



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“CLONACIÓN, CARACTERIZACIÓN, EXPRESIÓN E
INMUNOLocalIZACIÓN DEL GEN Y LA PROTEÍNA
RECOMBINANTE 3-AS”**

T E S I S

QUE PRESENTA:

JOSÉ LUIS SUÁREZ FRANCO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

TUTOR:

DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

México, D.F. Ciudad Universitaria, Mayo 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez infinitamente por haberme guiado durante toda la maestría y por ser más que un tutor, por ser un gran amigo.

Al Dr. Higinio Arzate por haberme orientado y ayudado para desenvolverme y ser mejor en este mundo que es el de la investigación.

Al los miembros del jurado por todas las críticas hechas a este trabajo.

A los compañeros del laboratorio, Bruno, Eduardo, Pedro, Valentina, Anita, Juan Luis, Larus, Cynthia, Mercedes, Alejandro, Uriel, Mario, Luis, Ali por las críticas al trabajo y por todos los buenos momentos que hemos pasado durante estos años.

Este trabajo fue apoyado por DGAPA-UNAM IN200808.

Dedicatorias.

A Dios por todas las bendiciones que me ha dado.

A mis padres por quererme tanto, por ser ejemplo, por todo el apoyo incondicional y por ser guías durante todo este camino que se llama vida.

A mi hermana y a mi cuñado por las palabras de aliento en los momentos difíciles y por los consejos a lo largo de la vida

A Claudia por el apoyo incondicional, por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado juntos y por ser más que mi amiga.

A toda mi gran familia y amigos que sería interminable mencionarlos uno por uno, pero gracias a su apoyo he alcanzado otra de mis metas.

ÍNDICE

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Antecedentes.....	7
Planteamiento del problema.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	18
Materiales y métodos.....	19
Resultados.....	29
Discusión.....	34
Conclusión.....	37
Anexo.....	38
Bibliografía.....	47

Resumen

El cemento es un tejido mineralizado que cubre la superficie de la raíz del diente, sin embargo poco se sabe acerca de su crecimiento y desarrollo, esto debido a la carencia de marcadores específicos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar un gen llamado 3-AS (Número de acceso de GeneBank. EU220031). Se analizó *in silico* en el programa NCBI: ocupando las bases de datos de PROSITE y ExPASSY para determinar características teóricas de la secuencia 3-AS. Se realizaron RT-PCR e hibridación *in situ* para determinar la expresión temporal y espacial del gen 3-AS en humano y tejidos periodontales. Se clonó la secuencia del gen 3-AS dentro de un vector de expresión para su transfección en células de *Drosophila melanogaster*. El análisis teórico dio como resultado una proteína teórica de 195 aminoácidos con una Mr de 17,760 KDa con posibles sitios de fosforilación en los aminoácidos de ser y thr; O-glicosilaciones y C-manosilaciones. La purificación de la proteína hr3-AS fue analizada mediante western-blot usando anticuerpos específicos contra los epítopes 6xHis-tag y V5, detectando una banda de ~35 KDa. Los anticuerpos contra las fosforilaciones cruzaron contra la banda más prominente. El RT-PCR y la hibridación *in situ* determinaron la expresión y la localización del mensajero del gen 3-AS en tejidos periodontales adultos, mostrando fuerte señal de los híbridos ARN-ARN en cemento celular, fibroblastos del ligamento periodontal y en zonas paravasculares del ligamento periodontal. Se aisló un gen que es altamente expresado en el cemento radicular y en el ligamento periodontal. Esto podría contribuir a su posible papel dentro de la formación del cemento radicular y del ligamento periodontal.

Abstract

Cementum is a unique mineralized tissue that covers the root surface of teeth, however very little is known about its growth and differentiation because the lack of specific markers. The aim of this research was to characterize a novel gene which we have named 3-AS (GenBank accession Number. EU220031). *in silico* analysis of NCBI; PROSITE and ExPASSY data bases were used to determine the homologies of 3-AS gene sequence. RT-PCR and *in situ* hybridization were used to study the temporal and spatial expression of 3-AS gene in human and periodontal tissues. We cloned the 3-AS gene sequence onto an expression vector for *Drosophila melanogaster* system. Analysis of 3-AS sequence gave us a theoretical protein of 195 aminoacids with a Mr of 17,760 KDa with possible phosphorylations in amino acids ser, thr; O-glycosilation and C-manosilations. Purification of the rh3-AS protein were analyzed by western blot using specified antibodies against the 6xHis-tag and V5 epitope showed a band with a 35 KDa MW. Antibodies against phosphorilations crossreact with this prominent band. RT-PCR and *in situ* hybridization determined that the expression 3-AS mRNA in human adult periodontal tissues showed strong signal of the hybrids RNA-RNA in cellular cementum, fibroblasts of periodontal ligament and some cells around blood vessels. We have isolated a new gene that is highly expressed in cementum and periodontal ligament. This could contribute to determine its possible role during cementum and periodontal ligament formation.

ANTECEDENTES

Los órganos dentales se encuentran compuestos por cuatro tejidos minerales: esmalte, dentina, hueso alveolar y cemento radicular. Estos tejidos se diferencian a partir de una constante interacción epitelio-mesénquima y cada uno de estos tejidos está constituido por sales de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita (HA), depositados en la matriz extracelular (MEC) por proteínas específicas secretadas por las células que conforman dichos tejidos: ameloblastos, odontoblastos, osteoblastos y cementoblastos.

De los cuatro tejidos mineralizados que conforman al órgano dentario, esta tesis de investigación se centrará en uno de los tejidos menos estudiado del organismo humano; el cemento radicular

El cemento radicular fue descrito por primera vez en 1835 por los discípulos de Purkinje como un tejido mineralizado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios con características únicas; como presentar un bajo recambio metabólico, carecer de inervación, de irrigación sanguínea directa, de drenaje linfático y no sufrir procesos de resorción y aposición de un modo fisiológico [1, 2].

El cemento radicular estructuralmente es importante porque desempeña funciones especializadas como proveer el anclaje para las fibras de colágena que comprende el ligamento periodontal (fibras de Sharpey), mediar la inserción del diente al hueso alveolar, distribuir las fuerzas masticatorias y jugar un papel primordial en la reparación de la superficie radicular cuando el cemento radicular es afectado por enfermedades crónicas, episódicas e inflamatorias, como la gingivitis y la periodontitis, las cuales hoy día son consideradas un problema de salud pública a nivel mundial [3].

El cemento radicular se asume que presenta algunas similitudes con el hueso, porque:

1) Las enfermedades que afectan las propiedades del hueso, a menudo alteran las propiedades del cemento. La enfermedad de Paget resulta en hiper cementosis; La hipofosfatasa resulta en la no-formación de cemento, con la exfoliación dentaria; y El hipopituitarismo esta asociado con la disminución de cemento, son algunos ejemplos [4].

2) La composición inorgánica del cemento radicular y del hueso alveolar esta constituida aproximadamente del 50% de fosfatos de calcio, que se puede observar por microscopía electrónica en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Asimismo algunos elementos trazas como magnesio (0.5 al 0.9%), flúor, sodio, cobre, azufre y zinc, se encuentran en ambos tejidos; sin embargo su significado no ha sido estudiado a detalle [5].

3) La matriz orgánica de cemento y hueso presentan moléculas estructurales en común como: Colágenas Tipo I (95%) y Tipo III (5%); moléculas involucradas en el depósito de los cristales de hidroxiapatita como: Fibronectina (FN), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC), osteonectina (SPARC); y diversos factores de crecimiento que activan o regulan la diferenciación de los cementoblastos como: Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II), factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa), factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento tumoral beta ($TGF\beta$) [5-11].

El continuo estudio de la matriz extracelular con el afán de encontrar moléculas específicas del cemento radicular han llevado al aislamiento de por lo menos tres moléculas de importancia en el cemento radicular, debido a su especificidad celular como: la proteína de adhesión de cemento (CAP), la proteína de cemento (CEMP-1) y el factor de crecimiento de cemento (CGF) que se ha reportado ser similar al factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) [9, 12-16].

Sin embargo, el cemento radicular en cuanto a su biología de formación (cementogénesis), permanece como un paradigma oscuro, debido a la falta de marcadores específicos para localizar a las células progenitoras de los cementoblastos durante el desarrollo y durante el estadio adulto [17, 18].

Las investigaciones que han intentado localizar el origen de los cementoblastos recaen en diversas teorías. Una de las teorías sugiere que durante el desarrollo; las células ectomesenquimatosas, las células del folículo y las células de la papilla dental, cuando son estimuladas correctamente tienen la capacidad de actuar como cementoblastos [19-23]. Otra teoría establece que en el estadio adulto, las células de los espacios endosteales del hueso alveolar migran y adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal -exhibiendo algunas características de células madre- convirtiéndose posteriormente en células formadoras de tejido mineral con un fenotipo osteo-cementoblástico [19, 24, 25]. Por último, otra teoría sugiere que durante el desarrollo de la raíz, diferentes factores relacionados con las amelogeninas tales como tuftelina y ameloblastina suministradas por las células de la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS), pueden en parte influenciar la diferenciación de las células del folículo dentario hacia cementoblastos, de tal modo que durante el inicio del

proceso de la cementogénesis, secreten la matriz pre-mineralizada del cemento [26, 27] ; o bien, se propone que son las mismas células epiteliales de Hertwig las cuales se encuentran bajo una transformación ectomesenquimatosa hacia un linaje cementoblástico, donde sus espacios intercelulares se llenan de fibras de colágena, expresando tonofilamentos rudimentarios y desmosomas (característica típica de los cementoblastos), apoyando el concepto de la herencia ancestral epitelial de las células cementoblásticas [28, 29].

Toda esta información considerada en conjunto, indican que los factores que disparan la proliferación, migración y diferenciación celular de las células responsables para la formación del cemento radicular permanecen controversiales y como preguntas abiertas.

Las anteriores interrogantes se pueden abordar al identificar, aislar y caracterizar poblaciones celulares que expresen el fenotipo del cemento radicular. Aunque se han realizado diversos intentos para obtener poblaciones de células cementoblásticas y propagarlas *in vitro* [7, 30, 31], los estudios reportan que existen dificultades para lograr este objetivo; primero por los laboriosos procedimientos de disección requeridos para obtener suficiente tejido para estudiar sus propiedades bioquímicas y moleculares. Segundo porque a la fecha no existe un marcador biológico específico de la matriz extracelular del cemento radicular. Y tercero, porque la población celular del ligamento periodontal es heterogénea, lo cual implica que existen linajes osteoblásticos, cementoblásticos y fibroblásticos, que impiden aislar una población puramente cementoblástica. Debido a que el 40% del total de las poblaciones del ligamento periodontal expresan un fenotipo asociado a la formación de tejido mineralizado y solo el 7%

de esta población expresa el fenotipo cementoblástico con alta actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP), lo que revela estadios de diferenciación.

Tomando en cuenta lo anterior descrito y pensando en contribuir al entendimiento de la biología del cemento radicular; nuestro laboratorio desarrolló una estrategia de investigación, la cual consistió en aislar, expandir y caracterizar parcialmente una línea celular a partir de un cementoblastoma de humano [32, 33]. La Organización Mundial de la Salud considera al cementoblastoma como un raro tumor odontogénico de origen mesenquimatoso. La lesión presenta un crecimiento lento asociada a la raíz de órganos dentarios permanentes (premolares y/o molares) y radiográficamente, la lesión esta bien delimitada con su parte central radio-opaca y comúnmente rodeada por una zona radio-luminosa de anchura uniforme, que representa el tejido no mineralizado que corresponde a las capas celulares en formación, es decir, cementoblastos [34].

Los cultivos celulares derivados del cementoblastoma, manifestaron inicialmente una morfología fibroblástica, y después del pasaje 4^{to} a 5^{to} asumieron una morfología distinta; consistente en células más anchas, aplanadas y multipolares, especialmente cuando llegaban a confluencia [35].

La caracterización de las células derivadas del cementoblastoma, muestran que esta línea celular parece ser homogénea y clonal así como expresar el fenotipo del cemento celular humano, dado que expresan marcadores asociados a tejidos mineralizados como: la fosfatasa alcalina (ALP) enzima reconocida como un marcador biológico en el complejo proceso de la diferenciación de osteoblastos y cementoblastos, participando en la mineralización de la matriz extracelular, probablemente regulando las concentraciones extracelulares de fosfatos [5, 36] y

proteínas no colágenas como la osteopontina (OPN) y la sialoproteína ósea (BSP); proteínas que se encuentran en la respectiva matriz mineralizada del cemento e implicadas en el depósito del mineral y en las interacciones matriz-matriz durante el desarrollo radicular [7, 25, 37]. Asimismo, esta línea celular -de un modo importante- también ha mostrado producir moléculas putativas específicas del cemento radicular mencionadas y descritas en la literatura; un factor mitogénico el cual parece ser una isoforma más grande que el factor de crecimiento IGF-I [16, 38], una proteína de 72 KDa, CEM-1 [26] y una proteína de adhesión de 55 KDa [39, 40]. Esta proteína es conocida como Proteína de Adhesión del Cemento radicular (CAP) y es una especie de 56-65 KDa que ha sido purificada de extractos de cemento humano y bovino [41] y caracterizada como una proteína colagénica [15]. Anticuerpos monoclonales producidos contra la CAP tiñen positivamente células del ligamento periodontal *in vitro* [14, 42] la capa cementoide y la capa adyacente de cementoblastos *in vivo* [30], sugiriendo que CAP puede ser un marcador apropiado para diferenciar el cemento radicular del hueso [43, 44].

Por otro lado, la caracterización de la naturaleza y propiedades estructurales del tejido mineral depositado *in vitro* por las células derivadas del cementoblastoma, muestran que es diferente al compararlo con el tejido mineralizado depositado por células derivadas de hueso alveolar *in vitro*. Además, estas células producen una matriz extracelular mineralizada que es similar al cemento celular humano tanto en morfología, composición y ultraestructura; así como sintetizar y secretar una proteína de ~56 KDa (proteína derivada de cementoblastoma, CP), la cual presenta reacción cruzada con el anticuerpo contra la CAP [45]. Un anticuerpo policlonal producido en conejo contra la CP reveló que

esta proteína está distribuida a través de la longitud del cemento radicular y en células progenitoras cementoblásticas tanto *in vivo* como *in vitro* [45]. Estudios utilizando la proteína CP purificada sugieren que esta proteína promueve la adhesión de fibroblastos gingivales, células del ligamento periodontal y células derivadas de hueso alveolar. Asimismo, promueve la expresión de ALP y la producción de matriz extracelular mineralizada en células mesenquimatosas embrionarias sin un fenotipo definido [35]. Ensayos de inhibición *in vitro* utilizando el anticuerpo anti-CP sobre los cultivos celulares cementoblásticos, revelaron que la proteína CP regula las características morfológicas de la matriz extracelular mineralizada depositada *in vitro* por las células cementoblásticas, ya que se encontraron cambios en la composición de las relaciones de calcio y fósforo (Ca/P) de los cristales de hidroxiapatita. Estos cambios parecen estar asociados con la expresión y función de la osteopontina, sialoproteína ósea y la fosfatasa alcalina. Llevando a sugerir que la proteína CP juega un papel clave durante la mineralización de la matriz extracelular en la formación del cemento radicular [46].

Todos estos resultados preliminares, sugieren que las células derivadas del cementoblastoma humano, aunque comparten un progenitor común con las células osteoblásticas, siguen diferentes vías en el proceso de mineralización y por lo tanto, en la diferenciación, ofreciendo una oportunidad única de llevar al aislamiento de moléculas específicas del cemento radicular.

Con esto en mente y utilizando el anticuerpo policlonal anti-CP, llevamos a cabo el tamizaje de una biblioteca de ADNc usando el vector λ -ZAP Express construida con ARN mensajero obtenido a partir de las células derivadas del

cementoblastoma humano. El tamizado de esta biblioteca nos llevo al aislamiento de diversas clonas:

1) CEMP-1 (GeneBank Accession Number: AY584596). Es una proteína de 247 aminoácidos aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos humanos cultivados *in vitro*. Posee un ADNc de 1374 nucleótidos contiene un marco de lectura abierto de 744 nucleótidos, la proteína tiene un peso molecular teórico de 26 KDa, tiene sitios de N-glicosilación, fosforilación y miristilación, se predice la localización nuclear a pesar de no tener motivos de unión a ADN. La proteína CEMP-1 es altamente expresada a nivel de ARN mensajero por cementoblastos y subpoblaciones del ligamento periodontal, así como, por células progenitoras localizadas en el ligamento periodontal [35]. Experimentos *in vitro* han mostrado que esta proteína promueve adhesión y diferenciación celular. Asimismo, ha sido implicada en el proceso de deposición, crecimiento y morfología de cristales de hidroxiapatita, sin embargo la función de la proteína aún no esta del todo definido [12, 13].

2) CAP (GeneBank Accession Number: AY455942). La proteína CAP se ha aislado, purificado y caracterizado parcialmente a partir de extractos de cemento maduro, es una proteína tipo colágena, tiene un peso molecular de 56 KDa y presenta secuencia de aminoácidos con cierta homología con colágenas tipo I y XII, aunque no están inmunológicamente relacionadas [15]. Se ha inmunodetectado en la matriz del cemento radicular, en células de zonas paravasculares del ligamento periodontal y espacios endosteales del hueso alveolar, se ha demostrado que esta proteína promueve la adhesión de células derivadas del periodonto, y que promueve la migración con mayor afinidad para

las células del ligamento periodontal, además de tener alta afinidad por fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular e incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina [14, 35, 42].

3) 3-AS (GeneBank Accession Number EU220031): Clona que aun no ha sido estudiada por lo cual; esta tesis de Maestría se enfoco a la caracterización teórica del gen 3-AS así como al asilamiento y purificación de la proteína que es codificada por el gen 3-AS al utilizar un sistema de expresión eucarionte (*Drosophila melanogaster*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado con características físico-químicas y estructurales bien conocidas que han sido descritas a detalle a nivel morfológico. Aunque se han realizado progresos acerca del aislamiento y propagación de líneas celulares que expresan el fenotipo del cemento radicular, el conocimiento específico acerca del origen del linaje cementoblástico, y los mecanismos celulares y moleculares que controlan el proceso de la cementogénesis, aún es muy limitado a la fecha. Una de las principales causas ha sido la falta de marcadores moleculares específicos para el fenotipo cementoblástico. Por ello, el aislamiento y caracterización de moléculas que sirvan de marcadores moleculares para el fenotipo cementoblástico abre la oportunidad de determinar en un futuro la localización de las células progenitoras y/o entender la biología del cemento radicular con énfasis a la cementogénesis.

Con esto en mente, nuestras investigaciones se han enfocado en años recientes a tratar de aislar moléculas que sirvan de marcadores moleculares para el fenotipo cementoblástico

HIPÓTESIS

El gen 3-AS será un marcador del cemento radicular y codificará para una proteína de matriz extracelular del cemento radicular.

OBJETIVO GENERAL

Clonar, expresar, localizar y caracterizar el gen y la proteína recombinante 3-AS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar las características teóricas de la proteína 3-AS.

- 2) Determinar la expresión del ARN mensajero de la proteína 3-AS en líneas celulares derivadas del peridodonto de humano por medio de la técnica de RT-PCR.

- 3) Localizar la expresión del ARN mensajero de la proteína 3-AS en cortes de órgano dentarios de humano por medio de hibridaciones *in situ*.

- 4) Expresar la proteína 3-AS en un sistema ortólogo eucarionte (células de *Drosophila melanogaster*).

- 5) Purificar y caracterizar la proteína 3-AS (peso molecular, fosforilaciones y glicosilaciones).

MATERIALES Y MÉTODOS

Excisión del plásmido “Bluescript” de la biblioteca de ADNc lambda ZAP Express

La biblioteca de ADNc λ ZAP Express EcoRI/XhoI (Stratagene, La JollaCA), fue construida utilizando ARN mensajero, obtenido de células derivadas de un cementoblastoma humano. Se recobraron los insertos de ADNc como plásmidos “Bluescript” (Invitrogen, Carlsbad, CA) por excisión de la biblioteca λ ZAP usando un fago cooperador denominado ExAssit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente 250 μ l de stock del fago fueron incuados con 200 μ l de células E. coli (XL1-Blue MRF) hasta obtener una $O.D_{600} = 1.0$. Posteriormente se agregó 1 μ l del fago cooperador ExAssit ($>1 \times 10^6$ pfu) y 3 mL de medio NZY (Gibco), dejando en crecimiento por 3 horas. La mezcla fue calentada a 65°C por 20 minutos y centrifugada a 1000 r.p.m. por 15 minutos, 100 μ l de sobrenadante fueron incubados con 200 μ l de células E.coli XL0LR a 37°C hasta obtener una $O.D_{600}=1.0$. 50 μ l de esta mezcla fueron plaqueados sobre placas de kanamicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) (50 μ g/ml) e incubados toda la noche a 37°C, las colonias bacterianas que contenían el plásmido “Bluescript” con el inserto de ADNc se colocaron en medio LB (Gibco) para su crecimiento toda la noche. El ADN super enrollado fue preparado con el kit miniprep Quiaprep, para la recuperación de plásmidos con el inserto de ADNc (Quiagen, Valencia CA).

Recuperación de clones de ADNc “Panning”

Las placas para realizar el “panning” (método de inmunoselección de clones celulares) fueron preparadas de acuerdo a lo escrito por Wysocky y Sato [47]. Las cajas de cultivo bacteriológico de 6cm fueron cubiertas por 2 horas con un anticuerpo de cabra anti-conejo IgG (SIGMA) a una concentración de 5 µg/ml diluido en solución de fosfatos salinos (PBS); posteriormente las cajas bacteriológicas se lavaron con PBS y los sitios no reactivos fueron bloqueados toda la noche con PBS con BSA (SIGMA) a una concentración de 2 mg/ml. Las placas fueron preparadas en cantidades suficientes y almacenadas a -20°C. En el “panning” las placas de 100 mm tratadas para cultivo celular con un 50 a 80% de células fibroblásticas COS-7, fueron transfectadas con 16 µg de ADN plasmídico super enrollado obtenido de la biblioteca substraída. Para el protocolo de transfección utilizando el reactivo de Lipofectamina Plus, fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Entre las 48 y 72 horas después de la transfección, las células fueron despegadas con PBS, 1mM EDTA y 5% FBS e incubadas a 37°C por 30 minutos. Las células despegadas fueron centrifugadas y posteriormente resuspendidas en una solución de PBS con 10mM EDTA y 5% SFB que contenía un anticuerpo policlonal anti-CP en una dilución de 1:1000 en hielo durante 1 hora. Las células después fueron diluidas 1:1 con la solución de PBS, 1 mM EDTA y 0.5% NaN₃ y 10 ml de PBS, mM EDTA y 0.5% NaN₃ con 2% de Ficoll 400. Después las células se centrifugaron a 1500 r.p.m. por 5 minutos, el sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y el botón resuspendido en una pequeña cantidad de PBS, 1 mM EDTA/5% SFB. Las células fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente

en las placas que ya habían sido cubiertas con el anticuerpo IgG, lavando posteriormente tres veces gentilmente con PBS, mM EDTA 5% SFB; las células que se adhirieron a las placas fueron retiradas con un rapador de células. El plásmido de ADN fue aislado con el Kit Quiaprep de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Quiagen, Valencia, CA). El ADN de la primera parte del “panning” se utilizó para transformar a células competentes de *E. coli*, las colonias resultantes fueron agrupadas y multiplicadas por crecimiento en medio LB con kanamicina (50 µg/ml) (Invitrogen). El proceso de “panning” fue repetido en el mismo orden de tres a cuatro veces para obtener fibroblastos COS-/ con el anticuerpo anti-CP. Los plásmidos provenientes de colonias individuales positivas fueron analizados por el tamaño del inserto a través de PCR utilizando los arrancadores T3 y T7 (templado de ADN 100ng en 1 µl, amortiguador 10X 5µl, dNTP´s 0.5 µl, arrancadores T3 y T7 0.1 µg/µl cada uno en 1 µl, H₂O 41.5 µl y Taq polimerasa 1-2 U/µl en 1 µl). El ADN fue amplificado con un programa de 25 ciclos donde la desnaturalización inicial fue por 2 minutos a 94°C, la desnaturalización 1 minuto a 94°C, alineamiento 1 minuto a 55°C, la extensión 1 minuto a 72°C y una extensión final de 7 minutos 72°C. El fragmento de ADN finalmente fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y Hind III (Stratagene).

Secuenciación y análisis teórico del ADNc de la proteína recombinante 3-AS

Los plásmidos con el ADNc de la clona 3-AS fueron sujetos a secuenciación direccional usando un secuenciador de ADN ABI Prism 377 (Dye-termination chemistry). Los cambios de nucleótidos fueron detectados por identificación de

dobles picos en el cromatograma para la muestra de ADN heterocigota y confirmada por secuenciación de la dirección opuestas. La secuencia del gen 3-AS se analizó en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con el objetivo de determinar los datos teóricos de la estructura de la proteína 3-AS de acuerdo a su composición de aminoácidos y sus posibles modificaciones postraduccionales la secuencia del gen 3-AS se analizó en los programas *EXPASY* y *PROSITE*.

Construcción del ADNc en plásmido de expresión eucarionte

El ADNc que codifica para la proteína 3-AS se clonó en un vector de entrada pENTR/SD-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) para garantizar su direccionalidad en marco de lectura. Para lograr dicha direccionalidad en el vector de entrada se diseñaron los oligos de la siguiente manera: el oligo sentido fue diseñado tomando 4 pares de bases (CACC) en el extremo 5' seguido por un codón de inicio (ATG) para un adecuado inicio de la traducción y una correcta direccionalidad de clonación. El oligo antisentido fue diseñado eliminando el codón de paro nativo en orden para fusionar el producto con la secuencia que codifica para los epítopes de 6 histidinas y V5 en la región carboxilo terminal. Esta clona de entrada (pENTR/SD-TOPO + 3AS), fue recombinada con el vector de destino Gateway pMTDest-48/BiP/V5-His (Invitrogen, Carlsbad, CA) lo que resultó en la producción del plásmido pMTDest-48/BiP/h3AS-V5-His en el cual la N-terminal de h3-AS se fusiona posterior a la secuencia señal BiP en marco de lectura, y la C-terminal con un péptido de 6 histidinas y un péptido V5 (La unión de las regiones fue confirmada por secuenciar el ADN).

Una vez obtenido el vector de destino (pMTDest-48/BiP/h3AS-V5-His), las células embrionarias de *Drosophila melanogaster* (DML2) fueron transfectadas junto con el vector de selección pCoHygro usando el método de transfección de cloruro de calcio. Las células DML2/pMTDest-48/BiP/h3AS-V5-His, se crecieron en medio completo (Schnider's *Drosophila* Medium) conteniendo 500 µg/mL de higromicina-B. El medio de selección fue cambiado cada 5 días durante 4 semanas hasta obtener clonas de células resistentes y estables que permitieron establecer una línea celular. Las células DML2/pMTDest-48/BiP/h3AS-V5-His estables obtenidas anteriormente se indujeron con 750 µM de sulfato de cobre (CuSO₄), de 7 a 21 días; debido a que la transcripción de la secuencia codificante de la proteína humana 3-AS esta bajo el control del promotor de la metalotioneína (MT) que es inducible por iones divalentes como el cobre. Las células embrionarias de *Drosophila melanogaster* (DML2) transfectadas con el vector vacío pMT/BiP/V5-His B fueron utilizadas como control negativo.

Expresión y purificación de la proteína 3-AS

Para la expresión de la proteína recombinante, se crecieron las células DML2/pMTDest-48/BiP/h3AS-V5-His estables en medio completo (Schnider's *Drosophila* Medium) conteniendo 500 µg/mL de higromicina-B y 750 µM CuSO₄ durante 4 semanas a una temperatura de 28°C en condiciones de 100% de humedad y aisladas de la luz. Al término del periodo de inducción las células de insecto se centrifugaron a 7500 rpm y se obtuvo el medio de cultivo celular, el cual fue concentrado hasta 5 mililitros utilizando concentradores centricon (Amicon). Para la purificación de la proteína recombinante 3-AS, se llevó a cabo por medio

de utilizar la cromatografía de afinidad de níquel (Ni^{2+}) en una columna de 1 ml. El medio concentrado donde se encuentra la proteína recombinante 3-AS, se llevó a 10 mililitros con una solución de 10 mM de imidazol en buffer de fosfatos pH 7.4 e inhibidores de proteasas (peuceptina y pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta solución de la proteína recombinante 3-AS se pasó a través de la columna de afinidad que tiene en su interior sulfato de níquel a una concentración de 0.1 M, repitiendo el paso a través de la columna de Ni^{2+} por lo menos 5 veces. Posteriormente se lavó la columna con una solución de 10 mM de imidazol para retirar la unión de proteínas inespecíficas que se encontraran en el medio de cultivo. Para obtener la fracción purificada de la proteína recombinante 3-AS la columna se lavó con una solución de 100 mM de imidazol en buffer de fosfato pH 7.4. Esta fracción se concentró y se utilizó para realizar geles de poliacrilamida SDS-PAGE, la detección por inmunotransferencias de los epítopes de histidinas, V5 y para los estudios de las modificaciones post-traduccionales.

Electroforesis de la proteína recombinante 3-AS en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de SDS fueron realizados para los diferentes procedimientos de identificación de la proteína recombinante 3-AS. Los geles fueron preparados al 12% de acrilamida y corridos a 100 V por 45 minutos. Se cargaron 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína por línea. Los geles fueron teñidos con solución de Azul de Coomasie para observar la banda de la proteína recombinante y desteñidos en una solución que contiene 50% de metanol, 10% de ácido acético y 40% de agua.

Inmunotrasferencias

Los geles de electroforesis al 12% de acrilamida con la proteína recombinante 3-AS para cada uno de los procedimientos fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (GibcoBRL) en una cámara de inmunotransferencia semi-seca (BIORAD) a 50 mV por un lapso de 2 h. Pasado el tiempo las membranas se sumergieron en solución de Ponceau S (0.1% Ponceau S p/v en 5% de ácido acético v/v) para confirmar la transferencia de la proteína recombinante 3-AS. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche descremada al 5% a un pH 7.4 (NaCl, leche descremada, H₂O doble destilada) por 1 h en agitación a temperatura ambiente. Para detectar el epítotope de histidinas una de las membranas fue incubada con el anticuerpo policlonal anti-His diluido 1:1000 en PBS-T (PBS + 0.5% Tween 20) y para detectar el epítotope V5 la segunda membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-V5 diluido con PBS-T 1:3000 durante toda la noche a 4°C. Terminado el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas durante 3 veces por 15 minutos con PBS-T e inmediatamente incubados con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón peroxidado en el caso de las membranas incubadas con anticuerpos monoclonales en una dilución de 1:1000 y cabra anti-conejo para los anticuerpos policlonales diluidos a 1:1000 en solución de bloqueo por 1 hora. Previo al revelado la membrana fue lavada con PBS-T por 15 minutos y las inmunotrasferencias fueron reveladas por quimioluminiscencia con el sistema Millipore.

Detección de modificaciones post-traduccionales de la proteína recombinante 3-AS

La proteína recombinante (DES-rh3AS) purificada por la columna de afinidad de níquel fue caracterizada para analizar la presencia de modificaciones post-traduccionales tales como:

1) Glicosilaciones: Para determinar el grado de glicosilaciones de la DES-hr3AS la proteína fue inmunotransferida a membranas de nitrocelulosa y se procedió a utilizar el kit de detección DIG Glycan Detection Kit (Roche, NJ) que permite visualizar por medio de anticuerpos las modificaciones de glicosilación en la proteína.

2) Fosforilaciones: Para determinar la presencia de las fosforilación en la proteína recombinante DES-hr3AS, la proteína fue inmunotransferida a membranas de nitrocelulosa y se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-fosfotreonina y anti-fosfoserina. Asimismo, los anticuerpos policlonales anti-fosfotirosina fueron usados como control negativo, ya que la predicción de la secuencia de aminoácidos de la proteína 3-AS no contiene residuos de tirosina.

Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional determinada por RT-PCR de la proteína 3-AS en líneas celulares del periodonto humano.

Las células humanas derivadas del ligamento periodontal (PDL), fibroblastos gingivales (HGF), osteoblastos (OST) y cementoblastos derivados de un cementoblastoma (CEM) fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante 10 días. Pasado el tiempo de cultivo celular, se aisló el ARN mensajero total de las líneas celulares usando el kit

RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA). Para analizar la expresión del ARN mensajero se utilizó 1 µg de ARN total para la reacción RT-PCR de un solo paso (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las especificaciones del fabricante durante 25 ciclos en un termociclador (MJ, Research, Watertown, MA, CA). Para amplificar el ARN mensajero se utilizaron los arrancadores de la molécula 3-AS, cuya secuencia es la siguiente: sentido 5' CACCATGGATGGACGACAGCC 3', y el antisentido 5' GTCCTGCAGGTTTAAACGAAC 3', el cual da un inserto de ~580 pb. La molécula GAPDH se utilizó como control positivo para garantizar que no existiera degradación del material genético. Los productos de la reacción fueron separados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de luz UV y fotodocumentados con el sistema Kodak EDAS 290.

Hibridación *in situ*

Los cortes histológicos de los órganos dentarios se encuentran en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM. Para la detección del mensajero en los cortes de los órganos dentarios, las laminillas se sumergieron en xileno para desparafinar durante 5 minutos seguido de un proceso de hidratación en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 70%, 50% y 30%) durante 1 minuto. Posteriormente para llevar a cabo la hibridación, las laminillas se incubaron a 65°C durante toda la noche con la sonda de ARN complementario del gen 3-AS (experimental) y la sonda no complementaria del gen 3-AS (control) en una solución amortiguadora de fosfatos con formamida. Al día siguiente, las

laminillas se lavaron con una solución concentrada de citratos de sodio por 30 minutos (2XSSC, 1XSSC y 0.1XSSC) a una temperatura de 55°C para remover la sonda inespecífica del gen 3-AS y tratadas con RNasa A (100mg/ml) por 30min a 37°C, para eliminar las sondas que no hibridaron durante el tiempo de incubación. Posteriormente se incubaron en una solución con albúmina de suero bovino al 10% con el anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (Boheringer Mannheim, Germany) para detectar por medio del sustrato NBC/BCIP la señal positiva de los híbridos ARN-ARN del gen 3-AS. La reacción de detección se detuvo sumergiendo en PBS pH 6.5 por 10min, y las laminillas se montaron con DABCO y se fotodocumentaron al visualizar mediante microscopia óptica la localización específica del gen 3-AS.

RESULTADOS

Análisis teórico de la secuencia 3-AS

Mediante el análisis teórico de la clona 3-AS en bases de datos, se obtuvo que la clona presenta un ADNc de 587pb, con un marco de lectura abierto de 585 pb. Este marco de lectura abierto codifica para una proteína teórica de 195 aminoácidos (**Figura 1**). El ADNc denominado por nosotros 3-AS fue registrado en el banco de genes (GeneBank Accession Number. EU220031).

El gen que codifica para la proteína 3-AS, se localiza en el cromosoma número 19 de *Homo sapiens* y de *Pan trogloditas* en el locus 19p13.1.

La predicción teórica de la secuencia de aminoácidos usando el programa ExPASy reveló una proteína novel con una movilidad relativa de 17.76 kDa, presentando un punto isoeléctrico alcalino de 11.64 y con posibles modificaciones post-traduccionales:

- 1) Presenta 17 sitios probables de ser modificados por *fosforilaciones* (en los aminoácidos de treoninas en posiciones 64, 87, 122, 144 y serinas en posiciones 42, 60, 74, 75, 84, 91, 92, 114, 115, 124, 132, 156, 167);
- 2) Presenta 11 sitios probables de ser modificados por *O-glicosilaciones* (en los aminoácidos treoninas en posiciones 29, 32, 117, 122, 136, 144, 148, 152 y serinas en posiciones 124, 132, 138);
- 3) Presenta 3 sitios probables de ser modificados por *C-manosilación* (en los aminoácidos triptófanos en posiciones 18, 54, 77).

Utilizando el programa BLAST para analizar la secuencia de la proteína 3-AS, no encontramos homologías con las proteínas presentes en las bases de datos de este programa, sin embargo encontramos que presenta una identidad del 33%

con la Colágena tipo I en secuencias parciales de la proteína 3-AS (11, 26, 84, 120, 121, 123, 135, 144,171).

Construcción del vector de expresión para la proteína 3-AS

El fragmento aislado por el método de “panning” se clonó en el vector pENTR/SD-D-TOPO + 3AS (para asegurar su direccional); y recombinado con el vector de expresión pMTDest-48/BiP/His-V5+3-AS (Invitrogen, Carlsbad, CA): El vector de expresión logrado por recombinar ambos vectores (entrada y destino); fue transfectado en células de *Drosophila melanogaster*. La transfección y la expresión del gen 3-AS en las células de insecto se comprobaron por medio de análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce la bandera de 6-Histidinas que le adiciona el vector de expresión a la proteína cuando esta siendo procesada por las células de insecto. El anticuerpo anti-His va acoplado al fluorocromo isotiocinato de fluoresceína (FITC), que permite visualizar a las células que están expresando a la proteína. La inmunofluorescencia, tiñe positivamente las células de insecto cuando fueron sometidas a inducción con sulfato de cobre, lo cual nos indica que están expresando la proteína 3-AS cuando se comparan con las células de insecto control, las cuales fueron transfectadas con el vector de expresión vacío y expuestas a sulfato de cobre. Esto confirma que las células de insecto transfectadas con el vector pMT-Dest48/Bip/His-V5+3-AS, lo incorporaron a su genoma y llevan con éxito la producción de la proteína 3-AS en el sistema ortólogo eucarionte.

Para confirmar, que la proteína 3-AS se expresa satisfactoriamente en el sistema de células de insecto, asilamos el ARN mensajero cuando las células llevaban 3

días de inducción con sulfato de cobre. El aislamiento del ARN mensajero de la proteína 3-AS fue amplificado a ADN por medio de la técnica de RT-PCR; como se observa en la figura 2. La reacción de RT-PCR muestra un amplicon de 585 pb lo que confirma que las células transfectadas con el gen que codifica para la proteína 3-AS expresan el mensajero establemente. Las células control transfectadas con el vector vacío, no muestran amplificación del mensajero que codifica para proteína 3-AS (**Figura 2**).

Reconocimiento de la proteína con los anticuerpos anti-His y anti-V5

Una vez confirmado que nuestro sistema eucarionte esta expresando establemente el gen que codifica para la proteína 3-AS, llevamos a cabo la identificación del producto génico en geles de poliacrilamida al 12%.

Los resultados de la identificación del producto génico, muestra que la proteína recombinante 3-AS mostró tener tres especies prominentes, como se puede visualizar en los geles teñidos con azul de Coomasie (**Figura 3**).

Para confirmar los resultados anteriores, realizamos inmunotransferencias utilizando los anticuerpos específicos contra las banderas adicionadas por el vector de destino (epitope 6x-Histag y epitope V5). Las inmunotransferencias nos mostraron que los anticuerpos reconocen estas tres especies prominentes de la proteína recombinante 3-AS. Con los resultados de tinción de coomasie y de las inmunotransferencias se lograron obtener los datos de la movilidad relativa de las tres especies prominentes de la proteína recombinante 3-AS: Una especie presenta una movilidad relativa de ~22,000 KDa, otra una movilidad relativa de ~35,000 KDa y una especie de ~50 KDa. (**Figura 4**).

Reconocimiento de fosforilaciones, glicosilaciones y reacción cruzada con colágena tipo I

Una vez determinada la movilidad relativa de la proteína 3-AS, se determinó si esta diferencia en movilidad, que puede ser interpretada como diferencia en peso, podría deberse a las posibles modificaciones postraduccionales teóricas mencionadas párrafos arriba.

Una de las modificaciones mencionadas por el análisis teórico de la secuencia son la presencia de fosforilaciones, las cuales fueron detectadas mediante la utilización de anticuerpos anti-serina y anti-treonina (**Figura 5**), donde las tres especies prominentes de la proteína 3-AS, mostraron poseer ambos tipos de fosforilaciones. Sin embargo es claro que se necesitan hacer más estudios para poder determinar en que cantidad podrían estar presentes estas modificaciones en ambas especies.

Las posibles glicosilaciones que podrían estar presentes en la proteína recombinante fue determinada mediante el anticuerpo anti-Glycan, en donde sólo la especie de ~35 KDa mostró tener este tipo de modificación (**Figura 6**), lo cual argumenté que la tres especies son la misma proteína recombinante sólo con diferentes grados de modificaciones postraduccionales.

Finalmente, los análisis teóricos dieron como resultado que presenta identidad con la proteína Colágena tipo I, utilizando el anticuerpo anti-Colágena I de humano, encontramos que dicho anticuerpo presenta reacción cruzada con las bandas de ~35 KDa y ~50 KDa, esto nos habla que el arreglo estructural o el plegamiento de la proteína recombinante podría estar determinada en función de sus

modificaciones y que los sitios idénticos a la colágena solo son expuestos cuando la proteína presenta glicosilaciones **(Figura 7)**.

Localización del mRNA mensajero en cortes del órgano dentario

La localización del RNA mensajero fue determinada en cortes de órganos dentarios mediante la técnica de hibridación *in situ*, donde la señal positiva del ARN mensajero que codifica para la proteína 3-AS se localizó en las zonas paravasculares del hueso alveolar, en subpoblaciones celulares del ligamento periodontal y en la capa cementoide del cemento radicular **(Figura 8)**.

Caracterización de la expresión del ARNm en líneas celulares periodontales

La expresión del ARN mensajero en las líneas celulares del periodonto se determinó mediante la técnica de RT-PCR. Los resultados indican que hay la presencia de un amplicon del gen 3-AS en cementoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal, encontrándose ausente en osteoblastos y fibroblastos gingivales **(Figura 9)**.

DISCUSIÓN

Se aisló un ADNc de 587 pb, el cual tiene un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 195 aminoácidos, con una movilidad relativa teórica de ~17.7 KDa. Esta proteína denominada 3-AS, la cual deriva de una línea celular de un cementoblastoma al ser analizada teóricamente presenta sitios de *fosforilación* en los aminoácidos de Ser y Tre, dichas modificaciones le confieren a la proteína un carácter ácido, el cual en muchas proteínas con características ácidas juegan un papel en el crecimiento de los cristales de hidroxapatita como la sialoproteína ósea u osteocalcina [48]. Esta proteína presenta 11 sitios probables de *O-glicosilación*, las cuales le podrían conferir mayor peso molecular, además de que este tipo de modificación se encuentre en moléculas como las sialoproteína ósea y osteopontina, ayudando a la función confiriéndoles propiedades de adhesión celular, regular el proceso de mineralización, promover interacciones célula-célula e interacciones célula-matriz extracelular [49-51]. Esta proteína presenta teóricamente sitios probables de *C-manosilaciones*, los cuales le podría conferir un carácter secretor a ésta proteína o bien una ubicación dentro de la membrana plasmática [52].

La expresión de la proteína 3-AS en las células de *Drosophila melanogaster* se corroboró con la inmunofluorescencia en donde se muestra la expresión de la proteína recombinante. Esta proteína es excretada de las células al medio, donde logramos encontrar las especies más prominentes detectadas con el anticuerpo policlonal anti-V5, el cual solo reconoce el epítipo agregado a la proteína recombinante para su detección, no así, en el lisado celular, el cual no reacciona contra el anticuerpo policlonal anti-V5. Con el anticuerpo monoclonal anti-His el

medio muestra las bandas detectadas con el anticuerpo policlonal anti-V5, sin embargo se evidencian otras bandas las cuales son proteínas propias de la expresión con *Drosophila melanogaster* y el cual es menos específico, y al igual que con el anticuerpo policlonal anti-V5, no reconoce bandas en el lisado celular. Todos los datos teóricos fueron corroborados y corregidos mediante los experimentos, y en los cuales arrojaron tres especies de la proteína 3-AS con pesos moleculares de ~22 KDa , ~35 KDa y ~50 KDa, y en donde la especie de ~22 KDa es la especie que no presenta modificaciones postraduccionales, y donde la especie de ~50 KDa no es tan prominente con respecto a la de ~35 KDa, por lo que es considerada un corte alternativo del ADN.

La segunda especie de ~35 KDa es la proteína que presenta todas las posibles modificaciones postraduccionales como lo son fosforilaciones, glicosilaciones, y manosilaciones, detectadas con lo anticuerpos anti-Ser, anti-The y anti-Gly, estos datos se pueden corroborar con estudios previos donde se ha logrado aislar y caracterizar proteínas como el receptor a glucagon humano, plasminógeno humano, proteínas virales HIV-igp120, péptidos de anticuerpos como la cadena simple del fragmento variable scFv, interleucinas y oncogenes como H-Ras con diferentes grados de modificaciones postraduccionales y los cuales son importantes para estudiar sus propiedades biológicas de las moléculas en sistemas de cultivo *in vitro* [53-55].

En la proteína 3-AS recombinante se obtuvo una reacción cruzada con anticuerpos anti-Colágena tipo I, lo cual nos indica que esta proteína en su arreglo tridimensional podría tener un dominio triple helicoidal idéntico al que presenta la

Colágena tipo I. Dicho dominio podría estar sujeto a la presencia de sus modificaciones haciendo que el estructural o el plegamiento de la proteína en estos sitios se han idénticos a la colágena y expuestos cuando la proteína presenta las glicosilaciones.

Los RT-PCR de las líneas derivadas del cementoblastoma indican que la expresión del ARN mensajero es en células del cemento y en células del ligamento periodontal, con las hibridaciones *in situ*, se localizó la expresión del mensajero en la región del cemento y en zonas paravasculares del ligamento periodontal, lo cual corrobora el experimento de RT-PCR en donde estas dos líneas celulares presentaron expresión del ARN mensajero, lo cual podría corresponder con las teorías, que proponen que las células precursoras del cemento radicular provienen de espacios endosteales del hueso alveolar y zonas paravasculares del ligamento periodontal. Esto es de suma importancia ya que debido a que el gen 3-AS proviene de una clona aislada de una biblioteca derivada de un cementoblastoma, la clona 3-AS, junto con su gen y su producto podrían proponerse como otro marcador específico del linaje cementoblástico, en conjunto con la CAP y CEMP-1 [43, 56].

CONCLUSIONES

Mediante el sistema de *Drosophila melanogaster* fue posible expresar la proteína recombinante 3-AS, la cual mostró tres especies que corresponden a ~22 KDa, una especie predominante de ~35 KDa y una especie de ~50 KDa, pero sólo las especies de ~35 KDa y ~50 KDa fueron las que presentaron modificaciones postraduccionales, ya que fueron reconocidas por los anticuerpos que detectan fosforilaciones y glicosilaciones, y a eso se debe su mayor peso molecular con respecto a la de ~22 KDa, sin embargo nos enfocamos a la más prominente de ~35 KDa, y la especie de ~50 KDa como un corte alternativo de la secuencia de ADN, lo cual da como resultado una isoforma de la proteína.

La expresión del ARN mensajero sólo fue en células del cemento radicular y subpoblaciones del ligamento periodontal, lo que nos lleva a sugerir su posible especificidad celular

En este trabajo se aisló, expresó y caracterizó la proteína 3-AS; ello permitirá evaluar *in vitro*: ¿Cuál es la posible función de la proteína recombinante 3-AS?. Dicha proteína podría jugar un papel nucleador de cristales de hidroxiapatita o de adhesión celular.

Dicha pregunta podrá resolverse utilizando la proteína en cultivos celulares *in vitro* realizando pruebas de adhesión celular, quimioatracción, proliferación celular y si promueve o regula el proceso de mineralización. Todo esto con la finalidad de empezar establecer si esta molécula juega un papel importante en el proceso de formación del cemento radicular, vital para poder aplicar en un futuro terapias de regeneración guiada para obtener tratamientos más exitosos.

ANEXO

```
1 atggcatgcaaacatttggggaacaaccaggggcccagtgcatgg
M A C K H L G N N Q G P S A W
46 ctgccacagtggtcagaggacggcaaggaccgatggatggacga
L P Q W L R G R Q G P M D G R
91 cagccccgagagccagctgagtttggagacggggctgtgtggcca
Q P R E P A E F G D G A V W P
136 tcccggctgcccgggggctcttggctcaccctcgtcacctctggc
S R L P A G L L L T L V T S G
181 atctccccggcagcacttagcagcccagtgagagagcgggtcaagg
I S P A A L S S P V R E R S R
226 caggcgtgtggatggatccagggccctctctcaagggttctgaca
Q A C G W I Q G P L S R V L T
271 gatgaggggtcgaagaagggccaggctgtccagtctctggggcaga
D E G R R R A R L S S L W A R
316 gaggatgggcaaagtcaaggaacaggcaggggtcagcagccgggggt
E D G Q S Q G T G R V S S R G
361 gcagggagagggcaggtgtatgctggaaggtcaggccccacgaggg
A G R G R C M L E G Q A P R G
406 cccttgggggcatcaagtgggacagggccccggcgcaccctcagt
P L G A S S G T G P R R T L S
451 gccctgggcaggcctcggggccagtgatgtgggtcactccctcggga
A L G R P R A S D V V T P S G
496 aatgctggtgggaccggaccaccaccctggggccacaccatccc
N A V G T G P P T L G H T H P
541 gcctcaggcctggattttctgagctcccgcagatgttgcgatgtc
A S G L D F L S S R R C S H V
```

MACKHLGNNQGPSAWLPQWLRGRQGPMDGRQPREPAEFGDGAVW
PSRLPAGLLLTLVTSGISPAALSSPVRERSRQACGWIQGPLSRVLTDEG
RRRARLSSLWAREDQSQGTGRVSSRGAGRGRRCMLEGQAPRGPLGA
SSGTGPRRTLSALGRPRASDVVTPSGNAVGTGPPTLGHTHPASGLDFL
SSRRCSHV

Péptido señal: Sitio de rompimiento en aminoácidos 41 y 42.

Figura 1.- Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia nucleotídica por análisis *in silico* del gen 3-AS.

Expresión de la proteína 3AS en células *Drosophila Melanogaster*

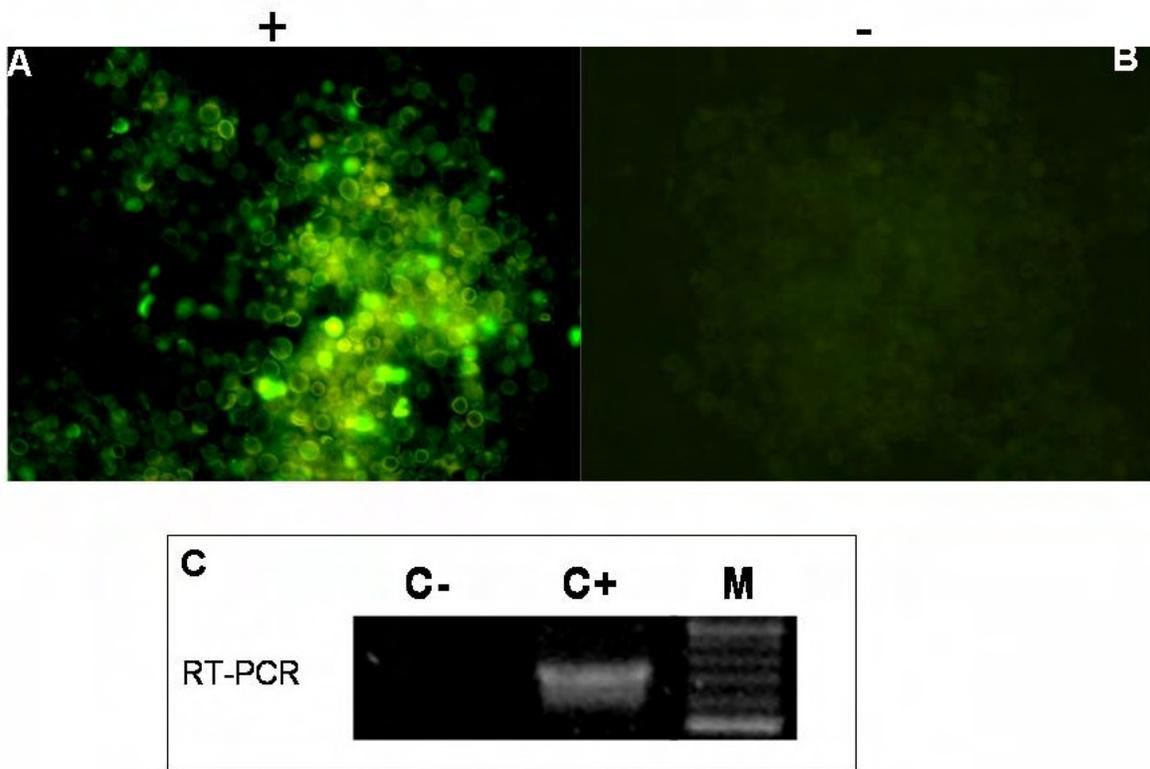


Figura 2. (A) Inmunofluorescencia de la transfección estable del gen que codifica para la proteína 3-AS en células de *Drosophila melanogaster* (Schneider S2) con el anticuerpo anti-His/FITC. (B) Inmunofluorescencia de la transfección del vector vacío en células de *Drosophila melanogaster* S2 con el anticuerpo anti-His/FITC que sirvieron como control (-). (C) Reacción de transcriptasa reversa (RT-PCR) del mensajero aislado de las células de *Drosophila melanogaster* transfectadas con el vector que llevan la secuencia del gen que codifica para la proteína 3-AS (+) y con el vector vacío (-).

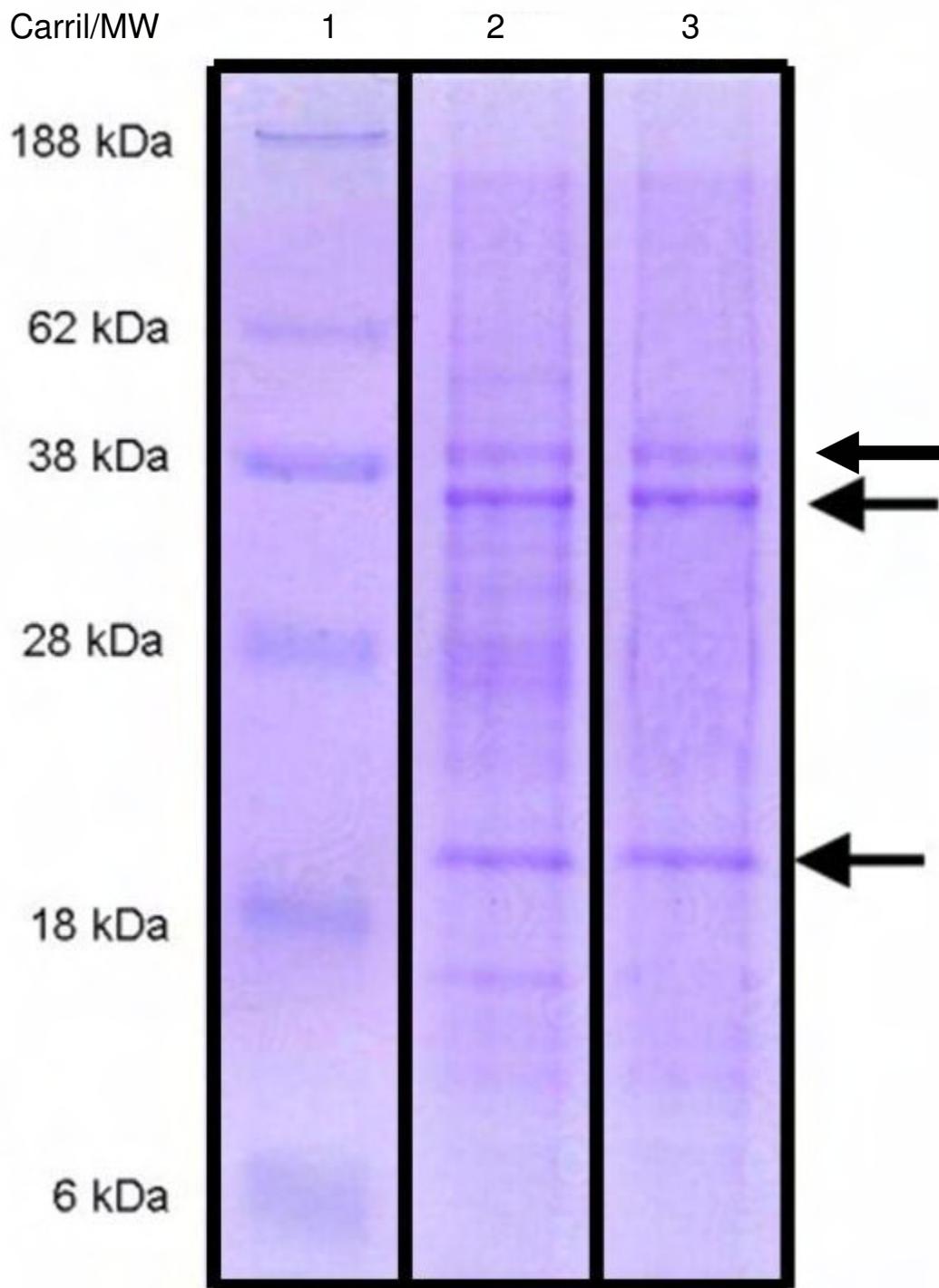


Figura 3. Gel de poliacrilamida al 12% donde se visualizan las especies más prominentes de la proteína 3-AS (señaladas por las flechas), expresada en las células de *Drosophila Schneider S2*, carril 2 y purificada por la columna de afinidad de níquel, carril 3. Tinción de azul de Coomassie, carril 1 marcador.

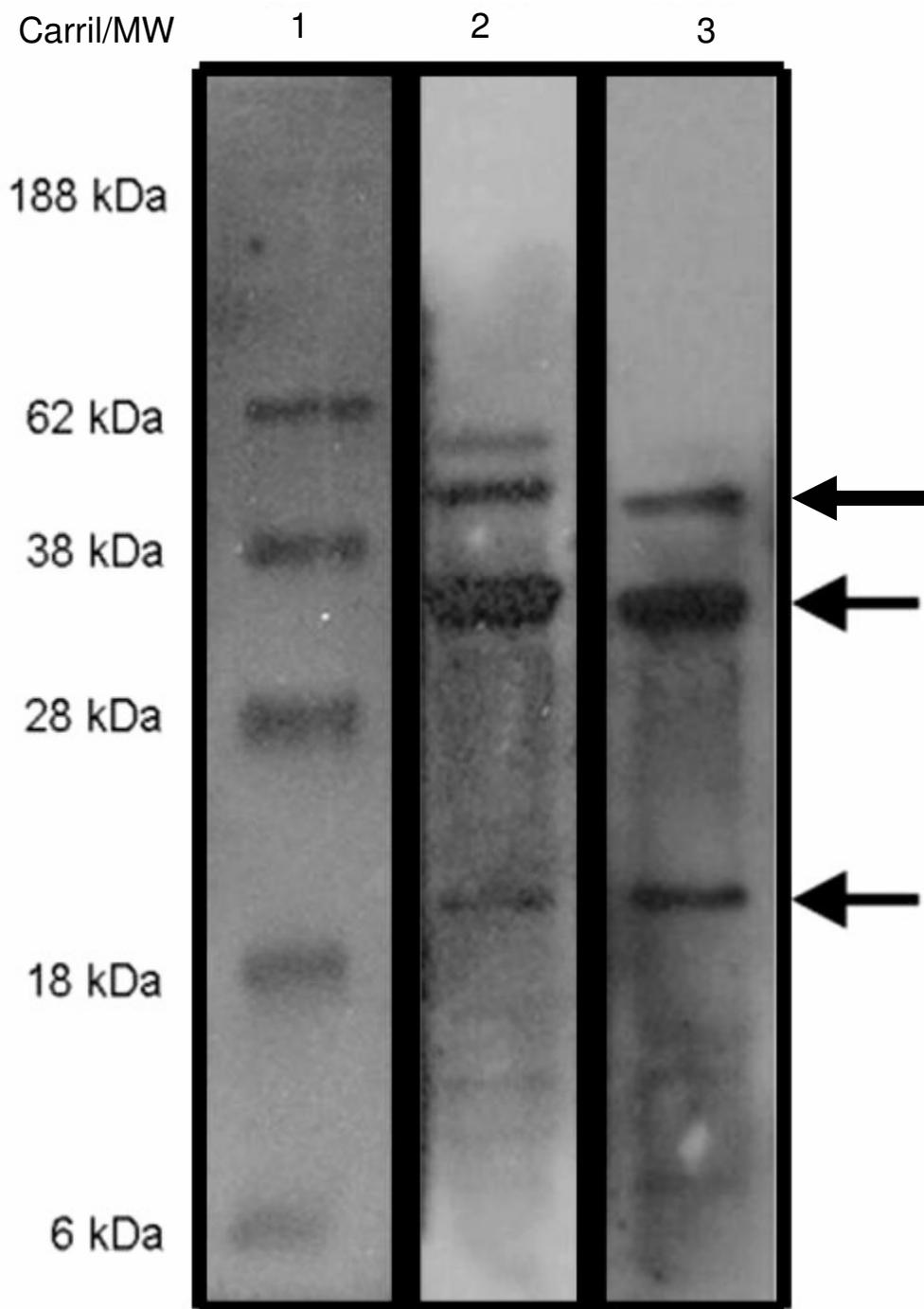


Figura 4. Inmunotransferencias de la proteína 3-AS purificada por la columna de afinidad de Níquel utilizando el anticuerpo anti-Histidinas, carril 2 y el anticuerpo anti-V5, carril 3. Las flechas indican a la especie de ~35 KDa que es la prominente, la especie sin modificar ~22 KDa y el corte alternativo de ~50 KDa que se relacionan con los geles teñidos por azul de Coomasie, carril 1 marcador

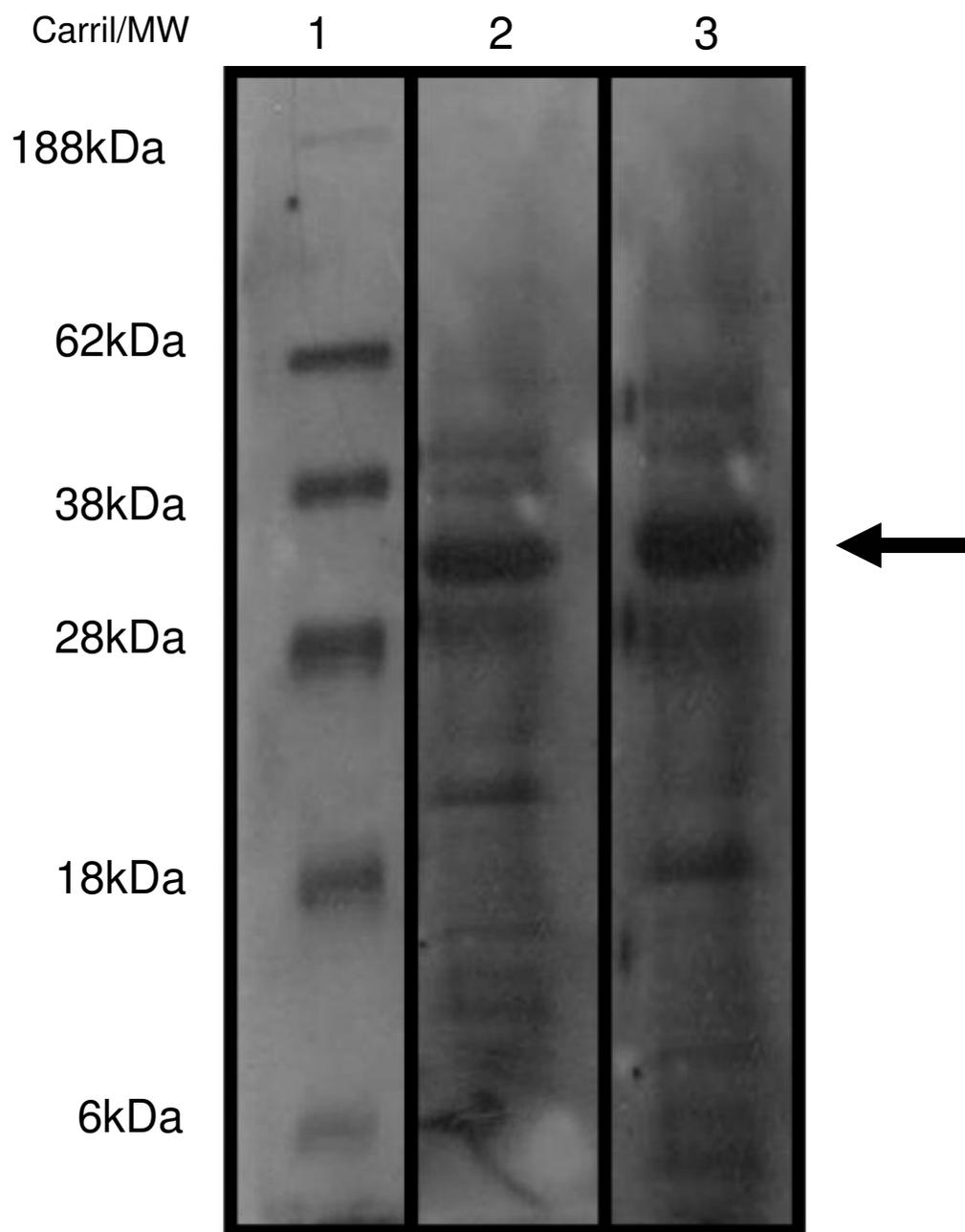


Figura 5.- Determinación de las fosforilaciones de la especie de ~35 KDa por medio de anticuerpos anti-Ser y anti-The, carril 2. Fosforilaciones en los aminoácidos de Ser, carril 3. Fosforilaciones en los aminoácidos de The. Se muestra en ambas fotografías el marcador de peso molecular, carri

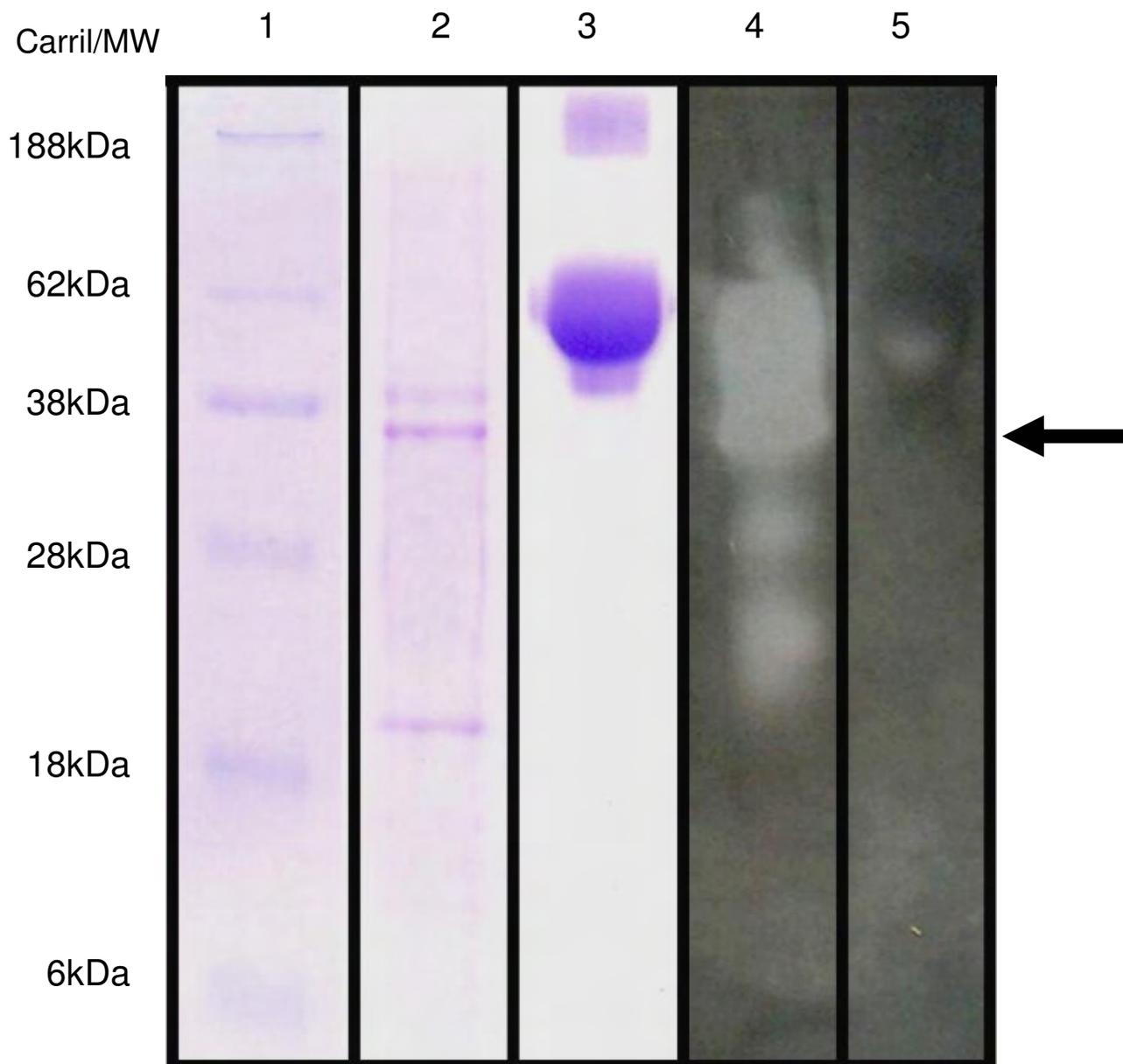


Figura 6.- Determinación de glicosilaciones de la especie de ~35 KDa mediante el anticuerpo anti-Gly, carril 2. Gel de poliacrilamida al 12% la flecha indica la proteína 3-AS, carril 4. Inmunoblot de la proteína en donde la flecha indica la proteína 3-AS que es detectada por el anticuerpo anti-Gly. En ambas figuras se muestra la transferrina que se utilizó como control, carriles 3 y 5 y el marcador de peso molecular, carril 1.

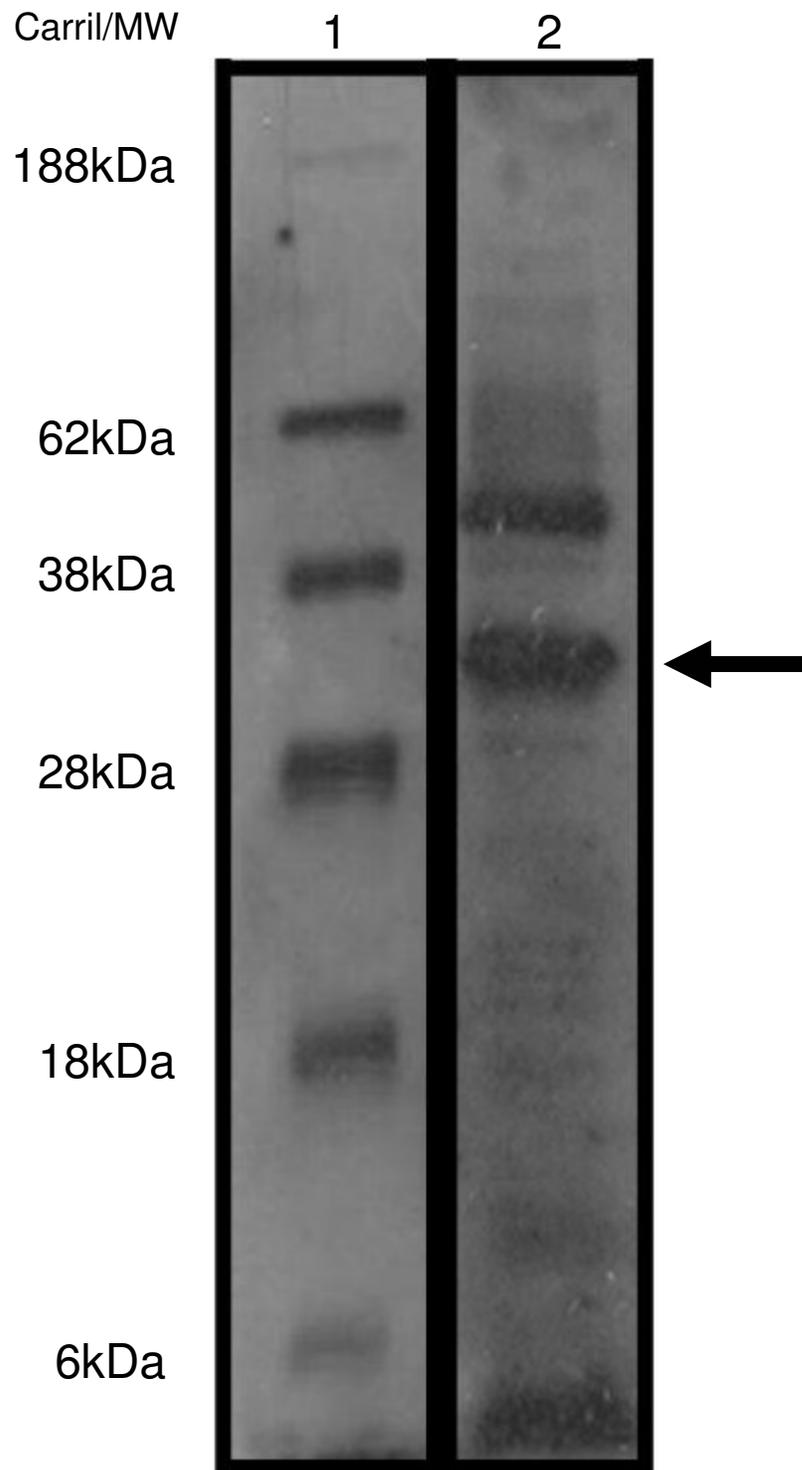


Figura 7.- En esta fotografía se muestra la inmunotransferencia con el anticuerpo anti-Col I, carril 2, la flecha indica la proteína 3-AS, la cual muestra reacción cruzada con el anticuerpo anti-Col I. Se muestra el marcador de peso molecular, carril 1.

Hibridación *in situ*

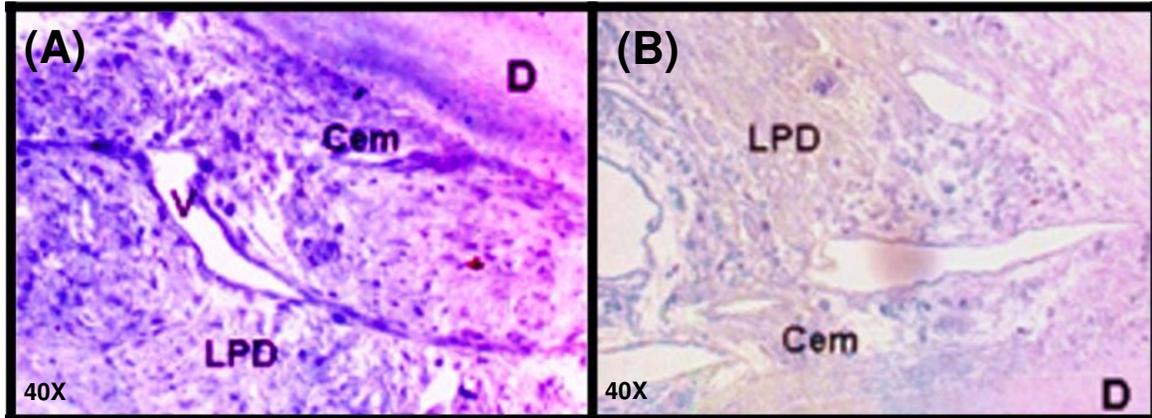


Figura 8.- Localización del ARN mensajero por medio de la técnica de hibridación *in situ*. (A) Se muestra la expresión del ARN mensajero con la sonda experimental antisentido en la región del cemento radicular y en la zona del ligamento periodontal, como una zona de mayor intensidad de color violeta. (B) Se muestra la expresión de la sonda sentido control como una zona de color tenue.

RT-PCR

Líneas Celulares del Periodonto

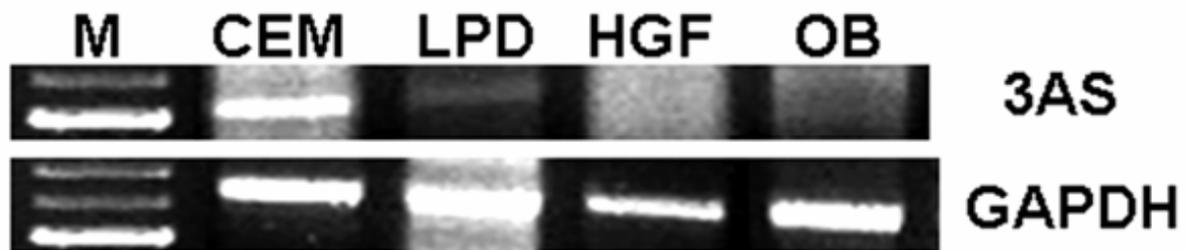


Figura 9.- Determinación de la expresión del RNA mensajero en líneas celulares del periodonto por la técnica de RT-PCR. En el panel superior se muestran las líneas celulares que expresan el RNA mensajero del gen 3-AS, estas células son: los cementoblasto (CEM) y células del ligamento periodontal (LPD), no así los fibroblastos gingivales humanos (HGF) y osteoblastos (OB). En el panel inferior se muestran la expresión del gen GAPDH el cual se utilizó como control. En ambos paneles el marcador de peso molecular se muestra con la letra (M).

Bibliografía

1. Paynter KJ, Pudy G: **A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat.** *Anat Rec* 1958, **131**:233-251.
2. Diekwisch TG: **The developmental biology of cementum.** *Int J Dev Biol* 2001, **45**:695-706.
3. Barmes DE: **Public policy on oral health and old age: a global view.** *J Public Health Dent* 2000, **60**:335-337.
4. van den Bos T, Handoko G, Niehof A, Ryan LM, Coburn SP, Whyte MP, Beertsen W: **Cementum and dentin in hypophosphatasia.** *J Dent Res* 2005, **84**:1021-1025.
5. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W: **Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation.** *J Dent Res* 1995, **74**:1374-1381.
6. Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch R, Niechoy U, Gelderblom HR: **Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum.** *J Histochem Cytochem* 1991, **39**:103-110.
7. D'Errico JA, MacNeil RL, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ: **Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro.** *Bone* 1997, **20**:117-126.
8. D'Souza RN, Cavender A, Dickinson D, Roberts A, Letterio J: **TGF-beta1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex.** *Eur J Oral Sci* 1998, **106 Suppl 1**:185-191.
9. Ikezawa K, Hart CE, Williams DC, Narayanan AS: **Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule.** *Connect Tissue Res* 1997, **36**:309-319.
10. Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y, Mizoguchi I: **Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum.** *J Periodontal Res* 1997, **32**:273-278.
11. MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ: **Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis.** *Connect Tissue Res* 1995, **33**:1-7.
12. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez Carmona B, Arzate H: **Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23).** *Bone* 2006, **38**:409-419.
13. Carmona-Rodriguez B, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, Garcia-Hernandez AL, Suarez-Franco JL, Chavarria IG, Villarreal-Ramirez E, Arzate H: **Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **358**:763-769.
14. Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S: **A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of**

- the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**:1691-1699.
15. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS: **Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein.** *J Bone Miner Res* 1996, **11**:686-692.
 16. Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H: **Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum.** *Bone Miner* 1992, **18**:187-198.
 17. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS: **Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones.** *Connect Tissue Res* 2002, **43**:257-264.
 18. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ: **Growth factors regulate cementoblasts activities in vitro.** *Journal of Dental Research* 2000, **79**:229-229.
 19. Kemoun P, Laurencin-Dalieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, et al: **Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro.** *Cell and Tissue Research* 2007, **329**:283-294.
 20. Amar S: **Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration.** *Anatomical Record* 1996, **245**:361-373.
 21. Lin WL, McCulloch CAG, Cho MI: **Differentiation of Periodontal-Ligament Fibroblasts into Osteoblasts during Socket Healing after Tooth Extraction in the Rat.** *Anatomical Record* 1994, **240**:492-506.
 22. Luan XG, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TGH: **Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium.** *Stem Cells and Development* 2006, **15**:595-608.
 23. Luan XH, Ito Y, Diekwisch TGH: **Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath.** *Developmental Dynamics* 2006, **235**:1167-1180.
 24. McCulloch CA, Lekic P, McKee MD: **Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament.** *Periodontol* 2000 2000, **24**:56-72.
 25. Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Norris K, Dickerson K, Argraves WS: **Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum.** *J Periodontal Res* 1991, **26**:10-16.
 26. Slavkin HC, Bessem C, Bringas P, Jr., Zeichner-David M, Nanci A, Snead ML: **Sequential expression and differential function of multiple enamel proteins during fetal, neonatal, and early postnatal stages of mouse molar organogenesis.** *Differentiation* 1988, **37**:26-39.
 27. Zeichner-David M: **Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited.** *Periodontol* 2000 2006, **41**:196-217.
 28. Bosshardt DD, Nanci A: **Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth.** *Journal of Clinical Periodontology* 2004, **31**:184-192.

29. Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S: **Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation.** *Journal of Dental Research* 2007, **86**:594-599.
30. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS: **Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum.** *FASEB J* 1992, **6**:2990-2995.
31. Grzesik WJ, Kuzentsov SA, Uzawa K, Mankani M, Robey PG, Yamauchi M: **Normal human cementum-derived cells: Isolation, clonal expansion, and in vitro and in vivo characterization.** *Journal of Bone and Mineral Research* 1998, **13**:1547-1554.
32. Arzate H, Alvarez-Perez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-Chavez A, Reyes-Gasga J, Ximenez-Fyvie LA: **Electron microscopy, microanalysis, and x-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells.** *Journal of Dental Research* 2000, **79**:28-34.
33. Arzate H, Alvarez-Perez MA, Aguilar-Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O: **Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro.** *J Periodontal Res* 1998, **33**:249-258.
34. Ohki K, Kumamoto H, Nitta Y, Nagasaka H, Kawamura H, Ooya K: **Benign cementoblastoma involving multiple maxillary teeth: Report of a case with a review of the literature.** *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2004, **97**:53-58.
35. Arzate H, ChimalMonroy J, HernandezLagunas L, deLeon LD: **Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells.** *Journal of Periodontal Research* 1996, **31**:144-148.
36. Beertsen W, Van den Bos T: **Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin: an in vitro study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum.** *J Dent Res* 1991, **70**:176-181.
37. MacNeil RL, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ: **Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis.** *Arch Oral Biol* 1996, **41**:827-835.
38. Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC: **Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum.** *Biochemistry* 1991, **30**:7047-7052.
39. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC: **Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum.** *J Periodontal Res* 1990, **25**:99-105.
40. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z: **Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces.** *J Periodontal Res* 1995, **30**:360-368.
41. Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC: **Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition.** *J Dent Res* 1991, **70**:1272-1277.

42. Bar-Kana I, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S: **Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium.** *Eur J Oral Sci* 1998, **106 Suppl 1**:357-364.
43. Bosshardt DD: **Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?** *J Dent Res* 2005, **84**:390-406.
44. Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A: **Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum.** *Anat Rec* 1998, **250**:13-33.
45. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S: **Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein.** *Journal of Dental Research* 2002, **81**:541-546.
46. Perez MAA, Pitaru S, Fregoso OA, Gasga JR, Arzate H: **Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line.** *Journal of Structural Biology* 2003, **143**:1-13.
47. Wysocki LJ, Sato VL: **"Panning" for lymphocytes: a method for cell selection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978, **75**:2844-2848.
48. Simmer JP, Fincham AG: **Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation.** *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1995, **6**:84-108.
49. Midura RJ, Hascall VC: **Bone sialoprotein--a mucin in disguise?** *Glycobiology* 1996, **6**:677-681.
50. Nanci A: **Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: Relationship to speed of formation and collagen packing density.** *Journal of Structural Biology* 1999, **126**:256-269.
51. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Arambawatta AKS, Wakita M: **Immunolocalization of proteoglycans and bone-related noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars.** *Cell and Tissue Research* 2004, **317**:299-312.
52. Ihara Y, Manabe S, Kanda M, Kawano H, Nakayama T, Sekine I, Kondo T, Ito Y: **Increased expression of protein C-mannosylation in the aortic vessels of diabetic Zucker rats.** *Glycobiology* 2005, **15**:383-392.
53. Nilsen SL, Castellino FJ: **Expression of human plasminogen in Drosophila Schneider S2 cells.** *Protein Expression and Purification* 1999, **16**:136-143.
54. Tota MR, Xu L, Sirotina A, Strader CD, Graziano MP: **Interaction of [Fluorescein-Trp(25)]Glucagon with the Human Glucagon Receptor Expressed in Drosophila Schneider-2 Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**:26466-26472.
55. Culp JS, Johansen H, Hellmig B, Beck J, Matthews TJ, Delers A, Rosenberg M: **Regulated expression allows high level production and secretion of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in Drosophila Schneider cells.** *Biotechnology (N Y)* 1991, **9**:173-177.
56. Lekic P, McCulloch CA: **Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue.** *Anat Rec* 1996, **245**:327-341.