

Tesis de Posgrado

Estructura primaria de la fibronectina humana y mecanismos que dan origen a sus diferentes polipéptidos

Gutman, Alejandro

1988

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Gutman, Alejandro. (1988). Estructura primaria de la fibronectina humana y mecanismos que dan origen a sus diferentes polipéptidos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2091_Gutman.pdf

Cita tipo Chicago:

Gutman, Alejandro. "Estructura primaria de la fibronectina humana y mecanismos que dan origen a sus diferentes polipéptidos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2091_Gutman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Registro 2091-2

TESIS:

Nº 2091

Ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA FIBRONECTINA HUMANA
Y
MECANISMOS QUE DAN ORIGEN A SUS DIFERENTES POLIPEPTIDOS

Autor: Alejandro Gutman

Director de Tesis: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), Buenos Aires.

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1988

2091-
y.2

I N D I C E

1.	INTRODUCCION .	1
1.1	LA FIBRONECTINA	2
1.1.1	Funciones	2
1.1.2	Estructura Primaria	7
1.1.3	<i>Splicing</i> Alternativo .	10
	a. Procesamiento del ARNm precursor (pre-ARNm): características generales	10
	b. El <i>splicing</i> alternativo: sus dis- tintos tipos	12
	c. <i>Splicing</i> alternativo del pre-ARNm de la fibronectina	15
1.1.4	Dominios funcionales	20
	a. Sitios de unión a células	20
	b. Sitio de unión a colágeno	22
1.1.5	Organización del gen	22
1.2	RECEPTORES CELULARES DE LA FIBRONECTINA Y DE OTRAS PROTEINAS ADHESIVAS .	26
1.3	NUESTRA INVESTIGACION	34
2.	MATERIALES Y METODOS	35
2.1	AISLAMIENTO DE ADN	36
2.1.1	Aislamiento de ADN de plásmidos.	36
2.1.2	Aislamiento de ADN de bacteriófagos.	38
2.2	EXTRACCION Y PURIFICACION DE ARN .	40
2.3	SINTESIS DE ADN COPIA POR EL METODO DE RNasa H	42
2.4	INSERCIÓN DE MOLECULAS DE ADN EN VECTORES.	46
2.5	TRANSFORMACION EN <i>E. coli</i>	50
2.6	HIBRIDACION DE ADN EN COLONIAS BACTERIANAS	52

2.7	ANALISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCION Y MARCADO DE ADN	54
2.8	ELECTROFORESIS EN GELES.	58
2.8.1	Geles de Agarosa	58
2.8.2	Geles de Poliacrilamida.	60
2.9	TRANSFERENCIA DE ADN (TECNICA DE SOUTHERN)	61
2.10	SECUENCIACION DE ADN	63
2.10.1	Método de Maxam & Gilbert.	63
2.10.2	Método de Sanger	65
2.11	MAPEO CON NUCLEASA S1.	66
2.12	SINTESIS Y PURIFICACION DE OLIGONUCLEOTIDOS.	63
2.13	LINEAS CELULARES Y CEPAS BACTERIANAS	69
2.13.1	Líneas celulares	69
2.13.2	Cepas bacterianas.	70
2.14	MEDIOS DE CULTIVO.	70
3.	RESULTADOS	72
3.1.	ANALISIS DEL EXTREMO 5' DEL ARNm DE LA FIBRONECTINA	73
3.1.1	Síntesis y clonado de ADNc	73
3.1.2	Caracterización de los clones.	76
3.1.3	Análisis de la secuencia	76
3.2	BUSQUEDA DE UNA TERCER REGION DE SPLICING ALTERNATIVO.	83
3.2.1	Falta de variabilidad en una región del pre-ARNm, situada entre la 1ª y 2ª homologías de tipo III.	84
3.2.2	Hallazgo de una nueva región de <i>splicing</i> alterna- tivo en el pre-ARNm de la fibronectina	86
	a. Caracterización de una región del gen de la fibronectina.	86
	b. Generación de diferentes subclones y análisis de los mismos	90

c.	Un exón ausente en los clones de ADNc.	97
d.	Expresión del EDII en los ARNms de la fibronectina	99
e.	Ausencia del EDII en los ARNms de hígado	101
3.3.	CONSTRUCCION DE UN ADNC DE FIBRONECTINA HUMANA, DE LONGITUD COMPLETA .	102
3.3.1	Obtención del 75% terminal (3') del clon .	107
3.3.2	Obtención del 25% inicial (5') del clon.	110
3.3.3	Ensamblado de los productos finales de las dos etapas anteriores.	113
4.	DISCUSION.	115
5.	CONCLUSIONES .	128
6.	BIBLIOGRAFIA .	133

ABREVIATURAS

ADNc: Acido desoxirribonucleico copia
ARNm: Acido ribonucleico mensajero
ARNms: Acidos ribonucleicos mensajeros
BSA: Albúmina sérica bovina
CIP: Fosfatasa alcalina de intestino de ternero
DNasa I: desoxirribonucleasa I (de páncreas bovino)
dNTPs: Desoxinucleósidos trifosfatos
IPTG: Isopropiltio- β -D-galactósido
PNK: Polinucleótido quinasa del fago T₄
pb: pares de bases
pre-ARNm: ARN mensajero precursor
kb: kilobases
RNasa A: ribonucleasa A (de páncreas bovino)
SDS: Dodecil-sulfato de sodio
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido
TCA: Acido tricloroacético

Código de una sola letra para aminoácidos

A: alanina; C: cisteína; D: acido aspártico;
E: ácido glutámico; F: fenilalanina; G: glicina
H: histidina; I: isoleucina; K: lisina;
L: leucina; M: metionina; N: asparagina;
P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina;
T; treonina; V: valina; W: triptófano; Y: tirosina.

1.1. LA FIBRONECTINA

1.1.1. FUNCIONES.

Durante los últimos 1.000 millones de años de evolución los organismos multicelulares han adquirido la capacidad de sintetizar un conjunto de proteínas con múltiples dominios, que tienen la propiedad de unirse a un amplio espectro de ligandos diferentes. Estas proteínas son secretadas y depositadas en la vecindad de las células donde forman una trama de fibrillas organizada, conocida como matriz extracelular.

El material extracelular contribuye a que las células se mantengan unidas entre sí y permite que éstas se adhieran a sustratos fijos, por lo cual se volvió crucial en el reino animal, particularmente en los vertebrados, donde grandes masas de células se organizan en tejidos. Sin embargo, las matrices extracelulares no son sólo armazones rígidos o semirígidos donde residen las células, sino que intervienen, dinámicamente, en la regulación de la migración y diferenciación celulares, favoreciendo la cicatrización de heridas y participando en la transformación oncogénica y la metástasis. Estas actividades se producen mediante la interacción de distintos componentes de la matriz extracelular entre sí y con receptores de la superficie celular, que se conectan a su vez con el citoesqueleto. Varias revisiones recientes y libros consideran estos temas: Yamada (1983); Kleinman *et al.* (1984); Thiery, Duband & Tucker (1985); Watt (1986).

La matriz extracelular está constituida por colágeno, proteoglicanos y un conjunto de glicoproteínas adhesivas, a los que deben agregarse algunos componentes menores (nidóge-

no, proteína de unión, etc.). Una descripción detallada de la biología molecular de estas proteínas se encuentra en Kornblihtt & Gutman (1988).

Las glicoproteínas adhesivas tienen en común un alto peso molecular, la presencia de secuencias repetitivas de aminoácidos y la naturaleza multifuncional de sus polipéptidos. Varias de ellas se encuentran, también, en el plasma donde desempeñan importantes papeles en procesos que tienen como base el contacto intercelular, tales como la hemostasia y la curación de heridas.

Este grupo de proteínas está integrado por la trombopodina, la laminina, la vitronectina, el factor de von Willebrand, y la fibronectina. La estructura y funciones de esta última se vienen investigando, intensivamente, desde hace varios años y es, hoy, la mejor conocida de estas versátiles moléculas (TABLA I).

La relación entre la fibronectina, sus propiedades adhesivas y las células cancerosas comenzó a vislumbrarse hace una década y media cuando se detectó que una proteína de alto peso molecular que se encontraba asociada a la superficie celular de las células normales no estaba presente en muchas células tumorales. Esa proteína, que fue luego denominada fibronectina, era capaz, por otra parte, de aumentar en forma notable la adhesividad de células cancerosas, en cultivo, al vidrio o al plástico (Yamada, Yamada & Pastan, 1976). El agregado de fibronectina a las células tumorales promovía, además, la reorganización de los filamentos de actina (en las células tumorales los filamentos de actina y, en general, el citoesqueleto están desorganizados; Yamada, Ohanian & Pastan, 1976).

Se demostró, luego, que las fibrillas de fibronectina, que se disponen alrededor de las células se alinean en forma

Tabla I. Características de la fibronectina

CELULAS DONDE SE SINTETIZA	LIGANDOS
Hepatocitos	Heparina
Fibroblastos	Fibrina
Células endoteliales	Factor XIIIa
Condrocitos	Colágeno
Mioblastos	Receptores celulares
Células de la glía	Bacterias
Macrófagos	
Células epiteliales	
¿Megacariocitos?	
LOCALIZACION	FUNCIONES
Plaquetas	Promoción de la adhesividad
Plasma sanguíneo	y el <i>spreading</i> celulares
Matrices extracelulares	Migración celular y desarrollo embrionario
TIPOS	Reversión parcial del fenotipo de células transformadas
Plasmática(hepatocitos)	Hemostasia: a) Adhesividad plaquetaria; b) Coagulación
Celular (fibroblastos y muchas líneas celulares)	Curación de heridas

paralela a la trama de actina que se encuentra en el interior sugiriendo una conexión entre ambas, por medio de un componente que atravesase la membrana plasmática (Ali *et al.*, 1977). De hecho, recientemente se han identificado proteínas de transmembrana que son capaces de unirse a la fibronectina por una parte y, por otra, al citoesqueleto a través de proteínas intermediarias (ver receptores celulares de la fibronectina, más adelante).

La pérdida de fibronectina que se observa en la superficie de las células tumorales podría deberse a un defecto cuantitativo o cualitativo en la síntesis de esta proteína, o a un aumento en su degradación. Por otra parte, la causa podría residir en las proteínas de transmembrana que conectan la fibronectina con el citoesqueleto (Hynes, 1986). Cualquiera sea la causa, la disminución de la adhesividad y la desorganización del citoesqueleto que se observa en las células cancerosas refleja la pérdida de los mecanismos que controlan la posición y migración de las células, todo lo cual tiene como consecuencia la producción de metástasis, carácter distintivo de las neoplasias malignas.

La propiedad de la fibronectina de promover la adhesión de células a un sustrato fijo puede estar relacionada, a su vez, con el fenómeno de la migración celular y el desarrollo embrionario. J.P. Thiery y colaboradores han demostrado, por ejemplo, que las células de la cresta neural migran en el embrión a lo largo de superficies cubiertas de fibronectina (Duband *et al.*, 1986; ver sección 1.1.4). Lo mismo se ha establecido para otros tipos celulares (Savagner *et al.*, 1986). Duband *et al.* (1986) han postulado la hipótesis según la cual, la capacidad migratoria de una célula depende, entre otros factores, de su capacidad de fabricar y secretar

Introducción

fibronectina. Esto es, una célula que no sintetiza fibronectina se mueve, migra, aún cuando se la provea de fibronectina exógena. Por el contrario, una célula que produce su propia fibronectina, se adhiere al sustrato y no se mueve.

Como se mencionó anteriormente, la fibronectina se encuentra también en el plasma sanguíneo, junto con otras glicoproteínas adhesivas, y se acumula en las plaquetas, en los llamados gránulos α . Cuando se produce una lesión vascular, el contenido de los gránulos α es secretado hacia la corriente sanguínea y, simultáneamente, se produce la translocación de un receptor para fibronectina -y para otras proteínas- a la superficie de la membrana (Gardner & Hynes, 1985; Parise & Phillips, 1986). Luego, las plaquetas se adhieren a los bordes de la pared dañada y se agregan para formar un tapón, que evita la pérdida de sangre. Es concebible que la fibronectina actúe, junto con otras proteínas adhesivas (trombospondina, factor de von Willebrand), facilitando la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular. Posteriormente, y si estos mecanismos no son suficientes para detener la hemorragia, actúa el proceso de coagulación sanguínea. El coágulo está compuesto de fibrina, en su mayor parte, pero también contiene gran cantidad de fibronectina. D. Mosher determinó que el factor XIIIa de coagulación desencadena la formación de uniones covalentes entre las dos proteínas (Mosher, 1975; 1976). La asociación fibrina-fibronectina parece, además, ser importante en la curación de heridas. Por ejemplo, ante una herida de la córnea ocular, las células reparadoras del epitelio corneano migran a través de una fina capa de fibrina-fibronectina.

1.1.2. ESTRUCTURA PRIMARIA

De acuerdo a su localización y estructura se han distinguido dos formas de fibronectina: plasmática y celular. La primera es un heterodímero soluble, cuyas subunidades de 230.000-250.000 D están unidas por puentes disulfuro, y que circula en la sangre en una concentración de 300 mg/l. El segundo tipo de fibronectina, se encuentra alrededor de las células y está asociado a la superficie de las mismas, donde forma dímeros y multímeros; estos últimos presentan una estructura de tipo fibrilar y son altamente insolubles.

Cada subunidad de las fibronectinas celular y plasmática muestra considerable heterogeneidad en carga y tamaño que no se puede atribuir, exclusivamente, a variabilidad en el procesamiento postraduccional (oligosacáridos unidos a N y a O, Krusius *et al.*, 1985; fosforilación de treoninas y serinas, y sulfatación de tirosinas e hidratos de carbono, Paul & Hynes, 1984). Esto implica que hay diferencias estructurales primarias no sólo entre las subunidades de las fibronectinas celular y plasmática, sino también entre las subunidades que pertenecen a un mismo tipo de molécula. La fibronectina puede, entonces, representar una familia de glicoproteínas estrechamente relacionadas.

Los primeros esfuerzos dirigidos a dilucidar la estructura primaria de la fibronectina se basaron en la determinación directa de la secuencia de péptidos, pertenecientes a las proteínas bovina (Petersen *et al.* 1983) y humana (García Pardo, Pearlstein & Frangione, 1983). Sin embargo, esta estrategia larga y difícil pronto se vio superada por el uso de técnicas de ADN recombinante. Así, el aislamiento y caracterización de clones de ADN copia (ADNc) que comprendían

la casi totalidad de la proteína madura humana permitió obtener un cuadro más completo de la secuencia de aminoácidos de la fibronectina (Kornblihtt, Vibe-Pedersen & Baralle, 1983; 1984a; Kornblihtt *et al.*, 1985; Umezawa, Kornblihtt & Baralle, 1985; Bernard *et al.*, 1985; Sekiguchi *et al.*, 1986).

Los datos aportados por estos trabajos revelan un alto grado de orden y complejidad en la estructura de la proteína (Figura 1). Las subunidades polipeptídicas de las fibronectinas celular y plasmática tienen una organización modular y comprenden una serie de unidades de homología interna que pueden agruparse en tres tipos: I, II y III con alrededor de 40, 60 y 90 aminoácidos de longitud, respectivamente (Petersen *et al.*, 1983). Las homologías de tipo I y II están estabilizadas por puentes disulfuro intracatenarios, mientras que las unidades de tipo III no tienen puentes disulfuro. Los tres tipos de homología interna se disponen desde el extremo NH₂ terminal al COOH terminal como sigue: 6 unidades de tipo I, 2 unidades de tipo II, 3 unidades de tipo I, 17 unidades de tipo III y 3 unidades de tipo I. La proteína contiene, además, cuatro regiones que no tienen homología con otras partes de la molécula. Estas corresponden a los extremos NH₂ y COOH terminales de la proteína y a las zonas que conectan las dos primeras y las dos últimas homologías de tipo III. Es interesante notar la disposición simétrica de algunas homologías: dos unidades de tipo III están separadas, por dos segmentos no homólogos, de un bloque central que comprende 15 elementos contiguos de tipo III.

Las secuencias humanas determinadas con anterioridad a nuestro trabajo comprenden 2356 aminoácidos, que corresponden a la casi totalidad de la proteína madura. La informa-

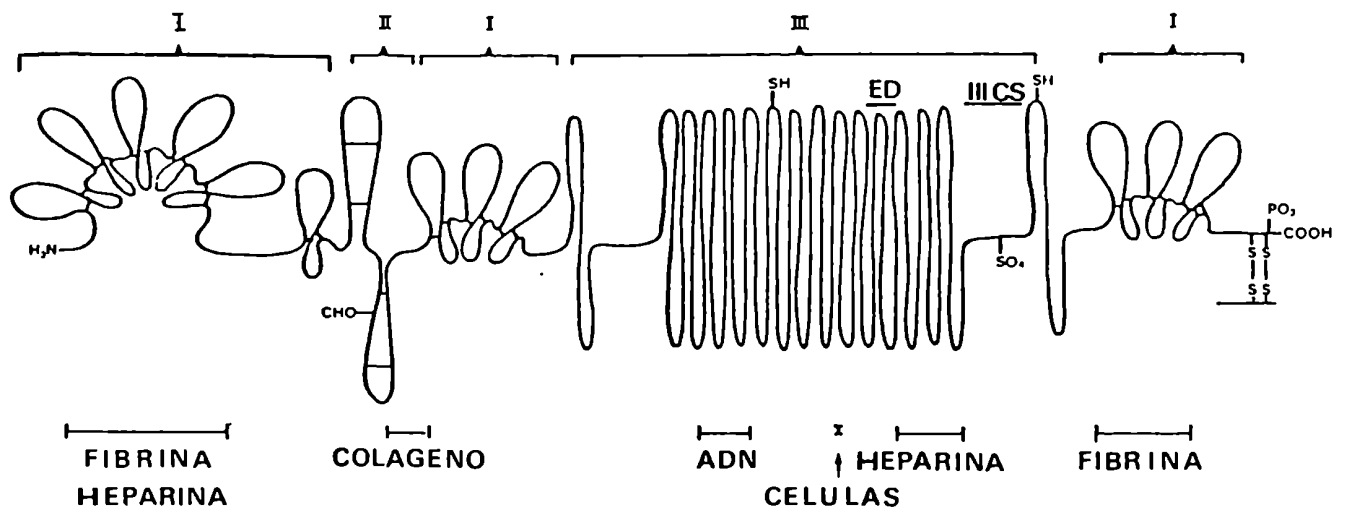


Figura 1. Modelo esquemático de la fibronectina. Se muestran los tres tipos de homología interna y los sitios de unión a células y a diferentes ligandos. PO₃: sitio de fosforilación. SO₄: sitio de sulfatación. CHO: cadena lateral de carbohidratos.

ción que hemos obtenido en este campo será comentada en la Discusión.

1.1.3. SPLICING ALTERNATIVO

1.1.3.a. Splicing del ARN mensajero precursor (pre-ARNm): características generales.

La síntesis de pre-ARNm en células eucariotes comienza con la interacción de la ARN polimerasa II con una secuencia promotora. A medida que crece la cadena de ARN, ésta se organiza en un complejo de ribonucleoproteína, por su asociación con proteínas básicas (Choi & Dreyfuss, 1984). Durante la transcripción, o inmediatamente después de terminada la misma, el ARN es objeto de varias reacciones de procesamiento:

Modificación de su extremo 5', por agregado de 7-metilguanosenatrifosfato y metilación, para formar la estructura característica del *cap* (7mGpppmXpmY...).

Metilación de alrededor del 0,1% de las adeninas en la posición 6.

Corte del pre-ARNm en un punto cercano a su extremo 3' y agregado de una cola de poli A.

Eliminación de los intrones y empalmado de los exones para formar el ARNm maduro en el llamado proceso de *splicing*.

El *splicing* requiere que las secuencias en los extremos 5' y 3' del intrón ("dador" y "aceptor", respectivamente) sean cortadas de manera adecuada y que los exones sean ensamblados correctamente. Existen secuencias conservadas de

nucleótidos en los dos sitios de corte que dan especificidad a la reacción. La secuencia consenso "dadora" se extiende desde los dos últimos nucleótidos de un exón hasta los 6 primeros nucleótidos del intrón: AG:GU(A)AGU (los dos puntos señalan el sitio de corte y reunión). El consenso en el sitio "acceptor" abarca los 15 últimos nucleótidos de un intrón hasta el primer nucleótido de un exón: (U/C)₁₁NCAG:G. El examen de los intrones no ha revelado otras secuencias conservadas con la excepción del sitio de ramificación (ver más adelante). Secuencias consenso similares a las descritas se encuentran, frecuentemente, dentro de intrones y exones y, sin embargo, no son utilizadas lo que implica que debe haber otros factores que contribuyan a especificar los sitios de corte.

Un esquema general de la reacción de *splicing* del pre-ARNm, derivado de estudios *in vitro* (Grabowski, Padgett & Sharp, 1984; Padgett *et al.*, 1985; Ruskin *et al.*, 1984), es el siguiente:

- Corte en el sitio "dador".
- Unión del extremo 5' del intrón a una adenina cercana al sitio "acceptor" (sitio de ramificación), a través de un puente fosfodiéster 2'-5', para producir un lazo (*lariat*).
- Corte en el sitio "acceptor" y ligado de los exones 5' y 3' a través de una unión fosfodiéster 3'-5'.
- Los productos finales de esta serie de reacciones son los exones ensamblados y el intrón escindido en forma de lazo.

Se ha identificado en levaduras una secuencia altamente conservada en los intrones (UACUAAC) que se encuentra 20-40 bases hacia la izquierda del sitio "acceptor" y que es utilizada como sitio de ramificación (Langford & Gallwitz, 1983;

Pikielny *et al.*, 1983). En mamíferos, en cambio, la secuencia que rodea al sitio de ramificación está mucho menos conservada y puede ser reemplazada por otras, sin que se vea afectada la precisión del *splicing*. Sin embargo, el reemplazo de una secuencia de ramificación por otra puede reducir la eficiencia del *splicing*, haciéndolo más lento.

Un análisis detallado de la bioquímica del *splicing* se encuentra en Padgett *et al.*, (1986).

1.1.3.b. El *splicing* alternativo: sus distintos tipos

En el proceso de múltiples pasos del *splicing* del pre-ARNm, en la mayoría de los casos todos y cada uno de los exones presentes en un gen son incorporados en un ARNm maduro: es lo que se denomina *splicing* constitutivo. En otros casos, en el llamado *splicing* alternativo determinados exones pueden ser incluidos en algunos ARNms maduros, pero ser excluidos de otros, con la producción de diferentes ARNms, y polipéptidos, a partir de un único gen. Más de 50 genes son capaces de producir distintos isomorfos proteicos a través del *splicing* alternativo, en diferentes organismos que van desde los invertebrados hasta el hombre (Breitbart, Andreadis & Nadal-Ginard, 1987).

El número de isomorfos proteicos codificados por un determinado gen aumenta exponencialmente en función del número de exones que participan en el proceso de *splicing* alternativo. Por lo tanto, este mecanismo es capaz de generar un alto grado de variabilidad fenotípica, como ocurre en los genes de la fibronectina, troponina T, etc.

Según Breitbart, Andreadis & Nadal-Ginard (1987) pueden identificarse 7 tipos de *splicing* alternativo: a) Exones

combinatorios; b) Exones mutuamente excluyentes; c) Sitio "aceptor" interno; d) Sitio "dador" interno; e) Intrón retenido; f) Promotores alternativos; g) Sitios de poliadenilación alternativos.

a) Exones combinatorios. En este mecanismo, exones enteros son individualmente incluidos o excluidos del ARNm maduro. Cuando un exón de este tipo es retenido, el proceso de *splicing* se asemeja al de un gen constitutivo en el cual todas las secuencias potencialmente codificantes son incorporadas en el ARNm maduro. Cuando el exón es removido queda incluido dentro de un intrón. Varios genes contienen más de un exón de este tipo. Si n es el número de exones en un gen que pueden ser individualmente incluidos o excluidos, entonces hasta 2^n ARNms diferentes pueden ser codificados por un único gen.

El ejemplo más notable de este tipo ocurre en el gen de la troponina T, del músculo esquelético, donde 5 exones consecutivos son procesados de manera combinatoria para producir hasta 32 diferentes secuencias, en el correspondiente dominio de la proteína (Breitbart *et al.*, 1985). Como se comentará en la Discusión, otro ejemplo destacado de *splicing* combinatorio se encuentra en el gen de la fibronectina.

b) Exones mutuamente excluyentes. Este tipo de *splicing* alternativo involucra pares consecutivos de exones que son procesados diferencialmente de una forma mutuamente excluyente. Un miembro u otro del par es invariablemente incluido en un ARNm dado, pero la exclusión o inclusión simultánea de ambos no ocurre. Hasta el momento, este mecanismo ha sido identificado en proteínas contráctiles: alfa y beta-tropomiosina (Helfman *et al.*, 1986), la cadena liviana de la miosina (Strehler *et al.*, 1985) y la troponina T del músculo esque-

lético (Hastings, Bucher & Emerson, 1985). Este último gen exhibe, hasta ahora, la mayor capacidad para generar diversidad de proteínas por *splicing* alternativo, ya que el potencial de originar 32 ARNm, por distintos patrones de exones combinatorios, se ve duplicado a 64 por la presencia de dos exones mutuamente excluyentes.

c y d) Sitios "dadores y "aceptores" internos. Hay un cierto número de genes con sitios "dadores" y "aceptores" alternativos internos que, a diferencia de los tipos a) y b), se encuentran enteramente dentro de secuencias codificantes. El *splicing* en tales sitios da lugar a la exclusión de una parte de un exón. El gen de la fibronectina presenta en la región III CS este tipo de *splicing*: en la rata existen 3 sitios "aceptores" alternativos internos que se combinan con un sitio "dador" común y dan lugar a 3 variantes polipeptídicas que difieren en la longitud del segmento III CS (ver más adelante y Figura 2). El gen de la fibronectina humana es aún más complejo, ya que en la misma región puede dar lugar a 5 variantes, por la combinación de dos sitios "dadores" con los tres sitios "aceptores" mencionados anteriormente.

e) Intrones retenidos. Varios genes incorporan secuencias de intrones en el ARNm al no cortar ningún miembro de un par "dador"- "aceptor". El intrón retenido mantiene intacto el marco de lectura abierto y, de hecho, crea un exón fusionado más largo. Ejemplos de este mecanismo son los transcritos del gen de gamma-fibrinógeno de rata, transcritos de retrovirus y otros.

f) Promotores alternativos. En muchos sistemas el *splicing* alternativo de los ARNm está asociado con diferentes transcritos primarios del mismo gen, debido al uso de

más de un sitio de iniciación de la transcripción. La consecuencia es la producción de ARNm con diferentes exones en el extremo 5'. Un ejemplo clásico es el gen de la alfa-amilasa de ratón, donde se utilizan dos promotores diferentes, uno activo en la glándula salival y otro en el hígado (Young, Hagenbluche & Schibler, 1981). Otros ejemplos son los exones líderes del gen de la aldolasa (Joh *et al.*, 1986) y de la glicoproteína de superficie celular Thyl.2 (Ingraham & Evans, 1986).

g) Sitios de poliadenilación múltiples. Transcriptos primarios con heterogeneidad en el extremo 3' surgen del corte del pre-ARNm en diferentes sitios de poliadenilación. Cuando cada sitio de poliadenilación está localizado en un exón separado, su uso diferencial genera ARNm procesados alternativamente. El ejemplo más notable de este tipo lo ofrece el gen de la tropomiosina (Ruiz-Opazo, Weinberger & Nadal-Ginard, 1985; Helfman *et al.*, 1986).

1.1.3.c. Splicing Alternativo del pre-ARNm de la fibronectina.

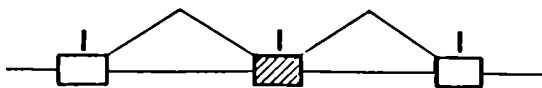
El análisis de clones genómicos y de ADNc, aislados de humanos y rata, indica que hay, por lo menos, dos regiones de variabilidad en el transcripto primario de la fibronectina (Figura 1). Una región corresponde al segmento no homólogo que conecta las dos últimas unidades de tipo III y que se ha denominado, por esa razón, *III Connecting Segment* (III CS). La segunda región se encuentra entre el dominio de unión a células y uno de los dominios de unión a heparina (Hep-2) de la proteína y se lo ha designado *Extra Domain*

(ED). III CS y ED son llamados, también, regiones V y EIII, respectivamente. Ya que hay un único gen de fibronectina por genoma haploide (ver más adelante) los diferentes ARNms para esta proteína deben surgir del procesamiento alternativo de un único transcripto primario.

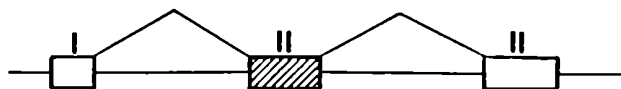
- III Connecting Segment (III CS ó V). Tres ARNms diferentes pueden originarse, en rata, por variación en la longitud del III CS, ya sea que este segmento esté ausente o tenga 285 o 360 pares de bases (0, 95 y 120 aminoácidos, respectivamente; Schwarzbauer *et al.*, 1983). Dos de estas variantes fueron identificadas, también, en humanos (Bernard *et al.*, 1985; Sekiguchi *et al.*, 1986). Además, esta última especie presenta dos variantes adicionales en la región III CS, de 64 y 89 aminoácidos (Umezawa, Kornblihtt & Baralle, 1985). Aunque no existe prueba formal de la existencia de la variante de 95 aminoácidos en humanos, la organización del gen en la región III CS indica que debería existir (ver más adelante). Estos datos, en su conjunto, indican que hay tres variantes posibles del III CS en los ARNms de rata y cinco en la correspondiente región de la fibronectina humana.

El aislamiento de clones genómicos de rata ha revelado el mecanismo por el cual surgen estas variantes. La región III CS y parte de la unidad de tipo III adyacente son codificadas por un exón entero. La combinación de un único sitio 5' "dador" con una serie de sitios "aceptores" alternativos, que se encuentran dentro del exón, da lugar a los tres tipos de ARNms (Figura 2; Tamkun; Schwarzbauer & Hynes, 1984). El análisis de la secuencia de la región III CS, en el gen humano, reveló que su organización es semejante a la de la rata, pero con la presencia adicional de otro sitio "dador"

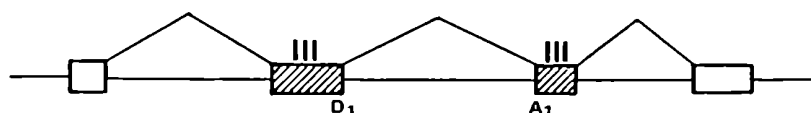
A. TIPO I



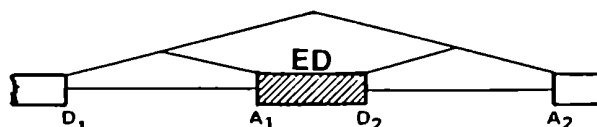
B. TIPO II



C. TIPO III



D. TIPO III (N°9, ED)



E. III CS

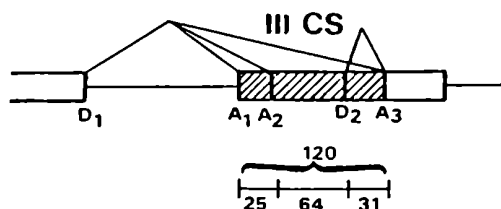


Figura 2. Organización intrón/exón y mecanismos del splicing del pre-ARNm de la fibronectina humana. Cajas rayadas: exones necesarios para codificar una unidad completa de homología interna, o un segmento conector. **A y B:** Las homologías tipo I y tipo II son codificadas por un solo exón cada una. **C:** La mayoría de las homologías de tipo III se origina a partir de dos exones, por procesamiento constitutivo del pre-ARNm entre D1 y A1. **D:** Homologías de tipo III, No. 9 y ED, el procesamiento entre D1 y A2 origina ARNms sin ED, mientras que el procesamiento entre D1-A1 y D2-A2 da lugar a ARNms que contienen el ED. En el caso del exón de rata No. 9, el procesamiento entre D1-A2 no ha sido observado. **E:** III CS, la correlación entre el splicing del pre-ARNm y las variantes proteicas es como sigue: 120 aa (D1-A1); 0 aa (D1-A3); 95 aa (D1-A2); 64 aa (D1-A2, D2-A3); 89 aa (D1-A1; D2-A3).

dentro del exón III CS, lo cual permite que se generen otras dos variantes de ARNm (de 89 y 64 aminoácidos) que no se encuentran en la rata (Figura 2).

Se ha obtenido evidencia directa de que el procesamiento alternativo que ocurre en la región III CS explica algunas de las diferencias observadas entre las subunidades proteicas de la fibronectina.

Se prepararon anticuerpos dirigidos contra una proteína de fusión entre β -galactosidasa y los primeros 95 aminoácidos del III CS, construida en λ gt11 (Schwarzbauer, Paul & Hynes, 1985). En experimentos de transferencia de Western, el antisuero reaccionó, solamente, con una de las subunidades de la fibronectina plasmática de rata, que tiene un tamaño un poco mayor que la otra. El antisuero reconoció, también, casi todas las subunidades de la fibronectina celular. Estos resultados indicarían que el polipéptido que carece del III CS y, por lo tanto, no es reconocido por los anticuerpos constituye una de las subunidades de la fibronectina plasmática y que la diferencia de peso molecular entre las fibronectinas circulantes se debe al *splicing* alternativo.

- Extra Domain (ED). La zona ED está constituida por un solo exón en el gen humano y corresponde exactamente a una unidad de homología interna de tipo III (Figura 2; Vibe-Pedersen, Kornblihtt, & Baralle, 1984). Se ha demostrado en experimentos de transferencia de Northern y de mapeo con nucleasa S1 que dos tipos de ARNms pueden originarse por *splicing* alternativo en esta región: unos incluyen la secuencia ED, y otros carecen de ella (Kornblihtt, Vibe-Pedersen & Baralle, 1984a, 1984b).

Tres líneas de evidencia indican que la presencia del ED explica una de las diferencias entre las fibronectinas celular y plasmática:

a) El *splicing* alternativo del exón ED tiene especificidad celular. ARNms de fibronectina conteniendo el ED son sintetizados por varias líneas celulares humanas, incluyendo fibroblastos y células epiteliales. Sin embargo, el ARNm del hígado parece carecer completamente del segmento ED. Se ha demostrado que los hepatocitos son la principal fuente de fibronectina plasmática (Tamkun & Hynes, 1983) y, por lo tanto, esto sugiere que el ED es un segmento característico y propio de la fibronectina celular.

b) Anticuerpos dirigidos contra las secuencias ED humanas y de rata reconocen la fibronectina celular, pero no la plasmática (Paul *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1986; Borsi *et al.*, 1987).

c) El ED no ha sido detectado cuando se lo ha buscado, a nivel proteico, en polipéptidos de fibronectina del plasma bovino (Skorstengaard *et al.*, 1986).

La presencia de una unidad extra de tipo III (ED) en la fibronectina celular, pero no en la plasmática, puede ser importante desde el punto de vista de la función. Por ejemplo, se ha informado que la fibronectina celular es considerablemente más activa que la plasmática en restaurar la morfología normal de una línea celular de fibroblastos transformantes (Yamada & Kennedy, 1979). Es posible que la función del ED sea aumentar la distancia entre los sitios de unión a células y a heparina dando lugar a un aumento en la actividad de unión a alguno de esos compuestos. Otro hallazgo interesante es que en la fibronectina proveniente de células tumorales o transformadas por virus, el porcentaje de moléculas conteniendo el segmento ED es aproximadamente 10 veces mayor que en la fibronectina proveniente de fibroblastos normales (Borsi *et al.*, 1987). Estos resultados sugieren

que en células malignas, los mecanismos que regulan el procesamiento del ED están alterados.

1.1.4. DOMINIOS FUNCIONALES.

Cada subunidad de la fibronectina contiene sitios específicos de unión a células y a una amplia variedad de ligandos que incluyen colágeno, fibrina, heparina y gangliósidos (Figura 1). Estos sitios han sido mapeados y ubicados dentro de dominios resistentes a proteasas. La localización de los sitios de unión a células y colágeno se ha definido con más precisión (ver a continuación).

1.1.4.a. Sitios de unión a células.

Pierschbacher & Ruoslahti (1984a) y Yamada & Kennedy (1984) demostraron que la mínima secuencia de la fibronectina requerida para la unión a células es el tetrapéptido Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS). Sustituciones conservativas de los tres primeros aminoácidos suprimen la actividad de unión a células, mientras que la cuarta posición puede ser reemplazada por otros aminoácidos sin pérdida de actividad biológica (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984b). Los péptidos RGD son capaces de mediar el *attachment* celular, directamente, cuando son presentados a las células como un sustrato insoluble, mientras que en solución pueden inhibir el *attachment* celular a la fibronectina.

La secuencia RGD está presente sólo una vez en la fibronectina humana y se encuentra dentro de una de las unidades de homología interna tipo III de la proteína. Existe,

sin embargo, otro sitio potencial para unión a células, en el área III CS, representado por una secuencia similar, pero no idéntica, a la anterior (REDV). Humphries *et al.* (1986) demostraron que el péptido REDV constituye una segunda señal de adhesión a células, que posee especificidad de tipo celular. De hecho, mientras que los fibroblastos utilizan la secuencia RGDS cuando interactúan con la fibronectina, las células de melanoma se adhieren, específicamente, a la secuencia REDV no reconocida por fibroblastos. Ya que el REDV se localiza en un segmento que sufre *splicing* alternativo (III CS), estos resultados sugieren que, al menos, para algunos tipos celulares la regulación de la actividad promotora de adhesión que posee la fibronectina puede ocurrir a través de la producción de distintas variedades de ARNm.

Se ha sugerido, recientemente, la existencia de un tercer sitio de unión a células (Obara *et al.*, 1987). Estos autores construyeron una proteína de fusión entre β -galactosidasa y un segmento de la fibronectina humana de 600 aminoácidos, que incluye entre sus últimos residuos la secuencia RGD. Observaron que esta construcción es 50-60 veces más activa en ensayos de *spreading* que proteínas de fusión que contienen el RGD, pero carecen de las secuencias NH₂ terminales de la construcción anterior.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* realzan la importancia de estas secuencias en distintos procesos biológicos. Por ejemplo, la microinyección de péptidos conteniendo RGD en la cavidad blastocélica de blástulas tardías o gástrulas tempranas de anfibios bloquea, específicamente, la gastrulación por interferencia con la adhesión de las células mesodérmicas al techo del blastocele, tapizado de fibronectina (Boucaut *et al.*, 1984). Otros trabajos demuestran la impor-

tancia de la interacción entre distintos tipos celulares y la fibronectina en los procesos de migración celular (migración de las células de la cresta neural, Duband *et al.*, 1986; y de precursores linfoides, Savagner *et al.*, 1986).

1.1.4.b. Sitio de unión a colágeno.

La actividad de unión a colágeno ha sido localizada, por corte con enzimas proteolíticas, en un fragmento de 45 kD, cercano al NH₂-término de la proteína, que se caracteriza por incluir las dos únicas unidades de tipo II de la molécula (Gold *et al.*, 1979). Con el objeto de precisar la ubicación del sitio de unión a colágeno, Owens & Baralle (1986a) expresaron distintos fragmentos de ADNc de fibronectina en *E.coli* y ensayaron la actividad de los productos de expresión por cromatografía con gelatina-Sepharose. Así, estos autores identificaron, dentro del fragmento de 45 kD, una secuencia de 14 aminoácidos (AAHEEICTTNEGVM, en el código de una sola letra) que era la mínima necesaria para que se conservara la capacidad de unión a colágeno.

1.1.5. ORGANIZACION DEL GEN.

La existencia de un solo gen para la fibronectina por genoma haploide se ha demostrado en humanos y ratas (Kornblihtt, Vibe-Pedersen & Baralle, 1983; Tamkun, Schwarzbauer & Hynes, 1984). El gen humano fue localizado en el cromosoma 2 por Zardi *et al.* (1982), los que usaron células híbridas humano-ratón y anticuerpos monoclonales antifibronectina humana.

La primera información concerniente al tamaño del gen de la fibronectina provino de estudios realizados por Hirano *et al.* (1983) que demostraron mediante microscopía electrónica, por la técnica de mapeo de R-loop, que este gen tiene alrededor de 50 kilobases de longitud en el pollo y contiene, por lo menos, 48 exones. El gen de fibronectina de rata tiene 70 kilobases, aproximadamente, y 47 exones (Patel *et al.*, 1987). El gen humano no ha sido, aun, completamente caracterizado, pero tiene probablemente la misma longitud y número de exones.

Se ha sugerido que los tres tipos de homología de la fibronectina se originaron a partir de tres genes independientes (Petersen *et al.*, 1983). Si esto es cierto, la secuencia actual de la proteína puede ser el resultado de la fusión y amplificación de tres genes primitivos, con una subsecuente divergencia durante el proceso evolutivo. La exacta correspondencia entre las unidades de homología y los exones apoya este modelo de la evolución de la fibronectina.

Un análisis detallado del dominio de unión a colágeno (Owens & Baralle, 1986b) y de la mayor parte del gen de la fibronectina de rata (Patel *et al.*, 1987) reveló que por lo menos 8 de las 12 homologías de tipo I son codificadas por un solo exón (Figura 2). La única excepción es la última unidad de tipo I, cercana al COOH-término de la proteína, que es compartida por dos exones. Los mismos trabajos informan que cada una de las homologías de tipo II es, también, codificada por un solo exón.

Aunque la ubicación exacta de todos los exones no se ha completado, aún, en ninguna especie, es evidente que la mayoría de las unidades de tipo III está codificada por dos exones separados (Figura 2). Sin embargo, hay dos excepciones

bien definidas: el ED y la unidad de tipo III n° 9 (numerada a partir del NH₂-término). Ambas regiones son codificadas, tanto en humanos como en rata, por un solo exón cada una, el cual habría surgido de la fusión de dos exones de tipo III. La posible relación entre exones fusionados y *splicing* alternativo del ARNm se considerará en la Discusión, a la luz de los resultados presentados por nosotros. El hallazgo de que las homologías de tipo III son codificadas por dos exones sugiere que la fibronectina se habría originado a partir de cuatro genes primordiales y no de tres como se había postulado. (Un gen para las unidades tipo I, otro para las de tipo II, un tercero para la mitad izquierda de las unidades de tipo III, y un cuarto para su mitad derecha).

La presencia de secuencias internamente repetidas parece ser un aspecto común de las proteínas de la matriz extracelular, aunque no son exclusivas de ellas y las exhiben muchas otras proteínas. Se ha sugerido que las homologías internas reflejan duplicaciones y el barajado (*shuffling*) de exones/genes ancestrales, lo cual fue un mecanismo evolutivo que intervino en la generación de parte, o todos, los genes actuales (Gilbert, 1978; Doolittle, 1985; Pathy, 1985). Es concebible que estos procesos llevaran a la inclusión de exones homólogos en genes no relacionados. Evidencias indirectas que apoyan un modelo de barajado de exones (*exon shuffling*) para la evolución de la fibronectina surgen del examen de la estructura de algunas proteínas. El activador tisular del plasminógeno contiene una unidad de tipo I (Ban-yai, Varadi & Pathy, 1983) que es codificada por un solo exón (Ny, Elgh & Lund, 1984) y que puede estar implicada en la unión a fibrina, como ocurre en la fibronectina. McMullen y Fujikawa (1985) han demostrado que el factor humano XIIa

también contiene una unidad de tipo I, junto con una homología de tipo II. La unidad tipo II del factor XIIa muestra una homología de un 50% con las unidades de tipo II de la fibronectina y es, también, muy similar a las dos secuencias tipo II encontradas en una proteína del plasma seminal bovino, de función desconocida (Esch *et al.*, 1983). Esto es, dos de los tres bloques de construcción de la fibronectina han sido identificados en otras proteínas, sugiriendo que surgieron en forma independiente.

Finalmente, el promotor y regiones flanqueantes 5' de las fibronectinas humana y de rata han sido, recientemente, clonados y secuenciados (Dean, Bowlus & Bourgeois, 1987 y Patel *et al.*, 1987, respectivamente). Muchas secuencias de nucleótidos, potencialmente regulatorias, fueron identificadas. Estas son: GGGGCGGGGC, el sitio de unión para el factor de transcripción SP1 (Dynam & Tjian, 1985); TGACGTCA, la secuencia necesaria para la inducción de la transcripción por cAMP (Montminy *et al.*, 1986), y sitios de unión para el receptor de glucocorticoides (Karin *et al.*, 1984). Se encontraron, también, secuencias potencialmente reguladoras de la actividad de proteínas de *heat shock* y de "fase aguda". Esta información excede el conocimiento actual del control de la transcripción de la fibronectina que, hasta el momento, ha sido demostrada para glucocorticoides (Oliver *et al.*, 1983), transformación oncogénica (Fagan *et al.*, 1981) y TGF β (*transforming growth factor*; Ignatz, Endo & Massagué, 1987).

1.2. RECEPTORES CELULARES DE LA FIBRONECTINA Y DE OTRAS PROTEINAS ADHESIVAS

Como se dijo anteriormente, el tripéptido RGD presente en la secuencia de la fibronectina es un sitio de unión a células. Este tripéptido se encontró, posteriormente, en otras proteínas, algunas de las cuales pertenecen a la matriz extracelular, mientras que otras son de diversa naturaleza y no relacionadas desde el punto de vista evolutivo (Tabla II).

Estos hallazgos dieron impulso al aislamiento y caracterización de receptores para las proteínas de la matriz extracelular. Una estrategia, utilizada para ese fin, consistió en el uso de anticuerpos, que inhibían el *attachment* de las células a sus matrices, para inmunoprecipitar las correspondientes proteínas de la superficie celular. Otra estrategia se basó en la cromatografía de afinidad, usando las proteínas de adhesión inmovilizadas como ligandos y eluyendo los receptores unidos, con péptidos sintéticos que contenían la secuencia RGD.

Por medio de estas técnicas, se purificaron proteínas con diferentes propiedades y especificidades. Al mismo tiempo, se hizo evidente que éstas pertenecían a una familia de receptores de la superficie celular que tenían en común su capacidad de reconocer la secuencia RGD. Por otra parte, estos receptores mostraron similitudes estructurales con proteínas ya conocidas que no estaban, necesariamente, relacionadas con la matriz extracelular. Finalmente, los datos de estructura primaria obtenidos a través del clonado y la secuenciación de ADN permitieron establecer la existencia de una nueva superfamilia génica.

Tabla II. Proteínas que contienen secuencias RGD potencialmente activas^a

PROTEINAS	ORGANISMO
1. Proteasa α lítica	<i>Myxobacter 495</i>
2. Receptor del fago λ	<i>E. coli</i>
3. Cadena A de la Discoidina I	<i>Dictyostelium discoideum</i>
4. Precursor de la Vitelogenina I	<i>Drosophila</i>
5. Colágenos de invertebrados	<i>Drosophila</i>
6. Colágenos de vertebrados	Bovinos, pollo, humanos
7. Trombina	Bovinos, humanos
8. Cadena α del fibrinógeno	Rata
9. Fibronectina	Bovinos, rata, humanos
10. Trombospondina	Humanos
11. Factor de pro-von Willebrand	Humanos
12. Fibronectina	Humanos
13. Componente iC3b del complemento	Humanos
14. 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa	Cerdo
15. Receptor del Factor de Creci- miento Epidérmico	Humanos
16. Precursor del β <i>Transforming</i> <i>Growth Factor</i>	Humanos
17. Poliproteína de la cubierta y de la membrana	Virus Sindbis
18. Proteína viral I	<i>Foot-and-Mouth disease virus</i>

a. Esta es una lista representativa, pero no necesariamente completa. Referencias. 1-8, 14, 17 y 18: Pierschbacher & Ruoslahti (1984b); 9: Pierschbacher, Hayman & Ruoslahti (1983); 10: Lawler & Hynes (1986); 11: Verweij *et al.* (1986); 12: Suzuki *et al.* (1985); 13: Wright *et al.* (1987); 15: Ullrich *et al.* (1984); 16: Derynck *et al.* (1985).

Esta superfamilia puede ser denominada "receptores del RGD", aunque para muchos de sus miembros la actividad de unión a proteínas conteniendo RGD no ha sido, aún, demostrada. Los "receptores del RGD" parecen exceder los límites de la matriz extracelular, si uno considera la variedad de sus moléculas blanco. Ellos exhiben una amplia distribución, expresándose en casi todos los tipos celulares. Por otra parte, parecen ser muy antiguos ya que están presentes en los invertebrados.

Hasta la fecha, pueden reconocerse cuatro familias de "receptores del RGD" (Tabla III). Cada familia está constituida por diferentes heterodímeros, cuyas subunidades se asocian no covalentemente y tienen diferentes especificidades de unión. Un tipo de subunidad, la cadena β , es común a todos los miembros de una familia, mientras que el otro tipo, la cadena α , es exclusiva de cada receptor individual. Se ha sugerido que las cadenas β reconocen la secuencia RGD y que las subunidades α determinan la especificidad fina de sus correspondientes receptores.

Una de las familias de "receptores del RGD" es la representada por las proteínas VLA (*very late antigens*) 1-5 que incluye, también, un complejo proteico del pollo, llamado integrina (también conocido como CSAT o complejo de 140 kD; ver Tabla III). Las moléculas VLA fueron identificadas, por primera vez, en linfocitos T humanos (Hemler, Jacobson & Strominger, 1985), pero luego se encontraron en muchos otros tipos celulares (Hemler, Huang & Schwarz, 1987; Fischel *et al.*, 1987).

Usando anticuerpos específicos contra la subunidad β de las proteínas VLA, Takada, Huang & Hemler (1987) demostraron que estas moléculas pueden mediar la adhesión de diferentes

Tabla III. Superfamilia de receptores del RGD.^a

FAMILIA	RECEPTOR	SUBUNIDADES		LIGANDOS CONOCIDOS
		α	β	
GPIIb/IIIa y Receptor de vitronectina	GPIIb/IIIa	GPIIb	GPIIIa	Fibronectina Fibrinógeno Vitronectina Factor de von Willebrand
	Receptor de vitronectina (VNr)	α VNr		Vitronectina
Proteínas leucocitarias de adhesión	LFA-1	α LFA-1	p95	\int I CAM-1?
	Mac-1 p150,95	α Mac-1 p150		iC3b
Proteínas VLA	VLA-1	α VLA-1	Banda III (tipo integrina)	Fibronectina y Laminina ^c
	VLA-2	α VLA-2		
	VLA-3	α VLA-3		
	VLA-4	α VLA-4	Banda I	
	Integrina ^b	Banda II		
	Receptor de fibronectina (FNr, VLA-5)	α FNr		Fibronectina
Antígenos de posición (<i>Drosophila</i>)	PS1	GP116	GP100	?
	PS2	GP120-130		

- Cada una de las cuatro familias receptoras se define por la presencia de una subunidad común en el dímero α/β .
- Como se menciona en el texto, el complejo integrina parece estar formado por dos receptores diferentes, pero relacionados: dímero II/III que es, probablemente, homólogo a VLA-3 y dímero I/III que no ha sido relacionado, aún, con otros receptores.
- La propiedad de unirse a fibronectina y laminina de las proteínas VLA 1-4 y del complejo integrina no puede adscribirse, aún, a receptores individuales.

células a fibronectina y laminina. Los mismos autores determinaron que VLA-5 es idéntico al llamado "receptor de fibronectina", que había sido caracterizado previamente por Pytella, Pierschbacher & Ruoslahti (1985a) y que reconoce específicamente fibronectina. Se estableció, también, que VLA-3 es muy similar a parte del complejo integrina.

Se ha informado que el complejo integrina está formado por tres polipéptidos (bandas I, II y III) y que funciona como receptor para fibronectina y laminina (Knudsen, Horwitz & Buck, 1985; Horwitz *et al.*, 1985). Teniendo en cuenta que la estructura heterodimérica de los receptores RGD parece haberse fijado ya en los invertebrados (por ejemplo, antígenos de posición en *Drosophila*) es muy probable que la integrina esté formada por dos diferentes receptores con las siguientes estructuras: I/III y II/III (la banda III es una cadena de tipo β ; las bandas I y II serían cadenas de tipo α). Si esto es correcto, es probable que uno de estos dos receptores reconozca sólo fibronectina y el otro sólo laminina. VLA-3 parece ser el equivalente, en células humanas de la combinación II/III del pollo; quizás alguna de las otras proteínas VLA corresponda a la combinación I/III. Excepto para VLA-5 y VLA-3, el resto de las proteínas VLA son receptores cuyos ligandos (y funciones) se desconocen completamente.

Además de los receptores antes mencionados, la fibronectina tiene otro, que es la glicoproteína IIb/IIIa, que integra junto con el receptor de vitronectina otra familia de receptores del RGD (Tabla III). Los polipéptidos IIb (una subunidad α) y IIIa (una subunidad β) fueron identificados, por primera vez, en las plaquetas donde están almacenados en los llamados gránulos α . El complejo IIb/IIIa es sintetizado

también por otros tipos celulares (Fitzgerald, Charo & Phillips, 1985; Burns *et al.*, 1986). Es un receptor "promiscuo" que reconoce varias proteínas adhesivas que incluyen a la fibronectina (Gardner & Hynes, 1985; Parise & Phillips, 1986), fibrinógeno (Parise & Phillips, 1985), el factor de von Willebrand (Plow *et al.*, 1985) y vitronectina (Pytela *et al.*, 1986).

El clonado de ADNc ha permitido obtener datos de estructura primaria de algunos receptores del RGD. La secuencia completa de aminoácidos de tres diferentes cadenas β se conoce hoy. Ellas son la glicoproteína IIIa (Fitzgerald *et al.*, 1987); la subunidad β de las proteínas leucocitarias de adhesión (Kishimoto *et al.*, 1987); Law *et al.*, 1987); y la banda III de la integrina (Tamkun *et al.*, 1986). Estas cadenas β tienen una homología de alrededor del 45% entre sí, con una estructura general muy similar. Son proteínas integrales de membrana con un dominio extracelular NH₂-terminal que comprende al 90% del polipéptido, un corto dominio hidrofóbico de transmembrana y un dominio intracelular, de 700, 23-30 y 40-50 aminoácidos respectivamente (Figura 3).

El dominio extracelular posee todos los sitios potenciales de glicosilación y todas las cisteínas. Precisamente, estas proteínas son muy ricas en estos aminoácidos (7-8%), los cuales participan en puentes disulfuro intramoleculares, lo que da lugar, en consecuencia, a una estructura muy compacta. Parte de las cisteínas definen una serie de motivos repetitivos de secuencia, de unos 40 aminoácidos de longitud. Hay cuatro de estos motivos en cada cadena β . Se ha sugerido que los mismos representan el sitio de interacción con los sitios RGD de sus correspondientes ligandos.

Un residuo de tirosina alojado en una secuencia de aminoácidos similar al sitio fosforilable del receptor del fac-

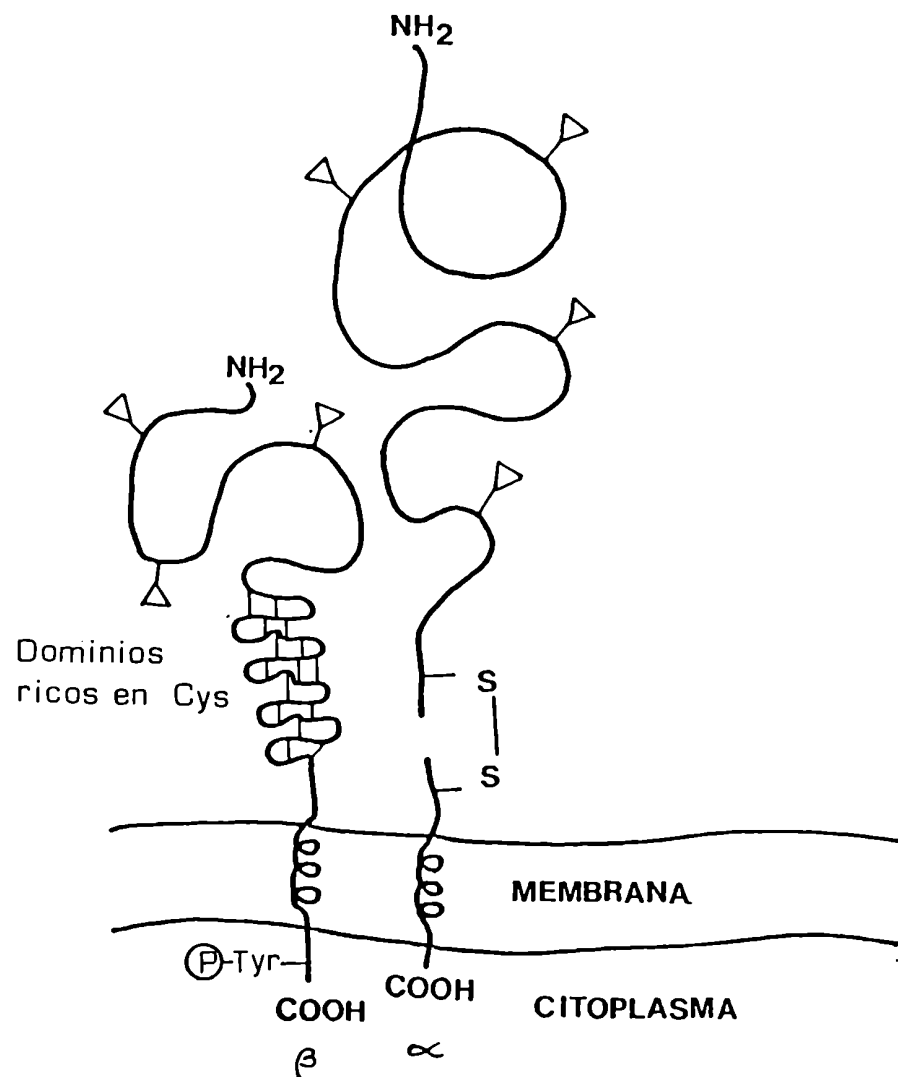


Figura 3. Dibujo esquemático de un receptor celular de la fibronectina. La localización de los hidratos de carbono unidos a N es sólo indicativa (∇).

tor de crecimiento epidérmico (EGFr) está presente en los dominios intracitoplasmáticos de la glicoproteína IIIa y de la banda III de la integrina. En concordancia con lo anterior, Hirst *et al.* (1986) demostraron que la banda III está fosforilada en una tirosina en células transformadas por oncogenes.

Suzuki *et al.* (1986) y Scott Argraves *et al.* (1986) determinaron parte de la estructura primaria de las cadenas α de los receptores de vitronectina y fibronectina, respectivamente. Ambas subunidades son sintetizadas como precursores de alrededor de 150 kD que sufren procesamiento proteolítico, cerca de su COOH-término. En consecuencia, se producen dos cadenas, de 125 kD y 25 kD, que se mantienen unidas por puentes disulfuro. La cadena de 25 kD comprende un dominio de transmembrana y una zona intracitoplasmática de alrededor de 30 aminoácidos, en su mayoría polares.

Varios problemas interesantes quedan, aún, por resolver. Por ejemplo, ¿por qué mecanismos los receptores de esta superfamilia adquirieron un rango tan amplio de especificidades de unión? Aparentemente, las subunidades β evolucionaron para seleccionar un cierto número de moléculas blanco, que representan un importante sub-conjunto de las proteínas adhesivas, a través de su capacidad de unirse a un corto dominio estructural: la secuencia RGD. ¿Pero, cómo se determina la especificidad fina para un cierto ligando? Parece necesario postular la existencia de un segundo sitio de unión, distinto para cada tipo de receptor, que interactuaría con una secuencia de la correspondiente proteína adhesiva, distinta del RGD. El segundo sitio podría estar presente en la misma cadena α , o podría ser el resultado de la asociación física entre las cadenas α y β . Alternativamente, la a-

sociación de α y β podría inducir un cambio conformacional en la subunidad β y exponer un sitio oculto de unión.

1.3. NUESTRA INVESTIGACION

Nuestro trabajo ha tenido como objetivos completar la estructura primaria de la fibronectina humana e investigar la existencia de nuevas regiones de variabilidad en el gen que codifica para esta proteína. Con ese fin, sintetizamos a partir de la región 5' del ARNm, clones de ADNc y determinamos su secuencia de nucleótidos, lo cual nos permitió establecer que la fibronectina es sintetizada como un pre-pro-polipéptido (Gutman, Yamada & Kornblihtt, 1986). Por otra parte, identificamos un tercer sitio de *splicing* alternativo, específico de tejido, en el transcripto primario de la fibronectina humana y lo caracterizamos por análisis de ARNms y por estudio directo de la estructura del gen (Gutman & Kornblihtt, 1987). Finalmente, con los clones obtenidos en el presente trabajo sumados a otros, de los cuales se disponía, hemos construido un clon de ADNc de longitud completa, cuya expresión en sistemas adecuados abre la posibilidad de profundizar el conocimiento de las relaciones estructura-función existentes en los diversos dominios que posee esta proteína.

2.1. AISLAMIENTO DE ADN

2.1.1. AISLAMIENTO DE ADN DE PLASMIDOS

a. Purificación de ADN en gran escala

Con una colonia aislada de bacterias, transformadas con un plásmido que confiere resistencia a Ampicilina, se inoculó 1 l de medio LB (conteniendo 100 µg/ml de Ampicilina) y se dejó crecer a 37°C, hasta que el cultivo estuvo saturado.

Se centrifugó 10 min a 5.000 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 ml de TGE (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM).

Se añadieron 120 ml de NaOH 0,2 N-SDS 1% (P/V); se mezcló y se dejó 5 min en hielo.

Se agregaron 60 ml de KAcO "5 M" (Por 100 ml de solución: KAcO 5 M, 60 ml; HAcO glacial 11,5 ml; H₂O 28,5 ml).

Se centrifugó a 10.000 g, 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron al mismo 0,6 volúmenes de isopropanol; se dejó 15 min a temperatura ambiente.

Se centrifugó a 12.000 g, 30 min; se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 7 ml de TE (Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM; EDTA 1 mM).

Se añadieron 500 µl de bromuro de etidio 1% (P/V), se pesó la solución y se agregó 1 g de CsCl por g de la misma. Se centrifugó a 40.000 rpm, durante 36 horas en un rotor Beckmann 50 Ti.

Se extrajo la banda de ADN plasmídico con una pipeta Pasteur.

El bromuro de etidio se eliminó mediante repetidas extracciones con n-butanol.

Se agregó H₂O csp., para 8 ml y, luego, se añadieron 0,8 ml de NaAcO 3 M y 17 ml de etanol absoluto.

Se dejó 20 min a -20°C, se centrifugó, luego, a 10000 g durante 10 min y se resuspendió en 500 µl de H₂O.

b. Purificación de ADN pequeña escala

Se inocularon 5 ml de medio LB (conteniendo 100 µg/ml de Ampicilina) con una colonia aislada de bacterias transformadas con un plásmido que otorga resistencia a Ampicilina y se dejó crecer hasta saturación, a 37 °C, con agitación.

Se centrifugó a 5000 g, 10 min; se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de TGE.

Se transfirió a 1 tubo Eppendorf, se centrifugó durante 2 min a 12000 g y el precipitado bacteriano se resuspendió en 100 µl de TGE.

Se agregaron 200 µl de NaOH 0,2 N-SDS 1% (P/V) y se dejó 5 min en hielo.

Se añadieron 150 µl de NaAcO 3 M (pH 5,2) y se dejó 5-10 min en hielo.

Se centrifugó 10 min y se recuperó el sobrenadante.

Se hizo una extracción con fenol-cloroformo y dos con éter.

Se precipitó con etanol y el *pellet* se resuspendió en 200 µl de H₂O.

Se añadieron 2 µl de una solución de 10 mg/ml de RNasa A y se incubó 30 min a 37°C.

Se agregaron 7,5 µl de NaAcO 4 M y 300 µl de etanol.

Se dejó 10 min a temperatura ambiente; se centrifugó y se resuspendió en 20 µl de H₂O.

2.1.2. AISLAMIENTO DE ADN DE BACTERIOFAGOS

a. Purificación de ADN del bacteriófago lambda, en gran escala

Aislamiento del virus

- Se tomó una colonia aislada de bacterias K802, se sembró en 100 ml de medio NZCYM y se creció a 37°C, hasta saturación.

Se midió la densidad óptica, se apartó una alícuota del cultivo, conteniendo $\approx 10^{10}$ células; se centrifugó y se resuspendió en 3 ml de SM (NaCl 100 mM; MgSO₄ 10 mM; Tris-HCl, pH 7,5, 50mM, gelatina 0,1%).

Se agregaron 10⁸ fagos contenidos en 0,1 ml de SM.

Se adsorbió 20 min a 37°C, luego, se inoculó la preparación anterior a 500 ml de NZCYM y se cultivó a 37°C, durante toda la noche, con agitación intensa (250 rpm).

Se añadieron 10 ml de cloroformo y se incubó por 30 min más.

Luego, se disolvieron en esta solución 29,2 g de NaCl; se mantuvo 1 hora en hielo y se centrifugó 10 min, a 4°C, a 6000 g, para eliminar restos celulares.

Al sobrenadante se le agregaron 50 g de polietilenglicol 8000 y se disolvió lentamente.

Se mantuvo 90 min en hielo y los fagos se precipitaron por centrifugación a 7000 g, 20 min (4°C).

Se descartó el sobrenadante; el *pellet* se dejó secar y se resuspendió, luego, en 24 ml de SM.

Materiales y Métodos

Se hicieron dos extracciones con un volumen de cloroformo, cada una.

La fase acuosa se centrifugó a 38000 rpm en rotor Beckmann 50 Ti.

El precipitado se resuspendió en 1,5 ml de SM; se extrajo 2 veces con cloroformo; se volvió a centrifugar y se resuspendió en 3 ml de SM.

Lisis del virus y purificación de su ADN

- Se agregó EDTA, proteinasa K y SDS, en ese orden, a una concentración final de 20 mM, 50 µg/ml y 0,5% (P/V), respectivamente. Se incubó 60 min a 65°C.

Se realizaron las siguientes extracciones de forma secuencial: fenol-cloroformo, cloroformo, éter.

Se precipitó con etanol (7000 g, 5 min) y se resuspendió en 2 ml de H₂O.

Se trató la preparación anterior con RNasa (20 µl de una solución 10 mg/ml), 30 min a 37°C.

Se agregaron 75 µl de NaAcO 4M y 1,5 volúmenes de etanol. Se dejó 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó y se resuspendió en 300 µl de H₂O.

b. Purificación de ADN simple cadena del virus M13

Se inoculó 50 µl de un cultivo saturado de bacterias JM101 en 12 ml de medio 2xTY.

Se crecieron 60 min, a 37°C y a 125 rpm.

Se añadieron $\approx 10^7$ viriones del fago M13 y se incubó durante 8 horas a 37°C.

Se centrifugó y se descartó el *pellet* bacteriano.

Materiales y Métodos

Se añadió al sobrenadante 1,3 ml de una solución de poli-etilenglicol 8000, 20% (P/V)-NaCl 2,5 M.

Se dejó en hielo 45 min y se centrifugó a 10000 g, 15 min.

Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 600 µl de Tris-HCl(pH 7,2), 20 mM.

Se realizaron las siguientes extracciones: fenol, fenol-cloroformo y cloroformo.

Se combinaron las fases acuosas y se precipitó con etanol.

Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de H₂O.

2.2. EXTRACCION Y PURIFICACION DE ARN

2.2.1. PURIFICACION DE ARN TOTAL

Las células fueron cosechadas, un día después de que habían llegado a confluencia, con PBS/EDTA.

Se centrifugó a 3000 rpm, 10 min y se agregaron 40 ml de la siguiente solución: clorhidrato de guanidinio 8 M, NaAcO (pH 5,2) 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 20 mM.

Los volúmenes de soluciones usadas están calculados para 4 g de células. En otras preparaciones varió el volumen de las mismas en forma proporcional a la masa celular.

La suspensión celular fue tratada en un homogeneizador de vidrio tipo Dounce y, luego, se agregaron 20 ml de etanol.

Se mantuvo 60 min a -20°C y, luego, se centrifugó 10 min a 8000 g.

Materiales y Métodos

Se resuspendió en 10 ml de la solución de guanidinio y se agregaron 5 ml de etanol. Esto se repitió 3 veces.

Se disolvió el último *pellet* en 10 ml de EDTA 20 mM (pH 8,0) y se calentó a 37°C.

Se extrajo con 10 ml de cloroformo/butanol 4:1(V/V).

A la fase acuosa se le agregaron 30 ml de NaAcO 4,5 M (pH 5,2) y se dejó toda la noche a -20°C.

Se centrifugó 10 min a 8000 g y se resuspendió en 3 ml de H₂O.

Se precipitó con etanol (8000 g, 10 min) y se resuspendió en 1 ml de H₂O. El rendimiento osciló entre 800-1000 µg de ARN total por g de células.

2.2.2. OBTENCION DE ARN MENSAJERO

Se realizó por cromatografía en oligo (dT) celulosa, de la siguiente manera:

Se preparó una columna de 1 ml y se lavó con 3 volúmenes, cada vez, de:

- H₂O estéril
- NaOH 0,1 M-EDTA 5 mM
- H₂O estéril

Se comprobó que el pH del efluente de la columna fuera menor que 8.

Se lavó la columna con 5 ml de *buffer* de siembra.

Se disolvió el ARN en H₂O y se calentó a 65°C, durante 5 min.

Se agregó 1 volumen de 2 x *buffer* de siembra y se aplicó a la columna.

Se recolectó el efluente y se repitió el procedimiento.

Materiales y Métodos

Se lavó la columna con 5 volúmenes de *buffer* de siembra y 4 volúmenes de *buffer* de lavado.

	<i>2 x buffer</i> siembra	<i>Buffer</i> de lavado	<i>Buffer</i> de elución
Tris-HCl (pH7,5)	40 mM	20 mM	10 mM
LiCl	1 M	100 mM	----
EDTA	2 mM	1 mM	1 mM
SDS	0,2%(P/V)	0,1%(P/V)	0,05%(P/V)

El ARN poli(A⁺) se eluyó con dos volúmenes de *buffer* de elución.

Se precipitó con etanol y se disolvió el precipitado en H₂O estéril.

2.3. SINTESIS DE ADN COPIA POR EL METODO DE RNasa H

Se extrajo ARN total de células Hs578T y, a partir del mismo, se purificó ARN poli (A⁺), por cromatografía de afinidad en oligo dT celulosa. Como iniciador (ó *primer*) se utilizó un oligonucleótido sintético de 19 bases (cuya síntesis y purificación se describen en 2.12), complementario de una región del ARN mensajero de fibronectina humana, que se encuentra cerca de su extremo 5' (Ver Figuras 5 y 6).

2.3.1. TRATAMIENTO DEL ARN CON METILMERCURIO

5 µg de ARN poli(A+), en 10 µl de H₂O, fueron incubados a 70°C, durante 1 min.

Se agregó 1 µl de metilmercurio 0,1 M que se dejó actuar durante 10 min, a temperatura ambiente.

Se añadieron 2 µl de mercaptoetanol y se dejó durante 5 min a temperatura ambiente.

2.3.2. SINTESIS DE LA PRIMERA CADENA DEL ADN COPIA (ADNc)

Se agregó a la preparación anterior 1 µg del oligonucleótido, previamente fosforilado con polinucleótido quinasa y ATP. Se utilizaron 100 unidades de transcriptasa reversa en 50 µl de volumen de incubación y en las siguientes condiciones finales de reacción:

Tris-HCl, (pH 8,3 a 42°C)	100 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	140 mM
dATP	1 mM
dCTP	1 mM
dGTP	1 mM
dTTP	1 mM
α ³² PdCTP	20 µCi (Actividad específica 3000 Ci/mmol)

Se incubó durante 90 min a 42°C y se detuvo la reacción con 2 µl de EDTA 0,5 M (pH 8,0).

Materiales y Métodos

Se calculó el porcentaje del deoxinucleótido radioactivo incorporado a la primer cadena de ADNc, mediante precipitación con TCA (tricloroacético).

Se extrajo con fenol/cloroformo.

El ADNc fue separado de los dNTPs no incorporados por cromatografía en Sephadex G-100, precipitado con etanol y resuspendido en 16 μ l de H₂O.

2.3.3. SINTESIS DE LA 2° CADENA

La preparación anterior, híbrido ADN/ARN, se trató con 0,5 unidades de RNasa H, 12,5 unidades de ADN polimerasa I de *E. coli* y 1 unidad de ADN ligasa de *E. coli* en las siguientes condiciones finales de reacción:

Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
MgCl ₂	4 mM
KCl	80 mM
dNTPs	50 mM (c/u)
NAD	150 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
BSA	2,5 μ g
α^{32} P dCTP	10 μ Ci (Actividad específica 3000 Ci/mmol)

Se incubó durante 60 min a 12°C y, luego, durante otros 60 min a 22°C.

Se extrajo con fenol-cloroformo.

Se calculó la masa de ADNc sintetizado, midiendo las cuentas precipitables por TCA. Se obtuvieron 80 ng de ADNc doble cadena, aproximadamente.

Materiales y Métodos

Se separaron los dNTPs no incorporados por cromatografía en Sephacryl-S300.

Se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 μ l de H₂O.

2.3.4. RELLENADO DE POSIBLES EXTREMOS 3' RECESIVOS POR FILLING IN

Se incubó la preparación anterior con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (15 unidades), en un volumen de 30 μ l, durante 20 min, a temperatura ambiente y en las siguientes condiciones:

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM
DTT	5 mM
dNTPs	400 mM cada uno

La enzima se inactivó por calentamiento a 70°C, durante 15 min.

2.3.5. LIGADO DEL ADNc A UN VECTOR

El ADNc fue ligado en forma *blunt end* al plásmido pAT153PvuII/8, cortado en el sitio Pvu II y desfosforilado con fosfatasa alcalina de ternero. La técnica empleada se describe en la siguiente sección.

2.4. INSERCIÓN DE MOLECULAS DE ADN EN VECTORES

En distintas etapas del trabajo se procedió a ligar distintos fragmentos de ADN en plásmidos, o en el fago M13. Las técnicas utilizadas fueron similares en todos los casos, variando sólo los sitios de restricción elegidos. En 2.4.3., se describe la obtención del subclón M13 Δ 0.90 por el sistema de deleciones sucesivas (Dale, McClure & Houchins, 1985).

2.4.1. PREPARACION DEL VECTOR

Los vectores empleados fueron los plásmidos pUC18 y pAT153PvuII/8, y la forma replicativa, de ADN doble cadena, del fago M13.

- Se cortaron alrededor de 10 μ g de vector con las correspondientes enzimas de restricción: una o dos diferentes, según el caso. La linearización del vector se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

A la preparación anterior se le agregó "CIP buffer" (Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM; MgCl₂ 1 mM; ZnCl₂ 0,1 mM; espermidina 1 mM), H₂O csp., para 100-500 μ l, según el caso; y fosfatasa intestinal de ternero (CIP), a razón de 10 miliunidades por cada picomol de extremos 5' de ADN.

Se incubó durante 15 min a 37°C y, luego 15 min a 56°C. Posteriormente, se agregó nuevamente CIP, en la misma cantidad que antes, y se incubó durante los mismos tiempos.

Se extrajo con fenol (vortex durante 1 min) y, luego 2 veces con éter. Se precipitó con etanol y se resuspendió en H₂O.

Materiales y Métodos

Se determinó el grado de corte y defosforilación del vector de la siguiente manera. Se transformaron bacterias *E. coli* competentes con las muestras 1 a 3 y se contaron las colonias obtenidas:

Muestra 1: 10 ng del vector tratado.

Muestra 2: 10 ng del vector tratado + *buffer* de ligasa + T₄ DNA ligasa.

Muestra 3: 1 ng del vector no tratado.

Buffer de ligasa

ATP	1 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	5 mM
Espermidina	0,1 mM

Los resultados obtenidos en el tubo 1 indican el porcentaje de vector no digerido por las enzimas de restricción; los del tubo 2, el porcentaje de vector no cortado más el que no fue defosforilado; y los del tubo 3 la eficiencia de las células competentes, punto de referencia para calcular los datos de 1 y 2.

- Se consideró aceptable un 1% de vector incompletamente tratado. En los casos en que fue necesario volvió a tratarse el vector con las endonucleasas de restricción y/o CIP hasta obtener valores adecuados.

2.4.2. LIGADO DE FRAGMENTOS DE ADN A VECTORES

En algunos casos, el fragmento de ADN de interés fue ligado conjuntamente con otros fragmentos provenientes del

vector o del inserto, que podían competir con el mismo. En otros casos se lo aisló, previamente, mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

Estrategias particulares de subclonado se describen en Resultados.

Las reacciones se llevaron a cabo en 10 μ l de reacción con 10 ng de vector, aproximadamente; 3 unidades de T4DNA ligasa, *buffer* de ligasa y distintas cantidades de inserto (cubriendo un rango de 3 órdenes de magnitud), para determinar la concentración óptima de los reactantes. Se incubó durante 5 horas a 15°C-16°C y luego, se transformaron bacterias MC1061, HB101 ó JM101.

2.4.3. SUBCLONADO POR EL METODO DE DELECCIONES SUCCESIVAS

- a. Subclon inicial. Un fragmento Eco RI/Sac I de 2,4kb, del gen de la fibronectina, fue insertado en M13mp18, según técnicas descriptas (Figuras 13 y 14). Se preparó ADN simple cadena del mismo y se procedió al paso siguiente.
- b. Linearización del fago. El *primer* RD29 (obtenido comercialmente) es complementario de una región del *polylinker* del ADN del fago, que contiene un sitio Hind III.

La secuencia del *primer* es la siguiente:

TTTTTTTTTTCGAACCGTGACCGGCAGC (se subraya la zona que forma parte del sitio Hind III). Se hibridó este oligonucleótido con el ADN de M13 y se cortó con HindIII, en las siguientes condiciones: ADN 2 μ g; *primer* RD29 160 ng; Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 4 mM; Hind III 40 unidades, en un volumen total de 25 μ l, 8 horas a 50°C. Se calentó, luego, 5 min a 85°C, se dejó enfriar y

Materiales y Métodos

- se corrió una alícuota en un gel de agarosa para comprobar la eficiencia del corte.
- c. Digestión a partir del extremo 3' con T4 ADN polimerasa. Se incubaron alícuotas de la preparación anterior con T4 ADN polimerasa, 12 unidades, a 37°C, durante 7,5; 15; 25; 40 y 55 min. Se juntaron las 5 fracciones y se continuó con el siguiente paso.
 - d. Agregado de una cola de poli (A). La preparación anterior se incubó con Transferasa Terminal, 15 unidades, en 16 µl, con el agregado de 150 picomoles de dATP, durante 10 min a 37°C y durante otros 10 min a 65°C.
 - e. Ligado. 20 µl de la preparación anterior fueron incubados con 160 ng del *primer* RD29, durante 10 min, a 65°C, dejándose enfriar durante 30 min, a temperatura ambiente. Se añadió ATP, a una concentración final de 1 mM y 3 unidades de T4 ADN ligasa, incubándose durante toda la noche a temperatura ambiente.
 - f. Transformación. Se transformaron células JM101 competentes, según técnicas ya descritas, con ADN sin ligar (como control) y ADN ligado, obteniéndose 0 y 370 colonias, respectivamente.
 - g. Análisis de los insertos. Se preparó ADN simple cadena de 60 placas independientes, por el método descrito en la sección 2.1.2.b y se lo analizó en un gel de agarosa 0,7% (Ver Resultados y Figura 14 B).

2.5 TRANSFORMACION EN E. COLI

2.5.1. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES MC1061 Y HB101

Se inocularon 5 ml de medio de cultivo LB con una colonia aislada de MC1061 o HB101 y se incubó toda la noche a 37°C.

Se tomaron 500 µl del cultivo anterior y se inocularon en 100 ml de LB (contenidos en un Erlenmeyer de 500 ml). Se dejó crecer a 37°C, hasta una densidad óptica de 0,2 a 550 nm para las cepas rec A+ y de 0,5 para las cepas rec A-.

Se centrifugó 10 min a 5000 g, se resuspendió el *pellet* bacteriano en 40 ml de TfbI* frío y se dejó en hielo 10 min.

Se centrifugó 10 min a 5000 g y el precipitado se resuspendió en 4 ml de TfbII** frío. Se dejó en hielo 5 min y, luego, se trasvasó a tubos Eppendorf, en alícuotas de 200 µl.

Se congeló por inmersión en N₂ líquido y, luego, se guardó a -70°C.

<u>TfbI*</u>		<u>TfbII**</u>	
KAcO	30 mM	PIPES	10 mM
KCl	100 mM	KCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	75 mM
MnCl ₂	50 mM	Glicerol	15%(V/V)
Glicerol	15%(V/V)		

Se llevó a pH 5,8 con HAcO.

Se llevó a pH 6,5 con KOH.

2.5.2. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES JM101

Se inoculó una colonia aislada de JM101 en 2 ml de LB y se dejó crecer durante toda la noche.

Se tomaron 200 µl del cultivo anterior y se inoculó en 50 ml de LB; se creció hasta 0,3-0,4 de densidad óptica a 550 nm

Se centrifugó, se resuspendió el precipitado en 25 ml de CaCl₂ 50 m y se dejó 40 min.

Se centrifugó, una vez más, y se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ 50 mM.

2.5.3. TRANSFORMACION CON PLASMIDOS

Se agregaron 60 µl de bacterias a un tubo Eppendorf conteniendo hasta 10 µl de la solución de ADN. Se dejó 10 min en hielo.

Se incubó 5 min a 37°C.

Se agregó 1 ml de LB, precalentado a 37°C, y se incubó a la misma temperatura, durante 30-40 min.

Se tomó una alícuota de 200 µl y se sembró, mediante rastro, en placas de Petri con LB agar, conteniendo Ampicilina (100 µg/ml).

2.5.4. TRANSFORMACION CON M13

Se agregaron 250 µl de células JM101 competentes a la solución de ADN y se dejó 40 min, en hielo.

Se incubó 2 min a 42°C y se puso en hielo.

Materiales y Métodos

Se agregaron 200 μ l de un cultivo saturado de células JM101, no competentes.

Se añadieron 20 μ l de IPTG (20mg/ml) y 20 μ l de X-gal (20 mg/ml).

Se agregaron 3 ml de LB agar blando, previamente fundido, y mantenido a 44°C.

Se homogeneizó por inversión y se sembró en cajas de Petri conteniendo LB agar.

2.6. HIBRIDACION DE ADN EN COLONIAS BACTERIANAS

Se describe el diseño experimental usado con mayor frecuencia y también el empleo con una sonda de 27 pb (ver 2.6.5).

2.6.1. LISIS BACTERIANA Y DESNATURALIZACION DEL ADN

Se colocó una hoja de papel de filtro Whatman 541 sobre la superficie de una caja de Petri conteniendo las colonias bacterianas.

Se dejó 15 min a temperatura ambiente y, luego, se retiró el papel Whatman, con las colonias adsorbidas.

Se trató el filtro de manera secuencial y durante 3 min cada vez con: 1) NaOH 0,5 N; 2) Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M; 3) 2 x SSC (1xSSC=citrato de sodio 0,015 M; NaCl 0,15 M). Se repitieron los tratamientos mencionados en el paso anterior.

Se pasó el filtro a etanol 95% y se lo mantuvo 1 min. Se dejó secar al aire.

2.6.2. PREHIBRIDACION

Se incubaron los filtros, en una bolsa plástica, a 65°C y con agitación, en la siguiente solución:

SSC	3 X
*Denhardt	10 X
SDS	0,2% (P/V)
ADN de esperma de salmón	100 µg/ml

* Denhardt 50 x = albúmina 1%(P/V), polivinilpirrolidona 1%(P/V), ficol 1%(P/V).

2.6.3. HIBRIDACION

Se desnaturalizó la sonda radioactiva 5 min a 100°C y, luego, se colocó en hielo.

Posteriormente, se la inyectó en la bolsa de hibridación, mediante una jeringa hipodérmica.

Se incubó a 65°C, durante toda la noche.

2.6.4. LAVADO DEL PROBE NO HIBRIDADO

- 1) 3 X SSC- 0,1% SDS (P/V), 2 ó 3 lavados a temperatura ambiente.
- 2) 2 X SSC- 0,1% SDS (P/V), 30 min a 65°C
- 3) 1 X SSC- 0,1% SDS (P/V), 30 min a 65°C
- 4) 0,3 X SSC, 30 min a 65°C

2.6.5. CONDICIONES USADAS CON LA SONDA HIND III/Dde I, DE 27 PARES DE BASES

a. Prehibridación e hibridación

- Se incubaron los filtros durante 2 horas y 16 horas, respectivamente, a 45°C y en las siguientes condiciones:

SSC	5 X
SDS	1% (P/V)
*Denhardt	1 X
ADN de esperma de salmón	100 µg/ml

La sonda se inyectó de la manera usual y su concentración fue de 100.000 cpm/ml.

b. Lavados

SSC 5 X - SDS 0,1% (P/V), a 25°C, dos lavados de 30 min cada uno.

2.7. ANALISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MARCADO DE ADN

2.7.1. CORTE CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Como fuente de ADN se utilizaron preparaciones obtenidas por gradientes de CsCl, minipreparaciones o fragmentos eluidos de geles de poliacrilamida o agarosa.

Se usaron los siguientes *buffers*, de acuerdo a los requerimientos de cada enzima: Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, MgCl₂ 10 mM y distintas concentraciones de NaCl (0, 50, 100 o

Materiales y Métodos

150 mM), excepto para Sma I, para la cual se usó el siguiente:

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	20 mM
β-mercaptoetanol	6 mM

Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a la temperatura indicada por el proveedor, con 3-5 unidades de enzima por µg de ADN y con concentraciones de glicerol no superiores al 10% (V/V).

2.7.2. MARCACION DE ADN

Para marcar radioactivamente el ADN se usaron los métodos de *filling in*, fosforilación con polinucleótido quinasa (PNK) y *nick translation*, para marcar extremos 3', 5' ó de manera interna, respectivamente.

a. Método de filling in

- 1 µg de ADN se cortó con 1 o más enzimas de restricción en un volumen de 20 µl.

Se procedió luego a incubar la preparación anterior con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I: 0,3 unidades, en 30 µl de reacción, durante 20 min a 20°C. Las concentraciones finales de los reactivos fueron:

Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM
α ³² P dXTP ^a	25 µCi

Materiales y Métodos

a. Se utilizó $\alpha^{32}\text{PdCTP}$, $\alpha^{32}\text{PdGTP}$ ó $\alpha^{32}\text{PdATP}$ (actividad específica 3.000 Ci/mmol), según el tipo de extremo 3' recesivo dejado por la enzima de restricción empleada.

Se agregó a la preparación anterior 1 μl de dNTPs no radioactivos (de una solución de 1 mM, cada uno), y se incubó durante 10 min más.

Se inactivó la enzima por calentamiento a 70°C, durante 20 min.

En los casos en que fue necesario se cortó con una segunda o tercera endonucleasa de restricción con o sin previa modificación del *buffer* de incubación.

Se agregó a la preparación anterior la cantidad necesaria de *buffer* de siembra (ver 2.8) y se sembró en un gel de poliacrilamida "nativo" (ver sección siguiente), del porcentaje adecuado al tamaño de los fragmentos de ADN a separar.

Una vez finalizada la electroforesis se realizó una radioautografía de 5 min de exposición; se cortó la banda del gel, conteniendo el fragmento de ADN deseado y ésta se colocó en un tubo Eppendorf con 400 μl de NaAcO (pH 5,2) 0,3 M.

Se dejó durante toda la noche a 37°C y se precipitó con etanol el ADN eluído.

b. Fosforilación con PNK y $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$:

- 2 a 5 μg de ADN fueron cortados con una o más enzimas de restricción.

Se procedió a eliminar los fosfatos de los extremos 5', mediante la enzima CIP (fosfatasa alcalina de ternero), según las condiciones descriptas en 2.4.

Materiales y Métodos

Se precipitó con etanol, se lavó dos veces con etanol 70% y se resuspendió el ADN desfosforilado en 40 μ l de H₂O. Se agregaron 20 μ Ci de ATP γ ³²P "fresco" (no más de 10 días después de haber sido sintetizado), de una actividad específica de 1500 Ci/mmol.

Se añadió *buffer* de PNK a una concentración final de:

Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
Espermidina	1 mM

Se incubó la solución anterior con 5-10 unidades de PNK del fago T4, durante 30 min a 37°C.

Se agregó *buffer* de siembra y se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida.

La radioautografía y la elución del fragmento se hicieron como se describió en el apartado anterior.

c. Método de nick translation (desplazamiento del nick)

- 300-500 ng de ADN circular o lineal, de un tamaño superior a los 500 pb se incubaron con la siguiente mezcla enzimática: DNasa 1000 U/ml-DNA polimerasa I (*E.coli*) 0,1 μ g/ml, y dCTP α ³²P (25 μ Ci, actividad específica 3000 Ci/mmol), durante 60 min a 16°C.

Las condiciones del ensayo fueron: Tris.HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM y dGTP, dATP y dTTP(1 nanomol de cada uno), en 20 μ l de reacción.

La reacción se detuvo con 1 μ l de EDTA 0,5 M.

Los deoxinucleótidos no incorporados se separaron del ADN por cromatografía de filtración en gel. Para ello se

emplearon columnas de 2 ml de Sephacryl S-300 o Sepharosa CL 4B.

2.8. ELECTROFORESIS EN GELES

2.8.1. GELES DE AGAROSA

a. Preparación y corrida:

Se empleó agarosa de bajo punto de fusión, en algunos casos, y agarosa común en la mayoría. Se usaron minigeles, que se prepararon en minicubas, o geles de mayor tamaño, cuya preparación es muy similar a la descrita por Maniatis, Fritsch & Sambrook (1982).

- El *buffer* del gel y el de corrida fue, en todos los casos TBE.

Preparación de TBE 10X:

Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA (pH 8,0) 0,5 M	40 ml

Para teñir el ADN se utilizó bromuro de etidio que se incorporó en la solución de armado del gel a una concentración de 50 µg/ml.

La electroforesis se realizó, en general, a 8V/cm de gel. Se observó el ADN por iluminación directa del gel con luz UV de 300 nm y, cuando fue necesario, se lo fotografió con una máquina Polaroid MP-4 y película de alta sensibilidad, Polaroid N° 667.

b. Recuperación de ADN de geles de agarosa

Se utilizaron dos métodos diferentes con buen resultado:

Electroelución

Se corrió el gel y se localizó la banda de interés por medio de luz UV de 300 nm.

- Se hizo una incisión en el gel por debajo de la banda y se colocó dentro de ella un pedazo de papel Whatman 3MM, cubierto en la cara que mira al ánodo por una membrana de diálisis.

Se continuó con la electroforesis hasta que la banda de ADN entró en el papel.

Se eluyó el ADN del papel por lavado con NaCl 0,2 M, Tris-HCl (pH 7,6) 50 mM, EDTA 1 mM.

Se juntaron las fracciones eluidas, se extrajo una vez con fenol-cloroformo y dos con éter.

Se precipitó con etanol y se resuspendió en H₂O.

Recuperación de ADN a partir de agarosa de bajo punto de fusión

- Se preparó el gel y se realizó la electroforesis a 4°C
Se localizó la banda de ADN de interés por iluminación con luz UV y se cortó el trozo de gel deseado.
Se añadieron al mismo, 3 ml de H₂O por gramo de peso y se calentó 5 min a 65°C, para fundir el gel.
En algunos casos no se extrajo la agarosa y la preparación anterior se usó para ligar el fragmento de ADN a un vector (Ver 2.4).
En otros casos, se continuó con el procedimiento y se extrajo el ADN de la banda fundida con un volumen de fenol y, luego, con un volumen de fenol-cloroformo.

2.8.2. GELES DE POLIACRILAMIDA

a. Preparación y corrida de los geles

Los geles se prepararon a partir de una solución conteniendo acrilamida 30% (P/V)-bisacrilamida 1% (P/V).

El porcentaje de acrilamida del gel varió entre 4% y 20%, según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar.

El *buffer* de siembra, el del gel y el de la corrida fue siempre TBE (descripción en 2.8.1.a).

Los geles desnaturalizantes (secuenciación de ADN, mapeo con S1) se armaron en urea 7M.

Las dimensiones de los geles fueron: 40, 60 u 80 cm de longitud; 20 cm de ancho y 0,4 mm de espesor.

La preparación de los mismos fue similar a la descrita por Maniatis, Fritsch & Sambrook (1982).

La electroforesis se realizó a 30 mA, 22 mA y 15 mA para los geles de 40, 60 y 80 cm, respectivamente.

El ADN separado por electroforesis estuvo siempre marcado radioactivamente y se detectó mediante radioautografía.

b. Geles de separación de cadenas

Este tipo de geles se usó para obtener fragmentos de ADN de simple cadena, marcados radioactivamente en su extremo 3' o 5', con el propósito de emplearlos como sondas en las técnicas de mapeo con nucleasa S1, o para ser secuenciados por el método de Maxam & Gilbert.

- Se marcó un fragmento de ADN y se lo separó por electroforesis en gel de poliacrilamida; se lo eluyó de la manera descrita previamente y se lo precipitó con etanol.

Se resuspendió en TBE 1X y se agregó 1 volumen de dimetilsulfóxido.

Se calentó 3 min a 90°C y se sembró inmediatamente en un gel de poliacrilamida de las siguientes características: Acrilamida 6% (P/V)-Bisacrilamida 0,1% (P/V)-TBE 0,5X. El *buffer* de corrida fue TBE 0,5X y se utilizó un voltaje máximo de 8V/cm.

Se radioautografió y eluyó de la forma usual.

c. Radioautografías

Después de la electroforesis, el gel se cubrió con Saran-Wrap

Las exposiciones se hicieron con película Agfa CURIX Rp1, a temperatura ambiente para períodos cortos de tiempo y a - 70°C para períodos más largos.

Se emplearon o no, pantallas intensificadoras de tungsteno-calcio-fósforo (Dupont Cronex Lightning Plus).

2.9. TRANSFERENCIA DE ADN (TECNICA DE SOUTHERN)

2.9.1 TRANSFERENCIA DE ADN

Después de finalizada la electroforesis, se fotografió el gel y se lo transfirió a un recipiente adecuado.

Se incubó el gel en NaOH 0,4 N- NaCl 0,6 M durante 30 min, a temperatura ambiente, con agitación suave.

A continuación se neutralizó el gel en Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 M- NaCl 1,5 M, durante 30 min a temperatura ambiente.

Se cortó un trozo de la membrana de transferencia (GENE-SCREEN Plus) del tamaño del gel, se lo sumergió en H₂O

deionizada y posteriormente se lo dejó 15 min en SSC 10X (NaCl 1,5 M-citrato de sodio 0,15 M).

Se utilizó un sistema de transferencia igual al descrito por Maniatis, Fritsch & Sambrook (1982), excepto que se usó una membrana de nylon (GENE SCREEN Plus, mencionada anteriormente).

Se dejó 16-24 horas y, luego, se sumergió la membrana en NaOH 0,4 N, durante 1 min.

Se descartó la solución anterior y se neutralizó con Tris-HCl (pH 7,5)-SSC 2X.

Se dejó secar a temperatura ambiente y se colocó el filtro en la bolsa de hibridación.

2.9.2. HIBRIDACION DEL ADN

Prehibridación: se incubó la membrana durante 1-2 horas, en una bolsita plástica conteniendo SSC 6X; SDS 0,5% (P/V); Denhardt 5X (0,1% polivinil-pirrolidona, 0,1% ficol, 0,1% albúmina sérica bovina); ADN de esperma de salmón 100 µg/µl; a 65°C, con agitación.

Hibridación: a la solución anterior se le inyectó, mediante una jeringa, la sonda de ADN marcada y se incubó toda la noche, a 65°C.

Lavados:

SSC 2X, a temperatura ambiente: 2 lavados de 5 min c/u

SSC 2X, SDS 1% (P/V) a 65°C 2 lavados de 30 min c/u

SSC 0,2X, a temperatura ambiente: 2 lavados de 30 min c/u

Rehibridación del ADN:

- La membrana no se dejó secar completamente.

Se incubó la misma en 100-200 ml de NaOH 0,4 N a 42°C, durante 30 min.

Se descartó la solución anterior y se neutralizó en 100-200 ml de SSC 0,1X; SDS 0,1% (P/V), Tris-HCl (pH 7,5) 0,2 M, a 42°C , durante 30 min.

Se radioautografió durante un período de tiempo adecuado, para comprobar si la sonda de ADN radioactiva unida a la membrana había sido eliminada.

Se prehibridó e hibridó como se describió anteriormente.

2.10. SECUENCIACION DE ADN

2.10.1. METODO DE MAXAM & GILBERT

Los fragmentos de ADN a secuenciar fueron obtenidos por corte con endonucleasas de restricción, marcado por *fill-ing in* o con PNK y recorte con una segunda enzima de restricción (ADN doble cadena) o separación de cadenas (ADN simple cadena). Estos fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida, del porcentaje adecuado, y eluidos del gel de la manera descripta en Electroforesis en geles (ver 2.8.2).

Al fragmento de ADN contenido en la solución de elución (NaOAc, pH 5,2, 0,3 M) se le agregaron 8 µg de ADN *carrier* (ADN de esperma de salmón) y 900 µl de etanol.

Se colocó 20 min a -70°C y se centrifugó a 12.000 g, 10 min.

El precipitado de ADN marcado se resuspendió en 30 µl de H₂O.

Se realizaron en forma sucesiva las reacciones descriptas en la Tabla IV.

Tabla IV. Método de secuenciación de ADN. de Maxam & Gilbert

<u>A+G</u>		<u>G</u>		<u>T+C y C</u>	
		DMS <i>buffer</i>	200µl	H ₂ O(sólo a T+C)	20µl
				NaCl(sólo a C)	20µl
ADN <i>carrier</i>	8µg	ADN <i>carrier</i>	8µg	ADN <i>carrier</i>	8µg
ADN 32Pa	5µl	ADN 32Pa	5µl	ADN 32Pa	5µl
HCOOH 90%	25µl	DMS ^b (1/4)	1µl	Hidrazina	20µl
7 min a 17°C		15 s a 20°C		8 min a 17°C	
T+C <i>STOP</i>	200µl	DMS <i>STOP</i>	50µl	T+C <i>STOP</i>	300µl
ARN <i>carrier</i>	80µg	ARN <i>carrier</i>	80µg	ARN <i>carrier</i>	80µg
Etanol	750µl	Etanol	750µl	Etanol	750µl

- Se dejó 10 min a -70°C , como mínimo
- Se centrifugó a 12000 g, 5 min
- Se resuspendió en 300 µl de NaAcO 0,3 M
- Se añadieron 750 µl de etanol
- Se dejó a -70°C , 15 min
- Se centrifugó 10 min
- Se resuspendió en 25 µl de Piperidina 1 M
- Se calentó a 90°C , 30 min
- Se agregaron 25 µl de NaAcO 0,6 M
- Se añadieron 125 µl de etanol
- Se dejó a -70°C , 20-30 min y se centrifugó 15 min
- Resuspensión en 15 µl de "colorantes en formamida^c"
- Se calentó a 100°C , 5 min y se sembró en un gel de poliacrilamida con 7 M urea

a. Se usaron en general, entre 100.000 y 300.000 cpm, por reacción.

b. DMS= Dimetilsulfato.

c. Colorantes en formamida = formamida deionizada 80% (V/V); TBE 1X; azul de bromofenol 0,1%; xylen-cianol 0,1%

<u>DMS buffer</u>		<u>DMS STOP</u>		<u>C+T STOP</u>	
Cacodilato		NaAcO	1,5 M	NaAcO	0,3 M
de Na	50 mM	(pH 7,0)		(pH 5,2)	
EDTA (pH 8,0)	1 mM	β-MSH	1,0 M		

2.10.2. SECUENCIACION POR EL METODO DE SANGER

Se preparó ADN simple cadena de los clones M13FNE/S24 y M13FNΔ0.95, según técnicas descriptas en la sección 2.1.b.

a. Hibridación: 1/4 de una minipreparación de ADN, simple cadena, se hibridó con 1,5 ng de un *primer* de 17 bases (17mer *SEQUENCING PRIMER* (-20), New Engl. Biolabs) en TMN *buffer* y en 12 µl de volumen de reacción.

Se calentó 3 min a 100°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente, durante 30 min.

b. Preparación de las mezclas de dideoxinucleótidos^a

	T	C	G	A
dTTP (0,5 mM)	5,5	62	62	62
dCTP (0,5 mM)	62	5,5	62	62
dGTP (0,5 mM)	62	62	5,5	62
ddTTP (10 mM)	11,5	----	----	----
ddCTP (10 mM)	----	2,25	----	
ddGTP (10 mM)		----	2,5	----
ddATP (10 mM)			----	1

A todas las mezclas se les agregó TMN *buffer* (concentración final 1X).

a. Todos los volúmenes se expresan en µl.

c. *Mezcla enzima/precursor radioactivo.

dATP (2,5 μ M)	3,5
DTT (100 mM)	2
Tris-HCl (pH 8,0;10 mM)	8,5
Klenow (5U/ μ l)	1
dATP α ³² P (3.000Ci/mmol)	5
Volumen final	20

Los volúmenes se expresan en μ l

d. Reacción

Se mezclaron en cada tubo: 2 μ l de la solución de hibridación (a); 2 μ l de la mezcla de nucleótidos (b) y 2 μ l de la mezcla c. Se incubó 15 min a 50°C , se agregaron dNTPs fríos (100 μ M final cada uno) y se incubó durante otros 15 min a 50°C Se agregó un volumen de "colorantes en formamida", se calentó 3 min a 100°C, se sembró inmediatamente en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y se realizó la electroforesis en las condiciones habituales.

2.11. MAPEO CON NUCLEASA S1

Se extrajo ARN total de células de teratocarcinoma 2102Ep, de fibroblastos W138, de células de hepatoma Hep 3B y de células de carcinosarcoma Hs578T (Ver sección 2.13.1).

Se obtuvieron fragmentos de ADN de doble o simple cadena, marcados en sus extremos (5' o 3' según el caso), que se usaron como sondas para detectar ARNm de fibronectina humana.

a. Coprecipitación:

ARN total	10-50 μ g
Poli (A) <i>carrier</i>	20 μ g
NaAcO (pH 5,2)	0,3 M (concentración final)
ADN (α^{32} P)*	5-30 ng

*actividad específica: 5×10^6 - 1×10^7 cpm/ μ g de ADN

Se agregaron dos volúmenes de etanol y se incubó 20 min a -70°C ; luego se centrifugó a 12000 g, 10 min.

b. Hibridación: Se resuspendió en 12,5 μ l de *R-loop buffer*:

PIPES (pH 6,4)	40 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM
NaCl	0,4 M
Formamida deionizada	80% (V/V)

Se agregaron 2 gotas de vaselina líquida para evitar la evaporación.

Se calentó a 73°C , 10 min, para separar las cadenas del ADN.

Se incubó durante 12-16 hs a distintas temperaturas (ver Resultados).

c. Tratamiento con nucleasa S1

- Se agregó a cada tubo 150 μ l de la siguiente solución:

NaAcO (pH 4,4)	30 mM		
NaCl	250 mM		
ZnCl ₂	1 mM	S1	500 U/ml
ADN de esperma de salmón	3 μ g (hervido durante 5 min)		

Se incubó durante 60 min a 50°C .

d. Detención de la reacción

- Se agregaron a cada tubo 50 μ l de la solución siguiente:

EDTA (pH 8,0)	20 mM
ARN carrier	200 μ g/ml

Se añadieron 500 μ l de etanol, se enfrió a -70°C durante 20 min y se centrifugó a 2.000 g, 10 min.

e. Electroforesis en geles

- Se extrajo el sobrenadante con la vaselina, se secó al aire y se resuspendió en 10 μ l de colorantes en formamida (ver sección 2.10.1).

Se hirvió durante 5 min y se sembró en un gel desnaturante de poliacrilamida (con urea 7 M), del porcentaje adecuado.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la radioautografía de la manera usual.

2.12. SINTESIS Y PURIFICACION DE OLIGONUCLEOTIDOS

Se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios, de 19 y 20 bases (ver Resultados), por el método de triéster de fosfito, en un sintetizador automático de ADN (Applied Biosystems Inc.).

Una vez finalizada la síntesis se trataron las muestras con amoníaco, durante 30 min para despegar el oligonucleótido de la resina. Se repitió, luego, el procedimiento dos veces.

Se juntó el volumen de los 3 lavados y se calentó a 55°C , para eliminar el grupo tritilo protector del extremo 5'.

Se calentó a 70°C para evaporar el NH₃ y se concentró la muestra en un evaporador rotatorio.

Las muestras fueron purificadas en un gel de poliacrilamida 25%, 7 M urea, de 3 mm de espesor.

Las bandas de ADN se visualizaron por iluminación indirecta con luz UV de 300 nm (absorción de la luz UV sobre una placa de TLC con sustancia fluorescente).

La elución del ADN se realizó incubando el trozo de gel en H₂O, a 37°C, durante toda la noche.

Se concentró en evaporador rotatorio.

Las sales se separaron del ADN por cromatografía en Bio-gel P2.

Se hibridaron los dos oligonucleótidos por calentamiento a 60°C, 10 min y, luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

2.13. LINEAS CELULARES Y CEPAS BACTERIANAS

2.13.1. LINEAS CELULARES

HS578T: línea celular de carcinosarcoma mamario humano.

Hep 3B: línea celular de hepatoma humano.

2102 Ep línea celular de teratocarcinoma humano.

WI38 línea celular de fibroblastos humanos.

2.13.2. CEPAS BACTERIANAS

HB101: F⁻, hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ⁻.

MC1061: araD139, Δ (ara, leu)7697, lacx74, galU, galK, hsr⁻, hsm⁺, StrA.

K802: hsdR⁺, hsdM⁺, gal⁻, met⁻, supE.

JM101: Δ (lac-pro); supE, thi1, StrA, F[']proAB, lac I^q, Z ΔM15, traD36.

2.14. MEDIOS DE CULTIVO

2.14.1. MEDIO DMEM

Medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco (Dulbecco & Freeman, 1959): se utilizó para cultivar las células Hs578T.

2.14.2. MEDIO LB

Bactotripton (DIFCO)	10 g/l
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g/l
NaCl	10 g/l

Para medio LB sólido se añadió 15 g/l de agar (DIFCO). Para medio LB agar blando, se usaron 7 g/l de agar.

2.14.3. MEDIO NZCYM

NZ amina	10 g/l
NZCl	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Casaminoácidos	1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g/l
H ₂ O csp	1 l

Se llevó a pH 7,5 con NaOH

14.4. MEDIO 2xTy

Bactotripton (DIFCO)

Extracto de levadura (DIFCO)

NaCl

3.1 ANALISIS DEL EXTREMO 5' DEL ARNm DE LA FIBRONECTINA

Como se comentó en la Introducción, cuando comenzamos este trabajo se conocía la estructura primaria de la fibronectina madura, pero faltaba aún determinar cuál era el producto primario de traducción de su ARNm. Se suponía que esta proteína debía tener una secuencia señal, ya que la misma es secretada al exterior de la célula. No se sabía, sin embargo, si existía un propéptido y, por lo tanto, se desconocía también cuántos eventos de procesamiento debían ocurrir en el extremo NH₂-terminal de la fibronectina para originar la proteína madura.

Para investigar este problema, utilizamos la misma estrategia que se empleó para dilucidar la secuencia de aminoácidos del resto de la proteína: dar un paso más en la "caminata del ARNm". Esto es, utilizar la información provista por el clon de ADNc más cercano al extremo 5' del ARNm para generar un iniciador (o *primer*) que se emplea, a su vez, en la síntesis de un nuevo clon de ADNc.

3.1.1. SINTESIS Y CLONADO DE ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó como *primer* un oligonucleótido de 19 bases, cuya secuencia es la siguiente: 3'CGAGTCGTTTACCAAGTCG 5' (sintetizado previamente por A.R. Kornblihtt). Este fragmento de ADN es complementario de una región del ARNm de la fibronectina humana, representada en el clon de ADNc pFH6 (Figura 5; Kornblihtt *et al.*, 1985), cuyo extremo 5' termina donde comienza la proteína madura. La fuente del ARNm fue la línea celular de carcinosarcoma mamario Hs578T, que sintetiza fibronectina en abundancia (Hackett *et al.*, 1987). La síntesis del ADNc, de doble cade-

Resultados

na, se realizó por el método de RNasa H (Okayama & Berg, 1983), según se describe en Materiales y Métodos y se esquematiza en la Figura 4. Los pasos realizados fueron los siguientes:

- Fosforilación del extremo 5' del oligonucleótido mencionado anteriormente, con ATP y polinucleótido quinasa del fago T4.

- Hibridación de este *primer* con ARN poli (A)+ de células Hs578T y síntesis de la 1° cadena de ADNc con transcriptasa reversa.

- A continuación, digestión parcial del ARN hibridado, con RNasa H (esta enzima sólo actúa sobre el ARN cuando éste forma un híbrido de doble cadena). Esta etapa se realizó con el fin de generar iniciadores para la síntesis de la 2° cadena.

- La síntesis de esta última se llevó a cabo con ADN polimerasa I de *E. coli* y los *nicks*, que se produjeron como consecuencia de la síntesis discontinua del ADN, se sellaron con ADN ligasa de *E. coli*.

- Por último se rellenaron posibles extremos 3' recessivos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (no mostrado en la Figura 4) y el ADNc doble cadena se ligó en forma *blunt end* al sitio Pvu II del plásmido pAT153PvuII/8, mediante T4 ADN ligasa.

Con la mezcla de ligado se transformaron bacterias *E. coli* y las colonias bacterianas fueron analizadas por hibridación con un fragmento de ADN, de 27 pb, obtenido por corte del clon pFH6 con las enzimas Hind III y Dde I (marcado en su extremo HindIII). La sonda mencionada cubre el extremo 5' de pFH6, pero no incluye a la región del *primer* por lo cual es adecuada para detectar clones de fibronectina (Figura 5).

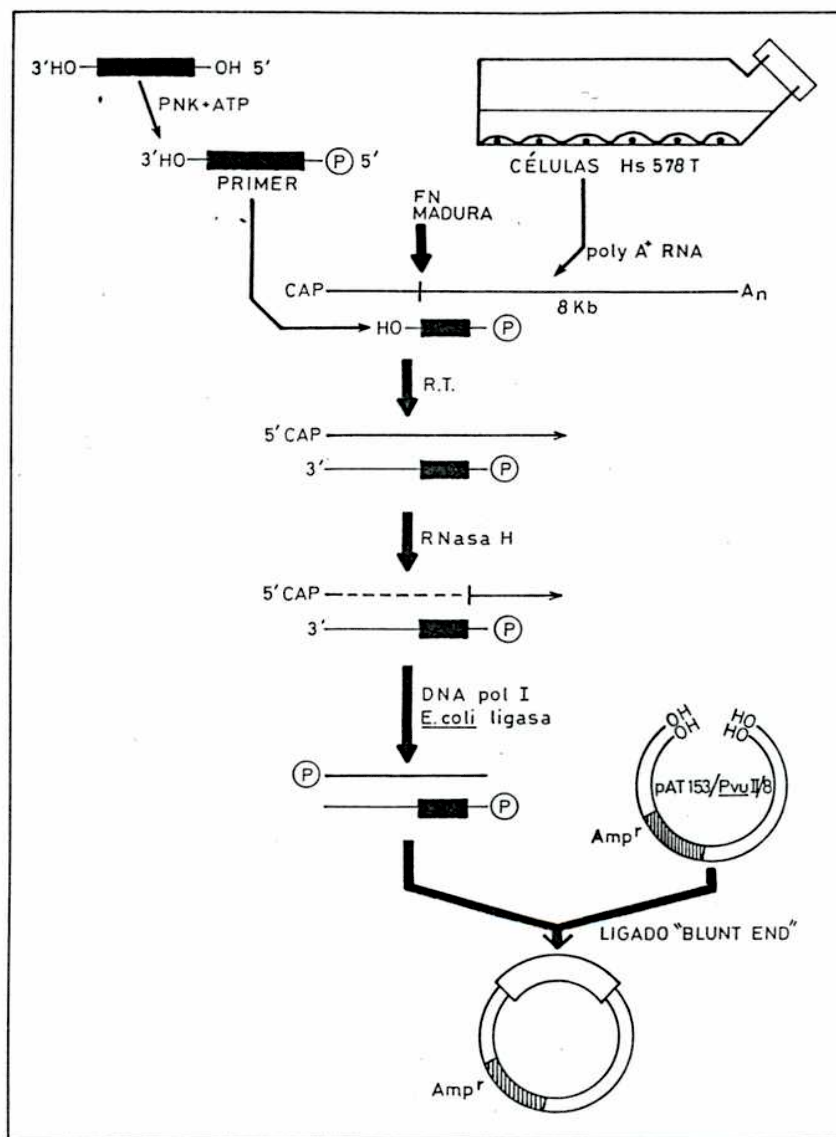


Figura 4. Esquema de síntesis y clonado de ADNc. a partir del extremo 5' del ARNm de la fibronectina humana. RT = transcriptasa reversa. Amp^r = resistencia a Ampicilina.

3.1.2. CARACTERIZACION DE LOS CLONES

Se obtuvieron dos clones, de 119 y 258 pares de bases, que denominamos pFH2 y pFH3, respectivamente (Figura 5). Su secuencia de nucleótidos se determinó por el método de Maxam & Gilbert (1980). La presencia de múltiples codones ATG, *up-stream* del presunto codón iniciador, en pFH3 hizo necesario corroborar la colinealidad del mismo con el ARNm de la fibronectina y para ello se realizaron experimentos de mapeo con nucleasa S1 (Figura 6). Como sonda se utilizó un fragmento de restricción Taq I de 501 pb, obtenido de pFH3 y marcado en su extremo 3'. Esta sonda contiene 222 pb de secuencias de inserto y 279 pb de secuencias de vector, lo que permite diferenciar la protección por el ARNm, de la digestión incompleta por la nucleasa S1.

Como se observa en la Figura 6 (canal +) se producen dos bandas por acción de la enzima: una superior (a) corresponde a la sonda incompletamente digerida, mientras que la inferior (b) corresponde a la sonda protegida por ARNm y tiene unos 85 pb. El tamaño de la banda (b) indica que sólo una parte de pFH3 es ADNc de fibronectina (Figura 5) y que, por un artificio de clonado, coligaron ADNc que codifica para esta proteína y un trozo de ADN no relacionado con el mismo.

3.1.3. ANALISIS DE LA SECUENCIA

La secuencia de nucleótidos de pFH2 y la secuencia de aminoácidos, deducida de la misma (Figura 7) nos permitió identificar a 31 aminoácidos que preceden al comienzo de la proteína madura. Aunque no existen datos proteicos para comparar, estas secuencias deben pertenecer a la fibronectina,

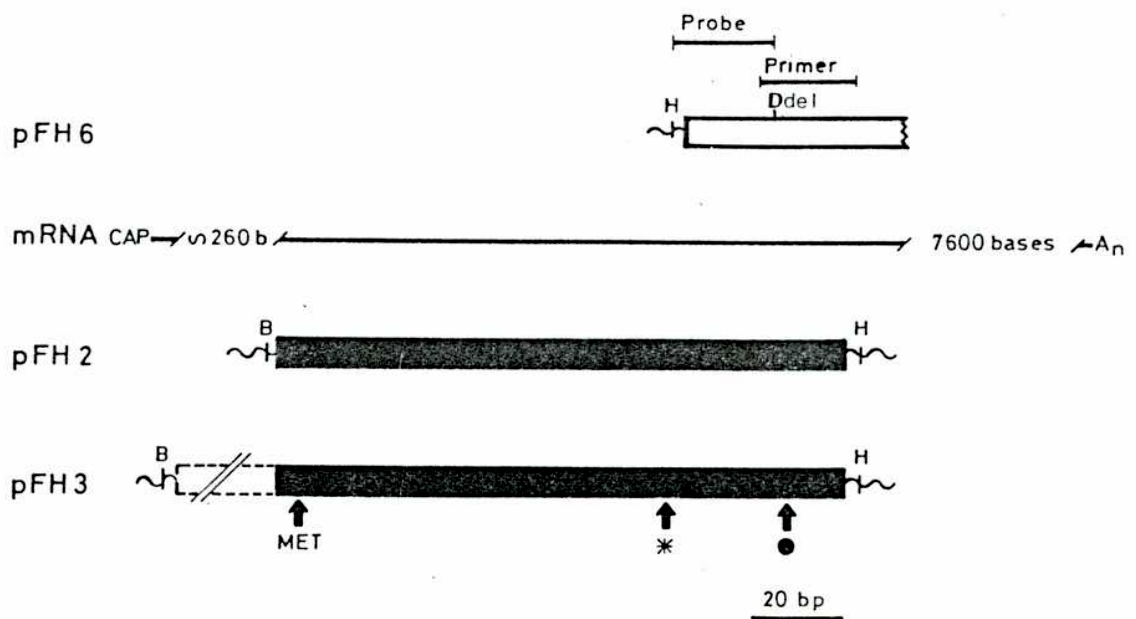


Figura 5. Localización de los insertos de los clones pFH6, pFH2 y pFH3 en el ARNm de la fibronectina. Las líneas onduladas son secuencias del vector. B=Bam HI; H=Hind III. (*): sitio probable de corte por la peptidasa de la señal. (●): sitio de corte entre el propéptido y la fibronectina madura. pFH3 contiene 139 pb de ADN no relacionado con la fibronectina, debido a un artificio de clonado (caja vacía de líneas cortadas).

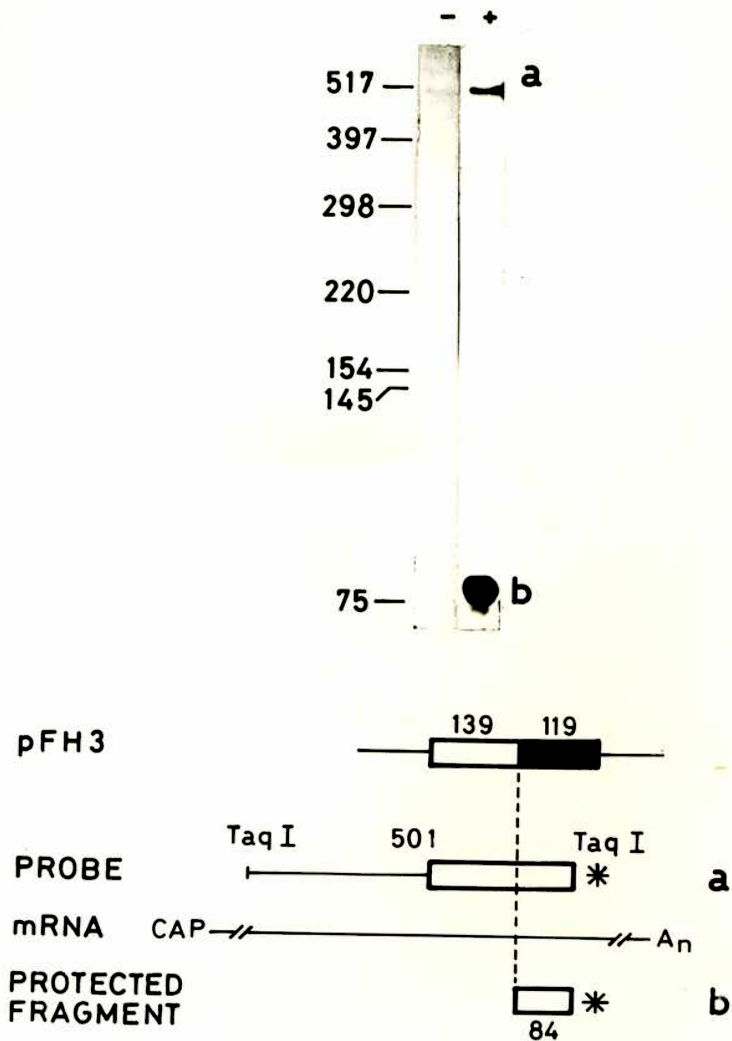


Figura 6. Análisis con nucleasa S1 de los híbridos ADNc/ARN total de células Hs578T. La sonda (probe) es un fragmento Taq I de 501 pb, obtenido de pFH3. El mismo tiene 222 pb de secuencias de inserto (□) más 279 pb de secuencias de vector (▬). - y + indican la ausencia o presencia de ARN en la mezcla de hibridación, respectivamente.

```

      1                               10
      M L R G P G P G L L L L A V Q C L G T
...CAACATGCTTAGGGGTCCGGGGCCCGGGCTGCTGCTGCTGGCCGTCCAGTGCCTGGGGACA

20                               30
/A V P S T G A S /K S K R Q A Q Q M V Q
GCGGTGCCCTCCACGGGAGCCTCGAAGAGCAAGAGGCAGGCTCAGCAAATGGTTCAGC...
      TaqI

```

Figura 7. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del clon de ADNc de fibronectina humana, pFH2. ADN: la secuencia complementaria al *primer* y el sitio Taq I, usado en el mapeo con S1, están subrayados. Proteína: la "ventana de procesamiento" se halla encuadrada entre barras; (*): probable sitio de corte por la peptidasa de la señal; (●) sitio de corte entre el propéptido y la proteína madura.

en base a la siguiente evidencia. En primer lugar, existe una superposición de 35 pb entre pFH2 y pFH6 y, en segundo lugar las secuencias que codifican para aminoácidos, presentes en la sonda Taq I, son protegidas totalmente en los experimentos con nucleasa S1.

Supusimos que el ATG que codifica para la Metionina N° 1 (en la Figura 7) era el codón iniciador (Kozak, 1984; ver Discusión). Por otra parte, el sitio de comienzo de la proteína madura (Q n° 32) había sido determinado previamente por otros autores, por análisis directo de la proteína (Petersen *et al.*, 1983). Por lo tanto, 31 aminoácidos preceden a la glutamina NH₂-terminal y éstos pueden dividirse en dos dominios estructurales diferentes: una secuencia señal y un propéptido.

El propéptido se identificó por análisis de los residuos que se encuentran inmediatamente antes del comienzo de la proteína madura: éstos son en su mayoría básicos (residuos 28-31) y no pueden, por lo tanto, corresponder a la terminación de la secuencia señal y sí, en cambio, al final de un propéptido.

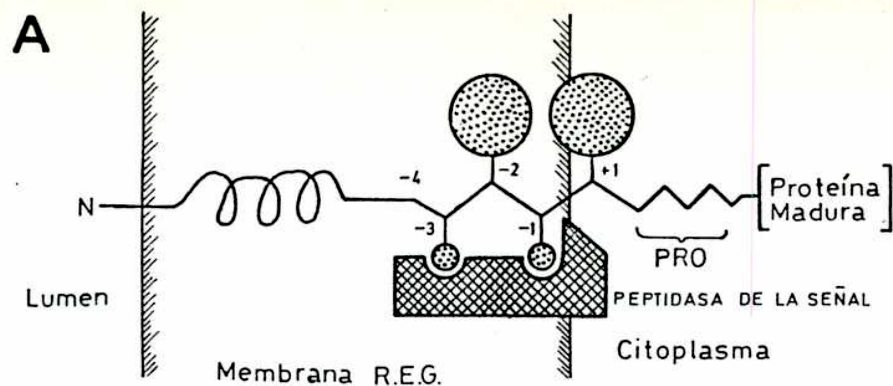
Por otra parte, se reconoce la existencia de una secuencia señal por las siguientes características (Von Heijne, 1983): presencia de un aminoácido cargado dentro de los cinco primeros residuos (R n° 3, en la Figura 7); existencia de una secuencia hidrofóbica (residuos 9-21), y la presencia de otra secuencia característica en el supuesto sitio de corte de la peptidasa de la señal (residuos 22-26; ver más adelante).

Para identificar el límite entre las secuencias pre y pro aplicamos el método descrito por von Heijne (1983), que se basa en el análisis estadístico de la estructura de secuencias señales de muchas proteínas diferentes y en la hi-

pótesis de que una secuencia señal contendría dos informaciones independientes (Figura 8, parte A): una en la forma de un núcleo hidrofóbico, posiblemente responsable de iniciar la exportación del polipéptido y de unirse a la proteína de reconocimiento de la señal (Walter, Ibrahimi & Blobel, 1981); y una segunda en la región -5 a -1 que es la que conferiría especificidad de procesamiento (-1 es el primer aminoácido que se encuentra a la izquierda del sitio de corte de la señal-peptidasa).

El comienzo del núcleo hidrofóbico fue localizado mediante la búsqueda, a partir de la Metionina n° 1, del primer cuádrupleto de aminoácidos que tuviera, por lo menos, tres residuos hidrofóbicos (residuos 8-11), y definiendo una "ventana de procesamiento" entre $i+12$ e $i+20$ (i es el primer residuo en el cuádrupleto). En este caso i corresponde a la G n° 8 y la ventana se encuentra entre la A n° 20 y la K n° 28. Entonces, para cada residuo de la ventana se calculó una probabilidad de procesamiento, por multiplicación entre sí de los valores indicados en la Figura 8, parte B.

Finalmente, el sitio de corte de la señal-peptidasa se reconoció por ser aquél que tenía una probabilidad de procesamiento más alta. En la Figura 8, parte C, se muestran los valores obtenidos para cada aminoácido de la ventana y, como se ve, el más elevado (96) se encuentra entre la A n° 26 y la S n° 27. De esta manera quedan definidas una secuencia señal de 26 aminoácidos y un propéptido de sólo 5 residuos (SKSKR) y, en consecuencia, el producto primario de traducción del ARNm de la fibronectina debe ser procesado dos veces en su extremo NH₂-terminal: 1) entre la secuencia señal y el propéptido y 2) entre el propéptido y la proteína madura.



B

POSICION	PESO ESTADISTICO DEL GRUPO						
	I	II	III	IV	V	G	P
+1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0
-1	0.0	0.0	0.5	0.0	A=80 S=40 C=1.0 T=1.0	4.0	0.0
-2	2.0	1.0	1.0	1.0	0.6	1.0	0.0
-3	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0	1.0	0.0
-4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	4.0	1.0
-5	1.0	1.0	1.0	0.7	1.0	1.0	4.0



Figura 8. Predicción del sitio de corte de la señal-peptidasa en la pre-pro-fibronectina. A. Modelo del complejo proteasa-secuencia señal, según von Hejne (1983). La secuencia señal atraviesa la membrana como una estructura de "hélice + hoja". Los residuos pequeños, neutrales, en las posiciones -1 y -3 encajan en bolsillos de la proteasa y definen, entonces, el sitio de corte entre las posiciones -1 y +1. **B.** Pesos estadísticos de los distintos grupos físico-químicos de los aminoácidos, en las posiciones -5 a +1, usados para calcular la probabilidad de procesamiento. I (residuos aromáticos): F; H; W; Y. II (residuos cargados): D; E; K; R. III (residuos polares grandes): N; Q. IV (residuos hidrofóbicos): F; I; L; M; V. V (residuos neutrales pequeños): A; C; S; T. **C.** Valores calculados, a partir de la tabla B, para todos los sitios posibles de corte por la peptidasa de la señal, dentro de la "ventana de procesamiento" (enmarcada entre barras).

3.2. BUSQUEDA DE UNA TERCER REGION DE SPLICING ALTERNATIVO

Paul & Hynes (1984) y Paul *et al.* (1986) detectaron en la rata por electroforesis bidimensional, por construcción de proteínas de fusión y mediante el empleo de anticuerpos específicos, un cierto número de variantes de la fibronectina. Los isomorfos proteicos corresponden tanto a la forma plasmática como a la celular y no parecen originarse por variabilidad en el procesamiento postraducciona. Por otra parte, su existencia sólo se explica, parcialmente, por la presencia en el pre-ARNm de la fibronectina de dos regiones que sufren splicing alternativo: ED y III CS.

En efecto, en la rata, pueden producirse hasta 6 variantes proteicas por este mecanismo: (ED+, III CS-), (ED+, III CS 95 aminoácidos), (ED+, III CS 120 residuos), (ED-, III CS-), (ED-, III CS 95), (ED-, III CS 120). Como el ED sólo se expresa en la fibronectina celular (ver Introducción), todas estas variantes podrían ocurrir en fibroblastos, pero sólo tres de ellas en hepatocitos. Sin embargo, los trabajos mencionados sugieren la existencia de por lo menos 12 variantes sintetizadas por los fibroblastos y 6 por los hepatocitos. Por lo cual, es posible que otra región del pre-ARNm de la fibronectina sea procesada alternativamente, tanto en fibroblastos como en hepatocitos y justifique, así, los datos mencionados.

La fibronectina humana ha sido analizada menos intensivamente, en este sentido, que su homóloga de la rata y consideramos que la magnitud de los interrogantes planteados requería un estudio más detallado de la estructura del gen. Por esta razón emprendimos la búsqueda de una nueva región de *splicing* alternativo en la fibronectina humana y, con ese

fin, seleccionamos dos regiones del gen para su estudio (cuyos resultados se detallan a continuación, secciones 3.2.1 y 3.2.2).

3 . 2 . 1 . FALTA DE VARIABILIDAD EN UNA REGION DEL PRE-ARN_m. SITUADA ENTRE LA 1° y 2° HOMOLOGIAS DE TIPO III.

Como se dijo anteriormente (ver Introducción y Figura 1), las homologías de tipo III se disponen simétricamente: 14 unidades forman un bloque central flanqueado por dos segmentos no homólogos que lo conectan con las dos unidades de tipo III que se encuentran en los extremos. Uno de estos segmentos no homólogos es el mencionado III CS, que por *splicing* alternativo origina 3 variantes proteicas en la rata y 5 en humanos. Teniendo en cuenta esta simetría se pensó que el segmento no homólogo que separa el bloque central de la unidad de tipo III que se encuentra más cerca del NH₂-término de la proteína podría constituir una nueva zona de *splicing* alternativo.

Con el objeto de evaluar esta suposición se llevaron a cabo experimentos de mapeo con nucleasa S1. Como sondas se emplearon fragmentos de restricción de ADN doble cadena o simple cadena, marcados en su extremo 3':

- Fragmento de ADN doble cadena, Dde I, de 298 pb, marcado en la cadena antisentido (Figura 9).

- Igual fragmento que el anterior, pero de simple cadena.

- Fragmento Sau 96I, de ADN doble cadena, de 423 pb, marcado en las dos cadenas.

Como se observa en la Figura 9, en los controles sin ARN en la mezcla de hibridación las sondas fueron digeridas completamente por la nucleasa S1 (canales con números pares

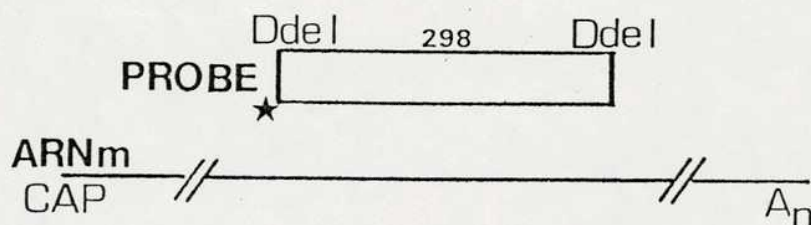
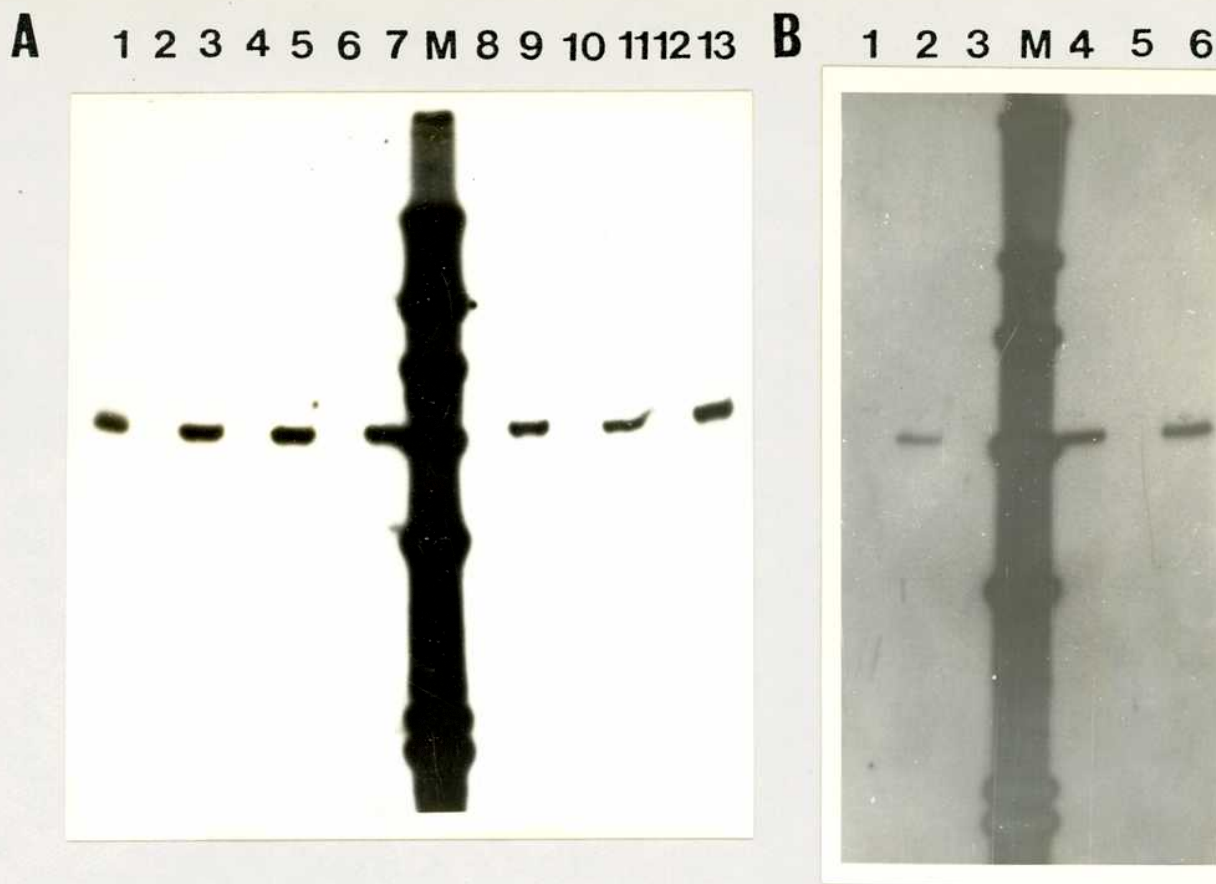


Figura 9. Mapeo con nucleasa S1 de una región del ARNm de la fibronectina. La sonda (*probe*) es un fragmento Dde I de 298 pb (aminoácidos 647-741 en la Figura 25, líneas 16, 17 y 18), marcado en su extremo 3'. Esta sonda es de doble cadena en A y de simple cadena en B. **A:** Canales 3, 5 y 7: Hibridación con ARN total de células Hep 3B a 50°C, 53°C y 55°C, respectivamente. Canales 9, 11 y 13: hibridación con ARN total de células Hs578T a 50°C, 53°C y 55°C, respectivamente. Canales 2, 4, 6, 8, 10 y 12: controles sin ARN. Canal 1: sonda sin tratar. Canal M: marcadores de peso molecular de 1300, 517, 397, 298, 220, 154 y 145 bases. **B:** Canales 2, 4 y 6: hibridación con ARN total de células Hs578T a 37°C, 46°C y 51°C, respectivamente. Canales 1, 3 y 5: controles sin ARN. Canal M: marcadores de peso molecular iguales a los de A.

en A e impares en B) mientras que en presencia de ARN los fragmentos fueron protegidos en toda su longitud (canales 3, 5, 7, 9, 11 y 13 en A y canales pares en B). Por otra parte, no se ven bandas de menor peso molecular con ninguna de las sondas empleadas (Dde I doble cadena, parte A; Dde I simple cadena, parte B; Sau 96I, datos no mostrados), ni utilizando ARN de dos líneas celulares diferentes (células Hep 3B, canales 2-7 en A y 1-6 en B; células Hs578T, canales 8-13 en A), al igual que a varias temperaturas diferentes de hibridación.

Por lo tanto, concluimos que no existen ARNms de fibronectina humana que tengan diferencias estructurales en la zona investigada.

3.2.2. HALLAZGO DE UNA NUEVA REGION DE SPLICING ALTERNATIVO EN EL PRE-ARN_m DE LA FIBRONECTINA

La segunda región del gen que analizamos fue seleccionada por dos motivos: 1) la existencia de datos que indicaban que, en el gen de la rata, había una unidad de homología interna, distinta del ED, que era codificada por un solo exón (R. Hynes, comunicación personal); 2) disponer de un clon genómico que cubría dicha zona, ya que la misma no se encontraba presente en ninguno de los clones de ADNc existentes.

3.2.2.a. Caracterización de una región del gen de la fibronectina

Se analizó un clon genómico de fibronectina humana de 16 kb insertado por medio de *linkers* de Eco RI en un vector derivado del fago λ (λ FN4, Vibe-Pedersen, Kornblihtt & Baralle, 1984). Se cortó el ADN con Eco RI y otras enzimas de

restricción, se separaron los fragmentos en un gel de agarosa, se los transfirió a una membrana de nylon, y se los hibridó con la sonda **A** (descrita en la Figura 10). Basándonos en las bandas visibles en el gel de agarosa (Figura 11, parte I) y en la autoradiografía (Figura 11, canal A) se concluyó que el inserto tenía 4 sitios internos para Eco RI de: 4,75; 4,65; 4,4; 1,5 y 0,65 kb.

Los fragmentos de 4,75 y 4,65 kb casi no se separan en el gel de agarosa y se ven como una banda doble, el fragmento de 1,5 kb es apenas visible y el de 0,65 kb sólo se detectó mediante la radioautografía. El orden de los fragmentos Eco RI y su posición respecto de algunos exones del gen se determinó por hibridaciones secuenciales, con distintas sondas de ADNc (descritas en la Figura 10). Estas últimas fueron diseñadas basándose en la suposición de que todas las homologías de tipo III contenidas en el clon genómico λ FN4 eran codificadas por dos exones cada una (excepto el ED). Estas sondas comprendieron, en algunos casos, una homología completa de tipo III y, en otros, sólo la primera o la última parte de las mismas. En este último caso se intentó que los fragmentos de ADNc fueran lo más cortos posible para garantizar que hibridaran con un solo exón (ver más adelante). Las distintas hibridaciones se realizaron como sigue y, en el orden en que se describen:

- Con la sonda **A**, ya mencionada, que comprende la totalidad de la unidad +1 (Figura 10) y que alumbró dos bandas, de 4,65 kb y 0,65 kb (Figura 11, canal A). La primera corresponde a una de las bandas que forman el duplete que se ve en el gel de agarosa (Figura 11, parte I) mientras que el fragmento de 0,65 kb no había sido detectado previamente. Se interpretó que la sonda **A** hibridó con dos exones y que existe en el intrón que los separa un sitio para Eco RI, cuya

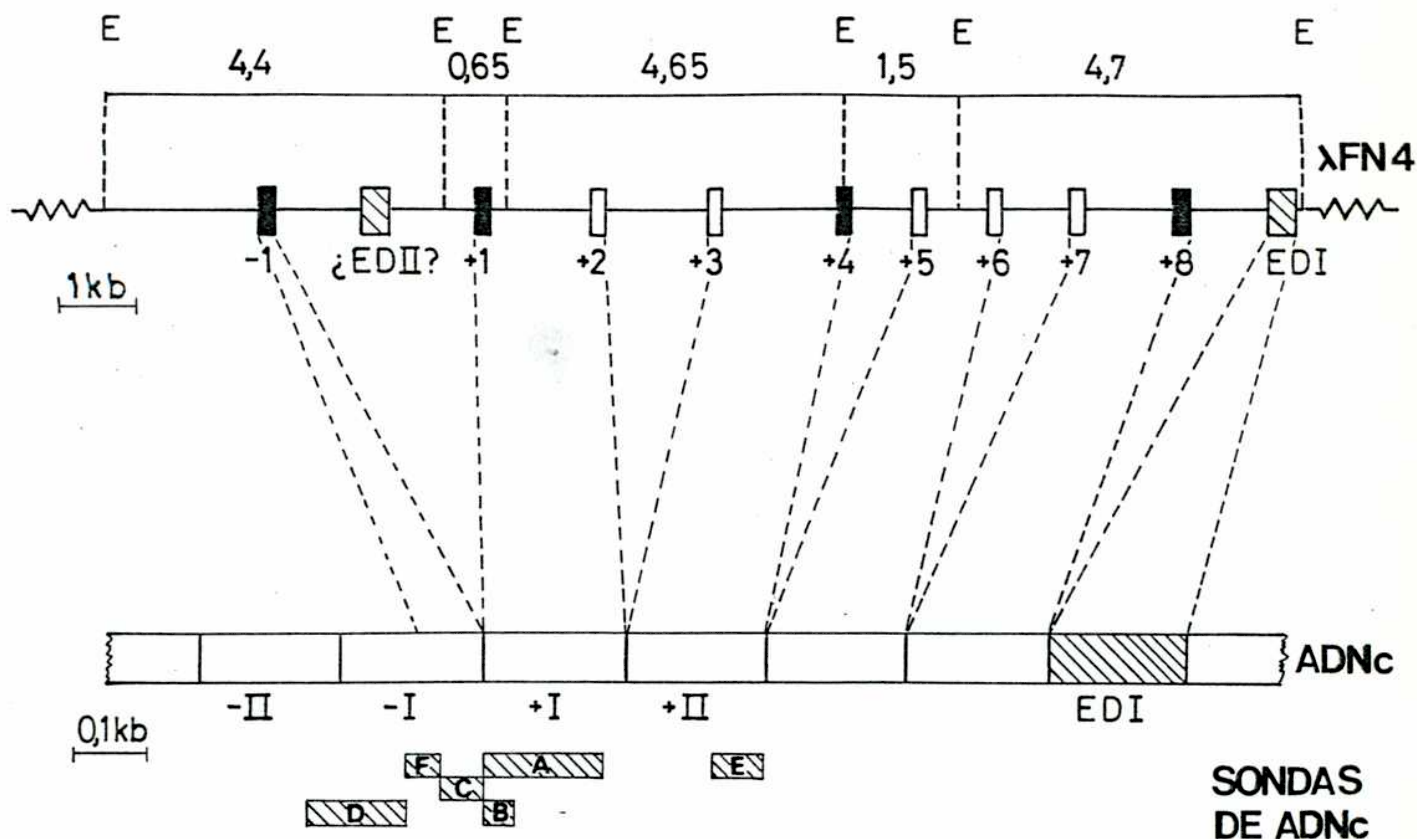


Figura 10 . Mapa del clon genómico de fibronectina λ FN4. Línea superior: cajas negras, exones cuya posición se conoce y que son procesados constitutivamente; cajas rayadas, exones cuya posición se conoce y que son procesados en forma alternativa; cajas blancas: exones cuya ubicación es tentativa. Los exones están numerados con relación al EDII. Las distancias se expresan en kilobases (kb). E= sitios para Eco RI. Línea media: región del ADNc de fibronectina que corresponde a λ FN4. La correspondencia entre el ADNc y los exones contenidos en este clon genómico se indica por líneas punteadas. Las unidades de tipo III contenidas en esta región se han numerado en relación al EDII. Línea inferior: sondas de ADNc que se emplearon en los experimentos mostrados en las Figuras 11 y 12.

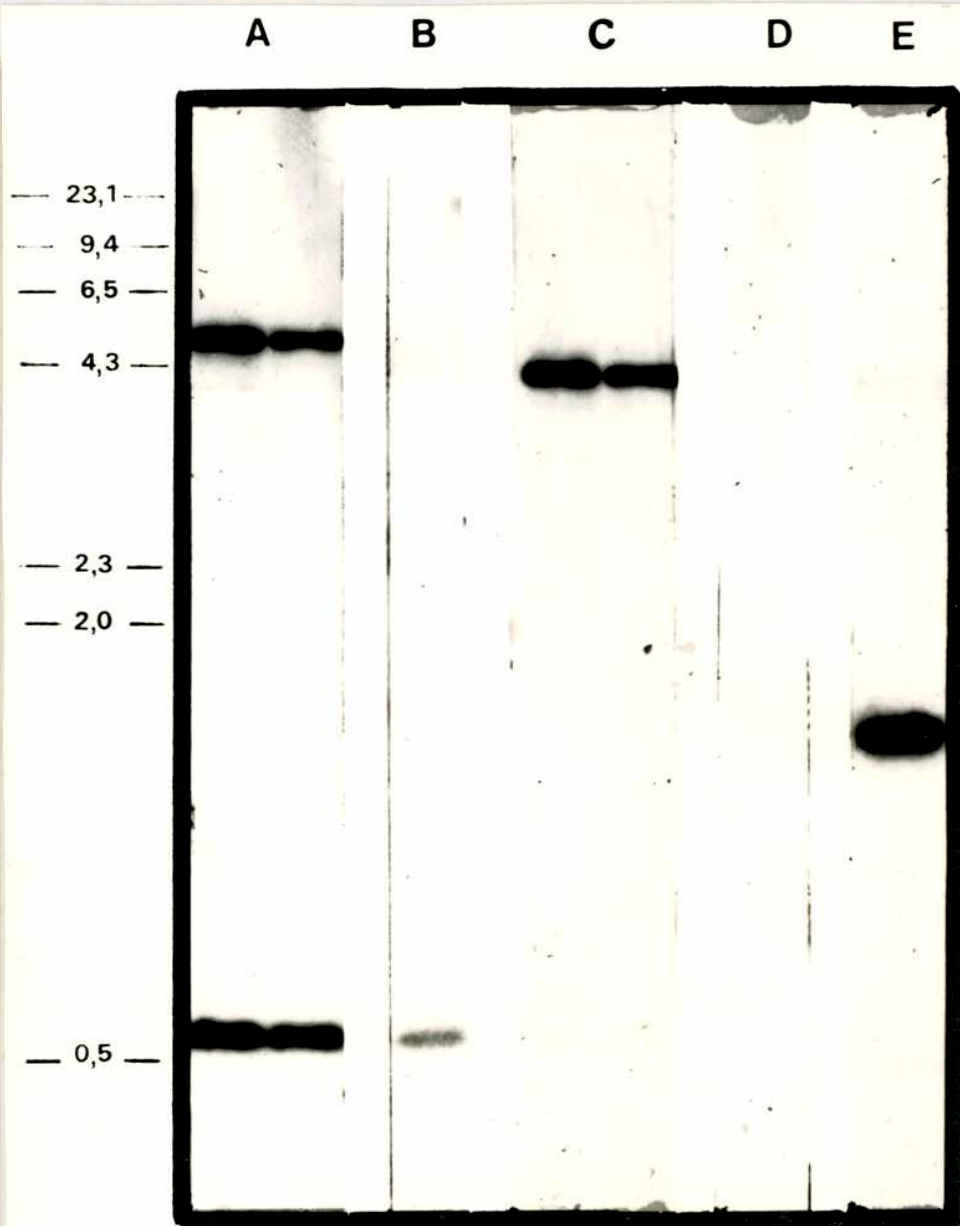
I**II**

Figura 11. **I.** Clon de fibronectina humana λ FN4 cortado con Eco RI y corrido en un gel de agarosa 0,8%. M: marcadores de peso molecular (en kilobases). **II.** Los fragmentos de ADN contenidos en el gel anterior fueron transferidos a una membrana e hibridados con distintas sondas de ADNc. La correlación entre estas últimas y el ARNm se muestra en la Figura 10.

posición exacta no se puede determinar aún. Para ello se empleo la sonda B.

- La sonda **B** comienza junto con la unidad +1 y tiene sólo 41 pb (Figura 10). Por su tamaño es muy probable que corresponda a un solo exón. Como se ve en la Figura 11, canal B, esta sonda sólo revela el fragmento de 0,65 kb, determinando que éste es proximal (se encuentra hacia 5') con respecto a uno de los segmentos de 4,7 kb.

- La sonda **C** es también muy corta y comprende el fin de la unidad -1 (Figura 10). Hibrida con el fragmento de 4,4 kb y determina, por lo tanto, que éste es adyacente y proximal al de 0,65 kb.

- La sonda **D** comprende el comienzo de la unidad -1 y la parte terminal de la unidad -2 (Figura 10). No hibrida con λ FN4 (Figura 11, canal D), lo cual indica que el exón -1 es el más 5' del clon, y que el segmento de 4,4 kb es el más proximal de todos.

- La sonda **E** comprende la parte terminal de la unidad +2 e hibrida con el fragmento de 1,5 kb (Figuras 10 y 11, canal E). De esta manera queda definida la ubicación de este fragmento y se deduce que el otro segmento de 4,7 kb se encuentra en el extremo 3' del clon.

3.2.2.b. Generación de diferentes subclones y análisis de los mismos

En base al mapa construido se subclonaron los fragmentos Eco RI de 4,4 kb y 0,65 kb en el plásmido pAT153PvuII/8, originando los respectivos subclones pFN4E4.4 y pFN4E0.65. Se determinó el mapa de restricción del subclón pFN4E4.4 por corte con distintas enzimas, transferencia a una membrana e hibridación con la sonda **C**, descrita en la Figura 10):

- En primer lugar, mediante corte con diferentes enzimas de restricción se identificó que no había sitios en el

Resultados

inserto para: Mlu I, Bste II, Pst I, Xho I, Ava I, Cla I, Sal I, Bam HI, Bgl II y Sma I (datos no mostrados). Simultáneamente se identificó la existencia de sitios en el inserto para otras enzimas y para realizar un análisis más detallado se hizo lo siguiente.

- Se cortó pFN4E4.4 con las enzimas de restricción que se muestran en la Figura 12 y los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 12, A).

La estrategia para determinar el número de sitios para cada enzima y la orientación de los fragmentos de restricción respecto de un extremo fue la misma en todos los casos y, como ejemplo se describe el procedimiento empleado para localizar los sitios para la enzima Sac I. Se cortó el subclon con Sac I, Eco RI/Sac I y Bam HI/Sac I (Figura 12, parte A, canales S, E/S y B/S, respectivamente). Con Sac I se observan dos bandas: una de 0,55 kb y una de aproximadamente 7 kb. Como no hay sitios para Sac I en el plásmido vector, esto indica que hay dos sitios para esta enzima en el inserto. Con Eco RI/Sac I se observan 4 bandas: la de mayor peso molecular corresponde al vector (3,3 kb) y las otras 3 al inserto (de 2,4; 1,45 y 0,55 kb). De esta manera pueden ubicarse los tres fragmentos en sucesión: el de 0,55 kb tiene extremos Sac I y, por lo tanto, se encuentra en el medio de los otros dos, que tienen extremos Eco RI/Sac I.

Falta, sin embargo, determinar la posición de los mismos respecto a un punto fijo. El corte con Bam HI/Sac I permite obtener esta información. Se observan, en este caso, sólo tres fragmentos: el de 0,55 kb, el de 2,4 kb y otro de 4,5 kb (este último es la suma del vector y del fragmento de 1,45 kb). De esta manera, se demuestra que el fragmento de 2,4 kb es el más cercano al sitio Bam HI del vector, lo cual se comprueba, además, por comparación de la posición del

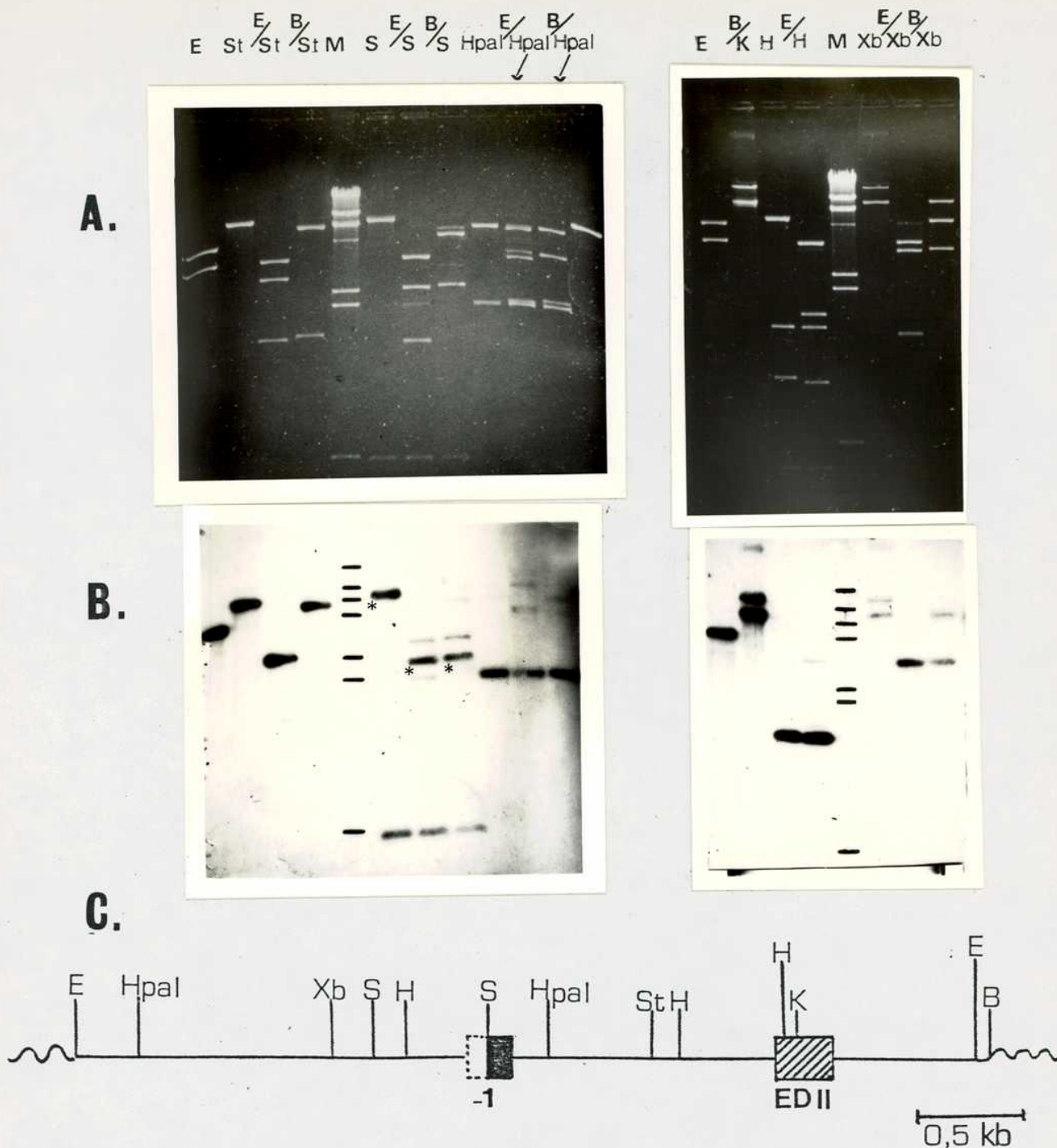


Figura 12. Mapa de restricción del clon pFN4E4.4. A. ADN de este clon fue cortado con diferentes enzimas de restricción y corrido en geles de agarosa 0,8%. E=Eco RI, S=Stu I, B= Bam HI, S=Sac I, K= Kpn I, H= Hind III, Xb= Xba I. M: marcadores de peso molecular (en kb: 23,1; 9,4; 6,5; 4,3; 2,3; 2,0; 0,56). B. Los geles mostrados en A se transfirieron a una membrana y se hibridaron con la sonda F (su ubicación se muestra en la Figura 10). M: marcadores de peso molecular iguales a los de A. C. Mapa de restricción deducido de A y B. \sim : secuencias de vector.

fragmento de 2,4 kb en los canales E/S y B/S: se ve que en realidad éste migra un poco menos en el canal B/S, lo que se explica porque tiene 40 pb más que corresponden a la distancia entre los sitios Eco RI y Bam HI del *polylinker*.

Posteriormente los fragmentos de ADN fueron transferidos a un soporte e hibridados con la sonda **E**, que contiene parte del exón -1 (descrita en la Figura 10 y resultados mostrados en Figura 12, parte B.). De esta manera, se confirmaron las deducciones anteriores, se pudo determinar la ubicación de otros sitios (por ejemplo, los 3 de Hind III), y localizar al exón -1 dentro del subclon.

Esto último se realizó analizando los resultados de la hibridación de la sonda con los sitios Sac I, descritos anteriormente: se ve que sólo en los canales S, E/S y B/S se revelan dos bandas, mientras que en todos los casos restantes sólo una (en algunos canales se observan algunas bandas adicionales que se deben a cortes parciales con algunas enzimas). Esto indica que uno de los sitios Sac I se encuentra dentro del exón -1, lo que coincide con la presencia de un sitio para esta enzima en el ADNc que comprende a la unidad de tipo III -1. El patrón de hibridación revela que este sitio Sac I es el más cercano al sitio Bam HI del vector (la banda Eco RI/Sac I de 1,45 kb no es revelada por la sonda).

Finalmente, faltaba determinar la orientación absoluta del inserto y para ello se realizó una nueva hibridación; esta vez con la sonda **C**, más pequeña y distal al sitio Sac I, con lo cual sólo se detectaron las bandas indicadas por un * en la Figura 12, parte B.

Estos resultados permitieron obtener el mapa que se muestra en la Figura 12, parte C.

Con el objeto de identificar y aislar el hipotético exón, se procedió a dividir el inserto de pFN4E4.4 en tres

segmentos, por corte con la enzima de restricción Hind III, y al subclonado de los mismos en el vector pAT153PvuII/8 (Figura 13, clones pFN4H1.3; pFN4H0.5; pFN4H0.95).

Simultáneamente, un fragmento Sac I-Eco RI de 2,4 kb fue subclonado en el fago M13 (M13FN4 S/E 2.4, que se describe en la Figura 13, B y en la 14 (1). Este último fue sometido a deleciones crecientes a partir del extremo Sac I, mediante T4 ADN polimerasa, con el objeto de disponer de subclones progresivamente más cortos, que abarcaran distintas regiones, y pudieran ser secuenciados a partir de un extremo por el método de Sanger (Figura 14).

Los pasos realizados fueron los siguientes:

- Hibridación del *primer* RD29 con el ADN simple cadena del subclon M13FN4S/E2.4 lo cual forma una corta zona de doble cadena que reconstituye un sitio para Hind III (2).

- Corte con Hind III y eliminación del resto del *primer* por calentamiento (3).

- Digestión con la actividad exonucleásica 3' → 5' de la T4 ADN polimerasa por distintos tiempos y reunión de las distintas fracciones (4).

- Agregado de una cola de poli (A), mediante Terminal Transferasa.

- Nueva hibridación con el *primer* RD29 y ligado mediante T4 ADN ligasa (este *primer* tiene varias dT en su extremo 3' que son complementarias de la cola de poli A; 5).

- Transformación de bacterias *E. coli* con la mezcla de ligado y preparación de ADN simple cadena a partir de 60 placas independientes.

- En la Figura 14, parte B, se muestran algunos de los subclones, corridos en un gel de agarosa, donde se observa la escalera de tamaños. Se determinaron los pesos moleculares aproximados de los mismos y se seleccionó para secuen-

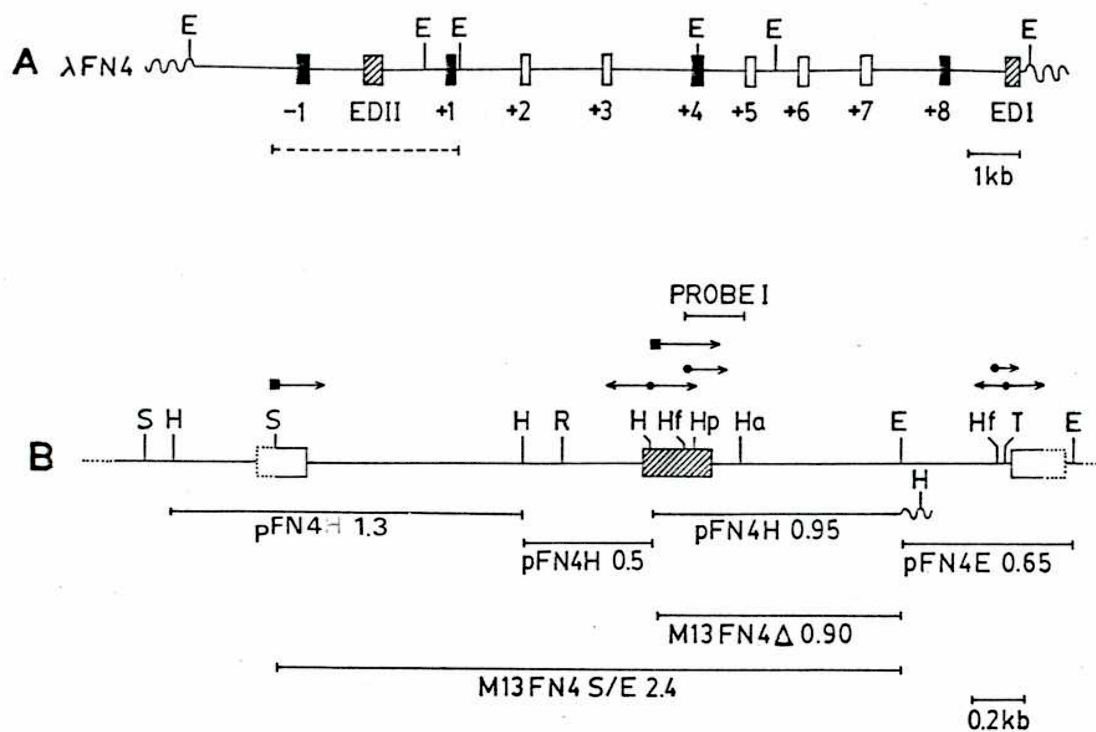


Figura 13. Mapas de los clones utilizados para detectar y secuenciar el EDII. **A.** Mapa de parte del gen de la fibronectina humana, en la región cubierta por el clon λ FN4. Líneas onduladas: secuencias de vector; E, sitios Eco RI; cajas vacías, exones cuya posición exacta y longitud no han sido determinadas; cajas negras y rayadas, exones cuya posición exacta y longitud se conocen; cajas rayadas, exones que son procesados alternativamente. Los exones están numerados con respecto al EDII. **B.** Mapa expandido de la parte subrayada por una línea cortada en A, y subclones empleados para secuenciar el EDII y regiones vecinas. La estrategia de secuenciación se muestra por medio de flechas: $\bullet \rightarrow$, método de Maxam & Gilbert (1980); $\blacksquare \rightarrow$, método de Sanger, Nicklen & Coulson (1977). Los números que se encuentran después del nombre de cada subclon señalan su extensión (en kb). E, Eco RI; H, Hind III; Ha, Hae III; Hf, Hinf I; Hp, Hpa II; R, Rsa I; S, Sac I; T, Taq I. Los sitios de restricción indicados no son todos los existentes en la secuencia. Línea ondulada, secuencias de vector.

ciar por el método de Sanger el subclon M13FN4 Δ 0.90 (Figura 13). En la Figura 13 están representados todos los clones y subclones mencionados, con sus correspondientes mapas de restricción y la estrategia de secuenciación.

3.2.2.c. Un exón ausente en los clones de ADNc

Se supuso que el nuevo exón podría estar rodeado de intrones de tamaño similar y, para localizarlo, se secuenciaron por el método de Maxam & Gilbert, cortas regiones de los distintos subclones, seleccionadas en base a esta presunción. Este procedimiento permitió, finalmente, identificar un marco de lectura abierto de 91 aminoácidos, al que denominamos EDII. Mediante el uso combinado de ambos métodos (Maxam & Gilbert y Sanger) determinamos la secuencia completa de nucleótidos del EDII y los límites intrón/exón del mismo, así como los de los exones flanqueantes (Figura 15, A).

La secuencia del EDII revela que esta región codifica para una homología de tipo III, como se comprueba al compararla con el ED (cuyo nombre cambiamos a EDI) y con la secuencia consenso de aminoácidos de las homologías de tipo III (deducida por análisis de las 16 unidades de este tipo presentes en la fibronectina humana; Figura 15, B). La homología entre el EDII y las otras secuencias mencionadas es de un 30%, que aumenta a un 45% si se considera que distintos aminoácidos hidrofóbicos son equivalentes. Por otra parte, la similitud entre estas secuencias está restringida al primero y último tercio de las mismas, presentando un valle de no homología en su parte media. El EDII presenta, además, un sitio potencial de N-glicosilación: asparagina-serina-serina (indicado con un • en la Figura 15, A), que se suma a los otros 11 identificados en la fibronectina.

Por otra parte, esta nueva homología de tipo III es codificada por un sólo exón, como pudimos deducir de la presencia de secuencias "dadoras" y "aceptoras" de *splicing*. En efecto, se reconocen secuencias de este tipo, similares a las encontradas en otros genes (ver Introducción), tanto en el intrón 5' como en el intrón 3' (respecto del EDII, Figura 15, A). En el intrón 3' identificamos un posible sitio de ramificación (ver Introducción), a -29 bases del exón adyacente (marcado con * en la Figura 15, A). En cambio, en el intrón 5' no se reconoce ninguna secuencia consenso para sitio de ramificación; se observa, sin embargo, una notable hilera de pirimidinas (interrumpida por algunas purinas) que se extiende desde -70 a -10 (Figura 15, A).

Tanto el intrón 5' como el intrón 3' interrumpen las secuencias codificantes, entre la 1° y la 2° base de un codón, lo que ocurre también con otros intrones que separan homologías de tipo III (Odermatt, Tankun & Hynes, 1985).

3.2.2.d. Expresión del EDII en los ARNms de la fibronectina

Los resultados anteriores sugieren que el EDII es un exón y que, por lo tanto, esta región podría ser incluida en ARNms de la fibronectina. Sin embargo, ninguno de los clones de ADNc de fibronectina aislados hasta el presente contiene esta secuencia.

Por lo tanto, para investigar la expresión del EDII realizamos experimentos de mapeo con nucleasa S1. Para ello utilizamos una sonda genómica, marcada con ³²P, dentro de la secuencia EDII, que hibridamos con ARNms provenientes de distintas fuentes. Esta sonda es un fragmento de restricción Hinf I/Hae III del clon pFN4H0.95, marcado en su extremo Hinf I, que tiene 220 pb, de los cuales 118 corresponden al supuesto exón y 112 pb al intrón 3' (Figuras 13 B y 16, aba-

jo). Cuando esta sonda fue hibridada con ARN de fibroblastos de pulmón WI38 (datos no mostrados), de células de carcinoma mamario Hs578T (Figura 16, canal 1) y de células de teratocarcinoma (canal 3) se observó una banda protegida por el ARNm (banda A), que no se observa en el control sin ARNm (canal 2). Este resultado indica la existencia de ARNms de fibronectina que contienen la región EDII. Para determinar el tamaño exacto de la banda y, por lo tanto confirmar experimentalmente el sitio predicho de terminación del exón y comienzo del intrón, la misma sonda fue secuenciada por el método de Maxam & Gilbert y analizada en el mismo gel y en paralelo con el experimento anterior (canales G+A y G; los canales T y T+C no se muestran). Se comprueba que el fragmento protegido tiene 118 nucleótidos y cubre la distancia existente entre el sitio Hinf I y la base donde se predijo que terminaba el exón.

3.2.2.e. Ausencia del EDII en los ARNms de hígado.

Cuando similares experimentos con nucleasa S1 se llevaron a cabo con ARN de hígado-humano, no se detectaron bandas protegidas, aún después de 10 días de exposición (Figura 16, canal 5), lo cual indica que el hígado produce fibronectina que carece de la región EDII. Para asegurar la calidad de la preparación de ARN hepático se utilizó como control positivo una sonda de ADNc, correspondiente a otra región de la fibronectina. Dicha sonda tiene 135 pb, de las que 42 corresponden a secuencias de vector. Esta se hibridó con la misma preparación de ARN hepático (Figura 16, canal 8) y se observó la presencia de una única banda protegida (banda B), del tamaño esperado, que no está presente en el control sin ARN en la mezcla de hibridación (en este último se ve una banda que corresponde a reasociación parcial de la sonda, canal

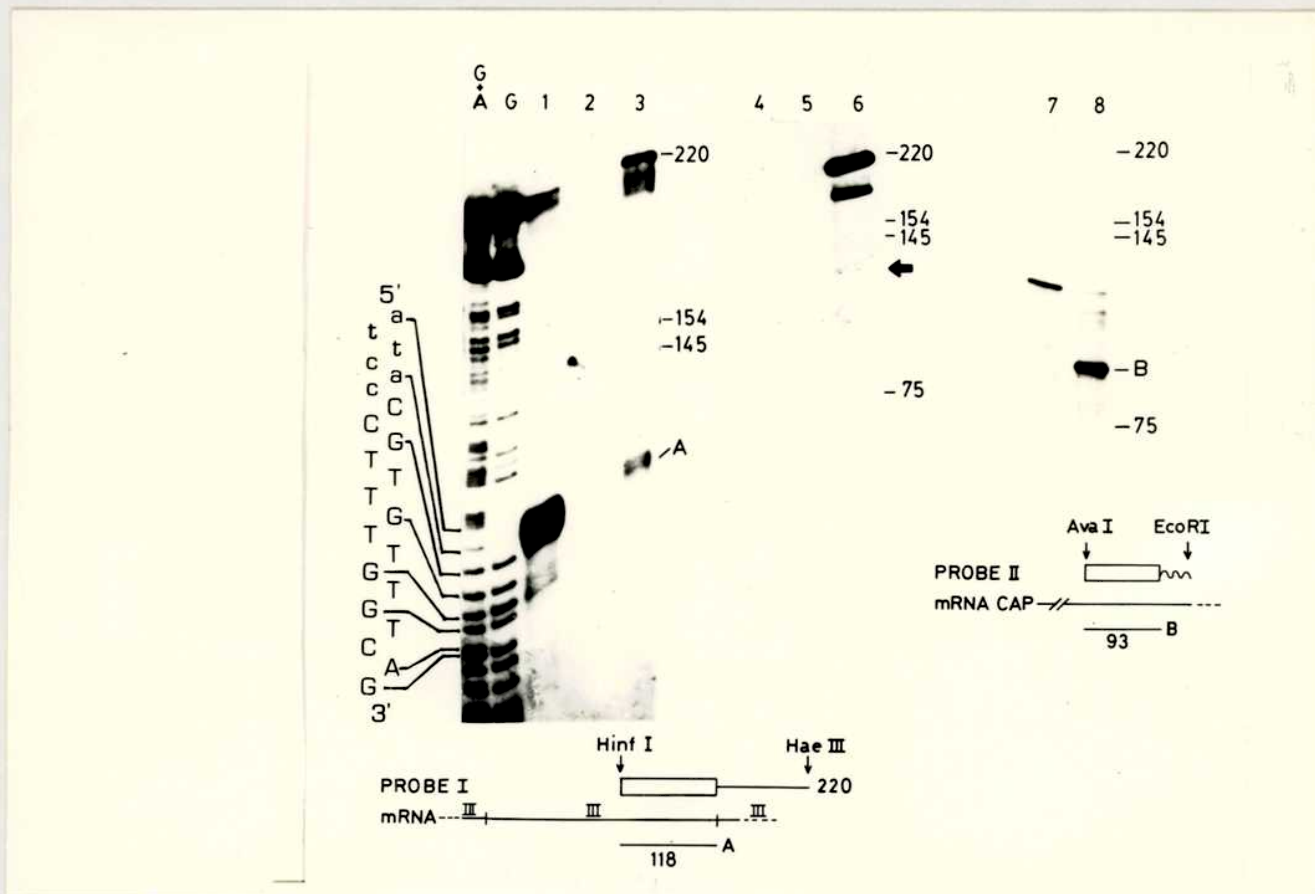


Figura 16. Análisis de la expresión del EDII, mediante mapeo con nucleasa S1. Izquierda y Centro: La sonda I (canales 1-6) es un fragmento de 220 pb, Hinf I-Hae III, obtenido de pFN4HO.95, cuya ubicación se muestra en la Figura 13 B. Canales G+A y G: Degradaciones del *probe* I por el método de Maxam & Gilbert (1980). Canales 1, 3 y 5: Hibridación del *probe* I con ARN de células Hs578T, de teratocarcinoma y de hígado, respectivamente. Canales 2 y 4: Controles sin ARN. Canal 6: *probe* I sin tratar. (Puede verse una banda espúrea de menor peso molecular que no interfiere con el experimento). Derecha: La sonda II es un fragmento Ava I-Eco RI, de 135 pb (residuos 1-38 en la Figura 25; líneas 1, 2 y 3), que fue hibridado con ARN de hígado (canal 8). El canal 7 es un control sin ARN. Las sondas y los fragmentos de ADN protegidos por el ARNm se muestran en diagramas, debajo de las figuras. La correspondencia entre los diagramas y los geles es indicada por letras. La flecha indica la posición esperada de la banda A en el experimento con ARN de hígado (canal 5). La radioautografía de la izquierda se ha sobreexposto para mostrar la banda A en el canal 3.

7). Este control demuestra que la preparación de ARN hepático contiene ARNm de fibronectina y comprueba, por lo tanto, la especificidad de tejido del proceso de *splicing* alternativo. Por otra parte, la sonda utilizada como control positivo contiene la secuencia señal de la fibronectina de tipo celular y el hecho de que sea totalmente protegida por el ARNm de hígado demuestra que esta secuencia es la misma en los dos tipos de fibronectina: celular y plasmática.

Los resultados del análisis con nucleasa S1 indican, en su conjunto, que el EDII constituye una tercera región de variabilidad en la fibronectina, que es procesada por *splicing* alternativo. Este último es específico de tipo celular ya que los fibroblastos sintetizan ARNms con EDII y sin EDII, mientras que los hepatocitos sintetizan sólo ARNms que carecen del EDII.

3.3. CONSTRUCCION DE UN ADNc DE FIBRONECTINA HUMANA DE LONGITUD COMPLETA

Como consecuencia del trabajo realizado en otros laboratorios y en el nuestro, disponemos de clones genómicos y de ADNc que, en su conjunto, codifican para la totalidad de la pre-pro-fibronectina. Con el objeto de crear una herramienta útil para estudiar algunos aspectos de la relación estructura-función de esta proteína (ver Discusión), procedimos a diseñar una estrategia que permitiera ensamblar los clones mencionados en un clon único: es decir, construir un ADNc de fibronectina humana de longitud completa.

El diseño experimental debió tener en cuenta los siguientes factores:

- La mayoría de los clones de ADNc se hallaban insertados en el plásmido pAT153PvuII/8. Este vector es adecuado

para clonar fragmentos de ADN, de extremos romos, en su sitio Pvu II, pero su *polylinker* tiene sitios de restricción para sólo 5 enzimas. Esta característica hace virtualmente imposible realizar varios pasos sucesivos de subclonado en este plásmido, ya que los sitios de restricción mencionados son insuficientes. Por esta razón, nos vimos obligados a trasladar varios de los insertos de ADNc de fibronectina a un vector más apropiado, como el plásmido pUC18 que tiene 13 sitios únicos para enzimas de restricción en su *polylinker*.

- La superposición entre los distintos clones de ADNc es en general muy corta (100 a 200 bases en promedio), lo que es consecuencia de que su síntesis se produjo por el método de la "caminata del ARNm" (ver a comienzos de 3.1).

- Los clones de ADNc que cubren el extremo 5' del ARNm son relativamente cortos y no existen sitios de restricción adecuados para unirlos, lo que requirió realizar cortes parciales con enzimas de restricción para obtener los fragmentos de ADNc necesarios y la síntesis química de dos oligonucleótidos.

Los clones empleados se describen en la Figura 17 y fueron los siguientes:

- pFH60, clon de ADNc, contenido en pUC18 (Obara *et al.*, 1987),

- pFH51, pFH134, pFH6, clones de ADNc, contenidos en pAT153PvuII/8 (Kornblihtt *et al.*, 1985),

- p λ HFPst1.0, clon genómico, contenido en pGEM- 4 (Dean, Bowlus & Bourgeois, 1987).

La estrategia utilizada en la construcción del clon de ADNc de longitud completa se describe en las Figuras 17, 18 y 19. Las etapas llevadas a cabo son 6 que pueden agruparse en tres secciones: **1.** Obtención del 75% terminal del clon; **2.** Generación del 25% inicial del mismo. **3.** Ensamblado de

los productos finales de 1 y 2. A continuación describiré, en detalle, los distintos pasos que se llevaron a cabo.

3.3.1. OBTENCION DEL 75% TERMINAL (3') DEL CLON

Nomenclatura: Los clones preexistentes p λ HFPst1.0, pFH134, pFH6, y pFH51 llevan el nombre puesto en su origen, el cual no indica ni su posición ni la longitud de su inserto. El nombre del clon pFH60 indica que comprende el 60% terminal (hacia 3') del ARNm de fibronectina. Los nombres de los clones nuevos, generados en el presente trabajo señalan el tipo de vector, por una parte, y la correlación del inserto con el ARNm de la fibronectina, por otra (según las coordenadas de la Figura 17).

3.3.1.a. Ensamblado de pFH60 y pFH51

En primer lugar, se digirió pFH60 con las enzimas Nco I y Hind III. Se separaron, luego, los fragmentos producidos, por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se cortó un trozo de gel que contenía el inserto de pFH60 (de unos 5500 pb).

Por otra parte, pFH51 fue cortado con las mismas enzimas y defosforilado con CIP. Finalmente, el inserto de pFH60 se ligó directamente a pFH51, es decir, que en ningún momento se extrajo el ADN del trozo de agarosa. Los recombinantes fueron analizados e identificados por corte de minipreparaciones de ADN con enzimas de restricción. Así se obtuvo un nuevo clon, de unos 5700 pb, que denominamos pAT25-100 (Figura 17, a). Este nombre indica cuál es el vector (en este caso, pAT153PvuII/8) y que éste tiene un inserto de fibronectina que se extiende desde la posición 25 a la 100; es decir, comprende el 75% 3' del ARNm.

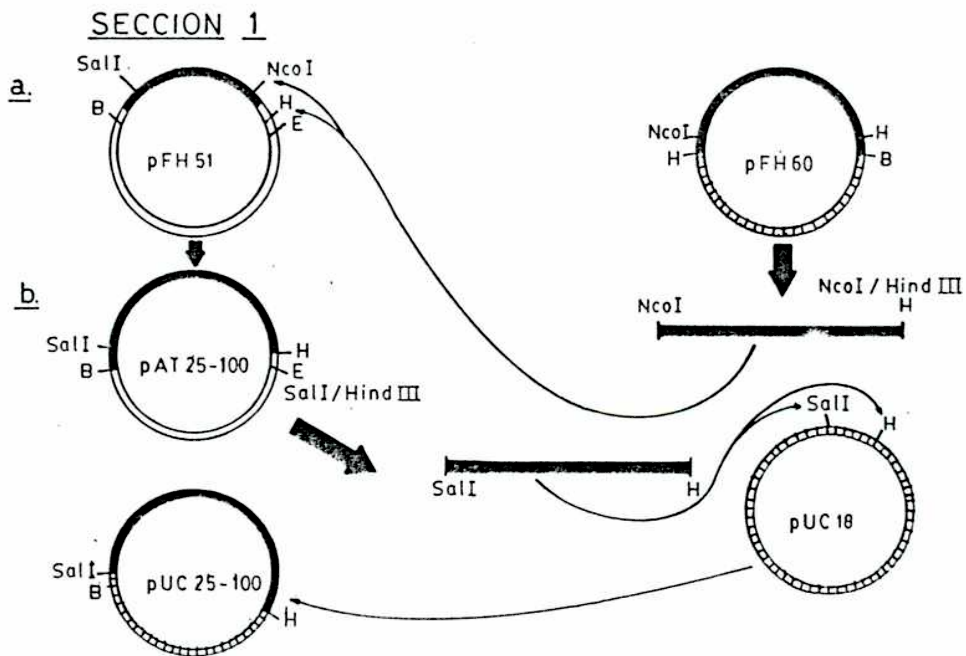
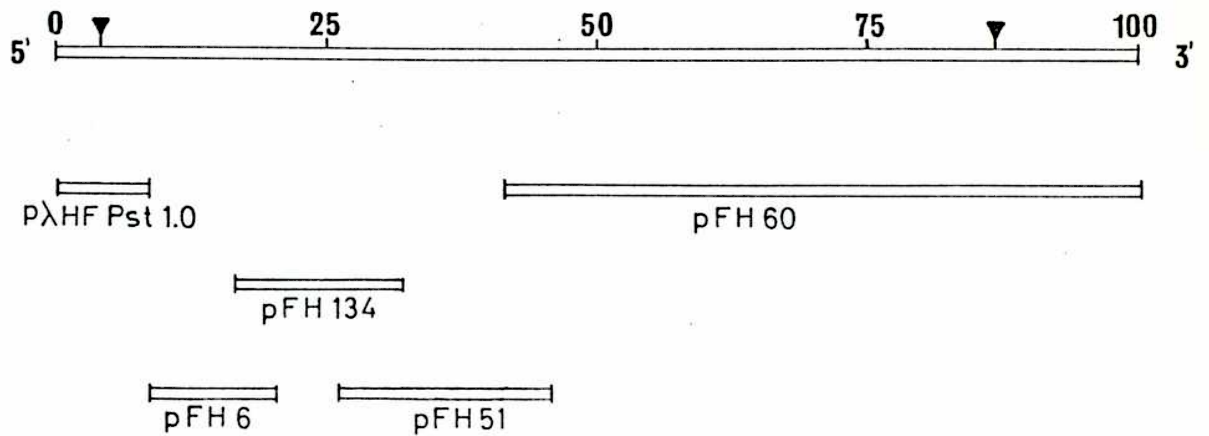


Figura 17. Obtención del 75% terminal (3') del clon de ADNc de longitud completa de fibronectina humana. Los pasos de construcción se describen en el texto (ver 3.3.1).

▬ : secuencias de pAT153PvuII/8.

▬▬▬▬ : secuencias de pUC18.

▬▬▬▬ : secuencias de fibronectina.

B = Bam HI, H = Hind III, E = Eco RI.

SECCION 2

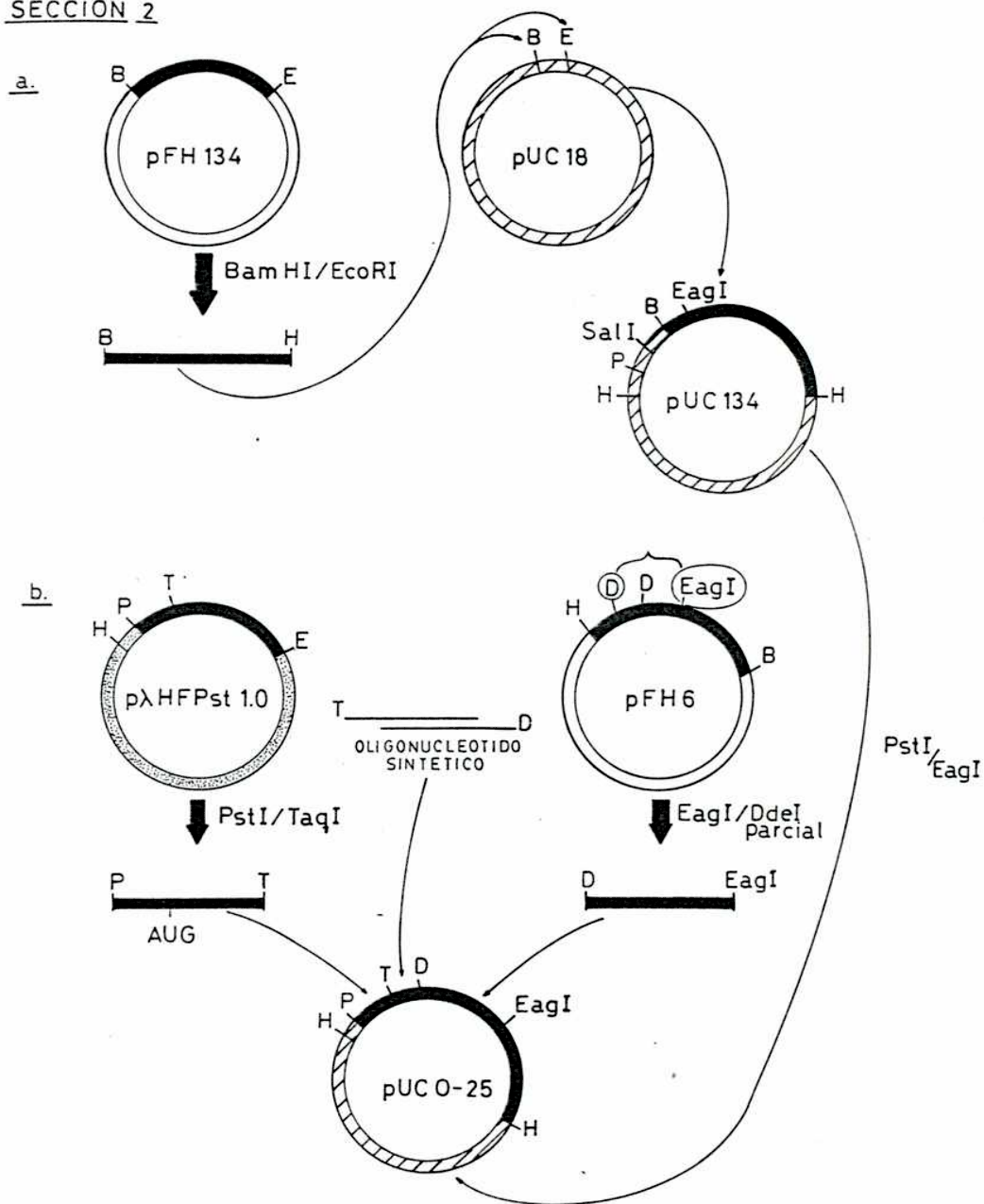


Figura 18. Obtención del 25% inicial (5') del clon de ADNc de longitud completa de fibronectina humana. Los pasos de construcción se describen en el texto (ver 3.3.2).

▬ : secuencias de pAT153PvuII/8.

▬ : secuencias de pUC18.

▬ : secuencias de fibronectina.

▬ : secuencias de pGEM-4.

B = Bam. HI, E = Eco RI, H = Hind III, P = Pst I, T = Taq I, D = Dde I.

Sección 3

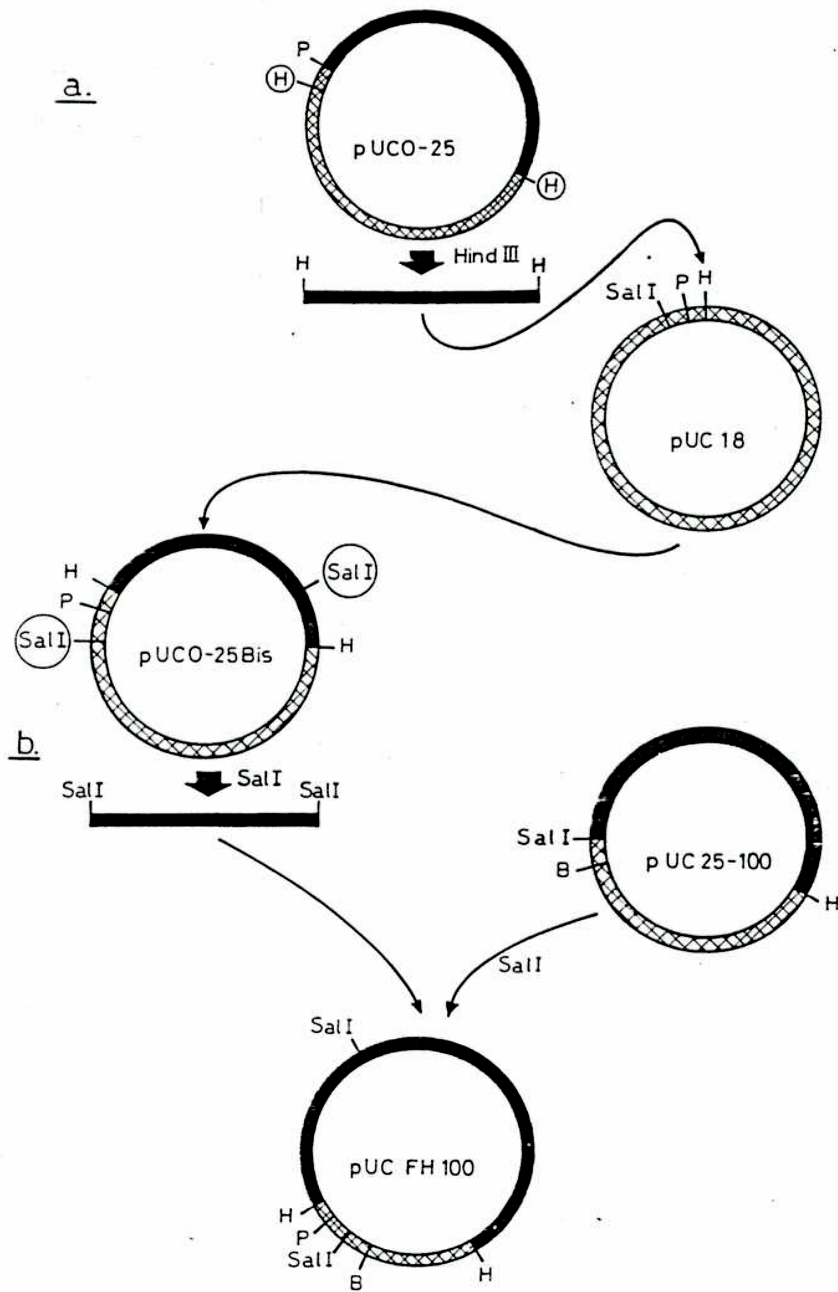


Figura 19. Construcción de un clon de ADNc. de fibronectina. de longitud completa.

▤ : secuencias de pUC18.
 ▬ : secuencias de fibronectina.
 H = Hind III, P = Pst I, B = Bam HI.

3.3.1.b. Traslado del inserto de pAT25-100 al vector pUC 18

Se digirió pUC 18 con Hind III y Sal I y se eliminaron los fosfatos de los extremos 5' con CIP. Por otra parte, se cortó pAT25-100 con las mismas enzimas, con lo que se obtuvieron dos fragmentos de ADN: uno de 6200 pb, correspondiente al inserto, y otro perteneciente al vector pAT153PvuII/8. Estos dos fragmentos se ligaron en la misma mezcla con pUC18. Para evitar el religado de pAT153PvuII/8 con su inserto se introdujo en la mezcla de incubación la enzima Cla I, que corta al plásmido pAT, pero no afecta al inserto de fibronectina ni a pUC18, ya que estos últimos no poseen sitios para esta enzima (ver Tabla V).

Los resultados del tubo 1 indican el *background*, es decir pUC18 incompletamente cortado o defosforilado, el cual no es modificado por Cla I (tubo 2) ya que este plásmido no posee secuencias reconocidas por dicha enzima. Las colonias obtenidas con la muestra 3 indican la reconstitución de pAT25-100, a partir de dos fragmentos presentes en la mezcla de incubación: inserto y vector. El tubo 4 comprueba que la enzima Cla I, en las condiciones utilizadas, impide casi totalmente la reconstitución de pAT25-100, por corte en el vector. Los tubos 5 y 6 revelan que a concentraciones relativamente bajas de pAT25-100 se forma predominantemente pUC25-100: es decir, el inserto de fibronectina ensamblado en pUC18 (ya que la diferencia entre el tubo con ClaI y sin ClaI es muy escasa, lo que señala que la gran mayoría de recombinantes obtenidos no tienen secuencias para ClaI). Los tubos 7 y 8 indican, en cambio, que a concentraciones mayores de pAT25-100 lo que predomina es la reconstitución de este clon, como lo indica nuevamente la diferencia existente entre la muestra sin Cla I y la que contiene Cla I.

Tabla V. Construcción de pUC25-100^a

	1	2	3	4	5	6	7	8
pUC18 ^b (10 ng/μl)	1	1			1	1	1	1
pAT25-100 ^b (50 ng/μl)			1	1	0,2	0,2	1	1
T ₄ ADN Ligasa (6 U/μl)	1	1	1	1	1	1	1	1
Cla I		+		+		+		+
Colonias	97	102	478	3	721	602	1500	125

- a. Se incubaron los tubos + con 10 unidades de Cla I, a 37°C, durante 60 min; luego se agregó T₄ ADN Ligasa y se incubó a 16°C, durante 5 horas; por último se añadieron otras 10 unidades de Cla I y se incubó durante 60 min, a 37°C. Con 1/5 de la mezcla de ligado se transformaron bacterias *E. coli* y las transformantes se seleccionaron por siembra en medio de cultivo sólido, conteniendo 100 μg/ml de Ampicilina (sólo se contaron 1/5 de las bacterias transformadas). Las condiciones del ensayo de ligado fueron: Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 10 mM; espermidina 1 mM; en 50 μl de volumen de reacción. Todos los volúmenes están expresados en μl.
- b. pUC18 y pAT25-100 fueron cortados, previamente, con Hind III y Sal I. pUC18 fue, además, defosforilado con CIP.

Se hicieron minipreparaciones de ADN plasmídico de las colonias obtenidas con la muestra 6. Mediante corte del mismo con enzimas de restricción, se observó que un 80% de los clones eran pUC25-100.

3.3.2. OBTENCION DEL 25% INICIAL (5') DEL CLON

3.3.2.a. Traslado del inserto de pFH134 a pUC18

Se cortó pFH134 con Bam HI y Eco RI y los dos fragmentos producidos, inserto y vector, se separaron por electroforesis en gel de agarosa. La banda de ADN de fibronectina se electroeluyó del gel por el método descrito en 2.8.1., y se ligó a pUC18 (previamente tratado con CIP). De esta manera se obtuvo un nuevo recombinante que denominamos pUC134.

3.3.2.b. Generación del clon pUC0-25

En esta etapa se procedió a la preparación de 4 fragmentos de ADN diferentes:

- Vector pUC134, cortado con Pst I y Eag I (Xma III) y defosforilado con CIP.

- Fragmento Pst I/Taq I (270 pb) de pλHFPst1.0. Se cortó el clon mencionado con Pst I y Taq I y los fragmentos obtenidos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Una alícuota de la preparación se marcó, por *filling in* en el sitio Taq I y se utilizó como trazador para hacer visibles los fragmentos por radioautografía. Posteriormente, se cortó la banda conteniendo el fragmento de interés y se eluyó de la manera usual.

- Oligonucleótido de ADN doble cadena, Taq I y Dde I.

Se sintetizaron químicamente y se purificaron dos oligonucleótidos de 19 y 20 bases (ver Materiales y Métodos); luego se hibridaron para formar un corto segmento de ADN doble cadena con la siguiente estructura:

Taq I CGAAGAGCAAGAGGCAGGC Dde I
TTCTCGTTCTCCGTCCGAGT

Su grado de pureza se verificó por marcación, con PNK, de su extremo 5' y posterior ligado con T4 ADN ligasa. Los productos se corrieron en gel de poliacrilamida (Figura 20), donde se observa la presencia de 3 bandas: la inferior corresponde a los oligonucleótidos en su forma de ADN simple cadena, la banda que se encuentra inmediatamente por encima de la anterior representa al monómero de ADN doble cadena, mientras que la banda que menos ha migrado corresponde a un dímero, de ADN doble cadena, que es el resultado esperado en este caso, ya que los sitios Dde I no pueden ligar entre sí por no ser compatibles y la unión de los oligonucleótidos doble cadena solo se produce a través del sitio Taq I.

Fragmento Dde I/Eco RI (694pb) de pFH6. En primer lugar se aisló un fragmento de 740 pb Eco RI/Eag I de pFH6, por electroforesis en gel de agarosa y electroelución. Posteriormente, se realizaron cortes parciales con Dde I, con carácter analítico, hasta encontrar las condiciones adecuadas. Se procedió entonces al corte parcial preparativo con esta enzima, obteniéndose así el fragmento Dde I/Eag I de 694 pb.

Los 4 fragmentos descritos se ligaron conjuntamente y en las condiciones habituales. Los recombinantes se analizaron por corte con distintas enzimas de restricción y secuenciación por Maxam & Gilbert de las zonas donde se insertaron los oligonucleótidos sintéticos, para comprobar la inexistencia de artificios de clonado (datos no mostrados). El nuevo clon obtenido se denominó pUC0-25.

SIN CON
LIGASA LIGASA

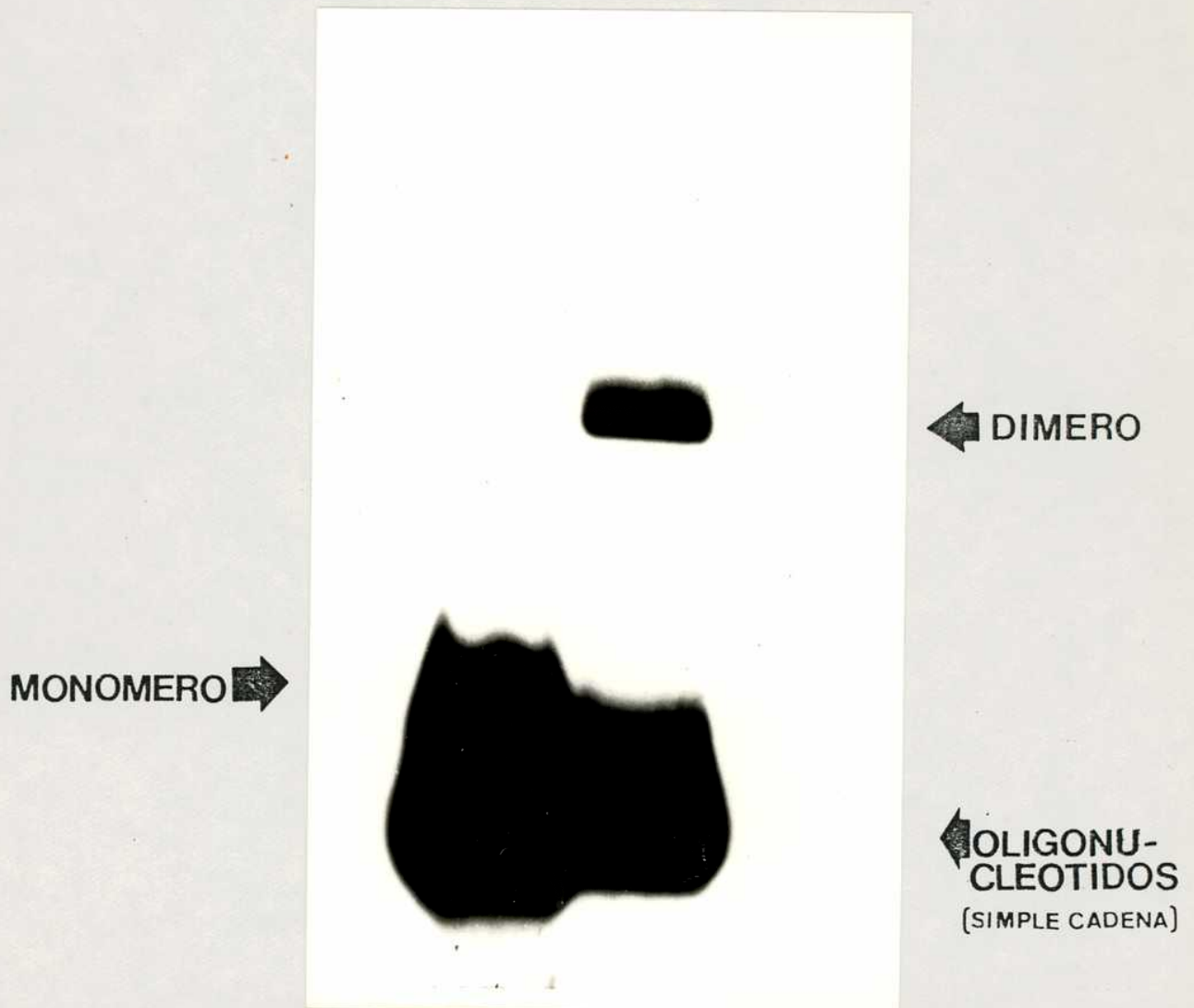


Figura 20. Ligado del oligonucleótido de ADN doble cadena. Taq I-Dde I. Dos oligonucleótidos de 19 y 20 bases, parcialmente complementarios (ver 3.3.2.b) se calentaron a 60°C, durante 10 min y, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente para que hibridaran. A continuación se los marcó con ATP γ ³²P y PNK y posteriormente se incubó con T₄ DNA ligasa, en las condiciones apropiadas. Los productos de la reacción fueron separados en un gel de poliacrilamida 12% (en *buffer* TBE 0,5X) y, finalmente, se realizó una radioautografía con 16 horas de exposición.

3.3.3. ENSAMBLADO DE LOS PRODUCTOS FINALES DE LAS DOS ETAPAS ANTERIORES

3.3.3.a. Traslado del inserto de pUC0-25 al sitio Hind III de pUC18.

Este paso es necesario para generar un sitio Sal I y poder realizar la siguiente y última etapa. Se cortó pUC0-25 con Hind III, se corrió en un gel de agarosa y el inserto se eluyó según técnicas descriptas anteriormente. Este fragmento se insertó en pUC18, previamente cortado con Hind III y defosforilado. El análisis de los recombinantes se realizó de la manera usual y se obtuvo así pUC0-25 BIS.

3.3.3.b. Obtención del clon de ADNc de fibronectina humana de longitud completa.

Se cortó pUC0-25 BIS con la enzima Sal I y se extrajo el inserto por electroforesis en gel de agarosa y elución según técnicas convencionales. Este fragmento se ligó a pUC25-100, previamente cortado con Sal I y defosforilado con CIP. Los recombinantes fueron analizados por corte con enzimas de restricción y el nuevo clon obtenido se denominó pUCFH0-100.

En la Figura 21 se muestran los productos finales de las etapas 1, 2 y 3, cortados con distintas enzimas de restricción, para su mejor identificación.

Cabe señalar que este clon de 7630 pb codifica para sólo uno de los 20 polipéptidos posibles de la fibronectina humana (EDII-; EDI-; III CS 89), cuya estructura se indica en la Figura 23 con un asterisco.

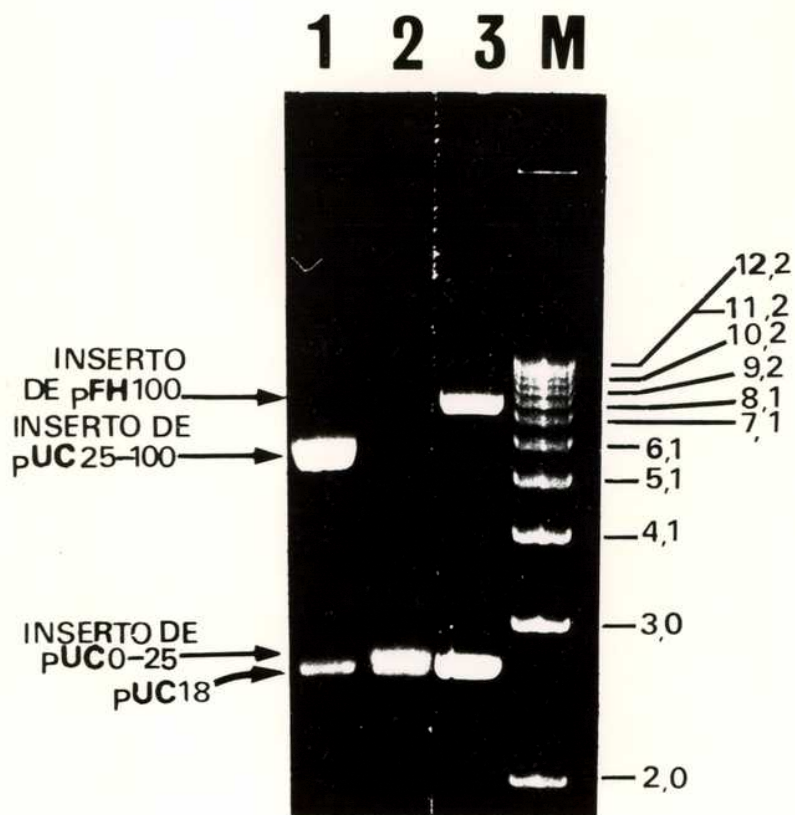


Figura 21. Clones de ADNc de fibronectina humana, analizados por digestión con enzimas de restricción. Se muestran los productos finales correspondientes a las secciones 1, 2 y 3 de construcción del ADNc de longitud completa (descritos en las figuras 17, 18 y 19, respectivamente). Los clones fueron cortados con las enzimas que se mencionan a continuación y los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 0,7%. 1: pUC25-100 digerido con Hind III y Sal I. 2: pUC0-25 cortado con Pst I y Cla I. 3: pFH 100 cortado con Hind III. M: marcadores de peso molecular (valores expresados en kb).

Mediante la síntesis de ADNc, hemos investigado la secuencia del extremo 5' del ARNm de la fibronectina. Reconocimos, de esta manera, la presencia de un ATG ubicado 31 aminoácidos antes del comienzo de la proteína madura. Nuestros datos no prueban que este ATG codifique la metionina n° 1. Sin embargo, la secuencia que se encuentra inmediatamente antes del mismo, CAAC, es similar a la secuencia consenso que rodea a los codones de iniciación funcionales (Kozak, 1984). En particular, es destacable la presencia de una adenina en la posición -3 (ver Figura 6) ya que esta base se encuentra muy conservada en los codones iniciadores de los eucariotes. Recientemente, Kozak (1986) y Lutcke *et al* (1987) han demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* que el nucleótido de la posición -3 parece regular la eficiencia de la iniciación de la traducción en sistemas animales y que una A en esa posición es la base mas efectiva.

Con posterioridad a la publicación de nuestros resultados, Dean, Bowlus & Bourgeois (1987) aislaron un clon genómico de fibronectina humana que incluye la región 5' no codificante y las secuencias que describimos en este trabajo. La información aportada por estos autores confirma que el ATG iniciador es el postulado por nosotros, ya que no existe ningún otro entre éste y el sitio de comienzo de la transcripción. Por otra parte, la secuencia presentada en el mencionado trabajo es idéntica a la nuestra con excepción del aminoácido 15: Q en nuestro caso y L en el de ellos, que se explica por el cambio de una base (T por A). La zona conflictiva la hemos secuenciado en ambas cadenas del ADN y pensamos, por lo tanto, que esta discrepancia es consecuencia de un error cometido por la transcriptasa reversa durante la síntesis del ADN o que existe un polimorfismo genético en ese sitio.

La fibronectina es una glicoproteína extracelular y se espera que tenga una secuencia señal. Nuestros datos han confirmado esta predicción, pero han demostrado además la existencia de un propéptido.

La arginina n° 31 (ver Figura 6) no puede corresponder a la terminación de la secuencia señal y sí, en cambio, a la de un propéptido, ya que: 1) Con muy pocas excepciones (como la de la apolipoproteína A1; Shoulders *et al.*, 1983) los propéptidos terminan en un par de aminoácidos básicos (en nuestro caso K n°30 y R n°31). 2) Las secuencias señales terminan en aminoácidos con cadenas laterales pequeñas, no cargadas (Watson, 1984).

Por otra parte, la existencia de una secuencia señal se identifica por la presencia de un residuo cargado dentro de los 5 primeros aminoácidos (R n°3), seguido de un núcleo hidrofóbico (aminoácidos 9-14, 17, 20 y 21) y por terminar con un residuo pequeño, no cargado (A n°26).

El límite entre las secuencias pre y pro se determinó por el método de von Hejne (1983). Este es un procedimiento estadístico que indica sólo el "sitio más probable de corte" por la proteasa de la señal y coincide con la realidad biológica en un 70-75% de los casos. Por consecuencia, se predice que el propéptido es de carácter hidrofílico y básico y tendría sólo 5 aminoácidos (Ser-Lys-Ser-Lys-Arg). Esta secuencia no se encuentra en ninguna otra proteína cuyos datos se hayan publicado (investigado en el banco de datos de proteínas NBRF).

Por otra parte, otros autores han determinado que la fibronectina no es procesada por proteólisis en su extremo COOH-terminal (Kornblihtt, Vibe-Pedersen & Baralle, 1983). De esta manera, se deduce que el producto primario de traducción de la fibronectina es cortado por proteasas especí-

ficas en dos sitios diferentes de la región NH₂-terminal, para dar lugar a la proteína madura.

El ADNc con el cual obtuvimos estos resultados se sintetizó a partir de ARNm extraído de células que producen fibronectina de tipo celular. Por medio de experimentos con nucleasa S1 comprobamos que estas secuencias son también protegidas por el ARNm de hepatocitos, los cuales sintetizan la fibronectina de tipo plasmático y, de esta manera comprobamos que la región pre-pro de la fibronectina es idéntica en ambos tipos de la proteína: celular y plasmática. Por lo tanto, se concluye que estas secuencias no determinan el diferente comportamiento y localización de las dos formas de la proteína.

En otro aspecto de nuestro trabajo, hemos identificado una nueva región de *splicing* alternativo en la fibronectina, que hemos denominado EDII. El EDII es un exón de 273 pb que codifica, exactamente, para una homología de tipo III completa. En esto se diferencia de la mayoría de las homologías de tipo III, que son codificadas por dos exones cada una. En la Figura 22 se describe el mecanismo de procesamiento del EDII. Este exón "fusionado" es incluido en el transcripto primario del gen de la fibronectina (su tamaño es aproximadamente el doble que el de los exones vecinos) y, a continuación, puede seguir dos caminos diferentes.

En algunos casos es reconocido como un exón por el mecanismo de *splicing* y es incluido en el ARNm (parte izquierda de la figura); en otros casos no es reconocido como tal, es incluido en un intrón y no se halla presente, por lo tanto, en el ARNm (parte derecha de la figura). La traducción de los ARNms produce dos isomorfos proteicos que difieren por la presencia o ausencia de una unidad de tipo III.

Como lo demuestran la estructura de clones de ADNc y los experimentos de mapeo con nucleasa S1 de la Figura 16,

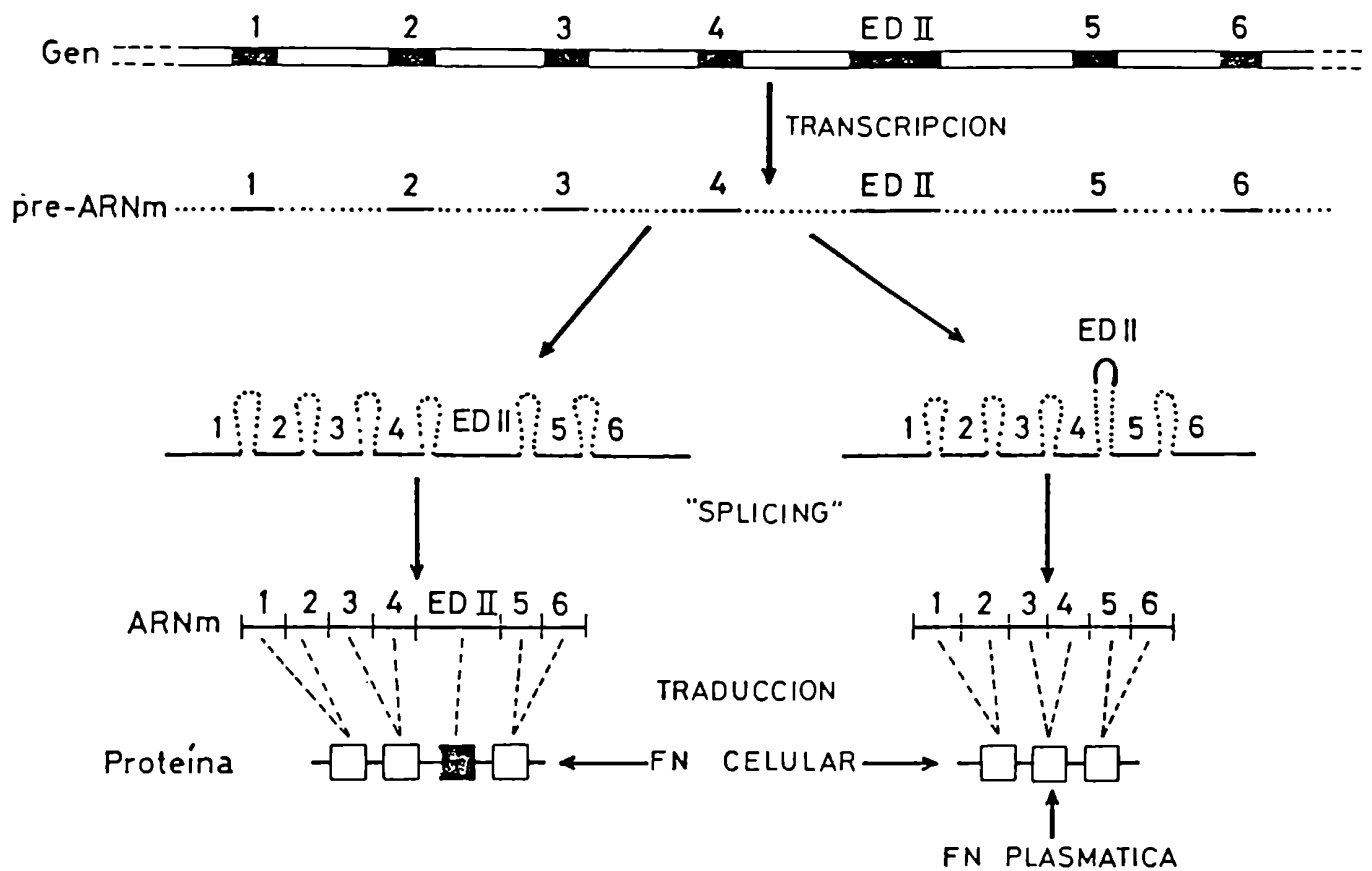


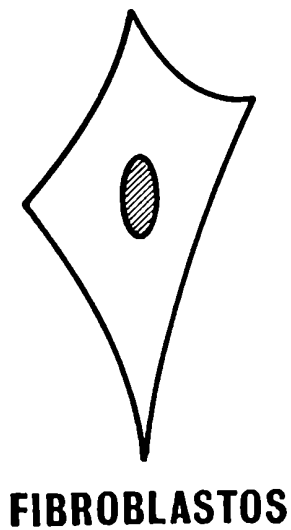
Figura 22. Splicing alternativo del exón EDII. La región EDII es una homología de tipo III, codificada por un único exón. El exón EDII está flanqueado por otras homologías de tipo III, cada una de las cuales es especificada por dos exones de menor tamaño. En fibroblastos y otros tipos celulares, el EDII puede ser incluido en el ARNm maduro o excluido del mismo; la traducción de cualquiera de estas dos variantes da lugar a la fibronectina de tipo celular. En los hepatocitos, el EDII es eliminado junto con los intrones y, por lo tanto, no aparece en el ARNm ni en su producto de traducción: la fibronectina plasmática. Los exones están numerados de manera arbitraria. FN=fibronectina.

este proceso de *splicing* alternativo es específico de tipo celular: los fibroblastos y diversas líneas celulares, que sintetizan la fibronectina celular, producen polipéptidos con EDII y sin EDII mientras que los hepatocitos, que sintetizan la fibronectina plasmática, producen solamente polipéptidos sin EDII.

Secuencias consenso para *splicing* están presentes en los intrones que flanquean al exón EDII. Sin embargo, sólo el intrón 3' presenta un sitio de ramificación reconocible. La ausencia de este sitio en el intrón 5' y la presencia de una hilera inusualmente larga de pirimidinas, precediendo al sitio "acceptor" de este intrón, podrían estar relacionadas con el mecanismo del *splicing* del EDII. Se ha informado que deleciones de sitios de ramificación de genes de mamíferos, localizados 20-50 nucleótidos *upstream* del sitio "acceptor" provocan el uso de otras secuencias de ramificación, pero como consecuencia disminuye la velocidad de la reacción de *splicing* en un grado variable (Padgett *et al.*, 1986).

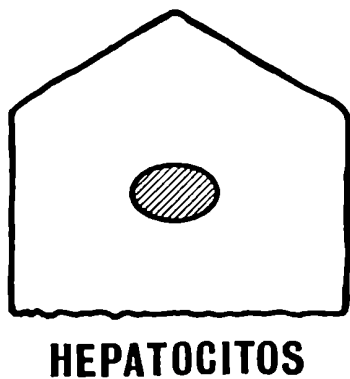
El EDII se asemeja por otra parte, al EDI (anteriormente denominado ED), ya mencionado en la Introducción. Ambos son exones "fusionados", que son procesados alternativamente, y cuya expresión es específica de tejido, ya que sólo se los encuentra en la fibronectina celular.

Las diferencias estructurales entre las fibronectinas son, entonces, consecuencia de la existencia de *splicing* alternativo en tres regiones del transcripto primario del gen: EDII, EDI y III CS. Si se supone que todas las permutaciones en las tres regiones de variabilidad son posibles, aquellas células que sintetizan fibronectina celular podrían producir hasta 20 polipéptidos diferentes a partir de un solo gen: $2 \text{ (EDII)} \times 2 \text{ (EDI)} \times 5 \text{ (III CS)} = 20$ (Figura 23). En los hepatocitos, en cambio, sólo pueden sintetizarse 5 isomorfos de



FN CELULAR

	EDII	EDI	III	C
N	+	+	120	C
N	+	+	0	C
N	+	+	89	C
N	+	+	64	C
N	+	+	95	C
N	+	-	120	C
N	+	-	0	C
N	+	-	89	C
N	+	-	64	C
N	+	-	95	C
N	-	+	120	C
N	-	+	0	C
*N	-	+	89	C
N	-	+	64	C
N	-	+	95	C
N	-	-	120	C
N	-	-	0	C
N	-	-	89	C
N	-	-	64	C
N	-	-	95	C



FN PLASMATICA

	EDII	EDI	III	C
N	-	-	120	C
N	-	-	0	C
N	-	-	89	C
N	-	-	64	C
N	-	-	95	C

Figura 23. Polipéptidos de las fibronectinas plasmática y celular. Cinco polipéptidos diferentes pueden constituir la fibronectina plasmática y hasta 20 polipéptidos distintos la fibronectina celular. La estructura de cada uno de ellos se describe en la figura. *: señala la variante de fibronectina codificada por el clon de ADNc de longitud completa que hemos construido.

la fibronectina. Recientemente, se ha descrito un exón similar al EDII, en idéntica posición, en la fibronectina de la rata y en la del pollo (Schwarzbauer *et al.*, 1987; y R. Hynes, comunicación personal, respectivamente). De acuerdo a estos trabajos pueden generarse en la rata un máximo de 12 y 3 variantes, mientras que en el pollo sólo 8 y 2, respectivamente.

Como se comentó en Resultados (comienzos de 3.2.), Paul *et al.* (1986) concluyeron, mediante análisis por electroforesis bidimensional, que en la rata los fibroblastos sintetizan un mínimo de 12 variantes de fibronectina y los hepatocitos 6. Por lo tanto, el hallazgo del EDII no alcanza a explicar la heterogeneidad de la fibronectina plasmática. Se plantea, entonces, la posible existencia de un 4° sitio de *splicing* alternativo, que debería involucrar un segmento que se halle presente en la mitad de las moléculas de la fibronectina aproximadamente, tanto en hepatocitos como en fibroblastos. Schwarzbauer *et al.* (1987) han explorado casi toda la longitud del ARNm de rata incluyendo una región investigada por nosotros en el ARNm humano (ver 3.1) sin encontrar evidencias de *splicing* alternativo. Por el momento, entonces, esta cuestión permanece sin resolver.

¿Qué relación existe entre exones fusionados y *splicing* alternativo en la fibronectina? Recientemente, Schwarzbauer *et al.* (1987) han realizado un análisis detallado de una parte del gen de la fibronectina de rata, que contiene todas las homologías de tipo III de la proteína. Estos autores han detectado que, además del EDII y del EDI, existe un tercer exón fusionado que codifica para una homología de tipo III (la n° 9 en la Figura 24). Sin embargo, experimentos de protección con ribonucleasas indican que este último es siempre incluido en los ARNms de fibroblastos normales y transforma-

dos, astrocitos y células hepáticas, y no contribuye, por lo tanto, a la conocida heterogeneidad de las fibronectinas. Entonces, el hecho de que una unidad de tipo III sea codificada por un solo exón no es condición suficiente para que ésta sea procesada alternativamente.

Está claro que las células pueden discriminar entre los límites intrón/exón, dentro del transcripto primario de la fibronectina, de manera compleja. Este transcripto tiene, probablemente, un único sitio de iniciación (Patel *et al.*, 1987) y un único sitio de poliadenilación (Kornblihtt, Vibe-Pedersen & Baralle, 1983). Así, algunos aspectos locales del mismo deben ser reconocidos por el sistema de *splicing*, de forma tal que los exones EDII y EDI sean procesados diferencialmente.

En la Figura 24 se resumen datos aportados por muchos investigadores que permiten tener un panorama claro de la estructura de las fibronectinas. En la misma se representa el polipéptido más largo posible de la fibronectina humana, que tendría 2446 aminoácidos. 31 residuos correspondientes a las secuencias pre-pro deben agregarse si se considera la proteína inmadura. Se localizan, además, las tres regiones que son procesadas alternativamente (EDII, EDI y III CS) con sus distintas variantes.

Se observa, entonces, que el gen de la fibronectina exhibe un notable potencial para generar diversidad proteica por *splicing* alternativo. Sólo la Troponina T del músculo esquelético muestra un patrón aún más complejo. En este último gen, 5 exones consecutivos son procesados de manera combinatoria para producir hasta 32 (2^5) diferentes secuencias en el correspondiente dominio de la proteína. Este número aumenta a 64 por la presencia de dos exones mutuamente excluyentes.

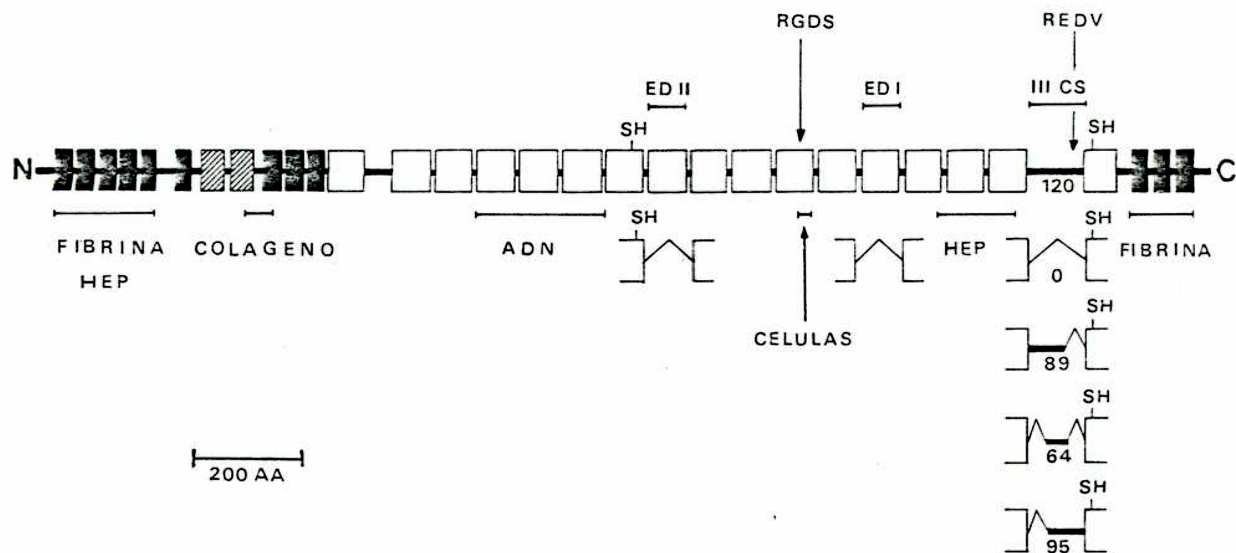


Figura 24. Estructura primaria de la fibronectina humana y sus variaciones. La parte superior de la figura representa el pre-pro-polipéptido más largo posible de la fibronectina humana. Cajas negras: homologías de tipo I. Cajas rayadas: homologías de tipo II. Cajas blancas: homologías de tipo III. Los sitios de unión a células (RGDS y REDV), y a diversos ligandos están indicados, al igual que todas las posibles variaciones que pueden ocurrir por *splicing* alternativo (EDII, EDI y III CS). Hep: sitios de unión a heparina.

Es sorprendente que la secuencia de aminoácidos del EDII sea 100% homóloga entre la rata y humanos y 96% homóloga entre estas especies y el pollo, mientras que otras unidades tipo III muestran una homología promedio del 92% y 50%, respectivamente. Por otra parte, las regiones EDI y III CS no están más conservadas que el resto de la fibronectina. Esto podría indicar una evolución más reciente de la secuencia EDII, con menos tiempo para diverger, o una conservación estricta de sus aminoácidos debido a que éstos participarían en algún fenómeno biológico. Es probable que el EDII confiera a la fibronectina de tipo celular funciones que no son necesarias en la fibronectina del plasma, o que incluso podrían ser perjudiciales para esta última. Una de ellas puede ser la fibrillogénesis. Otra posibilidad es que los isomorfos de fibronectina EDII+ (y también EDI+) puedan ser incorporados en matrices extracelulares específicas y tengan efectos particulares en la diferenciación, migración o adhesión de ciertos tipos celulares. Estas hipótesis, y otras, pueden investigarse ahora, usando técnicas de ADN recombinante pero, hasta el presente, son aún especulativas.

Con el objeto de crear una herramienta adecuada para explorar el rol biológico que desempeñan éstas y otras regiones de la proteína, hemos construido un ADNc de fibronectina humana de longitud completa, de 7630 pb. Numerosas posibilidades existen para el empleo fructífero de este clon:

- **Expresión en células en cultivo, de manera transitoria o permanente.** Como un ejemplo de las múltiples posibilidades que se pueden abordar en este sistema, hemos colocado este ADNc bajo el control de un promotor eucariótico inducible con el objeto de transfectar células que no producen fibronectina y eva-

luar así la hipótesis propuesta por J.P. Thiery y colaboradores (Duband *et al.*, 1986) según la cual la capacidad migratoria de una célula depende, entre otros factores, de su capacidad de secretar fibronectina.

- **Microinyección del gen de la fibronectina en óvulos fertilizados de ratón** bajo el control de un promotor fuerte y generalizado como el de la metalotioneína, con el fin de correlacionar la producción anormal, cuali y cuantitativa de esta proteína, por las células migratorias con sus efectos sobre el desarrollo embrionario temprano.
- **Expresión en E.coli** de variantes de este clon que permitan disponer de distintos isomorfos proteicos para ser utilizados en estudios *in vitro*, donde se pueda relacionar la estructura de los distintos polipéptidos con fenómenos biológicos definidos (por ejemplo, afinidad por distintos tipos de receptores celulares de la fibronectina).

El ADNc que hemos construido codifica para sólo uno de los 20 polipéptidos posibles de la fibronectina (indicado con un * en la Figura 23). Sin embargo, es fácil generar otras variantes a partir del mismo, ya que se dispone de clones que cubren todas las áreas involucradas. Finalmente, existen aún otras posibilidades que se basan en el empleo de técnicas de mutagénesis dirigida. Mediante estas últimas se pueden introducir modificaciones del más diverso tipo en cualquiera de los múltiples dominios estructurales y/o funcionales de la fibronectina y correlacionar estos cambios con las variaciones que se produzcan en el fenómeno biológico en estudio.

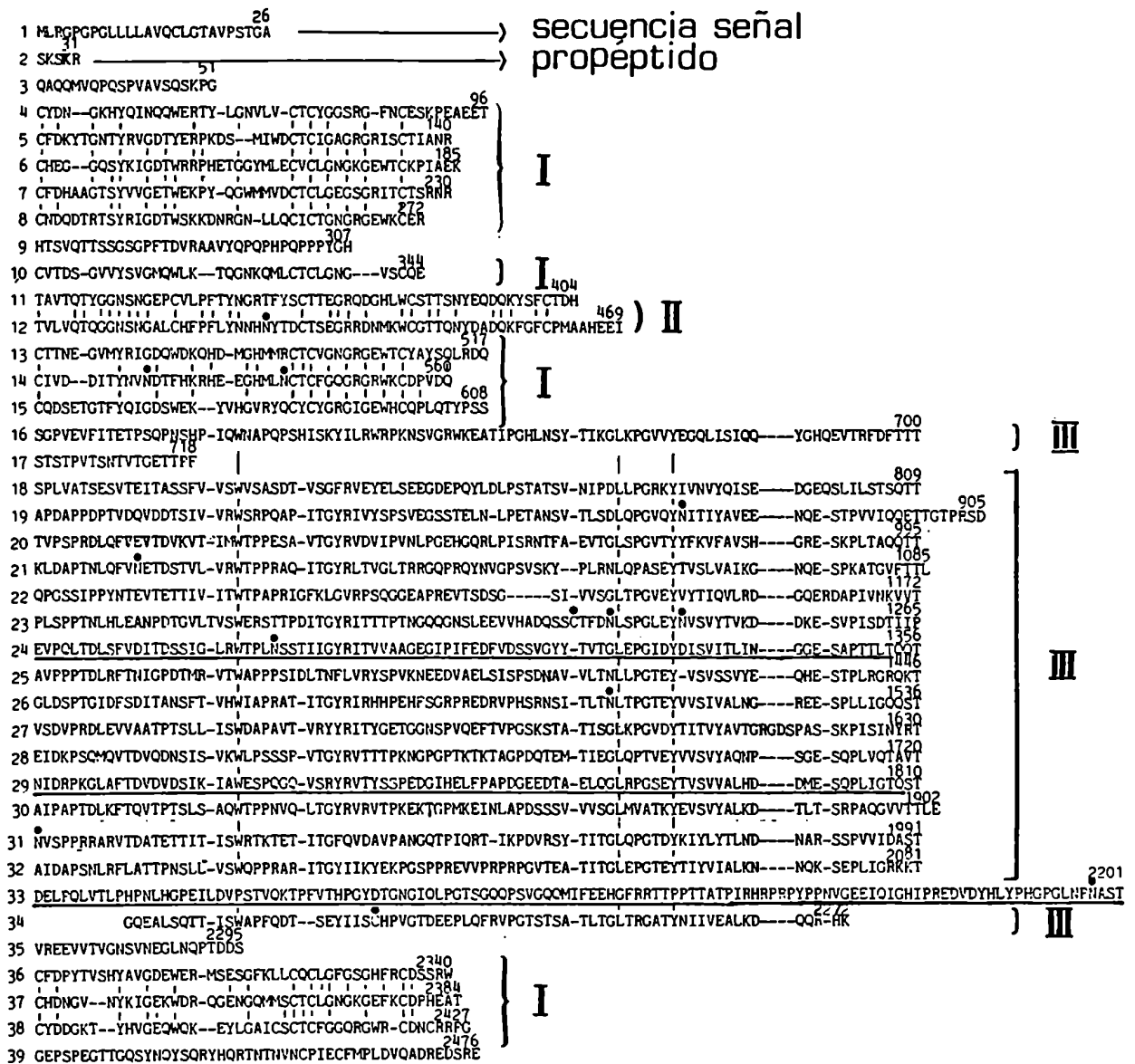


Figura 25. Secuencia de aminoácidos del pre-pro-polipéptido más largo posible de la fibronectina humana. Se indican los tres tipos de homología interna (I, II y III). Las tres regiones de *splicing* alternativo (EDII, EDI y III CS) están subrayadas. Residuos conservados se indican por líneas verticales. Existen muchas otras homologías que no se señalan. *: cisteínas con grupos SH libres. • : sitios potenciales de glicosilación.

Conclusiones

1. Se determinó que la fibronectina es sintetizada como un pre-pro-polipéptido y que, en consecuencia, debe ser procesada por proteólisis en dos sitios diferentes, de su extremo NH₂-terminal, para dar origen a la proteína madura.

2. Se estableció la estructura primaria de la secuencia señal y del propéptido de la fibronectina de tipo celular. La primera tiene 26 aminoácidos y tiene características similares a otras secuencias señales de eucariotes y el segundo es un corto segmento de sólo 5 aminoácidos, hidrofílico y básico, de función desconocida.

3. Las secuencias pre-pro de la fibronectina plasmática son idénticas a las de la fibronectina celular.

4. Se identificó una tercera región de variabilidad en la fibronectina, debida a *splicing* alternativo, que denominamos EDII.

5. El EDII es un exón de 273 pb que codifica, exactamente, para una homología de tipo III completa, mientras que otros exones de la fibronectina codifican para 1/2 homología de tipo III.

6. Se determinó la secuencia del EDII y con esto se aportaron nuevos datos sobre la estructura primaria de la fibronectina humana, ya que este exón no está presente en ningún clon de ADNc, ni ha sido detectado a nivel proteico.

7. El EDII puede ser reconocido como un exón por el sistema de *splicing* y, en consecuencia, ser incluido en el ARNm o, alternativamente, puede ser considerado como un intrón y, entonces, ser excluido del ARNm.

8. El *splicing* alternativo del EDII es específico de célula: fibroblastos humanos y otras células que sintetizan la llamada fibronectina celular producen ARNms con EDII y

sin EDII, mientras que el hígado que sintetiza fibronectina plasmática produce ARNms sin EDII.

9. El EDII es semejante estructural y funcionalmente a otra región de la fibronectina que es procesada alternativamente: el EDI (previamente denominado ED). Ambos son exones fusionados, que codifican para una homología de tipo III completa y exhiben la misma especificidad de tejido.

10. El descubrimiento del EDII eleva a tres el número de regiones de la fibronectina que participan en procesos de *splicing* alternativo y ejemplifica la gran versatilidad y complejidad de este mecanismo. Sólo la troponina T del músculo esquelético tiene un patrón de *splicing* alternativo más complicado que el de la fibronectina.

11. Se podrían generar hasta 20 polipéptidos diferentes de fibronectina humana, a partir de un sólo gen, en las células que producen fibronectina celular. Esto ocurriría si se asume que todas las permutaciones en las tres regiones de variabilidad son posibles: (5 variantes del III CS) X (2 del EDI) X (2 del EDII) = 20. En los hepatocitos, en cambio, sólo hay 5 variantes posibles.

12. La existencia del EDII no alcanza a explicar todos los isomorfos de fibronectina que se detectan por electroforesis bidimensional, pero por otra parte no parece existir una cuarta región de *splicing* alternativo ni éstos se justifican, tampoco, por variabilidad en las modificaciones posttraduccionales. Se desconoce la explicación de este fenómeno.

13. Los datos que hemos aportado se suman a los de otros investigadores y, en conjunto, permiten establecer la estructura primaria completa de la fibronectina humana. Así, se demuestra que el polipéptido más largo, de los 20 posibles, de esta proteína tiene 2446 aminoácidos. Si se consi-

dera la proteína inmadura hay que agregar 31 residuos, correspondientes a las regiones pre y pro.

14. Para profundizar la investigación de la relación existente entre la estructura y la función de los numerosos dominios estructurales y funcionales que posee la fibronectina, hemos construido un ADNc de longitud completa, de 7.630 pb de longitud.

Este clon representa sólo uno de los muchos polipéptidos de la fibronectina humana, pero pueden generarse con facilidad, a partir de él, otras variantes que reflejen la heterogeneidad de los ARNm que codifican para esta proteína.

AGRADECIMIENTOS

A Alberto Kornblihtt, quien me dirigió en este trabajo y me brindó su constante ayuda, tanto en la realización de los experimentos como para solucionar muchas dificultades cotidianas.

A Daniel Altschuler y Ricardo Attar, compañeros del INGEBI, por su generosa y desinteresada colaboración en todos los aspectos.

A mi esposa, Beatriz Avanzati, por la lectura crítica del manuscrito y por la realización de muchas de las figuras.

A Adriana Urman, por su cuidado y paciencia en la transcripción del presente trabajo.

Al Dr. Alejandro Paladini (h), por su asesoramiento en el uso del procesador de textos.

Alejandro Gutman
Alejandro GUTMAN

Autoz

Alberto E. Kornblihtt

Alberto E. KORNBLIHTT

Director de Tesis

Bibliografía

- Ali, I.U., Mautner, V., Lanza, R. & Hynes, R.O. (1977). *Cell* 11, 115-126.
- Banyai, L., Varadi, A. & Patthy, L. (1983). *FEBS Letters* 163, 37-41.
- Bernard, M.P., Kolbe, M., Weil, D. & Chu, M.L. (1985). *Biochemistry* 24, 2698-2704.
- Borsi, L., Carnemolla, B., Castelloni, P. Rosellini, C. Vecchio, D. Allemanni, G., Chong, S.E., Taylor-Papadimitrou, J., Pande, H. & Zardi, L. (1987). *The Journal of Cell Biology* 104, 595-600.
- Boucaut, J.C., Darribere, T., Poole, T.J., Aoyama, H., Yamada, K.M. & Thiery, J.P. (1984). *The Journal of Cell Biology* 99, 1822-1830.
- Breitbart, R.E., Nguyen, H.T., Medford, R.M., Destree, A.T. Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. (1985). *Cell* 41, 67-82.
- Breitbart, R.E., Andreadis, A. & Nadal-Ginard, B. (1987). *Annual Review of Biochemistry* 56, 467-495.
- Burns, G.F., Cosgrove, L., Triglia, T., Beall, J.A., López, A.F., Werkmeister, J.A., Glenn Begley, C., Haddad, A.P., d'Apice, A.J.F., Vadas, M.A. & Cawley, J.C. (1986). *Cell* 45, 269-280.
- Choi, Y.D. & Dreyfuss, G. (1984). *The Journal of Cell Biology* 99, 1997,2004.
- Dale, R.M., McClure, B.A. & Houchins, J.P. (1985). *Plasmid* 13, 31-40.
- Dean, D.C., Bowlus, C.L. & Bourgeois, S. (1987). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 84, 1876-1880.
- Derynck, R., Jarret, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.P. Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B. & Goeddel, D.V. (1985). *Nature* 316, 701-705.

- Doolittle, R.F. (1985). Trends in Biochemical Sciences 10, 233-237.
- Duband, J-L., Rocher, S., Chen, W-T., Yamada, K.M. & Thiery, J.P. (1986). The Journal of Cell Biology 102, 160-178.
- Dynam, W.S. & Tjian, R. (1985). Nature 316, 774-778.
- Esch, F.S., Ling, N.C., Bohlen, P. Ying, S.Y. & Guillemin, R. (1983). Biochemical & Biophysical Research Communications.
- Fagan, J.B., Sobel, M.E., Yamada, K.M., de Crombrugge, B. & Pastan, I. (1981). The Journal of Biological Chemistry 256, 520-525.
- Fitzgerald, L.A., Charo, I.F., Phillips, D.R. (1985). The Journal of Biological Chemistry 260, 10893-10896.
- Fitzgerald, L.A., Steiner, B., Rall Jr., S.C., Lo, S.-S., & Phillips, D.R. (1987). The Journal of Biological Chemistry 262, 3936-3939.
- García-Pardo, A., Pearlstein, E. & Frangione, B. (1983). The Journal of Biological Chemistry 258, 12670-12674.
- Gardner, J.M. & Hynes, R.O. (1985). Cell 42, 439-448.
- Gilbert, W. (1978). Nature 271, 501.
- Gold, L.I., García-Pardo, A., Frangione, B., Franklin, E.C. & Pearlstein, E. (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 76, 4803-4807.
- Grabowski, P.J., Padgett, R.A. & Sharp, P.A. (1984). Cell 37, 415-427.
- Gutman, A., Yamada, K. & Kornblihtt, A.R. (1986). FEBS Letters 207, 145-148.
- Gutman, A. & Kornblihtt, A.R. (1987). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 84, 7179-7182.
- Hastings, K.E.M., Bucher, E.A. & Emerson, C.P.Jr. The Journal of Biological Chemistry 260, 13699-13703.
- Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L & Gardner, M.B. (1977). Journal of the National Cancer Institute 58, 1795-1800.

Bibliografía

- Helfman, D.M., Cheley, S., Kuismanen, E., Finn, L.A. & Yamawaki-Kataoka, Y. (1986). *Molecular and Cellular Biology* 6, 3582-3595.
- Hemler, E., Jacobson, J.G. & Strominger, J.L. (1985). *The Journal of Biological Chemistry* 260, 15246-15252.
- Hemler, M.E., Huang, C. & Schwarz, L. (1987). *The Journal of Biological Chemistry* 262, 3300-3309.
- Hirano, H., Yamada, Y., Sullivan, M., de Crombugghe, B., Pastan, I. & Yamada, K.M. (1983). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 80, 46-50.
- Hirst, R., Horwitz, A., Buck, C. & Rohrschneider, L. (1986). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 83, 6470-6474.
- Horwitz, A., Duggan, K., Greggs, R., Decker, C. & Buck, C. (1985). *The Journal of Cell Biology* 101, 2134-2144.
- Humphries, M.J., Akiyama, S.K. Komoriya, A., Olden, K. & Yamada, K.M. (1986). *The Journal of Cell Biology* 103, 2637-2647.
- Hynes, R. (1986). *Scientific American* 254, 42-51.
- Ignotz, R.A., Endo, T. & Massagué, J. (1987). *The Journal of Biological Chemistry* 262, 6443-6446.
- Ingraham, H.A. & Evans, G.A. (1986). *Molecular and Cellular Biology* 6, 2923-2931.
- Joh, K., Arai, Y., Mukai, T. & Hori, K. (1986). *Journal of Molecular Biology* 190, 401-410.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgrove, H., Richard, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M. & Beato, M. (1984). *Nature* 308, 513-519.
- Kishimoto, T.K., O'Connor, K., Lee, A., Roberts, T.M. & Springer, T.A. (1987). *Cell* 48, 681-690.
- Kleinman, H.K., McGowey, M.L., Hassell, J.R., Martin, G. R., Baron Van Evercooren, A. & Dubois-Dalcq, M. (1984) (ed. Trelstad, R.L.), pp 123-143. Alan R. Liss, New York.

Bibliografía

- Knudsen, K.A., Horwitz, A.F. & Buck, C.A. (1985). *Experimental Cell Research* 157, 218-226.
- Kornblihtt, A.R., Vibe-Pedersen, K. & Baralle, F.E. (1983), *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 80, 3218-3222.
- Kornblihtt, A.R, Vibe-Pedersen, K. & Baralle, F.E. (1984a). *The EMBO Journal* 3, 221-226.
- Kornblihtt, A.R, Vibe-Pedersen & Baralle, F.E. (1984b). *Nucleic Acids Research* 12, 5853-5868.
- Kornblihtt, A.R, Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K. & Baralle, F.E. (1985). *The EMBO Journal* 1, 1755-1759.
- Kornblihtt, A.R. & Gutman, A. (1988). *Biological Reviews*, en prensa.
- Kozak, M. (1984). *Nucleic Acids Research* 12, 857-872.
- Kozak, M. (1986). *Cell* 44, 283-292.
- Krusius, T., Fukuda, M., Dell, A. & Ruoslahti, E. (1985). *The Journal of Biological Chemistry* 260, 4110-4116.
- Langford, C.J. & Gallwitz, D. (1983). *Cell* 33, 519-527.
- Law, S.K.A., Gagnon, J., Hildreth, J.E.K., Wells, C.E., Willis, A.C. & Wong, A.J. (1987). *The EMBO Journal* 6, 915-919.
- Lawler, J. & Hynes, R. (1986). *The Journal of Cell Biology* 103, 1635-1648.
- Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Fern, H.F. & Scheele, G.A. *The EMBO Journal* 6, 43-48.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Maxam, A. & Gilbert, W. (1980). *Methods in Enzymology* 65, 449-560.
- McMullen, B.A. & Fujikawa, K. (1983). *The Journal of Biological Chemistry* 260, 5328-5341.

Bibliografía

- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G. & Goodman, R.H. (1986). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 83, 6682-6686.
- Mosher, D.F. (1975). The Journal of Biological Chemistry 250, 6614-6621.
- Mosher, D.F. (1976). The Journal of Biological Chemistry 251, 1639-1645.
- Ny, T., Elgh, F. & Lund, B. (1984). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 81, 5355-5359.
- Obara, M., Kang, M.S., Rocher-Dufour, S., Kornblihtt, A., Thiery, J.P. & Yamada, K. (1987). FEBS Letters 213, 261-264.
- Odermatt, E., Tamkun, J.W. & Hynes, R.D. (1985). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 82, 6571-6575.
- Okayama, H. & Berg, P. (1983). Molecular and Cellular Biology 3, 280-289.
- Oliver, N., Newby, R.F., Furcht, L.T. & Bourgeois, S. (1983). Cell 33, 287-296.
- Owens, R.J. & Baralle, F.E. (1986a). The EMBO Journal 5, 2825-2830.
- Owens, R.J. & Baralle, F.E. (1986b). FEBS Letters 204, 318-322.
- Padgett, R.A., Konarska, M.M., Aebi, M., Hornig, H., Weissmann, C. & Sharp, P.A. (1985). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 82, 8349-8353.
- Padgett, R.A., Grabowski, P.J., Konarska, M.M., Seiler, S. & Sharp, P.A. (1986). Annual Review of Biochemistry 55, 1091, 1117.
- Parise, L.V. & Phillips, D.R. (1985). The Journal of Biological Chemistry 260, 10698-10707.
- Parise, L.V. & Phillips, D.R. (1986). The Journal of Biological Chemistry 261, 14011-14017.

Bibliografía

- Patel, R., Odermatt, E., Schwarzbauer, J.E. & Hynes, R. (1987). *The EMBO Journal* 6, 2565-2572.
- Patthy, L. (1985). *Cell* 41, 657-663.
- Paul, J.I. & Hynes, R.O. (1984). *The Journal of Biological Chemistry* 259, 13477-13487.
- Paul, J.I., Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W. & Hynes, R. (1986). *The Journal of Biological Chemistry* 261, 12258-12265.
- Peters, J.H., Ginsberg, M.H., Bohl, B.P., Sklar, L.A. & Cochrane, C.G. (1986). *Journal of Clinical Investigation* 78, 1596-1603.
- Petersen, T., Thogersen, H.C., Skorstengaard, K., Vive-Pedersen, K., Sahl, P. Sottrup-Jensen, L. & Magnusson, S. (1983). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 80, 137-141.
- Pierschbacher, M.D., Hayman, E.G. & Ruoslahti, E. (1983). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 80, 1224-1227.
- Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1984a). *Nature* 309, 30-33.
- Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1984b). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 81, 5985-5988.
- Pikielny, C.W., Teem, J.L. & Rosbash, M. (1983). *Cell* 34, 395-403.
- Pischel, K.D., Hemler, M.E., Huang, C., Bluestein, H.G. & Woods, V.L. (1987). *Journal of Immunology* 138, 226-233.
- Plow, E.F., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., Marguerie, C.A. & Ginsberg, M.H. (1985). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 82, 8057-8061.
- Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ginsberg, M.H., Plow, E.F. & Ruoslahti, E. (1986). *Science* 231, 1559-1562.
- Ruiz-Opazo, N., Weinberger, J. & Nadal-Ginard, B. (1985). *Nature* 315, 67-70.

Bibliografía

- Ruskin, B., Krainer, A.R., Maniatis, T. & Green, M.R. (1984). *Cell* 38, 317-331.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 74, 5463-5467.
- Savagner, P., Imhof, B.A., Yamada, K.M. & Thiery, J.P. (1986). *The Journal of Cell Biology* 103, 2715-2128.
- Schwarzbauer, J.E., Paul, J.I. & Hynes, R.O. (1985). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 82, 1424-1428.
- Schwarzbauer, J.E., Patel, R.S., Fonda, D. & Hynes, R. (1987). *The EMBO Journal* 6, 2573-2580.
- Scott Argraves, W., Pytela, R., Suzuki, S. Millán, J.L., Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1986). *The Journal of Biological Chemistry* 261, 12922-12924.
- Sekiguchi, K., Klos, A.M., Kurachi, K., Yoshitake, S. & Hakomori, S. (1986). *Biochemistry* 25, 4936-4941.
- Shoulders, C.C., Kornblihtt, A.R., Munro, B.S. & Baralle, F.E. (1983). *Nucleic Acids Research* 9, 2827-2837.
- Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Sahl, P., Petersen, T.E. & Magnusson, S. (1986). *The European Journal of Biochemistry* 161, 441-453.
- Strehler, E.E., Periasamy, M., Strehler-Page, M.A. & Nadal-Ginard, B. (1985). *Molecular and Cellular Biology* 5, 3168-3182.
- Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1985). *The EMBO Journal* 4, 2519-2524.
- Suzuki, S., Scott Argraves, W., Pytela, R., Arai, H., Krusius, T., Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1986). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 83, 8614-8618.

Bibliografía

- Takada, Y., Huang, C. & Hemler, M.E. (1987). *Nature* 326, 607-609.
- Tamkun, J.W. & Hynes, R.O. (1983). *The Journal of Biological Chemistry* 258, 4641-4647.
- Tamkun, J.W., Schwarzbauer, J.E. & Hynes, R.O. (1984). *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 81, 5140-5144.
- Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F. & Hynes, R.O. (1986). *Cell* 46, 271-282.
- Thiery, J.P., Duband, J.L. & Tucker, G. (1985). *Annual Review of Cell Biology* 1, 91-11
- Ulrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. & Seeburg, P.H. (1984). *Nature* 309, 418-425.
- Umezawa, K., Kornblihtt, A.R. & Baralle, F.E. (1985). *FEBS Letters* 186, 31-34.
- Verweij, C.L., Diergaarde, P.J., Hart, M. & Pannekoek, H. (1986). *The EMBO Journal* 5, 1839-1847.
- Vibe-Pedersen, K., Kornblihtt, A.R. & Baralle, F.E. (1984). *The EMBO Journal* 3, 2511-2516.
- Von Heijne, G. (1983). *The European Journal of Biochemistry* 133, 17-21.
- Walter, P., Ibrahimi, I. & Blobel, G. (1981). *The Journal of Cell Biology* 91, 545-550.
- Watson, M.E. (1984). *Nucleic Acids Research* 12, 5145-5164.
- Watt, F.M. (1986). *Trends in Biochemical Sciences* 11, 482-485.

Bibliografia

- Wright, S.D., Reddy, P.A., Jong, M.T.C. & Erickson, B.W. (1987). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 84, 1965-1969.
- Yamada, K.M., Ohanian, S.H. & Pastan, I. (1976). Cell 9, 241-245.
- Yamada, K.M., Yamada, S.S. & Pastan, I. (1976). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 73, 1217-1221.
- Yamada, K.M. & Kennedy, D.W. (1979). The Journal of Cell Biology 80, 492-498.
- Yamada, K.M. (1983). Annual Review of Biochemistry 52, 761-799.
- Yamada, K.M. & Kennedy, D.W. (1984). The Journal of Cell Biology 99, 29-36.
- Young, R.A., Hagenbuchle, O. & Schibler, U. (1981). Cell 23, 451-458.
- Zardi, L., Cianfriglia, M., Balza, E., Carnemolla, B., Siri, A. & Croce, C.M. (1982). The EMBO Journal 1, 929-933.