



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Generación de una fusión génica entre la proteína roja fluorescente (DsRed) y un novedoso marco de lectura codificado por un retrotransposón de la familia PLE de *Adineta vaga* y su expresión en células HEK.

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO (A)

PRESENTA:

ARELY CRUZ PÉREZ

TUTOR (A): DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

JULIO, 2015



Agradecimientos

A mi mamá por su apoyo en todos los sentidos.

A mis hermanos y tías por motivarme.

A mi asesor de tesis, por su paciencia y enseñanza.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por formarme como Bióloga.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi desarrollo en sus instalaciones.

A mis compañeros del laboratorio D15 del Instituto de Neurobiología por ayudarme.

A Edith Espino por su orientación.

A Adriana por su apoyo con los microscopios y las células.

A la profesora Edith Chávez por todo su ayuda y confianza.

A las personas inolvidables de siempre por alentarme.

El trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto CONACYT 220224

-Gracias

Dedicatoria

Para la abuela que terminaba con la vida que tanto la golpeó y mi flor de lis que me guiaría siempre.

Índice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Elementos genéticos móviles del tipo transposón (TEs):	3
3.2 Clasificación de transposones:	4
3.2.1 Retrotransposones:	4
3.2.1.1 <i>Penelope- Likeelements (PLE)</i>	5
3.2.1.1.1 Subconjunto especializado de <i>PLEs</i>	6
4. HIPÓTESIS	8
5. OBJETIVO GENERAL	8
6. MATERIAL Y MÉTODOS	9
6.1 Material	9
6.1.1 Cepas bacterianas:	9
6.1.2 Vectores	9
6.1.3 Líneas celulares	10
6.1.3.1 HEK 293	10
6.1.4 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)	11
6.1.5 Enzimas de restricción	11
6.2.5.1 <i>HindIII</i> y <i>Sall</i>	11
6.2 Metodología	12
6.2.1 Propagación del plásmido de expresión dSRed-C1	12
6.2.2 Construcción de pDsRed-C1 con ORF1A. <i>vaga</i>	12

6.2.3	Transfección en células HEK-293	14
6.2.4	Microscopía de epifluorescencia y confocal	15
6.2.5	Análisis de células	15
7.	RESULTADOS.....	16
7.1	Construcción de DsRed-ORF1	16
7.2	Expresión en células HEK-293.....	17
7.3	Morfología.....	21
8.	DISCUSIÓN.....	23
9.	CONCLUSIÓN.....	25
10.	PERSPECTIVAS.....	25
11.	REFERENCIAS	26
12.	DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS.....	28
12.1	Transformación.....	28
12.2	Extracción de ADN plasmídico (Miniprep).....	28
12.3	Extracción de ADN plasmídico MIDI PREP (QIAGEN)	29
12.4	Transfección de DNA mediante lipofección.....	30
13.	SOLUCIONES	32

1. RESUMEN

La clase de rotíferos Bdelloidea ha sido objeto de estudio por el hecho de incluir una gran cantidad de retrotransposones en las regiones subteloméricas de su genoma. Uno de los retrotransposones recientemente descubiertos es *Athena*, elemento perteneciente a la familia PLE (*Penelope like-elements*). Dicho elemento ha sido controversial debido a la ausencia del dominio GIY-YIG característico de la familia PLE y a la presencia de un segundo marco de lectura abierto (ORF1) río arriba del ORF2. Por ahora lo único que se conoce sobre este ORF1 es que es transcripcionalmente activo en *Adineta vaga* y que el polipéptido para el que codifica incluye una hélice superenrollada y señales de localización nuclear.

En el presente trabajo se probó la hipótesis de que este ORF1 se localizaría en el núcleo celular. Para ello, se generó una fusión de este gen con el que codifica para la proteína fluorescente DsRed y se expresó de manera transitoria en células HEK. Se determinó su distribución celular a través de microscopía de epifluorescencia y confocal.

Como resultados se muestra que la fluorescencia emitida por ORF1-DsRed se localiza principalmente en el núcleo de forma focalizada, aunque también se encontró en el citosol. Esta distribución contrasta con la de DsRed, que se encontró distribuida en toda la célula. Se requieren más experimentos para probar la función de este novedoso ORF.

2. INTRODUCCIÓN

Los rotíferos de la clase Bdelloidea comprenden 350 especies descritas en 18 géneros y se trata de una clase de invertebrados microscópicos acuáticos de amplia distribución. Son conocidos por su capacidad de reproducirse de manera asexual por partenogénesis y sobrevivir ciclos repetidos de deshidratación y rehidratación en cualquier etapa de su ciclo de vida (Ruppert *et al*, 2003).

El ADN genómico de la mayoría de los eucariontes está compuesto por una gran cantidad de elementos genéticos móviles, especialmente retrotransposones, los cuales se multiplican a través de un fragmento de RNA (Gladyshev y Arkhipova; 2007). Los rotíferos no son la excepción y, a pesar de no contener elementos genéticos móviles en las regiones con alta densidad de genes, su genoma incluye una considerable variedad de retrotransposones en las regiones adyacentes a los telómeros (Gladyshev y Arkhipova, 2010). Entre los retrotransposones reportados en *A. vaga*, se encuentran los elementos *Athena* que pertenecen a la familia de retrotransposones PLE (*Penelope like-elements*). Dichos elementos se caracterizan por la ausencia de un dominio de endonucleasa GIY-YIG característico de la familia PLE y presencia de un segundo ORF el cual, a través de análisis bioinformáticos se predice que incluye señales de localización nuclear y una hélice superenrollada (Gladyshev y Arkhipova, 2007). Este trabajo abordó la hipótesis que predice que el producto del ORF1 se localiza en el núcleo celular.

3. ANTECEDENTES

3.1 Elementos genéticos móviles del tipo transposón (TEs):

Se trata de segmentos de ADN con capacidad de transposición, proceso que consiste en que un segmento de ADN se mueve de un lugar del cromosoma, llamado sitio donador, a otro sitio del mismo o de diferente cromosoma, llamado sitio diana. En su estructura y organización, los transposones son muy variables; sin embargo, la mayoría incluye secuencias de ADN repetitivo en cada extremo de su estructura que sirven como sitio de unión a la transposasa, enzima que cataliza el proceso de transposición. Cuando ocurre un evento de transposición, una secuencia corta del lugar de inserción (de 5 a 10 pares de bases) se duplica para formar una secuencia corta repetida adicional que flanquea cada extremo del transposón insertado. Estos segmentos duplicados son generados al momento de insertarse un transposón en la nueva localización (Lenhinger *et al.*, 2005).

En bacterias hay dos rutas generales para la trasposición: 1) directa y 2) replicativa. En la transposición directa o simple, el transposón es escindido por cortes en ambos extremos de su estructura y se desplaza hasta una nueva localización. Este proceso deja un corte en la doble cadena del ADN donador, el cual debe ser reparado. En el lugar de inserción se produce un corte en el ADN por la acción endonucleasa, el transposón es insertado en este sitio, y durante este evento el corte se repara mediante la acción de una ADN polimerasa, duplicándose así la secuencia del sitio diana. En la trasposición replicativa, los eventos de escisión del transposón y su integración a un segundo sitio son similares a la transposición simple, la diferencia estriba en que permanece una copia completa del transposón en el sitio donador (Lenhinger *et al.* 2005).

Los transposones se pueden insertar dentro de los genes que codifican para proteínas y pueden interrumpir completamente su función al romper su marco de lectura, o bien se pueden insertar dentro de secuencias regulatorias de la transcripción o en regiones intrónicas donde su presencia puede modular la expresión del gen (Watson *et al.* 2008). Es posible que los transposones sean la

fuerza más común de nuevas mutaciones en la mayoría de los organismos, contribuyendo a su diversidad genética y evolución (Koyama *et al.*, 2013). Análisis comparativos de secuencias de genomas revelan que las secuencias relacionadas a transposones pueden ocupar una gran fracción del genoma de un organismo y el contenido de transposones en diferentes organismos es altamente variable (Watson *et al.* 2008).

3.2 Clasificación de transposones:

Dependiendo del mecanismo de transposición los TEs se clasifican en dos: La clase I que son retrotransposones que se movilizan por transcripción reversa de un ARN intermediario, y la clase II donde los transposones se movilizan directamente de ADN a ADN (Rebollo *et al.* 2012).

3.2.1 Retrotransposones:

Las secuencias de estos elementos contienen repeticiones terminales largas (LTR), y ORFs variables que codifican para una transcriptasa reversa, una ARNasa H, una integrasa, una proteinasa y las proteínas gag, las cuales codifican para elementos estructurales de un retrovirus (Eickbush y Jambururhugoda, 2008). (Figura 1).

Existen dos grupos principales de retrotransposones: con y sin secuencias LTR en sus extremos 5' y 3'; además. Los que no incluyen LTR incluyen usualmente dos marcos de lectura abiertos (Kazazian, 2004).

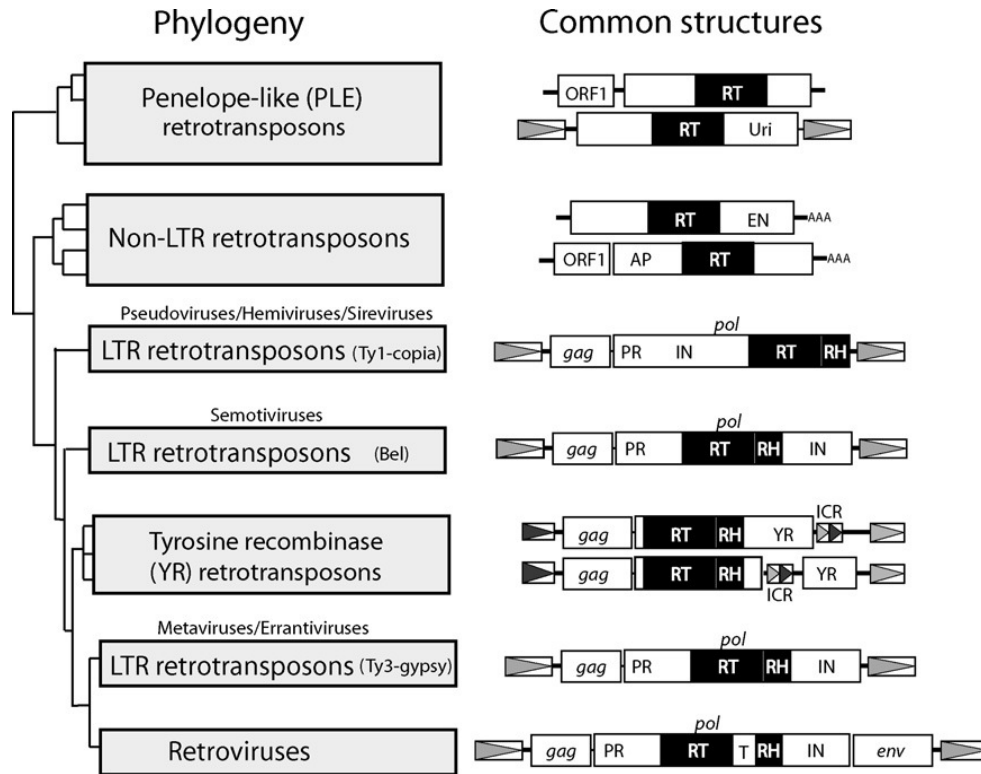


Figura1: Estructura y relación filogenética de varios grupos de retrotransposones. Abreviaturas: ORF: marco de lectura abierto; RT: retrotranscriptasa; EN: endonucleasa; RH: Dominio H RNAasa de la transcriptasa reversa; PR: proteinasa; IN:integrasa; APE: endonucleasa apurínica; Uri, dominio similar a la endonucleasa de algunos intrones móviles del grupo I; YR,dominio con similitud a tirosina recombinasas. Puntas de flechas sombreadas en cajas, repeticiones terminales largas (LTR) o regiones complementarias internas (ICR) con identidad de secuencia con LTR; líneas delgadas, regiones no traducidas de los elementos; AAA, colas de poli A (Eickbush y Jamburuthugoda, 2008)

3.2.1.1 *PenelopeLike-Elements (PLE)*

En 1997 fue descubierta una nueva familia de retrotransposones que fue identificada inicialmente en *Drosophila virilis*. A estos retrotransposones se les atribuyó el fenómeno de la disgenesia híbrida (Evgen'ev *et al.*, 1997). Dicho retrotransposón fue llamado PLE (*Penelope like-element*). Dentro del género de *Drosophila* se encontró únicamente en *D. virilis*, sugiriéndose que este elemento ha invadido recientemente esta especie y juega ahora un papel fundamental en la estructura de su genoma y evolución (Volf *et al.*, 2001; Koyama *et al.*, 2013).

A través de varios estudios se ha mostrado que *Penelope* presenta una amplia variabilidad de estructuras (Eickbush y Jamburuthugoda, 2008). Sus propiedades estructurales y funcionales son las de un retrotransposón típico, que consiste en un ORF que codifica para una retrotranscriptasa (Garrido y Teijón, 2006) y una endonucleasa con dominio GIY-YIG. Los retroelementos *PLEs* se insertan aleatoriamente a lo largo de los genomas; sin embargo, se ha visto que prefieren zonas ricas en AT (Arkhipova *et al*, 2013; Gladyshev y Arkhipova, 2007).

3.2.1.1.1 Subconjunto especializado de *PLEs*

Una nueva clase llamada *Athena* perteneciente a *PLEs* fue hallada en rotíferos bdelloideos (*A. vaga* y *Philodina roseola*) y se caracteriza porque no incluye ORFs con los dominios EN o GIY-YIG (Figura 2) (Arkhipova, 2012). Además, se ha mostrado la presencia de *PLE* en genomas de varios hongos, protistas, y plantas (Arkhipova *et al*, 2013).

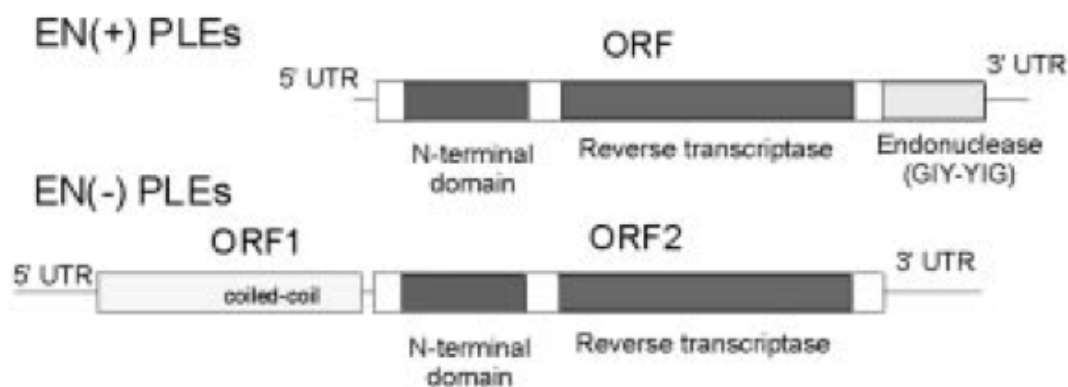


Figura 2: Organización estructural de PLEs y su similitud con telomerasas EN (+): Con dominio endonucleasa EN (-) Sin dominio endonucleasa (Arkhipova, 2012)

Una de las peculiaridades de estos PLEs es que, además del ORF que codifica para una retrotranscriptasa (en este caso el ORF2), incluye un ORF río arriba cuya secuencia es poco conservada y sin aparente similitud con otros genes de elementos transponibles o con genes de otros genomas. Solo se discernen por herramientas bioinformáticas motivos de señalización de localización nuclear (NLS) y hélices superenrolladas (Gladyshev y Arkhipova, 2007). (Figura 3)



Figura 3. Representación del análisis bioinformático del ORF1 de *Athena*. Se muestra al NLS localizado en la posición 120-136. GLN: Región rica en glutamina; LYS región rica en lisina NLS: Señal de localización nuclear bipartida.

3.3 Señalización de localización nuclear (NLS)

Para poder tener acceso al núcleo celular, las proteínas deben incluir NLSs que son segmentos específicos de una secuencia de aminoácidos o bien interacciones entre aminoácidos localizados en diferentes regiones de la proteína y que forman un “parche”, arreglo tridimensional formado por la interacción de varias regiones discontinuas de la secuencia de aminoácidos que se asocian espacialmente cuando la proteína se pliega (Alberts *et al.*, 2002).

El NLS presente en el ORF1 de *Athena de A.vaga* es un NLS bipartido (KR x{10} KKKL), que consiste en dos diferentes fragmentos de aminoácidos separados por 10-12 residuos. Este dominio fue tipificado en un inicio a partir de la proteína nucleoplasmina de *Xenopus* (Pouton *et al.* 2007; Cautain *et al.* 2014).

Dado el poco conocimiento sobre el nuevo ORF1 en *Athena*, es de interés tratar de conocer más sobre él, empezando por su localización celular.

4. HIPÓTESIS

La proteína que codifica el ORF1 del retrotransposón *Athena* en *A. vaga*, se localizará en el núcleo de las células HEK-293.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización celular del producto del marco de lectura ORF1 del *PLE* de *A. vaga*.

5.1 Objetivos específicos

1. Generar una quimera entre el ORF1 del PLE de *A. vaga* y la proteína fluorescente DsRed.
2. Determinar la localización de ORF1-DsRed a través de su expresión en células HEK.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material

6.1.1 Cepas bacterianas:

Para los experimentos de clonación se utilizó la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue.

6.1.2 Vectores

6.1.2.1 pGEMT-easy (Promega®)

Vector utilizado para la clonación del ORF1 del PLE de *A. vaga*. Se trata de un vector lineal con extremos 3' de timina que evitan la recircularización del vector y facilitan la inserción de productos de PCR, posee los promotores T7 y SP6 que flanquean la región de clonación múltiple dentro de la región de la enzima β -galactosidasa (Figura 4).

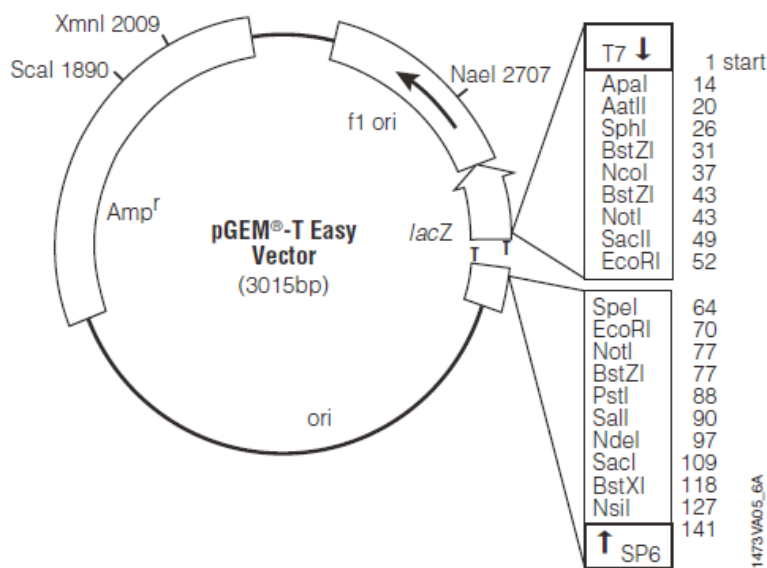


Figura 4. Mapa génico del vector de clonación pGEMT- Easy, utilizado para la clonación del ORF1 del PLE de *Adinera vaga*

6.1.2.2pDsRed-Express-C1

Vector de expresión que codifica para DsRed, una variante de la proteína rojo fluorescente de *Discoma sp* bajo el control del promotor CMV (Figura 5). Al expresarse DsRed en células de mamífero en cultivo celulares, esta puede observarse por microscopía de fluorescencia. La excitación y emisión máxima son 557 y 579 nm respectivamente.

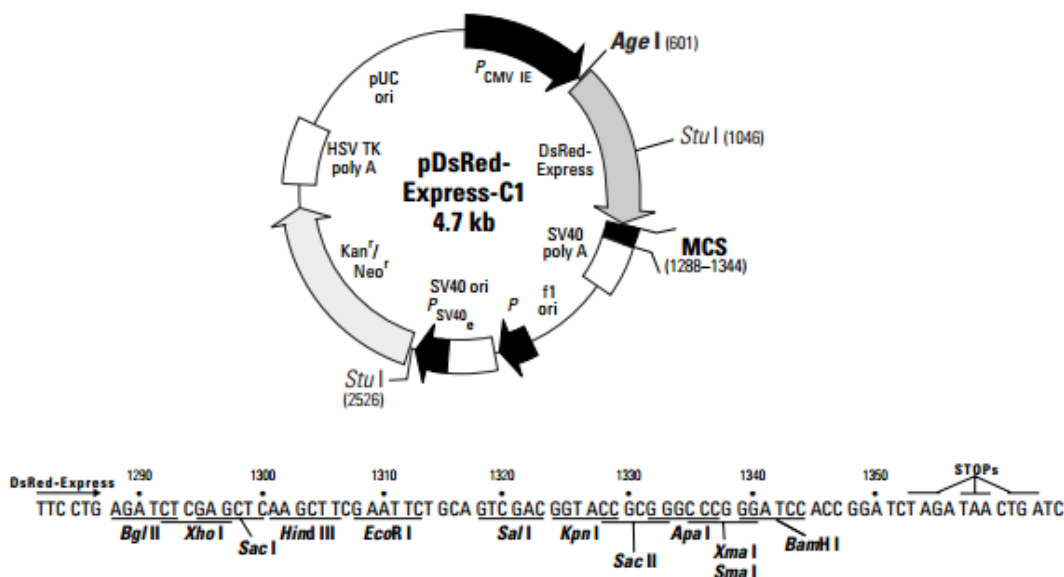


Figura 5. Plásmido pDsRed- Express-C1 y sitio múltiple de clonación. Incluye los sitios *HindIII* y *SalI* que se emplearon para la estrategia de clonación del ORF1.

6.1.3 Líneas celulares

6.1.3.1 HEK 293

Línea celular cultivada por primera vez en 1970 por Alex Van der Eby y usada para transfectar a través de fosfato de calcio por Frank Graham. Se ha convertido en una línea celular muy popular debido a su alta eficiencia en la transfección, llegando a ser muy importante en la investigación biológica.

Dicha línea celular es derivada de preparaciones de riñón de embrión humano, son fáciles de cultivar y transferir y son comúnmente usadas como modelo para el estudio de los genes que se expresan de manera heteróloga en estas.

Características:

Semi-adherente

Células embrionarias de riñón humano

Tiempo de duplicación: 48 horas

Expresión proteica: las células pueden ser inducidas a producir grandes cantidades de diversas proteínas.

Medio recomendado: D-MEM suplementado con suero fetal bovino y L-Glutamina.

6.1.4 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)

Marcador azul fluorescente cuya actividad se expresa al unirse a regiones ricas en AT de DNA de doble cadena. Es excitado a una longitud de onda de 405 nm y se utiliza comúnmente como contra tinción nuclear en microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, y la tinción de cromosomas.

6.1.5 Enzimas de restricción

6.2.5.1 *Hind*III y *Sal*I

Se buscaron inicialmente sitios de restricción compatibles tanto para el fragmento (ORF1), como para los dos plásmidos ocupados, para lo cual *Hind*III y *Sal*I resultaron idóneos. Tales enzimas de restricción fueron utilizadas para los dobles cortes utilizados para la liberación del inserto de pGEMT-easy, para la el corte del plásmido pDsRed-C1 y corroboración de la identidad del plásmido generado.

6.2 Metodología

6.2.1 Propagación del plásmido de expresión dSRed-C1

Se inició a partir de una alícuota del plásmido comercial (Clontech) que se utilizó para transformar *E. coli* XL1-blue. El plásmido se aisló por el método de lisis alcalina MIDI PREP QIAGEN. Una vez obtenido el plásmido, este se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ThermoScientific® y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

6.2.2 Construcción de pDsRed-C1 con ORF1 *A. vaga*.

Se aisló el ORF1 del plásmido pGEM-ORF1 previamente generado en el laboratorio (Figura 6). En dicha construcción se incluyó el sitio de reconocimiento para la enzima *Hind*III en el extremo 3' y se removió el codón de paro de la traducción. Algunas clonas de la construcción pGEMT-ORF1 fueron propagadas en la cepa de *E.coli* XLI blue a través de transformación bacteriana. Como paso último de la transformación, las clonas fueron cultivadas en medio LB con ampicilina (50µg/ml) a 37°C por 16 horas para posteriormente realizar la extracción del DNA plasmídico por lisis alcalina (MINIPREP).

Se utilizaron dos clonas de pGEMT-ORF1 para corroborar que el fragmento ORF1 estuviera presente, y se hicieron cortes con la enzima *Eco*RI (Invitrogen) además se determinó la secuencia nucleotídica del ORF1 en la Unidad de Proteogenómica del INB de la UNAM en Querétaro.

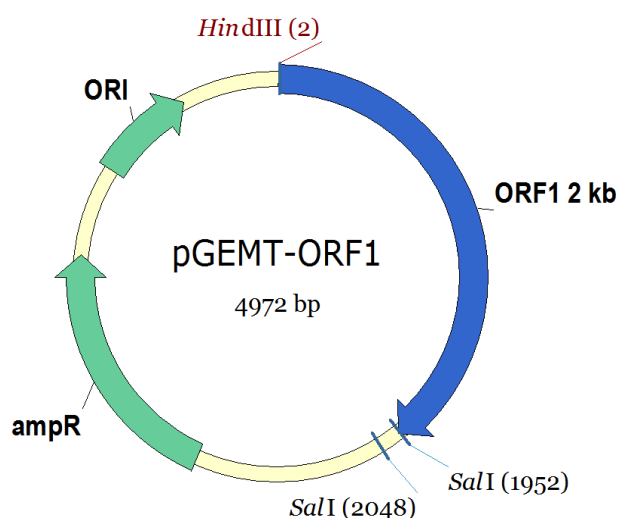


Figura 6. Vector pGEMT-ORF1 de *Adineta vaga*

Para aislar el ORF1, se realizó una digestión de pGEMT- ORF1 usando las enzimas de restricción *Hind*III y *Sal*I (Invitrogen) y se extrajo el fragmento del gel de agarosa (0.8%) con el QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN® (Figura 7). Posteriormente se ligó el ORF1 (figura 4), con el plásmido pDsRed C1 (previamente digerido con las enzimas *Hind*III y *Sal*I). El producto de la ligación se utilizó para transformar *E. coli* cepa XLI blue. Se seleccionaron varias colonias que se propagaron en medio LB suplementado con kanamicina 40 µg/ml, se aisló el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina y se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Finalmente se caracterizaron los plásmidos obtenidos por medio de enzimas de restricción (*Sal*I y *Hind*III).

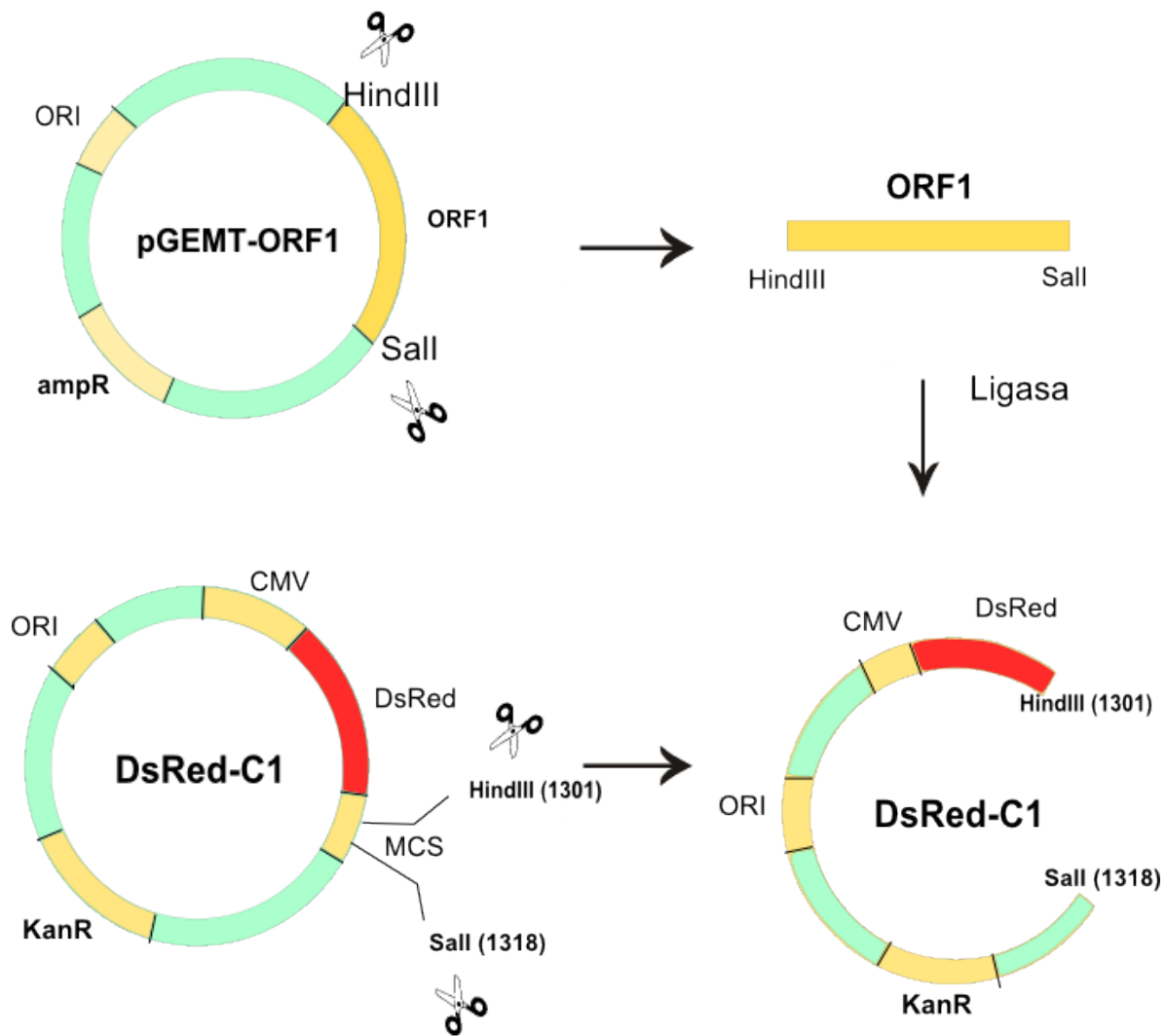


Figura 7. Estrategia de construcción del plásmido pDsRed-C1 ORF1 de *Athenade Adineta vaga*.

6.2.3 Transfección en células HEK-293

La transfección en monocapa se realizó mediante lipofección utilizando Lipofectamine™ 2000 en células HEK-293. Para un volumen final de 2ml, se emplearon 4µg de pDsRed-ORF1 para cada transfección, y se utilizó como control de la expresión el plásmido pDsRed-C1. Las células ya transfectadas se incubaron a 37°C con CO₂ y se observaron a las 28, 36 y 72 horas, de tal forma que al presentar la máxima fluorescencia (36 horas), se contra tiñeron los núcleos con DAPI.

6.2.4 Microscopía de epifluorescencia y confocal

Las células se observaron a los microscopios de epifluorescencia LSM 510 y confocal Zeiss LSM 510 META. Para las fotografías de DsRed, las tomas fueron cada 1 μm , mientras que las de DsRed-ORF1, donde la fluorescencia persistía por más tiempo y en la cual era más relevante determinar su localización, se tomaron las imágenes cada 0.2 μm . El número de tomas fue de acuerdo al tamaño celular. La excitación se llevó a cabo a 405 nm para DAPI y 543 nm para DsRed.

6.2.5 Análisis de células

Dado un aparente cambio de morfología en las células transfectadas y el control negativo, se determinó el área cubierta por células individuales, y se estimó a través de *Image J* con la función de analizador de partículas. Las células analizadas fueron tomadas de dos transfecciones independientes, se analizó el área de 100 células de cinco grupos diferentes de muestras: Control negativo, DsRed-ORF1 que presentaron fluorescencia, DsRed-ORF1 que no presentaron fluorescencia, DsRed que presentaron fluorescencia y DsRed que no presentaron fluorescencia.

Mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6, se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$); sin embargo no se logró normalizar la muestra; por tanto se realizó la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney para contrastar primeramente los datos de los grupos de DsRed, de DsRed-ORF1 y finalmente de cada grupo con el control negativo.

7. RESULTADOS

7.1 Construcción de DsRed-ORF1

En la figura 8A se muestra la caracterización del plásmido pGEMT-ORF1: el vector a 3 kb y el ORF1 a 2 kb, mientras que en la segunda columna se muestra el vector de expresión pDsRed-C1 a 4.7 kb, ambos cortados con Sall y HindIII. Por otra parte, en la figura 8B, se muestran los productos aislados: ORF1 y pDsRed-C1.

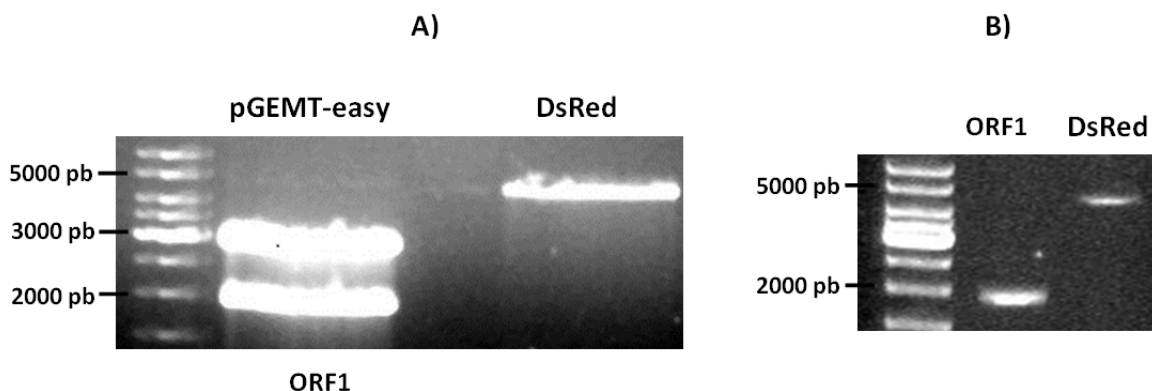


Figura 8. Caracterización de los plásmidos precursores pGEM-ORF1 y pDsRed-C1. A. En la primera columna se muestra a pGEMT-easy a 3000 pb, mientras que el inserto se muestra en la misma columna, pero a 2000 pb. Por otro lado, en la segunda columna, se muestra a pDsRed-C1 a unos 4700 pb, muy cerca del indicador de 5000 pb.

La figura 9 muestra la caracterización del plásmido generado: pDsRed-ORF1. Este fue cortado con las enzimas HindIII y Sall, se observa la liberación del fragmento de 2Kb que corresponde al ORF1.

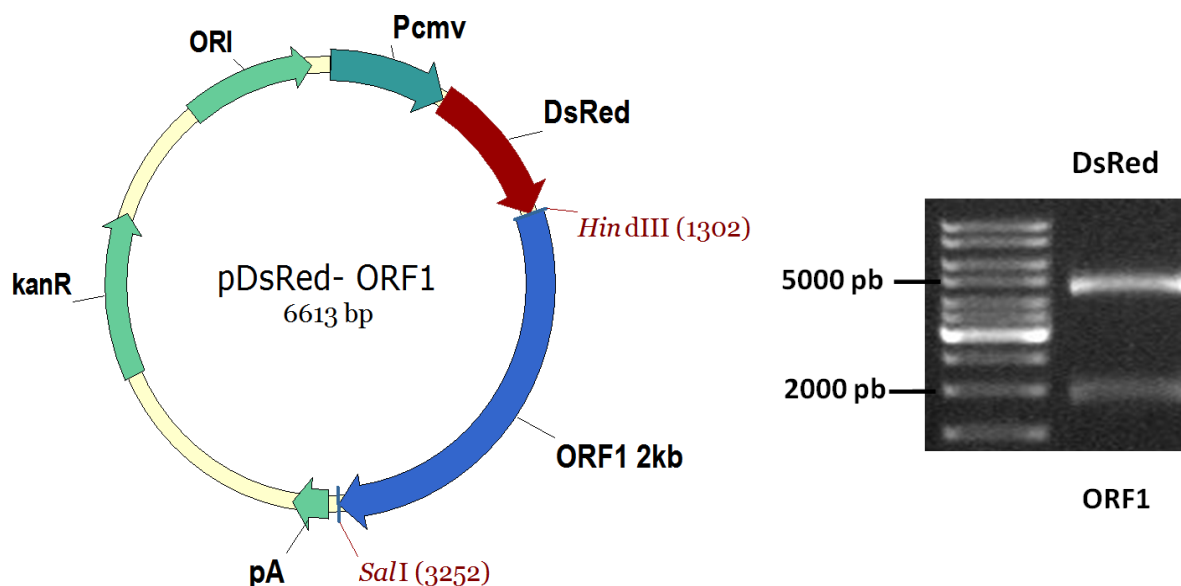


Figura 9. Caracterización de pDsRed- ORF1. A. Mapa funcional y de restricción; B digestión con HindIII y SalI de plásmido ligado a ORF1. Se muestra el ORF1 a 2 kb, mientras que el pDsRed-C1 se encuentra a 4.7 kb.

7.2 Expresión en células HEK-293.

Las células empezaron a mostrar fluorescencia desde las 24 horas, siendo la máxima fluorescencia entre las 36 y 48 horas, lo que indicó que la proteína si se estaba traduciendo. Al contrateñir con DAPI y hacer observaciones al microscopio de epifluorescencia, se mostró coincidencia en la localización de ambas señales. Generalmente se obtuvo una baja eficiencia de transfección (menor al 10%).

A través de la toma de imágenes al microscopio en diferentes campos de la muestra, se observaron singulares cambios en el tamaño de las células transfectadas exitosamente, dicho fenómeno se observó en las células expresando DsRed-ORF1 y DsRed (Figura 10).

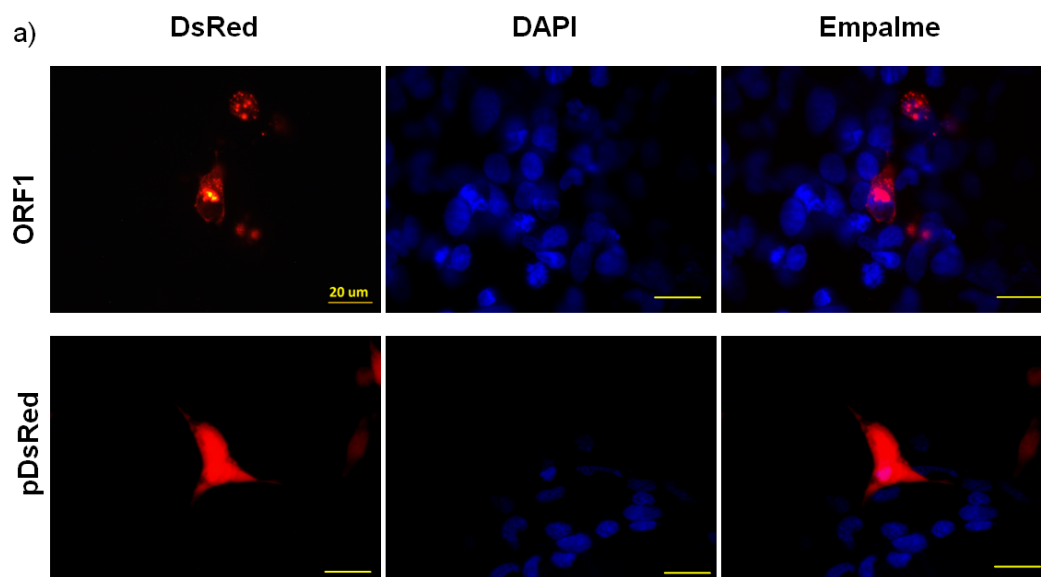


Figura 10. Células HEK-293 transfectadas con DsRed-ORF1 de Athena de *A. vaga*. Se muestra la expresión del ORF1 fusionado a DsRed, posteriormente los núcleos de las células HEK-293 y el control negativo. Hay una baja eficiencia de transfección y los núcleos de las células que expresan DsRed-ORF1 presentaron aparentemente un mayor tamaño.

Se tomaron fotografías en microscopía confocal de las células que expresaron DsRed y DsRed-ORF1. De las fotografías analizadas, se observó claramente que la distribución de DAPI coincide con la distribución de la fluorescencia de DsRed-ORF1, mostrándose además en sitios cercanos al núcleo donde no hay coincidencia. La mayor expresión de la proteína se muestra en el citosol, alrededor del núcleo. La fluorescencia se presentó en cúmulos, haciendo suponer que está en compartimentos (Figura 11). En las células que expresaron DsRed se encontró fluorescencia distribuida en toda la célula, incluyendo el núcleo (Figura 12).

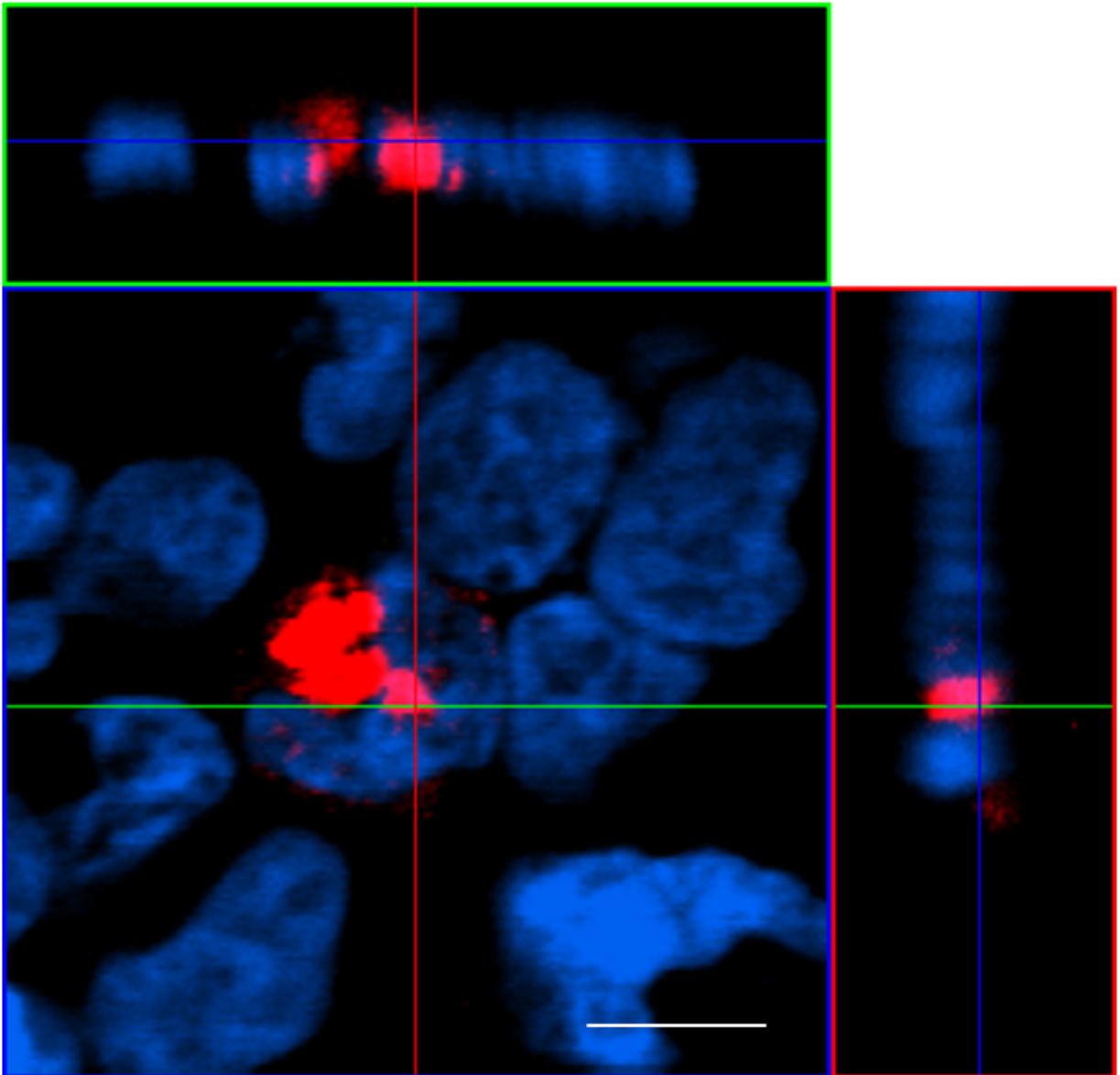


Figura 11. Vista ortogonal de distribución de fluorescencia de DsRed-ORF1. Azul: DAPI. Barra= 10 μ m.

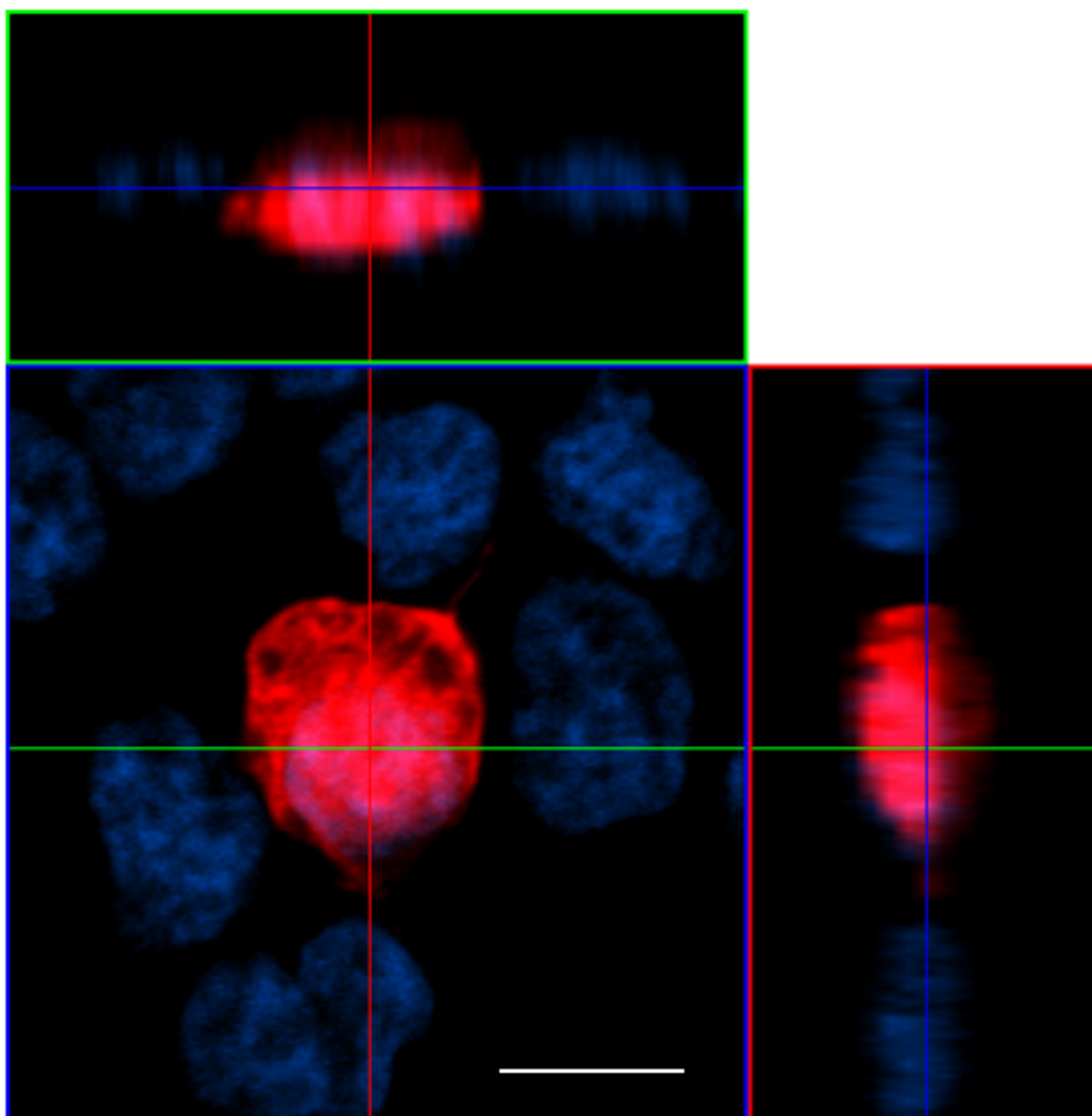


Figura 12. Vista ortogonal de la transfección de DsRed. Azul: DAPI. Barra=10 μ m

7.3 Morfología

De acuerdo a la estadística descriptiva realizada, el área media de los núcleos de las células del grupo control fue de $79.06 \mu\text{m}^2$ ($s=35.16$; $S_E=3.52$). La media de los núcleos de DsRed que presentaron fluorescencia fue de $79.09 \mu\text{m}^2$ ($s=30.34$; $S_E=3.48$), los núcleos que no tenían fluorescencia tuvieron una media de $85.22 \mu\text{m}^2$ ($s=27.10$; $S_E=2.71$). En cuanto al área del núcleo de las células transfectadas con DsRed-ORF1 que presentaron fluorescencia, ésta fue de $92.71 \mu\text{m}^2$ ($s=47.01$; $S_E=4.7$) mientras que los que no tenían fluorescencia tuvieron una media de $86.59 \mu\text{m}^2$ ($s=32.81$; $S_E=3.28$) (Tabla 1).

Tabla 1. Estadística descriptiva del área de los núcleos de células HEKS.

Parámetros	DsRed-ORF1		DsRed		Negativo
	Fluorescencia	Sin Fluorescencia	Fluorescencia	Sin Fluorescencia	
$\bar{x}$	92.71	86.58	79.09	85.22	48.14
S	47.01	32.80	30.34	27.10	44.02
S_E	4.70	3.28	3.48	2.71	4.40

En el análisis de U Mann-Whitney realizado no se mostraron diferencias significativas en el tamaño de los núcleos en los diferentes grupos ($p>0.05$). A pesar de la aparente diferencia entre la media del área de los núcleos de las células que presentaban fluorescencia de DsRed-ORF1 y el control negativo, esta diferencia tampoco fue significativa ($p= 0.0611$) (Figura 13).

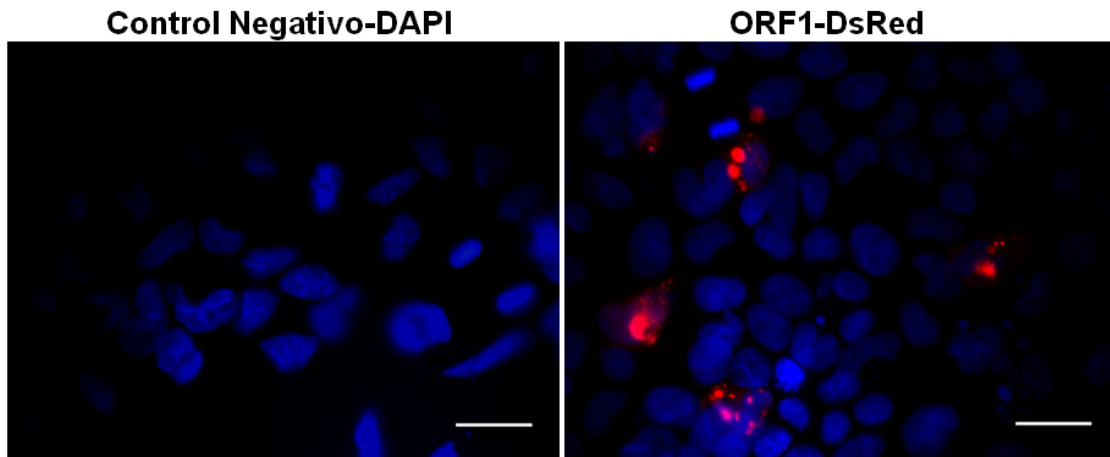


Figura 13. Muestra de los núcleos del control negativo y los núcleos ORF1-DsRed. Barra= 20 μ m

8. DISCUSIÓN

En el estudio realizado por Gladyshev y Arkhipova (2007) se esclareció que el ORF1 de *Athena* de *A. vaga* se transcribe, mientras que en el presente trabajo, observamos que este ORF1 se traduce en células HEK transfectadas con un plásmido que porta a este gen en fusión con DsRed. De manera interesante, se encontró que la fusión DsRed-ORF1 se localiza en el núcleo, como se predecía por la presencia de una NLS. Adicionalmente, esta proteína también se encontró en el citoplasma.

Es importante señalar que la distribución nuclear no fue la más abundante, dado que se mostraba mayor presencia de la proteína en el citoplasma, lo cual puede estar ocurriendo debido a que la proteína resultante del ORF1 no esté siendo importada eficientemente al núcleo por una falla en la compatibilidad del NLS con las proteínas de transporte. Algunos estudios muestran que cada tipo celular puede variar en la composición de la maquinaria de transporte nuclear, incluyendo el repertorio de importinas y la naturaleza del NLS. La señal de localización nuclear identificada en la secuencia del ORF1 es un NLS bipartido, tipificado originalmente en la proteína nucleoplasmina de *Xenopus* (Poutonet *al.* 2007). Experimentos de Kohler (1999) demostraron que la nucleoplasmina es importada al núcleo de manera más eficiente por la Importina $\alpha 5$ que por Imp $\alpha 1$, Imp $\alpha 7$ e Imp $\alpha 3/4$.

Se requiere monitorear el proceso de importe hacia el núcleo, para observar si en algún momento aumenta la fluorescencia de DsRed-ORF1 en el núcleo, ya que puede ser que la importación se realice pero de manera más lenta, por lo que se saturaría la proteína en el citoplasma, explicándose así la presencia de esta en las regiones alrededor del núcleo que observamos en nuestros experimentos. Otra explicación de esta distribución en el citoplasma de las células es que la fluorescencia que se observó corresponde a proteína en su tránsito natural desde los sitios en los que se traduce hacia el núcleo. Con este experimento, se pudo concluir que la proteína producto del ORF1 de *Athena* tiene una distribución en el

núcleo, lo que indica que la NLS de ésta debe ser funcional para el direccionamiento hacia este compartimento celular. Con respecto al tamaño del núcleo de las células, se puede especular que la diferencia, aunque no significativa, se puede deber a cambios en el estado de la cromatina que solo se observó en las células que expresaron DsRed-ORF1.

9. CONCLUSIONES

Se generó un plásmido que expresa al ORF1 de Athena en fusión con DsRed.

La proteína DsRed-ORF1 es importada al núcleo.

No se observan cambios en la morfología o el tamaño de los núcleos de las células que expresan DsRed-ORF1.

10.PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas futuras se encuentra realizar la fusión de una proteína fluorescente con el ORF2 y averiguar el comportamiento de la coexpresión de ORF1 y ORF2. Igualmente quedaría averiguar más sobre la proteína del ORF1, su naturaleza y función que podría estar implicada en la conservación de los telómeros del genoma de rotíferos.

11. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science.
- Arkhipova I.R; Yushenova I. A; Rodríguez F (2013) Endonuclease-containing *Penelope* retrotransposons in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* exhibit unusual structural features and play a role in expansion of host gene families. Mobile DNA 4:194e
- Arkhipova, I. R. (2012) Telomerase, Retrotransposons, and Evolution, in Telomerases: Chemistry, Biology, and Clinical Applications (eds N. F. Lue and C. Autexier), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken
- Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W (2014) Components and regulation of nuclear transport processes. FEBS J. 282 (3):445-62
- Eickbush Thomas H, Jamburuthugoda Varini K. (2008) Diversity of retrotransposons and the properties of reverse transcriptases. *Virus Research* 134, 221–234
- Evgen'ev, M. B., Zelentsova, H., Shostak, N., Kozitsina, M., Barskyi, V., Lankenau, D.-H., &Corces, V. G. (1997). *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 196–201.
- Garrido P.A y Teijón R J. M. (2006) Fundamentos de Bioquímica Metabólica. (2da edición) España: Tébar.
- Gladyshev E.A. y Arkhipova I. R. (2007) Telomerase-associated endonuclease-deficient *Penelope*-like retroelements in diverse eukaryotes. PNAS 104(22): 9352-9357
- Gladyshev E. A. y Arkhipova I. R. (2010) Genome Structure of Bdelloid Rotifers: Shaped by Asexuality or Desiccation?. *Journal of Heredity* 101:S85-S93.

- Kazazian HH Jr (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303:1626–1632.
- Kohler M, Speck C, Christiansen M, Bischoff FR, Prehn , Haller H, Gorlich Dm, Hartmann E. (1999) Evidence for distinct substrates specificities of importin alpha family members in nuclear protein. *Mol Cell Biol.* 19(11): 7782-91
- Koyama T, Kondo H, Aoki T y H (2013) Identification of two *Penelope*-Like Elements with different Structures and Chromosome Localization in Kimura Shrimp Genome. *Mar. Biotechnol* 15: 115-123
- LehningerA. L. Nelson D L., y Cox MM. (2005) . *Principios de Bioquímica.* (4ª ed.) España: Omega.
- Pouton C W, Wagstaff K M, Roth D M., Mosely G W y Jans D A. (2007) Targeted delivery to the nucleus. *Advanced Drug Delivery Review* 59:698-717.
- Rebollo Rita, Romanish Mark T y Mager Dixie L. (2012). Transposable Elements: An abundant and Natural Source of Regulatory Sequences for Host Genes. *Annual Reviews of Genetics*46: 21-42.
- Ruppert, Edward E. Richard S. Fox y Robert D. Barnes. 2003. *Invertebrate Zoology.* (6th edición). Estados Unidos: Saunders College Publishing, Harcourt Brace and Company.
- Sinha, J. Mell and R.J. Redfield, Bacterial Transformation, In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition), edited by Stanley Maloy Kelly Hughes, Academic Press, San Diego, 2013, Pages 271-273
- Volff JN, Hornung U, Scharf M (2001) Fish retrotransposons related to the Penelope element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. *Mol Genet Genomics* 265:711–720
- Watson J D, Baker, Tania A, Bell Stephen, Gann Alexander, Levine Michael y Losick Richard (2008). *Molecular Biology of the Gene.* (6ª ed.) Estados Unidos de América: Pearson.

12. DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS.

11.1 Transformación

Adquisición de nuevas propiedades genéticas a partir de ADN exógeno, para lo cual, la bacteria debe ser “competente”, es decir, con capacidad de integrar moléculas de ADN (Sinha, *et al*, 2013).

Mezclar 100 μ l de *E. coli* XLI blue competente con 1 μ l de ADN plasmídico

Incubar por 30 minutos en hielo

Aplicar choque térmico a 42°C por 90 segundos

Colocar directamente en hielo por 2 minutos.

Resuspender en medio SOC

Incubar a 37°C en agitación por una hora.

Sembrar 200 μ l en caja Petri de LB-agar con antibiótico Kanamicina (40 μ g/ml) o Ampicilina (50 μ g/ml) según fuere el caso.

Incubar por 12 horas a 37°C

Seleccionar colonias y cultivar en 4 ml de medio LB con antibiótico Kanamicina (40 μ g/ml) o Ampicilina (50 μ g/ml) según fuere el caso, a 37°C con agitación por 16 horas.

11.2 Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)

Del cultivo de bacterias transformadas, tomar 1.5 ml del medio y centrifugar (13000 rpm por 5 minutos)

Tirar sobrenadante y al pellet resuspenderlo en 200 μ l de solución I (Tris-Cl 23mM, pH 9, EDTA 10mM pH8)

Agitar en vortex hasta disolver

Agregar 200 μ l de solución II (0.2 ml de NaOH 20 N, 8.8 ml H₂O y 1m l de SDS 10%). Mezclar suavemente por inversión.

Adicionar 350 μ l de solución III (60 ml de acetato de potasio SM, 11.5 ml de ácido acético concentrado y 28.2 ml de H₂O) y agitar por inversión.

Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.

Colocar sobrenadante en un tubo nuevo y agregar 0.8% V de isopropanol y centrifugar a 30000 rpm por 5 minutos.

Desechar sobrenadante por decantación y lavar pellet con etanol 70% frío y centrifugar 5 minutos a 30000rpm

Desechar etanol con pipeta, cuidando de no tocar el pellet. Dejar secar pellet en incubadora por 10 minutos.

Resuspender en 20µl de Elution Buffer 10mM (10mM Tris-Cl pH 8)

Correr gel de agarosa 0.8% a 90V por 45 minutos

11.3 Extracción de ADN plasmídico MIDI PREP (QIAGEN)

Muestras: pGEMT-ORF A. *Vaga*

pDsRed-C1

Recolectar bacterias por centrifugación a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C

Resuspender pellet en 4 ml Buffer P1 .Agitar con vortex

Agregar 4 ml del buffer P2, mezclar por inversión hasta que el lisado sea viscoso e incubar a temperatura ambiente por 3 min.

Colocar el cartucho en el tubo permitiendo el espacio para la adición de BB

Agregar 4ml de buffer S3 al lisado y mezclar de 4-6 veces

Trasferir el lisado al QIA Filter e incubar por 10 min a temperatura ambiente

Durante la incubación preparar el colector de vacío y las columnas Maxi

Realizar el filtrado de la solución y pasar a un tubo nuevo

Agregar 2ml, de buffer BB al lisado ya filtrado e invertir de 4-6 veces para mezclar.

Trasferir el lisado al cartucho, a la columna con el vacío

Aplicar vacío hasta que todo el líquido haya pasado por la columna

Para lavar el ADN agregar 700 µl. de buffer PE a la columna con el vacío

Para remover completamente los residuos, centrifugar la columna a 7000 rpm/1 min

Colocar la columna en tubo de 1.25 ml. Para eluir el ADN agregar 200µl. de Buffer EBI en el centro de la columna. Dejar reposar por 1 minuto y centrifugar por 1 minuto a 9700 rpm

Correr 4µl de muestra en un gel de agarosa al 0.8% a 100 V por 30 min.

11.4 Transfección de DNA mediante lipofección

Lípidos catiónicos son usados para crear una membrana artificial de vesículas (liposomas) que se unen a las moléculas de ADN. Resultando complejos catiónicos estables que se adhieren y fusionan con la carga negativa de la membrana celular.

Las células HEK-293 se mantuvieron en cultivo celular a 5% de CO₂, 37°C, y medio de crecimiento celular que en este caso fue DMEM (1x) (GIBCO®) con antibiótico Penicilina Estreptomicina (GIBCO ®) y Suero Fetal de Bovino (GIBCO®)10%. A una confluencia de 70-80% se inició la transfección en condiciones de esterilidad.

Protocolo:

Las células HEK 293, son tripsinizadas:

Las células con un 70-80% de confluencia son expuestas a Tripsina e incubadas a 37°C por 5-10 min.

Se les coloca DMEM-SBF 10%

Incubar por 24 horas, para que las células se adhieran, en este caso a la caja Petri.

A las 24 horas:

Diluir 250 µl DMEM con 10 µ de Lipofectamine™ 2000, mezclar uniformemente. Dejar incubando por 10 min a temperatura ambiente.

En otro tubo diluir 250 µl DMEM con el ADN que se desea transfectar a una concentración de 4 µg. Dejar incubando a temperatura ambiente.

Se mezclan las primeras dos diluciones y los 500 µl se agregan lentamente 1.5ml de células con DMEM-SBF 10%.

Incubar a 37° C con CO₂ por 24-48 horas.

ORF1- pDsRed-C1 [4µg]

ORF1- pDsRed-C1 [4µg] repetición.

pDsRed-C1 [4µg]

11.5 Tinción con DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)

Lavar la muestra 5 veces por 5 min con PBS 1x

Fijar con PFA-4% POR 3 minutos.

Lavar dos veces por 5 minutos con PBS 1x- t20 0.05%

Añadir a la muestra PBS 1x- t20 0.05% con DAPI [1:500] y ARNsa [1:1000]

Incubar por 30 minutos

Deshidratar con

ET-OH 90% por 2 minutos

ET-OH 100% por 3 minutos (2 veces)

A las células agregarles 1 ml de PBS 1x.

13. SOLUCIONES

Phosphate-buffered saline (PBS)

Para una solución 1x

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HP ₄	1.44 g
KH ₂ P ₄	0.24 g

Disolver los reactivos en H₂O.

Ajustar pH a 7.4

Esterilizar.

SOC

20 g/L	Tryptona
5 g/L	Extracto de levadura
4.8 g/L	Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)
3.603 g/L	Dextrosa
0.5g/L	Cloruro de Sodio (NaCl)
0.186 g/L	Cloruro de Potasio (KCl)

Disolver los reactivos en H₂O.

Esterilizar.