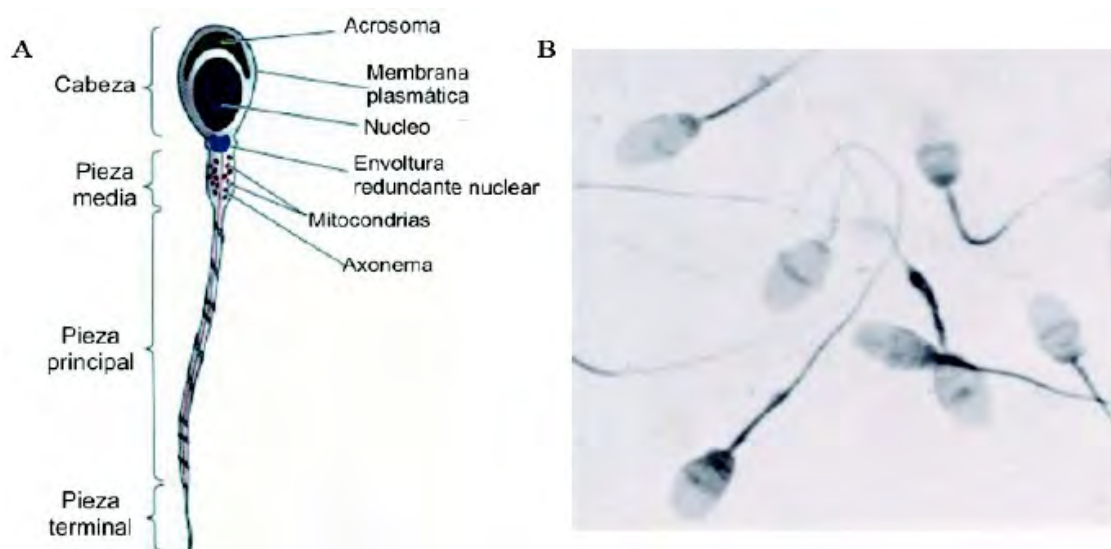


Figura 3. Representación gráfica del espermatozoide de mamífero. En el panel A se indica la cabeza, la pieza media, la pieza principal, la pieza terminal. La cabeza y la pieza media se subdivide en diferentes regiones que se señalan como axonema, mitocondrias, envoltura redundante

nuclear, núcleo, membrana nuclear y acrosoma. En el panel B de la figura 3 se presenta una muestra de espermatozoides de humano bajo el microscopio.

Una característica notoria de esta célula es que posee poco citoplasma y no sintetiza proteínas ni ácidos nucleicos⁵. A pesar de estas restricciones funcionales, el espermatozoide tiene la capacidad de comunicarse con el óvulo y de responder de forma dinámica a los cambios fisiológicos a los que se expone dentro del tracto reproductor femenino.

Comunicación celular.

El término de fecundación es definido como la comunicación celular entre ambas células sexuales, desde la deposición de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino hasta la fusión de los pronúcleos entre los gametos. Este evento está altamente regulado y se divide en varios pasos en relación al espermatozoide, como se muestra en la Figura 4.

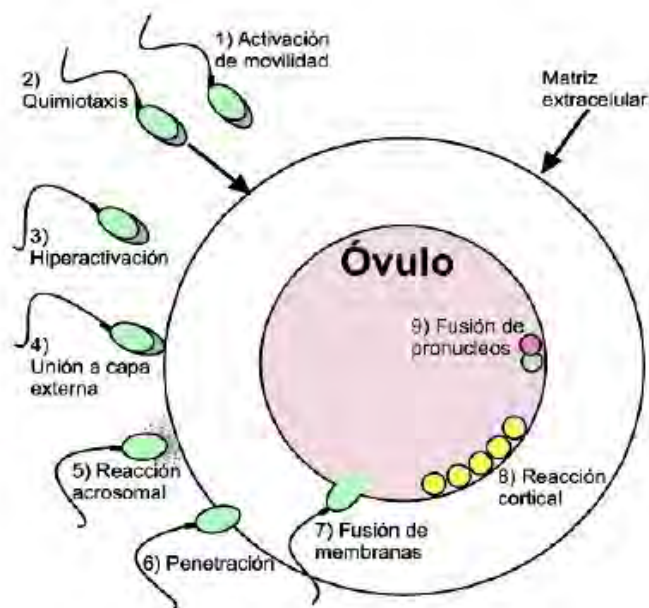


Figura 4. Representación gráfica del proceso de fecundación. 1) Activación de la movilidad, 2) Quimiotaxis, 3) Hiperactivación del flagelo, 4) Unión a la capa externa del óvulo, 5) Reacción acrosomal, 6) Penetración a la capa externa del óvulo, 7) Fusión de las membranas plasmáticas entre el espermatozoide y el óvulo, 8) Exocitosis de los gránulos corticales del óvulo y 9) Fusión de los pronúcleos.

La capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosomal.

El espermatozoide pasa por una serie de cambios fisiológicos en el tracto reproductor femenino como la capacitación, la modulación de la motilidad y la reacción acrosomal. En la regulación de estos eventos, los canales iónicos juegan un papel clave en la transducción de señales ⁶.

Capacitación.

El espermatozoide de mamífero recién eyaculado no tiene la habilidad de fecundar al óvulo y la adquiere después de pasar algunos cambios fisiológicos en el tracto reproductor femenino, lo cual es denominado capacitación. Aunque no se sabe completamente todos los cambios fisiológicos que ocurren durante la capacitación, algunos de los eventos ya identificados son: 1) cambios en el pH_i , 2) cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), 3) cambios en la concentración de cAMP ($[cAMP]$), 4) reorganización de la membrana plasmática ocasionado por la remoción de colesterol; es posible que esto ocurra mediante lipoproteínas de alta densidad (HDL) ⁷, 5) fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas, la cual requiere la actividad de la proteína cinasa A (PKA) de manera indirecta ⁸, 6) hiperpolarización de la membrana plasmática en el espermatozoide de ratón ⁹, 7) cambio en la concentración intracelular de otros iones como bicarbonato (HCO_3^-) y Cl^- . Los eventos ocurridos durante la capacitación son necesarios para la inducción de la reacción acrosomal ⁷.

En la actualidad la capacitación es reproducible *in vitro* en un medio que contenga Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina sérica de bovino (BSA), esta última mimetiza la participación de las HDLs ¹⁰.

Hiperactivación del Flagelo.

En el tracto reproductor masculino previo a la eyaculación, los espermatozoides son quiescentes. Los espermatozoides recién eyaculados muestran un batido flagelar simétrico con una amplitud corta y un nado progresivo. Este patrón de nado se denomina motilidad activada. En contraste, se ha demostrado que en varias especies de mamíferos los espermatozoides aislados de zonas superiores del tracto reproductor femenino presentan una movilidad hiperactivada ¹¹. La

hiperactivación es el proceso por el cual el espermatozoide cambia la forma de batido flagelar y la dirección de la motilidad. Como se representa en la figura 5, en un medio experimental no viscoso un espermatozoide hiperactivado nada en su mismo lugar y no avanza eficientemente debido al batido asimétrico del flagelo. Sin embargo, en un medio viscoso y/o viscoelástico, el espermatozoide hiperactivado muestra un patrón de nado progresivo comparado con el espermatozoide activado. Por lo tanto, se sabe que la hiperactivación es importante para mantener el nado progresivo en el fluido viscoso y facilitar la penetración a la matriz extracelular de las células del *cumulus* y la zona pelúcida. También se sabe que la hiperactivación ayuda al espermatozoide a despegarse del epitelio del istmo del oviducto, conocido como el reservorio de espermatozoide, al momento de la ovulación. Considerando lo anterior, se concluye que la hiperactivación es un proceso esencial para que el espermatozoide fecunde exitosamente al óvulo. Además, existen evidencias que han demostrado que el Ca^{2+} es indispensable para el inicio y el mantenimiento de la movilidad hiperactivada, ya que regula directamente la maquinaria molecular del axonema ¹².

En la actualidad no se ha definido concretamente cómo se inicia la hiperactivación y cuál es su duración; recientemente fue reportado que en espermatozoides de humano la progesterona y la prostaglandina activan un canal de Ca^{2+} esencial para la hiperactivación denominado CatSper. Sin embargo, en el caso de los espermatozoides de ratón, estos ligandos no activan CatSper ¹³, lo cual sugiere que estas moléculas inducen la hiperactivación en el tracto genital femenino de humano y no en el de ratón.



Figura 5. Representación gráfica del cambio de motilidad de un espermatozoide activado y otro hiperactivado. Motilidad Activada: Los espermatozoides recién eyaculados muestran un batido flagelar simétrico con una amplitud corta y un nado progresivo en un medio no viscoso. Motilidad Hiperactivada: Los espermatozoides muestran un batido flagelar asimétrico con una amplitud larga y un nado ruinoso en un medio no viscoso.

La reacción acrosomal.

La reacción acrosomal (Figura 6) consiste en la exocitosis del contenido acrosomal y es esencial en la fecundación de mamíferos. La reacción acrosomal cumple con dos funciones para la fecundación: facilitar la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida y exponer la membrana interna del acrosoma, que posee sitios de reconocimiento para la fusión óvulo-espermatozoide. Por estas razones, en los mamíferos, la reacción acrosomal es un evento indispensable para la fecundación ¹⁴.

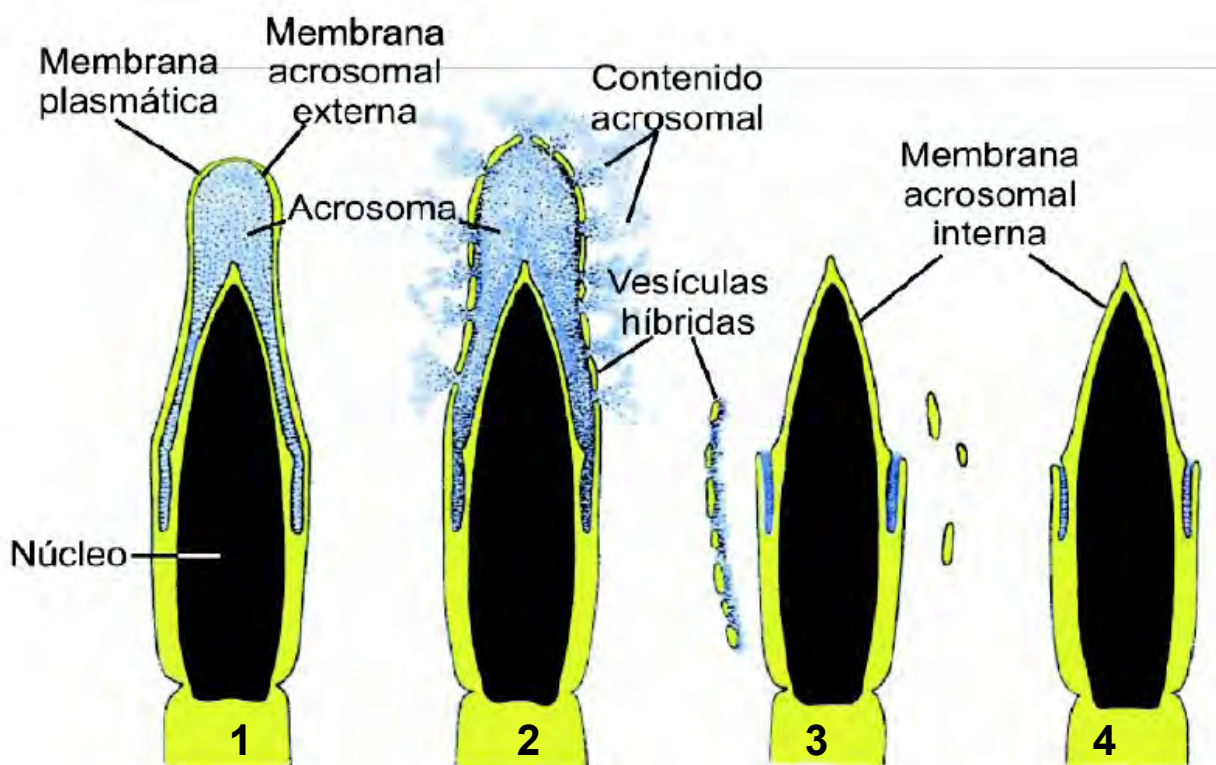


Figura 6. Representación gráfica antes, durante y después de la reacción acrosomal ¹⁵. (1) Durante la reacción acrosomal la membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa, (2 y 3) liberando vesículas que contienen enzimas hidrolíticas que facilitan la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. (4) La membrana acrosomal interna expone sitios de reconocimiento para la fusión óvulo-espermatozoide.

El calcio.

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero crucial en la señalización celular y, en el espermatozoide, regula distintos procesos como la hiperactivación y la reacción acrosomal ¹⁶.

En 2001, Ren y colaboradores descubrieron una nueva familia de canales de Ca^{2+} , nombrados CatSper (Cation channel of Sperm), localizados en la pieza principal del flagelo del espermatozoide e indispensables para la hiperactivación ¹⁷. Notablemente, los ratones transgénicos que carece de este canal padece de esterilidad masculina a pesar de que la cantidad y la morfología de los espermatozoides no están afectadas. Por ahora no se sabe cómo los canales CatSper están conformados estructuralmente en la membrana. Se cree que se oligomerizan cuatro subunidades formadoras de poro, CatSper 1-4, y de tres subunidades auxiliares, CatSper β , CatSper γ y CatSper δ ¹⁸. Cada una de la subunidades formadoras de poro contienen seis segmentos transmembranales del tipo de canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) a comparación con los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente (Ca_v) los cuales se conforman de un sólo polipéptido de 24 segmentos transmembranales ¹⁹.

Usando ratones nulos para cada una de las subunidades de CatSper (excepto para las subunidades CatSper β y CatSper γ), se demostró que se requieren todas las subunidades para generar un canal funcional en el espermatozoide y para fecundar el óvulo. Una de las características más llamativas de la corriente a través de CatSper (I_{CatSper}) es su potenciación mediada por la alcalinización del pH intracelular (pH_i). La subunidad CatSper1 contiene en su amino terminal un dominio rico en histidinas (83 histidinas en 446 residuos del amino terminal), lo cual sugiere que este dominio funciona como un sensor de pH aunque no hay evidencia experimental hasta el momento.

La familia de canales CatSper juega una función muy importante en la modulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el flagelo y por ende en la regulación de la movilidad espermatozoide. La figura 7 muestra una propuesta de los elementos moleculares que participan en la hiperactivación de la motilidad del espermatozoide. Se propone que un transportador de HCO_3^- aumenta la concentración intracelular de HCO_3^- del espermatozoide, lo cual promueve la activación de la adenilato ciclasa soluble. Se sugiere que el aumento de la $[\text{cAMP}]$ intracelular activa directamente un intercambiador de Na^+/H^+ (sNHE) que promueve un cambio en el pH_i . De esta de forma, el cAMP funciona como un activador

indirecto de los canales CatSper permitiendo una entrada de Ca^{2+} al citoplasma. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el flagelo promueve la hiperactivación de la motilidad ¹⁹.

La propuesta ilustrada en figura 7 proviene de las siguientes evidencias experimentales: 1) Los nucleótidos cíclicos permeables a membrana plasmática inducen un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los espermatozoides de ratón silvestre pero no en los espermatozoides de CatSper1 nulo ²⁰. 2) La inhibición de PKA no afecta el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por los nucleótidos cíclicos ²¹, 3) Los nucleótidos cíclicos no activan I_{CatSper} cuando el registro es realizado mediante patch-clamp en la configuración de la célula completa, en la cual el pH_i está amortiguado por la solución interna del micro-pipeta ¹⁹.

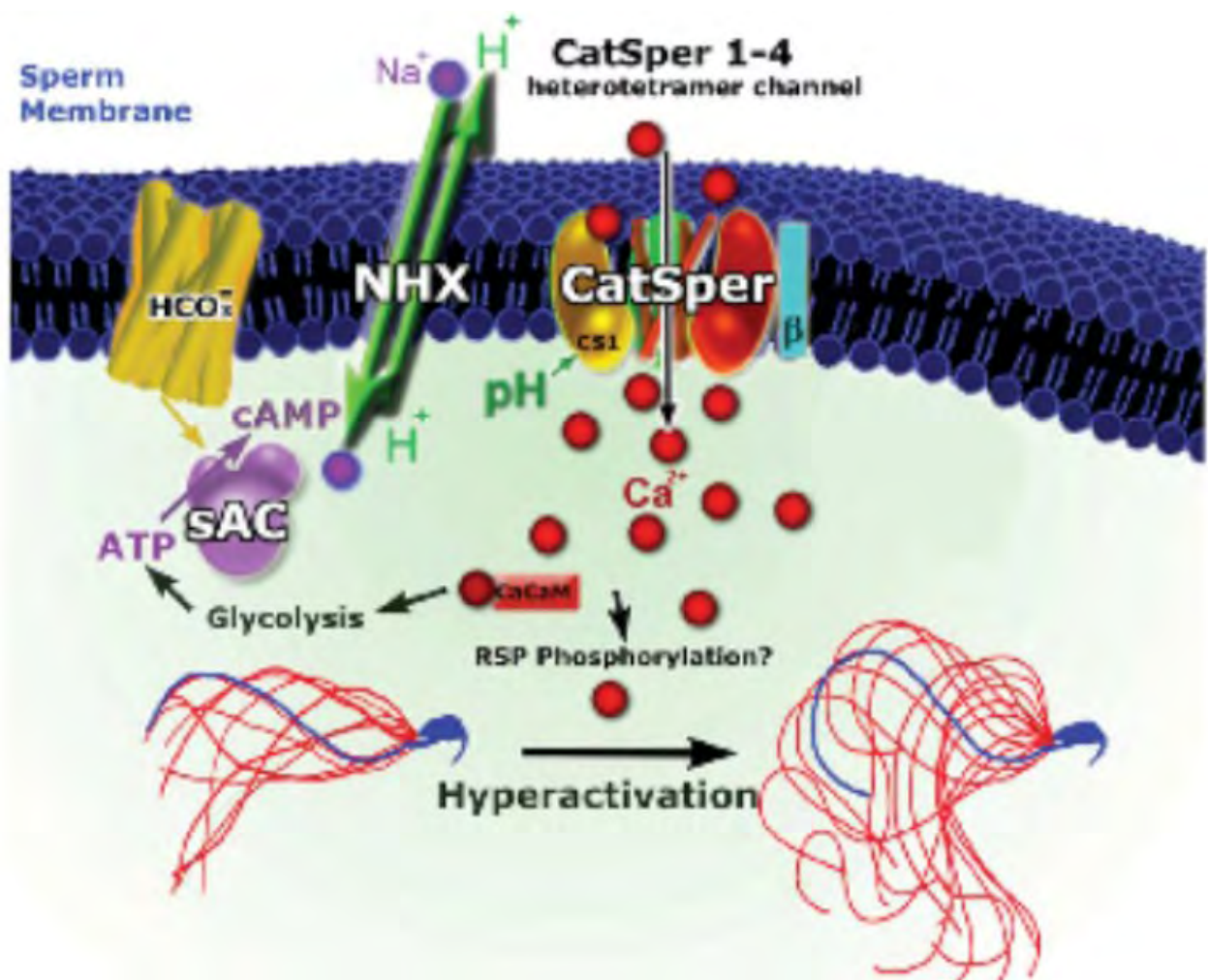


Figura 7. Activación y regulación de los canales iónicos en el espermatozoide durante la hiperactivación ¹⁹.

II. Antecedentes.

Intercambiador de Na^+/H^+ .

En las células, ya sean eucariontes o procariontes, el pH intracelular es un factor decisivo ya que todos los procesos biológicos son dependientes de pH.

Por ejemplo, la actividad enzimática está regulada por el pH_i , un simple evento de protonación en un sitio activo de una enzima puede cambiar la interacción con los residuos vecinos repercutiendo en la afinidad al sustrato. Además, la estabilidad conformacional de las proteínas se ha demostrado que es pH dependiente, es decir, los cambios en el pH_i pueden influir en la carga de las cadenas laterales de los aminoácidos, alterando el plegamiento y la actividad de la proteína ²².

Como se ha descrito, a pesar de que las células tienen una alta capacidad de amortiguar el pH en el citoplasma, el pH_i está regulado por distintos tipos de transportadores iónicos, los cuales controlan principalmente los flujos de H^+ y HCO_3^- . El intercambiador sodio-protón (Na^+/H^+ Exchanger: NHE) es un transportador iónico que cataliza el intercambio de Na^+ por H^+ con estequiometría de 1 a 1. En la membrana plasmática, el NHE incorpora Na^+ sacando H^+ , en condiciones fisiológicas. De hecho esta estrategia biológica se considera la más eficiente para eliminar el exceso de protones producidos en células metabólicamente activas comparada con los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Na^+ -dependientes y bombas de H^+ ATP-dependientes ²³.

En células de mamífero el NHE está localizado tanto en la membrana plasmática como en la membrana de varios organelos aunque su participación en organelos todavía no se ha descrito. A la fecha se han caracterizado nueve isoformas con 25% a 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos entre ellas manteniendo la estructura secundaria. Analizando sólo su estructura primaria, se puede predecir que comparten una topología similar para todas las isoformas; diez segmentos transmembranales en el N-terminal y una región citoplasmática en el C-terminal. A pesar de la precisa organización en la estructura secundaria de los NHE aún no se conoce la estructura terciaria o cuaternaria de esta proteína en la membrana (Orlowski and Grinstein 1997)

De las nueve proteínas reportadas de los NHE, la isoforma 1 (NHE1) es la más estudiada hasta la fecha. El NHE1 está involucrado en numerosos procesos fisiológicos en mamíferos, regulando el pH_i y la concentración intracelular de Na^+ . El NHE1 se estructura de diez segmentos

transmembranales en el N-terminal que funcionan para transportar a los iones y de un C-terminal citoplasmático que regula la actividad del intercambiador y coordina la interacción con el citoesqueleto, en el cual se encuentran sitios de unión a proteínas de citoesqueleto y sitios de unión a anquirinas ²⁴.

Intercambiador de Na⁺/H⁺ expresado específicamente en el espermatozoide (sNHE).

Por mucho tiempo ha sido considerado que el pH_i es un regulador crucial en la motilidad del espermatozoide de los vertebrados así como el de los invertebrados ²⁵. Se había predicho que el espermatozoide tiene un NHE particular el cual podría funcionar como posible candidato molecular que regule el pH_i ²⁶. En el año 2003, el grupo de Garbers reportó un nuevo intercambiador de Na⁺/H⁺ en el espermatozoide (sNHE), el cual se localiza en la pieza principal del flagelo ²⁷. Este intercambiador se expresa exclusivamente en células germinales masculinas a partir del estadio de espermátida condensante. A diferencia del resto de los NHE de las células somáticas, el sNHE está constituido de 14 segmentos transmembranales (TMs) predichos mediante bioinformática (Figura 8), incluyendo un posible sensor de voltaje (TM 11-14) con un alto grado de similitud con el sensor de voltaje de los canales Ca_v. Además, en su C-terminal el sNHE tiene un posible dominio de unión a nucleótidos cíclico (CNBD: cyclic nucleotide binding domain) en vez de sitios de unión a proteínas de citoesqueleto o señalizadoras de calcio (CaM).

Al analizar la secuencia de aminoácidos del C-terminal (820-1078) del sNHE de ratón donde se encuentra el CNBD predicho observamos un alto grado de identidad a la secuencia consenso propuesta por Kannan y colaboradores (Alineamiento 1, secuencia señalada en azul y amarillo). Sin embargo es casi imposible predecir si este dominio es funcionalmente activo y tiene importancia funcional para la modulación del sNHE, es decir que la regulación del intercambio de Na⁺/H⁺ se vea regulado mediante un cambio de conformación del dominio al unir un nucleótido cíclico (cNMP).

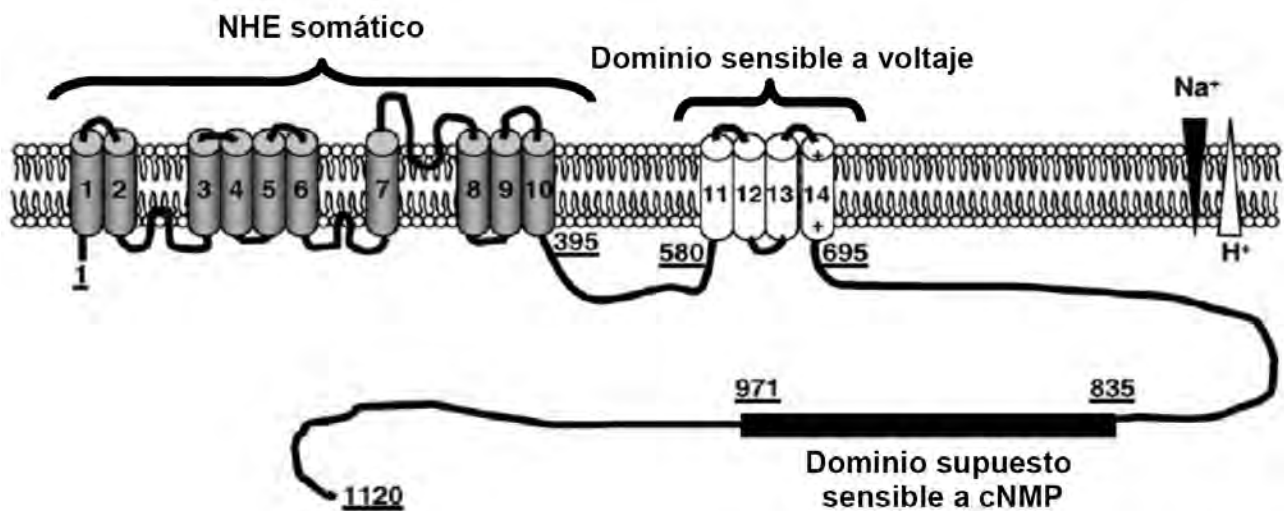
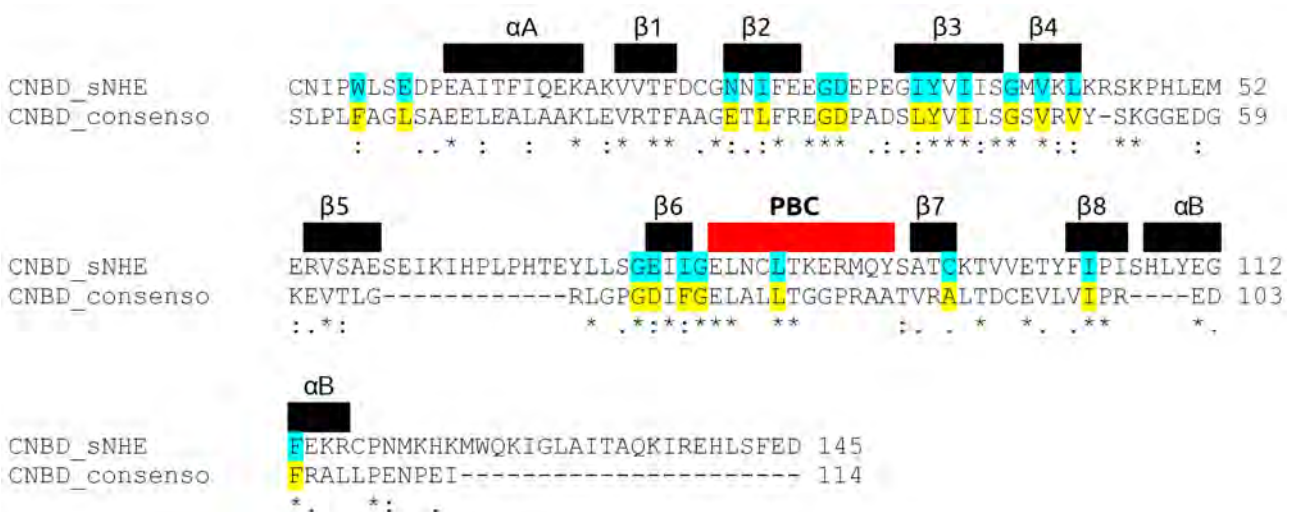


Figura 8. Representación gráfica del sNHE²⁸. El transportador específico para espermatozoide presenta 10 fragmentos transmembranales como los NHE somáticos en el N-terminal. Además, tiene un dominio sensible a voltaje y un dominio supuesto sensible a cNMP en el C-terminal.



Alineamiento 1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del CNBD supuesto del sNHE de ratón y la secuencia consenso del CNBD propuesta por Kannan y colaboradores. La estructura secundaria predicha mediante i-Tasser está señalada con barras negras e identificada como: αA, αB, β1, β2, β3, β4, β5, β5, β6, β7 y β8. El asa que orienta el fosfato del cNMP está señalado con una barra roja (PBC). En color amarillo se observan los aminoácidos que se proponen como la firma de un CNBD. Asteriscos * señalan aminoácidos presentes en ambas secuencias.

Los ratones nulos para el gen de la proteína sNHE muestran espermatozoides con un fenotipo infértil y presentan severas anomalías en la motilidad del flagelo del espermatozoide. No

obstante, mostraron que la adición de cloruro de amonio (NH_4Cl), el cual eleva el pH_i , recupera parcialmente el fenotipo silvestre en la motilidad del flagelo del espermatozoide (Tabla 1). Estos resultados indican que el sNHE juega un papel fundamental en la regulación del pH_i en el espermatozoide de ratón durante el proceso de hiperactivación ²⁸.

Tabla 1. La adición de NH_4Cl recupera el fenotipo silvestre parcialmente ²⁷		
Genotipo del espermatozoide	Tratamiento	Ovocitos fecundados
Silvestre	Ninguno	24/27
sNHE ^{-/-}	Ninguno	0/22
sNHE ^{-/-}	NH_4Cl	8/45

La importancia fisiológica que tiene el sNHE para la fertilidad y la motilidad del espermatozoide lo hace un blanco atractivo para el estudio de la regulación del pH_i del espermatozoide en respuesta a estímulos como cambios en el potencial de membrana plasmática y cambios en la concentración de nucleótidos cíclicos como cAMP y cGMP.

Sin embargo, utilizando las herramientas experimentales actuales, no se puede expresar el sNHE funcional en un sistema heterólogo, lo cual nos impide analizar la actividad del CNBD del sNHE con la proteína completa. Esta limitación técnica nos obliga a hacer el análisis de la modulación del CNBD de manera independiente.

Estudios recientes de Brelidze y colaboradores en el 2009 reportan el análisis funcional del CNBD en los canales de K^+ , mEAG1 (por sus siglas: mouse ether-à-go-go) y hERG1 (por sus siglas: human EAG-related gene). Mediante tres métodos diferentes: dicroísmo circular, la fluorescencia del triptófano y la fluorescencia de un análogo de cAMP (8-NBD-cAMP), analizaron la actividad de unión específica de nucleótidos cíclicos al CNBD aislado de los canales de K^+ . Los resultados indican que no existe unión del cNMP al CNBD del canal mEAG1 y existe unión específica con muy baja afinidad ($K_d > 51 \mu\text{M}$) al CNBD del canal hERG1. Siendo consistentes con sus observaciones, no se observa ningún efecto sobre las corrientes de estos canales al aplicar altas concentraciones de cNMP. Los resultados señalan que no existe modulación por el cNMP sobre la actividad de los canales de K^+ , mEAG1 y hERG1, a pesar de que presentan el CNBD en la

estructura ²⁹. Esto último presentó la oportunidad de analizar a el CNBD de los canales de K⁺ KCNH a nivel estructural. Zagotta y colaboradores, reportaron que el CNBD de los canales de K⁺ KCNH tiene un perfil negativo en la superficie de la proteína lo que repercute en una repulsión de cargas entre el grupo fosfato del cNMP y la carga neta negativa del CNBD. Además, en vez de que el cNMP se una de manera específica en el β-sandwich del CNBD, dos aminoácidos presentes una hoja-β, una tirosina y una leucina, mimetizan la posición del cNMP en el CNBD de los canales de K⁺ KCNH ³⁰. Sin embargo, la presencia del CNBD en el C-terminal sí participa en la actividad de los canales KCNH puesto que al eliminar el CNBD el voltaje medio de activación de los canales KCNH se desplaza de -45.3 mV a -28.3 mV ³⁰. Ante esta posibilidad nos hemos dado a la tarea de investigar la actividad del CNBD aislado del sNHE.

Cyclic Nucleotide Binding Domain: CNBD.

El CNBD es un dominio proteico conservado y ha evolucionado para responder a segundos mensajeros como cAMP y cGMP mediante el cambio conformacional inducido por la unión ³¹. El CNBD es ubicuo tanto en eucariontes como en procariontes, controlando una variedad de funciones intracelulares ³².

Algunos CNBD han sido bien caracterizados en las siguientes proteínas; un factor de transcripción en bacteria denominado CAP (por sus siglas en inglés “catabolic activated protein”), la subunidad reguladora de PKA ³³, el intercambiador de GDP-GTP en GTPasas pequeñas (EPAC) y canales iónicos (CNG y HCN) ³⁴.

La estructura tridimensional del CNBD ha sido determinada por métodos de cristalografía de rayos X. La Figura 9 muestra la estructura general del CNBD: un dominio de 8 hojas β plegadas y de 3 α-hélices. Cabe señalar que la estructura de 8 hojas β, también conocida como β-sándwich, es una estructura bien conservada de los CNBDs. Es importante destacar que en el β-sándwich del CNBD, existe una región clave entre la β6 y la β7 que orienta al grupo fosfato del cNMP durante la unión denominado casete de unión a fosfato (por sus siglas en inglés “phosphate binding cassette” PBC) ³⁵. No existe un consenso establecido en la secuencia de aminoácidos del PBC entre los CNBD, sin embargo hay evidencia de que una arginina (señalado con esferas) es primordial para la correcta orientación del cNMP y por consiguiente la unión con alta afinidad al CNBD ³⁶.

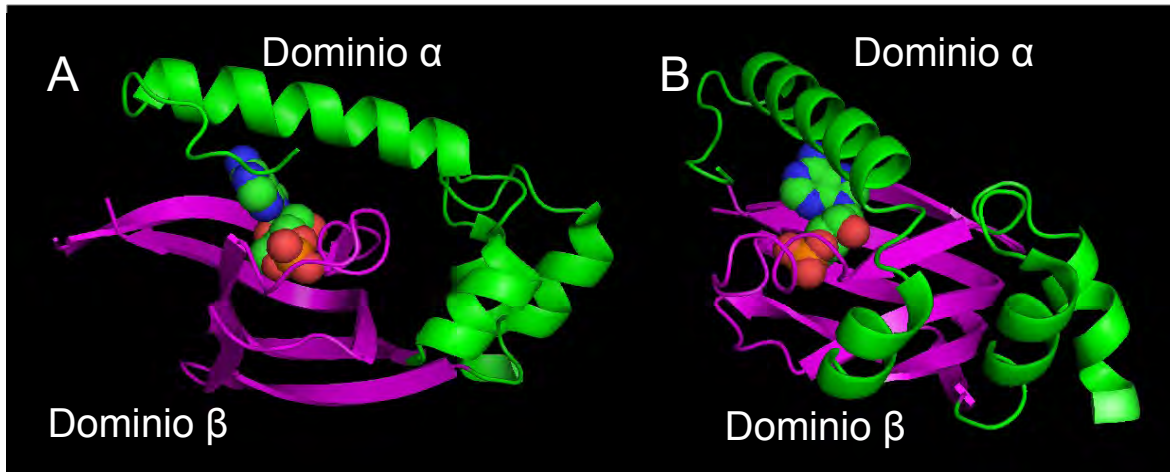


Figura 9. A. Estructura tridimensional del CNBD de la región reguladora de PKA RIIβ B de ratón B. Giro de 90 °C sobre el eje y ³².

La figura 10 resume el modelo de los cambios conformacionales del CNBD inducidos por la unión de cNMP ³⁷.

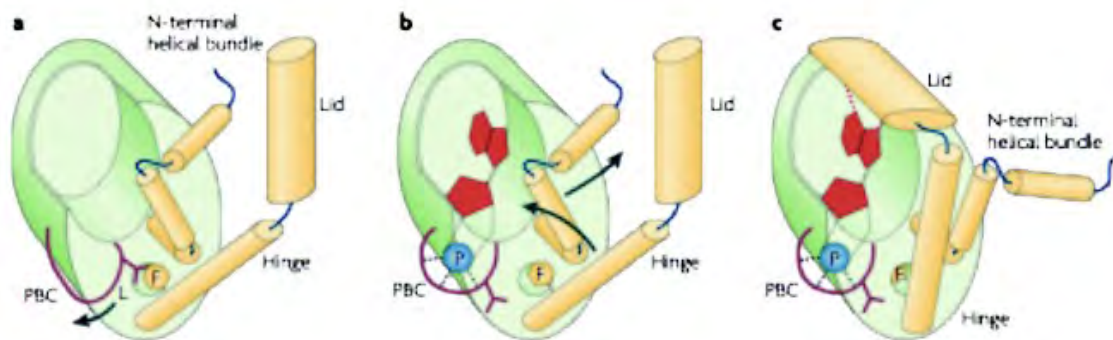


Figura 10. Cambios conformacionales universales de un CNBD. El panel **a** representa el CNBD en ausencia del cNMP. La interacción del grupo fosfato con el CNBD es mediado por el PBC, el cual consiste de una pequeña α hélice y una asa formada entre dos hojas β (β_6 y 7) de un sándwich β . Tres regiones del CNBD llevan a cabo un cambio conformacional posterior a la unión del cNMP (panel **b** y **c**): el PBC, la bisagra con la tapa y el “helical bundle” del N terminal. La orientación de la bisagra es controlada por el PBC debido a que en ausencia del cNMP el movimiento de la bisagra se ve impedido estéricamente por una leucina del PBC. Una vez que la bisagra se mueve, la tapa obtiene la posición correcta y estabiliza la unión específica con el cNMP, proporcionando la selectividad entre el cAMP y el cGMP, lo cual resulta un cambio conformacional importante para modular la actividad de la proteína asociada ³⁷.

III. Justificación.

El análisis bioquímico del dominio de unión a nucleótidos cíclicos del intercambiador Na^+/H^+ específico de espermatozoide es muy importante para poder comprender el mecanismo de alcalinización indispensable durante la capacitación y la hiperactivación de la motilidad en el proceso de fecundación.

El comportamiento del espermatozoide que carece sNHE indica que este intercambiador es esencial para la regulación de pHi en el espermatozoide. Sin embargo, no se ha logrado expresar el sNHE en células en cultivo, lo que impide estudiar sus propiedades bioquímicas. Por lo anterior, el estudio en el espermatozoide es la única manera de caracterizar la función del sNHE en proteína total.

El CNBD predicho del sNHE posiblemente esté influyendo la actividad del intercambiador, es decir que el cAMP o el cGMP regula la actividad del sNHE a través de la unión al CNBD. Recientemente, nuestro grupo desarrolló un método nuevo para realizar un ensayo de unión entre la proteína y un análogo del cNMP fluorescente mediante FRET (transferencia de energía). De esta forma podremos corroborar parte de nuestra hipótesis o de lo contrario demostrar que el CNBD del sNHE no tiene implicación sobre la actividad del intercambiador mediante la unión de cNMP, como en el caso del canal mEAG1 que presenta un CNBD el cual no presenta unión a cNMP en su extremo C-terminal ³⁰.

Como se mencionó anteriormente el CNBD es un módulo de señalización conservado para responder a segundos mensajeros como son cAMP o cGMP. Hasta el momento se han reportado varios sistemas de regulación en mamíferos que responden a la acción del segundo mensajero cNMP, por ejemplo, PKA, PKG, el canal HCN, el canal CNG y Epac ³². El estudio del CNBD del sNHE nos presenta la oportunidad de describir una nueva proteína que es modulada por un dominio funcional de unión a nucleótidos cíclicos. Esta aportación impactará principalmente en el área de la biología celular y la bioquímica.

IV. Hipótesis.

El dominio predicho de unión a nucleótidos cíclicos del sNHE tiene unión específica a cAMP.

V. Objetivo General.

Determinar afinidad dominio predicho de unión a nucleótidos cíclico del intercambiador Na^+/H^+ específico en espermatozoide (sNHE) para entender el mecanismo de regulación de dicho intercambiador.

Objetivos Particulares.

- Clonar la región carboxilo terminal del sNHE que contiene el CNBD predicho mediante rt-PCR y clonar diez fragmentos de DNA variando el tamaño del amino y el carboxilo terminal en un vector de expresión.
- Expresar las proteínas que codifican las quiméricas de CFP-CNBD (CFP: proteína cian fluorescente) en bacteria y determinar la actividad de unión a cAMP, mediante el par FRET: CFP y 8-Fluo-cNMP.
- Corroborar mediante Anisotropia los datos obtenidos en el ensayo de unión tipo FRET.

VI. Materiales y Métodos.

Expresión Heteróloga de proteínas recombinantes.

Para determinar la función de una proteína o de un dominio de ésta es conveniente producir la proteína recombinante en un sistema de expresión heteróloga con células vivas o utilizar la maquinaria de traducción *in vitro*, el cual es un sistema que sintetiza la proteína de manera exógena con alta eficiencia. Para seleccionar un sistema de expresión apropiado, es necesario considerar la característica bioquímica y el origen de la proteína que quiere expresar y las características de sistemas de expresión con los que actualmente contamos. En los últimos 30 años se han obtenido considerables avances tecnológicos y científicos sobre la expresión heteróloga de proteínas recombinantes principalmente en cuatro sistemas: *Escherichia coli* y células de mamífero.

Escherichia coli.

Escherichia coli fue descrita en 1885 por el bacteriólogo alemán Theodore von Escherich; es quizá la enterobacteria más estudiada. *E. coli* es una procarionte en forma de bastón con una dimensión de 2.0 µm de largo y 0.5 µm de diámetro, Gram-negativo, anaerobia facultativa y no genera esporas en condiciones adversas de crecimiento³⁸. Este sistema de expresión heteróloga fue el primer sistema utilizado para expresar proteínas recombinantes y es considerada actualmente como el hospedero de excelencia en el campo de proteínas. El sistema de *E. coli* es rápido y sencillo, comparado con otros sistemas, debido a que su tiempo de duplicación es corto y el medio de crecimiento es económico. Normalmente la proteína es dirigida directamente al citoplasma o al periplasma³⁹. Sin embargo, la alta producción de una proteína provoca agregados insolubles de las proteínas recombinantes denominados cuerpos de inclusión, lo que se convierte en un obstáculo significativo para obtener una proteína soluble y activa. Los cuerpos de inclusión han sido observados no sólo con proteínas de origen eucarionte sino también con proteínas de origen procarionte. La formación de cuerpos de inclusión de proteínas eucariontes se atribuye, por lo menos, a que la tasa de traducción en *E. coli* es 10 veces más alta comparada con la observada en células eucariontes, sí la tasa de plegamiento es más lenta en relación a la tasa de traducción entonces se promueve la formación de regiones que no son estables expuestas al ambiente hidrofílico favoreciendo se agreguen entre ellas y formen complejos insolubles⁴⁰.

Para maximizar la producción de proteína recombinante soluble y minimizar la formación de cuerpos de inclusión se han descrito diversas metodologías experimentales. El método más sencillo es disminuir la temperatura durante el periodo de expresión dentro del rango de 15-30 °C, lo cual implica que la tasa de traducción se disminuye. Además, a baja temperatura se ve disminuida la actividad de proteasas inducidas por un estímulo de “heat shock”⁴¹. Algunos grupos han coexpresado chaperonas de plegamiento durante la expresión de la proteína recombinante con la finalidad de promover la solubilidad, aunque es necesario probar una batería de chaperonas para cada proteína recombinante⁴².

Otra alternativa para promover la solubilidad es fusionar la proteína recombinante con otra proteína que se tenga antecedente de que favorece la solubilidad, ya sea en el extremo N- o C-terminal de la proteína recombinante. En la actualidad contamos con la Glutathión S transferasa (GST), la tioredoxina, la proteína de unión a maltosa (MBP), SUMO y NusA. Además, algunas de estas proteínas tienen la ventaja de facilitar la purificación por afinidad: GST y MBP. En algunos casos, una sola fusión no funciona para aumentar la solubilidad y es necesario evaluar un patrón expresión con múltiples marcas⁴³.

Por otra parte, *E. coli* es una bacteria ineficiente en la formación de puentes disulfuro cuando las proteínas recombinantes son expresadas en el citoplasma puesto que normalmente la formación de los puentes disulfuro ocurren en el periplasma. Finalmente, es importante reconocer que el sistema de expresión procarionte tiene una capacidad limitada para realizar modificaciones postraduccionales comparado con los organismos eucariontes. Por ejemplo: *E. coli* no tiene la maquinaria enzimática para realizar modificaciones del tipo N-glicosilación, O-glicosilación, amidación, hidroxilación, miristoilación, palmitación y sulfuración⁴⁰.

E. coli ofrece un mejor rendimiento de la producción de proteínas recombinantes sencillas. Por otra parte, este sistema no cubre con los requerimientos postraduccionales, por lo que manifiesta una gran desventaja para expresar proteínas eucariontes.

Células de mamífero.

Las células de mamífero son consideradas como un sistema de baja eficiencia para expresar proteínas recombinantes. Sin embargo, existen ventajas significativas para algunas proteínas. Por ejemplo, la transfección y expresión de anticuerpos recombinantes en células de ovario de hámster

chino (CHO) o en células de riñón de embrión humano (HEK293) superan el nivel observado *E. coli*, *P. pastoris* o células de insecto SF9. La línea celular HEK293 es una línea derivada de células de riñón de embrión de humano transformadas con adenovirus. Esta línea celular puede tener una eficiencia de transfección mayor al 80% usando ciertos lípidos catiónicos, fosfato de calcio o polietilenaminas como reactivos de transfección ⁴⁴. El sistema de expresión en células de mamífero requiere de medios de cultivo costosos, requerimientos nutricionales especiales durante la expresión, durante el crecimiento y durante la manutención, así también de equipo especial y sofisticado para evitar contaminaciones ⁴⁵.

Las células de mamífero, de los cuatro sistemas que se comparan, tienen el mecanismo más robusto durante el plegamiento de las proteínas y la formación de puentes disulfuro. Por lo anterior, el sistema de expresión de células de mamífero se ha considerado como el mejor sistema para obtener proteínas recombinantes de mamíferos glicosiladas correctamente.

Comparación de dos sistemas de expresión heteróloga.

Comparando los cuatro sistemas descritos previamente se puede concluir que cada sistema de expresión tiene ciertas ventajas y desventajas sobre la expresión de proteínas recombinantes de interés. A continuación se muestra una tabla comparativa (Tabla II) de los cuatro sistemas de expresión heteróloga más conocidos en la cual se en listan las propiedades importantes de cada sistema:

Tabla 2. Comparación entre dos sistemas de expresión heteróloga.		
Característica	<i>E. coli</i>	Células de mamífero
Costo de cultivo.	Bajo	Alto
Formación de puentes disulfuro.	No	Sí
Regulación de plegamiento.	No	Sí
N-glicosilación	No	Sí
O-glicosilación	No	Sí
Otras modificaciones postraduccionales.	No	Sí

Material Biológico.

Las cepas que fueron utilizadas en este trabajo para la producción de DNA plasmidico y para la producción de proteína recombinante son detalladas en la tabla 2.

Tabla 3. Cepas de <i>E. coli</i> , cepa eucarionte y de ratón utilizadas en este trabajo.		
Cepa	Genotipo	Fuente
Ratones CD1	CrI:CD1(ICR)	Bioterio del IBT- UNAM
<i>E. coli</i> DH5 α		Dr. Agustin López
<i>E. coli</i> XL1Blue		Dra. Alejandra Bravo
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	λ DE3	Dra. Susana López
Cultivo celular CHO		Dra. Susana López

Ratones CD1.

El origen de los ratones CD1 data desde 1926 en el laboratorio del Dr. de Coulon en el Centro Romand contra el cáncer en Lausanne, Suiza. Son ratones albinos que son utilizados como modelo de estudio en múltiples propósitos. En este trabajo fueron requeridos para separar por sedimentación las células Espermatogénicas de los testículos.

DH5 α .

Esta cepa del serotipo de *E. coli* tiene la característica de servir como hospedero de vectores de DNA para ser amplificados y conservarlos a bajas temperaturas.

XL1Blue.

Esta cepa del serotipo de *E. coli* tiene la característica de servir como hospedero de vectores de DNA para ser amplificados y conservarlos a bajas temperaturas.

BL21(DE3).

La bacteria BL21(DE3) es una cepa de *E. coli* la cual puede expresar una proteína recombinante que esté bajo el promotor T7 del bacteriófago λ . No todas las cepas de *E. coli* pueden expresar un gen bajo este promotor, ya que deben tener en el cromosoma el gen de la RNA polimerasa T7 dependiente. Este gen se induce con Isopropil- β -D1-tiogalactopiranosido (IPTG). Sin embargo la inducción no es necesaria para plásmidos que generan alto número de copias en bacteria ⁴⁶ ya que la cepa cuenta con cierto nivel de expresión de fuga de la RNA polimerasa T7 dependiente para expresar las proteínas recombinantes clonadas en los plásmidos.

CHO.

Las células de hámster chino de ovario (CHO) son las células de mamífero más utilizadas para transfección, expresión de proteínas recombinantes y producción de proteínas recombinantes a gran escala, fueron introducidas en el área en 1963 como el primer cultivo en monocapa, lo que facilita su manipulación. Para la células CHO se recomienda utilizarlas no por más de 45 pases y en condiciones de bioseguridad número dos. No son resistentes a ningún antibiótico ⁴⁴.

Plásmidos empleados para la clonación y expresión de las proteínas recombinantes.

Para las construcciones que fueron diseñadas para este trabajo, se optó manipular los genes de las proteínas recombinantes en vectores específicos para amplificar, almacenar y expresar las construcciones. A continuación se muestra una tabla de los vectores que fueron utilizados en este trabajo y se detalla que características conforman a cada vector (Tabla 3).

Tabla 4. Comparación entre los vectores que fueron utilizados en este trabajo.

	Vector		
	pJET 1.2	pRSETb(+)	pcDNA 3.1(-)
Proveedor	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen
Tamaño	2.0 Kb	2.8 Kb	5.0 Kb
Resistencia a Antibiótico	Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina/Kanamicina/ Neomicina
Promotor	Sin promotor	T7 fago λ	T7 fago λ y Citomegalovirus (CMV)
Otro	Almacenar y Amplificar.	Almacenar y expresar en procarionte.	Almacenar y expresar en eucarionte.

Soluciones.

Krebs 10X

KH ₂ PO ₄	12 mM
NaCl	1.2 M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 M
D·glucosa	100 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	12.85 mM
KCl	47.8 mM
Disolver en H ₂ O estéril	
Filtrar.estéril	

Krebs bicarbonato 20X

NaHCO ₃ ⁻	500 mM
Disolver en H ₂ O estéril	
Filtrar.	

Técnicas.

Separación de Células espermatozóicas por sedimentación.

Solución Glu-Pen-Strip 100X

L-Glutamina\Na ⁺	51.32 mM
Penicilina G	7.72 mM
Estreptomicina	8.60 mM
Disolver en H ₂ O estéril	
Filtrar.	

DNAasa I · Krebs

20 μ g/mL

BSA (Invitrogen)

Tripsina (Invitrogen).

Colagenasa (Invitrogen).

Inhibidor de Tripsina (Invitrogen).

La velocidad de sedimentación de una célula esférica es dependiente de la densidad de la célula y la del medio, dada en una relación matemática se define que a menor volumen menor densidad celular y vice versa. Esta relación se ha verificado experimentalmente para fines prácticos en la separación de los distintos estadios de diferenciación celular durante espermatogénesis que difieren principalmente por el tamaño ².

Separamos células espermatogénicas redondas, condensantes y paquitenos del resto de los tipos celulares presentes en el testículo de ratón mediante un gradiente de discontinuo de BSA (0.2%-4%).

Se sacrificaron de 25 ratones de 12 semanas de edad por dislocación en la columna y extrajeron los testículos asegurando que el testículo no tenía epidídimo y el menor contenido de grasa con unas tijeras de disección. Los testículos se suspendieron en solución Krebs 1X y se lavaron por decantación cuatro veces. Con la ayuda de una tijeras de disección evitando la formación de protoplastos se retiró de los testículos la túnica albugínea.

Los testículos sin la túnica albugínea se colocaron en 40 mL de Krebs 1X y 0.5 mg/mL de colagenasa y se incubó en agitación a 33 °C hasta que los túbulos seminíferos se disgregaron completamente. La suspensión se sedimentó en hielo y se lavo por decantación en tres ocasiones con Krebs 1X.

La suspensión se incubó en 40 mL de Krebs 1X, 0.5 mg/mL de tripsina y 2.5 µg/mL de DNAasa y se incubó en agitación a 33 °C durante 15 min hasta observar que los túbulos seminíferos se han disgregado por completo.

Utilizando una maya NiteX se filtro la solución sobre una suspensión de BSA 0.5% y se centrifugo a 4 °C a 1000xg durante 10 min posteriormente se lavó con BSA 0.5% y se repitió este procedimiento dos veces.

Sobre un gradiente continuo de BSA 0.5% - BSA 4% se cargó el material filtrado. Con la ayuda de un rayo rojo se verificó que la muestra comenzaba a eluir ya que el paso de la muestra genera dispersión de la luz.

Se colectaron fracciones (2 mL) y se observó cada fracción al microscopio de contraste de fases, corroborando así las fracciones que pertenecían a cada estadio de diferenciación celular de espermatogénesis.

Se centrifugó a 4 °C a 1000xg durante 10 min las fracciones del mismo estadio de diferenciación celular. Para extracción de RNA, se resuspendió la pastilla de células en dos volúmenes de Trizol (Fenol:Tiocianato de Guanidino:Cloroformo 1:2:1) y se conservó la muestra a -70 °C por 24 h.

Extracción de RNA total mediante el método fenol:tiocianato de guanidino:cloroformo.

El reactivo de Trizol (Invitrogen 15596-026) se compone de tiocianato de guanidino, fenol y cloroformo; la mezcla permite separar por ultracentrifugación proteínas, DNA y RNA aprovechando las propiedades bioquímicas de cada macromolécula, quedando el RNA total en la fase acuosa, las proteínas en la fase orgánica y el DNA en la interface.

Se descongeló la pastilla y se agregó 0.2 mL de cloroformo por cada mL de suspensión total; se centrifugó a 4 °C a 12,000xg durante 15 min. Posteriormente se mezcló vigorosamente y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

Se recuperó la fase incolora y se agregó 0.5 mL de isopropanol por cada mL de suspensión total, se centrifugó a 4 °C a 12,000xg durante 10 min. Se prosiguió por remover el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol·DEPC por mL de suspensión total. Se centrifugó a 4 °C a 7,500xg durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Cuando el etanol·DEPC se secó por completo se resuspendió la pastilla en 50 µL de H₂O·DEPC.

Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

Una estrategia indispensable experimental para corroborar que las construcciones generadas en este trabajo fue el análisis del patrón de digestión de plásmidos por nucleasas de restricción mediante la electroforesis de DNA en gel de agarosa. Esta metodología se basa en la separación de

fragmentos de DNA sometidos a un campo eléctrico en presencia de un polímero de agarosa que juega el papel de malla que dificulta la migración hacia el cátodo. La técnica de separación de fragmentos por electroforesis en geles de agarosa permite también separar y recuperar un fragmento específico para operaciones posteriores. La velocidad de migración del DNA depende de varios parámetros, tales como la longitud de DNA, su conformación estructural, la densidad de la agarosa, la composición iónica y el pH del buffer y la intensidad de la corriente aplicada. La carga neta negativa del DNA permite su migración en un campo eléctrico hacia el ánodo a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Así, mientras más pequeña es una molécula de DNA más fácilmente migrará a través del gel. La separación simultánea de un marcador de peso molecular conocido permite establecer, por comparación del patrón de bandas, el peso molecular de una muestra ⁴⁷. Para visualizar las bandas de DNA en la cámara de electroforesis, utilizamos un colorante que se intercala en el DNA (Gel/Green, 41004 Biotium) y observamos la fluorescencia del complejo DNA-Gel/Green excitando con una luz azul con una lámpara de LED y seleccionando la fluorescencia con una placa de color naranja la cual juega el papel de un filtro óptico. SybrGold (MP 11494, Invitrogen) es el colorante más sensible en el mercado, pero afecta el patrón de la migración del DNA si se utiliza en geles preteñidos.

Purificación de DNA mediante geles de agarosa.

Para recuperar un fragmento de DNA separado por electroforesis se ha implementado el kit comercial Zymoclean™ Gel DNA recovery de la compañía Zymo. Esta técnica está constituida por cuatro etapas:

1. Solubilizar el fragmento del gel. Se cortó el gel de agarosa donde se localice el fragmento de DNA que se desea purificar. El fragmento de gel de agarosa se disolvió a 45 °C y el DNA que contiene es liberado de la malla en el que se encuentra.
2. Retener el DNA en la columna de sílice. En esta etapa el DNA es unido a la sílice en presencia de alta concentración de sales, pH 7.4, mientras que el resto de la agarosa se eluyó pasa a través de la columna.
3. Lavado de la columna. En esta etapa se limpian eficientemente las impurezas como sales, nucleótidos sin incorporar, agarosa, colorante, etc.
4. Elución de DNA. En esta etapa se eluyó el DNA asociado a la membrana con agua grado biología molecular.

Transformación de células quimiocompetentes.

Para amplificar las distintas construcciones que se realizaron en este trabajo, las ligaciones resultantes fueron transformadas en células bacterianas *E. coli* XL1Blue y DH5 α . Para expresar las proteínas recombinantes que fueron generadas en este trabajo se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3) y la cepa eucarionte CHO.

Las cepas bacterianas fueron capacitadas para ser transformadas con las construcciones de DNA mediante el protocolo de transformación con CaCl_2 .

A partir de un inóculo crecido a 37 °C de la cepa de *E. coli* durante toda la noche en LB sin antibiótico se hizo una dilución 1:50 en medio de cultivo fresco, LB sin antibiótico, y se incubó a 37 °C hasta la fase exponencial temprana, es decir, hasta una densidad óptica entre 0.2-0.3 determinada a 600 nm. Se incubó un volumen de cultivo por 10 min en hielo y se centrifugó a 3000xg durante 10 min a 4 °C. A continuación se resuspendió la pastilla en la mitad del volumen con CaCl_2 50 mM frío y estéril y se centrifugó la suspensión en las mismas condiciones. Finalmente se resuspendió la pastilla en un volumen de CaCl_2 que representa 1/20 del total del volumen inicial. Esta suspensión se incubó en hielo por 24 h antes de la transformación ⁴⁸.

Obtención de cDNA a partir del RNA total mediante RT-PCR.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción y se incubó a 65 °C durante 5 min

Oligonucleótido Tak91 10 mM	2 pmoles
(Anexo I)	
RNA total	1 μg -5 μg RNA total
dNTPS 10 mM	0.8 mM
H ₂ O·DEPC	Ajustar a 12 μL

La reacción se incubó en hielo y se agregaron posteriormente los siguientes reactivos, la reacción final se incubó a 42 °C durante 2 min.

Buffer 5x SuperScriptII RT	1X
DTT 0.1 M	9.5 mM
RNAasa Out	1 μl

Una vez terminado el tiempo de incubación se agregó 1 μL de DNA polimerasa RNA dependiente SuperScriptII RT (1u/ μL) y se incubó a 42 °C durante 50 min para activar la DNA polimerasa RNA dependiente. Al termino de este periodo se incubó a 70 °C durante 15 min para inactivar la DNA polimerasa RNA dependiente y se agregó 1 μL de RNAasa H para degradar el RNA total. Finalmente, se incubó a 37 °C durante 20 min para activar la RNAasa H.

Reacción en cadena de la polimerasa: la PCR.

Para realizar las construcciones de DNA generadas en este trabajo fue necesario amplificar distintos fragmentos de DNA que constituyen distintos genes y vectores; con la finalidad de cumplir con este objetivo se hizo uso de la técnica “Reacción en cadena de la polimerasa” conocida como PCR por su acrónimo en ingles “Polymerase Chain Reaction”. Esta técnica de biología molecular fue desarrollada en 1988 por Gelfand y colaboradores, cuyo objetivo era obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un número mínimo de copias del templado

49

Esta técnica se fundamenta en la propiedad bioquímica de la DNA polimerasa DNA dependiente. En la actualidad contamos con DNA polimerasas que pueden ser activadas a cierta temperatura y resistir sin perder actividad a la temperatura donde el DNA se desnaturaliza. La técnica consta de tres fases primordiales: 1) Desnaturalización del templado, el templado o molde es desnaturalizado por completo para que los oligonucleótidos tengan acceso a su secuencia complementaria. 2) Alineamiento de oligonucleótidos, los oligonucleótidos tienen acceso a la secuencia complementaria en el templado y se mantienen unidos hasta que la polimerasa tenga acceso y comience su tarea. 3) Polimerización de DNA, la polimerasa se encuentra en su temperatura óptima de operación y es entonces donde comienza el proceso de polimerización de la secuencia complementaria del templado a partir del oligonucleótido unido. Durante estas tres etapas se requiere de una temperatura óptima. Esta rampa de temperaturas es mediada por un termociclador que controla la temperatura y evita que se evapore la reacción utilizando una tapa caliente a 110 °C.

Existe una batería amplia de polimerasas termosensibles de la cual nos hemos valido de dos principalmente. La polimerasa VentPol de New England Biolabs, la cual tiene la particularidad de dejar a los fragmentos con los extremos rasurados en una relación 99:1, tiene una tasa de error

sustancialmente más baja comparándola con la tasa de error de la TaqPol; esta enzima fue utilizada para amplificar todos los fragmentos de DNA que tenían como destino corroborar la secuencia, el marco de lectura y expresar proteína. Por otra parte, se utilizó la TaqPol de Invitrogen, la cual tiene la particularidad de dejar a los fragmentos con los extremos poli timinados en una relación 99:1; esta enzima fue utilizada para amplificar y corroborar inserciones mediante PCR de colonia o en DNA plasmídico

Amplificación del fragmento C-terminal del sNHE mediante PCR.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Oligonucleótido Tak91	0.2 μ M
Oligonucleótido Tak92	0.2 μ M
cDNA	2.5 μ L
Buffer ThermoPol 10X	1X
Mg ₂ Cl 100 mM	6 mM
dNTPs 10 mM	200 μ M
VentPol	1 u
H ₂ O	Ajustar a 50 μ L

Se corrió el siguiente programa en un termociclador de tapa caliente ajustando el número de ciclos, temperatura y tiempo.

1 Ciclo	Desnaturalización del templado	95 °C	2 min
30 Ciclos	Desnaturalización del templado	95 °C	30 seg.
	Alineamiento de oligonucleótidos	55 °C	30 seg.
	Polimerización de DNA	72 °C	1 min/Kb.
1 Ciclo	Polimerización de DNA	72 °C	10 min

Clonación del C-terminal del sNHE en el vector pJET1.2.

Se preparó la siguiente reacción de ligación en hielo:

Buffer de Reacción 2X	1X
Producto de PCR	1 μ L
pJET1.2/Blunt	0.05 pmol
T4DNA Ligasa	1 μ L
Agua	Ajustar a 20 μ L

Se incubó la mezcla de ligación a temperatura ambiente por 5 min.

Al producto de esta ligación, pJET1.2/Blunt y CNBD, se nombró pJET-CNBD.

Extracción de DNA plasmídico.

En este trabajo se empleó un kit comercial GeneJet plasmid miniprep kit de la compañía ThermoScientific^R que se fundamenta en la lisis alcalina de células bacterianas, seguido de una adsorción de DNA plasmídico a la silica en presencia de una alta concentración de sales. En general el procedimiento consta de dos etapas ⁴⁷:

I. Lisis alcalina.

El cultivo de células procariontes son lisadas bajo condiciones alcalinas con una solución que posee docecil sulfato sódico (SDS) (1%) y NaOH (0.2 N) en presencia de RNAsa A (1 mg/mL). El papel del SDS es solubilizar los fosfolípidos y componentes proteicos de la membrana celular produciendo la liberación de los componentes celulares, mientras que las condiciones alcalinas desnaturalizan el cromosoma y los plásmidos liberados, así como las proteínas. El tiempo de lisis optimizado permite la liberación máxima del DNA plasmídico sin ser contaminado con DNA cromosómico. El lisado es subsecuentemente neutralizado con una solución de acetato de potasio (3 M, pH 4.8) y ajustado a condiciones de unión de alta fuerza iónica. En este paso, el DNA plasmídico vuelve a renaturalizarse y permanece en solución, mientras que la mayor parte del DNA cromosómico, restos celulares y proteínas precipitan junto con el SDS, el cual forma una sal de potasio

II. Adsorción y elución.

Después de la lisis alcalina, los lisados crudos centrifugados son cargados a tubos-filtros que contiene una membrana de silica que permite la adsorción por afinidad del DNA plasmídico a una elevada concentración de sales. El resto del contenido en el lisado, es decir los componentes celulares desnaturizados, son eliminados por lavado. Finalmente el DNA plasmídico que está unido a la silica es posteriormente eluido en agua.

Amplificación de 10 fragmentos del C-terminal.

Para generar los distintos tamaños de los fragmentos del CNBD se construyeron 5 oligonucleótidos para el N-Terminal (Anexo I: N1, N2, N3, N4, N5) y dos oligonucleótidos para el C-Terminal (Anexo I: C1, C2); estos oligonucleótidos en combinación, un N con un C, dieron como resultado 10 fragmentos distintos en tamaño.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Oligonucleótido N1-N5	0.2 μ M
Oligonucleótido C1-C2	0.2 μ M
pJET CNBD	50 ng
Buffer ThermoPol 10X	1X
Mg ₂ Cl 100 mM	6 mM
dNTPs 10 mM	200 μ M
VentPol	1 u
H ₂ O	Ajustar a 50 μ L

Se corrió el siguiente programa en un termociclador de tapa caliente ajustando el número de ciclos, temperatura y tiempo.

1 Ciclo	Desnaturalización del templado	95 °C	2 min
30 Ciclos	Desnaturalización del templado	95 °C	30 seg.
	Alineamiento de oligonucleótidos	55 °C	30 seg.
	Polimerización de DNA	72 °C	1 min/Kb.
1 Ciclo	Polimerización de DNA	72 °C	10 min

Amplificación por PCR de los genes de las proteínas fluorescentes CFP y YFP.

Para amplificar por PCR los genes de las proteínas fluorescentes se utilizaron oligonucleótidos que introducen sitios de restricción para su posterior clonación en un vector de expresión. Los oligonucleótidos que fueron utilizados para amplificar e insertar los sitios de restricción en los genes de las proteínas fluorescentes, con excepción de mCherry, son complementarios para CFP y YFP en el extremo 5' y 3'. Esto se debe a que la mayoría de los genes de las proteínas fluorescentes provienen de un mismo gen y únicamente tienen modificaciones en la formación del cromóforo, el cual les confiere la característica de emitir a cierta longitud de onda.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Oligonucleótido F	0.2 μ M
Oligonucleótido R	0.2 μ M
DNA	50 ng
Buffer ThermoPol 10X	1X
Mg ₂ Cl 100 mM	6 mM
dNTPs 10 mM	200 μ M
VentPol	1 u
H ₂ O	Ajustar a 50 μ L

Se corrió el siguiente programa en un termociclador de tapa caliente ajustando el número de ciclos, temperatura y tiempo.

1 Ciclo	Desnaturalización del templado	95 °C	2 min
30 Ciclos	Desnaturalización del templado	95 °C	30 seg.
	Alineamiento de oligonucleótidos	55 °C	30 seg.
	Polimerización de DNA	72 °C	1 min/Kb.
1 Ciclo	Polimerización de DNA	72 °C	10 min

Amplificación por PCR del gen de la proteína fluorescente mCherry.

Para amplificar por PCR el gen de la proteína fluorescente mCherry se usaron oligonucleótidos que introducen sitios de restricción para su posterior clonación en un vector de expresión.

Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Anexo I):

Oligonucleótido Tak115	0.2 μ M
Oligonucleótido Tak116	0.2 μ M
DNA	50 ng
Buffer ThermoPol 10X	1X
Mg ₂ Cl 100 mM	6 mM
dNTPs 10 mM	200 μ M
VentPol	1 u
H ₂ O	Ajustar a 50 μ L

Se corrió el siguiente programa en un termociclador de tapa caliente ajustando el número de ciclos, temperatura y tiempo.

1 Ciclo	Desnaturalización del templado	95 °C	2 min
30 Ciclos	Desnaturalización del templado	95 °C	30 seg.
	Alineamiento de oligonucleótidos	55 °C	30 seg.
	Polimerización de DNA	72 °C	1 min/Kb.
1 Ciclo	Polimerización de DNA	72 °C	10 min

Purificación y renaturalización de cuerpos de inclusión.

Se inoculó un cultivo de 50 mL de LB-Amp con una clona aislada de la construcción pRSETb(+)-6H-CFP-N4C2 por 72 h a temperatura ambiente.

Se centrifugó durante 20 min a 4000xg a 4 °C. Se desechó el sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla con 1 mL de Tris-HCl 10 mM-Complete 1X.

Se centrifugó durante 20 min a 3000xg a 4 °C. Se desechó el sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla con 1 mL de Tris-HCl 10 mM-NaCl 300 mM-Complete 1X.

Se sonicó la muestra durante 30 s a una amplitud del 50% en intervalos de 1 minuto en hielo en un sonicador ULTRASONIC PROCESSOR GE50T.

Se centrifugó la muestra durante 20 min a 4000xg a 4 °C. Se desechó el sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla con 10 mL de Urea 8M-Tris-HCl 10 mM pH 7.2. La pastilla resuspendida se agitó por 4 h en frío.

Se diluyó la muestra en 250 mL de Tris-HCl 10 mM-NaCl 300 mM-L-Arginina 200 mM agregando el buffer de plegamiento goteando por 16 h. Se agitó por 4 h más en frío.

Purificación de proteínas recombinantes por columna de Ni²⁺.

Para purificar las proteínas recombinantes, se utilizó la interacción del ion Ni²⁺ y polihistidinas como sistema modelo. El níquel es un ion que tiene alta afinidad por las colas de histidinas que son usadas como marcas para purificar proteínas recombinantes.

Se equilibró la columna de Ni²⁺ con 5 volúmenes de Tris-HCl 10 mM-NaCl 300 mM.

Se pasó la muestra previamente soluble en TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM. Se lavó la columna con 5 volúmenes de TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM-Imidazol 50 mM.

Se eluyó la muestra con TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM-Imidazol 300 mM en tubos eppendorff de 600 µL, recolectando muestras de aproximadamente 400 µL.

La columna se lavó con 5 volúmenes de TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM-Imidazol 300 mM. Para conservar la columna se pasaron tres volúmenes de Etanol 70% y se conservó a 4 °C.

Purificación de proteínas de cuerpos de inclusión por Ni²⁺.

Para purificar las proteínas recombinantes de los cuerpos de inclusión, se utilizó la estrategia de “batch-wise” la cual consiste en agregar directamente el Ni^{2+} a la muestra, posteriormente se recupera el Ni^{2+} con una pipeta y se empaca la columna.

Se utilizó una resina de Ni^{2+} Superflow, 6% agarosa de la compañía Qiagen para empacar una columna. La cromatografía de afinidad se realizó normalizado a un volumen de 1 mL.

Se agregó un volumen de Ni^{2+} a la muestra de 260 mL de los cuerpos de inclusión que fueron purificados y naturalizados.

Se recuperó el Ni^{2+} con una pipeta Pasteur y se empacó la columna. Se equilibró la columna de Ni^{2+} pasando 5 volúmenes de TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM.

Se lavó la columna con 5 volúmenes de TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM-Imidazol 50 mM. Posteriormente, se eluyó la muestra con TrisHCl 10 mM-NaCl 300 mM-Imidazol 300 mM en tubos eppendorff de 600 μL recolectando muestras de aproximadamente 400 μL .

Cuantificación de proteína recombinante mediante espectroscopía de fluorescencia.

Las proteínas recombinantes que fueron expresadas en este trabajo tienen fusionada al CNBD al menos una proteína fluorescente CFP. Las proteínas fluorescentes entre otras ventajas durante su plegamiento sufren un proceso de maduración donde se forma un cromóforo. Este proceso ocurre a partir de tres aminoácidos adyacentes: una serina, una tirosina y una glicina en el caso de la proteína GFP (triptófano, treonina y glicina en el caso de CFP). La particularidad de este triplete se basa en que se encuentran en la parte central de un barril formado por 11 hojas- β plegadas generando un ambiente hidrofóbico en el lumen de la proteína. La reacción ocurre cuando el carbono del carboxilo de la serina y el nitrógeno de la amina de la glicina lo que resulta en la formación de un anillo heterocíclico nitrogenado, posterior a la oxidación se conjuga el anillo con la tirosina y así concluye la formación de la especie fluorescente de la proteína. El cromóforo también conocido como fluoróforo tiene la característica de absorber energía dentro de un rango de longitud

de onda y emitir un rango de mayor longitud de onda. Basado en la particularidad de que cada proteína fluorescente absorbe energía a cierta longitud de onda, calculamos la cantidad de moléculas que teníamos en una muestra de proteína recombinante pura.

Se ajustó un volumen de proteína recombinante pura en una celda óptica de 1 cm de ancho. En algunos casos fue necesario diluir la muestra debido a la saturación de la señal.

Se ajustó el espectrómetro Scientific R-65004 a 445 nm y se determinó la absorbancia (A).

Se calculó la concentración de la proteína siguiendo la Ley de Beer-Lambert, la cual establece que la absorción es proporcional a la longitud de la trayectoria que la luz viaja, además de que la absorción es proporcional a la concentración de la especie que absorbe con cierto coeficiente de extinción molar, lo que da como resultado la siguiente ecuación,

$$A = \epsilon cb \quad \text{Ecuación 1.}$$

donde:

A, Absorbancia.

ϵ , Coeficiente de extinción molar (Unidades $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

c, Concentración.

b, Longitud de la trayectoria.

Es decir, al estimar la absorbancia (A) de una especie a cierta longitud de onda podemos conocer la concentración (c) de la especie en la muestra si conocemos la trayectoria de la luz (b) y el coeficiente de extinción molar de la especie (ϵ) como establece la ley de Beer-Lambert.

Anisotropía como un reportero de unión.

La Anisotropía es una técnica basada en cambios en el grado de la polaridad de la fluorescencia al excitar una muestra con la luz polarizada. Cuando una muestra fluorescente recibe

una luz polarizada, las moléculas que estén alineadas paralelamente a la luz polarizada se excitan preferencialmente. Por consecuencia, la luz de emisión tiene la polaridad dependiendo del movimiento rotacional durante el periodo de la excitación (nano segundos). Las moléculas con poco movimiento rotacional mantienen un alto nivel de polaridad de la fluorescencia (Anisotropía grande), mientras que moléculas con alto movimiento rotacional disminuye la polaridad (Anisotropía pequeña). Utilizando esta técnica, podemos determinar la interacción molecular entre una molécula fluorescente como un ligando marcado con un fluoróforo y su receptor sin separación mecánica de la forma libre y el complejo en tiempo real. Para determinar el valor de anisotropía, se incide la luz verticalmente polarizada a la muestra y se detecta la intensidad de la luz de emisión en dos canales uno paralelo ($I_{||}$) y otro perpendicular (I_{\perp}) a la fuente de excitación usando filtros polarizadores ⁵⁰. Con estas dos medidas, el valor de Anisotropía r puede describirse como la proporción de ambas intensidades definido por la siguiente fórmula:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

Donde r = Valor de Anisotropía.

$I_{||}$ = Intensidad paralela de fluorescencia.

I_{\perp} = Intensidad perpendicular de fluorescencia.

Expresión del CNBD del sNHE en un sistema heterólogo.

En un principio, se comenzó por analizar la función del CNBD del sNHE en un sistema heterólogo procarionte expresando la fusión del dominio con una proteína fluorescente de color Cían (CFP). Conforme el proyecto fue evolucionando se optó por analizar una fusión del CNBD con dos proteínas fluorescentes en un sistema heterólogo eucarionte para evitar la formación de cuerpos de inclusión y aumentar la estabilidad de la proteína total y mejor su solubilidad.

Construcción de un vector que exprese el CNBD en un sistema procarionte y eucarionte.

pRSETb(+)-CFP-CNBD

Para expresar el CNBD en un sistema procarionte, seleccionamos a la cepa de *E. coli* BL21(DE3) descrita en el apartado de Material biológico.

Se construyó un vector que expresa la proteína recombinante CFP y mCherry (CFP-mCherry) bajo el promotor T7. Esta construcción nos ayudó a seleccionar por color las construcciones positivas cuando se sustituye al gen de la proteína mCherry por un fragmento del CNBD; Utilizando una lámpara de color azul y un filtro de color naranja podemos discernir cuando la colonia brilla en color verde es positiva para la proteína CFP-CNBD y cuando la colonia brilla en color rojo, ésta pertenece al vector nativo CFP-mCherry debido a una digestión parcial o contaminación del vector superenrollado.

Se amplificó por PCR el gen de la proteína CFP insertando los sitio NheI y seis histidinas en el N-terminal y una asa GGGSGGG y los sitios KpnI/BamHI/XhoI en el C-terminal. Posteriormente se purificó el producto de PCR por gel de agarosa 1%.

Se amplificó por PCR el gen de la proteína mCherry insertando el sitio KpnI/BamHI en el N- y C-terminal, respectivamente. Posteriormente se purificó el producto de PCR por gel de agarosa 1%.

Se digirió 1 µg de pRSETb(+) y 500 ng del producto de PCR del gen CFP con el par de enzimas de restricción NheI/XhoI en el buffer Rojo 1X durante 1 h a 37 °C. Subsecuentemente se purifico por gel el vector lineal y el producto de PCR digerido.

Se ligó en una relación molar 1 a 3, 50 ng de vector lineal con 27 ng del producto de PCR del gen CFP en el buffer de la ligasa T4 1X por 16h a temperatura ambiente en un volumen de 20 µL finales.

Se transformó en la cepa BL21(DE3) la mitad de la ligación, es decir 10 µL, por el método químico descrito anteriormente. Se seleccionó por color las colonias positivas para la construcción pRSETb(+)-CFP.

Se digirió 1 µg de pRSETb(+)-CFP y 500 ng del producto de PCR del gen mCherry con el par de enzimas de restricción KpnI/BamHI en el buffer BamHI 1X durante 1 h a 37 °C; subsecuentemente se purifico por gel el vector lineal y el producto de PCR digerido.

Se ligó en una relación molar 1 a 3, 50 ng del vector lineal con 27 ng del producto de PCR del gen mCherry en el buffer de la ligasa T4 1X por 16 h a temperatura ambiente en un volumen de 20 μ L finales.

Se transformó en la cepa BL21(DE3) la mitad del volumen de la ligación por el método químico descrito anteriormente. Se seleccionó por color las colonias positivas para la construcción pRSETb(+)-CFP-mCherry.

Se utilizó esta construcción como templado para clonar los diez fragmentos del CNBD y se seleccionaron por color en caja cada una de las fusiones positivas.

pRSETb(+)-CFP-CNBD-YFP

Para mejorar la solubilidad de la proteína recombinante pRSETb(+)-CFP-CNBD se fusionó una segunda proteína fluorescente en el C-terminal de la construcción.

Se utilizó el vector pRSETb(+)-CFP-PKA-173 como molde para realizar esta construcción. Este vector tiene una proteína recombinante que expresa la quimera CFP en el N-terminal del dominio regulador de PKA y una proteína fluorescente YFP en el C-terminal. El dominio regulador de PKA está clonado en el vector pRSETb(+)-CFP-PKA-173 con los sitios KpnI/BamHI en el sentido 5' \rightarrow 3'.

Se amplificó por PCR el gen de la proteína fluorescente mCherry donde se insertaron los sitios KpnI en el N-terminal y un codón de paro y el sitio de restricción BamHI en el C-terminal.

Se digirió 1 μ g del vector pRSETb(+)-CFP-PKA-173 y el fragmento de PCR mCherry con las enzimas de restricción KpnI/BamHI en el buffer BamHI 1X por 1 h a 37 °C.

Se ligó 50 ng de vector digerido pRSETb(+)-CFP-PKA-173 con 23 ng del fragmento de PCR mCherry en buffer de ligasa T4 1X por 16 h a temperatura ambiente.

Se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) 10 μ L de la ligación final y se seleccionó en caja por color las colonias positivas que brillan de color rojo de las colonias negativas que no tienen color. A ésta nueva construcción se nombró pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP.

Para facilitar la purificación de la construcción fusionamos una cola de histidinas a la proteína recombinante. Para realizar esta construcción utilizamos como molde la construcción pRSETb(+)-WT-4-173 la cual se digirió con las enzimas de digestión NcoI/HindIII en buffer R por 1 h a 37 °C; el vector resultante solo contiene la cola de histidinas en el N-terminal.

Se digirió 1 µg del vector pRSETb(+)-WT-4-173 y 1 µg del vector pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP con las enzimas de restricción NcoI/HindIII en el buffer R 1x por 1h a 37 °C.

Se ligó en una proporción molar 1 a 1 el fragmento CFP-mCherry-YFP y el vector pRSETb(+)-WT-o-173 en el buffer de ligación T4 por 16 h a temperatura ambiente.

Se transformó 10 µL de la ligación en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se seleccionó en caja por color las colonias positivas que brillan de color rojo de las colonias negativas que no tienen color. A esta nueva construcción se nombró pRSETb(+)-6HCFP-mCherry-YFP.

Se utilizó esta construcción como templado para clonar los diez fragmentos del CNBD y se seleccionaron por color en caja cada una de las fusiones positivas.

pcDNA(-)(proRBS)-CFP-CNBD-YFP.

Para mejorar la solubilidad de la proteína quimera CFP-CNBD-YFP decidimos expresar dicha construcción en un sistema heterólogo eucarionte. El sistema heterólogo que seleccionamos son la células CHO. La línea celular CHO con la que se trabajó no tiene resistencia endógena a ningún antibiótico, por lo que nos facilitó la selección. Utilizamos la construcción pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP como molde para construir pcDNA(-)-CFP-CNBD-YFP, ya que comparten un par de sitios de clonación río abajo del promotor T7, lo que no afecta el marco de lectura del gen que se está clonando, además de clonar el sitio de unión a ribosoma de procariontes (RBS) en un vector de expresión de eucariontes. Clonar el sitio RBS en un vector de expresión en eucariontes río arriba del promotor T7 nos da la ventaja de poder seguir con el sistema de selección por color en caja en una cepa de *E. coli* (DE3) las construcciones positivas que se desee expresar en eucariontes.

Se digirió 1 μg de pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP y 1 μg de pcDNA(-)3.1 con el par de digestión XbaI/HindIII en el buffer R 1X. Se purificó por banda el fragmento esperado de 2.2 kb y 5.3 kb respectivamente.

Se ligó en una proporción molar 1 a 3 (vector:fragmento) 50 ng del vector digerido pcDNA(-)3.1XbaI/HindIII con 23 ng del fragmento RBS-CFP-mCherry-YFP, resultado de la digestión del vector pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP, en buffer de ligasa T4 1X por 16h a temperatura ambiente en un volumen de 20 μL finales.

Se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) 10 μL de la ligación final y se seleccionó en caja por color las colonias positivas que brillan de color rojo de las colonias negativas que no tienen color.

Se confirmó por digestión XbaI/HindIII en buffer R por 1 h a 37 °C que se tratara del vector pcDNA(-)-CFP-mCherry-YFP y no de la digestión parcial de pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP.

VII. Resultados.

Clonación del dominio CNBD del sNHE: Purificación de RNA total y rt-PCR.

Separé células espermatogénicas mediante un gradiente discontinuo de BSA. Utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen) purifiqué el RNA total de paquitenos, espermátidas redondas y espermátidas condensantes. Preparé el cDNA mediante transcriptasa reversa utilizando un oligonucleótido específico (91R), el cual posteriormente se utiliza para PCR como “primer” reverso (Anexo I). Mediante PCR se amplificó un fragmento que flanquea toda la región citoplasmática del C-terminal del sNHE (91R y 92 F, Anexo I) aproximadamente 1400 pares de bases (pb), la cual contiene el dominio predicho de CNBD.

La figura 11 muestra un gel de agarosa 1% donde se corrió la reacción PCR, corroborando la amplificación del fragmento esperado de 1400 pb. Se observa un fragmento único presente sólo en las espermátidas condensantes (EC) y espermátidas redondas (ER). En el caso de los paquitenos (P) no se amplificó ningún fragmento, coincidiendo con el reporte hecho por el grupo de Garbers y colaboradores en 2003 ²⁷.

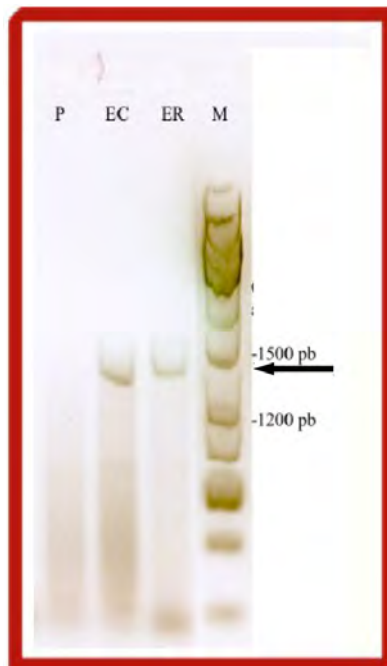


Figura 11. Gel de agarosa 1 %. rt-PCR con RNA total de paquitenos (P), espermátidas condensantes (EC) y espermátidas redondas (ER). Marcador molecular (M). En ambos carriles ER y EC se observa el fragmento del tamaño esperado 1400 pb.

Clonación del dominio CNBD del sNHE.

Se purificó el producto esperado de PCR, posteriormente se subclonó en el vector pJET1.2 (Fermentas) y se secuenció el inserto usando los oligonucleótidos pJETF y pJETR (Fermentas). Los resultados de la unidad de secuenciación fueron procesados y analizados en la base de datos de NCBI. El alineamiento 2 demuestra que el producto de rt-PCR es 100% idéntico a la secuencia del mRNA que corresponde al C-terminal del sNHE de ratón.

Selección de 10 fragmentos diferentes que contienen el dominio predicho del CNBD del sNHE.

Se ha reportado que se requiere una región extra del N-terminal del CNBD de EPAC1 para la estabilidad de la proteína recombinante expresada en *E. coli*⁵¹, lo cual indica que el estudio de la función del CNBD requiere de un tamiz regional de la proteína. Por ello se prepararon diez fragmentos del dominio CNBD variando la extensión del N-Terminal (5 variaciones) y del C-Terminal (2 variaciones). Para decidir los sitios de corte que generarán los diez fragmentos del dominio CNBD analicé la estructura secundaria de toda la parte citoplásmica del sNHE usando el programa iTasser (Figura 13)⁵². En el caso del N-terminal, encontramos solamente 4 α -hélices antes del CNBD, con base en esto decidimos los 4 sitios de corte N1, N2, N3 y N4 eliminando las asas que se encuentran entre las α -hélices; el sitio N5 corresponde al sitio del CNBD sin región extra. En el caso del C-terminal, encontramos una variedad de estructuras secundarias lo cual no permitió elegir como en el caso del N-terminal. En general, esta región determina la selectividad entre cAMP y cGMP, sin embargo parece que no es tan importante para la estabilidad del CNBD. Por lo anterior, decidimos solamente dos sitios; uno al final del CNBD y otro al final de todo el C-terminal del sNHE.

Diseñamos 7 oligonucleótidos con apoyo del programa Oligo7 (Molecular Biology Insights) insertando el sitio de restricción KpnI en 5' (5 oligonucleótidos. Anexo I) y el sitio de restricción BamHI en el 3' (2 oligonucleótidos. Anexo I) para construir 10 diferentes fragmentos del CNBD de manera sistemática.

La figura 12 muestra los 10 fragmentos del CNBD del sNHE a probar. Se indica como N1, N2, N3, N4 y N5 las variaciones del N-terminal, también se señalan las dos variaciones del C-terminal como C1 y C2.

```
>gb|AY368685.1| UEG Mus musculus sperm-specific sodium proton exchanger mRNA, complete
cds
Length=3867
```

```
GENE ID: 208169 Slc9a10 | solute carrier family 9, member 10 [Mus musculus]
(Over 10 PubMed links)
```

```
Score = 1637 bits (886), Expect = 0.0
Identities = 886/886 (100%), Gaps = 0/886 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 1 AAAGAGCTAGGCTACTTAGAGTATGACCATCCGGAAATCGCTGCTACTATGAAAACCAAG 60
|||||
Sbjct 2596 AAAGAGCTAGGCTACTTAGAGTATGACCATCCGGAAATCGCTGCTACTATGAAAACCAAG 2655

Query 61 GAGGAGATTAATGTCATGCTCAATATGGCCAGAGAAATGTC AAGACTTTCAGGTCCAAA 120
|||||
Sbjct 2656 GAGGAGATTAATGTCATGCTCAATATGGCCAGAGAAATGTC AAGACTTTCAGGTCCAAA 2715

Query 121 GGAATTATACACAAGGTGGAAGGCACTGAGATTAACAAGT AATCATGGCCAAAAGATC 180
|||||
Sbjct 2716 GGAATTATACACAAGGTGGAAGGCACTGAGATTAACAAGT AATCATGGCCAAAAGATC 2775

Query 181 CAGGTGCTTGATCTGCAGTCTGTTATCCAGCCATTTAATG TTTGAAGAAGCCCCGTGCAAT 240
|||||
Sbjct 2776 CAGGTGCTTGATCTGCAGTCTGTTATCCAGCCATTTAATG TTTGAAGAAGCCCCGTGCAAT 2835

Query 241 ATCCCATGGCTTAGTGAAGATCCTGAAGCCATAACCTTTA TTTTCAGGAAAAAGCAAAAGTT 300
|||||
Sbjct 2836 ATCCCATGGCTTAGTGAAGATCCTGAAGCCATAACCTTTA TTTTCAGGAAAAAGCAAAAGTT 2895

Query 301 GTAACATTTGACTGTGGAATAACATATTTGAAGAAGGTG ATGAGCCAGAAGGAATCTAT 360
|||||
Sbjct 2896 GTAACATTTGACTGTGGAATAACATATTTGAAGAAGGTG ATGAGCCAGAAGGAATCTAT 2955

Query 361 GTAATAATTTTCAGGCATGGTTAAGCTTAAAAGGTCAAA AACCACACCTGGAGATGGAAGA 420
|||||
Sbjct 2956 GTAATAATTTTCAGGCATGGTTAAGCTTAAAAGGTCAAA AACCACACCTGGAGATGGAAGA 3015

Query 421 GTATCCGCAGAGTCAGAGATTAATAATTCATCCACTGCCC CACACAGAGTACCTGCTCAGC 480
|||||
Sbjct 3016 GTATCCGCAGAGTCAGAGATTAATAATTCATCCACTGCCC CACACAGAGTACCTGCTCAGC 3075

Query 481 GGGGAGATAATAGGAGAGTTAAACTGTCTGACTAAAGAAC GGATGCAATATTC TGCCACC 540
|||||
Sbjct 3076 GGGGAGATAATAGGAGAGTTAAACTGTCTGACTAAAGAAC GGATGCAATATTC TGCCACC 3135

Query 541 TGCAAAACCTGTTGTGGAGACATATTTTATTC CATTAGCCACTTGTATGAAGGCTTTGAA 600
|||||
Sbjct 3136 TGCAAAACCTGTTGTGGAGACATATTTTATTC CATTAGCCACTTGTATGAAGGCTTTGAA 3195

Query 601 AAAAGATGTCCTAACATGAAACATAAAAATGTGGCAAAA AATTCGGACTTGCCATTACTGCC 660
|||||
Sbjct 3196 AAAAGATGTCCTAACATGAAACATAAAAATGTGGCAAAA AATTCGGACTTGCCATTACTGCC 3255
```

Alineamiento 2. Resultado de la base de datos de NCBI al analizar la secuencia del fragmento obtenido en la reacción de rt-PCR. La secuencia del fragmento clonado del C-terminal del sNHE se corroboró con la base de datos del NCBI, se obtuvo un 100 % de identidad en la región C-terminal del mRNA completo del sNHE.

Construcciones quiméricas de 10 fragmentos del CNBD y una proteína Cian fluorescente.

Para determinar si existe unión de cNMP al CNBD del sNHE se planeó preparar una proteína quimérica con uno de los 10 fragmentos del sNHE fusionada con la proteína fluorescente cian (CFP, por las siglas en inglés de “*Cyan Fluorescent Protein*”) insertando un espaciador -GGGSGGG- (G, glicina y S, serina) entre ellos. La fusión de la proteína CFP al fragmento del sNHE nos facilita determinar la actividad del CNBD debido a que nuestro grupo ha desarrollado un nuevo ensayo de unión sencillo y rápido (sin proceso de purificación) usando la técnica de FRET (abreviación de “*Fluorescence Resonance Energy Transfer*”), en el cual la proteína fluorescente funciona como donador de energía y el cAMP acoplado a fluoresceína (8-Fluo-cAMP, BioLog) sirve como aceptor de energía. Nuestro grupo confirmó que el método funcionó exitosamente usando EPAC1 como el CNBD. Además, la proteína quimérica con CFP nos facilita, estimar el nivel de expresión de la proteína recombinante y cuantificar la concentración de la proteína, tanto de la proteína purificada como de la proteína en extracto crudo, por determinación de la absorbancia de CFP (435 nm, $32500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Figura 13).

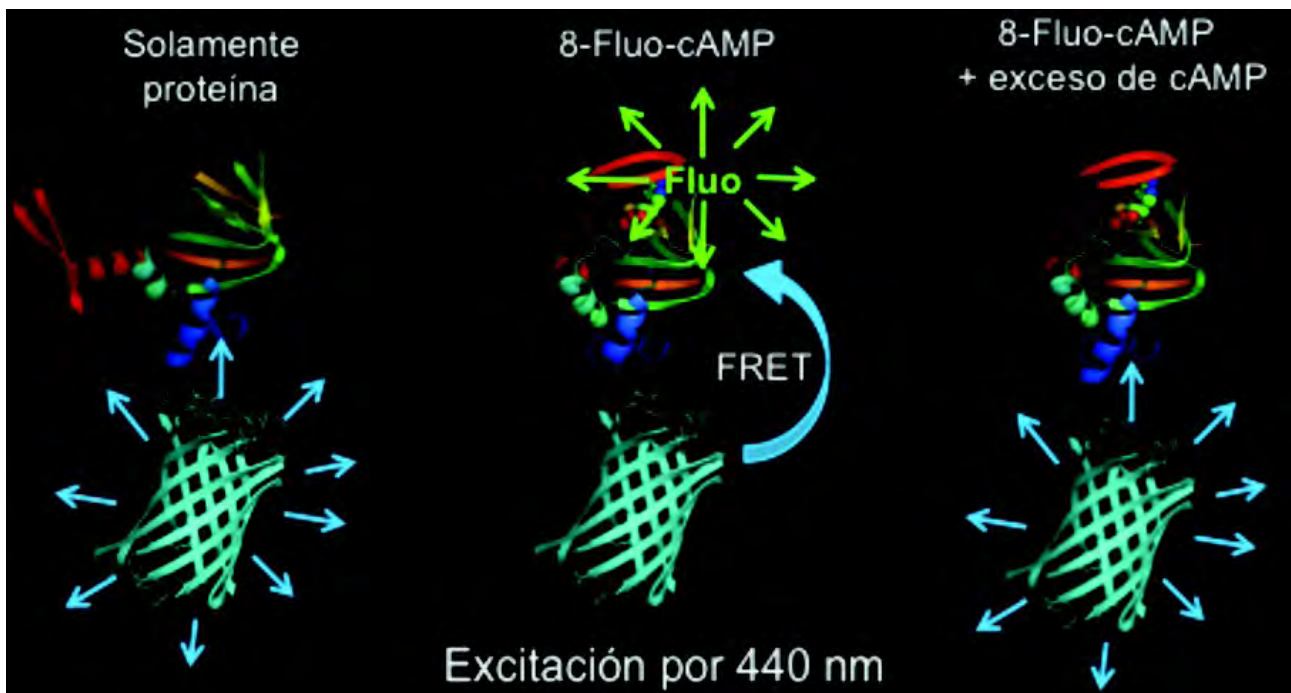


Figura 13. Construcción diseñada para determinar si el dominio CNBD tiene unión con cNMP.

En general, después de transformar una construcción nueva se debe realizar la selección de las clonas positivas. Las colonias de *E. coli* se amplifican y se extrae el DNA plasmídico mediante mini prep. Por patrón de digestión en un gel de agarosa o por secuenciación se distinguen clonas positivas de los falsos positivos o vectores que no contienen el inserto deseado. En otros casos, se utiliza un método alternativo en el cual se realiza un PCR de colonia directamente de la placa a pesar de que esta metodología es más rápida frecuentemente aparecen falsos positivos y negativos.

Seleccionar clonas positivas por el método convencional es laborioso y costoso, por lo que diseñamos un tamiz eficiente para seleccionar las colonias deseadas mediante la expresión de proteínas fluorescentes en caja petri. Para este objetivo, decidimos utilizar el vector pRSETb(+) (Invitrogen) un vector de expresión de fácil manipulación por su alto número de copias en cepas de *E. coli*. Por comunicación personal nos recomendaron no utilizar IPTG en la inducción de proteínas que se expresan en pRSETb(+) porque el brillo de la proteína fluorescente disminuye. Además, es posible expresar la proteína clonada en este vector sin la inducción por IPTG, en las cepas que tienen el gen de la RNA polimerasa T7 en su genoma como son BL21(DE3) y JM109(DE3). Esta propiedad nos permite distinguir claramente el color de la colonia después de uno o dos días de la transformación.

En nuestras construcciones quiméricas, la proteína CFP se sitúa en el lado N-terminal del CNBD (CFP-CNBD), lo cual indica que es difícil utilizar el color de CFP para el tamiz de las colonias. Por lo anterior, decidimos generar una construcción que contiene una proteína fluorescente roja (mCherry) en el C-terminal de CFP (CFP-mCherry). Posterior a la selección, intercambiamos el gen de mCherry con cada uno de los 10 fragmentos del CNBD del sNHE resultando en la pérdida del color rojo como consecuencia de la inserción del fragmento del CNBD pero manteniendo el color verde-azul de CFP. A continuación se explica a detalle como construimos este sistema de selección por color en caja.

Para construir el vector que facilita la selección por color esquematizado en la figura 15, se inicio por amplificar el gen de CFP con dos oligonucleótidos específicos (141F y 94R. Anexo I). El oligonucleótido 141F tiene un sitio de restricción NheI el cual, subsecuentemente, se utiliza para subclonar el fragmento en pRSETb(+). El sitio NheI de pRSETb(+) se encuentra justo después del sitio que codifica 6 histidinas (6His), por lo que nuestra proteína recombinante puede ser purificada mediante una columna de afinidad. El oligonucleótido 94R esta diseñado para insertar un espaciador (-GGGSGGG-) seguido de 3 sitios de restricción KpnI, BamHI y XhoI en el 3' del

producto de PCR. Un codón de paro (TAA) esta insertado entre los sitios de restricción BamHI y XhoI.

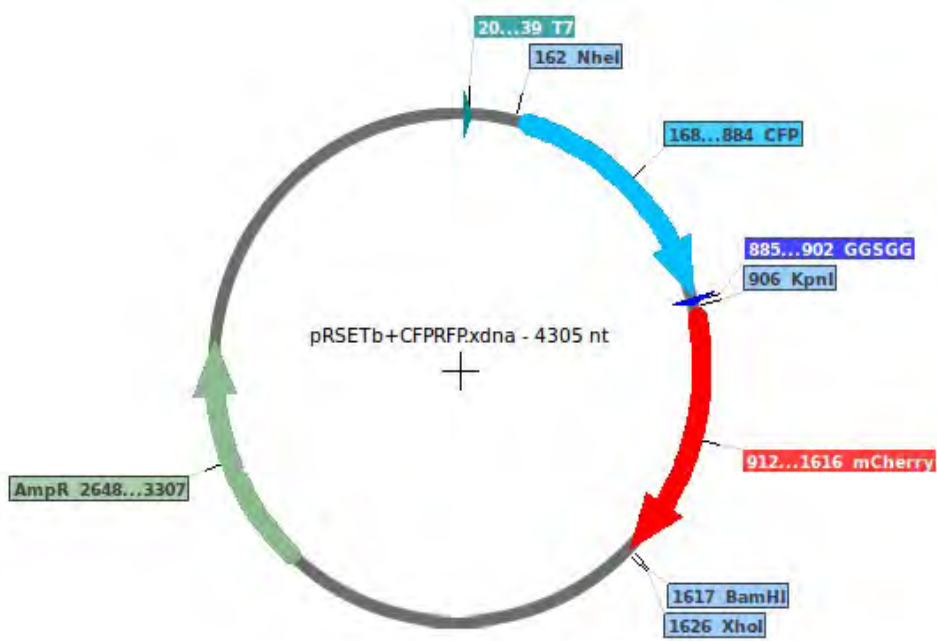


Figura 14. Construcción diseñada para seleccionar colonia positivas (color amarillo) de colonias negativas (color rojo) cuando se clone el fragmento CNBD.

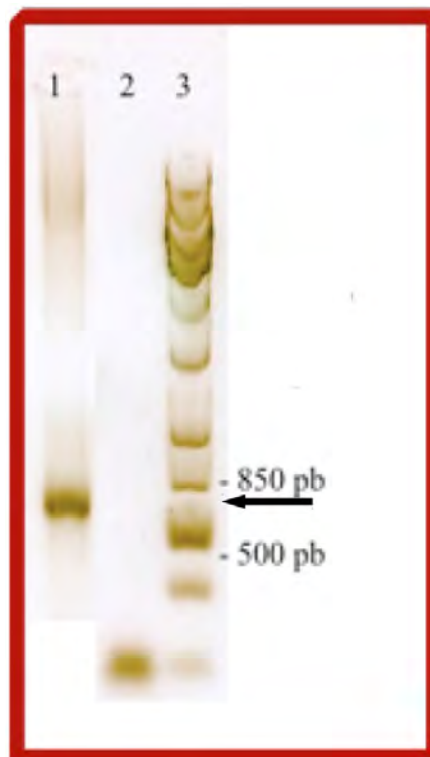


Figura 15. Gel de agarosa 1%. Reacción de PCR con el producto de aproximadamente 750 pb del gen CFP (1), como control negativo se utilizó la reacción sin templado utilizando agua (2). El carril 3 corresponde al marcador de peso molecular.

Se insertó el producto de PCR usando las enzimas de restricción NheI y XhoI en un vector modificado de pRSETb(+) en el grupo (mV1S2 pRSETb(+)), el cual tiene un sólo sitio de XhoI. La figura 17 muestra la digestión NheI-XhoI que comprueba la integridad del gen de CFP en el vector pRSETb(+). A esta construcción la nombramos pRSETb(+)-CFP.

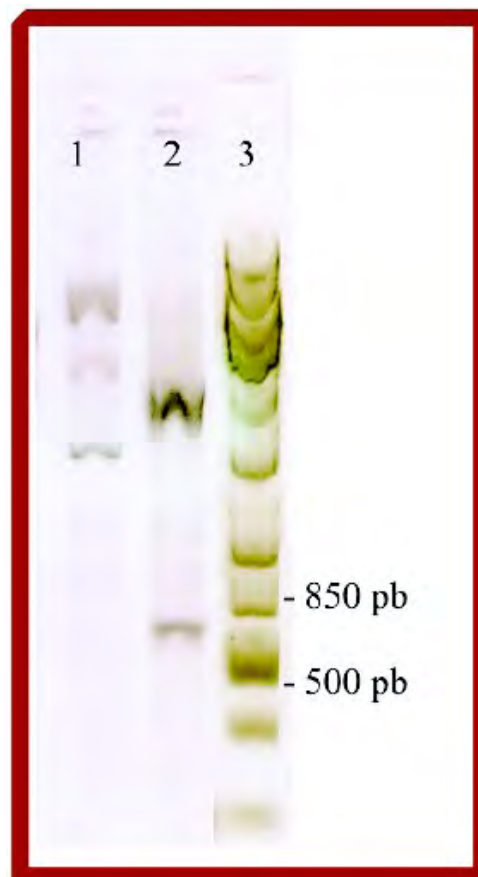


Figura 16. Gel de agarosa 1%. Reacción de digestión sobre la construcción pRSETb(+)-CFP. En el carril 1 se observa el vector de pRSETb(+)-CFP súper enrollado, es decir sin digerir, en el carril se muestra el vector pRSETb(+)-CFP digerido con los sitios que flanquean al gen CFP, es por esto que observamos una banda del tamaño correspondiente en aproximadamente 720 pb y una banda correspondiente al vector de mayor tamaño.

Para concluir la construcción del vector de expresión para selección por color en caja, se amplificó por PCR el gen de mCherry con los oligonucleótidos específicos 115F y 116R. Los oligonucleótidos 115F y 116R agregan sitios de restricción KpnI y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente en el producto de PCR de mCherry. Posteriormente, se insertó el producto de PCR

del gen mCherry en el vector pRSETb(+)-CFP usando los sitios de KpnI y BamHI y el producto de la ligación se transformó en células BL21(DE3). Como era de esperarse la placa de petri mostró dos poblaciones de distinto color como podemos observar en la figura 17. El diseño del vector para seleccionar clonas positivas por color resultó exitoso lo cual nos permitió hacer un tamiz más rápido y eficiente de los diez fragmentos del CNBD. Esta nueva construcción se nombró pRSETb(+)-CFP-mCherry.

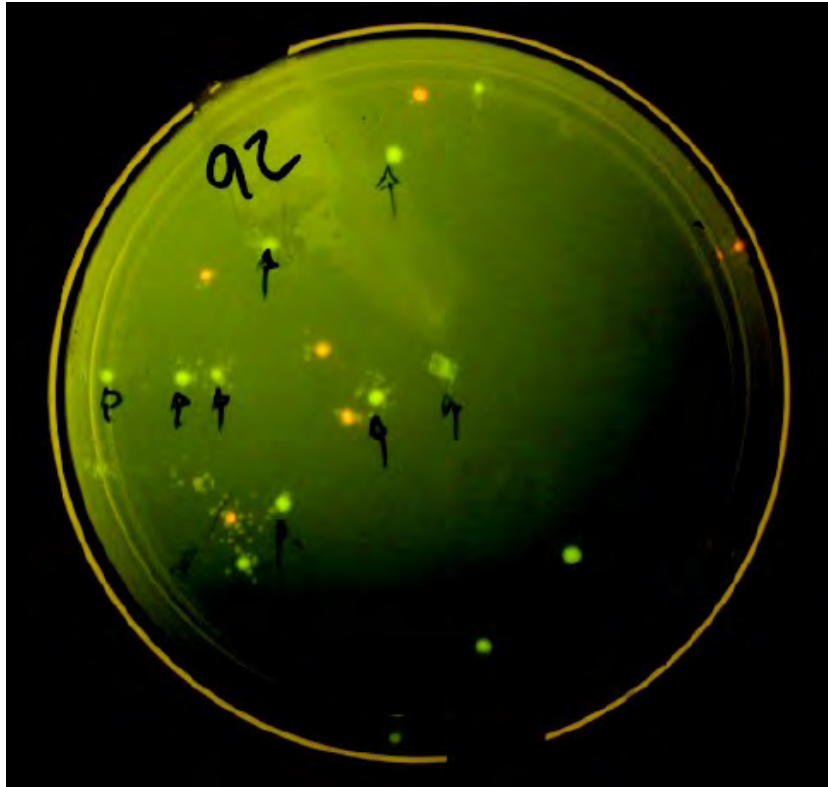


Figura 17. Caja petri LB-Amp con el esquema de selección por color. Observamos con una flecha negra las colonias que fueron transformadas con el plásmido pRSETb(+)-CFP y de color rojo las colonias que contienen la construcción pRSETb(+)-CFP-mCherry. La imagen fue capturada con un transiluminador de luz azul y un filtro de emisión color naranja (una placa de acrílico de color naranja que sirve como filtro de “long-pass”, es decir que solo deja pasar luz con frecuencia baja).

Se insertó cada fragmento del C-terminal del sNHE en el vector pRSETb(+)-CFP-mCherry con ayuda de los sitios de restricción KpnI y BamHI, sustituyendo el gen de la proteína mCherry. Posterior a la inserción, el producto de la ligación se transformó en la cepa BL21(DE3). Como se observa en la figura 18, la placa de petri muestra dos poblaciones de diferente color. En términos prácticos, las clonas que brillan en color verde corresponden a las colonias transformadas con el plásmido pRSETb(+)-CFP-CNBD mientras que las clonas que brillan en color rojo a las del plásmido pRSETb(+)-CFP-mCherry. El tamiz por color nos permitió seleccionar fácilmente las

colonias positivas, lo cual reduce significativamente el trabajo y el costo de selección de la construcción. Además, se puede utilizar la colonia de la bacteria (BL21(DE3)) para expresar la proteína codificada sin transformar otra cepa.

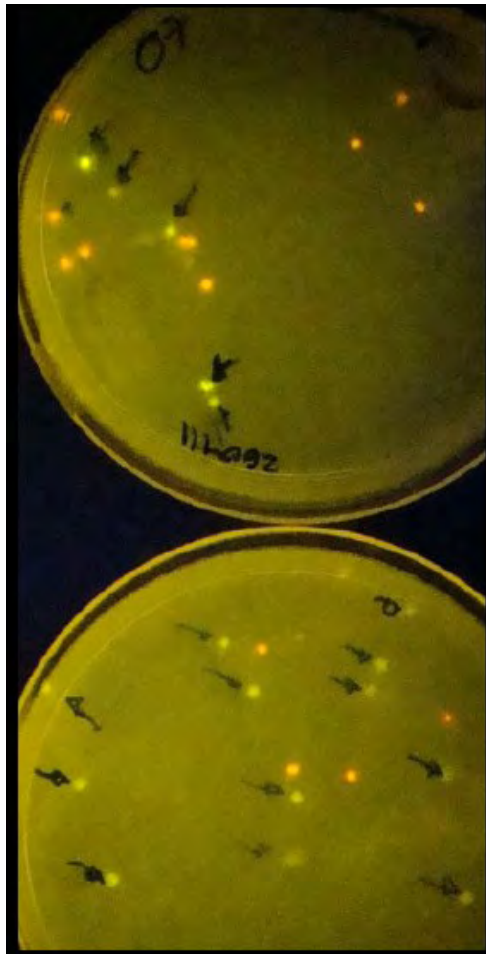


Figura 18. La selección por color permite seleccionar colonias positivas que contengan el fragmento CNBD.

Cada construcción generada en este trabajo se secuenció en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Expresión de la proteína recombinante en *E. coli*.

Antes de expresar la proteína quimérica en un volumen grande, realicé un experimento piloto para evaluar la actividad del CNBD usando un volumen pequeño de la suspensión de la bacteria en LB-liquido (10 mL). Se inocularon las colonias de *E. coli* (BL21(DE3)) que expresan el

plásmido confirmado en un cultivo de LB-liquido ampicilina y se incubaron a temperatura ambiente por 72 h con agitación (200 rpm) y posteriormente 1 h a 4°C.

Se centrifugó el cultivo (4000 x g, 20 min) y se resuspendió la solución de extracción de proteína (Materiales y Métodos). Se extrajo proteína soluble de todos los cultivos utilizando un sonicador (Ultrasonicador Processor) a 20 Watts de frecuencia como se describe en la sección de materiales y métodos. Mediante una columna de afinidad de Ni²⁺ se eliminaron proteínas que no se unen a la resina con 50 mM de imidazol. Se recuperó la proteína recombinante que contiene la cola de histidinas con 250 mM de imidazol. Se cuantificó la concentración de cada proteína recombinante considerando el coeficiente de extinción molar (32500 M⁻¹ cm⁻¹) y el pico máximo de absorbancia (435 nm) de la proteína fluorescente CFP.

Para confirmar el tamaño de las proteínas recombinantes y su nivel de pureza se corrió un gel desnaturante de acrilamida SDS-PAGE 12%. En la figura 19 se muestran ocho de las diez construcciones expresadas en *E. coli* y purificadas con una columna de Ni²⁺. Desafortunadamente, en los grupos de las proteínas purificadas, no se observa ninguna proteína del tamaño esperado y sólo se observa la banda de la proteína que correspondería a la proteína fluorescente (27 kDa). Sin embargo, en la fracción de la pastilla (Panel B) se observa que se concentra la proteína recombinante con el tamaño esperado para la fusión. Para confirmar la solubilidad de las proteínas recombinantes, nuevamente expresé una construcción (CFP-N4C2) en *E. coli* con mayor volumen de cultivo (50 mL) e intenté extraer la proteína soluble por sonicación. Sin embargo, se observó con ayuda de la señal de fluorescencia de la proteína, que la mayoría de la proteína recombinante se quedó en la pastilla sin poder recuperarla en la fracción soluble, lo que sugiere que las proteínas recombinantes completas forman cuerpos de inclusión en bacteria y solamente los productos degradados pueden estar en la fracción soluble.

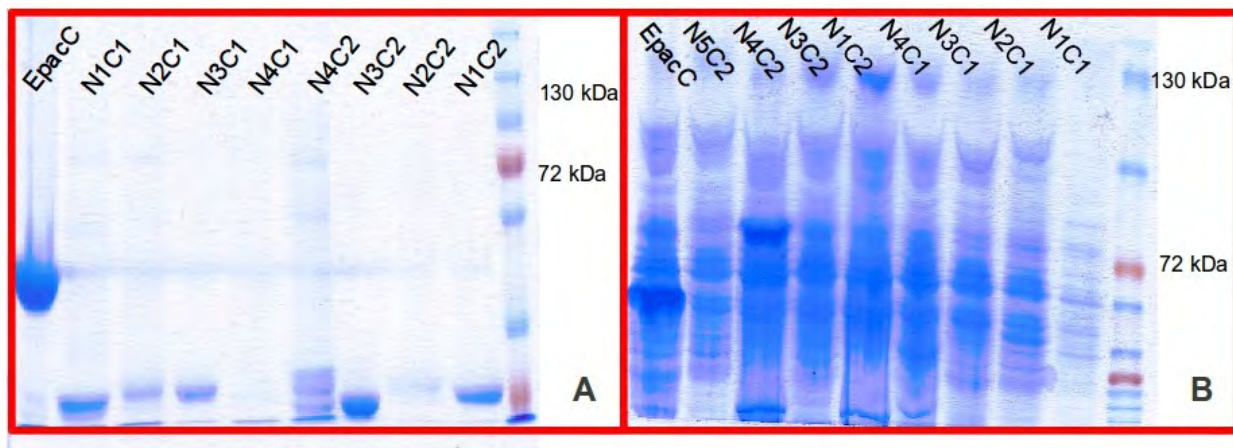


Figura 19. A. Gel desnaturalizante de acrilamida SDS-PAGE 12% de la fracción soluble. B. Gel desnaturalizante de acrilamida SDS-PAGE 20% de la fracción no soluble.

Se sabe que algunas proteínas recuperadas de los cuerpos de inclusión pueden convertirse en proteínas solubles después de tratamientos adecuados de desnaturalización y renaturalización. Aplicamos esta estrategia a nuestra proteína (CFP-N4C2) para obtener una proteína soluble que nos permita determinar su actividad. Purificamos los cuerpos de inclusión después de sonicar las bacterias que expresan CFP-N4C2 y agregamos urea (8 M en final) a 4 °C con agitación para desnaturalizar la proteína. La suspensión del cuerpo de inclusión se convirtió en una solución transparente y la intensidad de la fluorescencia se disminuyó (dato no mostrado). Posteriormente, añadimos a la proteína desnaturalizada la solución de renaturalización (Tris-HCl 10 mM-NaCl 300 mM-L-Arginina 200 mM) gota por gota a 4 °C con agitación. Se incrementó la intensidad de la fluorescencia en la solución de renaturalización, lo cual indica que la proteína, por lo menos CFP, recuperó su plegamiento correcto. Obtuvimos la proteína concentrada recuperando la resina de Ni²⁺ agregada directamente al matraz.

En la figura 20 se muestra el resultado al correr un gel SDS-PAGE (12%) de la proteína (CFP-N4C2) renaturalizada del cuerpo de inclusión. Podemos observar que al menos la construcción de la proteína recombinante CFP-N4C2 purificada por la resina de Ni²⁺ permanece la proteína completa (Carril D). Sin embargo, la estabilidad de la proteína es pobre puesto que es difícil mantenerla en la fracción soluble por más de 12 h ya que después de este periodo la proteína recombinante se agrega y se precipita. Por lo anterior, no se pudo analizar la actividad de la proteína. En otro intento, una parte de la proteína renaturalizada se quedó en la fracción soluble después de 12 horas de purificación. Sin embargo, esta fracción de la proteína estaba degradada.

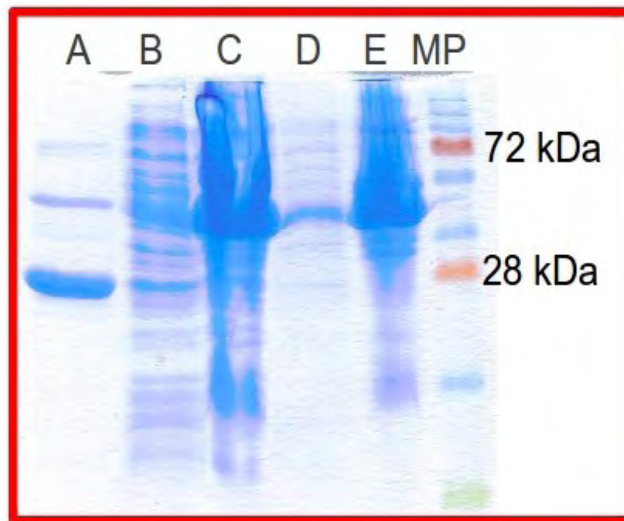


Figura 20. Gel desnaturalizante SDS-PAGE 12%. A. Carril de la fracción soluble de la purificación de la proteína quimera N4C2-CFP. B. Carril de la fracción no soluble de la purificación de la proteína quimera N4C2-CFP. C. Carril de la fracción purificada de los cuerpos de inclusión. D. Carril de la fracción purificada por Ni^{2+} de los cuerpos de inclusión. E. Fracción no unida de la purificación por Ni^{2+} de los cuerpos de inclusión. MP. Marcador de peso molecular.

Para favorecer la solubilidad de la proteína quimera decidimos fusionar una segunda proteína fluorescente en el carboxilo terminal del CNBD y expresar la proteína recombinante en un sistema eucarionte. Por lo primero nos sustentamos del análisis informático del perfil de agregación (ΔPA)⁵³ el cual da una aproximación cuantitativa de cualquier proteína en solución a formar conglomerados no solubles. Al analizar el perfil de agregación de un péptido el algoritmo estima un valor ΔPA , el cual sí es mayor a 0 indica que el péptido tiene mayor probabilidad de formar agregados no solubles en fase acuosa y a pH neutro. Por otra parte, mientras menor sea a 0 el valor de ΔPA , el péptido tendrá mayor probabilidad de permanecer en fase acuosa a pH neutro. En la tabla 3 se muestra un resumen del análisis informático de 30 quimeras, es decir para cada fragmento del CNBD se determinó su perfil de agregación con 0, 1 y 2 proteínas fluorescentes. Como se observa en la tabla 3 la fusión de una o dos proteínas fluorescentes aumenta la probabilidad de que la proteína recombinante permanezca en fase acuosa.

Tabla 5. Determinación del perfil de agregación del CNBD con 0, 1 y 2 proteínas fluorescentes. Se indica en número de veces que se mejora la solubilidad predicha con 1 y 2 proteínas fluorescente.

	N1C2	N3C2	N3C2	N4C2	N5C2	N1C1	N2C1	N3C1	N4C1	N5C1
Δ PA CNBD	-0.024	-0.034	-0.054	-0.059	-0.064	0.013	-0.009	0.014	-0.014	-0.018
Δ PA CNBD	-0.07	-0.085	-0.098	-0.103	-0.108	-0.062	-0.08	-0.079	-0.096	-0.103
1 PF	0.3X	2.5X	1.8X	1.7X	1.7X	4.8X	8.9X	5.6X	6.8X	5.7X
Δ PA CNBD	-0.092	-0.106	-0.115	-0.119	-0.124	-0.091	-0.104	-0.106	-0.118	-0.123
2 PF	3.8X	3.1X	2.1X	2.0X	1.9X	7X	11.6X	7.6X	8.4X	6.8X

Construcciones quiméricas de 10 fragmentos del CNBD y dos proteínas fluorescentes en un sistema eucarionte.

De acuerdo al análisis informático del perfil de agregación, el uso de dos proteínas fluorescentes podría incrementar la solubilidad de la proteína. De hecho existe un ejemplo en nuestro grupo: el CNBD de PKA unido solamente con una CFP se queda en el cuerpo inclusión mientras que el mismo dominio fusionado con CFP y YFP se convirtió una proteína soluble. Por lo anterior, decidimos probar la fusión de nuestra proteína con CFP y YFP. Para reutilizar los 10 fragmentos del sNHE preparados anteriormente, escogimos un plásmido construido previamente en el laboratorio, pRSETb(+)-CFP-4-YFP, el cual codifica un dominio de CNBD de PKA unido a CFP y YFP en su N- y C-terminal mediante los sitios de KpnI y BamHI, respectivamente. Primero insertamos el gen de la proteína fluorescente mCherry en el sitio de PKA con ayuda de las enzimas de restricción KpnI y BamHI, siguiendo con nuestro sistema exitoso de selección por color en caja. A este vector lo nombramos pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP. Debido a que pRSETb(+)-CFP-mCherry-YFP no tiene la cola de seis histidinas (6 his), subclonamos el fragmento de DNA que codifica mCherry-YFP a otro vector que tiene 6His y CFP usando las enzimas de restricción KpnI y HindIII. Este vector fue denominado pRSETb(+)-6HCFP-mCherry-YFP. Posteriormente, insertamos cinco fragmentos amplificadas con el C-terminal más pequeño del CNBD del sNHE que preparamos previamente usando los sitios de KpnI y BamHI; el intercambio del fragmento de

mCherry por un fragmento del sNHE. Los productos de ligación se transformaron en la cepa BL21(DE3) y seleccionamos las colonias por código de color (colonia verde). Determinamos la secuencia de DNA de cada plásmido y confirmamos que el tamaño y la secuencia de los insertos son correctos. Inoculamos las colonias positivas en 50 ml de líquido LB y expresamos las proteínas incubando las bacterias a temperatura ambiente por 72 h con agitación. Confirmamos la expresión de las proteínas por color verde-amarillo de las bacterias; sin embargo la mayoría de señal de la fluorescente se quedó en la pastilla después de la sonicación y no logramos extraer las proteínas solubles. Para reducir la velocidad de síntesis de las proteínas de bacteria, incubamos las bacterias a 16 °C por 72 h después de crecer las células a una densidad alta (37 °C por una noche). Esta modificación de la condición de la expresión tampoco sirvió para obtener las proteínas solubles del CNBD del sNHE.

Vector de expresión en bacteria y células de mamífero

Considerando la dificultad que obtuvimos en la expresión de nuestra proteína a la fracción soluble en bacteria, decidimos cambiar el sistema de expresión; un cultivo de células de mamífero, CHO (ovario de hámster chino). Sin embargo, no hay un vector de expresión que funcione tanto en bacteria así como en células de mamífero. Debido a que la selección de colonias de bacteria por código de color en caja petri fue muy útil, intentamos preparar un vector quimérico de dos plásmidos, pcDNA3.1 y pRSET. El vector pcDNA3.1 es un vector muy popular para expresar proteínas en cultivos de células de mamífero como CHO y HEK293. Este plásmido genera alto número de copias en bacteria y tiene el promotor T7 aparte del promotor CMV (citomegalovirus) (Figura 21), lo cual cumple dos requisitos para expresar proteínas en bacterias usando las cepas BL21(DE3) o JM109(DE3). Sin embargo, el pcDNA3.1 no tiene un sitio de unión de ribosoma (RBS) de bacteria en su 5' UTR, que es lo que permite expresar proteínas en bacteria. Revisando los sitios de restricción de los vectores pcDNA3.1 y pRSETb(+), encontramos que es posible transferir el fragmento de DNA de pRSET que codifica el RBS de bacteria junto con la región codificada de una proteína al pcDNA3.1(-) (no al pcDNA3.1(+)) usando XbaI y HindIII. Para confirmar nuestra idea, construimos un plásmido quimérico insertando el fragmento de pRSETb(+)-6HCFP-mCherry-YFP (incluyendo RBS de bacteria) a pcDNA3.1(-) usando XbaI y HindIII (Figura 21). Nombramos al nuevo plásmido pcDNA(proRBS)-6HCFP-mCherry-YFP.

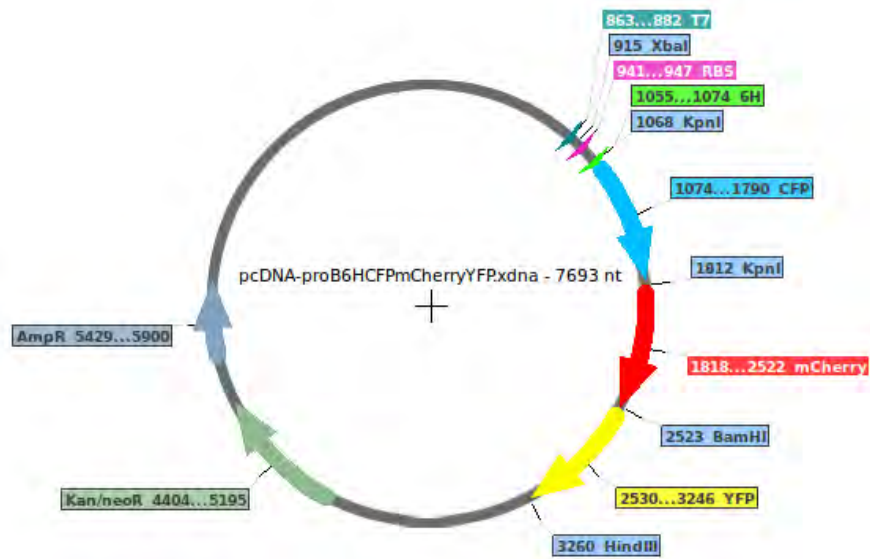


Figura 21. Vector de expresión pcDNA(proRBS)-6HCFP-mCherry-YFP. RBS, sitio de unión a ribosoma. T7, promotor de expresión de fago λ T7. CMV, promotor de Citomegalovirus. AmpR, resistencia a ampicilina. NeoR, resistencia a Neomicina (también kanamicina).

Expresión de una proteína recombinante en un sistema procarionte como en un sistema eucarionte.

Para demostrar que nuestra estrategia experimental resultó exitosa, probamos el vector pcDNA(proRBS)-6HCFP-mCherry-YFP en la cepa BL21(DE3) y también en cultivo de células CHO. La figura 22 claramente muestra que la bacteria transformada con el nuevo vector es resistente a ampicilina y a kanamicina, y además forma colonias de color rojo, es decir que el vector funciona para expresión de proteínas en procariontes (panel A). Además, en el panel B podemos observar que células CHO transfectadas con el mismo vector también expresan la proteína recombinante en un sistema eucarionte. De esta manera podemos utilizar este vector de expresión para clonar los diez fragmentos del C-terminal del sNHE de forma sistemática, seleccionando por color en caja en una cepa procarionte, y posteriormente expresar la proteína quimérica en un sistema eucarionte.

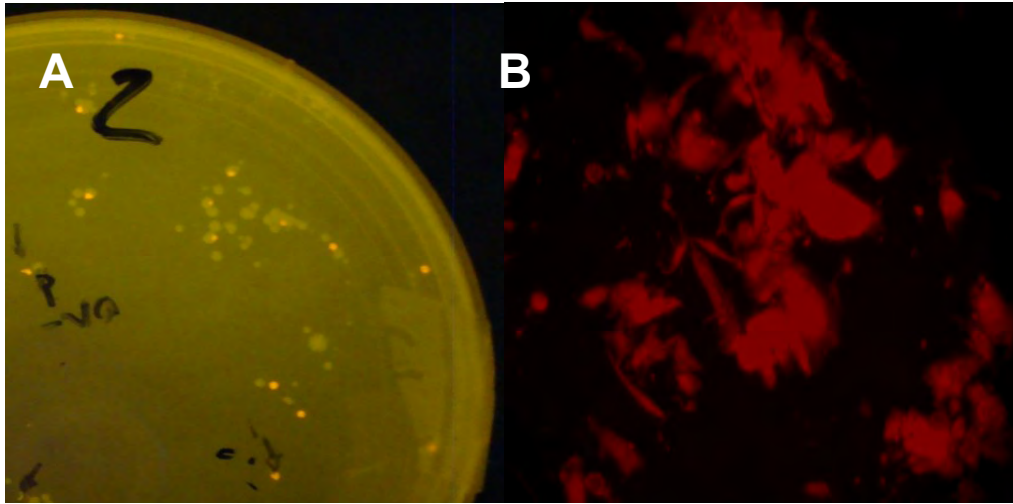


Figura 22. A. Expresión de la construcción pcDNA(proRBS)-CFP-mCherry-YFP en *E. coli*. **B.** Expresión de la construcción pcDNA(proRBS)-CFP-mCherry-YFP en células CHO.

VIII. Discusión.

Al día de hoy no está bien establecido como el pH intracelular es regulado en el espermatozoide de mamífero. Algunos grupos apoyan la idea de que el intercambiador sodio-protón específico para espermatozoide (sNHE) es la principal entidad molecular que participa sobre la regulación de este factor fisiológico mediante la activación de un dominio predicho de unión a nucleótidos cíclicos presente en el C-terminal citoplasmático de este intercambiador^{13,54}. Sin embargo, no se ha logrado expresar la proteína completa del sNHE en un sistema heterólogo, lo cual nos motivó a estudiar solamente el dominio citoplasmático del sNHE.

Preparación de plásmidos de expresión.

En este trabajo clonamos el C-terminal del sNHE en el vector pJET1.2, desde cual generamos 10 fragmentos diferentes, variando la longitud del N- y C-terminal. Para expresar las proteínas recombinantes en bacteria, inicialmente usamos el vector pET para clonar la fusión de un fragmento del C-terminal del sNHE con una proteína fluorescente CFP. El vector pET comúnmente se ha utilizado para expresar una proteína recombinante bajo el promotor del fago λ T7. El diseño de este vector está basado en un origen de replicación del vector pBR322, el cual genera un número bajo de copias y es indispensable utilizar IPTG para la expresión de la proteína recombinante. Al inicio de este trabajo no se logró determinar la concentración óptima de IPTG para expresar la proteína recombinante en caja petri. El Dr. Takeharu Nagai (Univ. Sapporo, Japón, actualmente Univ. Osaka, Japón) nos recomendó utilizar el vector pRSET para selección de colonia en caja petri sin agregar IPTG, por lo que decidimos cambiar de vector de expresión. El vector pRSETb(+) es un vector utilizado para expresar una proteína recombinante bajo el promotor del fago λ T7. El diseño de este vector está basado en un origen de replicación del vector pUC el cual genera un alto número de copias. A diferencia de pET, pRSET no requiere IPTG para la expresión de la proteína recombinante, debido a que en las cepas de *E. coli* DE3 tienen un nivel de fuga de expresión de la RNA polimerasa T7 el cual es suficiente para expresar la proteína quimérica autónomamente con el vector de el alto número de copias como pRSET. En general, el uso de pRSET nos facilitó los procedimientos de biología molecular, incluyendo la secuenciación, debido al alto número de copias en bacterias (los plásmidos purificados son más limpios que los de pET). Además, utilizando unas proteínas fluorescentes con diferentes colores, establecimos un tamiz eficiente (fácil y económico) para seleccionar colonias de bacteria que tienen los plásmidos con el inserto deseado. Esta

metodología funcionaría no solamente para nuestro proyecto sino también para cualquier construcción de un plásmido como una alternativa del vector pBluescript, el cual usa el color de la colonia azul y blanco.

Utilizamos la misma estrategia para el vector de expresión en células eucariontes. El vector pcDNA3.1 es un vector muy popular para la expresión de proteínas en células de mamífero y produce un alto número de copias en bacteria. Además, tiene el promotor T7 para la transcripción in vitro, el cual funciona como un promotor para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias que tienen el gen de RNA polimerasa T7 de fago λ como BL21(DE3). El único elemento que se necesita para la expresión de proteína en bacteria es el sitio de unión a ribosoma de la bacteria (RBS). Generamos un vector quimérico de pcDNA3.1(-) y pRSETb(+) para complementar el RBS al pcDNA3.1, nombrado pcDNA3.1(proRBS), cual nos permite expresar una proteína tanto en bacteria y como células de mamífero. Esta estrategia nos facilitará preparar varios vectores de expresión que codifican distintos fragmentos del dominio citoplasmático C-terminal del sNHE usando el tamiz eficiente con color de colonias de bacteria en caja petri. El único inconveniente que podría mencionar de la estrategia que desarrollamos es el uso de cepa DE3 como BL21(DE3), cuya eficiencia de transformación es más baja que otras cepa de clonación como DH5a.

Ensayo de unión.

Una vez que logramos expresar la proteína recombinante en *E. coli* en un experimento piloto con una cantidad pequeña de bacteria determinamos la actividad de las proteínas mediante un ensayo de unión tipo FRET entre la proteína fluorescente CFP y el análogo fluorescente de cAMP, 8-Fluo-cAMP. Observamos unos resultados de espectro de fluorescencia que sugieren unión específica entre el fragmento del C-terminal del sNHE y el análogo de cAMP. Estos ensayos no son concluyentes ya que los resultados deben ser corroborados con otra estrategia experimental y podrían acarrear distintos artefactos experimentales que deben ser considerados. Durante la manipulación de estos ensayos, ya sea de proteína recombinante o de 8-Fluo-cAMP, se tomaba uno o dos μL de la solución. En este caso una gota extra o una burbuja de aire en la punta de la pipeta puede cambiar significativamente el volumen de la muestra y por consecuencia alteraría la concentración final de la proteína y/o el análogo de cAMP. Los ensayos se realizaban en el espectrofotómetro excitando con un haz de luz de 435 nm, el cual también excita al análogo 8-Fluo-cAMP. Aunque la eficiencia es baja, una alteración de la concentración del donador o el aceptor afecta directamente en el patrón del espectro de fluorescencia de emisión del 8-Fluo-cAMP.

En el futuro, usando otro tipo de proteína fluorescente, como mAmetrine con un análogo de cAMP adecuado, posiblemente podemos resolver este problema, lo cual estamos planeando realizar en nuestro grupo. También es importante puntualizar que la luz de excitación tiene diferentes patrones de difracción dependiendo la posición del tubo que se utilizó, puesto que los tubos que usamos son muy delgados y no tienen una forma homogénea.

Como se mencionó anteriormente, los datos obtenidos en el ensayo de unión tipo FRET deben ser sustentados y corroborados mediante otra estrategia experimental, por lo que decidimos utilizar otro método de espectrometría de fluorescencia denominado Anisotropía.

Para determinar la interacción entre CNBD-CFP y el 8-Fluo-cAMP, el método de Anisotropía enfoca solamente a la fluorescencia de 8-Fluo-cAMP, por lo que CFP casi no afecta la medida de Anisotropía de 8-Fluo-cAMP, lo cual es una ventaja comparado con el método de FRET. Sin embargo, no solamente a la proteína de interés sino cualquier molécula que se una al 8-Fluo-cAMP incrementa el valor de Anisotropía, por lo que la técnica de Anisotropía requiere una muestra purificada para obtener resultados confiables. Confirmamos que la técnica de Anisotropía funciona muy bien para determinar la interacción entre un CNBD-CFP y 8-Fluo-cAMP usando el CNBD de EPAC1. Sin embargo, el problema de estabilidad de nuestra proteína no nos permitió utilizar este método prácticamente.

En el caso de las quimeras que expresan dos proteínas fluorescentes en el extremo N- y C-terminal del fragmento del CNBD, la fusión de la segunda proteína fluorescente YFP nos imposibilita realizar el ensayo de FRET utilizando 8-fluo-cAMP puesto que el espectro de excitación y emisión de la proteína YFP y 8-fluo-cAMP son similares, por lo anterior hemos decidido realizar un ensayo de Anisotropía utilizando el análogo fluorescente 8-pharos-cAMP⁵⁵ ya que el espectro de excitación y emisión se encuentran alejados hacia el rojo respecto a YFP u 8-fluo-cAMP.

Estabilidad del dominio citoplasmático en el C-terminal del sNHE.

Después de un experimento piloto con 10 mL de suspensión de bacteria, incrementamos el volumen de cultivo para obtener una mayor cantidad de las proteínas recombinantes. En esta condición, la mayoría de proteínas recombinantes se quedaron en la fracción no soluble y las proteínas en la fracción soluble se encontraban degradadas (evaluado por SDS-PAGE). La

estabilidad de la proteína está comprometida con su plegamiento. Pensamos que la proteína estaba mal plegada por crecer el cultivo de *E. coli* a temperatura ambiente alrededor de 25 °C, por lo que se implementó un protocolo de crecimiento y de expresión a 16 °C. Sin embargo no obtuvimos resultados positivos.

Para determinar si la proteína recombinante que forma los cuerpos de inclusión se encuentra completa y útil, decidimos purificar los cuerpos de inclusión de una construcción (N4C2), desnaturalizar los cuerpos de inclusión y replegar las proteínas recuperadas en presencia de un estabilizador (L-Arginina) a baja temperatura (4 °C). El resultado muestra que la proteína efectivamente se encontraba completa en los cuerpos de inclusión pero no era posible mantener la estabilidad en solución puesto que se precipita poco tiempo después de purificar la proteína recombinante renaturalizada por Ni²⁺. Cabe mencionar que este método funcionó por lo menos para recuperar el plegamiento de la proteína fluorescente (CFP); la señal de la fluorescencia casi desapareció en el momento de la desnaturalización con alta concentración de urea y se recuperó en el paso de renaturalización.

Para incrementar la solubilidad de las proteínas, preparamos construcciones que codifican dos proteínas fluorescentes uniendo el N- y C-terminal de los fragmentos del sNHE, sin embargo ninguna construcción sirvió para obtener proteínas solubles.

El complejo del sNHE y sAC.

Para obtener un éxito en la expresión del C-terminal del sNHE, posiblemente se necesitará una chaperona especial para que el dominio se pliegue correctamente. La adenilato ciclasa soluble específica de espermatozoide (sAC) es un candidato fuerte ya que existe un reporte de la expresión codependiente entre el C-terminal del sNHE y sAC, es decir se expresa la sAC únicamente si se expresa el sNHE⁵⁶. Apoyando esta idea, se ve afectada la expresión de la sAC a nivel de traducción en el ratón nulo del sNHE⁵⁴. Además de la expresión codependiente, experimentos de coimmunoprecipitación indican que el sNHE y la sAC se asocian entre ellos, lo que sugiere que estas dos proteínas son componentes de un complejo de señalización en el flagelo del espermatozoide. Obtuvimos una clona de sAC de rata (Dr. Loney Levin, Cornell Univ. NY a través de Addgene) y actualmente estamos preparando construcciones del C-terminal del sNHE para realizar experimento de co-expresión en células CHO.

Respecto a la función del CNBD del sNHE podemos proponer dos hipótesis generales. La primera es dominio no funcional: en el 2009 el grupo de Zagotta reportó la función del CNBD predicho presente en el C-terminal de los canales de potasio ERG, concluyendo que el dominio no modula la función del canal ²⁹. Es decir, la presencia de un CNBD predicho en la secuencia de una proteína no significa que la unión de un cNMP regule la función de la misma. La segunda idea es el dominio funcional. Es importante considerar que la concentración de cAMP en el micro ambiente del CNBD es muy alta en comparación de la concentración de cAMP en el resto del citoplasma del espermatozoide. La relevancia que tiene esta condición fisiológica está relacionada con la k_d del CNBD, es decir una constante muy alta por el cAMP (Afinidad baja) funcionaria muy bien en el caso del sNHE. Considerando esta posibilidad, es necesario estudiar la actividad del CNBD del sNHE con un amplio rango en la concentración de cAMP.

Función del sNHE en humano y ratón.

Como se mencionó, el *cassette* de unión a fosfato (PBS) coordina la unión del cNMP en el CNBD. En 1998 el grupo de Tibbs analizó la función de la R559 conservada en el PBS de los canales CNG utilizando mutación sitio dirigida. El grupo determinó que este aminoácido juega un papel fundamental en la interacción y coordinación del grupo fosfato del cAMP con el PBS y en la función integral del CNBD ³⁶. Analizando la secuencia primaria del CNBD del sNHE de humano y ratón, notamos que la arginina en la región del PBS no está presente en lo de humano pero sí en el CNBD de ratón. En este sentido el CNBD de humano posiblemente no esté funcionando como un regulador del sNHE. Es importante mencionar que, en el espermatozoide de humano, el canal de protones sensible a voltaje muestra una mayor corriente comparada con la observada en el espermatozoide de ratón ⁵⁷, lo cual nos sugiere que la participación del sNHE de humano es menos importante en la regulación del pH_i .

IX. Conclusiones.

Al finalizar este trabajo hemos concluido:

- El C-terminal citoplasmático del sNHE de ratón se clonó exitosamente en un vector pJET1.2.
- Se generaron 10 fragmentos del C-terminal del sNHE variando el N- y el C-terminal.
- Se generaron múltiples construcciones de plásmidos que codifican el dominio predicho con cada fragmento del C-terminal del sNHE: 10 construcciones con una proteína fluorescente en el N-terminal y 10 construcciones que codifican el fragmento con dos proteínas fluorescentes en el N-terminal y el C-terminal, respectivamente.
- Ninguna proteína quimérica pRSETb(+)-CFP-CNBD se pudo expresar en solución a pesar de las modificaciones en las condiciones de crecimiento y de expresión
- La construcción pRSETb(+)-CFP-N4C2 se purificó y se renaturalizó de cuerpos de inclusión. Sin embargo, mostró un patrón inestable de solubilidad poco tiempo después de la purificación.
- Se generó una construcción quimérica entre los vectores pRSETb(+) y pcDNA3.1(-) que expresa una proteína recombinante tanto un sistema procarionte como en un sistema eucarionte.

X. Perspectivas.

- Expresar las 10 construcciones quiméricas pcDNA(proRBS)-6HCFP-CNBD-YFP en un sistema eucarionte.
- Evaluar la solubilidad de las 10 construcciones quiméricas expresadas en células CHO.
- Para determinar si se favorece la solubilidad de alguno de los 10 fragmentos del CNBD del sNHE, expresar tanto la sAC como la proteína quimérica CFP-CNBD-YFP en el mismo sistema de expresión.
- Determinar los cambios conformacionales que ocurren en el CNBD soluble del sNHE asociado a la sAC.
- Caracterizar la afinidad del CNBD por cAMP, mediante un ensayo de unión tipo FRET.

Anexo I. Tabla de oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia 5' -> 3'	Diseño
Tak92F	TCATGAACGTGATTCGACT	Amplificar por RT-PCR el CNBD del sNHE.
Tak91R	TCATTTTGAAAAGCTTAGGCA	
Tak22F (HindIII + 6 His)	CCAAGCTTATGCATCATCATC ACCACCACGTGAGCAAGGG CGAGGAGCTGTTC	Amplificar por PCR el gen de la proteína fluorescente CFP.
Tak94R (GGGSGGG + KpnI + A + BamHI + stop + XhoI)	CCOCTCGAGTTAGGATCCCG CGGTACCGCCACCGCCGCTA CCAACCCTTGTACAGCTC GTCCATGCCGAG	
Tak96F (KpnI) N1	CCCGGTACCCTGCTGCAAAT CATAGACAAAAGG	Generar 10 fragmentos del CNBD del sNHE.
Tak98F (KpnI) N2	CCCGGTACCTCCAAACAGAC TAAACAGATATTG	
Tak99F (KpnI) N3	CCCGGTACCAAGGTGGAAG GCACTGAG	
Tak100F (KpnI) N4	CCCGGTACCTTTAATGTTGAA GAAGCCCCG	
Tak101F (KpnI) N5	GGGGGTACCGATCCTGAAGC CATAACCTTTATTC	
Tak97R (BamHI) C1	CCCGGATCCGATGTTAATATT CTCTTCTATCAATTCCTC	
Tak102R (BamHI) C2	CCCGGATCCCTTATAAATTTT TCGCAGCTGGC	
Tak115R	GGA GGT ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG	KpnI y BamHI (con stop antes de BamHI)
Tak116F	GGT GGA TOC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	

1. Grubb, B.J. Developmental Biology, Eighth Edition. Scott F. Gilbert, editor. *Integrative and Comparative Biology* **46**, 652-653 (2006).
2. R., B.A. Purification, Culture, and Fractionation of Spermatogenic Cells. *Methods* **225**, 84-113 (1993).
3. Suarez, S.S. Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update* **14**, 647-57 (2008).
4. Yanagimachi, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote Cambridge England* **2**, 371-372 (1994).
5. Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M. & Yanagimachi, R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *PNAS* 1-4 (2011).doi:10.1073/pnas.1116965108/-DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116965108
6. Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. & Treviño, C.L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews* **91**, 1305-55 (2011).
7. Visconti, P.E. *et al.* Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* **53**, 133-150 (2002).
8. Visconti, P.E. *et al.* Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development Cambridge England* **121**, 1139-1150 (1995).
9. Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* **140**, 327-337 (2010).
10. Martínez-López, P. *et al.* Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **381**, 204-9 (2009).
11. Suárez, S.S. & Osman, R.A. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biology of Reproduction* **36**, 1191-1198 (1987).
12. Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. & Treviño, C.L. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews* **91**, 1305-55 (2011).
13. Lishko, P.V. *et al.* The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual review of physiology* **74**, 453-75 (2012).
14. Harper, C.V., Cummerston, J.A., White, M.R.H., Publicover, S.J. & Johnson, P.M. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *Journal of Cell Science* **121**, 2130-2135 (2008).
15. Metz, E.C., Kane, R.E., Yanagimachi, H. & Palumbi, S.R. Fertilization between closely related sea urchins is blocked by incompatibilities during sperm-egg attachment and early stages of fusion. *Biological Bulletin* **187**, 23-34 (1994).
16. Darszon, A., López-Martínez, P., Acevedo, J.J., Hernández-Cruz, A. & Treviño, C.L. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* **40**, 241-252 (2006).
17. Cai, X. & Clapham, D.E. Evolutionary genomics reveals lineage-specific gene loss and rapid evolution of a sperm-specific ion channel complex: CatSpers and CatSperbeta. *PLoS one* **3**, e3569 (2008).
18. Jin, J. *et al.* Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biology of reproduction* **77**, 37-44 (2007).
19. Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J. & Clapham, D.E. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *The International journal of developmental biology* **52**, 607-13 (2008).

20. Kobori, H., Miyazaki, S. & Kuwabara, Y. Characterization of intracellular Ca²⁺ increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biology of reproduction* **63**, 113-20 (2000).
21. Kobori, H., Miyazaki, S. & Kuwabara, Y. Characterization of intracellular Ca²⁺ increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biology of reproduction* **63**, 113-20 (2000).
22. Akke, M. & Forsén, S. Protein stability and electrostatic interactions between solvent exposed charged side chains. *Proteins* **8**, 23-29 (1990).
23. Buck, J. & Levin, L.R. Physiological sensing of carbon dioxide/bicarbonate/pH via cyclic nucleotide signaling. *Sensors (Basel, Switzerland)* **11**, 2112-28 (2011).
24. Wakabayashi, S. & Munezaki Shigekawa, A.J.P. Molecular Physiology of Vertebrate Na⁺ / H⁺ Exchangers. *Molecular Physiology* **77**, (1997).
25. Babcock, D.F. & Pfeiffer, D.R. Independent elevation of cytosolic [Ca²⁺] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 15041-15047 (1987).
26. Lee, H.C. & Garbers, D.L. Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract. *The Journal of Biological Chemistry* **261**, 16026-16032 (1986).
27. Wang, D., King, S.M., Quill, T. a, Doolittle, L.K. & Garbers, D.L. A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature cell biology* **5**, 1117-22 (2003).
28. Quill, T. a, Wang, D. & Garbers, D.L. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatS-pers. *Molecular and cellular endocrinology* **250**, 84-92 (2006).
29. Brelidze, T.I., Carlson, A.E. & Zagotta, W.N. Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *The Journal of biological chemistry* **284**, 27989-97 (2009).
30. Brelidze, T.I., Carlson, A.E., Sankaran, B. & Zagotta, W.N. Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. *Nature* **481**, 530-533 (2012).
31. Berman, H.M. *et al.* The cAMP binding domain : An ancient signaling module. *Structure* **102**, 4-9 (2005).
32. Kannan, N. *et al.* Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. *Genome biology* **8**, R264 (2007).
33. Taylor, S.S., Buechler, J.A. & Yonemoto, W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **59**, 971-1005 (1990).
34. Matulef, K., Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. Molecular rearrangements in the ligand-binding domain of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **24**, 443-452 (1999).
35. Youn, H., Kerby, R.L., Koh, J. & Roberts, G.P. A C-helix residue, Arg-123, has important roles in both the active and inactive forms of the cAMP receptor protein. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 3632-3639 (2007).
36. Tibbs, G.R., Liu, D.T., Leybold, B.G. & Siegelbaum, S. a A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *The Journal of biological chemistry* **273**, 4497-505 (1998).
37. Berman, H.M. *et al.* The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 45-50 (2005).

38. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. *Brock Biology of Microorganisms. Cell* **2**, 1168 (Pearson/Benjamin Cummings: 2009).
39. Jana, S. & Deb, J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 289-298 (2005).
40. Brondyk, W.H. *Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. Methods in enzymology* **463**, 131-47 (Elsevier Inc.: 2009).
41. García-Fruitós, E. *et al.* Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial cell factories* **4**, 27 (2005).
42. Brewer, J.W., Cleveland, J.L. & Hendershot, L.M. A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. *the The European Molecular Biology Organization Journal* **16**, 7207-7216 (1997).
43. Esposito, D. & Chatterjee, D.K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 353-358 (2006).
44. Kovtun, O. *et al.* Protein Expression System. *Transformation* **55**, 58-64 (2011).
45. Products, R., Pcr, S. & Protein, S. Protein Expression. *Molecular Biology* **90**, 31-31 (2007).
46. Ys, J. & Hr, H. News on GFP variants. *Worm Breeders Gazette* **14**, (1995).
47. Wood, E. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. 48. *Biochemical Education* **11**, 82-82 (1983).
48. Dagert, M. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of. *Recherche* **6**, 23-28 (1979).
49. Saiki, R.K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
50. Lakowicz, J.R. & Masters, B.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. Journal of Biomedical Optics* **13**, 029901 (Springer: 2008).
51. Kraemer, a *et al.* Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *Journal of molecular biology* **306**, 1167-77 (2001).
52. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* **5**, 725-38 (2010).
53. Sánchez de Groot, N., Pallarés, I., Avilés, F.X., Vendrell, J. & Ventura, S. Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC structural biology* **5**, 18 (2005).
54. Wang, D. *et al.* A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9325-30 (2007).
55. Moll, D. *et al.* Biochemical characterization and cellular imaging of a novel, membrane permeable fluorescent cAMP analog. *BMC biochemistry* **9**, 18 (2008).
56. Wang, D. *et al.* A sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 9325-30 (2007).
57. Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* **140**, 327-337 (2010).

