

XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Villa Carlos Paz/Córdoba/Argentina, 2008.

# **CLONING AND CHARACTERIZATION OF b3-CHIMAERIN: A NOVEL DAG REGULATED RAC-GAP.**

Zubeldia Brenner L, Coso OA, Jares-Erijman EA y Coluccio Leskow F.

Cita:

Zubeldia Brenner L, Coso OA, Jares-Erijman EA y Coluccio Leskow F (2008). *CLONING AND CHARACTERIZATION OF b3- CHIMAERIN: A NOVEL DAG REGULATED RAC-GAP. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Sociedad Argetina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Villa Carlos Paz/Córdoba/Argetina.*

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lautaro.zubeldia.brenner/9>

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



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>.*

# Cloning and characterization of $\beta 3$ -chimaerin: a novel DAG regulated Rac-GAP

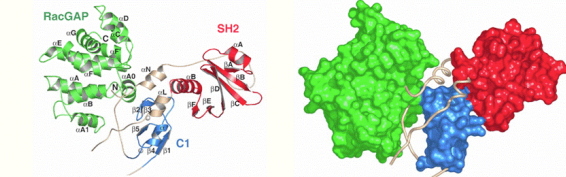
Lautaro Zubeldia Brenner<sup>1</sup>, Omar A. Coso<sup>2</sup>, Elizabeth Jares-Erijman<sup>1</sup> and Federico Coluccio Leskow<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA. <sup>2</sup>DFBMC, FCEyN, UBA, IFIBYNE-CONICET.

Chimaerins comprise a family of phorbol ester/diacylglycerol (DAG) receptors with specific Rac-GAP activity. Two genes are present in mammals ( $\alpha$  and  $\beta$ ), coding for the four isoforms described up to date ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 2$ ). Chimaerins possess a C-terminal Rac specific GAP domain and a C1 domain that binds DAG and phorbol ester with high affinity, similar to that found in PKC isoforms. In addition,  $\alpha 2$ - and  $\beta 2$ -chimaerins have an autoinhibitory N-terminal region containing an SH2 domain involved in the regulation of its activity by DAG. Screening several mouse tissues by Western blot we have recently discovered the presence in kidney, heart and adrenal gland of an isoform showing an extra 10 kDa apparent molecular weight. Searching for EST sequences in the NCBI database, several cDNAs from kidney tumors and amygdala were found to code for a novel isoform we named  $\beta 3$ -chimaerin. This protein differs from  $\beta 2$ -chimaerin on its N-terminal portion having an essential domain involved in the autoinhibitory mechanism replaced by a novel 90 aminoacid sequence coded by two exons 48kb upstream of the  $\beta 2$ -chimaerin transcription start site. Our goal is to clone and characterize  $\beta 3$ -chimaerin and unveil the role of its N-terminal region in the regulation of the activity.

## Introducción

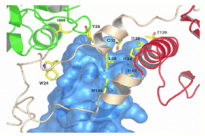
Las Quimerinas son una familia de proteínas receptoras de ésteres de forbol y diacilglicerol con actividad de Quimera" entre la región reguladora de las PKCs, y el BCR (Breakpoint Cluster Region). Las cuatro isoformas descriptas poseen un dominio C1 homólogo a las PKCs y un dominio de GAP (GTPase activating protein) específico para Rac. Estas proteínas son codificadas por los genes CHN1 o  $\alpha$  y CHN2 o  $\beta$ , los cuales se asume que por procesamiento diferencial o "splicing alternativo" 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 de función aún desconocida, mientras que las isoformas 2 presentan un dominio SH2.



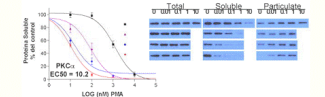
Esquema de  $\beta 2$ -Chimaerin, con los dominios SH2 en rojo, C1 en azul y GAP en verde. Las regiones N-terminal y linker en gris. La figura de la izquierda es el modelo de cintas, la de la derecha es la representación de espacio ocupado, las regiones conectoras aparecen representadas como gusanos.

## 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:  $\alpha$ -hélices N-terminal, y conectora.

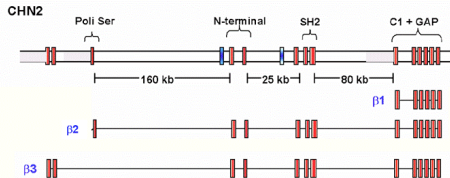


## Evidencias sobre la expresión de $\beta 3$ -chimaerin en diferentes tejidos y líneas celulares

La existencia de ESTs (expressed sequence tags) humanos en las bases de datos publicas, es uno de los indicios que sugieren la existencia de esta novésima 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	Tejido	Tamaño total (pb)	ATG	Nro. de aa distintos a $\beta 2$ -chimaerin	Nro de aa. En común con $\beta 2$ -chimaerin	Clon
1	Homo Sapiens	Tumor de riñón	592	No	54	113	MR4-RT0948-70501-010-c02
2	Homo Sapiens	Amygdala cerebral	578	SI	92	88	BRAMY2020366
3	Homo Sapiens	Amygdala cerebral	600	SI	92	97	BRAMY3013141

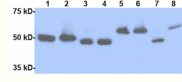
Esto sugiere la existencia de por lo menos tres isoformas codificadas por el gen CHN2 o  $\beta$  que se generan por sitios alternativos de origen de la transcripción y no por splicing alternativo. La isoforma específica de testículo,  $\beta 1$ -chimaerin, que tiene su origen de la transcripción en 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.



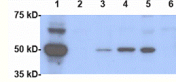
Esquema que muestra la disposición genómica de los exones que codifican para los mensajeros de las isoformas  $\beta$ . Se observan los dos exones novésimos que son los que generarían este putativo dominio que queremos describir funcionalmente.

## Resultados

### Expresión de quimerinas en de tejidos de ratón y diferentes tipos de líneas celulares



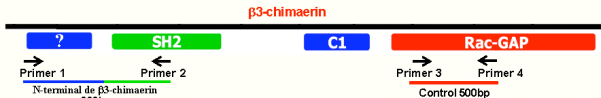
Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal contra el dominio GAP de quimerinas HAR-2. Lisados de distintos tejidos de ratón resueltos por PAGE-SDS 10% acrilamida. 1 extracto de cerebro, 2 cerebelo, 3 pons, 4 corteza cerebral, 5 glándula adrenal, 6 riñón, 7 testículo, 8 corazón. En glándula adrenal,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



Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal HAR-2. Lisados de distintas líneas celulares resueltos 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.

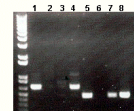
### Estrategia de clonado

Para amplificar la secuencia codificante del dominio N-terminal de  $\beta 3$ -chimaerin utilizamos la técnica de RT-PCR. Se partió de RNA total purificado de las líneas celulares HEK (Human Embryonic Kidney), SH-SY5Y, y SK-N-SH ambas derivadas de neuroblastoma humano, y se sintetizó cDNA para utilizarlo como template. También se utilizaron como templates cDNAs humanos comerciales de riñón y de encéfalo (BioBank), teniendo en cuenta que los ESTs reportados se aislaron de muestras de riñón y cerebro.



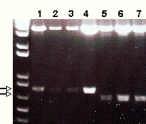
Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO. Luego de analizar por ensayos de restricción, los clones positivos se mandan a secuenciar.

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



Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de PCR utilizando como primers: calles 1 a 4: primers 1 y 2; calles 5 a 6 primers 3 y 4 (control). Como templates se utilizaron: calle 1 y 5: cDNA HEK; calle 2 y 6: cDNA SK-N-SH; calle 3 y 7: cDNA SH-SY5Y; calle 4 y 8: cDNA HEK. Se vio producto de amplificación en las calles cuyo template es el cDNA de HEK.

Electroforesis en gel de agarosa 1% que muestra los clones positivos, luego de digerir el vector pCR2.1-TOPO con la enzima de restricción EcoRI. También se incluyen clones obtenidos por el mismo procedimiento, usando como templates cDNAs comerciales de riñón y encéfalo humano. Calles 1 a 3: clones obtenidos a partir de cDNA comercial humano de riñón; calle 4: clon obtenido a partir de cDNA comercial humano de encéfalo; calles 5 a 7: clones obtenidos a partir de la PCR anterior de las calles conteniendo cDNA de células HEK.



Todos los clones positivos obtenidos en la anterior electroforesis fueron secuenciados. Los clones procedentes del cDNA de células HEK no poseían la secuencia completa esperada de  $\beta 3$ -chimaerin. Estos carecen de un exón interno y no codifican una proteína viable por estar corrido el marco de lectura.

Los clones correspondientes a cDNAs comerciales de riñón (calles 1 a 3), y encéfalo (calle 4) humanos, también fueron secuenciados. Resultaron positivos los correspondientes a las calles 1 y 4, obteniéndose la secuencia esperada en ambos casos. Cabe destacar que provienen 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.



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

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

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

## Conclusiones

- Se clonó el mensajero codificante de la isoforma de 60 kDa que denominamos  $\beta 3$ -chimaerin.
- $\beta 3$ -chimaerin se expresa en ratón 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 de función desconocida.

## 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 Duane's retraction syndrome. Miyake N, et al. *Science*. 2009 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, Saidi LF, Kazanietz MG, Hurley JH. *Cell*. 2004 Oct 29;119(3):407-18.