

# Expresión de p44<sup>mapk</sup> en la línea celular de monocitos (U-937)

Haritz Moreno Moreno

# Expresión de p44<sup>mapk</sup> en la línea celular de monocitos (U-937)

## Introducción

Las protein kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o kinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) son una familia de kinasas que actúan como intermediarios en la transducción de la cascada de señales desde los receptores de membrana para la regulación de procesos tales como la proliferación celular, diferenciación y la progresión del ciclo celular. p44<sup>mapk</sup> es una serin/treonin kinasa codificada por el Gen MAPK 3 (16p11.2; NC\_000016.8) que presenta tres isoformas de p44<sup>mapk</sup> producto de una maduración del RNA mensajero (RNAm) alternativo.

## Objetivos

Partiendo de la secuencia del cDNA incompleta de Gen p44mapk se quiere:

- Comprobar si el Gen p44<sup>mapk</sup> se expresa en la línea celular monocitaria U-937.
- Conocer el tamaño de RNA mensajero completo y la estructura genómica en la región delimitada entre los cebadores 44p<sub>4</sub> y 44p<sub>5</sub>.

## Material y Planteamiento experimental

Se procedió a la extracción del RNA total mediante el kit "Ultraspec" de un sedimento de 5-10x10<sup>5</sup> células de la línea celular U-937. Una parte de este RNA se utilizó para un posterior Northern Blot mientras que otra parte se utilizó para su análisis por PCR, donde para evitar que hubiera cualquier contaminación por DNA residual por la extracción se trató con DNasa (DNasa I). El RNA total se trató con una retrotranscriptasa (RT-PCR) para obtener el cDNA necesario para la realización de la PCR. Se amplificaron por PCR tanto el producto de la retrotranscripción, así como el DNA genómico (gDNA) extraído de la línea Celular U-937, mediante el uso de pares de cebadores específicos (44p<sub>4</sub> y 44p<sub>5</sub>) sintetizados a partir de la secuencia del cDNA publicada por Owaki *et al.* (1992). Con el propósito de realizar una secuenciación se extrajeron los productos de dichas amplificaciones mediante el kit *QIAquick Gel extraction* para su posterior ligación aleatoria en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Se transformó la línea bacteriana *E. coli* XL1-Blue competentes con los productos de la ligación mediante un choque térmico y se cultivaron durante 16 horas a 37°C. Se recogieron las colonias adecuadas y se cultivaron nuevamente en un medio líquido de LB a 37° toda la noche previo análisis por PCR de los productos transformados. Se extrajo el DNA plasmídico a partir del cultivo bacteriano mediante una minipreparación. Parte del DNA plasmídico se digirió con **EcoRI** para su posterior análisis en un gel de agarosa y otra parte se usó para la secuenciación de los insertos mediante el método de terminación de la cadena descrito por Sanger y cols,

1977, mediante el uso de cebadores complementarios al vector (“cebador universal” y/o “cebador reverso”).

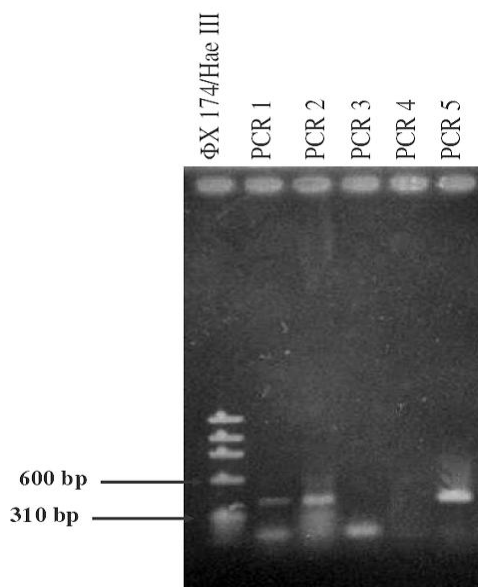
Northern blot. Para la realización del Northern blot se usó como sonda el cDNA extraído mediante el kit *QIAquick Gel extraction* que fue marcado con peroxidasa. Para el revelado se utilizó un reactivo luminiscente.

## Resultados

Tras la obtención del RNA total del sedimento celular de la línea U-937 se realizó una RT-PCR del RNA total con el propósito de realizar una amplificación de un fragmento conocido de la región descrita por Owaki *et al.* (1992) valiéndonos de los cebadores 44p<sub>4</sub> y 44p<sub>5</sub>. El resultado observado (Fig. 1) fueron bandas de productos de aproximadamente 400 pb a partir del DNA genómico y banda de un tamaño inferior a 300 pb en las PCRs con cDNA.

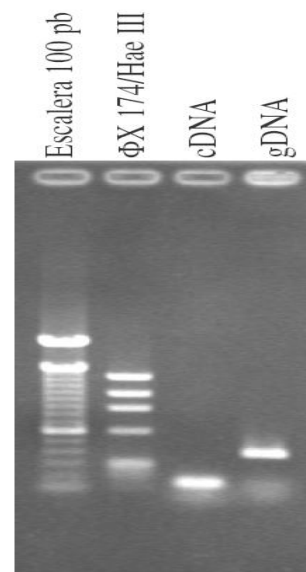
Para la obtención de los clones de ambos fragmentos se utilizó el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (vector abierto con timinas protuberantes) que se ligó a el producto de una amplificación por PCR con una Taq polimerasa con actividad inespecífica de adición de una adenina protuberante 3'. La comprobación de los clones se realizó por PCR valiéndose de los cebadores a partir de un lisado de células dando como resultado bandas de aproximadamente 100-200 pb y de 400 pb para el DNA genómico (Fig. 2).

**Fig. 1: Gel de agarosa de PCRs**



Gel de agarosa con los productos de PCR del RNA retrotranscrito sin tratar con DNAsa (PCR 1), RNA no tratado con DNAsa (PCR 2), RNA retrotranscrito previamente tratado con DNAsa (PCR 3), RNA tratado con DNAsa (PCR 4) y del DNA genómico (PCR 5). Como marcador de peso molecular el DNA del bacteriófago  $\Phi$ X 174 digerido con Hae III.

**Fig. 2: Producto de PCR a partir de las colonias lisadas**

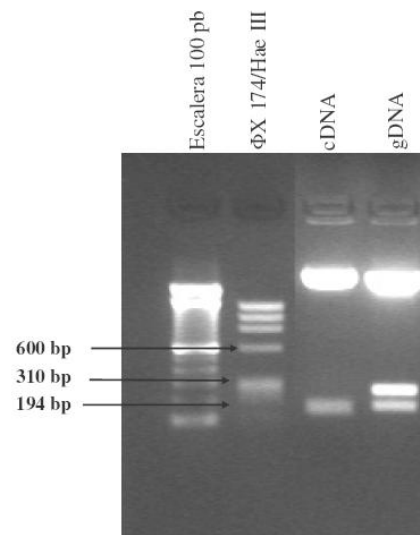


Gel de agarosa con los productos de PCR a partir de los plásmidos obtenidos de los clones con cDNA y DNA genómico (gDNA). Como marcador de peso molecular se usaron el DNA del bacteriófago  $\Phi$ X 174 digerido con Hae III y el marcador de escalera de 100 pares de bases.

La digestión de los plásmidos obtenidos de los clones de cDNA y DNA genómico con **EcoRI** dilucidaron la presencia de una banda de entre 100-200 pb para el cDNA y dos bandas de 100-200 pb y de 200-300 pb para el DNA genómico (Fig. 3). La secuencia obtenida mediante el método de Sanger y cols, 1977, usando como cebador el “cebador universal”, de plásmidos obtenidos de clones transformados con los productos de las PCR 3 (cDNA) y PCR 5 (gDNA) ligadas al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy se analizaron para determinar las hebras y regiones secuenciadas para poder completar la totalidad de la secuencia de los insertos mediante una alineación. La secuencia obtenida del cDNA desde el cebador 44p<sub>4</sub> hasta el cebador 44p<sub>5</sub> fue de un fragmento de 128 pb y la secuencia obtenida del DNA genómico para la misma región flaqueada entre los cebadores 44p<sub>4</sub> y 44p<sub>5</sub> fue de 390 pb (Fig. 5).

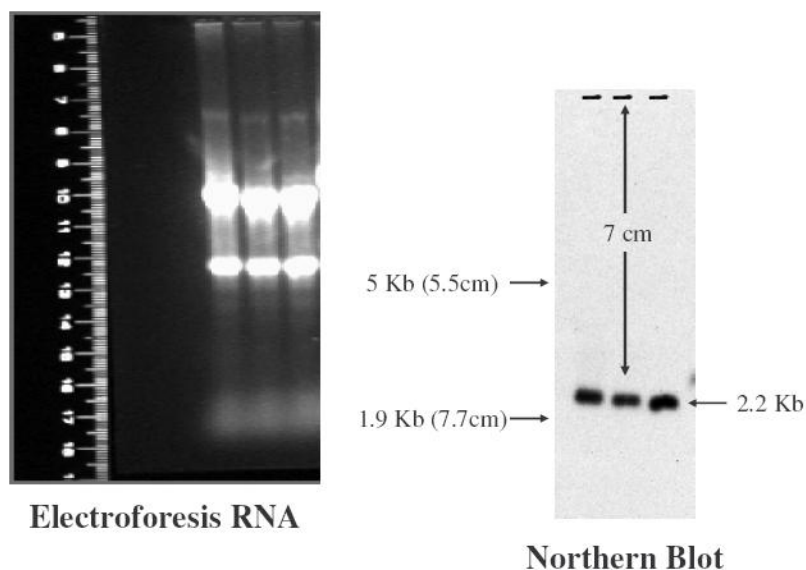
El resultado obtenido en el Northern blot (Fig. 4) fue de una banda a una distancia de 7 centímetros de aproximadamente 2.2 Kb.

**Fig. 3: Producto de la digestión por EcoRI**



Gel de agarosa con los de digestión con **EcoRI** de los plásmidos obtenidos de los clones con cDNA y DNA genómico (gDNA). Como marcador de peso molecular se usaron el DNA del bacteriófago  $\Phi X$  174 digerido con **Hae III** y el marcador de escalera de 100 pares de bases.

**Fig. 4: Northern blot**



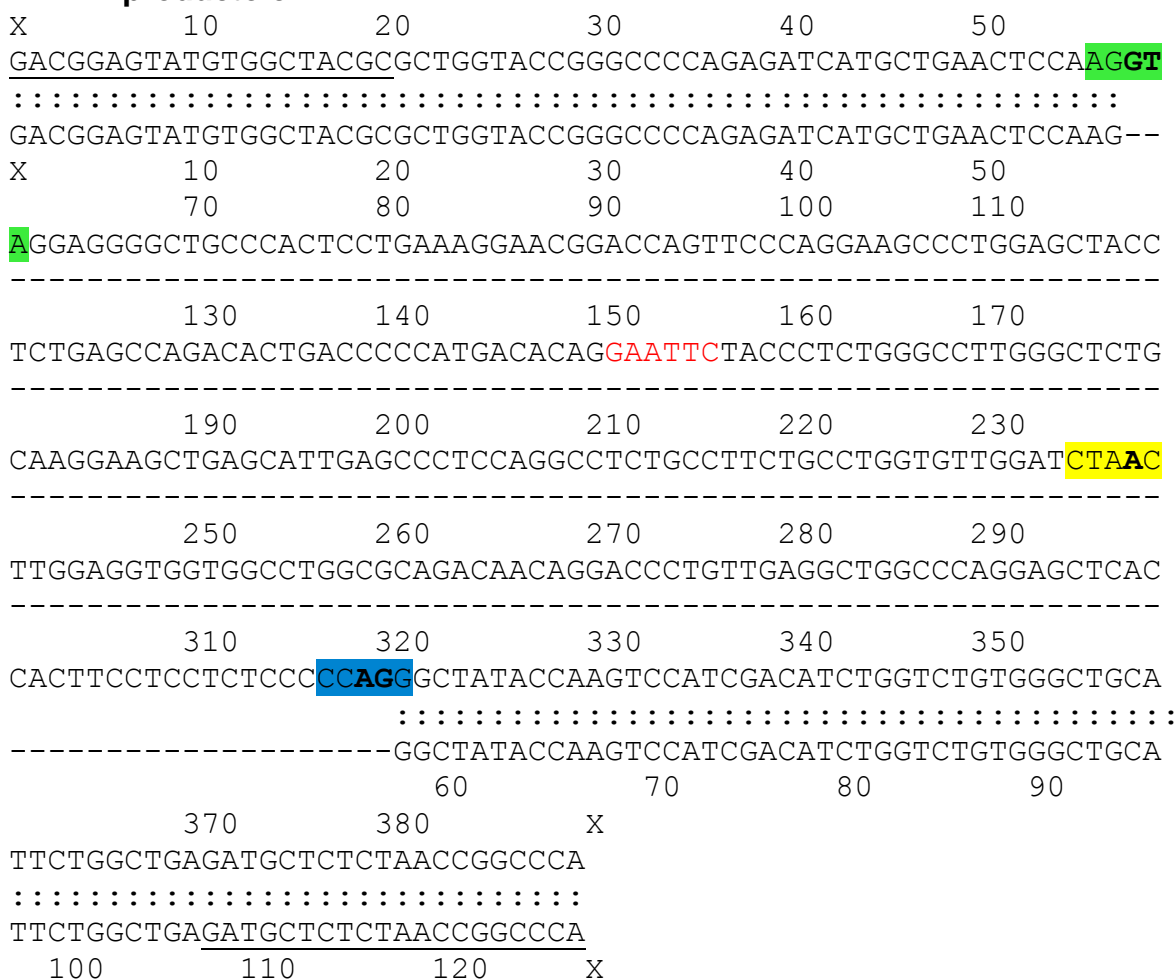
Gel de agarosa con el RNA total purificado a partir de la línea celular U-937 antes de la transferencia a membrana de nilón y su correspondiente membrana nilón híbrida con una sonda (cDNA) de marcada con peroxidasa y revelada. Subunidad ribosómica 28S (5 Kb) a una distancia de 5,5 cm. Subunidad ribosómica 18S (1,9 Kb) a una distancia de 7,7 cm. Sonda híbrida a una distancia de 7 cm.

## Discusión

El resultado obtenido en las PCRs del extracto de RNA de la línea de monocitos (U-937) demuestra que se ha amplificado una secuencia inferior a 300 Kb procedente de un cDNA producto de la retrotranscripción (PCR 3 y PCR 1) por lo que se demuestra que el gen está siendo expresado en esta línea celular. Este producto no se debe a contaminación del DNA genómico ya que esta región amplificada tiene un tamaño aproximado de 400 Kb que no puede llevar a confusión. Además, el producto amplificado desde el DNA genómico es mayor que el obtenido a partir del cDNA por lo que indica la posible existencia de una secuencia intrónica en esa región.

La digestión de los plásmidos obtenidos a partir de los clones de cDNA y DNA genómico nos advierten de la existencia de una diana de **EcoRI** que no está presente en el cDNA. Las dos bandas obtenidas experimentalmente de 100-200 pb y 200-300 pb por la digestión del DNA genómico suman una banda de aproximadamente 400 pb como la que se obtuvo en la PCR de DNA genómico previamente realizada (PCR 5).

**Fig. 5: Alineamiento entre las secuencias sentido del producto genómico y el producto cDNA**



Alineamiento de las secuencias sentido del cDNA y DNA genómico de las regiones delimitadas entre los cebadores 44p<sub>4</sub> (cebador sentido en la región 5') y 44p<sub>5</sub> (cebador antisentido en la región 3'). Se han obtenido 128 alineamientos correctos entre bases.

El marcaje obtenido en el Northern blot reafirma que el gen está siendo expresado en la línea monocitaria U-937. Además comparando la distancia recorrida por parte de el RNAm con la distancia recorrida por parte de las subunidades ribosómicas 18S y 28S nos permite estimar el tamaño del RNA mensajero completo de aproximadamente 2,2 Kb de tamaño. Las secuencias obtenidas de DNA genómico y el producto de cDNA se alinearon para dilucidar las regiones que presentaban homología de secuencia (Fig. 5). Como ya se observó en la digestión (Fig. 4), la secuencia genómica presenta una diana de restricción para **EcoRI** representada en rojo que no está presente en el cDNA, la digestión con **EcoRI** nos daría dos fragmentos de 151 pb y 239 pb, tamaño similar a los obtenidos experimentalmente que apoyan la veracidad de la secuencia obtenida. Ante la sospecha de que la región no presente en el cDNA pueda ser una región intrónica se procedió a su análisis para la búsqueda de secuencias que encajen con los criterios de ajuste. Generalmente las secuencias de ajuste 5' donadora se encuentran en una secuencia consenso  $AG|GU[A/G]AGU-3'$ , donde el corte que se produce se indica con una barra (|). Nuestra secuencia no contiene dicha secuencia en su totalidad (subrayada en verde) pero presenta los nucleótidos guanina-uracilo necesarios para el correcto ajuste antes del corte. Por otro lado la secuencia 3' receptora de ajuste (indicada en azul) se ajusta a la secuencia consenso de ajuste  $NCAG|G-3'$  donde se encuentran los nucleótidos adenina-guanina que median en la maduración. También se ha podido observar una secuencia que se ajusta a la secuencia consenso  $CU[A/G]A[C/U]-3'$  (representada en amarillo) para el punto de ramificación (*Branch point*). Todos estos datos reafirman la hipótesis de que la región descrita en el DNA genómico y que no se encuentra en cDNA se ajusta a una región intrónica con los elementos necesarios para que se produzca un corte y empalme adecuado.

Mediante el empleo de otros pares de cebadores que solapen estas regiones se podría reconstruir la secuencia del RNA mensajero completo (Fig. 6) como se ha hecho para esta región.

