

Tesis de Licenciatura. DEPARTAMENTO DE FISILOGIA, BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR ; FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES ; UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

# Clonado y caracterización de beta-3-chimaerin: una novedosa isoforma de la familia de las Quimerinas.

Lautaro Zubeldia Brenner.

Cita:

Lautaro Zubeldia Brenner (2010). *Clonado y caracterización de beta-3-chimaerin: una novedosa isoforma de la familia de las Quimerinas* (Tesis de Licenciatura). DEPARTAMENTO DE FISILOGIA, BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR ; FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES ; UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lautaro.zubeldia.brenner/39>

ARK: <https://n2t.net/ark:/13683/ptoZ/yba>



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons.  
Para ver una copia de esta licencia, visite  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>.

*Acta Académica es un proyecto académico sin fines de lucro enmarcado en la iniciativa de acceso abierto. Acta Académica fue creado para facilitar a investigadores de todo el mundo el compartir su producción académica. Para crear un perfil gratuitamente o acceder a otros trabajos visite: <https://www.aacademica.org>.*

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

Tesis de Licenciatura

**Clonado y caracterización de  $\beta$ 3-chimaerin: una  
novedosa isoforma de la familia de las Quimerinas.**

**Lautaro Zubeldia Brenner**

**Director:**

**Federico Coluccio Leskow**

**Laboratorio de Biofísica Molecular, Centro Multidisciplinario 1**

Marzo de 2010



## Resumen

### **Clonado y caracterización de $\beta$ 3-chimaerin: una novedosa isoforma de la familia de las Quimerinas.**

Las chimaerins o quimerinas son una familia de receptores para el segundo mensajero diacilglicerol (DAG) y los ésteres de forbol, con actividad de GAP específica para Rac. Están codificadas en dos genes  $\alpha$  y  $\beta$  que dan lugar a las cuatro isoformas reportadas hasta el momento:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2-chimaerin. Las quimerinas poseen en su extremo C-terminal un dominio de GAP específico para Rac y un dominio C1 capaz de unir DAG y ésteres de forbol con alta afinidad similar al que poseen las PKC. Además,  $\alpha$ 2 y  $\beta$ 2 poseen en su extremo N-terminal un dominio SH2 capaz de unir proteínas fosforiladas en tirosinas y un dominio autoinhibitorio responsable de la regulación de su actividad de GAP por DAG. Para estas dos isoformas se describió un mecanismo de activación alostérica por unión a DAG y fosfolípidos de membrana. En ausencia de ligando, la proteína se encuentra en una conformación cerrada en el citoplasma, con el dominio C1 "enterrado" en la estructura terciaria con interacciones intermoleculares con los dominios GAP y SH2 y con la  $\alpha$ -hélice N-terminal que, además, posee dos residuos que se insertan en el dominio de GAP inactivándolo.

Experimentos de Western blot para varios tejidos de ratón utilizando un anticuerpo específico anti-quimerinas mostraron la presencia de una isoforma de peso molecular aparente 10 KDa mayor a  $\beta$ 2-chimaerin en riñón, glándula adrenal y corazón. Haciendo una búsqueda de secuencias relacionadas a  $\beta$ 2-chimaerin en las bases de datos del NCBI se encontraron varios EST provenientes de tumor de riñón humano y amígdala cerebral que codificaban para una isoforma con un extremo N-terminal novedoso y considerablemente mas grande desconocido en la familia de las quimerinas. Haciendo un análisis *in silico* de estas secuencias se observó que este extremo N-terminal esta codificado en el genoma por dos exones que se encuentran 48 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de  $\beta$ 2-chimaerin y río abajo de secuencias promotoras.

En base a estas evidencias se llevó a cabo el clonado molecular de una nueva isoforma de la familia de las quimerinas que denominamos  $\beta$ 3-chimaerin. La secuencia codificante fue levantada por PCR de dos cDNA comerciales humanos provenientes de riñón y de encéfalo y luego fue subclonada en distintos vectores de expresión. Esta

nueva isoforma fue reportada al **GeneBank** a nombre del autor de la presente tesis y de su director y se le asignó el código: **bankit1266590 GQ924106**.

Con el objetivo de medir la unión de ésteres de forbol por  $\beta$ 3-chimaerin en un contexto celular se realizaron estudios de translocación *in vivo* en los cuales células COS-1 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para  $\beta$ 3-chimaerin y tratadas con concentraciones crecientes de PMA.  $\beta$ 3-chimaerin mostró ser 7 veces más sensible al PMA que lo reportado para las proteínas  $\beta$ 2-chimaerin y  $\alpha$ 2-chimaerin con un  $EC_{50} = 180,6$  nM. Nuestro próximo objetivo será determinar la actividad de  $\beta$ 3-chimaerin como RacGAP, su regulación por DAG y ésteres de forbol y elucidar el papel de su extremo N-terminal en su regulación.

*A mis Viejos queridos, Águeda y Juan  
Carlos; y a mi país, Argentina.*

Quiero agradecer en primer lugar a Federico por haber depositado su confianza en mí para comenzar gran parte de su trabajo aquí en Argentina. Ha sido un gran mentor, y considero que he aprendido muchísimo en estos dos años de trabajo junto a él. Lo más destacable tal vez sea haber perdido el miedo a cometer errores, y a resolver ciertas situaciones del trabajo solo. También, quiero destacar su esfuerzo para que todos los integrantes del grupo propongan nuevas ideas, y se animen a llevarlas a cabo. Creo que en mi formación será algo fundamental de acá en más.

Quiero agradecerle a Eli Jares la oportunidad que me está dando al permitir ser parte de su equipo de trabajo. Su preocupación por conseguir todas las herramientas que necesitamos para trabajar hacen que nunca nos falte prácticamente nada. Además, más de una vez sus consejos me han servido para resolver problemas que creíamos insuperables. Todo esto gracias a su experiencia.

Quiero decirle gracias también al Dr. Thomas Jovin. Creo que él tiene mucho que ver con que tengamos un laboratorio muy bien equipado. Desinteresadamente nos ha brindado gran parte de los equipos así como el espacio en el cual tenemos nuestro laboratorio. Estas actitudes lo pintan de cuerpo entero. A pesar de haber vivido mucho tiempo fuera de Argentina, todavía queda gran parte de la típica solidaridad Criolla dentro suyo.

También me ayudó mucho Omar. En todo este tiempo, siempre tuvo un rato para escuchar las dudas que le acercábamos junto a Fede; quiero agradecerle por su paciencia, por sus consejos, y por saber que puedo contar con él en cualquier momento. Gracias también a todas las personas de su grupo, que siempre tienen la mejor con nosotros, ayudándonos con todo.

Gracias a Jime, a Martín y a Fran. Los tres me ayudaron en muchas oportunidades. Quiero agradecerle a Jime su paciencia para contestar cualquier duda, incluso las más tontas (es decir, las que ponen mal a Federico), y su consideración con cada una de las personas del grupo. En Martín encontré un buen amigo y un buen compañero, al igual que con Fran. Quiero agradecerles a los dos la buena onda y la alegría de todos los días que tienen para laburar. Gracias a Lucía y a Paula, con quienes también hice buenas migas, porque siempre están bien dispuestas pa' cebar algún mate, pa' la risa y la charla sincera.

Gracias a todos los restantes integrantes del laboratorio, los del segundo piso y los del tercero.

También quiero decirle gracias a todos los amigos y compañeros de la facultad, por hacer que venir a estudiar sea algo divertido. No puedo nombrar a todos porque son muchísimos, pero tal vez Lalo y Flor sean los dos con los cuales tengo más recuerdos.

Gracias a ellos en especial, ojala que nuestra amistad sea para siempre.

Quiero agradecerle a mi grupo de amigos de Colegio San Luis, a “Los Muchachos”. Porque a pesar de que no los veo todos los fines de semana, siempre se que con un llamado, o un mensaje puedo compartir un buen rato con ellos. Gracias a Juanchi, a Seba y a Cuchi. Tres fenómenos que siempre me bancaron y me alentaron en toda la carrera y durante toda la tesis.

Quiero agradecerle a mi familia. A mi Vieja por ayudarme siempre que pudo, por escucharme cuando me desanimaba con algo, por inculcarme su paciencia y su temple para enfrentar cualquier desafío. A mi Viejo también porque siempre esta dispuesto a prestar la oreja, a ayudarme con lo que sea y por enseñarme a darle a los problemas la dimensión justa.

Gracias Lúlu, mi hermana, que con sus cargadas, sus chistes y su ocurrencia hace que me ría de mi mismo cuando algo no sale como yo quiero.

Finalmente quiero agradecerle humildemente a mi país, Argentina, por haberme brindado una educación Universitaria que esta entre las mejores del mundo, pese a todos los inconvenientes que tiene nuestra Facultad. Es un gran orgullo personal haberme recibido en una Universidad que es Pública y Gratuita. Haber conseguido este título no es solo un logro individual, lo considero un logro colectivo, por eso espero devolverle a mi Sociedad algo de lo mucho que aprendí en estos seis años.





## ÍNDICE

### I-Introducción

-Breve reseña de las Chimaerins o Quimerinas: una familia de Receptores de DAG y Esteres de Forbol con Actividad de Rac-GAP	8
- El dominio C1 en las quimerinas	10
- El dominio de GAP en las quimerinas	11
- El dominio SH2 en las quimerinas	11
- Rac: una pequeña proteína G monomérica	12
- Estructura tridimensional de $\beta$ 2-chimaerin y el modelo autoinhibitorio	15
- Una nueva isoforma del gen $\beta$ -chimaerin	23

<b>II-Objetivos</b>	<b>28</b>
---------------------	-----------

### III-Materiales y Métodos

- Análisis bioinformático	30
- Construcción, clonado y amplificación de ADN recombinantes	30
- Cultivo de bacterias	36
- Cultivo de células	37
- Análisis de proteínas	39
- Microscopía de Fluorescencia	40

### IV-Resultados

-Clonado Molecular de $\beta$ 3-chimaerin	43
-Diseño de primers	47
-Estrategia de clonado	48
-Amplificación de $\beta$ 3-chimaerin por PCR	49
-Clonado molecular del extremo N-terminal de $\beta$ 3-chimaerin	54
-Ingreso de la secuencia codificante de $\beta$ 3-chimaerin a la base de datos del NCBI	57
-Subclonado de la secuencia codificante de $\beta$ 3-chimaerin en diferentes vectores de expresión	57
-Unión de $\beta$ 3-chimaerin a ésteres de forbol	60

**V-Discusión**

- $\beta$ 3-chimaerin, un nuevo integrante de la familia de las quimerinas_____	67
- $\beta$ 3-chimaerin se expresa en riñón y cerebro_____	68
-Subclonado y expresión $\beta$ 3-chimaerin_____	69
- $\beta$ 3-chimaerin es un receptor de ésteres de forbol de alta afinidad_____	70
- $\beta$ 3-chimaerin transloca a la membrana plasmática y al espacio perinuclear_____	71
-¿ $\beta$ 3-chimaerin es una SUPER-chimaerin?_____	71
-Perspectivas a futuro_____	72

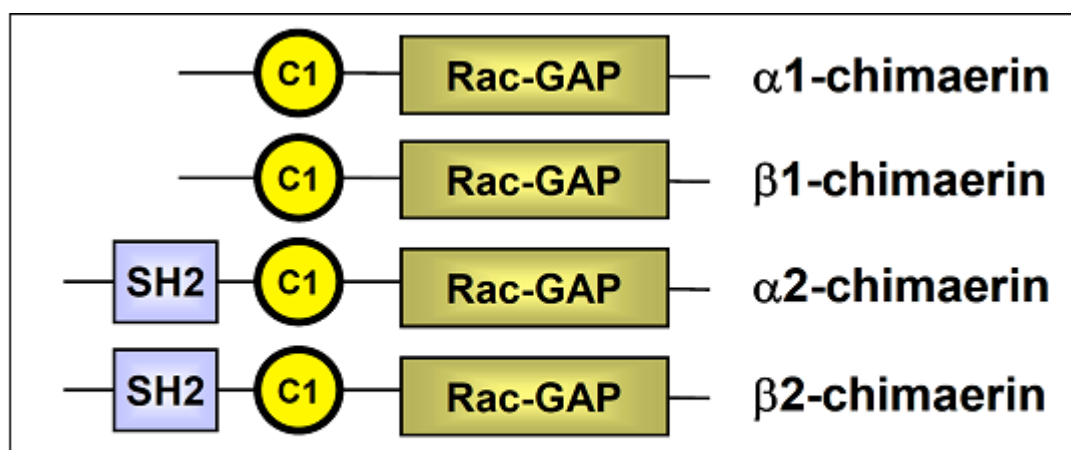
<b>VI-Bibliografía_____</b>	<b>76</b>
-----------------------------	-----------

<b>VII-Anexo_____</b>	<b>79</b>
-----------------------	-----------

# **I-Introducción**

### Breve reseña de las Chimaerins o Quimerinas: una familia de Receptores de DAG y Esteres de Forbol con Actividad de Rac-GAP

Las chimaerins o quimerinas son una familia de receptores para el segundo mensajero diacilglicerol (DAG) y los ésteres de forbol, con actividad de GAP específica para Rac. Son una “quimera” entre la región reguladora de las PKC y el BCR (Breackpoint Cluster Region), una proteína involucrada en la translocación del cromosoma de Filadelfia en leucemia mielógena crónica. n-chimaerin (luego llamada  $\alpha$ 1-chimaerin) fue aislada como una proteína de 34 KDa de cerebro. Posteriormente tres nuevas isoformas fueron descritas,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2-chimaerin. Todas ellas poseen un dominio C1 homólogo al de las PKC y un dominio GAP específico para Rac (1-3). Estas proteínas son codificadas por dos genes  $\alpha$  y  $\beta$  y los dominios C1 y GAP productos de cada gen poseen un 94 % de identidad de secuencia.



**Figura 1:** Esquema que muestra los dominios de cada una de las isoformas descritas hasta el momento (4).

Las isoformas 1 y 2 producto de cada gen se generan por sitios alternativos del inicio de la transcripción, debido a esto las isoformas provenientes de un mismo gen poseen idénticos dominios C1 y GAP y difieren en su N-terminal.

Las isoformas 1 presentan una región inicial corta y de función desconocida, mientras que las isoformas 2 en su extremo N-terminal poseen un dominio SH2 capaz de unir proteínas fosforiladas en tirosina.

En un comienzo, las PKC eran reconocidas como las únicas proteínas receptoras para el DAG y los ésteres de forbol. Todas las isoenzimas de PKC están compuestas por dos regiones fundamentales: una región reguladora amino terminal y una región catalítica carboxilo terminal y contienen 4 dominios conservados (C1-C4) y 5 dominios variables (V1-V5) (5). Se estableció que el dominio C1 era el dominio mínimo necesario para la unión de DAG y ésteres de forbol (6). Este dominio de 50 o 51

aminoácidos esta duplicado en tándem en la región amino-terminal de la región reguladora de las PKC.

En los últimos años se identificaron tres nuevas familias de proteínas que contienen dominios C1 capaces de unir DAG y ésteres de forbol, pero no presentan actividad quinasa: las de proteínas de la familia de Unc-13; las Ras-GRPs; y las quimerinas o “chimaerins”.

El DAG es un lípido de membrana producido a partir de un producto de fosforilación del fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). El PI y sus derivados son fosfolípidos ácidos que representan una pequeña porción de los fosfolípidos de membrana. La cabeza del fosfolípidos contiene D-myo-inositol. Este grupo puede estar fosforilado en numerosas posiciones por las fosfatidilinositol quinasa. La hidrólisis del PIP<sub>2</sub> por acción de las fosfolipasas genera inositol trifosfato IP<sub>3</sub> y DAG. El IP<sub>3</sub> difunde al citoplasma, uniéndose a receptores específicos en el retículo endoplasmático y gatillando la liberación de otro segundo mensajero, el calcio (Ca<sup>++</sup>). El DAG generado queda en la membrana donde recluta proteínas con dominios ricos en cisteínas (dominios C1) como las proteínas de la familia de la proteína quinasa C (PKC). La elevación de los niveles de DAG por estimulación de receptores acoplados a fosfolipasas es rápida y transitoria, y puede ser seguida por una segunda fase o aumento prolongado de DAG. Este fenómeno se debe a la producción de DAG por dos fuentes diferentes. La primera, es por la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas G heterotriméricas de la familia Gq o de receptores tirosina quinasa, que activan a la enzima fosfolipasa C (PLC) en respuesta a estímulos como factores de crecimiento, hormonas o neurotransmisores. La segunda fuente de DAG es responsable de la fase prolongada y se supone que esta mediada por la fosfolipasa D. Esta enzima hidroliza fosfatidilcolina a ácido fosfatídico, quien por acción de fosfomonoesterasas puede convertirse en DAG. Adicionalmente, la fosfolipasa D es activada por varias clases de receptores. El DAG se metaboliza rápidamente ya sea por acción de lipasas y esterases, o convirtiéndose a ácido fosfatídico mediante la acción de DAG quinasa.

Los ésteres de forbol, son productos naturales aislados de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que despertaron mucho interés por su potencial como promotores tumorales en la piel. Estos compuestos, estéricamente similares al DAG, son ampliamente utilizados en el laboratorio como imitadores del DAG ya que son más estables y más potentes. El éster de forbol mas utilizado en el laboratorio es el PMA (“*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*”) también conocido como TPA (“*Tetradecanoyl Phorbol Acetate*”).

### El dominio C1 en las quimerinas

Ensayos de unión de ligando *in vitro* del tipo “Scatchard plot” utilizando [3H]PDBu revelaron que  $\beta$ 2-chimaerin recombinante une ésteres de forbol con alta afinidad en presencia de vesículas de fosfatidilserina. La  $K_d$  es aproximadamente 1 nM (7), similar al de las cPKC y nPKC para este radioligando (8). Algunas diferencias interesantes entre  $\beta$ 2-chimaerin y las PKC fueron observadas al estudiar la afinidad por diferentes ésteres de forbol. Así, el análogo del promotor tumoral mezereina, la thymeleatoxina, presenta una afinidad por PKC $\alpha$  60 veces mayor que para  $\beta$ 2-chimaerin (7). Adicionalmente, distintos análogos del DAG muestran una ligera preferencia por  $\beta$ 2-chimaerin con relación a PKC $\alpha$  (9). Esto indica que distintos dominios C1 presentan distintas preferencias de ligando, debido a interacciones del ligando con residuos específicos. Por otra parte, las diferentes dependencias de co-factores como Ca<sup>++</sup> y/o lípidos confieren distintas propiedades a los diferentes receptores de ésteres de forbol, probablemente como una forma de conferirle especificidad en su respuesta y actividad.

En ensayos *in vivo*, utilizando fraccionamiento subcelular en células COS-1, se ha observado la mayor diferencia en la respuesta a ésteres de forbol entre  $\beta$ 2-chimaerin y las PKC tanto en la cinética como en la dosis. Ambas proteínas responden al tratamiento con PMA translocándose de la fracción soluble a la insoluble.  $\beta$ 2-chimaerin requiere de una concentración de PMA 100 veces mayor para translocarse que la requerida por las PKC (10,11). Esta menor asociación a membrana se creyó que era debido a la ausencia de algunos residuos aminoacídicos esenciales en la estructura del dominio C1 de las quimerinas. La translocación de  $\beta$ 2-chimaerin por ésteres de forbol es independiente de PKC ya que ocurre aún en presencia de inhibidores de PKC y requiere del dominio C1, dado que mutaciones o deleciones en este dominio abolen la translocación (9). Esto refuerza la idea de que un solo dominio C1 es suficiente para la translocación, según se reportó para los dominios C1 aislados de distintas PKC (12).

La proteína de fusión GFP- $\beta$ 2-chimaerin se aloja en el citoplasma de células COS-1 en ausencia de estímulo. Luego de estimularlas con PMA esta se transloca a la membrana plasmática y al espacio perinuclear/Golgi según revela la co-localización con marcadores de Golgi (10,13).

El dominio C1 de  $\beta$ 2-chimaerin también está involucrado en interacciones proteína-proteína. La proteína Tmp21-I, un miembro de la familia de proteínas transmembrana de p24 involucrada en el tráfico de vesículas secretorias, interactúa con el dominio C1 de  $\beta$ 2-chimaerin (13,14). Esta proteína funcionaría anclando a  $\beta$ 2-chimaerin al Golgi,

en analogía con las PKC donde la asociación con otras proteínas juega un papel importante en la localización celular. Aunque se conoce poco acerca de la regulación del funcionamiento del Golgi y del tráfico de vesículas por ésteres de forbol, se ha descrito previamente que el DAG está involucrado en el transporte vesicular desde el Golgi a la membrana plasmática (15).

### **El dominio de GAP en las quimerinas**

La región carboxilo (C-) terminal de  $\beta$ 2-chimaerin presenta un dominio de GAP con homología a BCR (16). Este dominio de GAP es específico para Rac, dado que es capaz de acelerar la hidrólisis del GTP a GDP por Rac sin afectar la actividad GTPasa de Cdc42 y Rho. Nos referiremos a este dominio como dominio de Rac-GAP (3).

La sobreexpresión de forma estable del dominio de GAP de  $\beta$ 2-chimaerin en células de carcinoma mamario de ratón causa una reducción en la activación de Rac y en la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta al tratamiento con EGF. En estas células también ha observado una menor tasa de proliferación y migración *in vitro* cuando sobreexpresan el dominio  $\beta$ GAP. Al inyectar estas células de forma subcutánea en ratones *nude*, los clones que sobreexpresan el  $\beta$ GAP forman tumores que crecen menos y son menos invasivos en comparación con células control (17).

Rac es una proteína involucrada en distintos procesos celulares como remodelación del citoesqueleto de actina, migración, proliferación y control del ciclo celular (18,19). La sobreexpresión de  $\alpha$ 1-chimaerin en fibroblastos de ratón NIH-3T3, altera el citoesqueleto y la adhesividad e impide el ensamblado de receptores de integrinas y la formación de focos de adhesión (20). La expresión de  $\alpha$ 1-chimaerin en leucocitos bloquea la fagocitosis, de la misma manera que se observa utilizando una mutante de Rac dominante negativa (Rac-N17) (21). La identificación de  $\beta$ 2-chimaerin asociada a la transformación maligna en astrocitomas, donde se ve una marcada reducción en los niveles de expresión de  $\beta$ 2-chimaerin en comparación con tejido normal, sugiere que la disminución de los niveles de expresión de quimerinas y la consecuente desregulación de la cascada de señalización de Rac son claves para el desarrollo y la progresión de gliomas malignos (22).

### **El dominio SH2 en las quimerinas**

Los dominios SH2 (*por Src homology 2*) están formados por secuencias de aproximadamente 100 aminoácidos encontradas por primera vez como dominios sin actividad quinasa conservados en distintas familias de proteínas. Estos dominios son capaces de unir proteínas fosforiladas en tirosinas, y la especificidad para cada



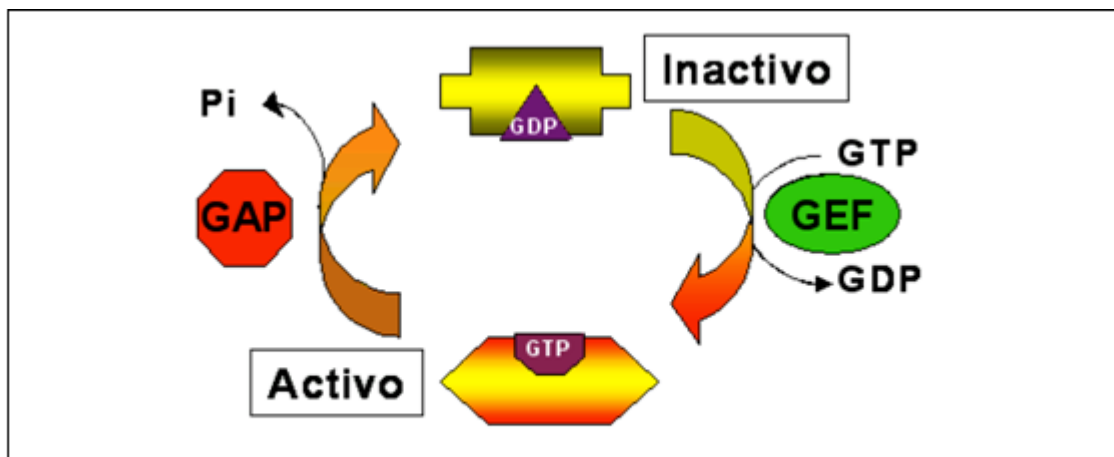
dominio particular esta dada por la secuencia primaria de aminoácidos alrededor de la fosfo-tirosina (23).

Las quimerinas  $\alpha$ 2-chimaerin y  $\beta$ 2-chimaerin contienen en su estructura primaria un dominio SH2 que presenta una secuencia bien conservada con todos los residuos necesarios para su funcionalidad (**Figura 1**). Se vió que en  $\alpha$ 2-chimaerin el dominio SH2 de cumple un papel fundamental en la neuritogénesis en células de neuroblastoma dado que mutantes de este dominio son incapaces de inducir la formación de neuritas (24).

### Rac: una pequeña proteína G monomérica

Las pequeñas proteínas G monoméricas, con una masa molecular que varía entre 20 y 40 KDa, son GTPasas, es decir, enzimas capaces de unir e hidrolizar nucleótidos trifosfato de guanina o GTP. Estas proteínas se encuentran siempre unidas a nucleótidos de guanina y en función de la naturaleza de éste, las proteínas G se encontrarán en estado inactivo, cuando tienen unido GDP, o en estado activo cuando tienen unido GTP (25).

El cambio de GDP a GTP se produce tras la recepción de una señal estimuladora, la cual provoca cambios estructurales que hacen accesible la región efectora a los denominados efectores. La forma activa de estas proteínas es capaz de hidrolizar el GTP gracias a su capacidad GTPasa intrínseca volviendo de nuevo a su estado inactivo y cerrándose de este modo el ciclo.



**Figura 2:** ciclo de activación/inactivación de las proteínas G monoméricas (4).

Por lo tanto el paso limitante en el proceso de activación, es el intercambio del GDP por GTP y esta reacción es extremadamente lenta, así pues se hace necesaria la acción de un grupo de proteínas denominadas factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors). Estos GEFs

interaccionan con la forma inactiva de las proteínas G y facilitan la salida del GDP, el cual es rápidamente sustituido por GTP que se encuentra en exceso en la célula.

La actividad GTPasa de las proteínas G es muy heterogénea, pero en general es bastante lenta, por lo que se hace necesaria la participación de otro grupo de proteínas denominadas factores activadores de la actividad GTPasa o GAPs (*Guanine nucleotide Activating Proteins*) cuya función es acelerar la hidrólisis del GTP. Al igual que ocurre con los GEFs, las proteínas activadoras de la capacidad GTPasa pueden ser muy específicas como es el caso de las quimerinas o presentar un amplio espectro de sustratos como p190GAP.

Rac al igual que Rho y Cdc42 pertenece a las pequeñas proteínas G con actividad de GTPasa de la familia de Rho. Las GTPasas de la familia de Rho desempeñan un papel importante en el control del crecimiento, la regulación de la proliferación celular, la expresión de genes, la regulación del ciclo celular, y el control de la dinámica del citoesqueleto de actina y todos los procesos asociados a éste (26). Estas proteínas estimulan la progresión de la fase G-1 del ciclo celular y la síntesis de ADN así como vías de señalización que activan gran variedad de factores de transcripción. Además, poseen un potencial transformante en algunas líneas celulares y muchos GEFs para Rho, Rac y Cdc42 son oncogénicos (26). Por otro lado, la expresión de GAPs está disminuida en líneas tumorales (27). Asimismo, formas constitutivamente activadas de GTPasas de la familia de Rho incrementan el crecimiento celular e inducen crecimiento independiente y la formación de tumores.

La migración celular es un proceso regulado por Rac. Durante el proceso de migración se requiere de la polarización de la célula para tener direccionalidad. La actividad de las proteínas de la familia de Rho es muy importante en la coordinación del citoesqueleto de actina para mantener la polarización. La célula migratoria tiene un frente de avance y una "cola". El frente consta de una protuberancia membranosa rica en mensajeros de actina con alta tasa de traducción, donde la actina se polimeriza dinámicamente, mientras que en la cola los filamentos de actina se desensamblan y el citoplasma se retrae. El frente de migración requiere de alta actividad de Rac mientras que en la cola la actividad de Rho es necesaria. La actividad de Rho y Rac se regulan negativamente entre sí. Este antagonismo mantiene la polarización y direccionalidad del movimiento (28).

Como se dijo más arriba, Rac interviene en la regulación de la progresión del ciclo celular. Este proceso se caracteriza por el encendido y apagado de genes de forma coordinada. Durante la fase G1 se activa la transcripción del gen de ciclina D1, necesaria para activar a las quinasas dependientes de ciclinas 4/6 (CDK4/6) que

fosforilan a la proteína de retinoblastoma (Rb) (27). La acumulación de Rb fosforilada es un punto de regulación para entrar en fase S. La estabilidad del ARNm de la ciclina D1 es regulada por proteínas que se unen a su 3'UTR. Existen dos formas del ARNm de ciclina D1 que varían en su 3'UTR. La forma corta, que carece de la región 3'UTR tiene una estabilidad mucho mayor y esta asociada a proliferación celular y malignidad en linfomas (29). Estos ejemplos nos muestran la importancia de Rac también en la regulación del destino de los ARNm.

Dado que las quimerinas poseen una actividad de GAP específica para Rac, éstas tienen un papel excluyente en la regulación de Rac. Se ha demostrado recientemente que la proteína  $\beta$ 2-chimaerin, particularmente su dominio de GAP, es capaz de aumentar la actividad GTPasa de Rac, mientras que no se observó efecto sobre Rho y Cdc42; la resolución de la estructura cristalográfica de  $\beta$ 2-chimaerin, la cual se detallará posteriormente, ha permitido entender la base molecular de esta especificidad.

Las Rho GTPasas tienen un papel crítico en tumorigénesis y sus niveles de expresión se encuentran aumentados en una gran variedad de tumores. En especial Rac y distintos Rac-GEFs están sobre-expresados en tumores de mama y esto se asocia con una alta tasa de proliferación y metástasis. Hay evidencias de que la expresión de  $\beta$ 2-chimaerin en tumores de mama o en líneas celulares de cáncer de mama se encuentra apagada. También se observó una correlación entre los niveles de  $\beta$ 2-chimaerin y la tasa de proliferación y malignidad (17,27).

Se ha reportado el primer modelo *in vivo* para las quimerinas (30), donde el gen homólogo a  $\alpha$ 2-chimaerin (*chn1*) presente en el pez zebra, tiene un papel crucial en el desarrollo temprano, y al igual que la vía de señalización a través de Rac es determinante en los movimientos morfogenéticos durante la epibolia. La caracterización de *chn1* demostró que tiene una actividad de GAP específica para Rac, y que funciona como un receptor de ésteres de forbol. El bloqueo de la traducción del ARNm del gen *chn1*, no solo elevó los niveles de Rac-GTP en los embriones tempranos, sino que produjo en ellos notables defectos morfogenéticos en el desarrollo de la notocorda y la forma de los somitos.

La familia de las Rho GTPasas están involucradas también en la señalización para el establecimiento de circuitos motores neuronales en ratones (31-33). Las Rho GTPasas son efectores claves en la dinámica de polimerización/despolimerización de actina. La activación de moléculas como RhoA induce la retracción de conos neuronales en crecimiento, mientras que Rac y Cdc42 activadas inducen su extensión. Se ha descrito a  $\alpha$ 2-chimaerin como un mediador clave en la formación de redes

neuronales locomotoras, actuando río abajo del receptor de Efrinas, EphA4. Éste, es un receptor tirosina quinasa que interactúa físicamente con el extremo C-terminal de  $\alpha 2$ -chimaerin. Esta quimerina tiene un papel central en el colapso de los conos neuronales en crecimiento en neuronas corticales y por lo tanto determina parcialmente el tipo de conexiones nerviosas que se forman. Los ratones mutantes para éste RacGAP tienen un fenotipo similar al observado para mutantes con receptores EphA4 con actividad kinasa deficiente.

Además, la desregulación de  $\alpha 2$ -chimaerin esta implicada en patologías como el Síndrome de Retracción de Duane (34).

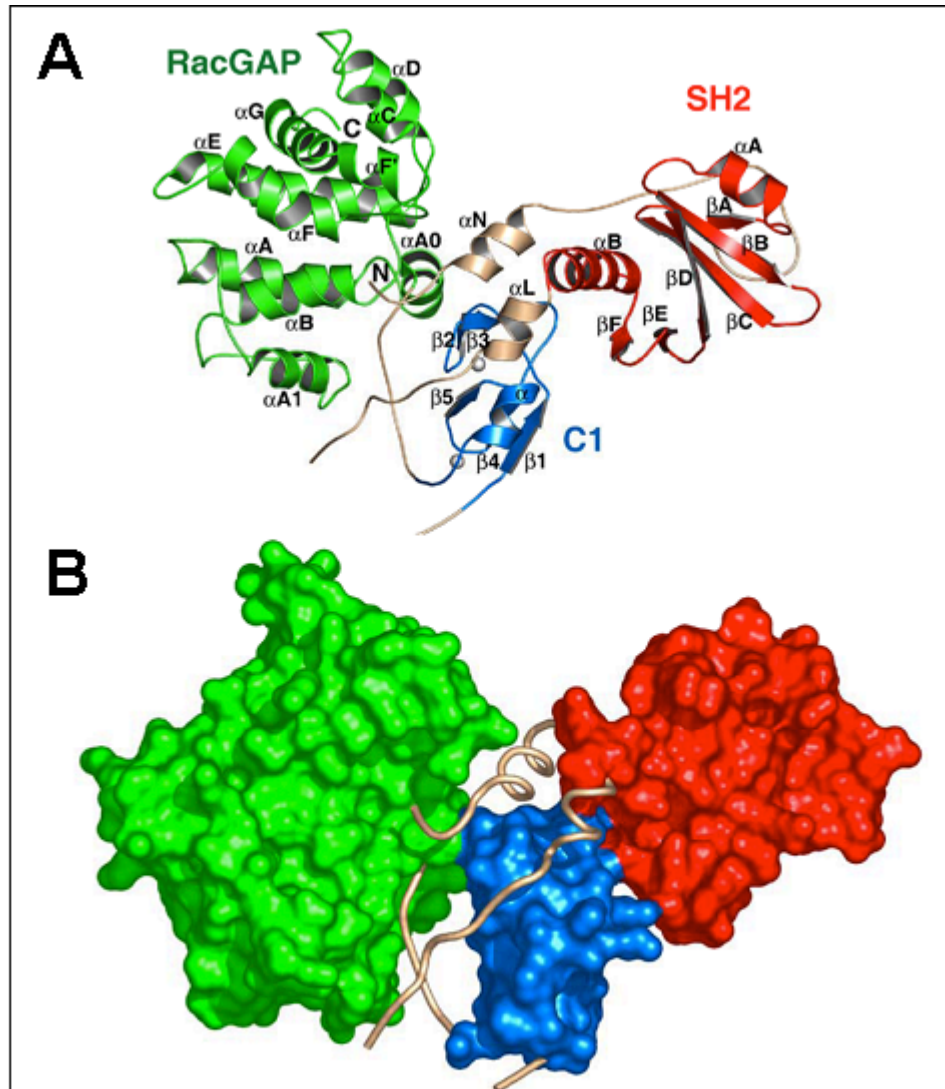
Se ha demostrado que en células T, Rac1 y Rac2 participan en una gran variedad de procesos celulares como la sinapsis, la polarización mediada por antígenos o quemoquinas, la activación de fosfolipasa  $C\gamma 1$  y la regulación positiva de factores nucleares de células T activadas. Durante la formación de la sinapsis entre la célula presentadora de antígenos y el receptor T el rearreglo del citoesqueleto de actina tiene un papel excluyente. Esto requiere de la activación coordinada de las GTPasas de la familia de Rho.  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ -chimaerin se expresan en las células T en niveles distintos y participan en la señalización del receptor T. La familia de las quimerinas esta involucrada en la modulación de la actividad de Rac durante la formación de la sinapsis de las células T, sugiriendo que contribuyen en la reorganización del citoesqueleto de actina de una manera DAG-dependiente (35). Otros estudios han demostrado que existe una regulación TCR dependiente de  $\beta 2$ -chimaerin que desestabiliza su unión a lípidos de membrana, disminuyendo su actividad de GAP específica para Rac. También  $\beta 2$ -chimaerin participa en la regulación dependiente de quemoquinas de la migración y adhesión de células T (36).

### **Estructura tridimensional de $\beta 2$ -chimaerin y el modelo autoinhibitorio**

Recientemente se resolvió la estructura cristalográfica por difracción de rayos X de  $\beta 2$ -chimaerin (37). La **Figura 3A** muestra el modelo para la estructura de  $\beta 2$ -chimaerin, con los dominios SH2 en rojo, C1 en azul, y GAP en verde, y las regiones N-terminal y la región conectora o *linker* en gris. La **Figura 3B** muestra una representación de espacio ocupado o “*space filling*” orientada y coloreada como en A con las regiones “*linker*” mostradas en una representación tipo gusano o “*worm representation*”.

La estructura del dominio C1 presenta una gran similitud con el dominio C1 $\beta$  de PKC $\delta$ . Este dominio hace contacto con el extremo N-terminal, los dominios SH2 y GAP, y las regiones “*linker*” que unen los tres dominios. El dominio aislado posee una superficie

de contacto con el solvente de  $4056 \text{ \AA}^2$  de los cuales sólo  $2481 \text{ \AA}^2$  se encuentran expuestos al solvente en la proteína intacta. Los putativos residuos hidrofóbicos de unión a membrana se encuentran “enterrados” por contactos intermoleculares con el resto de la proteína.

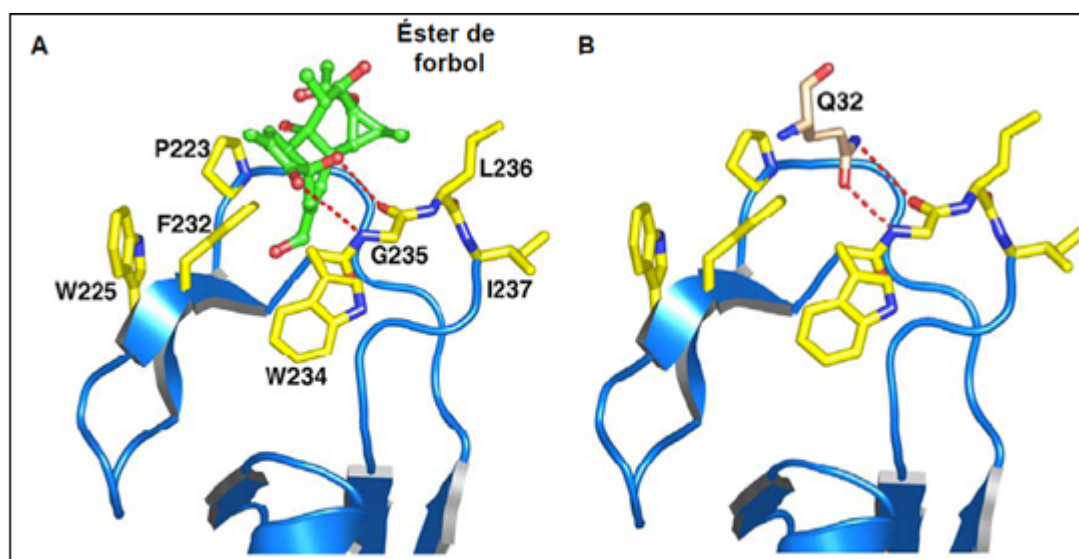


**Figura 3:** **A:** Modelo de cintas (*ribbons*) para la estructura de  $\beta 2$ -chimaerin. **B:** Representación de espacio ocupado (*space filling*) de los dominios SH2, C1 y GAP con las regiones conectoras modeladas como gusanos (*worm*). SH2: rojo; C1: azul; GAP: verde; N-terminal y linker: gris (4).

Se vió que la estructura del dominio de Rac-GAP es homóloga a la de los dominios de Rho-GAP previamente cristalizados, como cabe esperar debido a su similitud de secuencias aminoacídicas.

El extremo N-terminal de  $\beta 2$ -chimaerin se encuentra ordenado entre los aminoácidos 21 y 54. Este extremo posee un papel crucial en el modelo autoinhibitorio propuesto para la regulación alostérica de la isoforma.

El N-terminal mide 60 Å extendiéndose prácticamente el largo completo de la proteína. Los aminoácidos 21 a 24 están en contacto con el dominio de Rac-GAP. El segmento 27-34 forma un  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ N) que hace contacto con el sitio de unión a membrana, cubriendo el sitio de unión a DAG y ésteres de forbol del dominio C1. La glutamina en posición 32 protuye de la hélice insertándose en el sitio de unión a ésteres de forbol formando uniones puente de hidrógeno con la glutamina 235 (**Figura 4**). El resto de los residuos (aminoácidos 35 a 54) forman un lazo o “loop” de unión al dominio SH2. Los primeros 25 residuos de la secuencia que une el dominio SH2 con el dominio C1 (139 a 147) se encuentran ordenados, formando una  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ L por linker). Esta hélice descansa sobre el dominio C1 haciendo contacto de forma antiparalela con  $\alpha$ N.

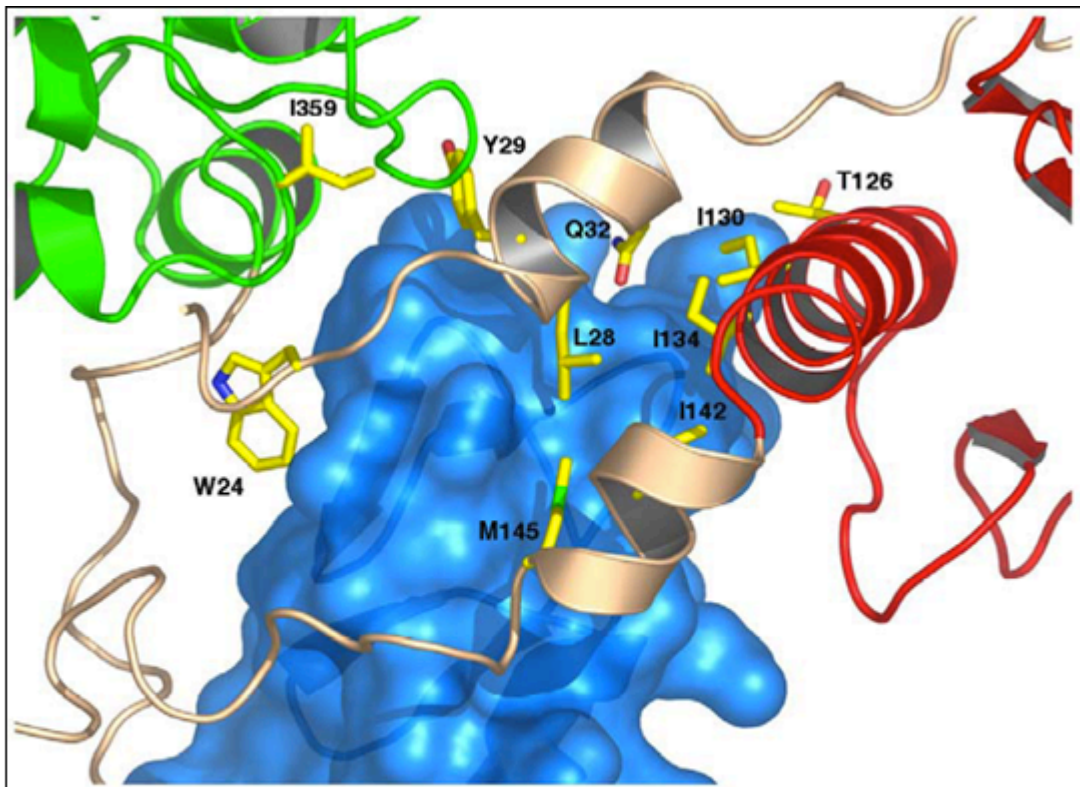


**Figura 4:** **A:** Modelo e unión de un éster de forbol al dominio C1. **B:** El residuo glutamina 32 se inserta en el sitio de unión a ésteres de forbol y forma puentes de hidrógeno con la glutamina 235. Los puentes de hidrógeno están representados en líneas punteadas rojas (4).

Si bien  $\beta$ 2-chimaerin une ésteres de forbol *in vitro* a concentraciones similares que las PKC, en células requiere concentraciones 100 veces mayores para translocarse a la fracción de membranas en respuesta a PMA. Esta diferencia se debe a que el dominio C1 está “enterrado” en la estructura terciaria con interacciones intermoleculares con los distintos dominios y con el  $\alpha$ N y  $\alpha$ L. El sitio de unión a ésteres de forbol y DAG se encuentra ocluido por la glutamina en posición 32. En el caso de los ensayos *in vitro* la unión se hace en presencia de vesículas fosfolípídicas de fosfatidilserina y fosfatidilcolina (7,8). En estas condiciones donde los lípidos están en exceso, la estructura terciaria estaría abierta y el dominio C1 expuesto permitiendo la unión del éster de forbol con alta afinidad.

El modelo autoinhibitorio de  $\beta$ 2-chimaerin en el cual participan el  $\alpha$ N y el  $\alpha$ L se comprobó llevando a cabo mutaciones puntuales en residuos aminoacídicos

considerados clave. Se construyeron 10 mutantes de residuos que hacen contactos internos manteniendo la conformación de la proteína “cerrada”. En la **Figura 5** se muestran los residuos mutados. Estos residuos están localizados en el  $\alpha$ N,  $\alpha$ L o en posiciones del dominio SH2 o GAP que hacen contacto con el dominio C1.



**Figura 5:** Representación que muestra los 10 residuos clave que fueron mutados para comprobar el modelo autoinhibitorio (cadenas laterales representadas como palos). En azul, representación de espacio ocupado del dominio C1. Representación de cintas: en rojo, dominio SH2; en verde, dominio GAP; en gris, los dominios N-terminal y conectores (4).

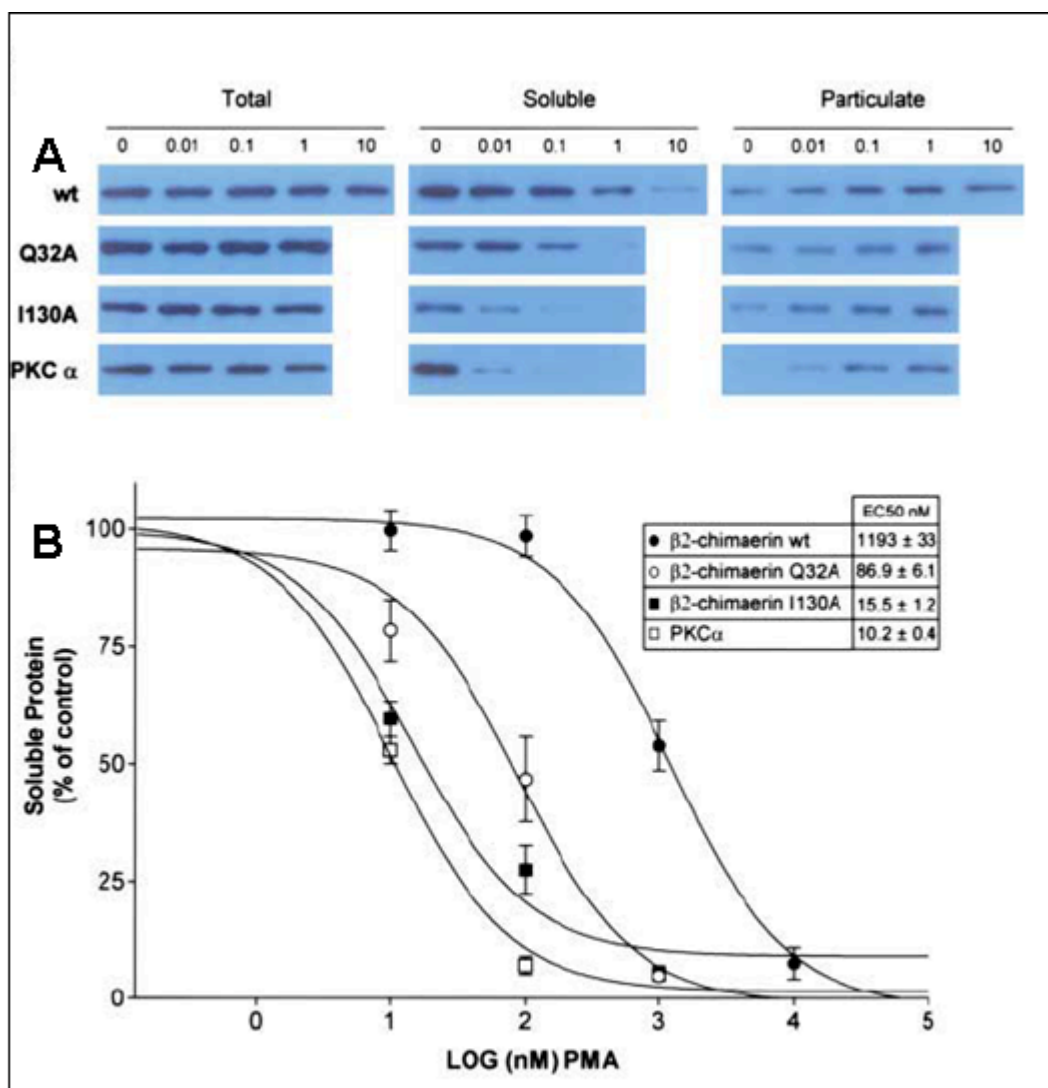
Al medir la respuesta a la unión de un ligando del dominio C1 en un contexto celular, utilizando estudios de translocación en células COS-1, todas las mutantes menos una mostraron ser mas sensibles a la translocación por el éster de forbol PMA. Las mutantes hipersensibles al PMA se las denominó SUPER-chimaerins (*por Single-Mutant Ultrasensitive Phorbol Ester Responsive Chimaerins*).

Las mutantes triptofano 24 por alanina (W24A), leucina 28 por alanina (L28A) y isoleucina 130 por alanina (I130A), son tan sensibles al PMA como las PKC y  $\beta$ 1-chimaerin. El W24 se posiciona entre el dominio C1 y el domino de GAP, el L28 lo hace entre el  $\alpha$ L y el dominio C1, mientras que I130 en la interfase  $\alpha$ N/C1. Estos aminoácidos median contactos entre más de un interdominio provocando mayores aumentos en la sensibilidad al PMA al mutarlos.

La glicina 32 de  $\beta$ 2-chimaerin se encuentra bloqueando este sitio de unión a ésteres de forbol, haciendo que la estructura sea incompatible con la unión de éteres de forbol



y fosfolípidos de membrana. La mutante Q32A se comporta como una SUPER chimaerin, aunque su sensibilidad a PMA es levemente menor a la sensibilidad mostrada por las PKC.

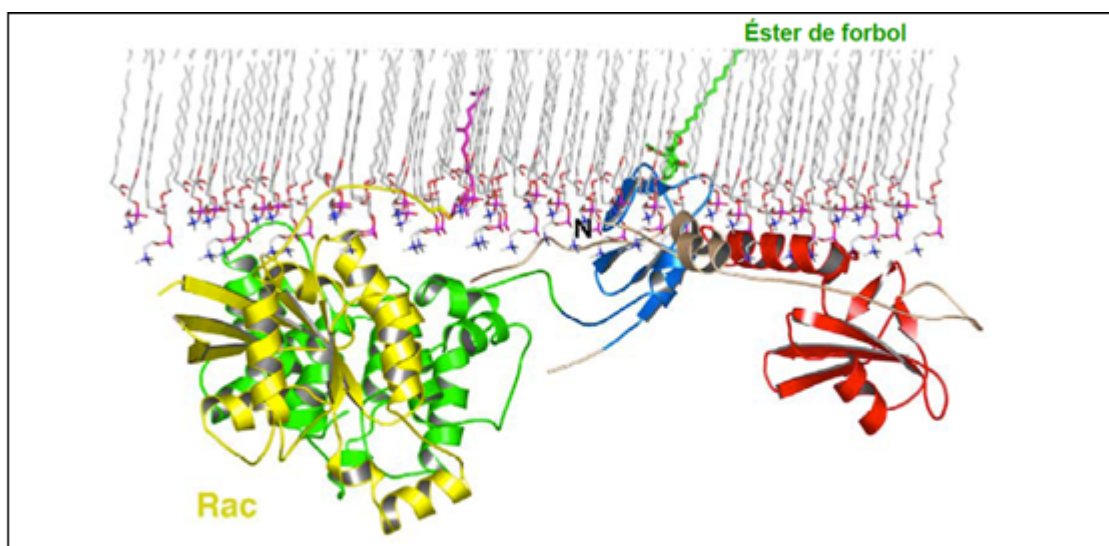


**Figura 6:** **A:** Se muestra la translocación en función de distintas concentraciones de PMA, de la fase soluble a la fase particulada de  $\beta 2$ -chimaerin wt y dos de las mutantes mencionadas, I130A y Q32A, comparándolas con la enzima PKC. En el **panel B** se muestran las cuantificaciones correspondientes a las fracciones solubles mostradas en el panel **A** (4).

Las mutantes Q32A e I130A tienen una actividad de GAP mas alta que la isoforma  $\beta 2$ -chimaerin *wild type*. Los niveles de Rac-GTP medidos con ensayos de pulldown son menores cuando se transfectan células COS-1 con cualquiera de las dos mutantes comparado con los niveles observados cuando se transfecta con  $\beta 2$ -chimaerin wt. Esto se observa tanto en el caso de células creciendo en medio con suero (10% FBS), como en células sometidas a un hambreado previo y luego estimuladas con EGF.



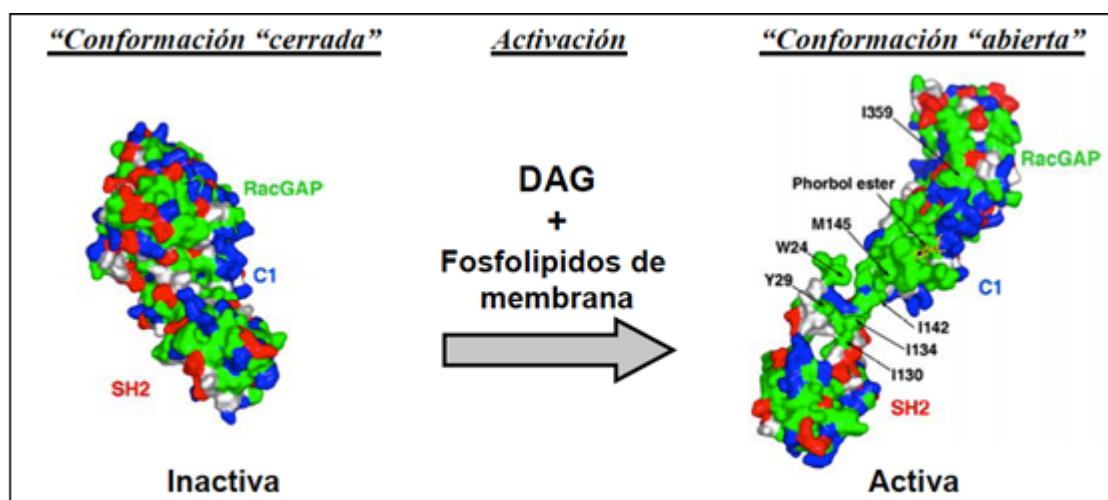
Cuatro diferentes regiones están en contacto con el dominio C1: el dominio SH2, el dominio de GAP, la alfa hélice N-terminal ( $\alpha$ N) y la alfa hélice conectora entre el dominio SH2 y C1 ( $\alpha$ L por Linker). Estas interacciones cubren la zona de inserción a membrana del dominio C1 y cada uno de estos dominios está involucrado en interacciones con las cadenas laterales hidrofóbicas. La energía necesaria para romper estas interacciones explica la necesidad de altas dosis de PMA para lograr la translocación de  $\beta$ 2-chimaerin en comparación con la isoforma  $\beta$ 1-chimaerin que carece de los dominios SH2,  $\alpha$ N y  $\alpha$ L o con PKC $\alpha$ . Deben romperse interacciones intramoleculares para que  $\beta$ 2-chimaerin se una a la membrana, lo que sugiere que la proteína debe atravesar un cambio conformacional masivo que involucra a todos los dominios para insertarse en la membrana. Cuando la proteína adquiere la estructura activa, unida a la membrana, las superficies hidrofóbicas liberadas por la apertura de la estructura terciaria se insertan a la membrana en vez de quedar expuestas al solvente.



**Figura 7:** Modelado de la estructura de  $\beta$ 2-chimaerin en su conformación activa unida a un éster de forbol y a la membrana (4).

La estructura cerrada está catalíticamente inactiva. Por un lado, las prolina en posición 21 y 22 bloquean directamente el sitio de unión a Rac. La prolina 22 impide que  $\alpha$ F' (alfa hélice F' del dominio de GAP) se pueda poner en la posición correcta para unirse a Rac. Por esto, para que la unión ocurra, las prolina 21 y 22 deben moverse fuera de su posición. Las prolina forman una estructura rígida, y el micro ambiente del sitio de unión a Rac es conformacionalmente restrictivo, con lo cual la única posibilidad es que se muevan los residuos que conectan la dupla de prolina con el resto de la molécula.

Los aminoácidos isoleucina 23 y triptofano 24 están involucrados en uniones hidrofóbicas entre los dominios C1, GAP y N-terminal. Esto implica que se deben romper estas interacciones para que pueda ocurrir la unión con Rac. Por esto se ve que las mutantes que desestabilizan la conformación cerrada son potentes Rac-GAPs. Para activar a  $\beta$ 2-chimaerin, es necesaria la unión de DAG y la conjunta interacción con los fosfolípidos de membrana, que competirán por las zonas hidrofóbicas del dominio C1 involucradas en interacciones intermoleculares. Según el modelo propuesto, el dominio N-terminal, además de enterrar al dominio C1, ocluye el sitio de unión a Rac del dominio GAP. Estas interacciones intermoleculares se interrumpen cuando el dominio C1 se inserta en la membrana, dando flexibilidad al dominio N-terminal para que libere el sitio activo de Rac-GAP, permitiendo que la  $\alpha$ F' se ubique en la conformación activa.

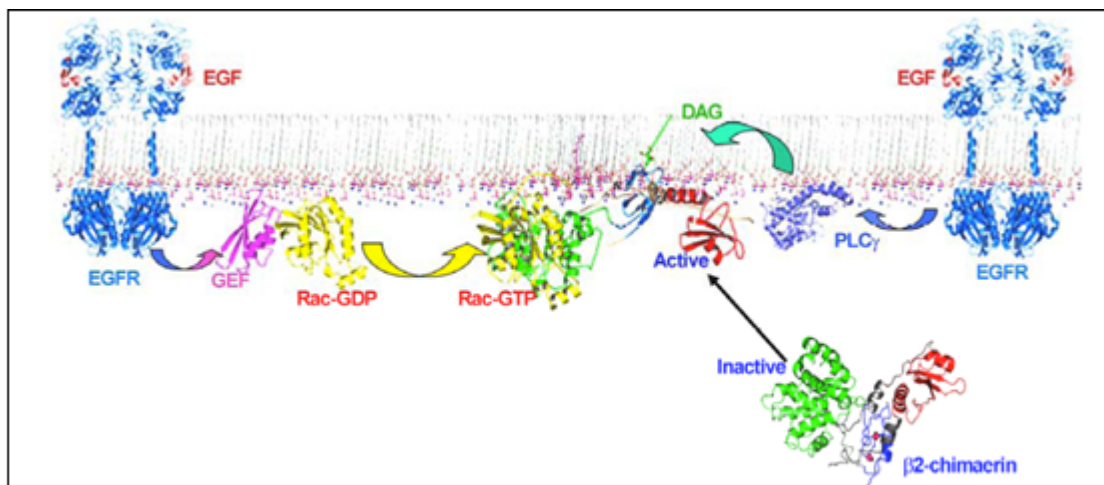


**Figura 8:** Modelo para la activación de  $\beta$ 2-chimaerin. En verde, las superficies hidrofóbicas, en azul las básicas, en rojo las ácidas y en blanco las polares no cargadas (4).

La activación de Rac por receptores del tipo tirosina quinasa como el receptor de EGF (EGFR) está ampliamente estudiada. La consecuente activación de PLC río abajo del EGFR, estimula la translocación a la membrana de  $\beta$ 2-chimaerin y la inserción del dominio C1 en la membrana produce el cambio conformacional necesario para activar el dominio de Rac-GAP. Este modelo se muestra en la **Figura 9**.

Este modelo autoinhibitorio también fue descrito mediante ensayos *in vitro* (38). La caracterización bioquímica de algunas de las mutantes puntuales mencionadas anteriormente confirmó que poseen el dominio C1 y el dominio de RacGAP expuesto en mayor medida que la isoforma *wild type*.

Se reportó en ensayos de unión del radioligando [ $^3\text{H}$ ]PDBu (análogo de DAG) hechos en vesículas fosfolipídicas con un 10% de fosfatidil serina, que las mutantes L28A, I130A e I359A tienen una afinidad de unión mucho mayor que  $\beta 2$ -chimaerin wt, mientras que la mutante Q32A tiene una afinidad levemente mayor por el [ $^3\text{H}$ ]PDBu. En este trabajo además se confirmó que la unión de lípidos de membrana por parte de  $\beta 2$ -chimaerin no se ve afectada por la presencia de la proteína Rac en estado activo, además de que la actividad de RacGAP de las mutantes también está aumentada *in vitro*.



**Figura 9:** Modelo para la activación de Rac y  $\beta 2$ -chimaerin por EGF (4).

La isoforma  $\alpha 2$ -chimaerin tiene un mecanismo de autoinhibición muy similar al descrito para  $\beta 2$ -chimaerin (1). El modelado molecular de la estructura terciaria de  $\alpha 2$ -chimaerin utilizando como molde la estructura de  $\beta 2$ -chimaerin, reveló que el dominio C1 se encuentra enterrado y ocluido por interacciones intramoleculares. De manera similar a lo que ocurre con la isoforma  $\beta 2$ , el extremo N-terminal ocluye un loop hidrofóbico presente en el dominio C1 responsable de la interacción con el ligando y con la membrana plasmática. Asimismo, el extremo N-terminal de  $\alpha 2$ -chimaerin bloquea el sitio de unión de Rac, en el dominio RacGAP.

Esto se elucidó utilizando una aproximación parecida a la llevada a cabo con  $\beta 2$ -chimaerin, generando mutantes puntuales en aminoácidos que, gracias al modelado molecular, eran considerados clave en interacciones hidrofóbicas que ayudan a mantener a la isoforma en conformación cerrada o inactiva.

Las mutantes demostraron ser más sensibles que la isoforma *wild type* a la estimulación por PMA y además tienen una actividad más potente como RacGAPs. Se

reporta además que  $\alpha 2$ -chimaerin modula negativamente la activación de Rac a través de la estimulación del EGFR.

El mismo mecanismo autoinhibitorio está presente en dos isoformas provenientes de distintos genes (CHN1 y CHN2). En ambas isoformas el dominio C1 permanece ocluido por diferentes contactos intramoleculares, haciendo que la proteína permanezca en una conformación inactiva o cerrada. Se piensa que mientras que para las PKC el DAG contribuye a la activación enzimática, para el caso de las quimerinas éste segundo mensajero tenga solo una función de anclaje y sean necesarios mecanismos adicionales para facilitar el pasaje del estado inactivo al estado activo.

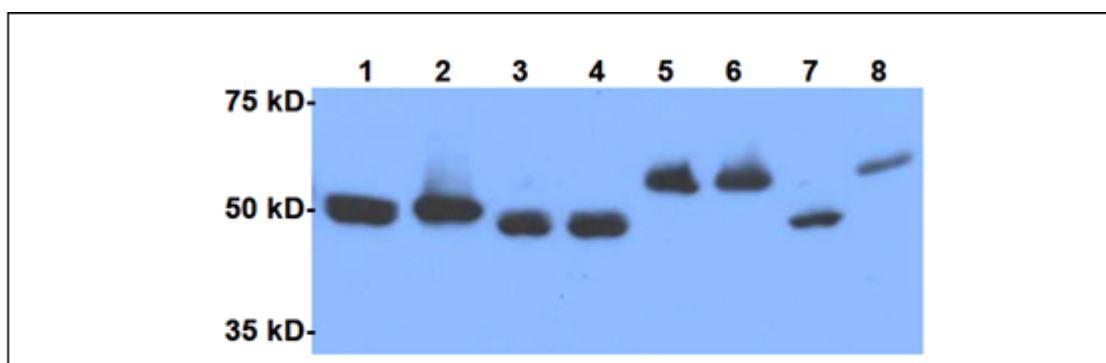
### **Una nueva isoforma del gen $\beta$ -chimaerin**

Entre las evidencias que indicaban la existencia de una nueva isoforma generada a partir del gen  $\beta$ -chimaerin o CHN2 se encontraban ensayos de Western blot, en los cuales se analizó la expresión de diferentes isoformas de quimerinas en lisados provenientes de diferentes tejidos de ratón: cerebro total, cerebelo, pons, cortex, glándula adrenal, riñón, testículo y corazón. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-quimerina que reconoce el dominio de GAP de las quimerinas, por lo tanto es capaz de reconocer las cuatro isoformas descritas en mamíferos (7).

El resultado se muestra en la **Figura 10** y se puede ver la presencia de las distintas bandas correspondientes a quimerinas. La literatura reporta la existencia de dos genes,  $\alpha$  y  $\beta$  (CHN1 y CHN2, respectivamente, según la nomenclatura de la base de datos del genoma humano) que, por sitios alternativos del inicio de la transcripción, dan cuatro isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ). Las isoformas 2 poseen un dominio SH2 y tienen una masa molecular de 50 kD. Las isoformas 1 carecen del dominio SH2 y presentan una masa molecular de 35 kD. En humanos fueron clonadas las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , mientras que la isoforma  $\beta 1$  no fue clonada aún. En la **Figura 10** se puede ver que existen en el ratón al menos tres isoformas de tamaños distintos, sin contar las isoformas 1 que no se lograron visualizar. Existen pequeñas diferencias de tamaño entre las quimerinas encontradas en cerebelo comparado con la encontrada en pons, cortex o testículo. La presencia de bandas de distinto tamaño en estos tejidos se puede atribuir a la existencia de distintas variables de la isoformas  $\beta 2$ . Para explicar estas diferencias es necesario hacer un análisis de secuencias disponibles en bases de datos públicas. Se cree que estas variantes de  $\beta 2$  poseen extremos N-terminales diferentes, codificados en cromosomas distintos. Este análisis escapa a los fines de la presente tesis.

Es importante destacar que se observó en glándula adrenal, riñón y corazón una banda de aproximadamente 60 KDa que claramente no se correspondía con ninguna de las isoformas descritas hasta el momento, tanto provenientes del gen CHN1 o  $\alpha$  como CHN2 o  $\beta$ .

También se analizó la expresión de quimerinas en diferentes líneas celulares humanas y murinas usualmente utilizadas en el laboratorio. Se utilizó el mismo anticuerpo que en el gel de la **Figura 10**, específico para el dominio GAP de quimerinas.



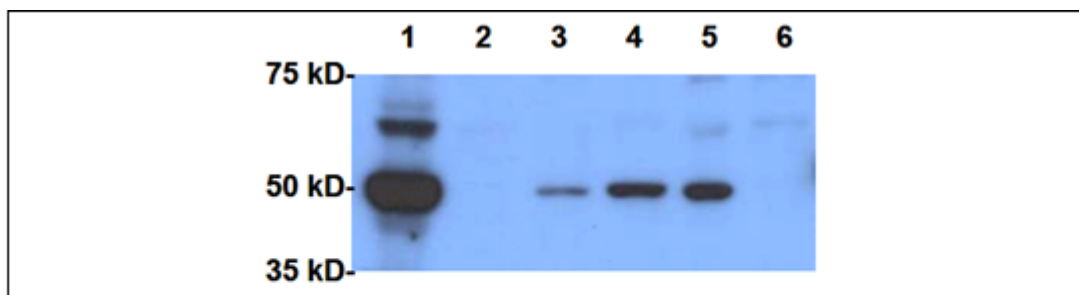
**Figura 10:** Expresión de quimerinas analizada por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-quimerinas. Proteína total (20  $\mu$ g) de lisados de distintos órganos de ratón fueron resueltos en PAGE-SDS10% acrilamida. 1: extracto de cerebro. 2: cerebelo. 3: pons. 4: corteza cerebral. 5: glándula adrenal. 6: riñón. 7: testículo. 8: corazón (4).

Particularmente lo que llamó nuestra atención fue la presencia, aquí también, de una banda de 60 KDa en las líneas celulares de neuroblastoma de ratón Neuro2a y en las células derivadas de un neuroblastoma humano con metástasis en medula ósea SK-N-SH (**Figura 11**). El nivel de expresión en el segundo caso es marcadamente menor, respecto de las células de neuroblastoma murino, que se caracterizan por producir grandes cantidades de quimerinas.

Estos dos ensayos de Western blot son los primeros indicios obtenidos para postular la existencia de una nueva isoforma que tendría un peso molecular 10 KDa mayor a las isoformas 2.

Haciendo una búsqueda de secuencias relacionadas a la de  $\beta$ 2-chimaerin utilizando el programa BLAST en las bases de datos de EST humanos del NCBI se encontraron distintas secuencias correspondientes a ARN mensajeros que compartían secuencias con  $\beta$ 2-chimaerin y que diferían en sus extremos 5'. Una de estas variantes se encontró en un EST de tumor de riñón humano. Los EST, también conocidos como "*Single-pass cDNA Sequences*", son secuencias correspondientes a ADN copia (cDNA) que se obtienen por secuenciación automatizada y al azar. Representan

porciones de ARN mensajeros incompletas de no más de 700 pb (39).

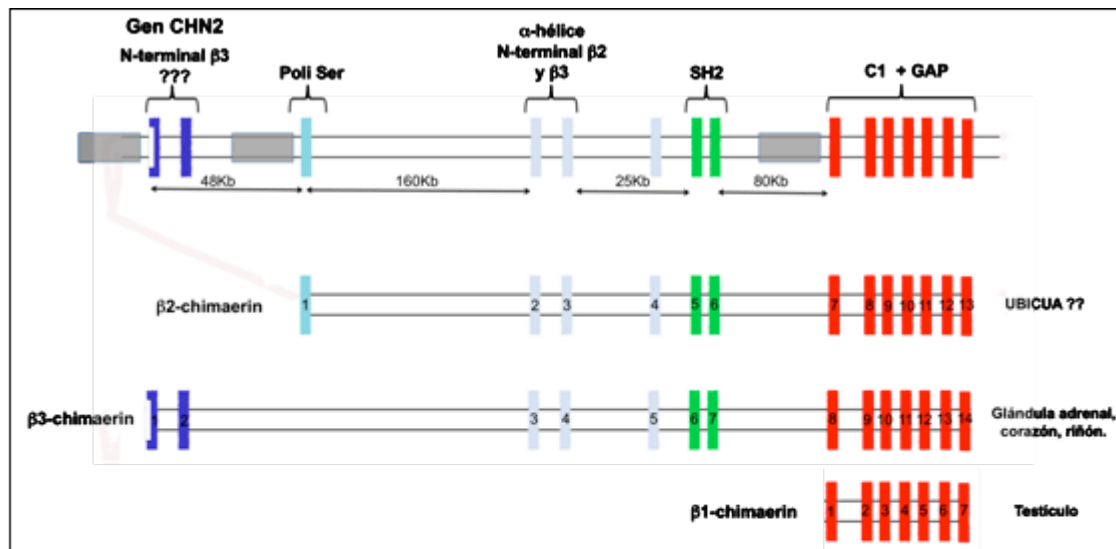


**Figura 11:** Expresión de quimerinas analizada por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti quimerinas HAR-2. Proteína total (20  $\mu$ g) de lisados de distintas líneas celulares fueron resueltos en PAGE-SDS 10% acrilamida. 1: Neuro2a. 2: NIH-3T3. 3: Rat-1. 4: PC12. 5: SK-N-SH. 6: U-937 (4).

Este EST proveniente de tumor de riñón coincidía con buena parte de la secuencia nucleotídica de  $\beta$ 2-chimaerin, pero su extremo 5' era considerablemente mayor. Esta secuencia fue traducida en el marco de lectura correcto utilizando el código genético; de esta forma se observó que el EST codificaba un extremo N-terminal considerablemente mayor desconocido en la familia de las quimerinas (**ver ANEXO**).

Se analizó la secuencia genómica del gen CHN2 en el cual se identificaron dos exones 48 kb río arriba del inicio de la transcripción de  $\beta$ 2-chimaerin que codifican para 80 aminoácidos novedosos en la porción N-terminal (aproximadamente 9 kD) (**Figura 12**). Estos aminoácidos coinciden con los codificados por el EST mencionado mas arriba, y además, codifican para un nuevo dominio de función desconocida. No obstante, el primero de los dos exones está incompleto, debido a que no se encontró un ATG sobre el EST de tumor de riñón humano que de inicio al marco de lectura abierto (**Figura 12**).

Las evidencias son lo suficientemente fuertes como para poder sostener la hipótesis que sugiere la existencia de una nueva isoforma perteneciente a la familia de las quimerinas que de ahora en mas llamaremos  $\beta$ 3-chimaerin.



**Figura 12:** Diagrama del Gen CHN2. En la parte superior se esquematiza la disposición genómica de los diferentes exones pertenecientes a cada una de las isoformas. Las cajas grises simbolizan las secuencias promotoras. Por debajo, se esquematizan los mensajeros de las distintas isoformas reportadas hasta el momento, y de β3-chimaerin. En rojo aparecen los exones que codifican para los dominios C1 y GAP. En verde, los exones que codifican el dominio SH2. En azul oscuro se grafican los exones que codifican el N-terminal de β3-chimaerin; el primer exón está incompleto, ya que no se pudo encontrar un ATG que de inicio al marco de lectura abierto.

## **II-Objetivos**



El **primer objetivo** de esta Tesina de Licenciatura es realizar el clonado molecular de esta nueva isoforma a la que llamamos  $\beta$ 3-chimaerin, utilizando cDNA de tejidos que en los antecedentes previos hayan evidenciado su expresión.

El **segundo objetivo** de esta tesina es caracterizar la unión a ésteres de forbol por parte de  $\beta$ 3-chimaerin.

## **III-Materiales y Métodos**

## **Análisis bioinformático**

### ***Búsqueda y alineación de secuencias***

Para la búsqueda de secuencias se utilizó el programa Blast (40). Se analizaron las bases de datos del NCBI y del Ensembl. Para la alineación de secuencias se utilizó el programa *Aligner* presente en la página web <http://www.justbio.com>.

## **Construcción, clonado y amplificación de ADN recombinantes**

### ***a. Purificación del RNA total de líneas celulares***

Para purificar el RNA total de las distintas líneas celulares que luego se utilizó para la fabricación de cDNA se empleó el agente TRI REAGENT (MOLECULAR RESEARCH CENTER INC CAT No: TR-118). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Al término de la purificación se constató la integridad del RNA extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,9% y posterior tinción con bromuro de etidio.

Las muestras de RNA total se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm (Abs<sub>260nm</sub>). Las concentraciones se calcularon conociendo la Abs<sub>260 nm</sub> y teniendo en cuenta el factor de dilución, teniendo en cuenta que 1 unidad de Abs<sub>260 nm</sub> equivale a 50 ng/μg de ADN. En todos los casos se verificó la pureza del RNA viendo que la relación de absorbancias 260/280 esté entre 1,6 y 1,9.

### ***b. Síntesis de cDNA a partir del RNA total purificado de las distintas líneas celulares.***

Los cDNA fueron sintetizados por retrotranscripción a partir del RNA total extraído de las líneas celulares con las cuales se trabajó.

En todas las reacciones se utilizó como templado 2μg de RNA. En un tubo libre de RNasas se mezclaron 2 μg de RNA, 1μg de oligo(dt)<sub>15</sub> primer (Promega), y 15 μl de H<sub>2</sub>O DEPC. Se calentó la mezcla 5 minutos a 70°C para desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA. Inmediatamente después las muestras se colocaron en hielo.

Posteriormente al templado se le agregó la siguiente mezcla: 1X M-MLV buffer de reacción, 0.5 mM de dNTPs, 25 U del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNasin (Promega), 200 U M-MLV Retrotranscriptasa (Promega), llevado a 25 μl con H<sub>2</sub>O DEPC. La mezcla de reacción total fue incubada 60 minutos a 42°C.

### ***c. Amplificación por PCR del cDNA de β3-chimaerin***

La amplificación por PCR del cDNA de β3-chimaerin se llevó a cabo utilizando como templado dos cDNA comerciales provenientes de riñón (Catalogue no. cDNA-hu-tj;

Batch n.o: C0038) y encéfalo (Catalogue no. cDNA-hu-tj; Batch n.o C0035) de la compañía BioNank.

El ciclador utilizado fue Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler, Cat nro: TC9600-G-230V.

Los primers usados en los experimentos de PCR fueron diseñados con el programa **Primer3** presente entre las herramientas ofrecidas en la página <http://www.justbio.com> y son los siguientes:

**XhoI      BamHI**

**PRIMER 1    5'CTCGAG GGATCC ATGACCCAGACCCACAGG3'**

**PRIMER 2    5'CTTCGAACCAGGGAGGAGAT3'**

**PRIMER 3    5'GCCAACCTGATCTCAAGAGG3'**

**PRIMER 4    5'TCCCCAGATTTTCTGCATTC3'**

**MluI      NotI**

**PRIMER 5    5'ACGCGT GCGGCCGC GGATTAGAATAAAACGTCTTCG3'**

Primers contra **Actina**:

**FORWARD 5'TCAACGTGCCCGCCATGTAC3'**

**REVERSE 5'GAATGCCCGCCGACTCCATA3'**

**-Programa utilizado para la amplificación de la secuencia codificante completa de β3-chimaerin (utilizando PRIMERS 1 y 5):**

Desnaturalización Inicial.....95°C    5 minutos

Desnaturalización.....95°C	30 segundos	} 25 ciclos
Annealing.....56°C	30 segundos	
Extensión.....72°C	2'30" minutos	

Extensión Final.....72°C    10 minutos

4°C

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l con: 3 U de enzima Pfu DNA Pol (Promega), 1X de buffer Pfu con magnesio, 0,02  $\mu$ M de cada uno de los primers (1 y 5), 0,2 mM de dNTPs, entre 1 y 4  $\mu$ l de cDNA de células HEK293 y llevado a volumen con H<sub>2</sub>O miliQ.

**-Programa utilizado para la amplificación del extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin (utilizando PRIMERS 1 y 2):**

Desnaturalización Inicial.....	95°C	2 minutos	
Desnaturalización.....	95°C	1 minuto	} 32 ciclos
Annealing.....	56°C	45 segundos	
Extensión.....	72°C	1 minuto	
Extensión Final.....	72°C	5 minutos	
	4°C		

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l con: 1X Green GoTaq, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de GoTaq Pol (Promega), 0,02  $\mu$ M de cada uno de los primers (1 y 2), 2 $\mu$ l de templado\*\*, llevado a volumen con H<sub>2</sub>O mQ.

\*\* se pipetearon 2 $\mu$ l de templado cuando se utilizaron los cDNA sintetizados en nuestro laboratorio, cuando se utilizaron cDNA comerciales se pipetearon 7 $\mu$ l en todos los casos.

**d. Subclonado de los fragmentos amplificados por PCR**

Los fragmentos amplificados por PCR se subclonaron en el vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit **TOPO TA Cloning** provisto por la empresa Invitrogen siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

**e. Minipreparación de ADN plasmídico**

Se utilizó el kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este protocolo esta basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado (41). Luego de lisis, el DNA genómico es eliminado por centrifugación. El DNA plasmídico es adsorbido en una membrana de sílica en presencia de alta

concentración salina, lavado con una solución de etanol concentrado, y luego eluido en buffer TE.

#### **f. Secuenciación**

Las construcciones de ADN plasmídico fueron secuenciadas utilizando el servicio de secuenciación Unidad Genómica perteneciente al Instituto de Biotecnología de Castelar que forma parte del INTA (Instituto de Tecnología Agropecuaria).

#### **g. Preparaciones a gran escala de ADN plasmídico**

Se utilizaron columnas de intercambio iónico *Tip 500* de *Plasmid Maxi Kit*(QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este protocolo esta basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado (41), seguido de una purificación del DNA plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico. El DNA se une a la columna, y luego se remueve el RNA, proteínas, solventes e impurezas de bajo peso molecular con una concentración media de sal. Finalmente el DNA es eluido con un buffer de alta salinidad, y concentrado y desalado por precipitación con 0,7 volúmenes de isopropanol y posterior lavado con etanol 70%. El rendimiento de estas maxi-preparaciones es aproximadamente de 500 µg de ADN plasmídico.

#### **h. Geles de agarosa nativos**

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TBE 1X al 0,7-1,5% con bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. A las muestras se les agregó el correspondiente volumen de buffer de siembra 6 X. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta (UV). Se utilizaron los marcadores de peso molecular *1 kb* y *100 bp DNA Ladder* (New England Biolabs).

#### Soluciones

TBE 10X: (1 litro) 108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8.

#### **i. Cuantificación de ADN**

Las muestras de ADN se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm (Abs<sub>260nm</sub>). Las concentraciones se calcularon conociendo la Abs<sub>260 nm</sub> y teniendo en cuenta el factor de dilución, teniendo en cuenta que 1 unidad de Abs<sub>260 nm</sub> equivale a 50 ng/µg de ADN. También se cuantificaron muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa, comparando las intensidades observadas bajo luz

UV con las intensidades dadas por cantidades conocidas de ADN del marcador de peso molecular *1 kb DNA Ladder* (NewEngland Biolabs).

#### **j. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

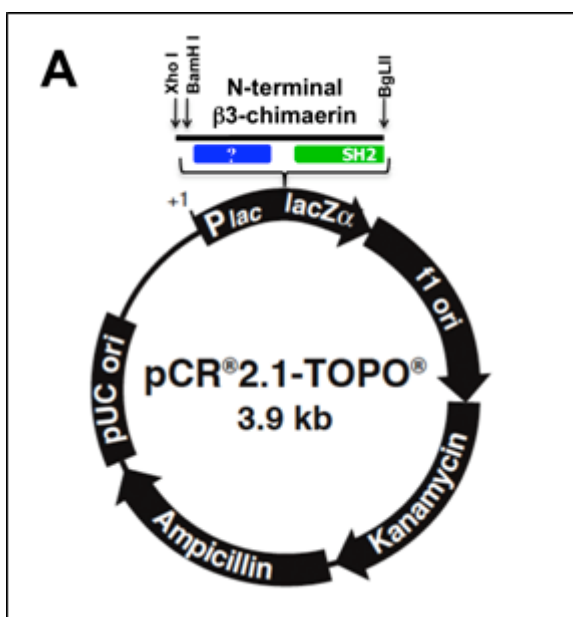
El análisis de ADN por digestión con enzimas de restricción se realizó en las condiciones de temperatura y salinidad indicadas por el manual del fabricante (New England Biolabs, Roche, Life Technologies). Se utilizaron las unidades enzimáticas y los buffers recomendados para cada enzima.

#### **k. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE 1X. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó bajo luz UV y se siguieron las instrucciones del fabricante.

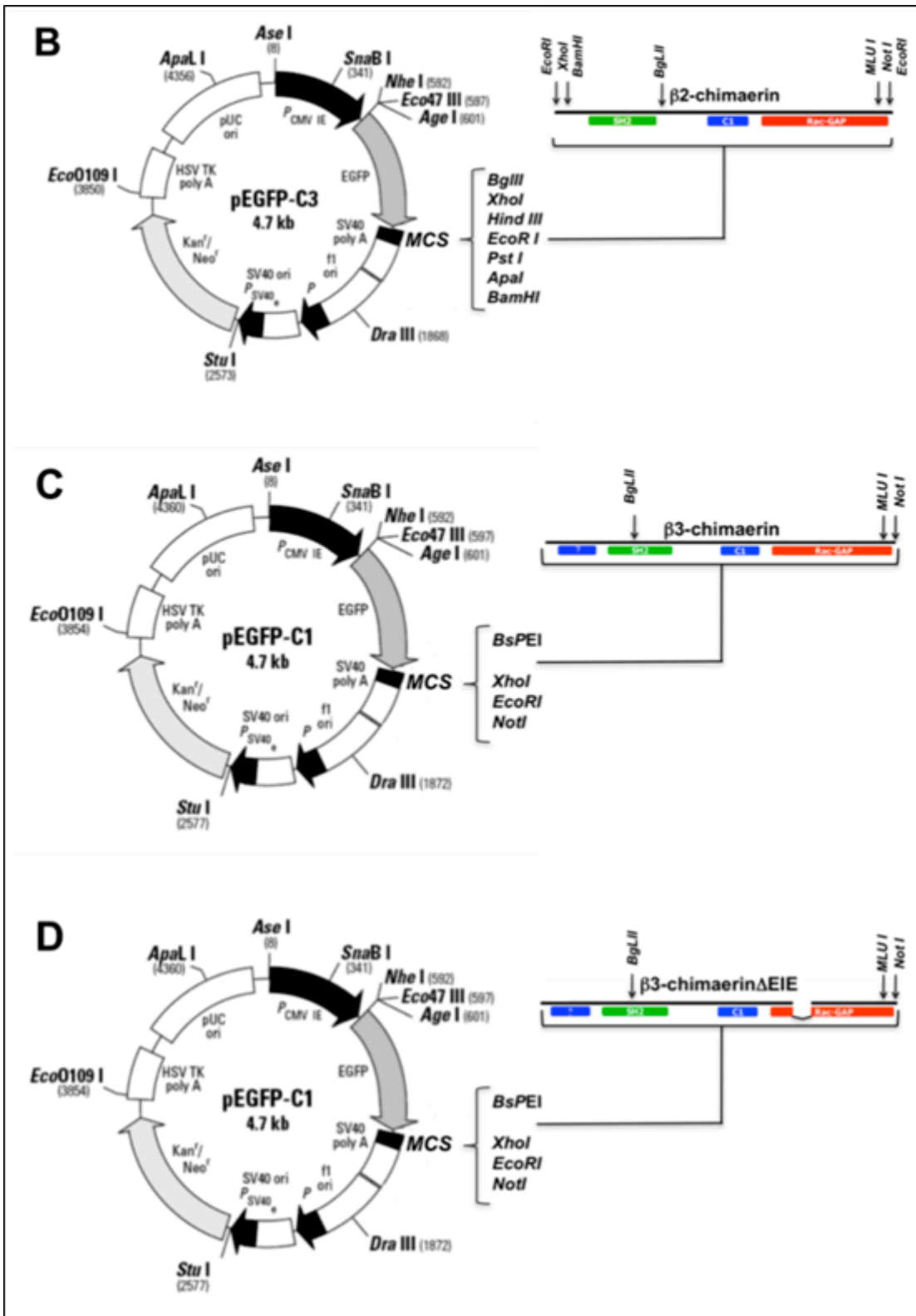
#### **l. Reacciones de ligación y transformación**

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo respetando una relación inserto:vector de 3:1, utilizando 30 ng de vector. Las reacciones se llevaron a cabo en 10  $\mu$ l de volumen final, utilizando 1 U de la enzima ADN ligasa del fago T4 (PROMEGA). Se incubó a 16°C durante toda la noche o a temperatura ambiente dos horas. Como control se incubó el vector con enzima y buffer, pero sin agregar inserto. Se transformaron bacterias competentes con 2  $\mu$ l de la reacción de ligación (con y sin ligasa), como ya fue descrito.

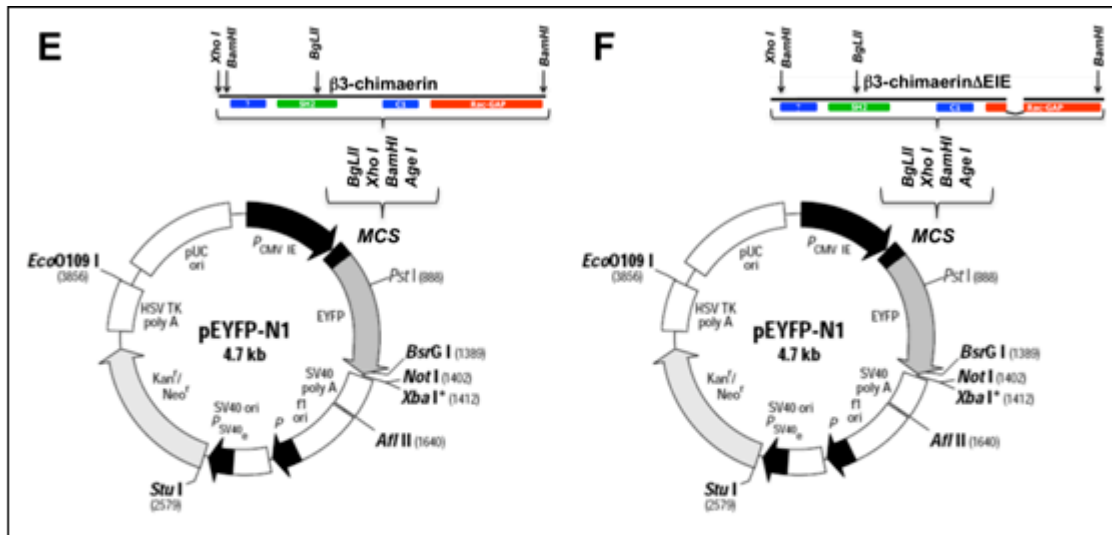


#### **j. Plásmidos**

Todos los plásmidos utilizados son variantes de los vectores pEGFP-C1, pEGFP-C, pEYFP-N1, y pCR2.1TOPO. Algunas versiones modificadas de estos plásmidos se utilizaron para transfectar transientemente células en cultivo.







**Figura 13:** Plásmidos generados y utilizados durante el trabajo; **A:** pCR2.1TOPO Nterminal|β3chimaerin; **B:** pGFP-C3-β2-chimaerin; **C:** pEGFP-C1-β3-chimaerin; **D:** pEGFP-β3-chimaerinΔEIE; **E:** pYFP-N1-β3-chimaerin; **F:** pYFP-β3-chimaerinΔEIE.

### Cultivo de bacterias:

#### a. Transformación de bacterias

Se transformaron bacterias competentes con diferentes plásmidos o productos de ligaciones. A 50  $\mu$ l de bacterias competentes se le agrega aproximadamente 1 ng de ADN plasmídico, o 2  $\mu$ l de reacción de ligación y se agita suavemente para mezclar. Se incuban 5 minutos en hielo y luego se procede con el golpe de calor incubando a 42°C por 45 segundos. Se deja 5 minutos en hielo y se agrega 0,9 ml de LB. Se incuba 1 hora a 37°C con agitación, luego se plaquea 100  $\mu$ l en placas de LB agar con ampicilina o kanamicina y se incuba toda la noche a 37°C. Se pican las colonias de interés y se crecen en 3 ml de medio líquido con antibiótico para preparación plasmídica.

#### Soluciones:

LB (1 litro): 0.5% p/v extracto levadura, 1% p/v bacto-triptona, 1% p/v NaCl

LB agar: LB + 1.5% p/v bactoagar

LB/ampicilina: 50  $\mu$ g/ml (tanto en medio sólido como líquido)

LB/kanamicina: 100  $\mu$ g/ml (tanto en medio sólido como líquido)

**Cultivo de células:****a. Líneas celulares**

COS-1: Células CV-1 que llevan integrada una copia de la región temprana del genoma del SV-40, (ATCC: CRL-1.650).

HEK-293-T: Células 293 (ATCC: CRL-1573), línea celular originada a partir de células epiteliales de riñón de embrión humano transformadas con el ADN del adenovirus humano tipo 5, que llevan integrada una copia de la región temprana de SV40.

HeLa: Línea celular derivada de un adenocarcinoma de cuello de útero de morfología epitelial. Llevan integradas secuencias de Virus del Papiloma humano 18 (HPV-18). (ATCC: CCL-2).

Estas células fueron crecidas en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO), 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina (Life Technologies).

**b. Transfecciones transientes**

Las transfecciones se llevaron a cabo en utilizando Lipofectamina (Lipofectamine 2000 Reagent Cat. No: 11668-019) y PEI Polyethylenimine, Linear (MW 25,000) (Polysciences Cat.No: 23966).

Las transfecciones transientes con Lipofectamina fueron realizadas en placas de 6 pocillos, con 200.000 células/pocillo. Se utilizaron entre 1,5  $\mu\text{g}$  y 3  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico por pocillo. El protocolo de transfección utilizado fue el recomendado por el fabricante.

Las transfecciones transientes con PEI fueron realizadas también en placas de 6 pocillos, con 200.000 células/pocillo. Se utilizaron 2  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico por pocillo.

Se siguió el siguiente protocolo de transfección:

- 1) Se mezclan los 2 $\mu\text{g}$  de DNA con 50  $\mu\text{l}$  de OPTIMEM. Mezclar bien.
- 2) La solución 1) se mezcla con 15  $\mu\text{l}$  de PEI (partiendo de una solución cuya concentración sea 1mg/ml). Mezclar bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- 3) Incubar durante 8 minutos.
- 4) Agregar 750  $\mu\text{l}$  de medio DMEM con 10% FCS sin antibióticos.
- 5) Poner la mezcla en contacto con las células.
- 6) Incubar durante 5 horas, agitando suavemente la placa cada 1 hora aproximadamente.
- 7) Lavar las células 2 veces con PBS.
- 8) Agregar 2ml de medio completo.

9) Incubar durante 48 horas.

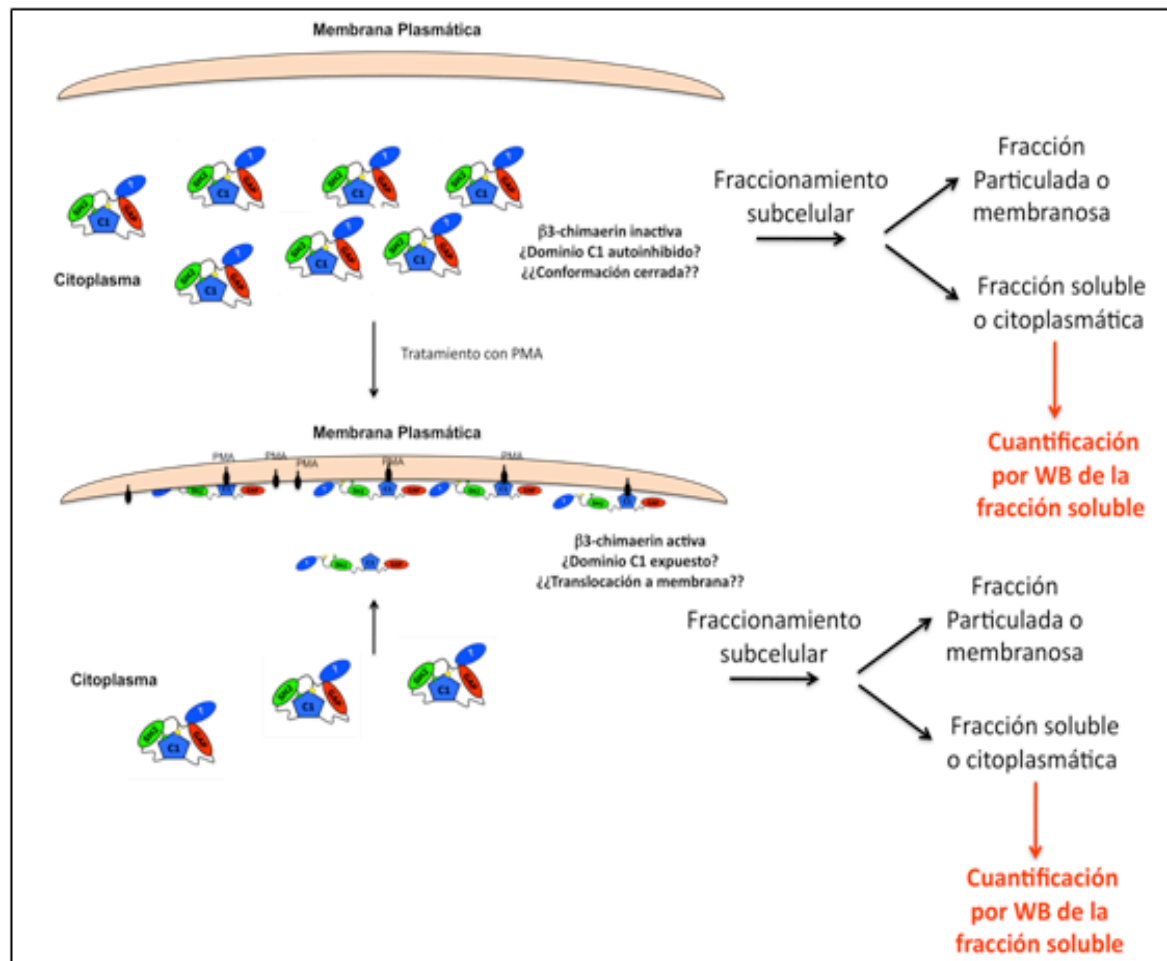
**c. Experimentos de translocación con células HeLa observados al microscopio de fluorescencia.**

Se plaquearon 130000 células de la línea celular HeLa por posillo en placas de 24 posillos. Se las transfeció con 0,2 µg de DNA/posillo y se utilizó 0,75 µl de lipofectamina/posillo. El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante.

Las muestras fueron incubadas durante 48 horas, luego tratadas con 5 mM del inhibidor de PKC GF109203X por 20 minutos, se las incubó con distintas concentraciones de PMA por 20 minutos. Las células fueron lavadas con PBS a 4°C y fueron fijadas (ver mas adelante).

**d. Fraccionamiento subcelular**

Las células fueron crecidas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar el 80-90% de confluencia. Luego fueron transfectadas con Lipofectamina o con PEI y se las incubó por 48 horas. Luego de tratarlas con 5 mM del inhibidor de PKC GF109203X por 20 minutos, se las incubo con distintas concentraciones de PMA por 20 minutos. Las células fueron lavadas con PBS a 4°C y mantenidas sobre hielo de aquí en adelante. Se colectaron las células con 200 µl de buffer (20 mM tris pH 7,5; 5 mM EGTA + inhibidores de proteasas). Las células fueron lisadas por sonicación, 3 veces por 10 segundos al 12% de amplitud. Posteriormente se centrifugaron los lisados por 5 min a 14000 X g a 4°. 150 µl fueron centrifugados por 30 minutos a 100.000 X g, el resto se conservó como fracción total. Se recuperó el sobrenadante (fracción soluble) y se resuspendió el *pellet* en 20 µl de buffer de siembra (fracción insoluble). A las fracciones total y soluble se le agregaron 20 y 30 µl de buffer de siembra respectivamente. Se procedió a resolver las distintas fracciones por PAGE-SDS.



**Figura 14:** Se esquematiza el ensayo de translocación y el posterior fraccionamiento subcelular. Luego se cuantifica por Western blot la relocalización de la proteína β3-chimaerin utilizando la fracción soluble. β3-chimaerin se esquematiza con cada uno de sus dominios funcionales, y con su extremo N-terminal novedoso cuya función es desconocida. Ensayos equivalentes se hicieron de forma simultánea con la proteína β2-chimaerin.

## Análisis de proteínas

### a. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron utilizando el sistema *Miniprotean* (Bio Rad). Se prepararon geles de 10 o 12% de acrilamida con SDS. Las muestras se incubaron a 95°C en buffer de siembra por 5 minutos. Los geles se corrieron a 100 v durante una hora utilizando marcadores de peso molecular (Bio Rad).

### b. Westerns blot

Las proteínas resueltas por PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de PVDF

(Millipore) mediante electrotransferencia utilizando el sistema *MiniProtean* (BioRad). Estas membranas se bloquearon por 2 horas en solución de bloqueo (1 g de leche en polvo en 20 ml de TTBS).

Se lavan con TTBS dos veces 5 minutos cada una y se agrega el primer anticuerpo 1:1.000 en TTBS leche (1 g de leche en polvo en 20 ml de TTBS) y se deja por 1 hora o toda la noche. Se hacen 3 lavados con TTBS de 5 minutos cada uno y se incuba con el segundo anticuerpo (1:10.000 en TBST leche) por 1 hora. Este anticuerpo reconoce la Fc (fracción constante) del primer anticuerpo tiene acoplado la proteína HRP (horse-radish peroxidase).

Se hacen 3 lavados con TBST de 15 minutos cada uno y se incuba con la solución de Quimioluminiscencia (ECL fabricado en nuestro laboratorio) por 1 minuto. Se expone con placa radiográfica.

Soluciones utilizadas en el revelado (ECL):

A) -100  $\mu$ l luminol (Conc. Final: 2,5 mM)

-44  $\mu$ l p-coumaric (Conc. Final: 400  $\mu$ M)

-1ml Tris-HCl 1M pH 8,5 (Final Conc: 100 mM)

-Llevar a 10 ml con H<sub>2</sub>O.

B) -6,1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Conc. Final 0,54 mM)

-1 ml Tris-HCl 1M pH 8,5 (100 mM)

-Llevar a 10 ml con H<sub>2</sub>O.

Se mezclan las soluciones A y B y se incuban las membranas por 1 minuto en la solución resultante.

**Anticuerpo primario:** anti-GFP (B-2) hecho en Ratón; Santa Cruz Biotechnology, Cat. No: sc-9996.

**Anticuerpo secundario:** Goat anti-Mouse, Santa Cruz Biotechnology Cat. No: sc-2005.

## Microscopía de Fluorescencia

### a. Preparación de muestras para microscopía

Las muestras transfectadas con los plásmidos pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin y pEGFP-C3- $\beta$ 2-chimaerin se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de otros 3 lavados con PBS, se tiñeron los núcleos con DAPI (Sigma) 10  $\mu$ g/ml en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente por triplicado y se montaron en PBS para su posterior observación.

***b. Microscopía y análisis de imagen***

Las muestras fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia convencional Olympus IX71, con platina motorizada para los ejes X,Y y un stage Prior Nano ScanZ para el eje Z utilizando objetivos de aire 20X, de inmersión en agua UApo/NA 1.15 y aceite PlanApo/NA 1.43. Las imágenes fueron adquiridas utilizando una cámara Hamammatsu Orca-ER mediante el software Andor IQ. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J 1.37v (Wayne Rasband, NIH, USA). El Software utilizado para generar las reconstrucciones tridimensionales y las imágenes deconvolucionadas es **Huygens Professional 3.5.0-1p released de Scientific Volume Imaging B.V;** <http://support.svi.nl/wiki/HuygensDeconvolution>.

## **IV-Resultados**

### Clonado Molecular de $\beta$ 3-chimaerin

Para llevar a cabo el clonado molecular de la nueva isoforma que denominamos  $\beta$ 3-chimaerin se debía identificar el marco de lectura abierto completo realizando el clonado *in silico* de la proteína. Esto es, buscar en las bases de datos públicas, reportes de secuencias relacionadas con la de  $\beta$ 2-chimaerin que codifique para un N-terminal mayor conteniendo el codón ATG inicial que determinase el marco de lectura abierto y un péptido completo.

Se hizo una búsqueda exhaustiva en las bases de datos de EST humanos del NCBI de secuencias que se apareen parcialmente con el ARNm de  $\beta$ 2-chimaerin utilizando el programa BLAST.

EST beta2-chimaerin	GCAGAACTCGAGCCTTTAAGCGCTCCTTAGGCTCACATGACCCAGACCCACAGGGCAA
EST beta2-chimaerin	AAGTGCCTCGTCTGTCCCAACCTCCTGGTCCCGGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGC
EST beta2-chimaerin	TTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCA
EST beta2-chimaerin	TCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGCAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAGT
EST beta2-chimaerin	GGTGTGATTTCCCACTGTTTAAAAAGGCAACACACAGTTTCGCTGATGGTCTACATTCAG
EST beta2-chimaerin	GTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGTT GGTGTCTCCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGTT *****
EST beta2-chimaerin	ACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGAGGTGGAAAAACAGACC ACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGAGGTGGAAAAACAGACC *****
EST beta2-chimaerin	AAAAATTTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGCCGGATGAGCTTCT AAAAATTTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGCCGGATGAGCTTCT *****
EST beta2-chimaerin	TGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACAC TGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACAC *****
EST beta2-chimaerin	GCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAACTACAGGCTCTTTCACGACGGGAAACA GCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAACTACAGGCTCTTTCACGACGGGAAACA *****
EST beta2-chimaerin	CTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGATTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAAC
EST beta2-chimaerin	ACTGTACATAGAAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCAAAAATGACAACAAACCCCATCTA
EST beta2-chimaerin	TGAACACATTGGATATGCCACCCTACTCAGAGAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTC

**Figura 15:** Alineación uno de los EST encontrados provenientes de amígdala humana y parte de la secuencia codificante del ARNm de  $\beta$ 2-chimaerin. Se resalta en gris el ATG inicial y la secuencia codificante del extremo N-terminal considerablemente mayor contenida en el EST.



Se encontraron dos EST correspondientes a ARN mensajeros que mostraban un apareamiento base a base con  $\beta 2$ -chimaerin pero que diferían en sus extremos 5'. Estas secuencias provenían de Amígdala, órgano que forma parte del sistema límbico involucrado en variadas funciones cerebrales, incluyendo el aprendizaje y la memoria, además es parte del sistema que procesa lo relacionado a las emociones reflexivas como el miedo y la ansiedad.

Estos dos EST presentan una alta identidad de secuencia con la del ARNm de  $\beta 2$ -chimaerin, pero con un extremo 5' considerablemente mayor (**Figura 15**). Además ambos poseen el ATG inicial que determina un marco de lectura abierto. Traduciendo esta secuencia utilizando el código genético pudimos obtener la secuencia primaria del extremo N-terminal de  $\beta 3$ -chimaerin (**Figura 16**).

1 - GCAGAACTCGAGCCTTTAAGCGCTCCTCTAGGCTCACATGACCCAGACCCACAGGGCAA - 60	
1 -	M T Q T H R A K - 8
61 - AAGTGCCTCGTTCGTCCTCCCAACCTCCTGGTCCCGGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGC - 120	
9 - S A S S C P N L L V P E T W P H Q V S A - 28	
121 - TTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGGAAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCA - 180	
29 - S H A G R S K Q P Q G G I L K I N E E H - 48	
181 - TCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGCAAGCCAGGATTTACATTTGGAAGCGGAGT - 240	
49 - R R G A I Q D L L A S P G F T F G K R V - 68	
241 - GGTGTTGATTCCCACTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGGCTGATGGTCTACATCCAG - 300	
69 - V F D S H C L K R Q H T F A D G L H S S - 88	
301 - CTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGTT - 360	
89 - C T S D A E E Y Q P P I W K S Y L Y Q L - 108	
361 - ACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTTGTCCTCGGGAGGTGGAACAGACC - 420	
109 - Q Q E A P R P K R I I C P R E V E N R P - 128	
421 - AAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCT - 480	
129 - K Y Y G R E F H G I I S R E Q A D E L L - 148	
481 - TGGAGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACAC - 540	
149 - G G V E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y T - 168	
541 - GCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTTCACGACGGGAACA - 600	
169 - L A L R F G N Q T L N Y R L F H D G K X - 188	
601 - - 600	
189 -	- 208

**Figura 16:** Se muestra uno de los EST encontrados en amígdala cerebral. Fue traducido utilizando el código genético, de esta forma se observó que codificaba un extremo N-terminal considerablemente mayor desconocido en la familia de las quimerinas.

A partir de esta información, se dedujo la secuencia codificante completa de  $\beta 3$ -chimaerin (**Figura 17**). Ésta posee 1632pb y codifica para una proteína de 543 aminoácidos de un peso aproximado de 60 KDa. Este tamaño coincide con el visto en los Western blots mostrados en la parte introductoria (**Figuras 10 y 11**). En ellos se analizaba la expresión de diferentes isoformas de quimerinas en diferentes tejidos murinos y en líneas celulares de uso corriente en el laboratorio. Fue en estos experimentos donde por primera vez se observó una quimerina de un peso de 60 KDa. Esto indicaría que el ATG identificado como el inicial sobre los EST es el correcto.

```

1 - ATGACCCAGACCCACAGGGCAAAAAGTGCCTCGTGTGTCCTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAA - 60
1 - M T Q T H R A K S A S S C P N L L V P E - 20

61 - ACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGA - 120
21 - T W P H Q V S A S H A G R S K Q P Q G G - 40

121 - ATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGGCGGGGTGCCATTGAGACTTACTTGCAAGCCCA - 180
41 - I L K I N E E H R R R G A I Q D L L A S P - 60

181 - GGATTACATTTGAAAAGCAGTGGTGTGTTGATTCCCACTGTTTAAAAAGGCAACACAG - 240
61 - G F T F G K R V V F D S H C L K R Q H T - 80

241 - TTCGCTGATGGTCTACATTCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCCTCCTATA - 300
81 - F A D G L H S S C T S D A E E Y Q P P I - 100

301 - TGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGT - 360
101 - W K S Y L Y Q L Q Q E A P R P K R I I C - 120

361 - CCTCGGGAGGTGAAAACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCT - 420
121 - P R E V E N R P K Y Y G R E F H G I I S - 140

421 - CGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGC - 480
141 - R E Q A D E L L G G V E G A Y I L R E S - 160

481 - CAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACAGACCTTAAACTAC - 540
161 - Q R Q P G C Y T L A L R F G N Q T L N Y - 180

541 - AGGCTCTTCCACGACGGAAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGATTCATGAT - 600
181 - R L F H D G K H F V G E K R F E S I H D - 200

601 - CTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTCA - 660
201 - L V T D G L I T L Y I E T K A A E Y I S - 220

661 - AAAATGACAACTAACCCCATCTATGAACACATTGGATATGCCACCCTACTCAGAGAAAAA - 720
221 - K M T T N P I Y E H I G Y A T L L R E K - 240

721 - GTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTCTAAAAATGAACCAAGAAAACAAAACGTCACACATGAA - 780
241 - V S R R L S R S K N E P R K T N V T H E - 260

781 - GAACACACAGCGGTGAAAAGATCTCCTCCCTGGTTCGAAGGGCTGCCCTCACACACAAC - 840
261 - E H T A V E K I S S L V R R A A L T H N - 280

841 - GACAACCCTTCAATTATGAGAAGACACAACTTTAAGGTCCACACGTTCCGAGGCCCA - 900
281 - D N H F N Y E K T H N F K V H T F R G P - 300

901 - CACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTGATGTTGGGGCTCATCGCCCAAGGGTCCGGTGC - 960
301 - H W C E Y C A N F M W G L I A Q G V R C - 320

961 - TCAGACTGTGGATTGAACGTACACAACAGTGTTCGAAGCAGTTCCCAATGACTGCCAA - 1020
321 - S D C G L N V H K Q C S K H V P N D C Q - 340

1021 - CCTGATCTCAGAGGATCAAGAAAGTGTACTGTTGTGACCTCACAACACTTGTGAAGGCT - 1080
341 - P D L K R I K K V Y C C D L T T L V K A - 360

1081 - CACAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATATGCATTCCGGAAATTGAAGCAAGAGGA - 1140
361 - H N T Q R P M V V D I C I R E I E A R G - 380

1141 - TTTAAATCGGAAGGCCCTTACAGAGTCTCTGGGTTCACTGAACACATTGAAGATGTCAA - 1200
381 - L K S E G L Y R V S G F T E H I E D V K - 400

1201 - ATGGCATTGACAGAGATGGTGAAGGCCGATATATCTGCCAATGCTATCCAGACATA - 1260
401 - M A F D R D G E K A D I S A N V Y P D I - 420

1261 - AACATCATCACTGGAGCCCTTAAACTGTATTTCAGAGACTTACCCATCCCTGTATCACA - 1320
421 - N I I T G A L K L Y F R D L P I P V I T - 440

1321 - TATGATACCTATCCAAATTTATAGATGACGAAAAATCTCCAATGAGATGAGAGGCTG - 1380
441 - Y D T Y S K F I D A A K I S N A D E R L - 460

1381 - GAAGCCGTCATGAAGTGCCTGATGCTGCTGCTCCTGCCACTATGAAACCCCTCCGGTAC - 1440
461 - E A V H E V L M L L P P A H Y E T L R Y - 480

1441 - CTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAATGAAAAGACAATTCATGAATGCAGAA - 1500
481 - L M I H L K K V T M N E K D N F M N A E - 500

1501 - AATCTGGGGATCGTGTGGGCCCACTCTGATGAGGCCCCCTGAGGACAGCACCCGTACC - 1560
501 - N L G I V F G P T L M R P P E D S T L T - 520

1561 - ACCCTGCATGATATCGGGTACAAAAGCTGATTGTGAGATTTAATAGAAAACGAAGAC - 1620
521 - T L H D M R Y Q K L I V Q I L I E N E D - 540

1621 - GTTTATTCTAA - 1632
541 - V L F * X - 560

```

Figura 17: Marco de lectura abierto completo o secuencia codificante de  $\beta$ 3-chimaerin. Se puede observar además su secuencia aminoacídica.

Si se comparan las secuencias aminoacídicas de  $\beta$ 2-chimaerin y de  $\beta$ 3-chimaerin la diferencia principal entre ambas proteínas reside en su extremo N-terminal, el cual en el caso de la segunda es 90 aminoácidos mas grande. Ambas isoformas poseen los dominios SH2, C1 y GAP (**Figura 18**).

El extremo N-terminal de  $\beta$ 2-chimaerin, como se vió en la parte introductoria, cumple un papel central en el mecanismo de autoinhibición según lo descrito anteriormente (37). Siendo el extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin considerablemente mayor, esto podría influir en la regulación y la unión de DAG por esta nueva isoforma.

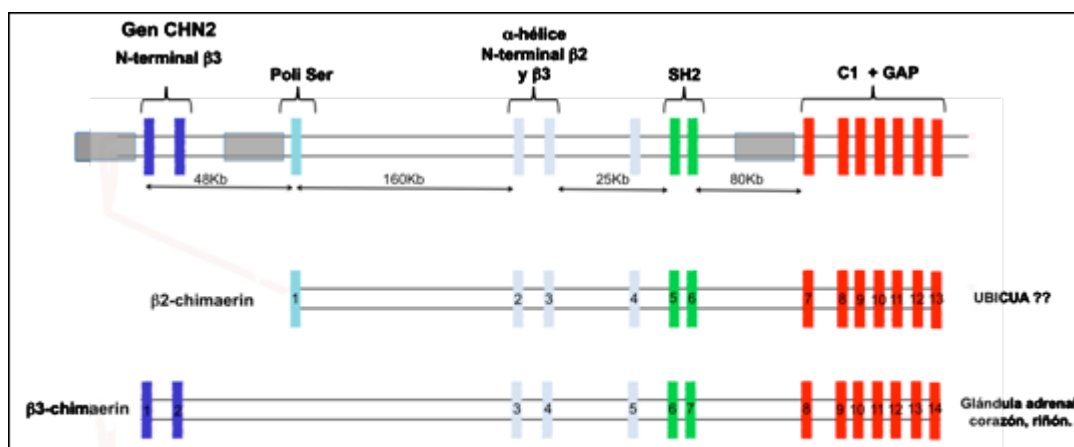
beta3-chim	MTQTRAKSASSSCP <del>NLLV</del> PETWPHQVSASHAGRSKQPQGGILKINEE <del>HRRGAIQDLL</del> ASP
beta2-chim	
beta3-chim	GFTFGKRVVFD <del>SHCLKRQHTFADGLHSSCTS</del> DAEEYQPP <del>IIWKS</del> SYLYQLQ <del>QEA</del> PRPKRIIC
beta2-chim	MRLSSLSGSSVSSDAEEYQPP <del>IIWKS</del> SYLYQLQ <del>QEA</del> PRPKRIIC
beta3-chim	PREVENRPKYGR <del>EFHGIISREQA</del> DELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQT <del>LN</del> Y
beta2-chim	PREVENRPKYGR <del>EFHGIISREQA</del> DELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQT <del>LN</del> Y
beta3-chim	RLFHDGKHFVGEKRFESIHDLVTDGLITLYIETKALEYISKMTNPIYEHIGYATLLREK
beta2-chim	RLFHDGKHFVGEKRFESIHDLVTDGLITLYIETKALEYISKMTNPIYEHIGYATLLREK
beta3-chim	VSRRLSRSKNEPRKTNVTHEEHTAVEKISSLVRAAL <del>THNDNHFNYEKTHNFKVHTFRGP</del>
beta2-chim	VSRRLSRSKNEPRKTNVTHEEHTAVEKISSLVRAAL <del>THNDNHFNYEKTHNFKVHTFRGP</del>
beta3-chim	HWCEYCANFMWGLIAQGVRCSDCGLNVH <del>KQCSKHVP</del> NDCQ <del>PD</del> LKRIKKVYCCDLTTLVKA
beta2-chim	HWCEYCANFMWGLIAQGVRCSDCGLNVH <del>KQCSKHVP</del> NDCQ <del>PD</del> LKRIKKVYCCDLTTLVKA
beta3-chim	HNTQIPMVVDICIREIEARGLKSEGLYRVSGFTEHIEDVKMAFDRDGEKADISANVYPDI
beta2-chim	HNTQIPMVVDICIREIEARGLKSEGLYRVSGFTEHIEDVKMAFDRDGEKADISANVYPDI
beta3-chim	NIITGALKLYFRDLPIPVITYDTYSKFI <del>DAAKISNADERLEAVHEVLM</del> LPPAHYETLRY
beta2-chim	NIITGALKLYFRDLPIPVITYDTYSKFI <del>DAAKISNADERLEAVHEVLM</del> LPPAHYETLRY
beta3-chim	LMIHLK <del>KKVTMNEKDNFMNAENLGIVFGPTLMR</del> PEISTLTTLLHDMRYQKLI <del>VQ</del> ILIED
beta2-chim	LMIHLK <del>KKVTMNEKDNFMNAENLGIVFGPTLMR</del> PEISTLTTLLHDMRYQKLI <del>VQ</del> ILIED
beta3-chim	VLF
beta2-chim	VLF
	***

**Figura 18:** Alineación de la secuencias aminoacídicas de  $\beta$ 2-chimaerin y  $\beta$ 3-chimaerin. En rojo los 90 aminoácidos N-terminales exclusivos de  $\beta$ 3-chimaerin. Verde: Dominio SH2. Azul: Dominio C1. Rojo: Dominio de GAP.

Una vez deducida la secuencia codificante completa de  $\beta$ 3-chimaerin, se completó el análisis genómico presentado en la introducción (**Figura 12**). Se identificaron los dos exones que codificaban para el extremo N-terminal de esta nueva isoforma.

Estos exones se encuentran aproximadamente 48 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de  $\beta$ 2-chimaerin.

Utilizando el programa BLAST en la página del NCBI se comparó la secuencia de los EST provenientes de amígdala con la base de datos de secuencias genómicas humanas disponibles en el mismo sitio web. Se observó que el ATG identificado como el inicial sobre la secuencia de los EST provenientes de amígdala cerebral estaba presente en el genoma en el cromosoma 7, aproximadamente 48Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de  $\beta 2$ -chimaerin y río abajo de secuencias promotoras. Este ATG indica el comienzo del marco de lectura abierto de  $\beta 3$ -chimaerin (**Figura 19**). Recientemente, se reportó en GenBank una secuencia proveniente de amígdala cerebral que codifica un marco de lectura abierto idéntico al que nosotros dedujimos para  $\beta 3$ -chimaerin (ver **Anexo**). Esta secuencia, corresponde a uno de los clones reportados como EST (ver **Anexo**). En este caso el ARNm fue secuenciado casi completamente, mientras que el caso de los EST se secuenciaron solo las primeras 700 pb aproximadamente.



**Figura 19:** Diagrama del gen CHN2. Se muestra la disposición genómica de los exones que codifican para los mensajeros de las isoformas  $\beta 2$  y  $\beta 3$ . En azul oscuro se observan los dos exones novedosos completos que son los que generan este extremo N-terminal que queremos describir funcionalmente. Las cajas grises simbolizan las secuencias promotoras.

#### -Diseño de primers

Conociendo el marco de lectura abierto completo de  $\beta 3$ -chimaerin se diseñaron primers para amplificar por PCR la secuencia codificante de esta nueva isoforma.

El diseño de los primers para amplificar el ORF (*Open Reading Frame*) de  $\beta 3$ -chimaerin se llevó a cabo utilizando el programa **Primer3** presente en la página [www.justbio.com](http://www.justbio.com). Como primer *reverse* o 3' (**Primer 5** ver **Figura 21**), se utilizó el mismo que se empleó para amplificar la secuencia codificante de  $\beta 2$ -chimaerin (7), que posee dos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción MluI y NotI, que ayudarían en el subclonado posterior del cDNA amplificado. El primer *forward* fue el sugerido por el programa **Primer3**.

Este programa permite ingresar la secuencia que se desea amplificar, y establecer algunos parámetros básicos del primer; por ejemplo: la temperatura de *melting* óptima que se necesita que tenga el oligonucleótido para realizar la PCR, el porcentaje de GC, el tamaño, y el grado de autocomplementariedad permitido. También es posible ingresar la secuencia de uno de los primers, como en nuestro caso, para que el programa calcule el restante teniendo en cuenta las características del primero.

Se estableció que la temperatura de *melting* óptima para el primer forward estuviese entre 57 y 58 °C, que el % de GC esté entre 40 y 60%, y la autocomplementariedad sea mínima. También se prestó especial atención a que el extremo 3' haya una guanina o una citosina para lograr una mayor eficiencia. Se le indicó al programa que el primer debía hibridar en el sitio de inicio de la traducción, para que la amplificación contenga desde el primer codón ATG en adelante.

Se obtuvo una secuencia a la que se le adicionaron sitios de reconocimiento para dos enzimas de restricción, XhoI y BamHI. Los primers utilizados para la amplificación por PCR de  $\beta$ 3-chimaerin son los siguientes:



**Figura 20:** Primers diseñados para amplificar mediante un ensayo de PCR la secuencia codificante completa de  $\beta$ 3-chimaerin.

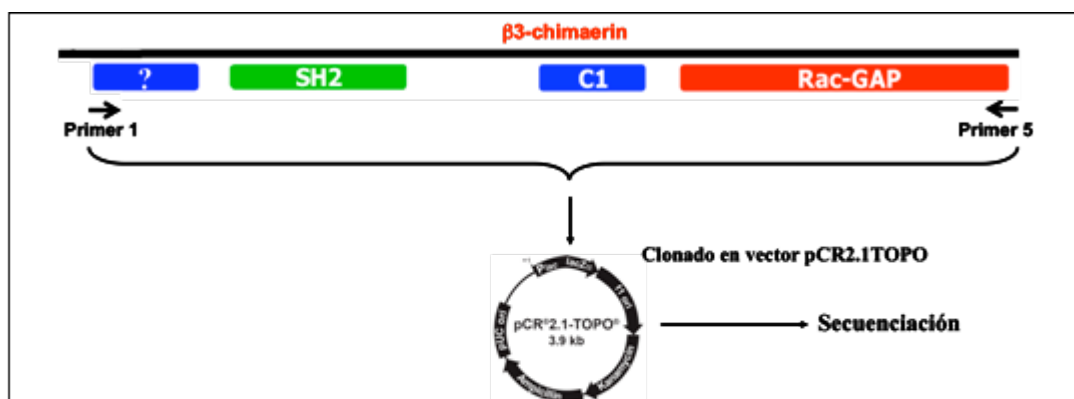
Ambos primers poseen dos sitios para enzimas de restricción, que permitirían subclonar la secuencia amplificada de  $\beta$ 3-chimaerin de manera direccional en una cantidad considerable de vectores de expresión. En particular nos interesó generar proteínas de fusión a GFP (*Green Fluorescent Protein*) y a YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). Se utilizó como control positivo de la reacción de PCR un par de primers que hibridaban específicamente con el ARNm de actina que dan como resultado un producto de PCR de 444 pb. Este control además funcionó como un control de la integridad del cDNA que se estaba utilizando como templado en cada caso.

#### *-Estrategia de clonado*

Para el clonado del cDNA de  $\beta$ 3-chimaerin se buscó amplificar por PCR el ORF completo, y posteriormente subclonar el producto de PCR en el vector pCR2.1TOPO (**Figura 21**). Este vector es una herramienta muy útil a la hora de clonar productos de PCR amplificados por la enzima *Taq* polimerasa, ya que no es necesario atravesar por

pasos de digestión con enzimas de restricción y posteriores ligaciones las cuales frecuentemente poseen bajas eficiencias. La estrategia requiere de un solo paso de clonado, que en este caso demandó un tiempo de sólo 30 minutos (**Materiales y Métodos**).

Con el producto de reacción entre el fragmento amplificado y el vector pCR2.1TOPO se transforman bacterias, luego se hace un análisis por ensayos de restricción, los clones positivos se mandan a secuenciar.



**Figura 21: Estrategia inicial de clonado del cDNA de  $\beta 3$ -chimaerin.** Representación de la secuencia codificante de la proteína  $\beta 3$ -chimaerin, incluyendo cada uno de sus dominios. Se incluye en el esquema el nuevo extremo N-terminal que podría conformar un dominio desconocido. Se muestran los primers utilizados para amplificar su cDNA.

#### -Amplificación de $\beta 3$ -chimaerin por PCR

En el Western blot de la **Figura 10** mostrado en la introducción, se había observado que en tres tipos de tejidos de ratón se evidenciaba la presencia de una quimerina de un peso molecular mayor; estos tejidos eran corazón, glándula adrenal y riñón. Además, analizando la expresión de quimerinas en diferentes líneas celulares, también pudo observarse la presencia de una proteína de aproximadamente 60 KDa en células de neuroblastoma murino, y en células de neuroblastoma humano (**Figura 11**). Por otro lado, los EST que permitieron deducir la secuencia codificante completa de  $\beta 3$ -chimaerin provenían de tejidos renales y de un tejido nervioso como es la amígdala cerebral.

En resumen, los EST y los Western blots de las **Figuras 10 y 11** indicaban que el mensajero de  $\beta 3$ -chimaerin podía encontrarse en tejidos renales, en glándula adrenal, en algún tipo de tejido nervioso, y en corazón.

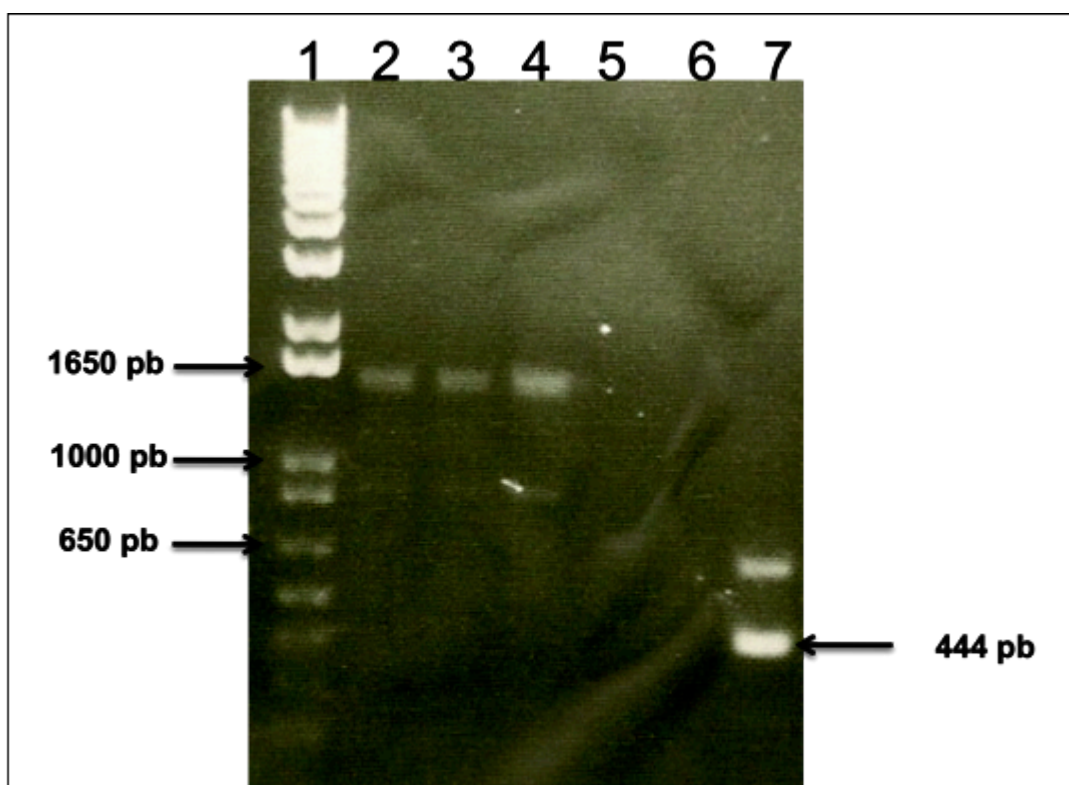
Como primera estrategia para amplificar la secuencia codificante de  $\beta 3$ -chimaerin se utilizó la técnica de rtPCR. Se partió de RNA total purificado de un lisado de células de riñón embrionarias humana HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) y se sintetizó el cDNA que luego se usó como templado (**Materiales y Métodos**).



La elección de esta línea celular se basó en la expresión de  $\beta 3$  en riñón, sumado a la disponibilidad que se tenía de la misma en nuestro laboratorio.

Los primers empleados son los mostrados anteriormente en la **Figuras 20 y 21 (Primers 1 y 5)**. Las condiciones, la cantidad y tipo de reactivos, y el programa utilizados para llevar a cabo el experimento de PCR pueden verse en la parte de **Materiales y Métodos**.

El resultado de la amplificación fue sembrado en un gel de agarosa 0,9% con el que luego se efectuó una electroforesis. La imagen de la misma se muestra en la **Figura 22**.

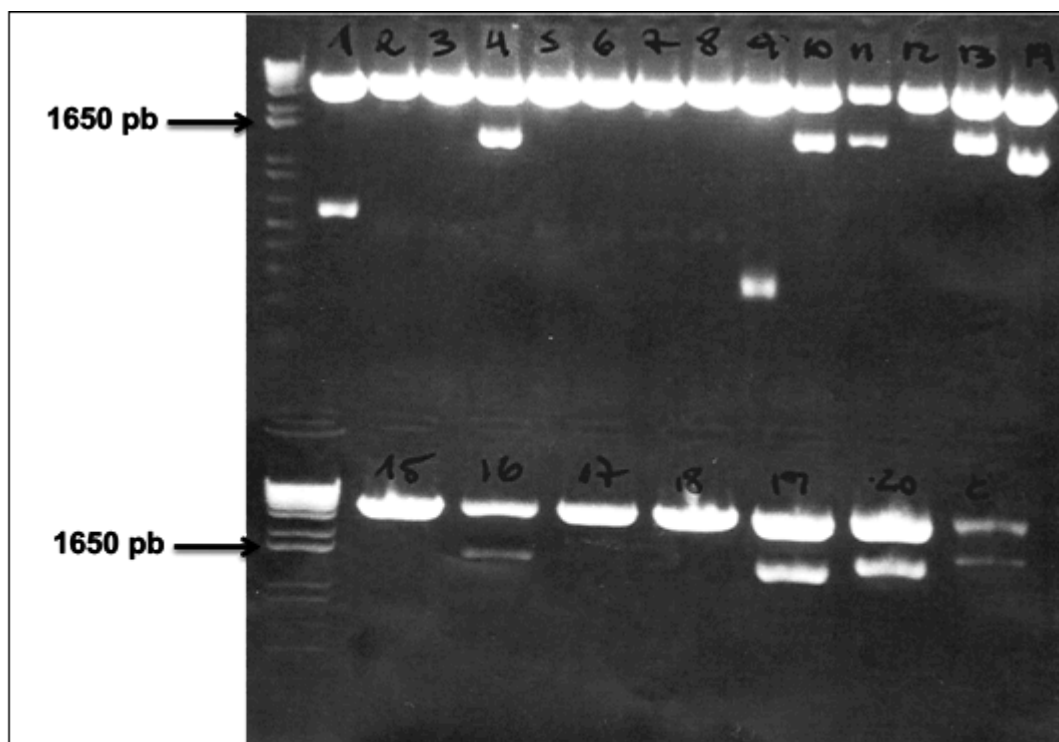


**Figura 22:** Electroforesis en gel de agarosa 0,9% del producto de PCR utilizando como primers: en las calles 2, 3 y 4, Primer 1 y Primer 5; calle 7: primers control específicos de  $\alpha 1$  actina. Calle 1: marcador de peso molecular; calles 5 y 6: controles negativos.

De acuerdo a los primers diseñados la secuencia amplificada debía tener un tamaño de 1660 pb. En las calles 2, 3 y 4 de la **Figura 22** se observa una banda correspondiente a un tamaño aproximado pero levemente menor (ver más adelante). En los tres casos se utilizó como templado cDNA de células HEK-293 solo que las cantidades que se agregaron en la mezcla de reacción fueron 1, 2 y 4  $\mu$ l de cDNA respectivamente.

Las bandas fueron extraídas del gel y purificadas por columnas (ver **Materiales y Métodos**). Posteriormente, se siguió adelante con la estrategia de clonado ya descrita y se subclonó el producto de la PCR en el vector pCR2.1.

El producto de ligación entre el vector y el producto de amplificación se utilizó para transformar una suspensión bacteriana que luego fue sembrada en una placa de Petri. De esta placa se picaron 20 clones distintos a partir de los cuales se hizo un análisis por ensayos de restricción. Mediante la digestión del pCR2.1 con la enzima de restricción EcoRI se libera el inserto, ya que existe un sitio de reconocimiento a cada lado del sitio de inserción de la secuencia subclonada. El producto de la digestión de los 20 clones se lo corrió en una electroforesis en gel de agarosa 0,9%, el resultado se muestra en la **Figura 23**.



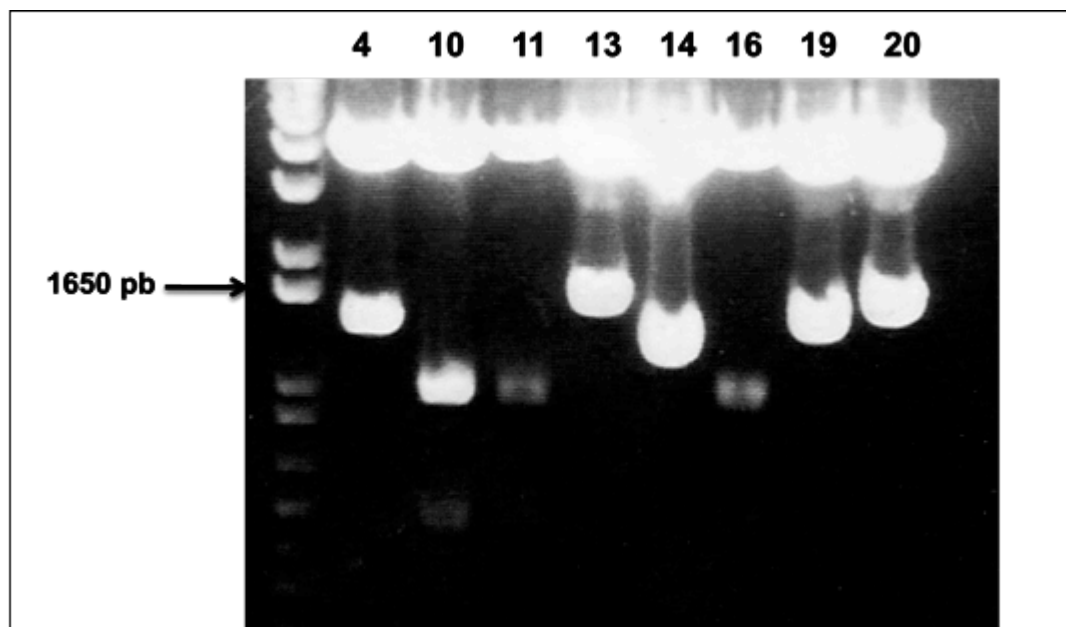
**Figura 23:** Electroforesis en gel de agarosa 0,9% que muestra el ensayo de restricción llevado a cabo con 20 clones distintos. El vector pCR2.1TOPO se digirió con la enzima de restricción EcoRI. Inmediatamente por debajo del origen de siembra se indica a que número de clon que se sembró en cada calle. En la última calle de la parte inferior del gel, yendo de izquierda a derecha, se sembró un plásmido control que al ser digerido con EcoRI libera un fragmento de 1700pb.

Por el tamaño del fragmento liberado, se consideró positivos a los clones 4, 10, 11, 13, 14, 16, 19, y 20. Para elegir cuales eran los clones que se iban a mandar a secuenciar, se decidió hacer un nuevo ensayo de restricción pero esta vez con otras dos enzimas cuyos sitios de reconocimiento estaban presentes uno en cada extremo del cDNA clonado (**Figura 20**). Se digirieron con BamHI y NotI todos los clones que habían mostrado ser positivos en la digestión con EcoRI (**Figura 24**).

Para secuenciar se escogieron los clones 4, 13, 19 y 20 (**Materiales y Métodos**). Los clones 4 y 20 fueron positivos. Dado que la orientación del inserto es al azar, en el último, el producto de PCR se había insertado en el sentido contrario al primer de



secuenciación. Para secuenciar se utilizó el primer T7, que hibrida en uno de los extremos del sitio múltiple de clonado. Por lo tanto, para el clon 20, la parte secuenciada del cDNA de  $\beta$ 3-chimaerin fueron 600pb aproximadamente de su extremo 3'.



**Figura 24:** Electroforesis en gel de agarosa 0,9% que muestra el ensayo de restricción llevado a cabo con 8 clones seleccionados a partir del ensayo de restricción mostrado en la **Figura 23**. El vector pCR2.1TOPO se digirió en este caso con las enzimas BamHI y NotI. Sobre sobre la parte superior del gel se indica que clon se sembró en cada calle.

La secuenciación del clon número 4 arrojó un resultado inesperado. La secuencia era parcialmente complementaria a la secuencia codificante obtenida *in silico* de  $\beta$ 3-chimaerin. Faltaba una parte de la secuencia que generaba una brecha en la alineación, que hacía que el clon 4 codificara un mensajero aberrante, pues se generaba un codón Stop en medio del ORF quedando trunca la secuencia aminoacídica (**Figura 25**). Esto creemos que se trata de una variante de splicing que da como resultado un mensajero incompleto al cual le falta el segundo exón correspondiente  $\beta$ 3-chimaerin. Por este motivo las bandas que se observan en las calles 2, 3 y 4 de la **Figura 22** no tienen exactamente el tamaño esperado, en realidad tienen 112 pb menos, que es el tamaño aproximado del segundo exón.

Haber clonado una variante aberrante el ARNm de  $\beta$ 3-chimaerin, a pesar de ser un resultado negativo, no supuso un replanteo de la primera hipótesis del trabajo, que es la existencia de una nueva isoforma de la familia de las quimerinas. Que se exprese este mensajero en células HEK-293 implica la existencia de secuencias promotoras funcionales río arriba del sitio de inicio de la transcripción de  $\beta$ 3-chimaerin. Esto reafirmaba nuestra hipótesis principal, además hay que tener en cuenta que el cDNA

proveniente de células HEK-293 era el único que habíamos utilizado como templado hasta el momento.

Clon4 beta3-chimaerin	ATGACCCAGACCCACAGGGCAAAAAGTGCCTGCTCGTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAA ATGACCCAGACCCACAGGGCAAAAAGTGCCTGCTCGTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAA *****
Clon4 beta3-chimaerin	ACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGA ACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGA *****
Clon4 beta3-chimaerin	ATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGGCGGGGTGCCATTTCAG----- ATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGCAAGCCA *****
Clon4 beta3-chimaerin	----- GGATTTACATTTGGAAGCGAGTGGTGTGATTCCCACTGTTTAAAAAGGCAACACAGC
Clon4 beta3-chimaerin	-----ATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATA TTGCTGATGCTCTACATCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATA *****
Clon4 beta3-chimaerin	TGGAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGT TGGAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGT *****
Clon4 beta3-chimaerin	CCTCGGAGGTGGAACACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCT CCTCGGAGGTGGAACACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCT *****
Clon4 beta3-chimaerin	CGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAGC CGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAGC *****
Clon4 beta3-chimaerin	CAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTAC CAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTAC *****
Clon4 beta3-chimaerin	AGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGATTTCATGAT AGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGATTTCATGAT *****
Clon4 beta3-chimaerin	CTGGTGACAGATGGCTTGATAAACAAGCTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTCA CTGGTGACAGATGGCTTGATAAACAAGCTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTCA *****

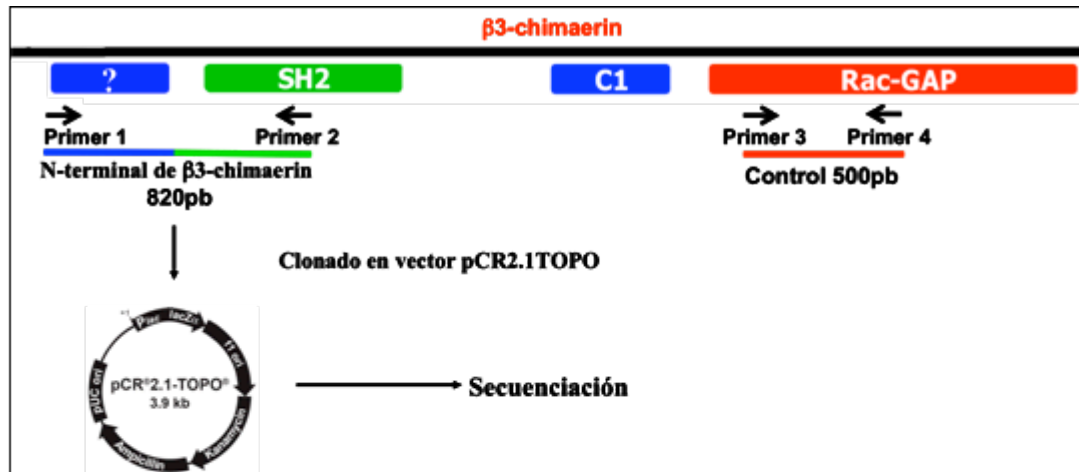
**Figura 25:** Alineación entre el Clon 4 y parte de la secuencia de  $\beta 3$ -chimaerin desde el primer ATG. El Clon 4 es una variante de splicing aberrante que carece del segundo exón. Esto genera un codón STOP que hace inviable cualquier tipo de proteína a partir de este ARNm defectuoso.

A partir de este resultado se decidió utilizar otros templados para amplificar la secuencia codificante de  $\beta 3$ -chimaerin. Además, se cambió la estrategia de clonado. La amplificación obtenida en la PCR de la **Figura 22** muestra bandas de una intensidad bastante baja. El **primer 5** posee muchas A y T, y una temperatura de *melting* de 54°C que se encuentra por debajo de lo aconsejable. Esto dificultaba la obtención de una amplificación significativa que se visualice como bandas intensas en los geles de agarosa.

El cambio de estrategia consistió en diseñar un primer interno (**Materiales y Métodos**) que hibride aproximadamente en la mitad del mensajero de  $\beta 3$ -chimaerin. De esta forma, se podrían amplificar 821pb contando desde el ATG que da inicio al marco de

lectura abierto. Esto nos permitiría diferenciar mejor entre variantes con y sin el exón 2, dado que es mas factible resolver en gel de agarosa bandas de 821 y 709 pb.

Este primer (**primer 2 en la Figura 26**) hibrida sobre un sitio de restricción específico para la enzima BgIII, presente en la secuencia de  $\beta$ 3-chimaerin y de  $\beta$ 2-chimaerin.



**Figura 26:** Representación de la secuencia codificante de la proteína  $\beta$ 3-chimaerin, incluyendo cada uno de sus dominios. Como parte de la nueva estrategia de clonado se diseñó el **Primer 2** para poder amplificar el N-terminal de 820pb. También se diseñaron los **Primers 3 y 4** que funcionan como control interno del experimento. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO. Luego de analizar por ensayos de restricción, los clones positivos se mandan a secuenciar.

Se buscaba amplificar el extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin. El resto del mensajero ya se conocía dado que es idéntico la secuencia de  $\beta$ 2-chimaerin. No obstante, se diseñó otro par de primers que funcionarían como control interno del experimento de PCR. Son los **primers 3 y 4** mostrados en la **Figura 26**. Dan como resultado un producto de amplificación de 500pb del dominio de RacGAP. Los **primers 3 y 4** podrían hibridar tanto con el ARNm de  $\beta$ 2-chimaerin como con el de  $\beta$ 3-chimaerin.

La secuencia codificante para el extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin sería luego subclonada en el vector pCR2.1TOPO.

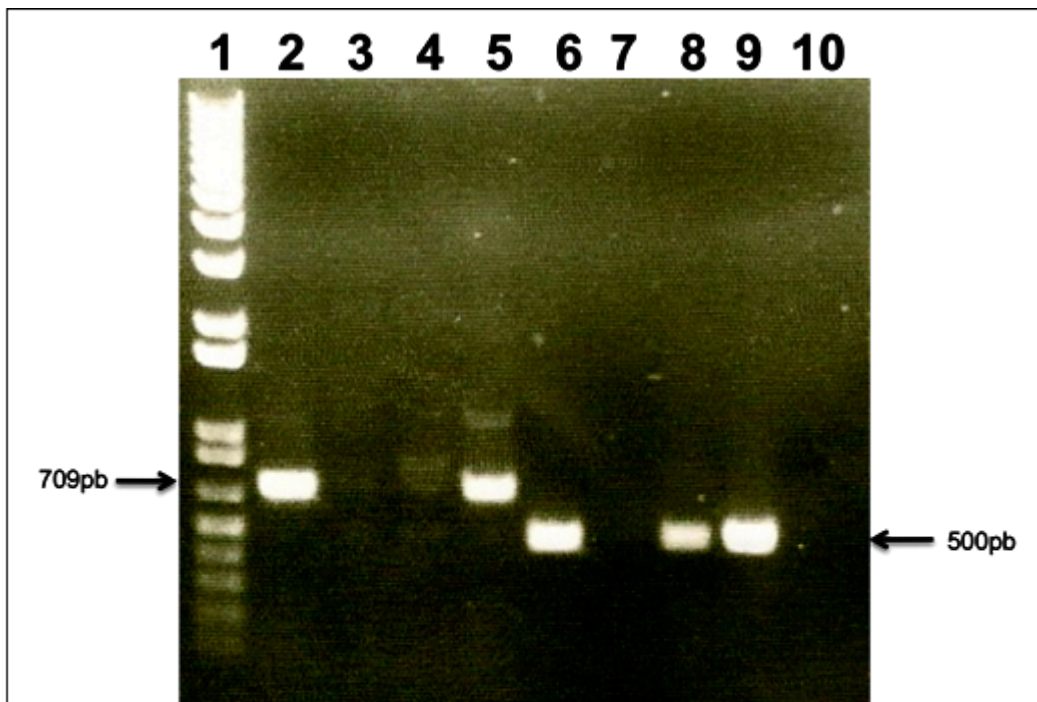
#### *-Clonado molecular del extremo N-terminal de $\beta$ 3-chimaerin*

Con el objeto de clonar el extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin se repitió nuevamente el ensayo de PCR. Se emplearon como templados cDNA extraídos de las líneas provenientes de neuroblastoma humano SK-N-SH, y SH-SY5Y. El cDNA de la línea celular HEK-293 fue utilizado como control de la reacción. Si bien lo que se amplificó anteriormente fue una variante de *splicing* aberrante (**Figura 25**), nos pareció prudente volver a hacer la PCR usando nuevos cDNA generados a partir de células HEK-293 de otra fuente. En este caso se partió de material cedido gentilmente por el laboratorio del

Dr. Omar Coso. Esto está fundamentado en que las células HEK-293 al ser una línea celular, poseen un número considerable de repiques y pasajes en cultivo. Este hecho hace que sufran un gran número de modificaciones, entre ellas variaciones en el tipo y en el nivel de expresión de algunos ARNm.

El experimento de PCR se llevó adelante con cuatro tipos de templados. cDNA de SK-N-SH, SH-SY5Y y los distintos cDNA de células HEK-293.

El resultado de la PCR fue negativo para los cDNA de SK-N-SH y de SH-SY5Y. Por el contrario, en ambos cDNA provenientes de HEK-293 se obtuvieron bandas de una intensidad fuerte, pero de un tamaño que coincidía con 709pb (**Figura 27**). Estas bandas se escindieron del gel de agarosa, se purificó su contenido, y nuevamente se subclonó el amplicón en el vector pCR2.1TOPO. La secuenciación de este fragmento amplificado mostró que se trataba del mismo mensajero aberrante obtenido anteriormente.

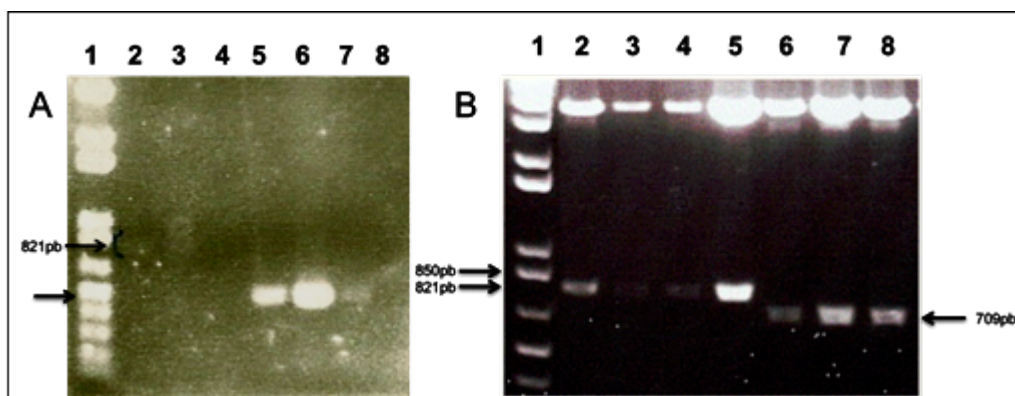


**Figura 27:** Electroforesis en gel de agarosa 0,9% del producto de PCR utilizando como primers: calles 2 a 5: primers 1 y 2; calles 6 a 10 primers 3 y 4 (control). Como templados se utilizaron: calle 2 y 5: cDNA HEK-293 (de cultivos de distinta procedencia); calle 3 y 7: cDNA SK-N-SH; calle 4 y 8: cDNA SH-SY5Y; calle 6 y 9: cDNA HEK-293 (de cultivos de distinta procedencia). Calle 10: control negativo. Se vió producto de amplificación con los primers 1 y 2 en las calles cuyo templado es el cDNA de HEK-293.

Este ensayo confirmó que las células de la línea HEK-293 no expresaban el ARNm completo de  $\beta$ 3-chimaerin. Por otro lado, corroboraba que existían secuencias

promotoras río arriba del sitio de inicio de la transcripción  $\beta$ 3-chimaerin que estaban activas en células HEK-293.

Se hizo un nuevo experimento de PCR en el cual se probaron otros tres cDNA. Dos de ellos eran cDNA comerciales, provenientes de riñón y de encéfalo humano. El restante era cDNA de una línea de células gliales humanas sintetizado en nuestro laboratorio (**Figura 28 A**).



**Figura 28: A)** Electroforesis en gel de agarosa 0,9% del producto de PCR utilizando como primers: calles 2 a 4: primers 1 y 2; calles 5 a 8: primers 3 y 4 (control). Como templados se utilizaron: calles 2 y 5: cDNA comercial de riñón; calles 3 y 6: cDNA comercial de encéfalo; calles 4 y 7: cDNA de células gliales. Calle 8: control negativo. **B)** Electroforesis en gel de agarosa 1% que muestra los clones positivos, luego de digerir el vector pCR2.1TOPO con la enzima de restricción EcoRI. También se incluyen clones obtenidos por el mismo procedimiento, usando como templados cDNA de células HEK. Calles 2 a 4: clones obtenidos a partir de cDNA comercial humano de riñón; calle 5: clon obtenido a partir de cDNA comercial humano de encéfalo; calles 6 a 8: clones obtenidos a partir de la PCR anterior de las calles conteniendo cDNA de células HEK.

Únicamente se obtuvo amplificación con los cDNA comerciales de riñón y de encéfalo. El producto de PCR era apenas perceptible en el gel de agarosa en el cual se sembró el resultado de la reacción. El tamaño, en contraposición con lo visto en los experimentos anteriores, era exactamente el esperado; es decir 820 pb aproximadamente (**Figura 28 B**).

Se procedió de acuerdo a la estrategia de clonado planteada en la **Figura 26**. Lo amplificado en las calles 1 y 2 del gel de la **Figura 28 A** fue subclonado en el vector pCR2.1TOPO. Nuevamente mediante ensayos de restricción con la enzima EcoRI se seleccionaron los clones positivos que luego se secuenciaron (**Figura 28 B**).

Tres clones resultaron ser positivos. Dos de ellos provienen del cDNA de riñón y el restante del de encéfalo (**ver Anexo**). Los dos primeros son exactamente iguales, mientras que el restante posee tres mutaciones silenciosas que no determinan cambios aminoacídicos (**ver Anexo**).

*-Ingreso de la secuencia codificante de  $\beta$ 3-chimaerin a la base de datos del NCBI*

La secuencia codificante completa de  $\beta$ 3-chimaerin fue ingresada al **GenBank**, la base de datos del NCBI a nombre del autor de la presente tesis y su director. El número de acceso a la secuencia es **bankit1266590 GQ924106**, permanecerá guardada de manera confidencial hasta el 30 de Junio de 2011. A partir de esta fecha tendrá acceso público.

*-Subclonado de la secuencia codificante de  $\beta$ 3-chimaerin en diferentes vectores de expresión*

El segundo objetivo de la tesis es caracterizar a  $\beta$ 3-chimaerin. Para ello debíamos generar las herramientas suficientes para poder sobreexpresar esta nueva quimerina. Contábamos en el laboratorio con vectores de expresión que codificaban para  $\beta$ 2-chimaerin fusionada a distintos epítopes. Reemplazando los extremos N-terminales obtendríamos la secuencia completa de  $\beta$ 3 en los distintos vectores. Para ello se hizo una doble digestión con las enzimas de restricción XhoI y BglII de pEYFP-N1- $\beta$ 2-chimaerin (codifica para  $\beta$ 2-chimaerin fusionada a YFP). De esta forma se escindieron del vector las primeras 574pb de la secuencia codificante de  $\beta$ 2-chimaerin, para luego ligar el fragmento de 821pb que contenía el extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin. Este fragmento había sido obtenido al digerir el vector pCR2.1- $\beta$ 3-Nterminal con las enzimas XhoI y BglII. Se generó de esta forma el constructo pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin, que permite obtener la nueva isoforma fusionada a YFP (**Figura 29**).

Otra de las herramientas que estaba presente en nuestro laboratorio era una versión mutante de  $\beta$ 2-chimaerin subclonada en el vector pEYFP-N1. Esta mutante tiene una deleción en tres aminoácidos clave en el dominio de GAP que lo hace inactivo. Esta mutante se la conoce como  $\Delta$ EIE y al constructo se lo denomina pEYFP-N1- $\beta$ 2-chimaerin $\Delta$ EIE.

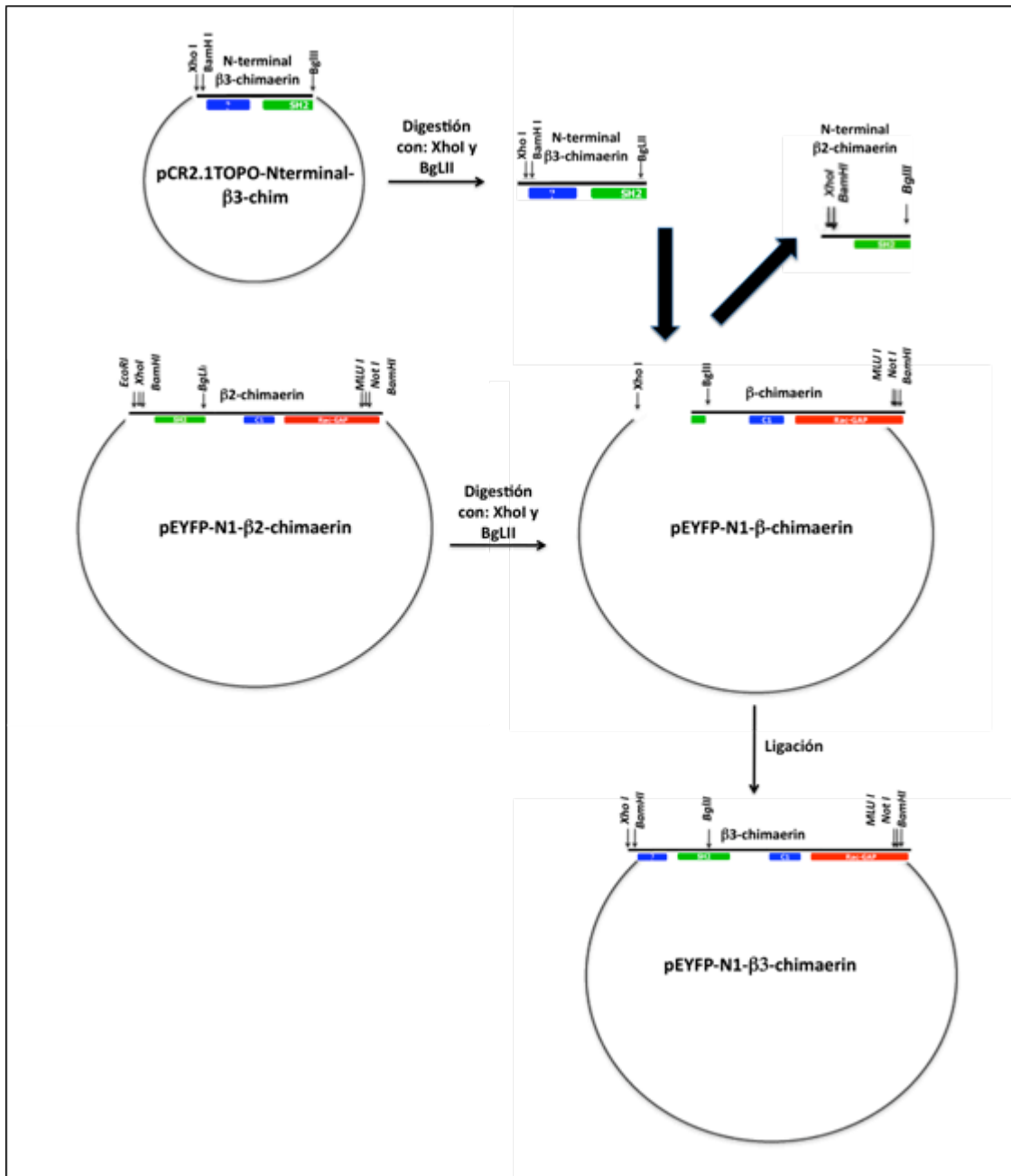
De forma análoga a como se procedió para generar la construcción pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin, se lo hizo para obtener el vector pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE. Se efectuó un intercambio entre los extremos N-terminales de  $\beta$ 2 y de  $\beta$ 3-chimaerin, utilizando en las digestiones las mismas enzimas de restricción, solo que en este caso, el dominio de GAP presente río abajo estaba mutado. Se generó de esta manera una mutante GAP inactiva de  $\beta$ 3-chimaerin.

Una vez que se tuvo a la secuencia codificante completa subclonada en dos vectores, pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin y pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE, fue mas sencillo generar

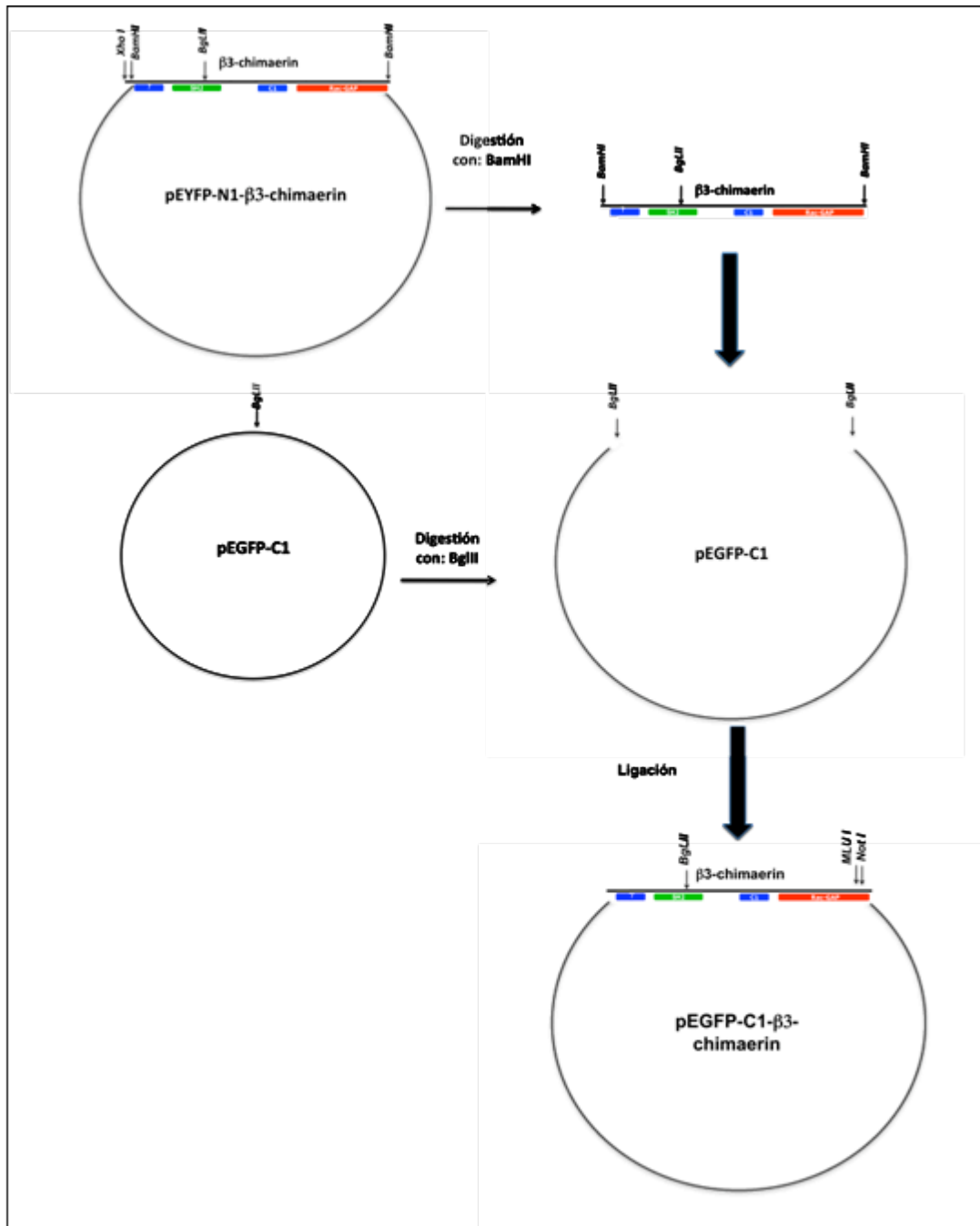
---

nuevas construcciones, cortando y ligando toda la secuencia en bloque. Con esta lógica, se lograron los constructos pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin y pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE (**Figura 29**).

Se digirió los vectores pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin y pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE con la enzima de restricción BamHI logrando escindir la secuencia completa de  $\beta$ 3-chimaerin y de  $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE. Estos dos fragmentos se ligaron al vector pEGFP-C1 vacío, que previamente fue digerido con la enzima de restricción BglII (**Figura 29**). Ambas enzimas poseen extremos compatibles que hacían posible la ligación. Mediante ensayos de restricción se elucidó cuales eran los clones en los cuales ambas secuencias se habían ligado en el sentido correcto. Todos los constructos generados aquí descritos fueron debidamente secuenciados.







**Figura 29:** Esquema que muestra como fue subclonada la secuencia que codifica el extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin para generar el marco de lectura completo de  $\beta$ 3-chimaerin. Para obtener los constructos pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE y pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE (**Figura 13 Materiales y Métodos**) se procedió de forma análoga a lo hecho para obtener los vectores pYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin y pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin.

#### -Unión de $\beta$ 3-chimaerin a ésteres de forbol

Con el objetivo de medir la respuesta al tratamiento con ésteres de forbol por parte de  $\beta$ 3-chimaerin en un contexto celular se realizaron estudios de translocación en células COS-1.

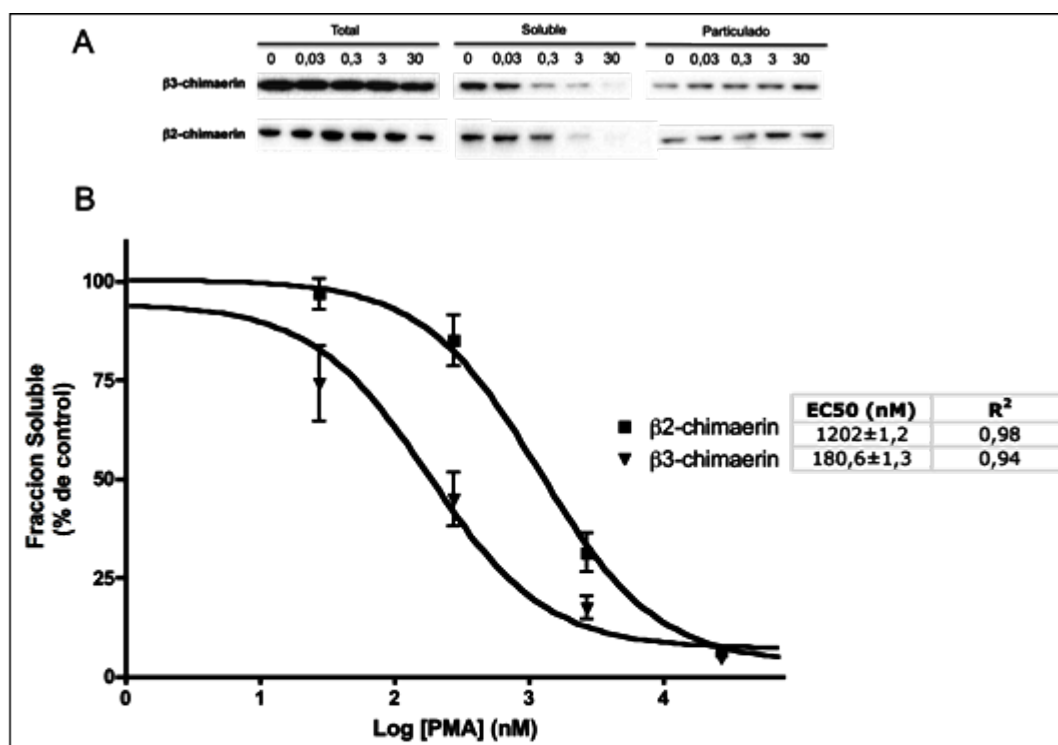
Las células fueron transfectadas transientemente con la construcción pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin o con la construcción pEGFP-C1- $\beta$ 2-chimaerin, incubadas por 48hs y tratadas con distintas concentraciones de PMA. Los ensayos se realizaron en presencia del inhibidor de PKC GF109203X (5  $\mu$ M por 20 minutos) para evitar efectos debidos a la activación de las PKC.

Una vez que las células fueron tratadas, se efectuaron experimentos de fraccionamiento subcelular por ultracentrifugación (ver **Materiales y Métodos, Figura 14**). Por último, se analizó por Western blot, que cantidad de la proteína GFP- $\beta$ 3-chimaerin o GFP- $\beta$ 2-chimaerin, estaba presente en las fracciones total, soluble e insoluble. Se utilizó para la cuantificación la fracción soluble. La técnica es simple, pero requiere de práctica dado que pequeños detalles de manipulación de las muestras pueden afectar en el resultado final. Es por esto que los ensayos fueron repetidos hasta obtener al menos 3 resultados reproducibles, observándose siempre la misma tendencia general.

En todos los experimentos, la cantidad de proteína presente en las fracciones totales no varió después del tratamiento con PMA. Los datos de las cuantificaciones de la fracción soluble se graficaron como porcentaje de proteína soluble respecto del control (sin PMA) contra logaritmo en base diez de la concentración de PMA expresada en nanomolar. Estos datos se ajustaron por regresión lineal a una curva sigmoidea del tipo dosis-respuesta y se calculó la  $EC_{50}$  (concentración de agonista necesaria para que se produzca el 50% del efecto máximo) para cada una utilizando el programa Prism 3.0. En todos los casos el  $R^2$  fue mayor a 0,9.

Los experimentos de translocación de la proteína  $\beta$ 3-chimaerin se efectuaron en simultáneo y de forma comparativa con los ensayos de  $\beta$ 2-chimaerin. Esta última isoforma se encuentra ampliamente caracterizada, y existe numerosas publicaciones describiendo su respuesta a la unión de ésteres de forbol y su actividad de GAP (3,7,9,10,37). Los ensayos de relocalización subcelular de  $\beta$ 2-chimaerin funcionaron como un control positivo de la técnica.

Se observó que la proteína  $\beta$ 3-chimaerin es 7 veces más sensible a al PMA que  $\beta$ 2-chimaerin. En la **Figura 30** se puede observar que el  $EC_{50}$  obtenido a partir de los ensayos de translocación de  $\beta$ 2-chimaerin en nuestro laboratorio es de  $1200 \pm 1,2$  nM. Este valor es idéntico a lo reportado en la literatura (7,37). Por otra parte, la cuantificación de los datos de los experimentos de translocación de  $\beta$ 3-chimaerin muestran un  $EC_{50}$  de  $180.6 \pm 1,3$  nM (**Figura 30**).

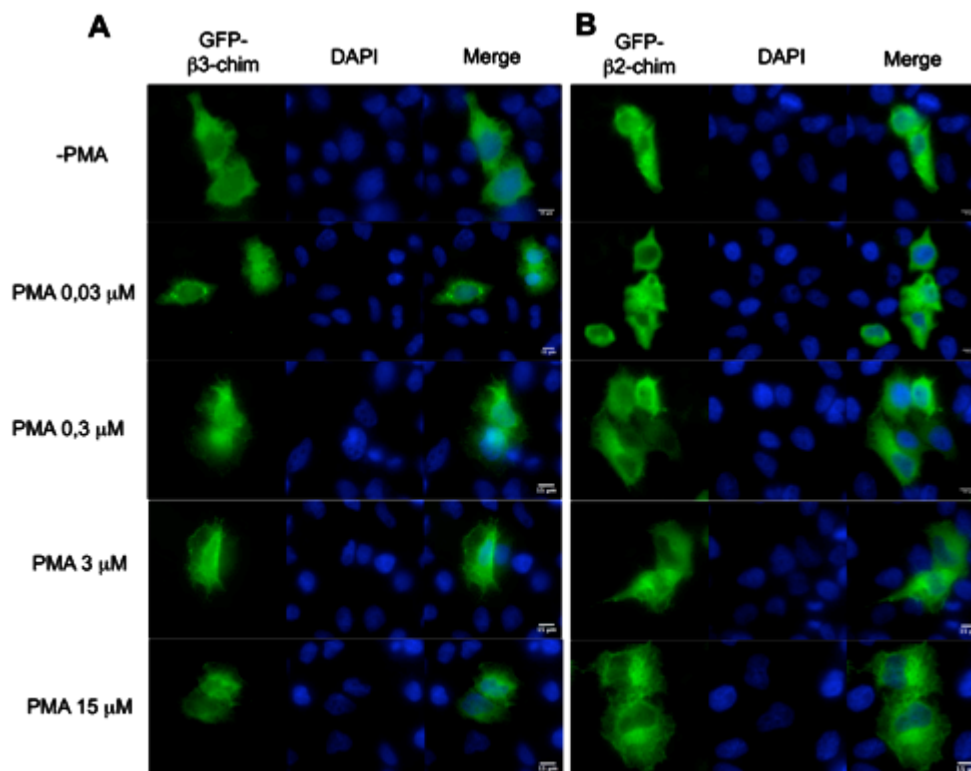


**Figura 30:** Ensayos de translocación de  $\beta 2$ -chimaerin y  $\beta 3$ -chimaerin hechos en células COS-1. **(A)** Células COS-1 fueron transfectadas con pEGFP- $\beta 2$ -chimaerin o con pEGFP- $\beta 3$ -chimaerin; 48 horas después las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de PMA ( $\mu\text{M}$ ) por 20 minutos y luego sometidas a un fraccionamiento subcelular. Se muestran Western blots representativos usando un anticuerpo anti-GFP. **(B)** El panel B muestra el análisis densitométrico hecho a partir de la inmunoreacción de las fracciones solubles. Los resultados son expresados como porcentaje del control (células sin estimular) y representan el promedio de entre 4 y 6 experimentos. En la tabla de muestran los valores de EC50 y R<sup>2</sup> para cada curva.

Para complementar el análisis anterior, células HeLa transfectadas (**Materiales y Métodos**) con los mismos plásmidos fueron incubadas durante 48 horas y tratadas con las mismas concentraciones éster del forbol PMA. Estos ensayos también se realizaron en presencia del inhibidor de PKC GF109203X (5  $\mu\text{M}$  por 20 minutos) (**Materiales y Métodos**).

Luego del tratamiento las células fueron observadas en el microscopio de fluorescencia (**Materiales y Métodos**).

La proteína GFP- $\beta 3$ -chimaerin transloca hacia la membrana plasmática y el perinúcleo en presencia de la menor concentración de PMA 0,03  $\mu\text{M}$  (**Figura 31 panel A**). Por otro lado la proteína GFP- $\beta 2$ -chimaerin transloca a la membrana plasmática y el perinúcleo a con concentraciones de PMA mayores que 0,3  $\mu\text{M}$  (**Figura 31 panel A**).



**Figura 31:** Células HeLa fueron transfectadas con vectores pEGFP codificando a GFP-β3-chimaerin (**Panel A**) y a GFP-β2-chimaerin (**Panel B**). Después de incubar las células durante 48 horas, fueron tratadas con 0,03 μM, 0,3 μM, 3 μM y 15 μM de PMA. La relocalización de las proteínas de fusión fue observada por microscopía de fluorescencia.

Esto coincide con lo observado en los ensayos de fraccionamiento subcelular. β3-chimaerin es más sensible al tratamiento con ésteres de forbol que β2-chimaerin.

Por lo observado en la **Figura 31** β2 y β3-chimaerin translocan hacia los mismos compartimentos subcelulares luego de tratamiento de las células con PMA, estos son la membrana plasmática, y la zona perinuclear, específicamente el aparato de Golgi.

La observación de la relocalización de β3 y β2 luego del tratamiento con PMA por microscopía de fluorescencia se realizó una única vez utilizando células HeLa. Anteriormente, el mismo ensayo se repitió dos veces con células COS-1. Se observó lo mismo en cuanto a la translocación de una y otra isoforma en función de las concentraciones de PMA. En estos ensayos, β3-chimaerin mostró ser mucho más sensible al tratamiento con PMA que β2-chimaerin, translocando a la membrana y al perinúcleo a concentraciones del orden de 0,1 μM. β2 únicamente se relocalizaba en el espacio perinuclear y en la membrana plasmática a concentraciones mayores que 0,1 μM (los tratamientos fueron: control (sin PMA), 0,1 μM, 1 μM, 10 μM). La calidad de las imágenes obtenidas fue menor, dada la fisonomía de las células COS-1, por eso decidimos no agregarlas al trabajo.

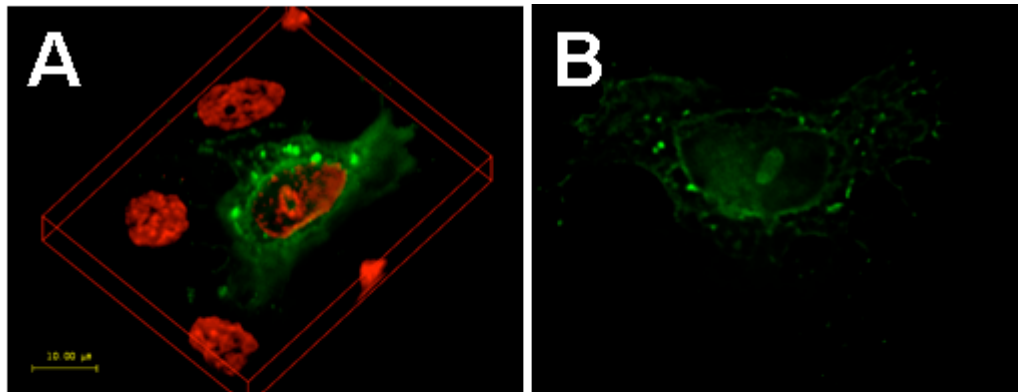
Con el objeto de observar comparativamente como es la localización subcelular de estas dos isoformas se llevaron a cabo reconstrucciones tridimensionales de células HeLa transfectadas con GFP- $\beta$ 3-chimaerin o GFP- $\beta$ 2-chimaerin.

Brevemente consiste en tomar imágenes de una célula transfectada en diferentes planos o secciones ópticas secuenciales en el eje Z. Luego utilizando el programa Huygens estas imágenes son procesadas generándose imágenes deconvolucionadas y una proyección en 3 dimensiones (**Figura 32 A y Figura 33 A**) (**mas detalles Materiales y Métodos**).

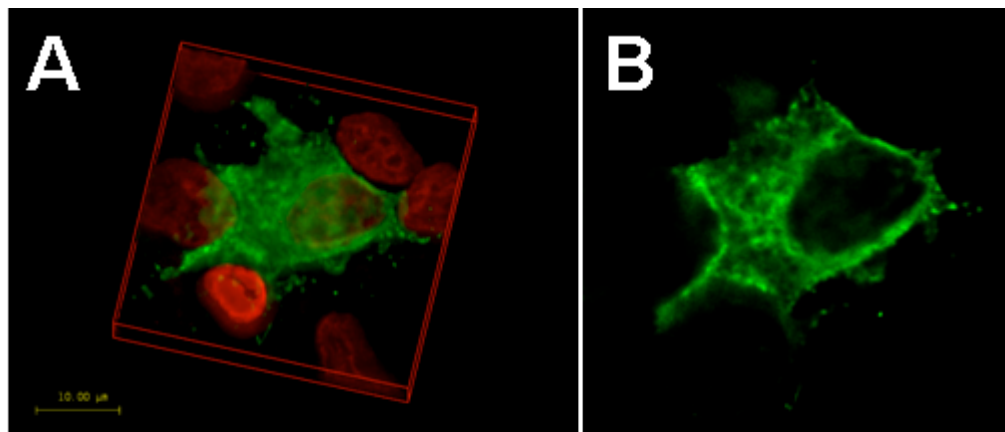
La **Figura 32 A** muestra la reconstrucción tridimensional de una célula HeLa que expresa la proteína GFP- $\beta$ 3-chimaerin, tratada con 0,03  $\mu$ M de PMA. Se observa claramente como  $\beta$ 3-chimaerin esta localizada en gran medida en la membrana plasmática y en la zona del perinúcleo. Incluso se pueden observar zonas citoplasmáticas en las cuales no está la proteína. La **Figura 32 B** es el resultado de una imagen deconvolucionada llevada a cabo con el programa Huygens. Esta técnica para el tratamiento de imágenes permite, mediante algoritmos matemáticos, eliminar la señal fuera de foco de un conjunto de imágenes seriadas en el eje Z, dando una imagen que simula confocalidad.

En la **Figura 32 B** se muestra la misma célula que en **A**. Se observa la localización de  $\beta$ 3-chimaerin en la membrana plasmática, incluso de forma mucho mas clara que en las imágenes de la **Figura 31 A**. También se localiza en el perinúcleo.

La **Figura 33 A** muestra una reconstrucción tridimensional de una célula HeLa que expresa la proteína GFP- $\beta$ 2-chimaerin, tratada con 3  $\mu$ M de PMA. Aquí también se observa la localización de  $\beta$ 2 en la membrana plasmática y en las zonas perinucleares de la célula. En **B**, se muestra una imagen deconvolucionada de la misma célula. En este caso también se aprecia claramente la localización de  $\beta$ 2-chimaerin en la membrana plasmática y en el perinúcleo.



**Figura 32: A:** Reconstrucción tridimensional de una célula HeLa transfecteda con el plásmido que codifica para GFP-β3-chimaerin incubada durante 48 horas y posteriormente tratada con 0,03 μM de PMA. La imagen se genera a partir de secciones ópticas obtenidas de manera secuencial en el eje Z tomadas con un microscopio de fluorescencia y procesadas por el programa Huygens (**Materiales y Métodos**). **B:** Imagen deconvolucionada de una sección óptica de la misma célula mostrada en **A**. Se observa la presencia de la proteína GFP-β3-chimaerin predominantemente en la membrana plasmática y en las zonas perinucleares.



**Figura 33: A:** Reconstrucción tridimensional de una célula HeLa transfecteda con el plásmido que codifica para GFP-β2-chimaerin incubada durante 48 horas y posteriormente tratada con 3 μM de PMA. **B:** Imagen deconvolucionada de una sección óptica de la misma célula mostrada en **A**. Se observa la presencia de la proteína GFP-β2-chimaerin predominantemente en la membrana plasmática y en las zonas perinucleares.

# **V-Discusión**

*-β3-chimaerin, un nuevo integrante de la familia de las quimerinas.*

Se tenían numerosas evidencias sobre la existencia de una nueva isoforma en la familia de las quimerinas, entre ellas Western blots de diferentes tejidos donde se observan bandas de un peso molecular mayor al de las isoformas conocidas, (**Figuras 10 y 11**) además del un EST de un tumor de riñón humano reportado en las bases de datos de NCBI (4). Para lograr el clonado molecular de β3-chimaerin, como primer paso, era necesario identificar el marco de lectura abierto completo. Para ello se realizó una búsqueda de secuencias relacionadas a β2-chimaerin en la cual se identificaron dos EST provenientes de amígdala. Estos EST nos permitieron completar el marco de lectura abierto de β3-chimaerin, para posteriormente diseñar los primers para clonar este cDNA por PCR. Durante la escritura de esta tesina, se hizo público un reporte en la bases de datos GenBank del NCBI de una secuencia proveniente de amígdala cerebral que contiene el marco de lectura completo β3-chimaerin (**GenBank: AK294271.1 g.i:221039909**). Éste es idéntico al reportado en este trabajo.

Haciendo un análisis *in silico* de estas secuencias sobre el genoma humano, se analizó la disposición de los exones, intrones y de las regiones promotoras de β3-chimaerin. El mensajero de β3-chimaerin presenta dos exones 48Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de β2-chimaerin.

Como se vió expresión en riñón, tanto en los tejidos de ratón por western blot (**Figura 10**), como en el EST (**GenBank Acc: BQ328172 GenBank gi: 20946364**) en un primer paso para lograr el clonado molecular de β3-chimaerin por PCR se utilizó como templado cDNA de células de riñón embrionarias humana HEK-293. Sorprendentemente, a partir de esta línea celular se clonó una variante de *splicing* aberrante a la cual le falta el segundo exón dando como consecuencia, un cambio en el marco de lectura, lo que generaba un codón Stop prematuro.

Esto, a pesar de ser un resultado negativo, no supuso un replanteo de la primera hipótesis del trabajo. La expresión de este mensajero carente del segundo exón, nos indicaba que en células HEK-293 el mensajero de β3-chimaerin se expresaba, aunque no se procesaba correctamente, confirmando que río arriba del sitio de inicio de la transcripción de β3-chimaerin había secuencias promotoras activas.

El mensajero sin el segundo exón se clonó dos veces utilizando dos estrategias de clonado distintas (**ver Resultados**) y a partir de distintos cDNA de cultivos de células HEK de distinta procedencia. Esto indica que la presencia de este mensajero es una característica de la línea celular, y no de un cultivo celular en particular.



Esto puede explicarse porque las líneas celulares se seleccionan por su capacidad de crecimiento en cultivo. Dado que las chimaerins son Rac-GAPs, el no expresar correctamente a  $\beta$ 3-chimaerin por fallas en el splicing, le conferiría una ventaja de crecimiento. Observaciones que apoyan esta teoría fueron reportadas en numerosos trabajos, donde se observa que sobreexpresión de  $\beta$ 2-chimaerin reduce los niveles de activación de Rac (27). También se reportó que la sobreexpresión del dominio de GAP de  $\beta$ 2-chimaerin inhibe el crecimiento y la agresividad de células metastásicas de carcinoma mamario de ratón. Los clones estables en los cuales se sobreexpresó el dominio GAP mostraron muy baja expresión de este, solo detectable por rtPCR, lo que sugiere una selección negativa sobre el transgén. Aun así estos clones presentan una tasa de crecimiento mucho mas lenta que las células control y una marcada disminución en sus propiedades migratorias (17). Además se reportó que en tumores mamaros y líneas celulares derivadas de tumores mamaros  $\beta$ 2-chimaerin inhibe la progresión del ciclo celular y la proliferación (27). Aunque no se podía saber *a priori*, tal vez hubiese sido prudente visualizar por Western blot la expresión de quimerinas mediante un anticuerpo anti-GAP específico en esta línea celular, antes de utilizar su cDNA como templado en los experimentos de PCR. Igualmente, ciertas líneas celulares expresan niveles de chimerins no detectables por western blot pero si por PCR (17,27).

No se pudo amplificar el ARNm de  $\beta$ 3-chimaerin de cDNA proveniente de una línea de células gliales, ni de la línea celular SHSY5Y. Por lo que se puede asumir que en estas líneas celulares  $\beta$ 3-chimaerin no se expresa.

Si bien en el Western blot de la **Figura 11** se observó una banda muy tenue de 60 KDa que podría tratarse de  $\beta$ 3-chimaerin, no se pudo amplificar la secuencia codificante a partir de cDNA de la línea celular SK-N-SH. Dado que ya tenemos un anticuerpo específico para  $\beta$ 3-chimaerin, podremos analizar la expresión de esta isoforma por western blot e inmunohistoquímica en distintos tejidos normales o patológicos.

*– $\beta$ 3-chimaerin se expresa en riñón y cerebro.*

Se clonó el extremo 5' del mensajero de  $\beta$ 3-chimaerin a partir de dos cDNA comerciales provenientes de encéfalo y de riñón humanos. Esta secuencia codifica para los 90 aminoácidos novedosos del extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin.

El producto de PCR pudo visualizarse como una banda apenas perceptible (**Figura 28**). Los cDNA comerciales que se emplearon como templado provienen de dos

órganos que poseen una variedad amplia de subtipos celulares muy especializados, particularmente en el caso del cDNA de cerebro. Es probable que solo algunos de estos subtipos celulares expresen el ARNm de  $\beta$ 3-chimaerin, por lo cual su representación en el cDNA del órgano completo sea baja. Esta puede ser una de las causas por las cuales no se observaron bandas intensas en los geles de agarosa donde se sembraron los productos de la PCR. No es lo que sucede con el ARNm de  $\beta$ 2-chimaerin, cuya expresión se supone que es ubicua y por esto cuando se utilizaron los primers control (**Figura 26**), si se observan bandas de una intensidad alta.

Es un dato importante haber clonado esta secuencia a partir de dos cDNA provenientes de distintos tejidos humanos. Estos cDNA comerciales se sintetizan a partir de la extracción del RNA total de varios órganos provenientes de distintos individuos. De los tres clones que resultaron positivos y fueron secuenciados dos de ellos presentan secuencias idénticas mientras que el restante posee tres mutaciones silenciosas que no determinan un cambio aminoacídicos. Estimamos que se clonaron dos variantes alélicas de un mismo gen (ver **Anexo**).

Si bien originalmente se había observado expresión de la proteína  $\beta$ 3-chimaerin en corazón, y glándula adrenal (**Figura 10**). No disponíamos en nuestro laboratorio de líneas celulares humanas de estos tejidos, ni cDNA comerciales a partir de los cuales hubiéramos podido intentar clonar el cDNA de  $\beta$ 3-chimaerin.

#### *-Subclonado y expresión $\beta$ 3-chimaerin.*

Se generaron dos construcciones en las cuales se subclonó la secuencia codificante completa de  $\beta$ 3-chimaerin. Estas son pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin y pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin. Entre los constructos obtenidos también se encuentran versiones mutantes de  $\beta$ 3-chimaerin, pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE y pEYFP-N1- $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE que dan lugar a proteínas de fusión que poseen un deleción de tres aminoácidos en el sitio activo de GAP que anula su función.

El vector de expresión pEGFP-C1- $\beta$ 3-chimaerin fue utilizado para caracterizar la unión de ésteres de forbol por esta nueva isoforma. El resto de las construcciones serán útiles a la hora de caracterizar la actividad de Rac-GAP de  $\beta$ 3-chimaerin. Generar estas herramientas tomó un tiempo considerable en el desarrollo del trabajo y su utilidad será determinante para seguir trabajando con  $\beta$ 3-chimaerin (ver **Perspectivas a Futuro**).

*-β3-chimaerin es un receptor de ésteres de forbol de alta afinidad.*

Los ensayos de translocación en respuesta al tratamiento con ésteres de forbol en células en cultivo son una estrategia ampliamente utilizada para caracterizar el *binding* de estos compuestos a proteínas que contienen dominios C1 (9,10,37,42). En ellos medimos por Western blot, la desaparición de la proteína de interés de la fracción soluble, y su translocación a la particulada. Como se vió en la **Figura 30** analizamos la unión de β3-chimaerin al PMA, un análogo estructural del DAG. Como control positivo de estos experimentos utilizamos a la proteína β2-chimaerin en ensayos idénticos y hechos de forma simultánea con los de β3-chimaerin. La translocación de β2-chimaerin en respuesta a PMA se encuentra caracterizada y existen numerosos reportes que describen su capacidad de unir DAG y ésteres de forbol en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (3,7,9,10,37,38). Según el modelo de activación alostérica descrito para esta isoforma el extremo N-terminal tiene un papel central en el mecanismo autoinhibitorio que mantiene a β2-chimaerin inactiva y en su conformación cerrada en el citoplasma (37). Es por este motivo que se propuso que el dominio N-terminal diferencial de β3-chimaerin le conferiría distinta sensibilidad al tratamiento con PMA en células en cultivo.

En los ensayos realizados, reprodujimos los datos reportados en la literatura para la translocación de β2-chimaerin en respuesta al PMA. Observamos que la proteína responde a estímulos crecientes de PMA translocando desde la fracción citoplasmática a la fracción particulada con un EC50 de  $1202 \pm 1,2$  nM. La técnica para medir la relocalización mediante fraccionamiento subcelular es muy sensible y demandó un tiempo importante ponerla punto. Hubo que descartar un gran número de ensayos hasta obtener resultados satisfactorios. No obstante, se comprobó que β3-chimaerin presenta una mayor sensibilidad a los tratamientos con PMA que β2. Comparando los resultados de β2-chimaerin y de β3-chimaerin, esta nueva isoforma es 7 veces más sensible al tratamiento con PMA que β2-chimaerin, mostrando un EC50 de  $180.6 \pm 1,3$  nM. Esto no solo se evidencia en las curvas presentadas en la **Figura 30** de **Resultados** que se obtuvieron en base a la cuantificación seis experimentos representativos. En total se realizaron 11 ensayos de translocación con β3-chimaerin con dosis de estímulo distintas y de ellos pudo extraerse una tendencia global que indica una mayor sensibilidad al PMA que β2-chimaerin.

*-β3-chimaerin transloca a la membrana plasmática y al espacio perinuclear.*

Para complementar los ensayos de fraccionamiento subcelular, se realizaron ensayos de translocación en células HeLa transfectadas con vectores que codificaban para β2 o para β3-chimaerin fusionada a GFP. La relocalización de estas proteínas de fusión, luego de tratar las células con PMA fue observada mediante microscopía de fluorescencia.

Se observó nuevamente que β3-chimaerin es mas sensible al tratamiento con PMA que la isoforma β2-chimaerin. Las imágenes de la **Figura 31 A** muestran que β3-chimaerin transloca con concentraciones de 0,03 μM, mientras que β2-chimaerin recién comienza a hacerlo en presencia de 0,3 μM de PMA como lo indican los reportes previos (37)(**Figura 31 B**). Esta mayor sensibilidad coincide con lo observado en los ensayos de fraccionamiento subcelular.

La **Figura 31** muestra que al igual que β2-chimaerin, β3-chimaerin se relocaliza en la membrana plasmática y el espacio perinuclear en respuesta al tratamiento con PMA. El ligando natural de las quimerinas, el DAG, es un lípido que permanece anclado en la membrana. Era previsible que β3-chimaerin se localice en este sitio gracias a la capacidad que tiene su dominio C1 de pegar ésteres de forbol y DAG. Por otro lado, se reportó que los dominios C1 tanto de β2-chimaerin como de PKC son responsables del anclaje de estas proteínas al aparato de Golgi mediante la interacción directa con la proteína Tmp21(14). El dominio C1 de β2 es idéntico al de β3, con lo cual suponemos que la forma en la que se relocaliza esta nueva isoforma en el aparato de Golgi es análoga a los descrito para β2 (13).

Las reconstrucciones tridimensionales y las imágenes deconvolucionadas obtenidas a partir del análisis de secciones ópticas secuenciales (**Figuras 32 y 33**) confirman los sitios de relocalización de ambas isoformas. Estas técnicas para el tratamiento de imágenes permiten eliminar la señal fuera de foco, dando una imagen que simula confocalidad. En particular permite ver nítidamente como β3-chimaerin esta presente en la membrana plasmática en imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia.

*-¿β3-chimaerin es una SUPER-chimaerin?*

Estableciendo comparaciones entre las SUPER-chimaerins, mutantes puntuales de β2-chimaerin presentadas en la **Introducción** y β3-chimaerin podemos especular con que β3-chimaerin podría actuar como una chimaerin hiperactiva. Según el modelo de activación alostérica el dominio de GAP esta autoinhibido por la α-héliceN-terminal.

Para el caso de  $\beta$ 3-chimaerin, dado que es más sensible al tratamiento con PMA, se podría especular que su actividad de GAP estaría también aumentada. Si bien  $\beta$ 3-chimaerin posee los aminoácidos que conforman el  $\alpha$ -hélice N-terminal implicada en este mecanismo autoinhibitorio y también forman parte de su estructura todos los residuos que estabilizan la conformación cerrada descrita para  $\beta$ 2-chimaerin, es exclusivo de  $\beta$ 3-chimaerin su extremo N-terminal de 90 aminoácidos. La mayor sensibilidad frente al tratamiento con PMA podría explicarse por la presencia de estos 90 aminoácidos extra en la proteína que de alguna forma estarían condicionando la estabilidad de la conformación cerrada.

Esto podría suceder debido a interacciones intramoleculares de residuos de este extremo N-terminal con otros sectores de la proteína que establezcan una conformación más receptiva del ligando, o también debido a interacciones de este dominio con alguna otra proteína.

Este reportado de mutantes naturales hiperactivas de la isoforma  $\alpha$ 2-chimaerin provocan el Síndrome de Retracción de Duane (DRS) (34). Este síndrome consiste en un complejo desorden de los movimientos oculares causado por una incorrecta inervación de los músculos extraoculares por axones del tallo cerebral. Estudiando familias con una variante de este desorden (DURS2-DRS) se identificaron mutaciones en heterocigosis causantes del desorden en el gen CHN1. Varias de estas mutaciones se localizaban en el extremo N-terminal de  $\alpha$ 2-chimaerin, dando lugar a mutantes hiperactivas, mucho más sensibles que la isoforma *wild type* al tratamiento con PMA. Además estas mutantes son mucho más potentes como RacGAPs. La expresión de versiones mutantes de  $\alpha$ 2-chimaerin en embriones de pollo bloqueó la correcta inervación de los músculos extraoculares por los axones oculomotores.

Numerosos reportes en la bibliografía muestran que el extremo N-terminal tanto de  $\beta$ 2-chimaerin como de  $\alpha$ 2-chimaerin es muy importante en la regulación alostérica de la molécula, e incluso en algunos casos el bloqueo de este mecanismo autoinhibitorio tiene consecuencias fisiológicas notorias. Por esto asumimos que el novedoso extremo N-terminal presente en  $\beta$ 3-chimaerin tendría un papel crucial en la regulación de esta isoforma como receptor de DAG y como RacGAP.

#### *-Perspectivas a futuro.*

Uno de nuestros objetivos a corto plazo es caracterizar la actividad de GAP de  $\beta$ 3-chimaerin. Nuestra hipótesis es que presentaría una mayor actividad de Rac-GAP respecto de  $\beta$ 2-chimaerin debido a que su conformación cerrada es más inestable

según lo discutido anteriormente. Esto se basa en que las mutantes puntuales de  $\beta$ 2-chimaerin que se comportan como *SUPER-chimaerins* como Q32A e I130A tienen una mayor actividad de GAP que la forma *wild type*. Como se vió en la **Introducción**, cuando  $\beta$ 2-chimaerin se encuentra en su conformación cerrada o inactiva, las prolina en posición 21 y 22 bloquean directamente el sitio de unión a Rac. La prolina 22 impide que  $\alpha$ F' (alfa hélice F' del dominio de GAP) se pueda poner en la posición correcta para unirse a Rac. Por esto, para que la unión ocurra, las prolina 21 y 22 deben moverse fuera de su posición.

Los aminoácidos isoleucina 23 y triptofano 24 están involucrados en uniones hidrofóbicas entre los dominios C1, GAP y N-terminal. Esto implica que se deben romper estas interacciones para que pueda ocurrir la unión con Rac. Por esto se ve que las mutantes que desestabilizan la conformación cerrada son potentes Rac-GAPs.  $\beta$ 3-chimaerin demostró ser más sensible que  $\beta$ 2-chimaerin frente a los estímulos del éster de forbol PMA. Por lo tanto nuestra hipótesis es que  $\beta$ 3 también sería más potente como RacGAP que  $\beta$ 2. Las prolina 21 y 22 están presentes en la secuencia de  $\beta$ 3-chimaerin (posición 98 y 99). Pero suponemos que los noventa aminoácidos que se encuentran en el extremo N-terminal de la molécula influyen en la posición que adoptan estas prolina en la conformación global de la molécula impidiendo el bloqueo del sitio de unión a Rac.

Proponemos probar la interacción entre Rac y  $\beta$ 3-chimaerin mediante FRET como se hizo con  $\beta$ 2-chimaerin (2). En nuestro laboratorio contamos con la construcción pECFP-C1-Rac que codifica a la proteína Rac fusionada a CFP (*Cian Fluorescent Protein*) y con plásmidos que codifican para  $\beta$ 3-chimaerin *wild type* y  $\beta$ 3-chimaerin $\Delta$ EIE fusionadas a YFP (**Figura 13 Materiales y Métodos**). Contamos con un microscopio confocal con un modulo de FLIM (Fluorescent Lifetime Imagin Microscopy) que nos permitiría medir FRET mediante esta técnica que es muy potente a la hora de demostrar interacciones específicas entre dos proteínas.

También nos proponemos analizar la expresión de  $\beta$ 3-chimaerin en distintos tejidos, tanto en humanos como en ratón. Para ello se planean realizar experimentos de Northern blot utilizando como sonda la secuencia codificante del extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin y de esta forma detectar en que tejidos se puede estar expresando el ARNm de esta nueva isoforma. Esto también es posible de contestar mediante experimentos PCR en tiempo real, utilizando cDNA de distintos tejidos.

Para detectar la expresión de la proteína es que hicimos, en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcelo Kazanietz, un anticuerpo específico anti- $\beta$ 3-chimaerin. Los

primeros sangrados de conejos inmunizados contra un péptido sintético de idéntica secuencia a una porción del dominio N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin fueron probados con éxito. Esta es una herramienta muy potente nos permitirá realizar distintos experimentos, entre ellos la posibilidad de trabajar con la proteína endógena.

El extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin de 90 aminoácidos podría estar involucrado en interacciones proteína-proteína. Estas interacciones podrían identificarse mediante un ensayo de doble híbrido. Nuestra intención es utilizar el novedoso extremo N-terminal de  $\beta$ 3-chimaerin como carnada para encontrar proteínas de unión en una librería de cDNA. Todos estos experimentos formaran parte de mi trabajo de Tesis de Doctorado.

## **VI-Bibliografía**



1. Colon-Gonzalez, F., Leskow, F. C., and Kazanietz, M. G. (2008) *J Biol Chem* 283, 35247-35257
2. Wang, H., Yang, C., Leskow, F. C., Sun, J., Canagarajah, B., Hurley, J. H., and Kazanietz, M. G. (2006) *EMBO J* 25, 2062-2074
3. Caloca, M. J., Wang, H., and Kazanietz, M. G. (2003) *Biochem J* 375, 313-321
4. Coluccio Leskow, F. (2005) Estudio Funcional y Estructural de las Quimerinas, una Familia de Receptores de DAG y Esteres de Forbol con Actividad de Rac-GAP. in *FCEN*, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires
5. Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Francke, U., and Ullrich, A. (1986) *Science* 233, 859-866
6. Kazanietz, M. G., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Kolch, W., Mischak, H., Wong, G., Pettit, G. R., Bruns, J. D., and Blumberg, P. M. (1994) *J Biol Chem* 269, 11590-11594
7. Caloca, M. J., Fernandez, N., Lewin, N. E., Ching, D., Modali, R., Blumberg, P. M., and Kazanietz, M. G. (1997) *J Biol Chem* 272, 26488-26496
8. Kazanietz, M. G., Areces, L. B., Bahador, A., Mischak, H., Goodnight, J., Mushinski, J. F., and Blumberg, P. M. (1993) *Mol Pharmacol* 44, 298-307
9. Caloca, M. J., Garcia-Bermejo, M. L., Blumberg, P. M., Lewin, N. E., Kremmer, E., Mischak, H., Wang, S., Nacro, K., Bienfait, B., Marquez, V. E., and Kazanietz, M. G. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11854-11859
10. Caloca, M. J., Wang, H., Delemos, A., Wang, S., and Kazanietz, M. G. (2001) *J Biol Chem* 276, 18303-18312
11. Kazanietz, M. G. (2002) *Mol Pharmacol* 61, 759-767
12. Oancea, E., Teruel, M. N., Quest, A. F., and Meyer, T. (1998) *J Cell Biol* 140, 485-498
13. Wang, H., and Kazanietz, M. G. (2002) *J Biol Chem* 277, 4541-4550
14. Wang, H., and Kazanietz, M. G. *Mol Biol Cell*
15. Huijbregts, R. P., Topalof, L., and Bankaitis, V. A. (2000) *Traffic* 1, 195-202
16. Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M. D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. (1991) *Nature* 351, 400-402
17. Menna, P. L., Skilton, G., Leskow, F. C., Alonso, D. F., Gomez, D. E., and Kazanietz, M. G. (2003) *Cancer Res* 63, 2284-2291
18. Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995) *Cell* 81, 1137-1146
19. Kjoller, L., and Hall, A. (1999) *Exp Cell Res* 253, 166-179
20. Herrera, R., and Shivers, B. D. (1994) *J Cell Biochem* 56, 582-591
21. Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P. G., Bokoch, G. M., and Greenberg, S. (1997) *J Exp Med* 186, 1487-1494
22. Yuan, S., Miller, D. W., Barnett, G. H., Hahn, J. F., and Williams, B. R. (1995) *Cancer Res* 55, 3456-3461
23. Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. (1993) *Cell* 72, 767-778
24. Hall, C., Michael, G. J., Cann, N., Ferrari, G., Teo, M., Jacobs, T., Monfries, C., and Lim, L. (2001) *J Neurosci* 21, 5191-5202
25. Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., and Kawata, M. (1992) *Int Rev Cytol* 133, 187-230
26. Hall, A. (1998) *Science* 279, 509-514
27. Yang, C., Liu, Y., Coluccio Leskow, F., Weaver, V. M., and Kazanietz, M. G. (2005) *J Biol Chem*

28. Siliceo, M., Garcia-Bernal, D., Carrasco, S., Diaz-Flores, E., Coluccio Leskow, F., Teixido, J., Kazanietz, M. G., and Merida, I. (2006) *J Cell Sci* 119, 141-152
29. Sander, B., Flygare, J., Porwit-Macdonald, A., Smith, C. I., Emanuelsson, E., Kimby, E., Liden, J., and Christensson, B. (2005) *Int J Cancer* 117, 418-430
30. Leskow, F. C., Holloway, B. A., Wang, H., Mullins, M. C., and Kazanietz, M. G. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5373-5378
31. Iwasato, T., Katoh, H., Nishimaru, H., Ishikawa, Y., Inoue, H., Saito, Y. M., Ando, R., Iwama, M., Takahashi, R., Negishi, M., and Itohara, S. (2007) *Cell* 130, 742-753
32. Beg, A. A., Sommer, J. E., Martin, J. H., and Scheiffele, P. (2007) *Neuron* 55, 768-778
33. Wegmeyer, H., Egea, J., Rabe, N., Gezelius, H., Filosa, A., Enjin, A., Varoqueaux, F., Deininger, K., Schnutgen, F., Brose, N., Klein, R., Kullander, K., and Betz, A. (2007) *Neuron* 55, 756-767
34. Miyake, N., Chilton, J., Psatha, M., Cheng, L., Andrews, C., Chan, W. M., Law, K., Crosier, M., Lindsay, S., Cheung, M., Allen, J., Gutowski, N. J., Ellard, S., Young, E., Iannaccone, A., Appukuttan, B., Stout, J. T., Christiansen, S., Ciccarelli, M. L., Baldi, A., Campioni, M., Zenteno, J. C., Davenport, D., Mariani, L. E., Sahin, M., Guthrie, S., and Engle, E. C. (2008) *Science* 321, 839-843
35. Caloca, M. J., Delgado, P., Alarcon, B., and Bustelo, X. R. (2008) *Cell Signal* 20, 758-770
36. Siliceo, M., and Merida, I. (2009) *J Biol Chem* 284, 11354-11363
37. Canagarajah, B., Leskow, F. C., Ho, J. Y., Mischak, H., Saidi, L. F., Kazanietz, M. G., and Hurley, J. H. (2004) *Cell* 119, 407-418
38. Sosa, M. S., Lewin, N. E., Choi, S. H., Blumberg, P. M., and Kazanietz, M. G. (2009) *Biochemistry* 48, 8171-8178
39. Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., and et al. (1991) *Science* 252, 1651-1656
40. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) *J Mol Biol* 215, 403-410
41. Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
42. Garcia-Bermejo, M. L., Leskow, F. C., Fujii, T., Wang, Q., Blumberg, P. M., Ohba, M., Kuroki, T., Han, K. C., Lee, J., Marquez, V. E., and Kazanietz, M. G. (2002) *J Biol Chem* 277, 645-655

## **VII-Anexo**

**Anexo**

**dbEST Id:** 12366096  
 EST name: MR4-RT0048-070501-010-c02  
 GenBank Acc: BQ328172  
 GenBank gi: 20946364  
 Organ: **kidney\_tumor**  
 Develop. stage: Adult

**SEQUENCE**

```

AAAAAGTGCCTCGTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCG
CTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGC
ATCGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTGCAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAG
TGGTGTGGATTCCCACTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTTCA
GCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGT
TACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTTGTCCTCGGGAGGTGGAAAACAGAC
CAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGCGGATGAGCTTC
TTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACA
CGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAAC
ACTTTGTGGGTGAGAAGAGTTTCGAGTCGATTCATGATCTGGTGACAGAT
    
```

**Traducción:**

```

1 - AAAAAGTGCCTCGTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAG - 60
  - K S A S S C P N L L V P E T W P H Q V S
61 - CGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGA - 120
  - A S H A G R S K Q P Q G G I L K I N E E
121 - GCATCGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTGCAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCG - 180
  - H R R G A I Q D L L A S P G F T F G K R
181 - AGTGGTGTGGATTCCCACTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTC - 240
  - V V F D S H C L K R Q H T F A D G L H S
241 - CAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCA - 300
  - S C T S D A E E Y Q P P I W K S Y L Y Q
301 - GTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTTGTCCTCGGGAGGTGGAAAACAG - 360
  - L Q Q E A P R P K R I I C P R E V E N R
361 - ACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCT - 420
  - P K Y Y G R E F H G I I S R E Q A D E L
421 - TCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTA - 480
  - L G G V E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y
481 - CACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAA - 540
  - T L A L R F G N Q T L N Y R L F H D G K
541 - ACACTTTGTGGGTGAGAAGAGTTTCGAGTCGATTCATGATCTGGTGACAGAT - 592
  - H F V G E K R F E S I H D L V T D X
    
```

TumorKidney **KVRRRSNLRGPETWPHQVSASHAGRSKQPQGGILKINEEHRRGAIQDLLASPGFTFGKRV**  
 beta2 -----MR-----LLSSLG-----  
 : \* : \* : \*

TumorKidney VFDSHCLKRQHTFADGLHSSCTSDAEYQPPIWKSYLEYQLQQEAPRPKRIICPREVENRP  
 beta2 -----SSVSSDAEYQPPIWKSYLEYQLQQEAPRPKRIICPREVENRP  
 \*\* .\*\*\*\*\*

TumorKidney KYYGREFHGIISREQADELGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFNGQTLNRYLRFHDGKH  
 beta2 KYYGREFHGIISREQADELGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFNGQTLNRYLRFHDGKH  
 \*\*\*\*\*

TumorKidney FVGEKRFESIHDLVTDX  
 beta2 FVGEKRFES-----  
 \*\*\*\*\*

**dbEST Id:** 33122110  
**EST name:** DA160372  
**GenBank Acc:** DA160372  
**GenBank gi:** 79821165  
**Organism:** Homo sapiens  
**Tissue type:** amygdala  
**Clone** "BRAMY2020366"

**SEQUENCE**

TGCCGAGGTTGTGAGTTCGTGCCTCACCTGGAGCACCAATGACCCAGACCCACAGGGCAA  
AAAGTGCCTCGTGTGTCCTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCG  
CTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGC  
ATCGGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTGCAAGCCCAGGATTTACATTTGAAAAGCGAG  
TGGTGTGTTGATTCCCCTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTCCA  
GCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGT  
TACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGGGGTGGAAAACAGAC  
CAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTC  
TTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGCAACCAGGATGCTACA  
CGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTAC

**Traducción:**

1 - TGCCGAGGTTGTGAGTTCGTGCCTCACCTGGAGCACCAATGACCCAGACCCACAGGGCAA - 60  
1 - M T Q T H R A K - 8  
61 - AAAGTGCCTCGTGTGTCCTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCG - 120  
9 - S A S S C P N L L V P E T W P H Q V S A - 28  
121 - CTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGC - 180  
29 - S H A G R S K Q P Q G G I L K I N E E H - 48  
181 - ATCGGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTGCAAGCCCAGGATTTACATTTGAAAAGCGAG - 240  
49 - R R G A I Q D L L A S P G F T F G K R V - 68  
241 - TGGTGTGTTGATTCCCCTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTCCA - 300  
69 - V F D S H C L K R Q H T F A D G L H S S - 88  
301 - GCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGT - 360  
89 - C T S D A E E Y Q P P I W K S Y L Y Q L - 108  
361 - TACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGGGGTGGAAAACAGAC - 420  
109 - Q Q E A P R P K R I I C P R G V E N R P - 128  
421 - CAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTC - 480  
129 - K Y Y G R E F H G I I S R E Q A D E L L - 148  
481 - TTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGCAACCAGGATGCTACA - 540  
149 - G G V E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y T - 168  
541 - CGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTAC - 578  
169 - L A L R F G N Q T L N Y X - 188

Amygdala **MTQTHRAKSASSCPNLLVPETWPHQVSASHAGRSKQPQGGILKINEHRRGAIQDLLASP**  
beta2-chimaerin -----MRLSS-  
\*\*:\*

Amygdala **GFTFGKRVVFDSSHCLKRQHTFADGLHSSCTSDAEYQPPIWKSYLYQLQOEAPRPKRIIC**  
beta2-chimaerin -----LS-G--SSVSSDAEYQPPIWKSYLYQLQOEAPRPKRIIC  
:: \* \*\* :\*\*\*\*\*

Amygdala PRGVENRPKYYGREFHGIISREQADELGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLYN  
beta2-chimaerin PREVENRPKYYGREFHGIISREQADELGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLYN  
\*\* \*\*\*\*\*

Amygdala -----  
beta2-chimaerin RLFHDGKHVFGEKRFESIIDLVTGLITLYIETKAAEYISKMTTNPYIEHIGYATLLREK

Amygdala -----  
beta2-chimaerin VSRRLSRKNEPRKTNVTHEHTAVEKISSLVRAALHNDNHFNYEKTHNFVHTFRGP

**dbEST Id:** 33048109  
**EST name:** DA190643  
**GenBank Acc:** DA190643  
**GenBank gi:** 79172483  
**Organism:** Homo sapiens  
**Tissue type:** amygdala

**SEQUENCE**

GCAGAACTCGAGCCTTTAAGCGCTCCTCTAGGCTCACATGACCCAGACCCACAGGGCAAA  
AAGTGCCTCGTTCCTCCCAACCTCCTGGTCCCGGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGC  
TTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCA  
TCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAGT  
GGTGTGTTGATTCCTACTGTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATCCAG  
CTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGTT  
ACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCCTCGGGAGGTGGAAAACAGACC  
AAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCT  
TGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACAC  
GCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTTCACGACGGGAAACA

**Traducción:**

1 - GCAGAACTCGAGCCTTTAAGCGCTCCTCTAGGCTCACATGACCCAGACCCACAGGGCAAA - 60  
1 - M T Q T H R A K - 8  
61 - AAGTGCCTCGTTCCTCCCAACCTCCTGGTCCCGGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGC - 120  
9 - S A S S C P N L L V P E T W P H Q V S A - 28  
121 - TTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCA - 180  
29 - S H A G R S K Q P Q G G I L K I N E E H - 48  
181 - TCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAGT - 240  
49 - R R G A I Q D L L A S P G F T F G K R V - 68  
241 - GGTGTGTTGATTCCTACTGTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATCCAG - 300  
69 - V F D S H C L K R Q H T F A D G L H S S - 88  
301 - CTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGTT - 360  
89 - C T S D A E E Y Q P P I W K S Y L Y Q L - 108  
361 - ACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCCTCGGGAGGTGGAAAACAGACC - 420  
109 - Q Q E A P R P K R I I C P R E V E N R P - 128  
421 - AAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCT - 480  
129 - K Y Y G R E F H G I I S R E Q A D E L L - 148  
481 - TGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACAC - 540  
149 - G G V E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y T - 168  
541 - GCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTTCACGACGGGAAACA - 600  
169 - L A L R F G N Q T L N Y R L F H D G K X - 188  
601 - - 600  
189 - - 208

Amygdala **MTQTHRAKSASSCPNLLVPETWPHQVSASHAGRSKQPQGGILKINEEHRGAIQDLLASP**  
beta2-chimaerin -----MRLSS-  
\*\*:\*

Amygdala **GFTFGKRVVFDSSHCLKRQHTFADGLHSSCTSDAEYQPPIWKSYLYQLQQEAPRPKRIIC**  
beta2-chimaerin -----LS-G--SSVSSDAEYQPPIWKSYLYQLQQEAPRPKRIIC  
:: \* \*\* :\*\*\*\*\*

Amygdala PRGVENRPKYGREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQLNY  
beta2-chimaerin PREVENRPKYGREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQLNY  
\*\* \*\*\*\*\*

Amygdala -----  
beta2-chimaerin RLFHDGKHVFGEKRFESIHDLVTDGLITLYIETKAAEYISKMTNPIYEHIGYATLLREK

Amygdala -----  
beta2-chimaerin VSRRLSRSKNEPRKTNVTHEHTAVEKISSLVRRRAALHNDNHFNYEKTHNFVHTFRGP

## β3-chimaerin número de acceso: GenBank bankit1266590 GQ924106

1 - ATGACCCAGACCCACAGGGCAAAAAGTGCCTGCTGCTGCTGCCAACCTCCTGGTCCCAGAA - 60  
 M T Q T H R A K S A S S C P N L L V P E  
 61 - ACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGA - 120  
 T W P H Q V S A S H A G R S K Q P Q G G  
 121 - ATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGGCGGGGTGCCATTTCAGACTTACTTGCAAGCCCA - 180  
 I L K I N E E H R R G A I Q D L L A S P  
 181 - GGATTTACATTTGGAAAGCGAGTGGTGTGTTGATTCCCACTGTTAAAAAGGCAACACACG - 240  
 G F T F G K R V V F D S H C L K R Q H T  
 241 - TTCGCTGATGGTCTACATTCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATA - 300  
 F A D G L H S S C T S D A E E Y Q P P I  
 301 - TGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTTGT - 360  
 W K S Y L Y Q L Q Q E A P R P K R I I C  
 361 - CCTCGGGAGGTGGAAAACAGACCAAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCT - 420  
 P R E V E N R P K Y Y G R E F H G I I S  
 421 - CGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAGC - 480  
 R E Q A D E L L G G V E G A Y I L R E S  
 481 - CAGCGQAACAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTAC - 540  
 Q R Q P G C Y T L A L L R F G N Q T L N Y  
 541 - AGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGATTCATGAT - 600  
 R L F H D G K H F V G E K R F E S I H D  
 601 - CTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCA - 660  
 L V T D G L I T L Y I E T K A A E Y I S  
 661 - AAAATGACAACTAACCCCATCTATGAACACATTTGGATATGCCACCTACTCAGAGAAAAA - 720  
 K M T T N P I Y E H I G Y A T L L R E K  
 721 - GTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTCTAAAAATGAACCAAGAAAAACAAACGTACACATGAA - 780  
 V S R R L S R S K N E P R K T N V T H E  
 781 - GAACACACAGCGGTGGAAAAGATCTCCTCCCTGGTTCGAAGGGCTGCCCTCACACACAAC - 840  
 E H T A V E K I S S L V R R A A L T H N  
 841 - GACAACCACTTCAATTATGAGAAGACACAACTTTAAGGTCCACACGTTCCGAGGCCCA - 900  
 D N H F N Y E K T H N F K V H T F R G P  
 901 - CACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTTCATGTGGGGGCTCATCGCCCAAGGGTCCGGTGC - 960  
 H W C E Y C A N F M W G L I A Q G V R C  
 961 - TCAGACTGTGGATTGAACGTACACAAACAGTGTTCCAAGCACGTTCCCAATGACTGCCAA - 1020  
 S D C G L N V H K Q C S K H V P N D C Q  
 1021 - CCTGATCTCAAGAGGATCAAGAAAGTGTACTGTTGTGACCTCACAACACTTGTGAAGGCT - 1080  
 P D L K R I K K V Y C C D L T T L V K A  
 1081 - CACAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATATGCATTCGGGAAATGAAGCAAGAGGA - 1140  
 H N T Q R P M V V D I C I R E I E A R G  
 1141 - TTAAAATCGGAAGGCCTTTACAGAGTCTCTGGGTTCACTGAACACATTGAAGATGTCAAA - 1200  
 L K S E G L Y R V S G F T E H I E D V K  
 1201 - ATGGCATTGACAGAGATGGTAAAAGGCCGATATATCTGCCAATGTCTATCCAGACATA - 1260  
 M A F D R D G E K A D I S A N V Y P D I  
 1261 - AACATCATCACTGGAGCCCTTAAACTGTATTTTCAGAGACTTACCCATCCCTGTATCACA - 1320  
 N I I T G A L K L Y F R D L P I P V I T  
 1321 - TATGATACCTATTCCAAATTTATAGATGCAGCAAAAATCTCCAATGCAGATGAGAGGCTG - 1380  
 Y D T Y S K F I D A A K I S N A D E R L  
 1381 - GAAGCCGTCCATGAAGTGTGATGCTGCTGCTGCCCTCCTGCCACTATGAAACCCCTCCGGTAC - 1440  
 E A V H E V L M L L P P A H Y E T L R Y  
 1441 - CTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAATGAAAAGACAAATTCATGAATGCAGAA - 1500  
 L M I H L K K V T M N E K D N F M N A E  
 1501 - AATCTGGGATCGTGTGTTGGCCACTCTGATGAGGCCCCCTGAGGACAGCACCCCTGACC - 1560  
 N L G I V F G P T L M R P P E D S T L T  
 1561 - ACCCTGCATGATATGCGGTACCAAAAAGCTGATTGTGCAGATTTTAATAGAAAACGAAGAC - 1620  
 T L H D M R Y Q K L I V Q I L I E N E D  
 1621 - GTTTTATTCTAA - 1632  
 V L F \* X

**β2-chimaerin numero de acceso: L29126 {Leung, 1994 #634}**

GCTGTTGGCGTGAGTTGATCGAGCCGCAGCCGAGCTCTCGCAGCTCAGCCTGGTAGACGTCT  
 GCCAGCTTGGTGGGCTCCTTGCCCCGAGCTGGTTCAGCCTCAGCAGCCAGCGCCTTGTTTTG  
 CTGTTCCAGGAAGCGAACCTTCTCGATGTAGCTGGCAAAGCGGTATTGAGCTCCATCATCTCT  
 GCCCGCTCACTGGCCCGGGTCTCCTTGAAGCCAGCATTGAGTGCCCCAGCCAGGGAGAAATCC  
 ACCCGGGTCGGAGTGGAGGGGCATTCGAGCCAGGGAGAGGGCGGTGCAGGACCCAGACGGCG  
 GCCAGGAGCCAGGCCCCCCACCATCATCTCCCTGAGGAGACGTAGGAGCGGCGAGCAGCGGA  
 1 - GGTGATGCGTCTCCTCTCCAGCCTGTCCGGCTCGTGGTGTCTCCGATGCTGAAGAATA - 60  
 - M R L L S S L S G S S V S S D A E E Y  
 61 - CCAGCCTCCTATATGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAA - 120  
 - Q P P I W K S Y L Y Q L Q Q E A P R P K  
 121 - GAGAATCATTGTCTCGGGAGGTGGAACACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCA - 180  
 - R I I C P R E V E N R P K Y Y G R E F H  
 181 - TGGGATCATCTCTCGGGAGCAGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACAT - 240  
 - G I I S R E Q A D E L L G G V E G A Y I  
 241 - CCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCA - 300  
 - L R E S Q R Q P G C Y T L A L R F G N Q  
 301 - GACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGA - 360  
 - T L N Y R L F H D G K H F V G E K R F E  
 361 - GTCGATTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACATAGAAACAAAAGTGC - 420  
 - S I H D L V T D G L I T L Y I E T K A A  
 421 - CGAGTACATTTCAAAAATGACAACCAACCCCATCTATGAACACATTGGATATGCCACCT - 480  
 - E Y I S K M T T N P I Y E H I G Y A T L  
 481 - ACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTCTAAAAATGAACCAAGAAAAACAAA - 540  
 - L R E K V S R R L S R S K N E P R K T N  
 541 - CGTCACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAAAGATCTCCTCCCTGGTTCGAAGGCTGC - 600  
 - V T H E E H T A V E K I S S L V R R A A  
 601 - CCTCACACACAACGACAACCACTTCAATTATGAGAAGACACACAACCTTTAAGGTCCACAC - 660  
 - L T H N D N H F N Y E K T H N F K V H T  
 661 - GTTCCGAGGCCACACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTTCATGTGGGGGCTCATCGCCCA - 720  
 - F R G P H W C E Y C A N F M W G L I A Q  
 721 - AGGGTCCGGTGTCTCAGACTGTGGATTGAACGTACACAAACAGTGTTCGAAGCAGTTCC - 780  
 - G V R C S D C G L N V H K Q C S K H V P  
 781 - CAATGACTGCCAACCTGATCTCAAGAGGATCAAGAAAAGTGTACTGTTGTGACCTCACAAC - 840  
 - N D C Q P D L K R I K K V Y C C D L T T  
 841 - ACTTGTGAAGGCTCACAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATATGCATTCGGGAAAT - 900  
 - L V K A H N T Q R P M V V D I C I R E I  
 901 - TGAAGCAAGAGGATTTAAATCGGAAGGCCTTACAGAGTCTCTGGGTTCAGTGAACACAT - 960  
 - E A R G L K S E G L Y R V S G F T E H I  
 961 - TGAAGATGTCAAAATGGCATTGACAGAGATGGTGAAGGCGGATATATCTGCCAATGT - 1020  
 - E D V K M A F D R D G E K A D I S A N V  
 1021 - CTATCCAGACATAAACATCATACTGGAGCCCTTAAACTGTATTCAGAGACTTACCCAT - 1080  
 - Y P D I N I I T G A L K L Y F R D L P I  
 1081 - CCCTGTCTACATATGATACCTATTCCAAATTTATAGATGCAGCAAAAATCTCCAATGC - 1140  
 - P V I T Y D T Y S K F I D A A K I S N A  
 1141 - AGATGAGAGGCTGGAAGCCGTCCATGAAGTGTGATGCTGCTGCCTCCTGCCACTATGA - 1200  
 - D E R L E A V H E V L M L L P P A H Y E  
 1201 - AACCTCCGGTACCTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAATGAAAAGACAATTT - 1260  
 - T L R Y L M I H L K K V T M N E K D N F  
 1261 - CATGAATGCAGAAAATCTGGGGATCGTGTGTTGGGCCACTCTGATGAGGCCCCCTGAGGA - 1320  
 - M N A E N L G I V F G P T L M R P P E D  
 1321 - CAGCACCTGACCACCTGCATGATGCGGTACCAAAAGCTGATTGTGCAGATTTTAAT - 1380  
 - S T L T T L H D M R Y Q K L I V Q I L I  
 1381 - AGAAAACGAAGACGTTTTATTCTAATCCAT - 1410  
 - E N E D V L F \*



## Clones positivos secuenciados K2 (riñón) 1b (Encéfalo)

**K2** NNTNNNGANNNGNTNNCNNNTTACNCAGGAANCAGCTATGNCCATGATTACNCCAAGCT  
**1b** -----NNNNNNNN  
**Beta3Silico** -----

**K2** TGGTNCCGAGNTCGGANCCNNTAGTAACGGCCGNCAGTGTGCTGGAATTCNCCNTTCTCG  
**1b** NNNNNNNGNNNNAGCGGCCGCCAGTGT--GNTGGANATCTGC-AGAATTCGCCCTTCTCG  
**Beta3Silico** -----TGCCGAGGTTGTG--AGTTCGTGCCTCACCTG

**K2** AGGGANCC**ATGACCCAGACCCACAGG**GCAAAAAGTGCCTCGTGTGCCAACCTCTG**N**  
**1b** AGGGATCC**ATGACCCAGACCCACAGG**GCAAAAAGTGCCTCGTGTGCCAACCTCTG**G**  
**Beta3Silico** GAGCACC**ATGACCCAGACCCACAGG**GCAAAAAGTGCCTCGTGTGCCAACCTCTG**G**  
 \*\*\*\*\*

**K2** TCCC**G**GAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCC  
**1b** TCCC**G**GAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCC  
**Beta3Silico** TCCC**A**GAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCC  
 \*\*\*\* \*\*\*\*\*

**K2** AGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTG  
**1b** AGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTG  
**Beta3Silico** AGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGCGGGGTGCCATTCAGGACTTACTTG  
 \*\*\*\*\*

**K2** CAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAGTGGTGTGTTGATTCCCACTGTTTAAAAAGGC  
**1b** CAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAGTGGTGTGTTGATTCCCACTGTTTAAAAAGGC  
**Beta3Silico** CAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAGTGGTGTGTTGATTCCCACTGTTTAAAAAGGC  
 \*\*\*\*\*

**K2** AACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGC  
**1b** AACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGC  
**Beta3Silico** AACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGC  
 \*\*\*\*\*

**K2** CTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAA  
**1b** CTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAA  
**Beta3Silico** CTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAA  
 \*\*\*\*\*

**K2** TCATTTGTCTCGGGAGGTGAAAAACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGA  
**1b** TCATTTGTCTCGGGAGGTGAAAAACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGA  
**Beta3Silico** TCATTTGTCTCGGGAGGTGAAAAACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGA  
 \*\*\*\*\*

**K2** TCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTA  
**1b** TCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTA  
**Beta3Silico** TCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTA  
 \*\*\*\*\*

**K2** GAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCT  
**1b** GAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCT  
**Beta3Silico** GAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCT  
 \*\*\*\*\*

**K2** TAAACTACAGGCTCTTCC**AG**CACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGA  
**1b** TAAACTACAGGCTCTTCC**AG**CACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGA  
**Beta3Silico** TAAACTACAGGCTCTTCC**AG**CACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGAGTCGA  
 \*\*\*\*\*

**K2** TTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAAACTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGT  
**1b** TTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAAACTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGT  
**Beta3Silico** TTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAAACTGTACATAGAAACAAAAGCTGCCGAGT



## Homo sapiens cDNA FLJ59496 complete cds, highly similar to Beta-chimaerin

GenBank: AK294271.1  
 GenBank gi: 221039909  
 Clone: "BRAMY2020366"  
 ORGANISM: Homo sapiens  
 tissue type: "amygdala"

### SEQUENCE:

TGCCGAGGTTGTGAGTTCGTGCCTCACCTGGAGCACCAATGACCCAGACCCACAGGGCAAAAAGTGCCTC  
 GTCGTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCGCTTCCCATGCTGGAAGAAGC  
 AAGCAGCCCCAGGGTGGAACTTTAAAAATTAATGAAGAGCATCGGCAGGGTGCATTCCAGGACTTACTTG  
 CAAGCCAGGATTTACATTTGGAAAAGCGAGTGGTGTGGATGCCACTGTTTAAAAAGGCAACACACGTT  
 CGCTGATGGTCTACATTTCCAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATA  
 TTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGGGTGGAAAACAGAC  
 CAAAATATTTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGT  
 GGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGG  
 AACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGTGAGTCGA  
 TTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACATAGAAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCAA  
 AATGACAACCTAACCCCATCTATGAACACATTTGGATATGCCACCTACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGG  
 CTGAGCAGGTCTAAAAATGAACCAAGAAAAACAACGTCACACATGAAGAACAACAGCGGTGGAAAAGA  
 TCTCCTCCCTGGTTTGAAGGGCTGCCCTCACACACAACGACAACCACCTTCAATTATGAGAAGACACACAA  
 CTTTTAAGTCCACACGTTCCGAGGCCACACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTTCATGTGGGGGCTCATC  
 GCCAAGGGGTCCGGTGTCTCAGACTGTGGATTGAACGTACACAAACAGTGTCCAAGCACGTTCCCAATG  
 ACTGCCAACCTGATCTCAAGAGGATCAAGAAAAGTGTACTGTTGTGACCTCACAACTTGTGAAGGCTCA  
 CAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATATGCATTCCGGGAAATTGAAGCAAGAGGATTTAAATCGAA  
 GGCCTTTACAGAGTCTCTGGGTTCACTGAACACATTGAAGATGTCAAAATGGCATTGTGACAGAGATGGTG  
 AAAAGGCCGATATATCTGCCAATGTCTATCCAGACATAAACATCATCACTGGAGCCCTTAACTGTATTT  
 CAGAGACTTACCCATCCCTGTCATCACATATGATACCTATTTCAAATTTATAGATGCAGCAAAAATCTCC  
 AATGCAGATGAGAGGCTGGAAGCCGTCATGAAGTGTGATGCTGCTGCCTCCTGCCACTATGAAACCC  
 TCCGGTACCTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAATGAAAAAGACAATTTTCATGAATGCAGAAA  
 TCTGGGGATCGTGTGGGGCCACTCTGATGAGGCCCTGAGGACAGCACCCCTGACCACCTGCATGATGAT  
 ATGCGGTACCAAAAGCTGATTTGTGAGATTTAATAGAAAACGAAGACGTTTTATTCTAATCCATCAGGG  
 AAATGAGCTGAATGGCCCCAGCACCATCCAAGTTGACACAGCTAAAGGAATAAAAAACATTTCTTACCCT  
 TGATTTGTTTTCCAAGCAAGTGTGCTAGAATTTGCTGGACTGCAGAGGATCGCTGAGTGGGGTACTGTGTCT  
 CATAGACATGCGCCACCTCCACGTGAGAACAAGGGTGAAGGTGAGGGAAGCCCTCACCTTGGGTCTTTT  
 GCTGTGCCTCCTATGTATGTCTGGTTTGTGGAAGAGTGATTAATACATCTTTAATTTATTAAAAAACAA  
 TGTAGACCTTTAACTTCAGTCTTATTGGTAATAAAAGGGAACCTAATTCATACAGGTACTTGATACAGT  
 TATACATTTCCACTTACAAAAAGAAGACAATTTCTGTTAAATGAAACCTGTATCGTAAAATGTATCTTTA  
 TTTTACCCACGAGAATGTTGTTATTTTTAGC

### Traducción:

MTQTHRAKSASSCPNLLVPETWPHQVSASHAGRSKQPQGGILKI  
 NEEHRRGAIQDLLASPGFTFGKRVVFDHSHCLKRQHTFADGLHSSCTSDAEEYQPPIWK  
 SYLYQLQOEAPRPKRIICPRGVENRPKYYGREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRES  
 QRQPGCYTLALRFNGQTLNRYRLFHDGKHFVGEKRFESIHDLVTDGLITLYIETKAAEY  
 ISKMTTNPYIEHIGYATLLREKVSRRLSRSKNEPRKTNVTHEEHTAVEKISSLVRRAA  
 LTHNDNHFNYEKTHNFVKVHTFRGPHWCEYCANFMWGLIAQGVRCSDCGLNVHKQCSKH  
 VPNDQCPLKRIKKVYCCDLTTLVKAHNTQRPVVVICIREIEARGLKSEGLYRVSGF  
 TEHIEDVKMAFDRDGEKADISANVYPDINIITGALKLYFRDLPIPVITYDYTSKFIDA  
 AKISNADERLEAVHEVLMMLPPAHYETLRYLMIHLKVTMNEKDNFMNAENLGI VFGP  
 TLMRPPEDSTLTTLHDMRYQKLIVQILIEDVLF