

CLONADO Y CARACTERIZACIÓN DE b3- CHIMAERIN: UN NUEVO GAP CON ACTIVIDAD ESPECÍ- FICA PARA RAC, REGULADO POR DAG.

Zubeldia Brenner L, Coso O, Jares-Erijman EA y
Coluccio-leskow F.

Cita:

Zubeldia Brenner L, Coso O, Jares-Erijman EA y Coluccio-leskow F
(2009). *CLONADO Y CARACTERIZACIÓN DE b3- CHIMAERIN: UN NUEVO
GAP CON ACTIVIDAD ESPECÍ- FICA PARA RAC, REGULADO POR DAG. LIV
REUNION CIENTIFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación
Clínica (SAIC). Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del
Plata.*

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lautaro.zubeldia.brenner/8>

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



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>.*

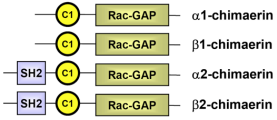
Clonado y caracterización de $\beta 3$ -chimaerin: una novedosa isoforma con actividad de GAP específica para Rac, regulada por DAG

Lautaro Zubeldia Brenner¹, Omar A. Coso², Elizabeth Jares-Erijman¹ and Federico Coluccio Leskow¹.

¹Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA. ²DFBMC, FCEyN, UBA, IFIBYNE-CONICET.

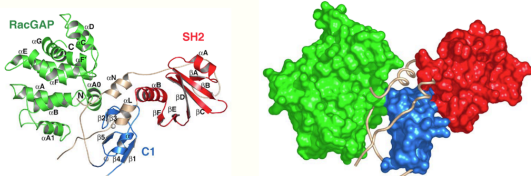
Las chimaerinas o quimerinas son una familia de receptores para diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol con actividad de GAP específica para Rac. Existen cuatro isoformas descritas hasta el momento ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$). Todas las quimerinas poseen un dominio GAP responsable de su actividad y un dominio C1, como el de las PKCs, capaz de pegar DAG y ésteres de forbol. Por otro lado, $\alpha 2$ y $\beta 2$ -chimaerin presentan un dominio SH2 en su porción N-terminal involucrado en funciones autoinhibitorias según el modelo de activación alostérica recientemente propuesto. En ensayos de Western blot de lisados de distintos tejidos, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-quimerina, se detectaron bandas de un peso molecular ligeramente mayor a $\beta 2$ -chimaerin. En la base de datos del NCBI se encontraron varios ESTs que codifican para una isoforma con un extremo N-terminal desconocido. Esta isoforma que denominamos $\beta 3$ -chimaerin, tiene su origen de transcripción 48 Kb río arriba del de $\beta 2$ -chimaerin y se expresa en riñón, glándula adrenal, corazón y cerebro. Se llevó a cabo el clonado molecular de $\beta 3$ -chimaerin utilizando como template cDNAs humanos comerciales de riñón y de encéfalo. La región codificante para $\beta 3$ -chimaerin se subclonó en distintos vectores de expresión. Células transfectadas con estas construcciones se estimularon con PMA, en presencia de inhibidores de PKCs, observándose la translocación de $\beta 3$ -chimaerin desde el citoplasma hacia la membrana plasmática y el perinúcleo. Estos resultados confirman el modelo de activación por DAG y sugieren que el dominio N-terminal de $\beta 3$ -chimaerin le confiere una regulación diferencial.

Introducción



Las Quimerinas son una familia de proteínas receptoras de ésteres de forbol y diacilglicerol con actividad de Rac-GAP. Son una "Quimera" entre la región reguladora de las PKCs, y el BCR (Breakpoint Cluster Region). Las cuatro isoformas descritas poseen un dominio C1 homólogo al de las PKCs y un dominio de GAP (GTPase activating protein) específico para Rac.

Estas proteínas son codificadas por los genes CHN1 o α y CHN2 o β , los cuales generan las isoformas 1 y 2. Los dominios C1 y GAP producidos de cada gen poseen un 94% de identidad de secuencia. La región N-terminal presenta diferencias entre las isoformas 1 y 2. Las isoformas 1 poseen una región inicial corta y de función aún desconocida, mientras que las isoformas 2 presentan un dominio SH2.



Estructura tridimensional de $\beta 2$ -Chimaerin, con los dominios SH2 en rojo, C1 en azul y GAP en verde. Las regiones N-terminal y linker en gris. La figura de la izquierda es el modelo de cintas, la de la derecha es la representación de espacio ocupado, las regiones conectoras aparecen representadas como gusanos.

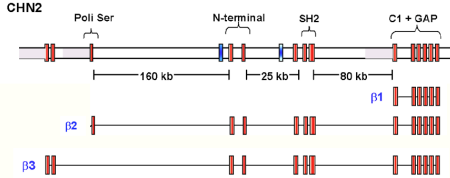
Clonado *in silico* de $\beta 3$ -chimaerin

La existencia de ESTs (expressed sequence tags) humanos en las bases de datos públicas sugieren la existencia de esta novedosa isoforma que llamamos $\beta 3$ -chimaerin. Estos ESTs coinciden en secuencia con $\beta 2$ -chimaerin salvo en su extremo 5'.

El extremo 5' de estas secuencias se corresponde con dos exones encontrados 48 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de $\beta 2$ -chimaerin.

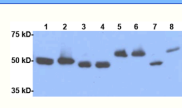
EST	Organismo	T Tejido	Tamaño total (pb)	ATG	No. de aa distintos a $\beta 2$ -chimaerin	No. de aa. En común con $\beta 2$ -chimaerin	Clon
1	Homo Sapiens	Tumor de riñón	592	No	84	113	MR4.R7048.70501.d10-c02
2	Homo Sapiens	Amígdala cerebral	578	Si	92	89	BRAMY200366
3	Homo Sapiens	Amígdala cerebral	600	Si	92	97	BRAMY303341

Esto sugiere la existencia de por lo menos tres isoformas codificadas por el gen CHN2 o β que se generan por sitios alternativos de origen de la transcripción. La isoforma específica de testículo, $\beta 1$ -chimaerin, que tiene su origen de la transcripción en una región intrónica de $\beta 2$ -chimaerin mientras que $\beta 3$ -chimaerin que tendría su sitio de inicio de la transcripción 48kb río arriba del sitio de la secuencia codificante para $\beta 2$ -chimaerin. Dos exones son los que codifican para un nuevo dominio en el N-Terminal de 90 aminoácidos, cuya función nos proponemos estudiar.

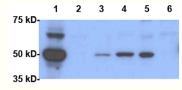


Esquema que muestra la disposición genómica de los exones que codifican para los mensajeros de las isoformas β . Se observan los dos exones novedosos que son los que generarían este putativo dominio que queremos describir funcionalmente.

Expresión en tejidos de ratón y diferentes líneas celulares



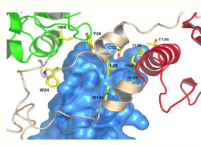
Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal contra el dominio GAP de quimerinas HAR-2. Lisados de distintos tejidos de ratón resultos por PAGE-SDS 10% acrilamida. 1 extracto de cerebro, 2 cerebro, 3 pons, 4 corteza cerebral, 5 glándula adrenal, 6 riñón, 7 testículo, 8 corazón. En glándula adrenal, riñón y corazón se observa una isoforma de 60 kDa



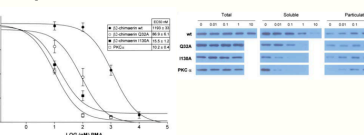
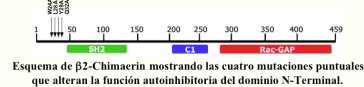
Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal HAR-2. Lisados de distintas líneas celulares resultos por PAGE-SDS 10% acrilamida. 1 Neuro2a, 2 NIH-3T3, 3 Rat-1, 4 PC12, 5 SK-N-SH, 6 U-937. Las líneas celulares SK-N-SH y Neuro2a expresan una isoforma de 60 kDa que podría corresponderse con la denominada $\beta 3$ -chimaerin.

El extremo N-terminal de $\beta 2$ -Chimaerin cumple una función autoinhibitoria

El análisis de la estructura cristalográfica de $\beta 2$ -chimaerin muestra que el dominio N-terminal oculta el sitio de unión a DAG. El modelo autoinhibitorio fue confirmado mediante el análisis de mutantes puntuales. Cuatro de estas mutantes pertenecen a residuos del dominio N-terminal.



Modelado molecular mostrando la función autoinhibitoria del dominio. En azul: dominio C1; en rojo: dominio SH2; en verde: dominio GAP; en gris: α -hélices N-terminal, y conectora.



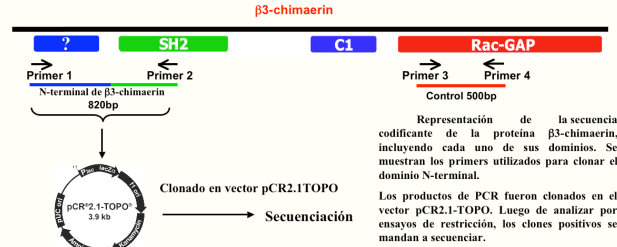
Translocación a membrana de las mutantes Q32A e H130A en células COS-1 en respuesta a distintas concentraciones de PMA.

Bibliografía:

- Identification of an autoinhibitory mechanism that restricts C1 domain-mediated activation of the Rac-GAP alpha 2-chimaerin. Colon-Gonzalez F, Coluccio Leskow F, Kazanietz MG. *J Biol Chem.* 2008 Sep 30. [Epub ahead of print]
- Human CHN1 mutations hyperactivate alpha2-chimaerin and cause Diane's retraction syndrome. Miyake N, et al. *Science.* 2008 Aug 8;321(5890):839-43.
- Phospholipase C gamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. Wang H, Yang C, Leskow FC, Sun J, Canagarajah B, Hurley JH, Kazanietz MG. *EMBO J.* 2006 May 17;25(10):2062-74. Epub 2006 Apr 20.
- Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin. Canagarajah B, Leskow FC, Ho JY, Mischak H, Saïdi LF, Kazanietz MG, Hurley JH. *Cell.* 2004 Oct 29;119(3):407-18.

Clonado por PCR de $\beta 3$ -chimaerin

Para amplificar la secuencia codificante del dominio N-terminal de $\beta 3$ -chimaerin por PCR se diseñaron primers específicos teniendo en cuenta la secuencia de $\beta 3$ -chimaerin reportada en los ESTs. Se utilizaron como templates cDNAs humanos comerciales de riñón y de encéfalo (BioBank).

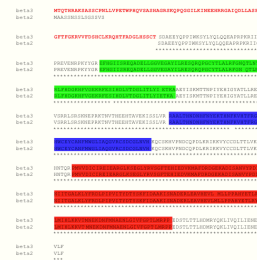


Electroforesis en gel de agarosa 1% que muestra los clones positivos, luego de digerir el vector pCR2.1TOPO con la enzima de restricción EcoRI. Cables 1 a 3: clones obtenidos a partir de cDNA comercial humano de riñón; cable 4: clon obtenido a partir de cDNA comercial humano de encéfalo

Todos los clones positivos fueron secuenciados obteniéndose la secuencia esperada en ambos casos. Cabe destacar que proviene de cDNAs de distintos tejidos, por lo que se puede afirmar que el mensajero codificante de $\beta 3$ -chimaerin se expresa en riñón y en alguno o varios tipos celulares del encéfalo.

La secuencia que codifica para el extremo N-terminal novedoso de $\beta 3$ -chimaerin fue subclonada reemplazando la de $\beta 2$ -chimaerin en distintos vectores de expresión.

De esta manera se obtuvo la secuencia completa de $\beta 3$ -chimaerin en distintos vectores, incluyendo fusiones con YFP, GFP y HA.



Alineación de las secuencias de $\beta 2$ -chimaerin y $\beta 3$ -chimaerin.

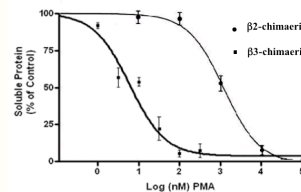
En rojo los 90 aminoácidos N-terminales exclusivos de $\beta 3$ -chimaerin.

Verde: Dominio SH2
Azul: Dominio C1
Rojo: Dominio de GAP

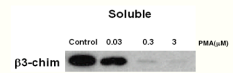
$\beta 3$ -chimaerin en un receptor de ésteres de forbol de alta afinidad.

Se analizó por ensayos de fraccionamiento subcelular en células COS-1 la translocación a membrana de $\beta 3$ -chimaerin en respuesta a diferentes concentraciones de PMA (análogo de DAG) en presencia de un inhibidor específico de las PKCs (5 μ M GF109203X).

$\beta 3$ -chimaerin es 100 veces más sensible a la translocación por PMA que $\beta 2$ -chimaerin.



Gráfica de la cuantificación de la translocación de $\beta 3$ -chimaerin en respuesta a PMA. La figura de la derecha muestra el resultado de un Western blot representativo.



Conclusiones

- Se clonó el cDNA de una isoforma de chimaerin de 60 kDa que denominamos $\beta 3$ -chimaerin.
- $\beta 3$ -chimaerin se expresa en: riñón, glándula adrenal y corazón así como en células de neuroblastoma murino N2a. En humanos se detectó el mensajero en riñón y cerebro.
- $\beta 3$ -chimaerin contiene un dominio N-terminal de 90 aminoácidos.
- $\beta 3$ -chimaerin es 100 veces más sensible a PMA que $\beta 2$ -chimaerin. Esto sugiere que el dominio N-terminal no sería un dominio autoinhibitorio.