

Tesis de Licenciatura



Empleo de la técnica de differential display para la identificación de genes de expresión diferencial dirante el desarrollo del cerebelo

Costanzo, Roxana V.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Costanzo, Roxana V.. (). Empleo de la técnica de differential display para la identificación de genes de expresión diferencial dirante el desarrollo del cerebelo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000674_Costanzo
Cita tipo Chicago:

Costanzo, Roxana V.. "Empleo de la técnica de differential display para la identificación de genes de expresión diferencial dirante el desarrollo del cerebelo". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000674_Costanzo

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

TESIS DE LICENCIATURA

TITULO: "EMPLEO DE LA TECNICA DE DIFFERENTIAL DISPLAY PARA LA IDENTIFICACION DE GENES DE EXPRESION DIFERENCIAL DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBELO"

AUTOR: ROXANA V. COSTANZO

DIRECTOR: Dr. HECTOR CARMINATTI

CODIRECTOR: Dr. TOMAS SANTA COLOMA

LABORATORIOS DE NEUROQUIMICA Y BIOLOGIA CELULAR Y
MOLECULAR - INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
FUNDACION CAMPOMAR

DICIEMBRE DE 1998

Nº 0674

FECE y N BIBLIOTECA

Firma del alumno:



Aclaración:

Roxana V. Costanzo

Firma del Director:



Aclaración:

Hector Carmiotti

Firma del Codirector:



Aclaración:

Tomás A. Santa Coloma

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Materiales y métodos	6
Resultados	11
Differential display	11
Digestión de fragmentos	13
Secuencia BJ3	14
Secuencia BJ5	15
Secuencia BJ7	16
Northern blot BJ3	17
Northern blot BJ5	18
Northern blot BJ5 tejidos	19
Discusión	21
Bibliografía	24

RESUMEN

La especificidad en el establecimiento de las conexiones entre células nerviosas depende de una secuencia muy compleja de eventos que ocurren en un orden estricto y definido. Los mismos se encuentran asociados a la expresión concertada de genes particulares para cada etapa. El objetivo de este trabajo es identificar algunos de estos genes, utilizando la técnica de Differential display.

Los estudios realizados permitieron identificar dos genes, cuyos ARNm alcanzan diferentes niveles a lo largo de las edades postnatales estudiadas, las cuales representan diferentes estadios durante el desarrollo del cerebro.

Uno de los fragmentos de ARNm, de 547 pb denominado BJ3, tiene 100% de homología con la subunidad catalítica α de la protein fosfatasa 2A (PP2A). El mismo presenta una máxima señal en el differential display a los 7 días postnatales. Este patrón fue confirmado por Northern blots.

El segundo fragmento de ARNm, denominado BJ5 (348 pb), contiene una región de 143 pb que presenta 65 % de homología en su secuencia nucleotídica y 81% de similitud en su secuencia proteica deducida del ADNc, con una calsecuestrina. Dicho fragmento presenta una señal máxima en el differential display en P4, y disminuye a partir de esta edad hasta P17. Este resultado fue también confirmado por Northern blots. El ARNm de BJ5 está presente tanto en cerebro como en bazo, en niveles elevados en P4, y prácticamente no se detecta en otros tejidos. Dada la baja homología de BJ5 con calsecuestrina y la correlación temporal entre el aumento en los niveles de ARNm y la proliferación de las células grano, en cerebro, este fragmento podría pertenecer a un nuevo gen asociado con células en proliferación.

INTRODUCCION

Un rasgo esencial en la organización del sistema nervioso central (SNC) es la precisión en el establecimiento de las conexiones entre células nerviosas, es decir de las sinapsis. La especificidad de estos contactos depende de una secuencia muy compleja de eventos que ocurren en un orden estricto y definido, los cuales incluyen procesos tales como proliferación celular, migración, diferenciación, crecimiento axonal orientado y sinaptogénesis. Tales eventos se encuentran asociados a la expresión concertada de genes particulares para cada etapa (Hatten *et al.*, 1997). Hasta el momento los procesos celulares mencionados han sido ampliamente estudiados, sin embargo, se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que los determinan.

El cerebelo se torna un excelente modelo de estudio para los mecanismos que operan en el desarrollo del SNC. Esto se debe al limitado número de tipos celulares que lo constituyen, los cuales a su vez resultan fácilmente identificables, y a que la mayoría de los cambios morfogénicos en la corteza del cerebelo ocurren en forma postnatal temprana. Además, el 90% de las sinapsis ocurren entre las células grano y Purkinje, lo cual contribuye aún más a la simplicidad del modelo (Sotelo, C., 1984, 1990). Por otro lado, existe un detallado conocimiento de su anatomía (Altman J., 1985a, b, c).

Los eventos celulares que culminan con la sinaptogénesis comienzan con el rápido aumento del número de precursores de células grano, en la denominada capa granular externa (EGL), período que abarca desde el nacimiento hasta los 8 días postnatales (P0-P8, respectivamente) (Fig. 1). Esta etapa de rápida proliferación conduce a la expansión de la EGL, desde una capa formada por una única célula hasta alcanzar un espesor de 8-10 células. Por otro lado, entre los días postnatales 4 y 15 (P4 y P15, respectivamente) los precursores de las células grano entran en un programa de diferenciación celular que comienza con la emisión de dos axones. Cerca del día 7, las células emiten un proceso descendente que dirige la migración del cuerpo celular a través de la capa molecular (ML) en formación y de las células de Purkinje. La denominada capa

molecular corresponde a la acumulación de los axones de las células grano, entre la EGL y las células de Purkinje, una vez que las primeras han migrado. Las células grano postmigratorias se ubican formando una densa capa neuronal, la capa granular interna (IGL). Por otro lado, a esta misma edad la EGL alcanza su máximo espesor, el cual comienza a disminuir notablemente alrededor del día postnatal 10. Aproximadamente en el día postnatal 11 (P11), las células grano comienzan a emitir dendritas cortas que interactúan con fibras aferentes en crecimiento. Mientras tanto, la migración continúa, y comienzan a estabilizarse las sinapsis transientes entre células grano y Purkinje. Alrededor del día postnatal 17 (P17), la estabilización sináptica entre estas células está llegando a su fin y la EGL prácticamente ha desaparecido.

En contraste, los precursores de las células de Purkinje comienzan a proliferar en un estadio embrionario y dicha proliferación cesa alrededor del día 12 (E12). En ese momento las células comienzan a migrar desde la zona ventricular del neuroepitelio cerebeloso, a través del sistema de fibras gliales. Alrededor de los días 14-15 (E14-E15) forman contactos transientes con fibras aferentes. Las células de Purkinje inmaduras continúan emitiendo procesos celulares, que se ramifican para formar el árbol dendrítico. Dichas ramificaciones establecen conexiones transientes con los axones de las células grano, durante la etapa de selección del blanco. Posteriormente, para que estos contactos se tornen permanentes, es necesaria la actividad neurotransmisora, la cual conduce a la última etapa denominada de selección del destino o estabilización sináptica y completa la diferenciación de las células de Purkinje (Altman, J., 1985a, b, c; Mason *et al.*, 1984; Sotelo *et al.*, 1984; Goodman *et al.*, 1993).

El objetivo de este trabajo consiste en aislar e identificar uno o más genes que se encuentren modulados durante el desarrollo del cerebelo en ratón, utilizando la técnica de "Differential display" (Liang *et al.*, 1992, 1993, 1995). La misma fue desarrollada con el fin de poder identificar fragmentos de ARNm cuyos niveles difieran, en distintas muestras analizadas, como consecuencia de la expresión diferencial del/los gen/es correspondiente/s. La técnica, brevemente, consiste en la síntesis de ADNc a partir de ARNm, mediante la técnica de RT PCR utilizando

³⁵S-dATP, y posterior separación electroforética de todas las especies obtenidas en un gel de poliacrilamida seguida de autorradiografía. El par de primers utilizados consistirá en un oligo dT (PD1) y una secuencia de 20 nuleótidos (3R) la cual codifica para una región proteica acídica. Esta secuencia resulta de interés debido a que en el laboratorio, previamente, se han identificado otros genes con regiones de este tipo que presentan modulación durante el desarrollo del cerebelo y se pretende identificar nuevos genes con características similares.

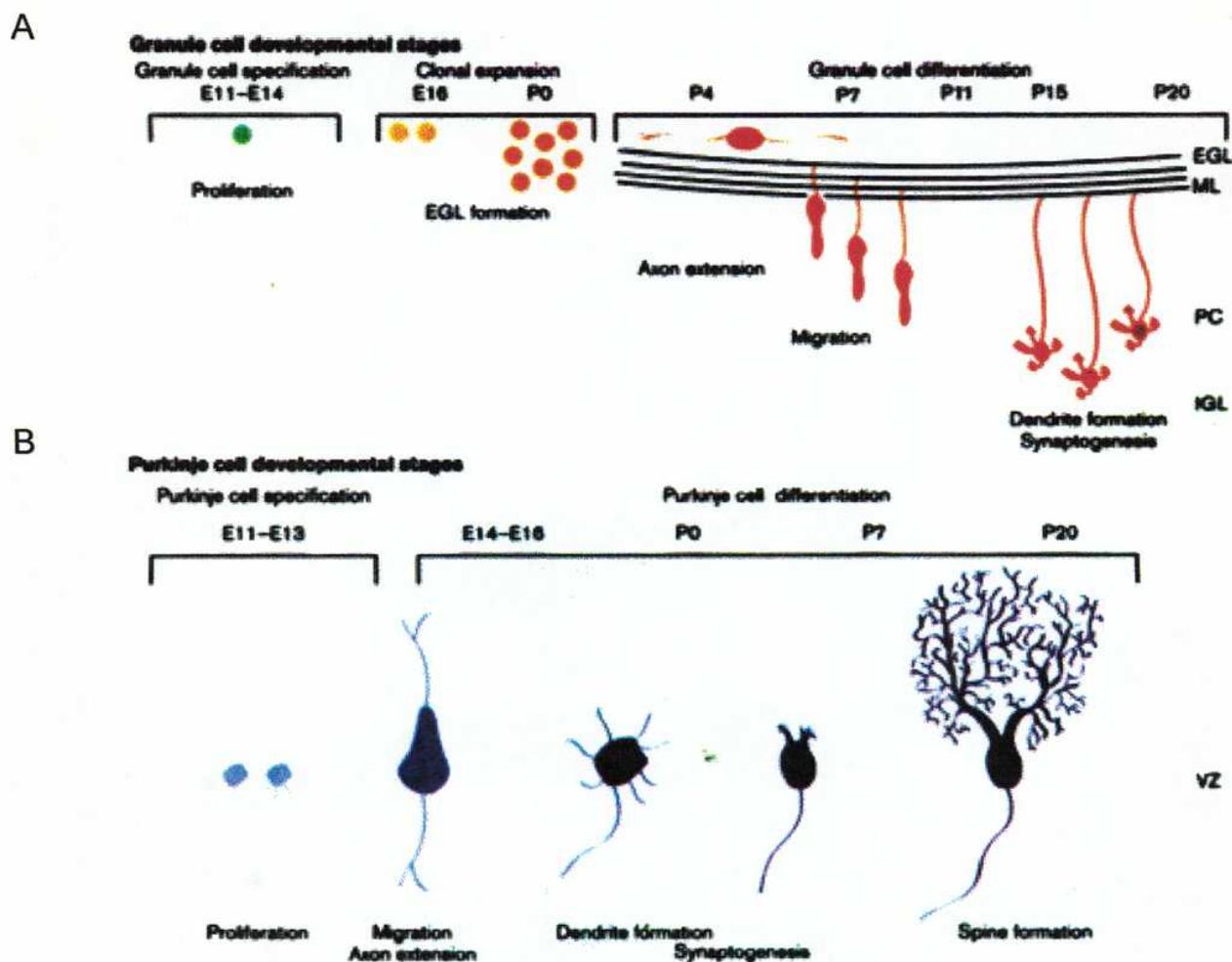
En nuestro caso se utilizará el ARN total de cerebelo de ratones de cuatro edades postnatales diferentes, P4, P7, P11 y P17; las cuales representan distintos estadios en el desarrollo del cerebelo de estos animales. P4 corresponde a un estadio en que las células grano están en plena proliferación, mientras que en P7 comienza la migración de las mismas. Por otro lado en P11 las células grano se encuentran en activo crecimiento axonal y comienzan a estabilizar las sinapsis, que hasta el momento son transientes, con las células de Purkinje. Finalmente en P17 la estabilización sináptica entre dichas células es máxima

FIGURA 1.- Esquema de los eventos celulares que ocurren durante el desarrollo del cerebelo en ratón.

- A.- Se describen los eventos que sufren los precursores de las células grano desde la edad embrionaria 11 (E11) hasta la edad postnatal 20 (P20).
- B.- Se describen los eventos que sufren los precursores de las células de Purkinje durante el mismo período que el contemplado en A.

E: edad embrionaria en días.

P: edad postnatal en días.



MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones de la cepa endociada C57BL-6J, de 4, 7,11 y 17 días postnatales, provistos por el Bioterio del CENAGEM, Instituto Malbrán.

Purificación de ARN

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se les disecó el cerebro. Cada pool de órganos fue homogeneizado en solución D (Citrato de sodio 25 mM, N-lauril sarcosine 0,5 %, Isotiocianato de Guanidinio 4M, β -Mercaptoetanol 8 mg/ml) en baño de hielo, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Posteriormente se procedió a la extracción de ARN según el método de Chomczynski & Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987), mediante una extracción con fenol-cloroformo, y precipitación con acetato de sodio e isopropanol. El ARN obtenido fue lavado con etanol 70% tres veces, resuspendido en H₂O DEPC y mantenido a -70°C hasta el momento de su uso.

Obtención de ADNc, PCR y separación de fragmentos (Differential display)

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc, 2 μ g de ARN total de cada edad, junto con el oligo dT PD1 (5' (T)₁₈VA 3') en concentración final 0.8 μ M, fueron llevados a 65°C por 10 minutos e inmediatamente puestos en hielo. A continuación se adicionaron los demás componentes necesarios para la transcripción reversa, correspondientes al kit de Promega (Madison, WI, USA). La composición final de la reacción fue buffer RT 1x (50mM Tris-HCl pH 8,3; 75mM KCl; 3mM MgCl₂; 10 mM DTT), 25 unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAsin®), deoxirribonucleótidos trifosfato 40 μ M y 200 unidades de transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV RT). La reacción

transcurrió durante 1 hora a, 42°C, en un volumen total de 25 μ l, y finalmente fue interrumpida llevando los tubos a 100°C por 3 minutos.

La reacción de PCR para cada edad, se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, conteniendo buffer PCR 1x (Tris-HCl 10mM pH=9,0; KCl 50mM; Tritón X-100 0,1%); MgCl₂ 1,5mM; dNTPs 10 μ M; ³⁵S-ATP 3,8 μ Ci; 1,2 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega, Madison , WI-USA); primers PD1 y 3R (5' AGGAGGGATGACGACGACGAG 3') y 2 μ l del producto obtenido en la transcripción reversa. La reacción transcurrió en un termociclador Gene cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA) en las siguientes condiciones:

94°C por 5 min	} 40 ciclos
94°C por 30s	
42°C por 1min	
72°C por 30s	

72°C por 5 min.

La separación de los fragmentos de ADNc amplificados se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 4%, desnaturaalizante, a 70w y 55°C durante 3 horas. Posteriormente la urea del gel se lavó con agua, y se secó por calor y vacío durante 2 horas, en un secador de geles, de manera que quedara adherido a una hoja de papel de filtro, y se expuso a un film XR-OMAT (Eastman-Kodak, Rochester , NY-USA) durante 24 horas a -70°C.

Recuperación de bandas diferenciales y reamplificación de las mismas

Cada banda de interés se cortó del gel adherido al papel de filtro, y se hidrató en 50 μ l de agua destilada estéril, durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se llevaron las muestras a 100°C durante 10 minutos para eluir el ADNc y luego se precipitaron en presencia de acetato de sodio 3,0 M pH 5,2 e isopropanol. Dado que las muestras podrían estar muy diluidas, se utilizó glucógeno para facilitar la precipitación del ADNc. Los precipitados se lavaron con etanol 70% y finalmente se resuspendieron en agua milliQ estéril.

Los fragmentos purificados fueron amplificados utilizando las mismas condiciones de PCR que se emplearon para el differential display.

Posteriormente los ADNcs reamplificados se corrieron en un gel de agarosa 1,8 %, los fragmentos se cortaron del gel y se purificaron utilizando el kit Gene Clean (Bio 101 Inc., Vista, CA-USA).

Clonado y secuenciación de los fragmentos

Los fragmentos de ADNc purificados fueron ligados con el vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI-USA), y utilizados para transformar E.coli Nova Blue (Novagen, Madison, WI-USA) competentes. Estas últimas se obtuvieron de acuerdo al protocolo siguiente, a partir de una placa de LB/Tc se picó una colonia de E.coli Nova Blue, se inoculó en LB/Tc (50 μ g/ml) líquido y se incubó O.N. a 37°C. A partir de este cultivo líquido se inició uno nuevo, en LB/Tc, hasta obtener una D.O.₆₀₀=0,4-0,6; el mismo se centrifugó, y el pellet de bacterias se resuspendió en CaCl₂ 50mM y se mantuvo a 4°C por 10 min. Luego se centrifugó y el pellet se resuspendió nuevamente en CaCl₂ 50mM, se adicionó glicerol hasta obtener una concentración igual a 16% v/v y se guardaron alícuotas a -70°C hasta el momento de su uso.

La transformación se llevó a cabo sometiendo a 50 μ l de suspensión de bacterias competentes y 10 μ l de reacción de ligación a shock térmico, transfiriendo la mezcla de 0°C a 42°C, manteniendo a esta temperatura por 90 seg, y llevando nuevamente a 0°C. Posteriormente se adicionaron 200 μ l de LB, se incubó a 37°C durante 1 hora, se plaqueó en LB agar / Tc (50 μ g/ml) /Amp (60 μ g/ml) / X-gal (80 μ g/ml) / IPTG (80 μ g/ml) y se incubó a 37°C O.N.

Se seleccionaron colonias blancas al azar de las diferentes placas correspondientes a las transformaciones con los diferentes insertos, y se procedió a la purificación del plásmido, en cada caso, utilizando el kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega Corp., Madison, WI-USA).

La secuenciación de los fragmentos de ADNc se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático ALFexpress (Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden)

propiedad del Instituto. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con el banco de datos de genes Genbank (servicio de red NCBI, programa BLAST).

Northern Blots

La obtención de las sondas se llevó a cabo por digestión con Eco RI (Stratagene, La Jolla, CA, USA) de los plásmidos purificados previamente, seguido de separación electroforética en un gel de agarosa 1%. Junto con las muestras se corrió un marcador de peso molecular para verificar que el tamaño fuera el adecuado. Los fragmentos fueron purificados utilizando el kit Gene Clean, y posteriormente fueron marcados con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP (NEN, Boston, MA, USA) utilizando el kit Prime-a-Gene Labelling System (Promega Corp, Madison, WI-USA). Finalmente la sonda marcada fue purificada utilizando una columna de Sephadex G-50.

Por otro lado, 30 μg de ARN total de cada edad fueron corridos en un gel de agarosa 1% conteniendo formaldehido 2,2 M y transferidos a una membrana de nylon Zeta Probe GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA) durante toda la noche. A continuación el ARN se fijó a la membrana por irradiación con luz UV, durante 2 minutos, y luego esta fue colocada en solución de azul de metileno (acetato de sodio 6,66% p/v, ácido acético glacial 0,01% v/v, azul de metileno 0,04 mg/ml) para teñir los ARNs ribosomales, los cuales se utilizaron posteriormente para normalizar los niveles de carga de ARNm presentes en la membrana a cada edad.

Para llevar a cabo el northern blot, cada membrana se prehibridizó con buffer fosfato 0,5 M; BSA 1%(p/v); EDTA dibásico 1mM y SDS 7% (p/v), a 65°C, durante 2 horas. La hibridización se llevó a cabo durante toda la noche a 65°C en la misma solución de prehibridización a la cual se adicionaron 3000 Ci/mmol de sonda marcada con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP. A continuación la membrana fue lavada dos veces a temperatura ambiente durante 5 minutos y una vez a 65°C durante 15 minutos con buffer fosfato 0,04M ; EDTA dibásico 1mM y SDS 1% (p/v) y finalmente

expuesta a una película XR-OMAT (Eastman-Kodak, Rochester , NY-USA) durante 24 horas a -70°C.

Para cada fragmento aislado del display diferencial, se realizaron Northern blots por duplicado. La cuantificación de los niveles de ARNm se llevó a cabo utilizando el programa IMAGE-b1 (SCION Corp.)

RESULTADOS

Differential display

En la figura 2 se observa el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

La figura 2 muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de las reacciones de transcripción reversa y PCR (differential display). Se puede observar que aparecen numerosas bandas diferenciales, con distintos patrones, a lo largo del gel. Tres de dichos fragmentos fueron seleccionados al azar para su posterior análisis y se las denominó BJ3, BJ5 y BJ7, tal como se indica en la figura.

FIGURA 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

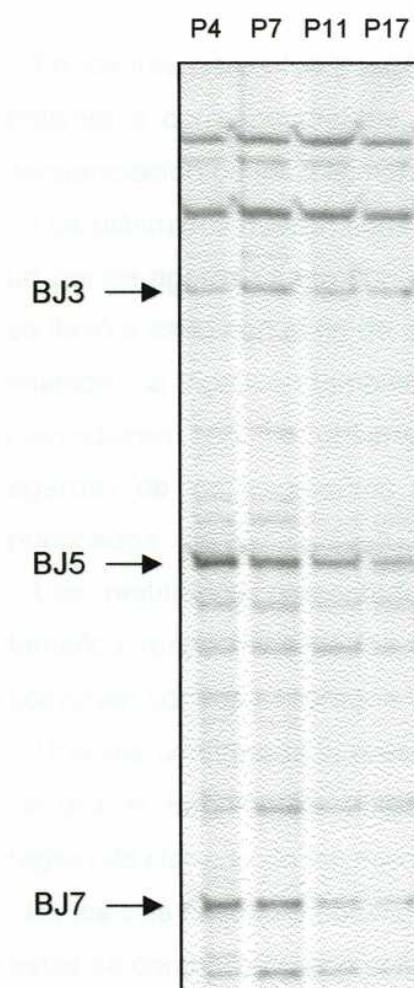


FIGURA 2

Differential display. En la figura se indican las edades postnatales de los ratones a los cuales se les disecó el cerebro del cual se extrajo el ARNtotal.

Con flechas están señaladas las bandas elegidas para continuar el trabajo, BJ3; BJ5 y BJ7.

BJ3 presenta una señal máxima, en el differential display, a los 7 días postnatales, mientras que BJ5 tiene un máximo a los 4 días, y BJ 7 presenta su máxima señal a los 7 días.

Los fragmentos elegidos fueron eluidos del gel y reamplificados, y sus tamaños aproximados se estimaron en función de un marcador de peso molecular que se sometió a electroforesis en gel de agarosa conjuntamente con los fragmentos de ADNc. Los resultados indican que BJ3 tiene un tamaño aproximado de 500-600 pb (pares de bases), BJ5 tiene aproximadamente 300-400 pb y BJ7 ronda los 200-300 pb.

Secuenciación de los fragmentos

En los tres casos fue posible obtener clones positivos, y por lo tanto purificar los plásmidos correspondientes, los cuales fueron utilizados para llevar a cabo la secuenciación de los fragmentos.

Los plásmidos fueron sometidos a digestión con la enzima Eco RI y corridos en un gel de agarosa junto con un marcador de pesos moleculares. Este tratamiento se llevó a cabo con el fin de confirmar que los insertos estuvieran presentes en los mismos. La digestión también permitió verificar que los tamaños de tales insertos coincidieran con los observados previamente en la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos levantados del differential display, reamplificados y purificados. (fig 3).

Los resultados presentados en la figura 3, indican que efectivamente los tamaños respectivos de los insertos presentes en los tres diferentes plásmidos, coinciden con los esperados.

Una vez confirmada la presencia de los insertos, se procedió a la secuenciación de dichos fragmentos, utilizando como primers secuencias flanqueantes a la región de clonado de los mismos, denominadas T7 y SP6.

En los tres casos se obtuvieron las secuencias respectivas de ambas cadenas, y estas se compararon con el fin de confirmar la composición de las mismas.

FIGURA 3.-

Digestión de los plásmidos purificados a partir de clones positivos para la transformación para cada uno de los insertos. En la figura están indicados los diferentes fragmentos, así como los tamaños relativos de los diferentes fragmentos del marcador de peso molecular.



La secuencia obtenida para el fragmento BJ3, presentó un 100% de homología con el RNAm del isotipo α de la subunidad catalítica de la protein fosfatasa 2A (PP2A) de *M. musculus* (Goetz J. M. & Kues W.), y un tamaño de 547 pb, que coincide con el observado previamente para este fragmento (fig 4).

FIGURA 4.-

Secuencia nucleotídica de BJ3. La secuencia del primer está marcada en ambos extremos, en color.

```

1  AGGAGGATGACCGACGACGAGTGACATGTGGCTGCCTCTACGAGGTGC
49  TGGGTCAAACGTCAAGAAAGAATACTTAAGAGTGTGTCGTCAGTTCCATGA
99  TTGCAGCTTGGTTACCACAAACGATAGCAATAGTTGGAGCACTGAAAATT
149 GTTACTACGTTCCGGTCATGGCACCCAGTTATATCCCTCCATCACCAGCTG
199 GTGAGCTCTGGACACCAACGTGAGGCCATTGGCATGATTAAATGTCTCA
249 GAAATATCTTGGCAAAGGTATAACCAGCTCCCCGAGGAGATATCCCCC
297 AGCCACCACGGTCATCTGGATCTGACCACAGCAAGTCACACATTGGCC
346 CTCATGAGGAACCTTCTGTAGGCGATCGAGTGCTCGGATGTGATCCAGT
395 GTGTCTATTGGATTGTGACAGAACACCGTGTAGACAGGGAGGTCTGGCC
444 ATTCAACCAAGGCAGTGAGAGGTAGATAGTCAAAAAGGGCTGTGAAGGAT
493 TTTCAAACATTGCATTCCGGATTTCTAAACACTCGTCGGCGTCATCC
544 TCCT

```

En la figura 4 se puede observar que el fragmento BJ3 contiene en ambos extremos el primer 3R, es decir que la amplificación del mismo se realizó a partir de este único primer, mientras que el oligo dT (PD1) no estuvo involucrado en la misma.

En el caso de BJ5, el fragmento de 348 pb, mostró un 65% de homología con el RNAm de calsecuestrina de músculo esquelético de *R. esculenta* (Treves *et al*, 1992). Sin embargo la secuencia proteica deducida de la región de ADNc que comprende desde el nucleótido 270 al 127 (correspondiente al marco de lectura -3 con respecto a la orientación de la secuencia en el vector de secuenciación), presentó 81 % de similitud con la proteína mencionada. (Fig. 5).

En la secuencia que se presenta en la figura 5, se puede observar que solo en uno de los extremos del fragmento aparece alguno de los primers (3R) utilizados

para la amplificación. Esto puede deberse a que la enzima *Taq* polimerasa se haya disociado del templado antes de llegar al extremo 5' del mismo y haya continuado con una amplificación lineal (un solo primer).

FIGURA 5.-

A.- Secuencia nucleotídica de BJ5. Se muestra también la secuencia proteica deducida del ADNc (fucsia), que presenta 81% de similitud con la calsecuestrina de músculo esquelético de *R. Esculenta*. En azul aparece el residuo de ácido aspártico más cercano al extremo carboxiterminal y en rojo el más cercano al aminoterminal, según la secuencia de la calsecuestrina. La secuencia del primer aparece en color. **B.-** Comparación de la secuencia proteica deducida del ADNc de BJ5 (rojo) y la secuencia proteica de la calsecuestrina (azul). En negro aparecen los aminoácidos idénticos y los positivos (+) (es decir aquellos aminoácidos diferentes, pero estructural y químicamente similares, de manera que su presencia no introduce cambios esenciales en la proteína)

A

1	ATAAGTCTGTGAGTCTAACCTGGTTGTTGTCATTGTCGACATCAAC	
51	GTTGTCACTGTTGACAACATCGTTGTCATCATTGTCGACACTGAGGTTGT	
101	CGACTTTGGCTCGGACTTGTGACATCATCGTCATCATTGTCGTCAACA	D D D D N D D V
151	TCATCTTCGTCATCGTTGTCGACGTCATCATCGTCATCGTCGTTGTCATC	D D E D D N D V D D D D D D N D D
201	ATCGTAATTGTCAATATCGTCATTGTCGTCAACATTGGCAATGTCGTCAATC	D Y N D I D D N D D V N A I D D D
252	ATCGTAGTTGTTGACATCATCGTAACGTCAACTTCTTCATCGTAGTTGTA	D Y N N V D
301	ATAGTAATTCTCATAGTAGGTGTAGGTC	CTCGTCGTCGTCACTCCTCCT

B

BJ5

270

372

127

419

Calsecuestrina de *Rana esculenta*

Identidades = 31 aminoácidos/48 aminoácidos (64%),

Positivos = 39 aminoácidos/48 aminoácidos (81%)

Finalmente, el fragmento BJ7 presentó 96% de homología con un factor poscoito de 5 días de *M.musculus* (Marra et al), y un tamaño de 264 pb (fig. 6). En este caso la amplificación fue también 3R-3R.

FIGURA 6.-

Secuencia nucleotídica de BJ7. La secuencia del primer está marcada en ambos extremos, en color.

1 AGGAGGGATGACGACGACGAGGAGGGAGGAAGAGGAAGAAATACCATGAGG
49 AAGAAGAGGAGGAAGATGATGATAGGCCCCCCAAGAAACCACGCCATG
97 GGGGCTTCATTTAGATGAGGCTGATGTAGATGATGAATATGAAGATGAA
147 GACCAGTGGGAAGATGGAGCTGAAGATATCCTGGAGAAAGAAGAGATTG
196 AAGCCTCCAATATTGATAACGTTGTTGCTGGATGAAGACCGCTTCGGGG
245 CTCGTCGTCGTACCTCCT

Northern blots

Los fragmentos que aparecen en la figura 3, se purificaron y marcaron con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP para obtener las diferentes sondas necesarias para este ensayo. El

mismo es necesario para confirmar el patrón diferencial obtenido en el differential display, dado que dicho patrón puede ser un artefacto de la técnica.

La figura 7 muestra los resultados obtenidos con el Northern blot de BJ3. Dicho fragmento hibridizó con tres especies de ARN de diferente peso molecular. La banda de menor peso molecular, coincide con el tamaño esperado para el ARNm de la subunidad catalítica α de la PP2A, mientras que el tamaño de las otras dos bandas no coincide con el de ninguna subunidad conocida para PP2A. La cuantificación realizada normalizando en función al ARN ribosomal 18 S, teñido con azul de metileno (fig 7A), muestra que existe un pico a los 7 días, en los niveles del mensajero de PP2A (fig 7C).

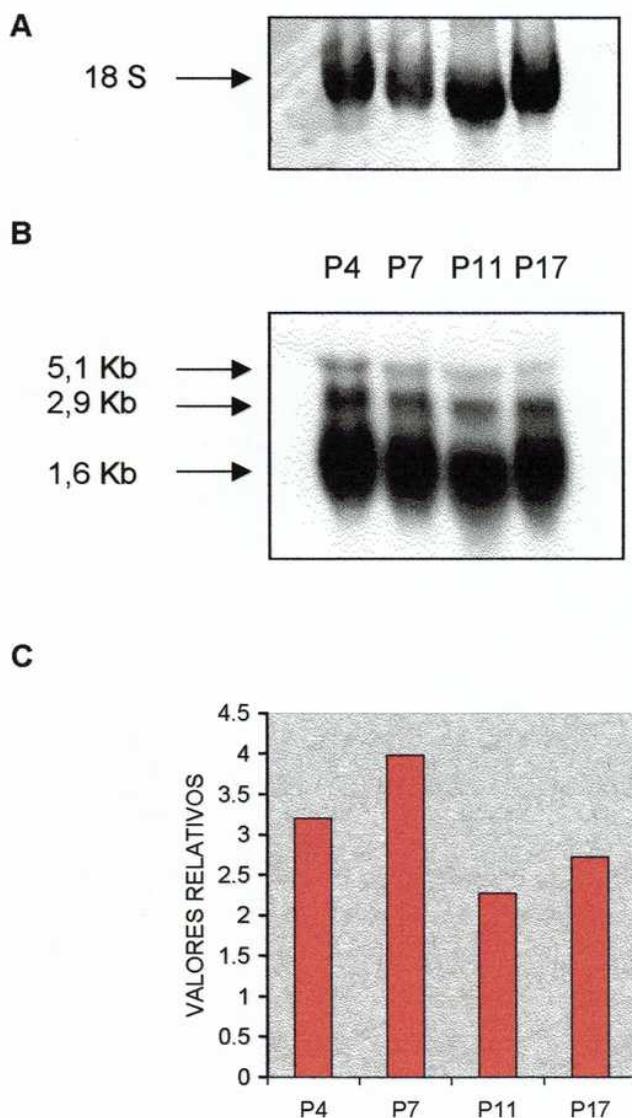


FIGURA 7.-

A-. ARN ribosomal 18 S, correspondiente al ARN sembrado para realizar el Northern blot para BJ3.

B-. Northern blot para BJ3. En la figura se indican los pesos moleculares de las tres especies que hibridizaron con la sonda y la edad de los ratones, en días postnatales, a partir de cuyos cerebros se purificó el ARN total.

C-. Cuantificación de los niveles del ARNm de 1,6 Kb obtenidos en el northern blot, normalizado con los ARNs ribosomales 18 S.

La figura 8 muestra los resultados obtenidos en el Northern blot de BJ5. Este fragmento hibridizó con dos especies de RNA, de 3.0 y 1.0 Kb de tamaño (fig 8B), y claramente se observa un marcado descenso en los niveles de ambas especies. Ambos son máximos a los 4 días postnatales (P4), comienzan a disminuir a los 7 días y alcanzan valores muy bajos a los 17 días postnatales. En la figura 8C se presenta la cuantificación de los niveles de ambos ARNm normalizados en función al ARN ribosomal 18S.

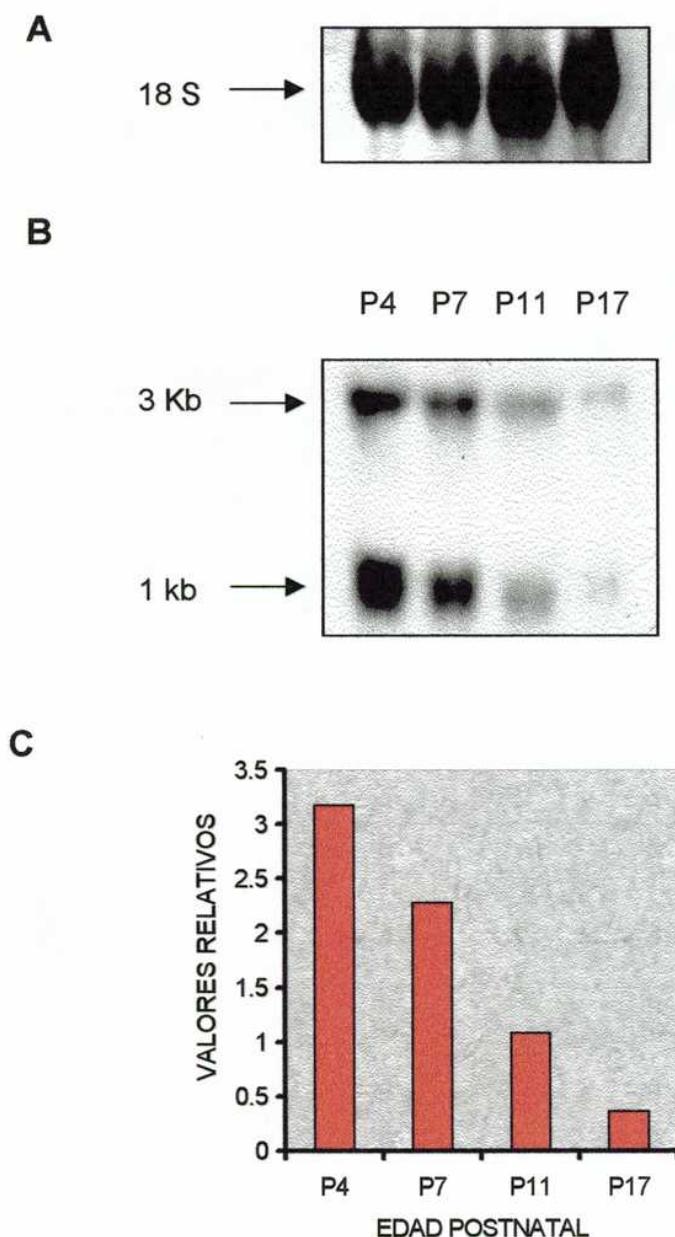


FIGURA 8.-

A.- ARN ribosomal 18 S, correspondiente al ARN utilizado para realizar el Northern blot para BJ5.
 B.- Northern blot para BJ5. En la figura se indican los pesos moleculares de las dos especies que hibridizaron con la sonda y la edad de los ratones, en días postnatales, a partir de cuyos cereblos se purificó el ARN total.
 C.- Cuantificación de los niveles de ARNm obtenidos en el northern blot, normalizado en función a los ARNs ribosomales 18 S. Se muestran los promedios de ambos mensajeros

En el caso del fragmento denominado BJ7, el Northern blot no reprodujo el patrón observado en el Differential display (los datos no se muestran), por lo cual se decidió no continuar, por el momento, el estudio del mismo.

Dados los resultados tan interesantes obtenidos con BJ5, este fragmento se utilizó también como sonda en un Northern blot para ARN de diferentes tejidos (fig. 9)

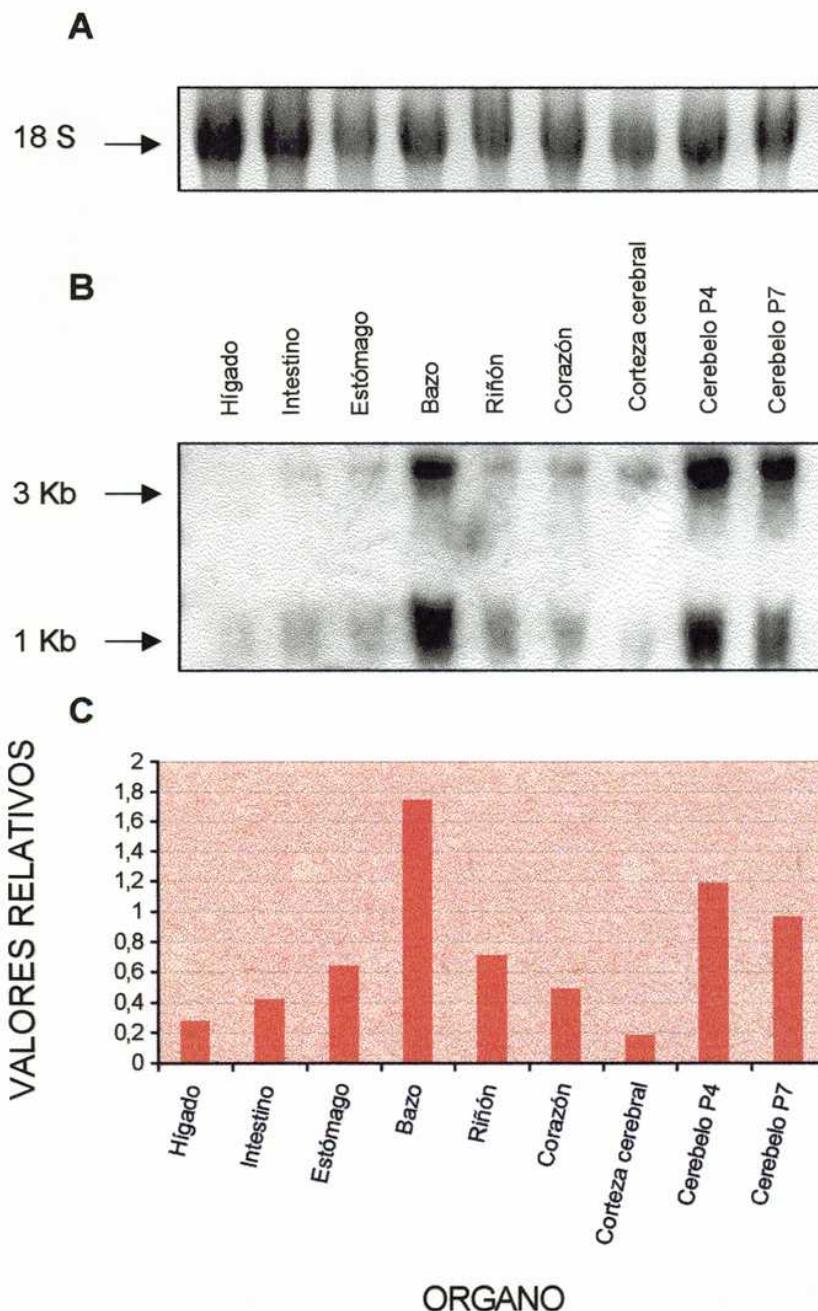


FIGURA 9.-

A.- ARN ribosomal 18 S, correspondiente al ARN, extraido de los órganos o tejidos indicados en la figura, 9B, utilizado para realizar el Northern blot de BJ5.

B.- Northern blot para BJ5. En la figura se indican los pesos moleculares de las dos especies que hibridizaron con la sonda y la fuente del ARN. En todos los casos, excepto en cerebelo P7, se extrajo el ARN de ratones de 4 días postnatales.

C.- Cuantificación de los niveles de ARNm obtenidos en el northern blot, normalizado en función a los ARNs ribosomales 18 S. Se muestran los promedios de ambos mensajeros

Como se observa en la figura 9, ambos mensajeros están presentes de manera abundante tanto en cerebelo como en bazo, mientras que apenas se detecta en hígado, corazón, estómago, riñón, intestino y corteza cerebral. Por otro lado nuevamente se confirma que la expresión en cerebelo es mayor a los 4 días, ya que en el ensayo se utilizó ARN total de cerebelo de 4 y 7 días, y se vuelve a observar el descenso en los niveles de ambos ARNm.

Este ensayo no se realizó para BJ3, debido a que se decidió centrar el estudio en BJ5 dada la marcada modulación de ambos mensajeros que hibridizan con este fragmento, presentes durante el desarrollo del cerebelo.

DISCUSION

Los estudios realizados permitieron aislar dos fragmentos que corresponden a ARNm modulados durante el período de sinaptogénesis.

Uno de los fragmentos, llamado BJ3, corresponde a una región del ARNm de la subunidad catalítica α de la protein fosfatasa 2A. Este hibridizó en el Northern blot con tres especies de ARNm de diferente peso molecular, que siguen el mismo patrón. Una de ellas, de 1,6 Kb coincide con el tamaño esperado para el ARNm de la subunidad catalítica de PP2A. Las otras dos especies, de 2,9 y 5,1 Kb, podrían pertenecer a alguna/s fosfatasa/s que aun no esté/n descripta/s, y que comparte con PP2A la región que corresponde a la secuencia del fragmento BJ3.

Se sabe que PP2A, entre otras funciones, defosforila a la proteína Tau. Cuando esto sucede Tau se asocia a los microtúbulos y los estabiliza, estabilizando por lo tanto los axones en crecimiento (Sontag E. *et al*, 1996; Merrick S.E. *et al*, 1997). Como se observó en el differential display, y se confirmó por Northern blots, el ARNm de BJ3 presenta un pico en sus niveles en P7. Por otro lado, es aproximadamente en esta edad cuando las células grano emiten un proceso descendente que dirige la migración del cuerpo celular a través de la capa molecular. En base a estos datos, a priori, se podría pensar que la PP2A jugaría algún rol en la migración de las células grano, a través de su interacción con Tau y la consecuente estabilización de los microtúbulos.

Sin embargo, la PP2A es un complejo formado por tres subunidades, una con función catalítica, otra estructural y una subunidad con función regulatoria. Esta última regula la actividad y la especificidad de la holoenzima (Nagase T. *et al*, 1997; Turowski P. *et al*, 1997). Por lo tanto resulta imprescindible conocer como es la expresión de la subunidad regulatoria, durante el desarrollo del cerebelo, para poder asignar un rol específico durante este período a la PP2A. De la misma manera, sería necesario determinar si el patrón observado para los niveles de ARNm de la subunidad catalítica, son acompañados por el patrón en los niveles de proteína.

Además, esta enzima está involucrada en numerosos procesos celulares, tales como replicación del ADN, ciclo celular, transcripción y traducción, los cuales son muy generales y esenciales para el funcionamiento celular. Por lo tanto, las variaciones en los niveles de ARNm de esta proteína, observadas durante el período en estudio, podrían responder a la necesidad del mantenimiento de la integridad celular.

El segundo fragmento, BJ5 de 348 pb, presentó una señal máxima en el differential display a los 4 días postnatales, lo cual fue confirmado por Northern blots.

Una región de 143 pb de las 348 de longitud total del fragmento, presentó 64% de homología con el mensajero de una calsecuestrina de músculo esquelético de *Rana esculenta*. Por otro lado, la secuencia proteica deducida del ADNc correspondiente a esta región presentó 81% de similitud con la calsecuestrina. Esta proteína presenta en su extremo carboxiterminal una región de 44 residuos de ácido aspártico, que le otorga a la misma una alta capacidad de unión a Ca^{2+} . Es precisamente con esta región con la cual la secuencia proteica deducida del ADNc de BJ5 presenta homología. Sin embargo dado que solo 143 de las 348 pb de BJ5 pertenecen a la región mencionada, este fragmento dudosamente pertenezca al ARNm de una calsecuestrina del tipo presente en el músculo esquelético de *R.esculenta*. De todos modos, dado que la secuencia proteica deducida del ADNc de BJ5 codifica para una región rica en residuos acídicos, dicho fragmento podría pertenecer al ARNm de una proteína que se une a Ca^{2+} , pero diferente de calsecuestrina o proteínas similares a ella.

Por otro lado, cuando se utilizó a BJ5 como sonda en un Northern blot realizado con ARN de diferentes tejidos, se observó que en P4, los niveles de ambos mensajeros están elevados tanto en bazo como en cerebelo, y prácticamente no se detectan en los demás tejidos analizados. En base a estos datos y sumado a que en ambos tejidos hay células en plena proliferación a esa edad, podríamos especular que BJ5 representa un fragmento de ARNm de un nuevo gen que codifica para una proteína involucrada en la proliferación celular.

En el caso del cerebelo, los niveles de ambas especies de ARNm corresponden temporalmente a la proliferación de las células grano. Además, en resultados preliminares de RT-PCR *in situ*, fue posible identificar a BJ5 en células grano solamente (los datos no se muestran). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes y es necesario repetirlos para poder afirmar la ubicación celular de este ARNm. Dado que los resultados obtenidos son sumamente interesantes, es nuestro interés continuar con el estudio de BJ5 con el fin de poder determinar su función.

BIBLIOGRAFIA

- Altman J., Embryonic Development of the Rat Cerebellum. III. Regional Differences in the Time of Origin, Migration, and Settling of Purkinje Cells., *Journal of Comparative Neurology*, (1985a), **231**: 42-65.
- Altman J., Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer, *Journal of Comparative Neurology*, (1985b), **145**: 399-463 .
- Altman J., *Journal of Comparative Neurology*, Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat. Maturation of the components of the granular layer, (1985c), **145**: 465-513
- Chomczynski P. and Sacchi N., Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, 1987, *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- Goetz J.M. and Kues W., Nucleotide sequence of murine brain cDNAs encoding the isotypes alpha and beta of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A, (1996), BLAST accesion number Z67745.
- Goodman C.S. and Shatz C., Developmental Mechanisms That Generate Precise Patterns of Neuronal Connectivity , 1993, *Cell*, **72** / *Neuron*, **10** (Suppl.) : 77-98.
- Hatten, M.E, Alder, J., Zimmerman, K. And Heintz, N., Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation, (1997), *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7(1)**: 40-47.
- Liang P. and Pardee A.B., Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction, (1992), *Science*, **257**: 967-971.
- Liang, P., Averboukh, L. and Pardee, A.B., Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization, (1993), *Nucleic Acids Res*, **21**: 3269-3275.
- Liang, P., Bauer, D., Averboukh, L ., Warthoe, P., Roahrwild, M., Muller, H., Strauss, M. And Pardee, A.B., Analysis of altered gene expression by differential display, (1995), *Meth. Enzymol.*, **254**: 304-321.

- Liang, P. and Pardee, A.B., Recent advances in differential display, (1995), *Curr. Opin. Immunol.*, **7**: 274-280.
- Marra,M., Hillier,L., Allen,M., Bowles,M., Dietrich,N., Dubuque,T., Geisel,S., Kucaba,T., Lacy,M., Le,M., Martin,J., Morris,M., Schellenberg,K., Steptoe,M., Tan,F., Underwood,K., Moore,B., Theising,B., Wylie,T., Lennon,G., Soares,B., Wilson,R. and Waterston,R., (1996), The WashU-HHMI Mouse EST Project. BLAST accession number AA107508.
- Mason C.A. and Gregory E., Postnatal Maturation of Cerebellar Mossy and Climbing Fibers: Transient expression of Dual Features on Single Axons, (1984), *J. Neurosci.*, **4**: 1715-1735.
- Merrick S.E., Trojanowski J.Q. and Lee V.M., Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/threonine phosphatases in cultured human neurons., (1997), **17(15)**: 5726-5737.
- Nagase T., Murakami T., Nozaki H., Inoue R., Nishito Y., Tanabe O., Usui H. and Takeda M., Tissue and subcellular distributions, and characterization of rat brain protein phosphatase 2A containing a 72-kDa delta/B" subunit., *J Biochem* (Tokyo), (1997), **122(1)**:178-187.
- Sontag E., Nunbhakdi-Graig, V., Lee G., Bloom G. S. and Mumby M. C., Regulation of the Phosphorylation State and Microtubule-Binding Activity of Tau by Protein Phosphatase 2A., 1996, *Neuron*, **17**: 1201-1207.
- Sotelo C., Bourrat F. and Triller A., Postnatal Development of the Inferior Olivary Complex in the Rat. II. Topographic Organization of the Immature Olivocerebellar Projection, 1984, *J. Comp. Neurol.*, **222**: 177-199.
- Sotelo C., Cerebellar synaptogenesis : what we can learn from mutant mice, (1990), *J. Exp. Biol.*, **153**: 225-249 .
- Treves S., Vilsen B., Chiozzi P., Andersen J.P. and Zorzato F., Molecular cloning, functionalexpression and tissue distribution of the cDNA encoding frog skeletal muscle calsequestrin, (1992), *Biochem. J.* , **283**: 767-772.

- Turowski P., Favre B., Campbell K. S., Lamb N. J. And Hemmings B.A., Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2^a catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit PR65alpha., (1997), *Eur J. Biochem*, **248 (1)**: 200-208.

AGRADECIMIENTOS *****

En primer lugar quisiera agradecer a los Dres. Carminatti y Santa Coloma por brindarme sus laboratorios y permitirme trabajar sin ningún tipo de restricción. Quisiera agradecer además a Anita, a Billy y a Caffe por brindarme toda su experiencia y su ayuda. A Paulita por todas las averiguaciones sobre el seminario que hizo por mi en la Facultad. A Mariana por preocuparse por mi y por escucharme cuando lo necesité. A mi hermano y mi cuñada por mi sobrina/o. A Claudia por ser mi mejor amiga.

Quisiera agradecer especialmente al Dr. Martín Radrizzani por guiarme en este trabajo, brindarme su experiencia, sus ideas y por estar siempre de buen humor y procurar ayudar a quien lo necesite, en fin por ser tan excelente persona. Otro agradecimiento especial es para Marietta, no solo por su experiencia, su buen criterio científico y su ayuda, sino también por su amistad y por escucharme en momentos de dudas.

Y por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a LOS REDONDOS por volver a tocar en Buenos Aires, a pesar de hacerlo en la cancha de Racing.