



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Alejandro Claude Retamal.**  
Instituto de Bioquímica  
Facultad de Ciencias

**“ESTUDIO DE LA FUNCION SECRETORIA DE LOS FACTORES DE INTERCAMBIO  
DE GTP, GBF1, BIG1 Y BIG2, A TRAVÉS DE SU INHIBICIÓN MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE siRNA”**

Tesis de Grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**JAVIER ROSAS GONZÁLEZ**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia por el apoyo incondicional que siempre me brindaron, gracias por creer en mí y hacer todo esto posible.

Al Dr. Alejandro Claude por recibirme y hacerme parte de su laboratorio, por su paciencia y consejos, pero sobretodo por su disposición cuando fue necesario. Al Dr. Jaime Figueroa por su simpatía y los buenos consejos. Al Dr. Alejandro Yañez por facilitar los equipos que fueron requeridos para este trabajo. Al Dr. Alejandro Reyes por su preocupación y disposición en los momentos que necesite de su ayuda.

A mis amigas, Patty y Chani, gracias por su compañía, amistad y por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Cecilia Rauch, Andrea Vargas y Alejandro San Martín, por hacer de nuestro espacio de trabajo, unido y amigable. Gracias por su ayuda y por las entretenidas conversaciones, no esta demás decir que fue un placer tenerlos de compañeros de trabajo.

A Mariela y a su familia, por el apoyo brindado en todo momento, gracias.

Y a todos los que de una u otra manera me apoyaron y compartieron conmigo durante esta etapa de mi vida.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1030346.

***A mi querido hijo Joaquín***

***A mis padres y hermanos***

## INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>SUMMARY</b>	2
2	<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
2.1	Objetivo General	10
2.1.1	Objetivos Específicos	10
3	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
3.1	Materiales y reactivos	15
3.1.1	Anticuerpos primarios	18
3.1.2	Equipos	19
3.2	Métodos	20
3.2.1	Elaboración de medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido y con agar	20
3.2.2	Creación del promotor H1 inducible por reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	20
3.2.3	Subclonamiento en pGEM-T Easy	21
3.2.4	Transformación en bacterias <i>E. coli</i>	22
3.2.5	Purificación de DNA por el método de ebullición (Boilling)	22
3.2.6	Análisis con endonucleasas de restricción	23
3.2.7	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	23
3.2.8	Extracción de DNA desde geles de agarosa	24

3.2.9	Preparación de pSuper inducible (pSuper_tet)	24
3.2.10	Diseño de secuencias para shRNA	28
3.2.10.1	Secuencias para hGBF1	28
3.2.10.2	Secuencias para hBIG1	29
3.2.10.3	Secuencias para hBIG2	29
3.2.11	Clonamiento de oligos en pSuper y pSuper_tet	29
3.2.12	Purificación de DNA plasmidial por kit comercial	30
3.2.13	Cuantificación de DNA plasmidial	31
3.2.14	Cultivo celular	32
3.2.15	Transfecciones transientes	32
3.2.16	Análisis del transporte vesicular de VSV-G-YFP (ts-045)	33
3.2.17	Inmunocitoquímica	35
3.2.17.1	Anticuerpos y sus respectivas diluciones	36
3.2.17.1.1	Anticuerpos primarios	36
3.2.17.1.2	Anticuerpos secundarios	37
3.2.18	Extracción de proteínas desde líneas celulares de mamífero	37
3.2.19	Electroforesis en geles de poliacrilamida	38
3.2.20	Western Blot	39
3.2.21	Microscopia de fluorescencia (epifluorescencia o confocal)	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
4.1	Diseño de secuencias y estrategias de clonamiento.	41
4.2	Análisis cuantitativo del silenciamiento de hGBF1 y hBIG1 por Western Blot no es suficientemente sensible.	46

4.3	Creación de pSuper inducible, un vector más versátil.	52
4.4	Optimización de pSuper_tet para clonamiento de oligos siRNA.	57
4.5	Efecto del silenciamiento de hGBF1 y hBIGs sobre los marcadores de la vía secretoria.	61
4.6	Los análisis cuantitativos confirman los resultados observados en los marcadores por inhibición de la expresión de hGBF1 y hBIGs.	66
4.7	La inhibición de la expresión de hGBF1 mediante shRNAs bloquea la secreción de la proteína VSV-G.	66
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
5.1	Confección y mejoramiento de herramientas	79
5.2	Efectos obtenidos con la aplicación de las herramientas confeccionadas.	81
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	La utilización de si RNA disminuye la expresión endógena de hGBF1 y hBIG1.	13
2	Mapa de pGEM-T Easy + PCR (H1 modificado) generado con el software pDRAW32.	25
3	Mapa de pSuper generado con el software pDRAW32.	26
4	Análisis virtual del ensayo con endonucleasas generado con el software pDRAW32.	27
5	Diagrama de incubación y temperatura en los experimentos de secreción.	34
6	Esquema del plasmidio pSuper (sitios de clonamiento y marcadores).	42
7	Análisis de restricción de pSuper con fragmento del bacteriófago lambda insertado.	44
8	Análisis de restricción de la doble digestión de pSuper con fragmento del fago lambda insertado.	45
9	Doble digestión <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> para la verificación de las secuencias clonada en pSuper.	47
10	Eficiente silenciamiento de hGBF1 no afecta la expresión de hBIG1.	49
11	Eficiente silenciamiento de hBIG1 no afecta la expresión de	51

	hGBF1.	
12	Esquema de modificación de promotor H1.	54
13	Modificaciones y preparación de pSuper_tet.	56
14	Análisis de restricción de pSuper inducible modificado con fragmento del bacteriófago lambda.	58
15	Análisis de restricción de la doble digestión pSuper_tet modificado con fragmento del fago lambda.	59
16	Confirmación de las secuencias clonada en pSuper_tet por doble digestión <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> .	60
17	Inhibición en la expresión de hGBF1 por medio de shRNAs altera la distribución de los marcadores tempranos de la vía secretoria.	63
18	Inhibición en la expresión de hBIGs por medio de shRNAs no altera la distribución de los marcadores de la vía secretoria.	65
19	Análisis cuantitativo de los marcadores de la vía secretoria no alterados por inhibición de la expresión de hGBF1 y hBIGs.	67
20	pSuper_tet vacío no bloquea la secreción de VSV-G.	70
21	La inhibición de la expresión de hGBF1 bloquea la secreción de VSV-G.	72
22	La inhibición de la expresión de hBIGs no bloquea la secreción de VSV-G.	74

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Análisis cuantitativo del silenciamiento de hGBF1 y hBIGs.	53

## ABREVIATURAS

ARF	Factor de ADP ribosilación
BFA	Brefeldina A
BSA	Albúmina sérica de bovino
DAB	Diaminobencicina
DMEM	Medio de cultivo Tagle modificado por Dulbecco
DNAsa	Desoxirribonucleasa
ddH <sub>2</sub> O	Agua bidestilada
EBNA	Antígeno nuclear EPSTEIN-BARR
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
GEF	Factor de intercambio de GTP
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
PBS	Tampón fosfato salino
RNAsa	Ribonucleasa
<i>pfu</i>	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	NNN` , N`-tetrametilenetilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
<i>Taq</i>	DNA polimerasa <i>Termophylus aquaticus</i>

VSV-G-ts-045 (YFP) Mutante termosensible de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular con el gen reportero para la proteína fluorescente amarilla

## 1. RESUMEN

Los factores de intercambio de GTP (GEFs) son fundamentales para la activación de los factores de ADP-ribosilación (ARFs), los cuales son necesarios en el reclutamiento del manto proteico COPI y el tráfico de proteínas en la vía secretoria para secreción. Este trabajo se enfocó en los tres GEFs caracterizados a la fecha en mamíferos: GBF1, BIG1 y BIG2, los cuales se localizan en regiones mutuamente exclusivas del Golgi (*cis* para GBF1 y *trans* para BIG1 y BIG2) y exhiben distintas preferencias por sustratos *in vitro* (ARF 5 para GBF1 y ARF 1 para BIG1 y BIG2).

Con la finalidad de conocer más sobre la función de estas proteínas, hemos diseñado dos construcciones de siRNA para cada uno de estos GEFs en el vector pSuper, las cuales expresan horquillas de RNA para el silenciamiento génico de cada uno de los transcritos blanco. Se efectuaron experimentos en las líneas celulares HeLa y 293 EBNA, las cuales fueron transformadas con las construcciones por medio del uso de lípidos catiónicos. Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia y Western blot. Después de verificar el silenciamiento provocado por las construcciones, se pudo comprobar que la inhibición de GBF1 provoca una alteración en los marcadores tempranos de la vía secretoria, con el consecuente bloqueo de la secreción de la glicoproteína VSV-G-ts-045 y acumulación de ésta en estructuras localizadas entre el retículo endoplasmático y el Golgi. Por el contrario, el silenciamiento de BIG1 y/o BIG2 no provocó ninguna alteración observable, ya sea en los marcadores de la vía secretoria como en la secreción de una glicoproteína.

## SUMMARY

The GTP Exchange Factors (GEFs) are key enzymes required for the activation of the ADP-Ribosylation Factors (ARFs) and the subsequent recruitment of the coat COPI. These events are essential for vesicle formation and the traffic of secretory proteins.

The present work is focused on three of these GEFs: GBF1, BIG1 and BIG2, which are located on mutually exclusive regions of Golgi (cis for GBF1 and trans for BIG1 and BIG2) and exhibit different substrate preferences *in vitro* (ARF 5 for GBF1 and ARF1 for BIG1 and BIG2).

In an effort to increase our understanding in the functional differences of these enzymes we made two inhibitory constructs for each GEF on the pSuper vector. These shRNA molecules so produced, specifically target each of the selected transcripts. Experiments employing HeLa and 293 EBNA cells transfected with these constructs were designed to test the effects of lowering the protein levels (knockdown) for each of these GEFs. After verifying the knockdown produced for each construct, we observed that only the knockdown of GBF1 produces the alteration of early markers of the secretory pathway. Additionally the secretion of the glycoprotein VSVG-ts-045 to the plasma membrane was blocked, while it accumulated on compartments between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. None of these effects was observed with the knockdown of BIG1 and/or BIG2.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las células en su constante comunicación con el medio, poseen la capacidad de interactuar con él, captar sus nutrientes y procesarlos, eliminar sustancias de desecho provenientes del metabolismo, así como también captar los estímulos del medio y reaccionar frente a ellos. Para que tales eventos ocurran, es necesario que en su medio interno ocurran un sinnúmero de procesos. Se requiere fundamentalmente de la síntesis de proteínas tales como: proteínas de membrana, proteínas de secreción y enzimas lisosomales, entre otras. Todas éstas deben obligatoriamente pasar a través de la vía secretoria. Esta vía, compuesta por una red de sistemas membranosos interconectados por un complejo sistema de transporte vesicular, está encargada de modificar, seleccionar y distribuir cada proteína según la finalidad para la cual fue sintetizada. Este tráfico vesicular funciona en dos direcciones, una anterógrada, encargada de ir madurando las proteínas a medida que avanzan hacia su destino final; y una retrógrada, responsable del reciclaje a compartimentos previos de factores itinerantes y enzimas que han escapado de su mecanismo de retención. Estos procesos deben además mantener un equilibrio dinámico para preservar la integridad funcional y espacial de los elementos que lo componen.

En el transporte anterógrado, las proteínas son translocadas inicialmente al lumen del retículo endoplásmico (RE), mediante el reconocimiento del péptido de señal por un complejo protéico, Translocador protéico o Translocón (un poro o canal). Una vez en el interior, las características estructurales, junto a la maquinaria enzimática del retículo endoplásmico, le proporcionan a estas proteínas modificaciones que son

indispensables para su correcto direccionamiento en la vía secretoria. Luego de concluida su síntesis, éstas son seleccionadas para posteriormente ser transportadas por medio de vesículas, desde subdominios especializados del Retículo Endoplásmico denominados ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites) hacia estructuras membranosas irregulares denominadas VTCs (Vesiculo Tubular Clusters). Inmediatamente después de su formación, estas estructuras viajan sobre microtúbulos en dirección al complejo de Golgi. En el camino, los VTCs se congregan para dar forma al ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment). Aquí las proteínas de carga son seleccionadas, separadas de las proteínas residentes del retículo endoplásmico y direccionadas hacia la cara *cis* del complejo de Golgi. Durante su progresión por la vía secretoria estas proteínas son modificadas enzimáticamente a medida que van avanzando progresivamente a través de las cisternas de este complejo. Finalmente, el viaje de estas proteínas concluye con su llegada a la cara *trans* del Golgi o TGN (Trans-Golgi Network), en donde son seleccionadas y distribuidas hacia su destino final, incluyendo endosomas, membrana plasmática, lisosomas o gránulos secretorios.

Una característica importante de estas vesículas membranosas, es que se encuentran recubiertas por complejos proteicos. El nacimiento de una nueva vesícula depende del reclutamiento de estos complejos citosólicos, los que se unen entre sí formando verdaderos “mantos” sobre la membrana en la región que se yemará para dar origen a la vesícula.

COPI es el manto que media el transporte vesicular retrógrado desde el Golgi hacia el retículo endoplásmico, (Donaldson *et al.*, 1992a) y su correcto funcionamiento es

fundamental para la integridad de la vía secretoria. Morfológicamente, COPI es un complejo citosólico pre-ensamblado compuesto por siete péptidos (Waters *et al.*, 1991) y el reclutamiento de estos complejos en las membranas produce yemas cubiertas por este manto, que eventualmente darán origen a vesículas de transporte recubiertas.

Para que COPI sea reclutado sobre la membrana existe un evento que activa este proceso. El control está dado por la activación de una familia de GTPasas de bajo peso molecular llamadas ARFs (ADP Ribosylation Factor), las que se encuentran ampliamente distribuidas en el citoplasma en su forma inactiva unida a GDP. De los ARFs descritos (1, 3, 4, 5 y 6), ARF1 es el más estudiado y es utilizado como modelo. La activación de estos ARFs está determinada por el cambio de estado, pasando de uno inactivo unido a GDP a uno activo unido a GTP; este último es el que finalmente inicia el reclutamiento de COPI a las membranas involucradas (Zhao *et al.*, 1997). Esta tarea la lleva a cabo una familia de proteínas conocidas con el nombre de GEFs (GTP Exchange Factors), las que estimulan el intercambio de GDP por GTP (Chavrier y Goud, 1999; Jackson y Casanova, 2000). La desactivación de ARF1 ha sido estudiada en detalle, y depende de un factor de activación de GTPasa o GAP (GTPase Activating Protein), la cual hidroliza el fosfato gama de GTP unido a ARF1 a GDP.

Múltiples miembros componen la familia de los GEFs, la que se divide en dos clases: GEFs de pequeño peso molecular, cuyas masas no superan los 60 kDa; y los de gran peso molecular, cuyas masas se encuentran por sobre los 160 kDa. Dentro de este último grupo encontramos a los tres integrantes que son de principal interés en este estudio: BIG1 y BIG2 (Brefeldin A-Inhibited GEFs), (Morinaga *et al.*, 1996; Togawa *et*

*al.*, 1999) y GBF1 (Golgi-specific Brefeldin A resistance Factor), (Claude *et al.*, 1999), todos ellos descritos en mamíferos.

Brefeldina A (BFA), es una lactona heterocíclica de origen fúngico que bloquea la secreción de proteínas (Misumi *et al.*, 1986). Ha sido utilizada en numerosas investigaciones sobre el complejo de Golgi. Esta droga interfiere con el reclutamiento de los ARFs a las membranas, a través del bloqueo del intercambio de GDP por GTP, evitando así su activación (Donaldson *et al.*, 1992b; Helms y Rothman, 1992; Randazzo *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1995; Franco *et al.*, 1996; Antony *et al.*, 1997). El efecto observado en las células tratadas con dicho compuesto, es la dispersión del complejo de Golgi y la redistribución de sus enzimas residentes hacia el RE (Pelham, 1991; Klausner *et al.*, 1992). Específicamente BFA se une y estabiliza el complejo ARF/GDP/GEF (Peyroche *et al.*, 1999; Mansour *et al.*, 1999), bloqueando el ciclo de activación de ARF. En los eventos subsiguientes, al estar bloqueada la activación de ARF, no hay reclutamiento de COPI a las membranas, lo que produce la tubulación del aparato de Golgi (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998). En este proceso las membranas de Golgi forman un conducto por el cual se desencadena la descarga del contenido del Golgi al RER, siendo el primero reabsorbido por el segundo.

Con respecto a los GEFs responsables de la activación de ARF y el reclutamiento de COPI, estos se concentran en distintas regiones de la vía secretoria. BIG1, es un GEF de 209 kDa que se encuentra en la cara *trans* del complejo de Golgi y su sobreexpresión no induce resistencia a BFA (Claude *et al.*, 1999). Estudios detallados indican que BIG1 posee la capacidad de activar ARF1 y ARF3 (Morinaga *et al.*, 1996).

BIG2 (202 kDa), el cual también localiza en la región *trans* del Golgi al igual que BIG1, posee la capacidad de activar ARF1 y ARF3. No induce resistencia a BFA cuando es sobreexpresado (Shinotsuka *et al.*, 2002) y es capaz de estabilizar la presencia de ARF1 y AP-1 en el TGN en presencia de BFA (Shinotsuka *et al.*, 2002). Estudios avalan que tanto BIG1 como BIG2 colocalizan en el TGN y se postula que forman parte de un mismo heterodímero (Yamaji *et al.*, 2000).

GBF1 por su parte, es un GEF de 206 kDa que se desplaza cíclicamente entre el citosol y las membranas del cis Golgi y de la región ERES/VTC (Zhao *et al.*, 2002). Al contrario que los BIGs, su sobreexpresión genera resistencia a BFA y tiene además como efecto la disminución en los niveles normales de BIG1 (Claude *et al.*, 1999). Algunos datos obtenidos *in vitro* sugieren que GBF1 utiliza preferentemente ARF5 como sustrato (Claude *et al.*, 1999), aunque observaciones realizadas *in vivo* han determinado que también puede actuar sobre ARF1 y ARF3 (Kawamoto *et al.*, 2002). Recientes hallazgos indican que GBF1 regula la interacción dinámica de ARF/COPI en el transporte entre el RE y el Golgi, siendo requerido para la formación y maduración de los VTCs; además de ser esencial para la mantención de la integridad del Golgi (García-Mata *et al.*, 2003).

Aún con todos estos datos, se desconoce si existe interacción entre GBF1 y algún tipo de proteína específica del complejo de Golgi o si bajo determinadas circunstancias utiliza uno u otro ARF como sustrato. Tampoco son conocidas las consecuencias producidas por una inactivación o disminución importante en los niveles de GBF1 sobre la morfología y funcionalidad del RE, ERES, VTC, ERGIC y Golgi. Lo más probable, a la

luz de los conocimientos que actualmente se manejan, es que la vía secretoria quede bloqueada en algún nivel entre el RE y el Golgi. Otro punto desconocido es la interregulación entre los distintos GEFs y ARFs; de existir habría que evaluar las posibles variaciones en los niveles de los distintos GEFs y ARFs cuando la expresión de GBF1 sea inhibida.

Considerando especialmente este último punto, el estudio del fenotipo celular al inhibir la expresión de GBF1 puede otorgar valiosa información sobre su actividad normal en la célula. La técnica del RNA de interferencia (RNAi) ha demostrado ser una eficaz herramienta para llevar a cabo el silenciamiento funcional de determinados genes.

El silenciamiento génico mediante esta técnica, es un proceso en el cual doble hebras de RNA (dsRNA) inducen la degradación post-transcripcional de transcritos homólogos. Este mecanismo de silenciamiento secuencia-específico de genes es activado por un RNA de doble hebra (dsRNA), que presenta homología con una fracción del transcrito del gen blanco, causando finalmente su degradación (Fire, 1999; Sharp, 2001; Hammond *et al.*, 2001; Tuschl, 2001). Este fenómeno ha sido observado en una gran variedad de organismos, incluyendo plantas, hongos, insectos, protozoos y mamíferos (Bernstein *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001a; 2001b; Moss, 2001), donde dsRNA son procesadas en el interior de la célula en fragmentos de 19 a 23 pares de bases conocidos con el nombre de siRNAs (small interfering RNAs), (Elbashir *et al.*, 2001a; 2001b). Estos siRNAs se unen a un complejo enzimático denominado RISC (RNA-induced silencing complex), activándolo. Este complejo RNA-enzima es el que finalmente provoca la degradación al mRNA homólogo (Bernstein *et al.*, 2001b;

Hammond *et al.*, 2001). En la práctica, el silenciamiento dirigido de la expresión de un gen puede lograrse introduciendo directamente siRNAs, ya sea por transfección o por expresión endógena, donde finalmente se unen al complejo enzimático en el interior de la célula generando silenciamiento del mRNA deseado.

Trabajos recientes demuestran que en células humanas los siRNAs pueden ser transcritos eficazmente por la RNA polimerasa III, siendo capaces de producir una degradación mRNA-específica (Ketting *et al.*, 2001; Brummelkamp *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Miyagishi y Taira, 2002; Paul *et al.*, 2002). Con este fin se ha utilizado el promotor de U6snRNA (small nuclear RNA U6) en construcciones que expresan secuencias de siRNA. Estas secuencias lineales de DNA que codifican a los siRNAs han sido transfectados temporalmente en células humanas usando plasmidios, logrando inhibiciones de la expresión de los genes blanco de hasta un 90% (Castanotto *et al.*, 2002). Nuevas y eficientes herramientas para este fin se han confeccionado, tal es el caso de pSuper RNAi system, un plasmidio en el cual se pueden insertar secuencias específicas para silenciar el gen deseado. Además posee marcadores que facilitan su identificación y selección en células mamíferas y poder así lograr una inhibición específica que es capaz de prolongarse establemente en el tiempo.

Trabajos realizados en el silenciamiento de la expresión de hGBF1, hBIG1 y hBIG2 en cooperación con el laboratorio del Dr. Paul Melançon (U. Alberta, Canadá), con oligos sintéticos de RNA han demostrado ser muy eficientes. La información obtenida a través del uso de éstos, ha sido fundamental ya que nos ha revelado la naturaleza de las secuencias requeridas para nuestro análisis.

En la figura 1 se ilustra un experimento, del cual se recopiló información sobre los tiempos óptimos de inhibición de la expresión de hGBF1 y hBIG1 en células HeLa que han sido transformadas con oligos sintéticos de RNA, demostrando que el efecto máximo en el silenciamiento de la señal corresponde al intervalo entre 72 y 96 h. Por lo tanto, la utilización de la técnica de siRNA demuestra ser una poderosa herramienta para silenciar de forma energética y selectiva la expresión de los distintos GEFs de la vía secretoria. Esta inhibición específica puede ser utilizada para el análisis en detalle de la función de cada GEF.

Con los antecedentes anteriormente descritos, se postula la siguiente hipótesis:

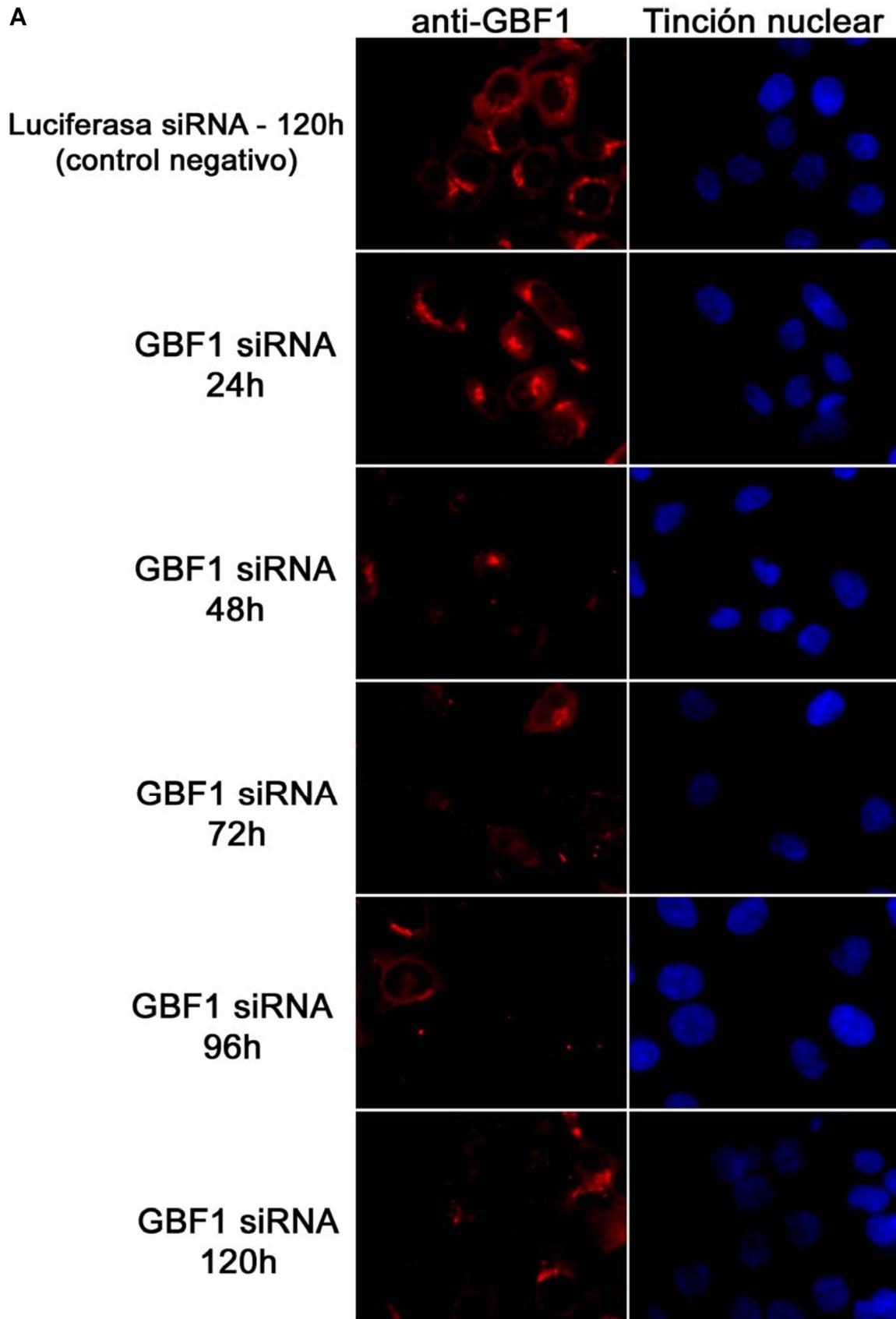
**La disminución en la expresión de las proteínas hGBF1 y hBIGs, afecta selectivamente la función y morfología de diversos elementos en la vía secretoria.**

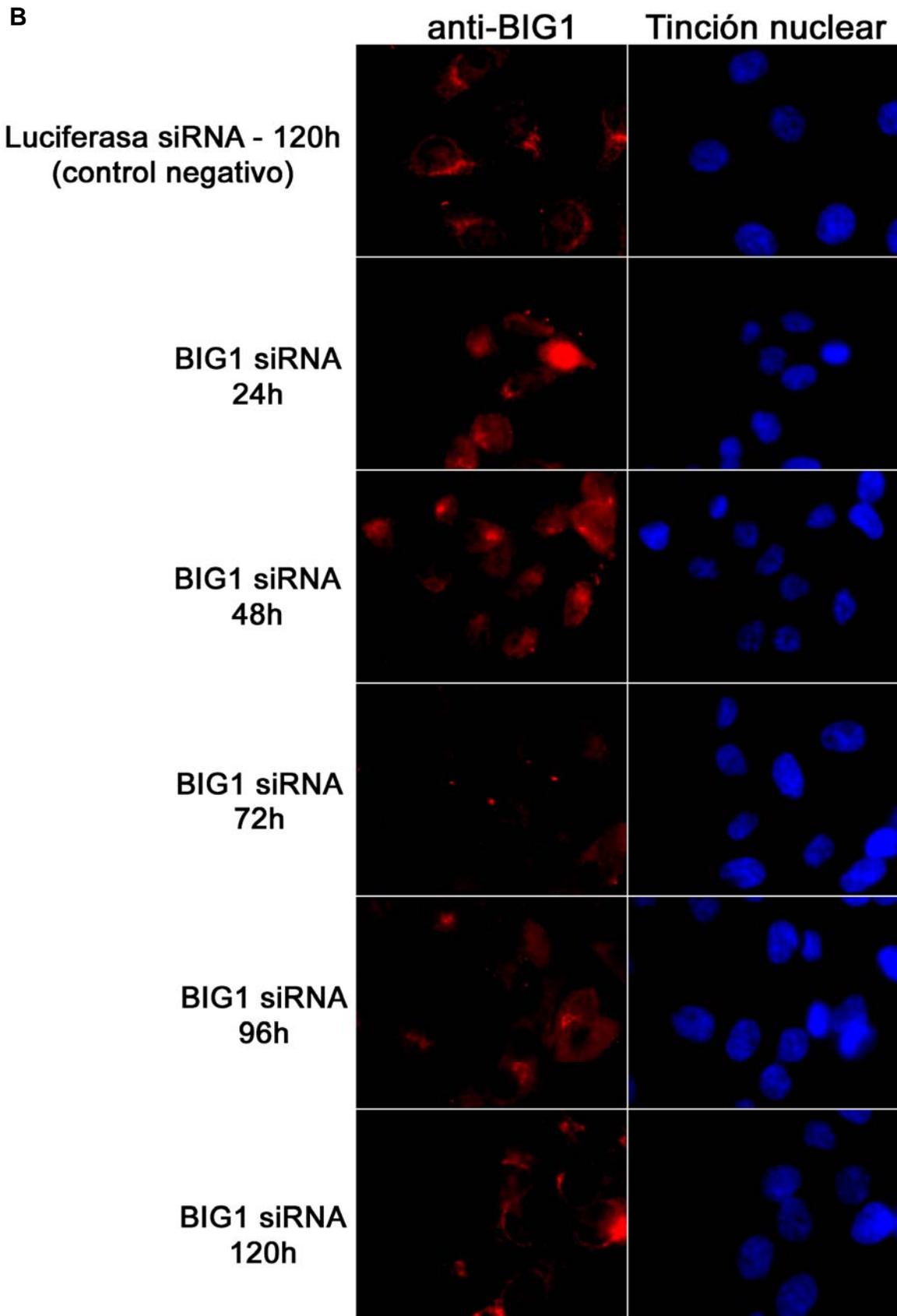
## **2.1. Objetivo general**

Estudiar la diferencia funcional de hGBF1 y hBIGs en la vía secretoria, mediante la inhibición de su expresión por la técnica de siRNA.

### **2.1.1. Objetivos específicos**

1. Diseño de oligos a partir de secuencias conocidas y construcción de siRNAs en el vector pSuper (Oligoengine, Seattle, USA).
2. Optimización de la técnica siRNA en células humanas Hela y 293 EBNA.
3. Análisis del efecto del silenciamiento de hGBF1 o hBIGs sobre marcadores de la vía secretoria.





**Figura 1: La utilización de siRNA disminuye la expresión endógena de hGBF1 y hBIG1.** Células HeLa fueron transformadas con oligómeros sintéticos de RNA dirigidos contra GBF1 ó BIG1 y crecidas por los tiempos indicados. Los cultivos fueron fijados y procesados para microscopía de fluorescencia utilizando los anticuerpos H154 (a-GBF1) y 9D3 (a-BIG1). La tinción nuclear se obtuvo por medio de DAPI. Panel A: muestra la inhibición de hGBF1. Panel B: muestra la inhibición de hBIG1. Imágenes gentileza de Dr Alejandro Claude y Dr Paul Melançon (U. de Alberta, Canadá).

4. Análisis del efecto del silenciamiento de hGBF1 o hBIGs sobre el tráfico de una proteína secretoria modelo hacia la membrana plasmática.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales y reactivos

**Amersham:** Sistema de quimioluminiscencia para detección de Western Blot ECL.

**Arquimed:** placas Petri.

**AXIGEN:** tubos para PCR (0.5ml), tips blancos (0,1-10 ul), tips amarillos (1-200ul), tips libres de DNAsa y RNAsa (0.5-10ul), tips azules (100-1000ul).

**BD (Becton, Dickinson and Company):** extracto de levadura y Bacto triptona.

**BioAxis:** kit de purificación de DNA desde geles de agarosa Megapure, deoxinucleotidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP).

**Bio Rad:** Anticuerpo IgG de cabra conjugado con peroxidasa contra IgG de conejo, marcador de peso molecular rango amplio, preteñido.

**Corning:** tubos de 15ml, tubos 50ml.

**DAKO:** medio de montaje (fluorescent mounting medium).

**EZNA:** kit purificación de DNA mini preparación.

**Falcon:** tubos de 15 ml, tubos de 50 ml.

**Fermentas:** T<sub>4</sub> DNA ligasa (10 U/ul), CIAP fosfatasa alcalina de intestino de cabra (1U/ul), enzimas de restricción: *HindIII* (10U/ul).

**Gene Therapy Systems:** reactivo de transfección PerFectin.

**Gibco BRL:** OptiMEM, marcador de DNA fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*, agua destilada libre de DNAsa y de RNAsa.

**Hyclone:** suero fetal bovino, L-glutamina 100X, Penicilina G 100X, Estreptomicina 100X, tripsina 1X y DMEM.

**Invitrogen:** Línea celular 293-EBNA, enzimas de restricción: *Bam*HI (10U/ul), *Hind*III (10U/ul), *Bg*II (10U/ul).

**Life Technologies:** Higromicina B.

**Merck:** 2-mercaptoetanol.

**MOBIO:** kit purificación de DNA mini preparación, agua libre de RNAsa y DNAsa.

**Molecular Probes:** anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 594, anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 594.

**NEB (New England Biolab):** enzimas de restricción: *Af*II (10U/ul), *Eco*RI (15U/ ul).

**Orange:** placas de cultivo de 6 pocillos, placas de cultivo de 12 pocillos, placas de 35, 60 y 100mm.

**QIAGEN:** kit purificación de DNA midi preparación.

**Roche:** Reactivo de transfección FuGene 6.

**US Biological:** cloramfenicol, x-gal, IPTG, Anfotericina B.

**SIGMA:** Brefeldina A, gelatina y la síntesis de los siguientes oligonucleotidos de DNA.

**Partidores:**

H1:5'-CGATAAGCTTAGATCTCTATCACTGATAGGGAACTTATAAGATTCCCAAATC  
C-3'

T7: 5'-AATACGACTCACTATAG-3'

**Oligos:**

a) Dirigidos hacia hBIG1:

Bfwd: 5'-GATCCCCGATCACAAATGGATGGTTATTCAAGAGATAACCATCCATTTGTG  
ATCTTTTTTA-3'

Brev: 5'-AGCTTAAAAAGATCACAAATGGATGGTTATCTCTTGAATAACCATCCATTTG  
TGATCGGG-3'

Cfwd: 5'-GATCCCCGAACTACGATCCAAGATTCTTCAAGAGAGAATCTTGGATCGTAG  
TTCTTTTTTA-3'

Crev: 5'-AGCTTAAAAAGAACTACGATCCAAGATTCTCTCTTGAAGAATCTTGGATCG  
TAGTTCGGG-3'

b) Dirigido hacia hGBF1:

2fwd: 5'-GATCCCCGCAAGGACTTTGAGCAAGATTCAAGAGATCTTGCTCAAAGTCCT  
TGCTTTTTTA-3'

2rev: 5'-AGCTTAAAAAGCAAGGACTTTGAGCAAGATCTCTTGAATCTTGCTCAAAGTC  
CTTGCGGG-3'

3fwd: 5'-GATCCCCGAACCTGCCAGTGTATTTGGTTCAAGAGACCAAATACACTGG  
GCAGGTTCTTTTTTA-3'

3rev: 5'-AGCTTAAAAAGAACCTGCCAGTGTATTTGGTCTCTTGAACCAAATACACTG  
GGCAGGTTTCGGG-3'

c) Dirigidos hacia hBIG2:

Alfa fwd: 5'-GATCCCCGAAAGAGGCTCATCACTGTTTCAAGAGAACAGTGATGAGCC  
TCTTTCTTTTTTA-3'

Alfa rev: 5'-AGCTTAAAAAGAAAGAGGCTCATCACTGTTCTCTTGAACAGTGATGAG  
CCTCTTTTCGGG -3'

Gama fwd: 5'-GATCCCCGGATAAGTGTTGTGTATAATTCAAGAGATTATACACAACAC  
TTATCCTTTTTTA-3'

Gama rev: 5'-AGCTTAAAAAGGATAAGTGTTGTGTATAATCTCTTGAATTATACACAAC  
ACTTATCCGGG-3'

Delta fwd: 5'-GATCCCCGCAAGACGGTGTAGTGTGATTCAAGAGATCACACTACACC  
GTCTTGCTTTTTTA-3'

Delta rev: 5'-AGCTTAAAAAGCAAGACGGTGTAGTGTGATCTCTTGAATCACACTACA  
CCGTCTTGCGGG-3'

**Winkler:** Cloruro de sodio, agar-agar, agarosa, sulfato de amonio, acetato de amonio, cloruro de amonio, persulfato de amonio, hidroxiquinolina, glicina, glucosa anhidra, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, dodecilsulfato de sodio (SDS), marcador de DNA escala de DNA 1Kb, azul de Bromofenol, Tween 20, glicerol, glicerina, triton X-100, alcohol etílico, hidróxido de sodio, tris, ampicilina sal sódica, bromuro de etidio, alcohol isopropílico, ácido acético glacial.

### 3.1.1. Anticuerpos primarios.

H154, anticuerpo policlonal generado contra el dominio carboxilo de GBF1 humano descrita en Claude *et al.*, 1999.

9D4, anticuerpo policlonal fue generado contra la región Sec7 de hGBF1 descrita en Claude *et al.*, 2003.

9D3, anticuerpo policlonal generado contra la región Sec7 de hBIG1 descrita en Claude *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2002.

7D1, anticuerpo monoclonal contra la proteína p115 humana descrita en Waters *et al.*, 1992.

M3A5, anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ COP humana descrita en Allan and Kreis *et al.*, 1986.

Anti-Gigantina, suero policlonal gentileza de E. Chen, U. of Calgary, AB, Canadá.

X22, anticuerpo policlonal contra clatrina humana gentileza Dr. Paul Melançon, U. Alberta, Canadá.

Anti-VSV-G, anticuerpo monoclonal gentileza Dr. Paul Melançon, U. Alberta, Canadá.

### **3.1.2. Equipos**

Los siguientes equipos fueron utilizados:

Espectrofotómetro UV-150-02 de Shimadzu; sistema para electroforesis de geles de agarosa Bio JSP; transiluminador TFX-20 M de Vilber Lourmat; cámara digital para geles Spectroline (model CA-1000/F) con monitor e impresora Sony (UP-860); incubador para cultivo con inyección de CO<sub>2</sub> SANYO; incubador bacteriológico tipo seco Electric Company (Blue M); microcentrifuga Eppendorf 5415R; baño termostático ORTHMANN; centrifuga Sorvall (RC-5); cámara de transferencia Bio-Rad (Trans-Blot SD); balanza analítica Shimadzu (LIBROR AEX-120G); balanza Kern 8440-33; cámara de flujo laminar NuAire (class II, type A); agitador Daiki LBLee 1001; microscopio invertido Nova (IN 833); microscopio de epifluorescencia Zeiss (Axioskop HBO 50); microscopio confocal (Zeiss Axiovert 100M); pHmetro Radiometer Copenhagen (PHM 83 Autocal); termociclador MJ Research (Mini Cyclor).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Elaboración de medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido y con agar.

El medio LB consta de 10g/l de NaCl, 10g/l de triptona y 5g/l de extracto de levadura, que luego de su preparación es autoclavado inmediatamente y enfriado previa utilización.

Para la preparación de placas, se le agrega al medio LB, 15g/l de agar. Después de autoclavar se deja enfriar hasta los 50 °C y se agrega el antibiótico requerido (ampicilina 100 µg/ml), se mezcla por agitación orbital y se procede a alicuotar 20 ml en placas Petri estériles.

### 3.2.2. Creación del promotor H1 inducible por reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Para la obtención del fragmento modificado del promotor H1 presente en pSuper, se utilizó la técnica de PCR, donde se empleó el mismo vector como templado. Para ello se utilizaron los oligos H1 y T7 (Partidores sección 3.1).

Para la reacción se mezclaron 5 µl de tampón PCR 10X, 4 µl de dNTPs en una concentración de 2,5 mM de cada uno, 5 µl de solución de MgSO<sub>4</sub> 25 mM, 3 µl de vector pSuper 50 ng/ul, 1 µl de cada oligo a una concentración de 10 µM, 1µl de una mezcla de *Pfu* Turbo/ *Taq* Polimerasa en una relación 1:5 U y 28 µl de agua libre de nucleasa. Se utilizó el termociclador con el siguiente programa: a) 30 ciclos de: denaturación por 1

min a 95°C; apareamiento 1 min a 62°C; elongación 2 min a 72°C, y b) una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

### **3.2.3. Subclonamiento en pGEM-T Easy.**

Debido a que el fragmento generado (PCR) presenta el sitio *HindIII* muy cercano hacia el extremo 3', lo cual dificulta la digestión enzimática, se procede a ligar el producto en pGEM-T Easy de Promega. Este al poseer una timina adicional hacia el extremo 3' terminal, es capaz de unir los fragmentos de PCR producidos con Taq polimerasa, ésta agrega una adenina en el extremo 3' terminal.

pGEM-T Easy además posee los genes que codifican para la resistencia contra Ampicilina como también el gen de la  $\beta$ -galactosidasa, lo que permite discriminar las colonias de bacterias que poseen el vector transformado del que solo se religó. El sitio de clonamiento interrumpe la expresión del gen de la  $\beta$ -galactosidasa que es capaz de hidrolizar el sustrato presente en el medio (X-Gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) para dar un producto coloreado azul, por lo tanto, aquellas colonias de bacterias que poseen el inserto añadido serán blancas.

### **3.2.4. Transformación en bacterias *E. coli*.**

Se prepararon bacterias competentes *E. coli*, cepas JM109 y XL-1Blue utilizando el método  $\text{CaCl}_2$  (Rudchenko *et al.*, 1975). Estas bacterias se mantienen alicuotadas en cantidades de 0,25 ml y congeladas a -70°C. Una vez descongeladas en hielo, a estas se les agregó de 0,1 a 1,0  $\mu\text{l}$  del producto de la ligación (entre 20 y 100 ng); se mezcló suavemente y la mezcla fue incubada por 30 min en hielo. Luego fueron incubadas por

60 seg a 42°C, se agregó 1 ml de medio LB líquido y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación orbital a 210 rpm. Después de ese período fueron sembradas en placas LB-agar con el antibiótico correspondiente (ampicilina para pGEM-T, pSuper y pSuper inducible). Se incubaron las placas en una estufa de cultivo por 14 h a 37°C, donde se observaron las colonias de bacterias que crecieron adquiriendo la resistencia al antibiótico correspondiente.

### **3.2.5. Purificación de DNA por el método de ebullición (Boiling).**

Según lo descrito en el manual de laboratorio de Sambrook (1989), en 5 ml de medio LB se crecieron a 37°C y con agitación constante de 210 rpm las colonias de bacterias transformadas, ya sea por ligaciones con pGEM-T o pSuper. Se tomó 1,5 ml de este cultivo y se centrifugó por 4 min a 2300 x *g*. Se eliminó el máximo de sobrenadante y se agregó 110 µl solución STETL (8 % sacarosa, 5 % Triton X-100, 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0 y lisozima 50 mg/ml) y después de aplicar vortex por 1 min se incubó por 1min a 95-100°C. Luego se centrifugó por 10 min a 16100 x *g* y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio. Se agregó 110 µl de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló por inmersión y se centrifugó por 20 min a 16100 x *g*. Se descartó el sobrenadante, el sedimento se lavó cuidadosamente con etanol 70% para luego centrifugar por 10 min a 16100 x *g*. El sobrenadante se descartó y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco se resuspendió con 25 µl de agua libre de nucleasas.

### **3.2.6. Análisis con endonucleasas de restricción**

Los análisis por digestión con enzimas de restricción fueron llevados a cabo para comprobar clonamientos de fragmentos de PCR o liberación de fragmentos de clonamientos y para subclonamientos. Según lo descrito por el proveedor de cada endonucleasa, se utilizó 1 µg, de DNA (aproximadamente 10 µl), 1,5 µl de tampón 10 x específico para cada enzima, 0,2 ul de enzima (10000-15000 U/ml), 0,2 µl de BSA 100X y 4,1 µl de ddH<sub>2</sub>O. Para las digestiones en las cuales se extraerían fragmentos específicos para subclonamiento, se utilizó el mismo protocolo aumentando la cantidad de materiales 5 veces.

### **3.2.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

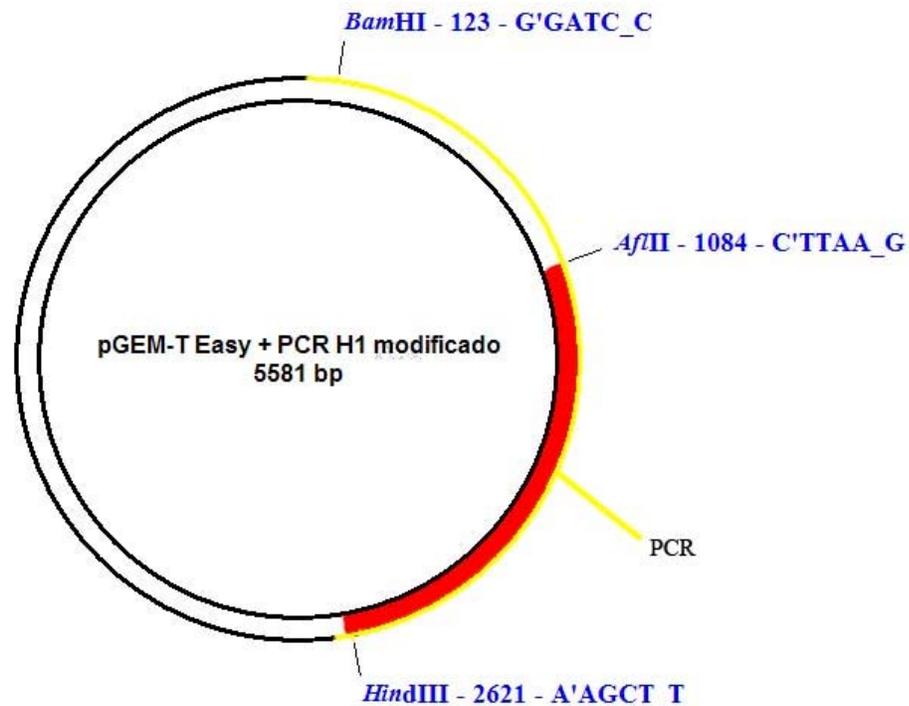
El gel se preparó a una concentración de 1% fundiendo 0,40 grs. de agarosa en 40 ml de tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA), se dejó enfriar hasta los 55°C, y se vertió sobre el molde (9x8 cm). Las muestras se prepararon mezclando 10 µl del DNA (0,12 ug/µl), 2 µl de tampón de carga para DNA 6X (glicerol 50%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,5% en tampón TE) y 1 µl de bromuro de etidio 0,5 mg/ml. Se mezcló y se cargó con micropipeta cada muestra en el gel. Luego, se realizó la corrida electroforética aplicando 5 V/cm por 35 min y se observó la migración del DNA en un transiluminador de luz ultra-violeta por fluorescencia del bromuro de etidio intercalado entre las bases del DNA.

### 3.2.8. Extracción de DNA desde geles de agarosa.

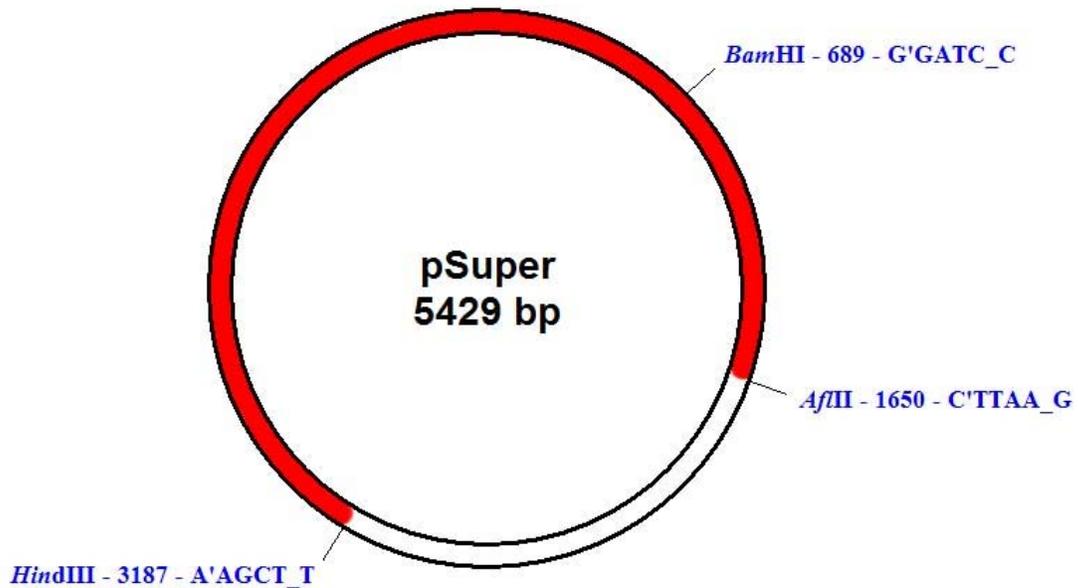
Después de la electroforesis en un gel de agarosa se procedió a extraer el DNA utilizando el kit comercial Megapure®. Se cortó con bisturí la fracción del gel específica que contenía la banda, se agregó la solución “Melt” en proporción 1:1 con el volumen de agarosa en un tubo de 1,5 ml. Luego se calentó a 55 °C hasta lograr la disolución completa, enseguida se agregó solución “Bind” y se dejó por 5 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 4500 x g por 1 min se hicieron 2 lavados con 700 µl solución “Wash”, se dejó secar y se eluyó con 40 µl de agua libre de nucleasas.

### 3.2.9. Preparación de pSuper inducible (pSuper\_tet).

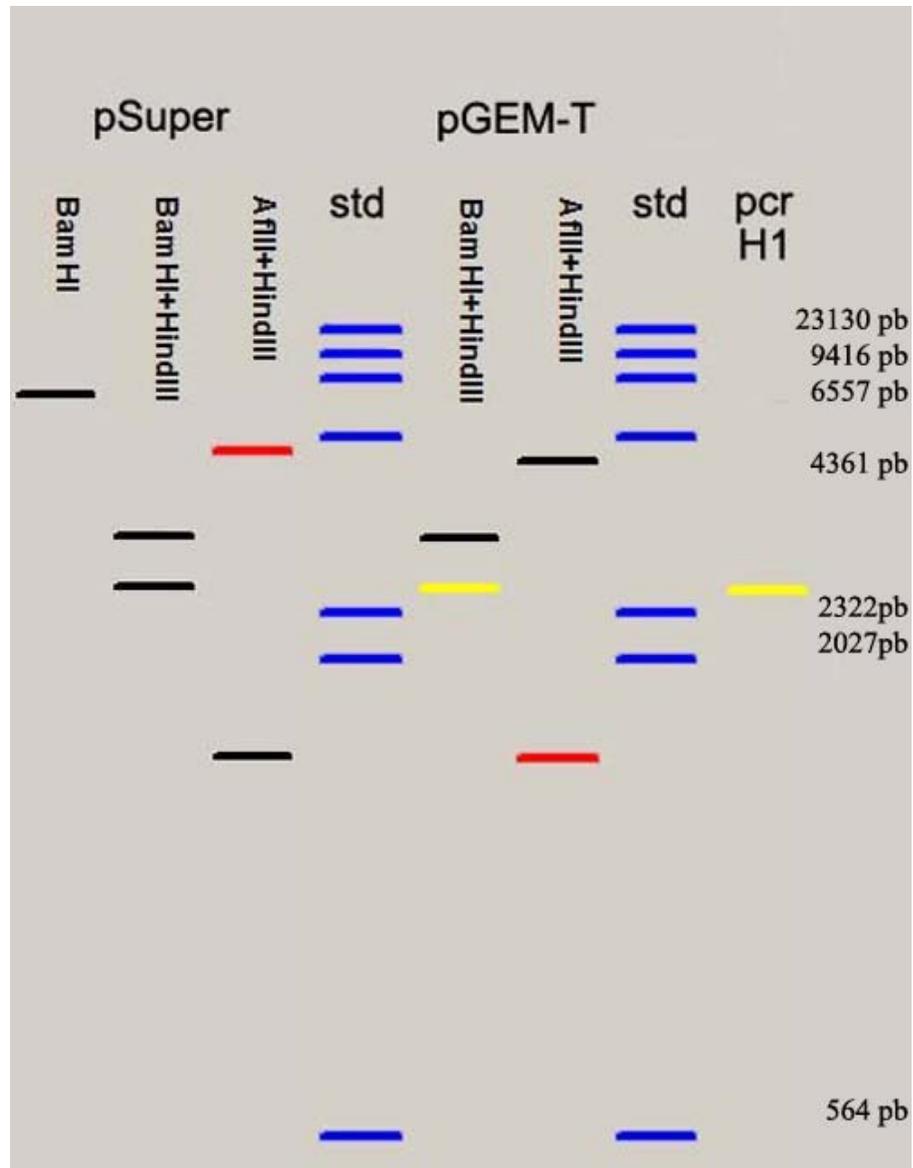
Después del procedimiento de amplificación con mutación sitio dirigida en la cual se modificó la región terminal del promotor H1 de pSuper con la secuencia complementaria a la unión del represor Tet (PCR antes descrito). Este fragmento (2498pb) fue clonado en pGEM-T easy, después repurificado por extracción desde un gel de agarosa después de la digestión con enzimas de restricción (*Bam*HI y *Hind*III). Como se muestra en los esquemas de las figuras 2, 3 y 4, se detectó un problema por la escasa separación de los fragmentos (2498 pb y 3016 pb) para su aislamiento y purificación. Lo mismo ocurre con los sitios de restricción para el vector (pSuper), por lo cual se determinó ocupar otro sitio de restricción dentro del fragmento de PCR. El análisis de secuencia arrojó que el sitio óptimo sería *A*fII. Después con la doble digestión con *A*fII y *Hind*III del fragmento insertado en pGEM-T easy, se logró obtener fragmentos de 1536 pb y 3892 pb. Se recuperó y purificó el fragmento de 1536 pb.



**Figura 2: Mapa de pGEM-T Easy + PCR (H1 modificado) generado con el software pDRAW32.** Localización de los sitios requeridos para la extracción del fragmento del promotor H1 modificado desde pGEM-T Easy. Rojo indica la fracción modificada que se recuperará para la reconstrucción de pSuper. Amarillo indica fragmento generado por PCR (H1 modificado).



**Figura 3: Mapa de pSuper generado con el software pDRAW32.** Localización de los sitios requeridos para modificación del vector pSuper. Rojo indica la fracción no modificada del vector que se recuperara para la reconstrucción del vector.



**Figura 4: Análisis virtual del ensayo con endonucleasas generado con el software pDRAW32. Azul: estándar lambda *Hind*III; amarillo: fragmento H1 modificado (PCR); rojo: fracciones que se recuperarán para la reconstrucción de pSuper\_tet.**

Asimismo se llevó a cabo el tratamiento de pSuper con las endonucleasas antes descritas y se recuperó el fragmento de 3892 pb. Luego se procedió a ligar de estos fragmentos para reconstruir pSuper. Mediante ensayos con enzimas de restricción y secuenciación se verificó que pSuper inducible (pSuper\_tet) estaba construido de forma correcta.

### **3.2.10. Diseño de secuencias para shRNA.**

El vector pSuper esta diseñado para insertar secuencias que funcionarán como silenciadores de genes. Siguiendo el esquema que muestra el proveedor, se diseñaron los oligos con las secuencias blanco tomadas para cada uno de los transcritos. Estos fueron obtenidos de las librerías génicas presentes en NCBI (National Center for Biotechnology Information). A continuación se muestran las secuencias utilizadas:

#### **3.2.10.1. Secuencias para hGBF1**

Secuencia 2:

Ubicación en cDNA: 2590 hasta 2608 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GCAAGGACTTTGAGCAAGA-3'

Secuencia 3:

Ubicación en cDNA: 2978 hasta 2998 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GAACCTGCCCAGTGTATTTGG-3' Se le agregaron dos nucleótidos al original (subrayado).

### 3.2.10.2. Secuencias para hBIG1

Secuencia B:

Ubicación en cDNA: 1636 hasta 1654 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GATCACAAATGGATGGTTA-3'

Secuencia C:

Ubicación en cDNA: 1344 hasta 1362 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GAACTACGATCCAAGATTC-3'

### 3.2.10.3. Secuencias para hBIG2

Secuencia Alpha:

Ubicación en cDNA: 818 hasta 836 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GAAAGAGGCTCATCACTGT-3'

Secuencia Gamma:

Ubicación en cDNA: 5283 hasta 5301 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GGATAAGTGTTGTGTATAA-3'

Secuencia Delta

Ubicación en cDNA: 1829 hasta 1847 a partir del codón de inicio (AUG) de la proteína.

5'-GCAAGACGGTGTAGTGTGA-3'

### 3.2.11. Clonamiento de oligos en pSuper y pSuper\_tet.

Los oligos que diseñamos fueron sintetizados por Sigma (ver oligos sección 3.1). Luego se preparó pSuper y pSuper inducible (pSuper\_tet) con la siguiente estrategia: Se

agregó un fragmento del estándar del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*. Este procedimiento fue necesario ya que existen 6pb entre los sitios *BglII* y *HindIII* utilizados para clonar en el vector los oligos diseñados. Además en el diseño de los oligos se encontró que en la secuencia 2, existe un sitio para *BglII*, con lo anterior se consigue que el vector pSuper o pSuper inducible no se religue y así poder optimizar el clonamiento de los oligos.

Las bandas que se agregaron fueron las de 2322 pb y 2027 pb, para lo cual se digirió pSuper y pSuper inducible, con la misma enzima de restricción (*HindIII*). Al comprobar que efectivamente se linearizaron totalmente, se procede a defosforilar con CIAP para evitar la religación. Una vez defosforilados los extremos del vector, se procede a la ligación de estos agregando los fragmentos del fago lambda aislados y purificados. Una vez verificada la adición del fragmento por digestión con *HindIII*, se procede a digerir el vector (pSuper o pSuper inducible) con la enzima de restricción *BglII*. Se purifica el fragmento linearizado de esta digestión a través de gel, y luego se llevó a cabo la digestión del DNA anterior con *HindIII*, donde se observa la liberación del fragmento de DNA del fago lambda antes mencionado.

### **3.2.12. Purificación de DNA plasmidial por kit comercial.**

Para la purificación de DNA, se utilizaron los kit comerciales MOBIO (mini prep) y QIAGEN (midi prep). Estos usan la técnica de lisis alcalina (Birnboim y Doly 1979). Para el primero se crecen a partir de cultivos en stock de glicerol de construcciones antes clonadas y analizadas en 10 ml de medio LB con el antibiótico necesario por 24 horas a 37°C y agitación orbital a 210 rpm. Luego se centrifugó a 9300 x *g* por 1 min y se

eliminó el sobrenadante. Se agregó 250  $\mu$ l de solución de homogenización S1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, 400  $\mu$ g /  $\mu$ l RNAsa.) con la cual se resuspendió el sedimento por medio de vortex por 1 min. Luego se agregó 250  $\mu$ l de solución de lisis S2 (NaOH 200 mM, 1% SDS), se invierten los tubos suavemente 4-6 veces para mezclar. Se agregó 350  $\mu$ l de solución de neutralización S3 (acetato de potasio 2,55 M pH 4.8), se mezcló por inversión de los tubos 4-6 veces y se centrifugó 1min a 9300 x *g*. El sobrenadante se agregó a la columna de retención de DNA plasmidial del kit la cual posee una matriz de sílice, se centrifugó 1 min a 9300 x *g* y se eliminó el eluato, la columna se lavó agregando 700  $\mu$ l de solución de lavado S4 (NaCl 1M, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol) y su posterior centrifugación a 9300 x *g* por 1 min y se descartó el sobrenadante. Luego se centrifugó a 9300 x *g* por 2 min para eliminar los restos de etanol. Finalmente se eluyó el DNA, adicionando 50  $\mu$ l de solución Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y se centrifugó por 5 min a 13200 x *g*. Para el kit para midi-prep se utiliza el mismo método sólo que a mayor escala.

### **3.2.13. Cuantificación de DNA plasmidial.**

Para una estimación de la cantidad de DNA en forma rápida, se hizo una comparación con estándar comercial 1kb, el cual contiene fragmentos con cantidades conocidas de DNA. Con esto se puede hacer una aproximación de la cantidad de DNA presente en las muestras cargadas en un gel.

Para una cuantificación más específica se realizaron cálculos por espectrofotometría a 260 nm, que consiste en diluciones de DNA donde 1 U/absorbancia es igual a 50  $\mu$ g/ml

de DNA doble hebra. Los cálculos finales se realizaron por multiplicación de estos valores por la dilución (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **3.2.14. Cultivo celular.**

Las líneas celulares fueron descongeladas de stocks almacenados en nitrógeno líquido y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico (50U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y 50ng/ml de anfotericina B) y 2 mM glutamina en una estufa de cultivo con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células fueron mantenidas sub-confluentes y se hicieron pasajes para mantener el cultivo. Para ello a las líneas celulares se les aspiró el medio y se lavó con PBS (37°C). Luego fueron tratadas con tripsina (0.05 % (1X), en HBSS 0,2 g/L EDTA), por 5 min para resuspender las células y poder sembrarlas en nuevas placas o expandir la línea.

#### **3.2.15. Transfecciones transientes.**

Las transfecciones en las líneas celulares HeLa y 293 EBNA, fueron llevadas a cabo utilizando Perfectin (GTS inc) o FuGene 6 (Roche), los cuales fueron empleados de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En el caso de Perfectin (el más utilizado), la relación entre masa de DNA ( $\mu\text{g}$ ) y volumen ( $\mu\text{l}$ ) de reactivo de transfección fue de 1:3,5. El protocolo establece que se debe utilizar un medio libre de suero para la dilución del reactivo de transfección (21,5  $\mu\text{l}$  por  $\mu\text{g}$  de DNA), se preparó por separado el DNA agregando 25  $\mu\text{l}$  de diluyente por  $\mu\text{g}$  de DNA y se mezcló suavemente. Luego se realizó la mezcla del DNA diluido con el medio de transfección diluido, se incubó 5-20 min a temperatura ambiente y se agregó directamente a la placa con confluencia

celular de 5-10 %, crecidas sobre cubreobjetos esterilizados. Luego las células fueron incubadas a 37°C y atmósfera a 5% CO<sub>2</sub>, en medio DMEM completo, durante un tiempo de 72 a 92 h. Luego fueron fijadas con paraformaldehído 3 % en PBS por 20 min a temperatura ambiente y después de este periodo lavadas con PBS.

### **3.2.16. Análisis del transporte vesicular de VSV-G-YFP (ts-045).**

El tráfico de VSV-G en células tratadas con las construcciones de siRNA se llevó a cabo mediante transfecciones separadas con cambios de temperatura según se ilustra en la figura 5. Las células HeLa fueron sembradas en placas de 6 pocillos a 5% de confluencia aproximadamente en medio DMEM y 5% CO<sub>2</sub>. Luego las células fueron transformadas con combinaciones de las construcciones siRNA para cada transcrito y crecidas sobre cubreobjetos e incubadas a 37°C por 72 h. Luego de este tiempo las células fueron retransformadas con el plasmidio que codifica para la proteína VSV-G-YFP (ts-045) e incubadas a 37°C por 18 h para completar la transformación. Después se llevo a cabo el siguiente procedimiento:

- Para los tiempos 0, 30 y 120 min (Figura 5A): se aspiró el medio y se agregó 2 ml/pocillo de medio DMEM suplementado independiente de CO<sub>2</sub> (Gibco). Se incubó por 4 h a 40°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se llevaron las placas a temperatura a 32°C en un baño termostático y a los tiempos indicados (0, 30 y 120 min) se detuvo la incubación aspirando rápidamente el medio y agregando 2 ml/pocillo de PBS 3% PFA (paraformaldehído) previamente calentado (40°C).

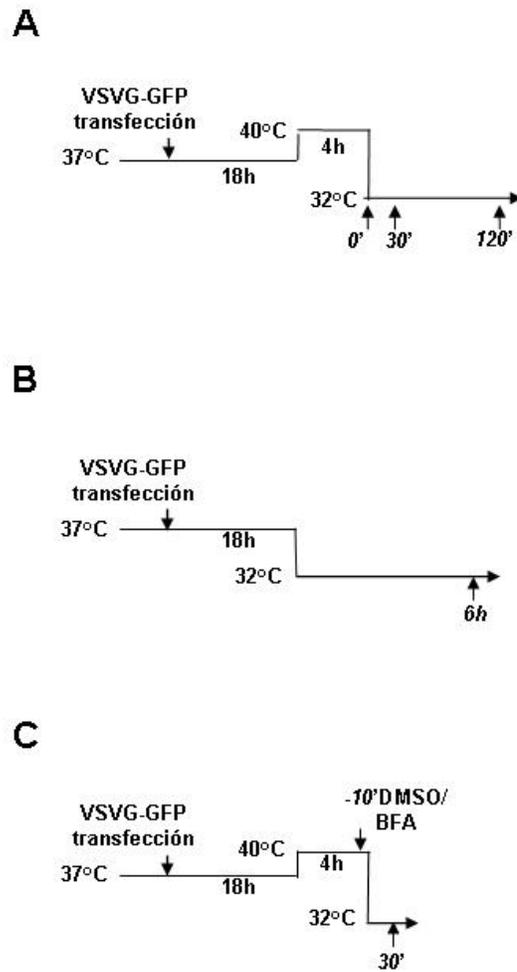


Figura 5: Diagrama de incubación y temperatura en los experimentos de secreción de la glicoproteína VSV-G-ts-045.

- Para la placa de 6 h (Figura 5B): se aspiró el medio y se agregó 2 ml/pocillo de medio DMEM suplementado independiente de CO<sub>2</sub>. Se llevaron las placas a un baño termostático a 32 °C y se incubó por 6 h. Se detuvo la incubación aspirando rápidamente el medio y se agregó 2 ml/pocillo de PBS 3% PFA previamente calentado (40°C).
- Para la placa con BFA (Figura 5C): se aspiró el medio y se agregó 2 ml/pocillo de medio DMEM suplementado independiente de CO<sub>2</sub>. Se incubó por 4 horas a 40°C y 5% CO<sub>2</sub>. 10 min antes de completar 4 h, se agregó BFA (10 µM) a la mitad de las muestras y a la otra mitad (control) se le agregó igual volumen de DMSO. Se continuó la incubación a 40°C por 10 min. Se llevaron las placas a un baño termostático a 32°C y después de 30 min de incubación se detuvo, aspirando rápidamente el medio y agregando 2 ml/pocillo de PBS 3% paraformaldehído previamente calentado (40°C).

Después de estos procedimientos las muestras fueron procesadas para inmunocitoquímica.

### **3.2.17. Inmunocitoquímica.**

Después de 72-92 h de transfección con las construcciones con vector pSuper o pSuper inducible, se realizó la inmunocitoquímica de las células en monocapa según describe Harlow (1999). Para ello, las células en el cubreobjeto fueron lavadas con PBS y fijadas con 3% paraformaldehído en PBS por 20 min. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS y se incubaron con 50 mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS por 10 min a temperatura ambiente.

Se lavaron 2 veces con PBS, después fueron permeabilizadas con 0,1 % Triton X-100 y 0,05% SDS en PBS por 5 min a temperatura ambiente. Después las células se lavaron 3 veces con solución de bloqueo 0,2 % gelatina, 0,5 mM azida de sodio en PBS, incubando por 5 min cada vez. Se diluyó el anticuerpo primario (ver materiales anticuerpos primarios) como indica el proveedor, en 0,2 % gelatina, azida de sodio 0,5 mM en PBS, incubando durante 90 min a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con 0,2 % gelatina, 0,5 mM azida de sodio en PBS por 5 min cada uno y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a Alexa-fluor 594 diluido 1:500 en solución de bloqueo. Se incubó a temperatura ambiente por 60 min. Finalmente se lavaron los cubreobjetos y se montaron en portaobjetos usando medio de montaje fluorescente (Dako), luego se dejaron secar al aire por 30 min y se sellaron los bordes con esmalte y se visualizaron la preparaciones en microscopio de epifluorescencia o confocal.

### **3.2.17.1. Anticuerpos y sus respectivas diluciones.**

#### **3.2.17.1.1. Anticuerpos primarios.**

Para la detección de hGBF1 se utilizaron los anticuerpos primarios H154 y 9D4 a dilución 1:500.

Para la detección de hBIG1 se utilizó el anticuerpo primario 9D3 a una dilución de 1:500.

Para la detección de COPI se utilizó el anticuerpo primario M3A5 a una dilución de 1:100.

Para la detección de p115 se utilizó el anticuerpo primario 7D1 a una dilución 1:1000.

Para la detección de clatrina se utilizó el anticuerpo primario X22 a una dilución de 1:1000.

Para la detección de gigantina se utilizó el anticuerpo primario contra giantina a una dilución de 1:2000.

Para la detección de VSV-G-ts-045 se utilizó el anticuerpo primario anti VSV-G comercial a una dilución 1:1000.

#### **3.2.17.1.2. Anticuerpo secundario.**

Se utilizaron, anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 594 y anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 594 ambos a dilución 1:600.

#### **3.2.18. Extracción de proteínas desde líneas celulares de mamífero.**

Para extracción de proteínas con detergente, se prepararon lisados de células 293 EBNA crecidas en monocapa sobre placas de 100 mm con 1ml de tampón de lisis frío (PBS- 1% Tween 20, 1mM PMSF y mezcla de inhibidores de proteasa) por 10 min sobre hielo. Con ayuda de un rastrillo se recolectaron las células y se depositaron en un tubo de centrifuga, todo sobre hielo. El lisado fue disgregado a través de 10 lentas

pasadas por una jeringa usando una aguja de calibre 22 y centrifugado a  $800 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El sobrenadante PNS (sobrenadante post-nuclear), fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tampón de muestra (0,063M tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0,01% Azul de bromofenol y 10% Glicerol).

### **3.2.19. Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Se confeccionaron los geles con el sistema de tampón discontinuo en condiciones denaturantes descrito originalmente por Laemmli (1970). Los geles fueron organizados entre dos placas de vidrio y espaciadores de teflón. El gel separador se preparó con acrilamida-bisacrilamida 30% (p/v), a una concentración final de 8% (p/v), tamponado con Tris- HCl 1,5 M, pH 8.8 y SDS 0,4%. El gel espaciador en cambio, se preparó a una concentración final de 6% (p/v) tamponado con Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8 y SDS 0,4%. Ambos fueron polimerizados con persulfato de amonio 0,05% (p/v) y TEMED 0,15% (p/v) de concentración final. Las muestras con tampón de muestra y con un 1.5% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol fueron denaturadas calentándolas en un baño termostático a  $90^{\circ}\text{C}$  por 5 min, para luego fueron cargadas cuidadosamente en los pocillos del gel.

El sistema ya montado e inmerso en tampón de corrida compuesto de 25 mM Tris-HCl, 0,19 M glicina y SDS 0,1% (p/v), se le aplicó un voltaje de 80V y en el momento en que las muestras entraron al gel separador se aumentó el voltaje a 120V. Una vez que se cayó el frente iónico se dejó en la misma condición por aproximadamente 90 min más hasta su transferencia.

### **3.2.20. Western Blot.**

Realizada la corrida electroforética, los geles fueron electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (48 mM Tris base, 39 mM glicina, 0.037% SDS, 20% metanol y 2.5 % isopropanol), se transfirió a 12V durante toda la noche a 4°C.

Se tomó la membrana ya transferida y se procedió a bloquear los sitios libres con solución Blotto (0.1% v/v Tween, 20, 5% p/v leche descremada en tampón PBS), luego se incubó con el primer anticuerpo dependiendo del experimento, a la dilución indicada por el proveedor por un tiempo mínimo de 90 min. Después se realizaron 3 lavados con 0.1% Tween 20, 1% leche descremada en PBS, cada uno de 10 min con agitación suave. Se incubó con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa anti- IgG de conejo, dilución 1:5000, por 60 min. Luego se lavó con PBS 3 veces por 10 min con agitación suave.

Para la detección de los complejos de proteínas-anticuerpo, la membrana fue revelada a través de la tinción con DAB (0.15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DAB 0.5 mg/ml, 0.3 % Tween 20 en PBS) y también por el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL.

### **3.2.21. Microscopía de fluorescencia (epifluorescencia ó confocal).**

La observación de las células transfectadas con las construcciones shRNA en pSuper o pSuper inducible, se realizó a través de un microscopio de epifluorescencia el cual excita las muestras a una longitud de onda de 488 nm.

De igual manera se realiza en un microscopio confocal, el cual excita las muestras a la misma longitud de onda a través de un láser de argón.

Las imágenes capturadas fueron obtenidas a través de cámaras digitales de alta resolución acopladas a los microscopios. Estas fueron procesadas para brillo, contraste y ajuste de modo a escala de grises por medio del software Adobe Photoshop. Las imágenes de geles de agarosa fueron invertidas a negativo para optimizar su resolución a través del mismo software.

## 4. RESULTADOS

En el desarrollo del trabajo de tesis, se confeccionaron construcciones shRNA (short hairpin RNA) específicas contra hGBF1, hBIG1 y hBIG2 en el vector pSuper. Estas construcciones fueron empleadas para el estudio del efecto producido sobre marcadores de la vía secretoria por la disminución en la expresión de estos GEFs. Además se analizó la secreción de una proteína G (VSV-G-ts-045) desde su origen, hasta su llegada a la membrana plasmática. pSuper fue modificado a pSuper inducible con el objetivo de mejorar las propiedades del vector, y con esto la capacidad de controlar la expresión de siRNA en forma estable.

### 4.1. Diseño de secuencias y estrategias de clonamiento

pSuper, es un vector plasmidial de 5429 pb que presenta marcadores de transfección como EGFP (proteína fluorescente verde) para células de mamífero y marcador de selección (ampicilina) para el trabajo con bacterias. No obstante, éste presenta un diseño particular (Figura 6). Existen 6 pb entre los sitios *HindIII* y *BglII*, requeridos para insertar las secuencias que expresaran horquillas de RNA. Esto provocó una baja eficiencia en la doble digestión del vector con ambas enzimas, ya sea por separado o juntas en la mezcla, debido a que el segundo sitio se ubica muy cercano al extremo del DNA linearizado. El problema fue corregido haciendo una modificación al vector como se describe a continuación: se utilizó una fracción del DNA del bacteriófago lambda, específicamente la del estándar lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*, del cual se aislaron y purificaron las dos bandas centrales (2322 pb y 2027 pb).

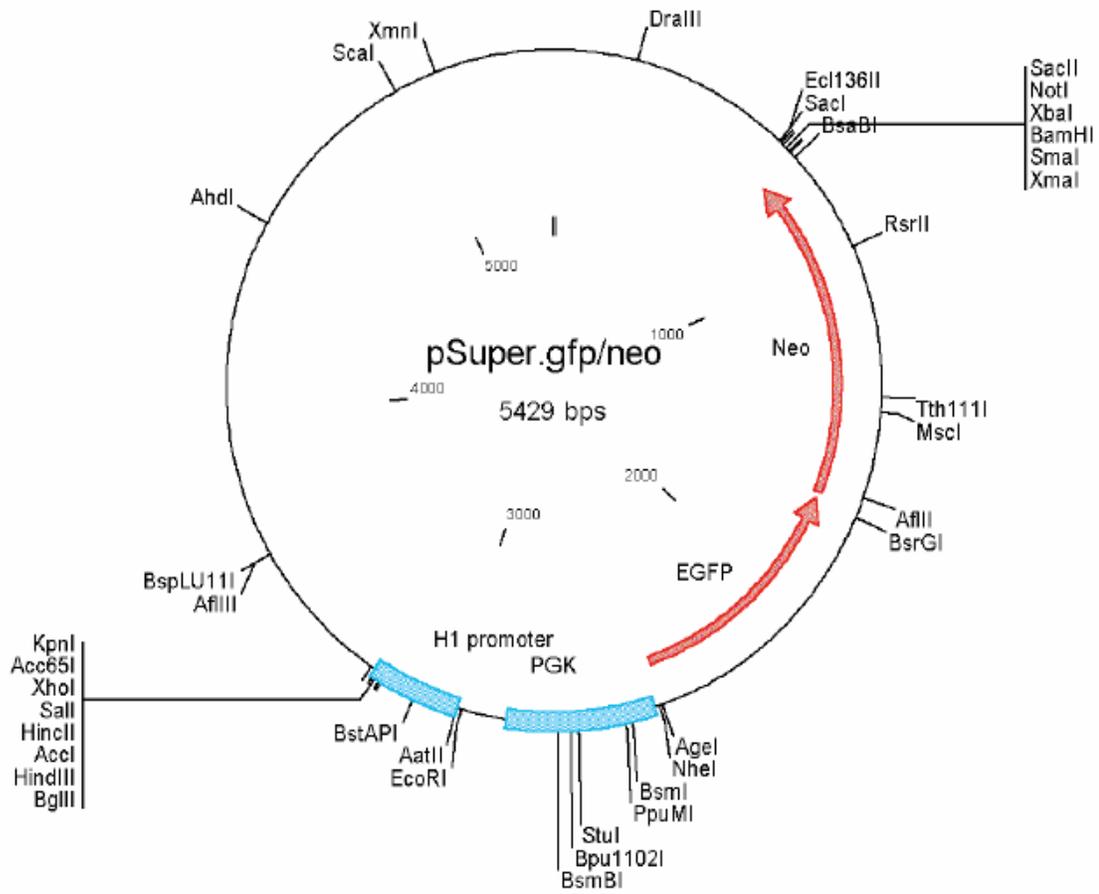


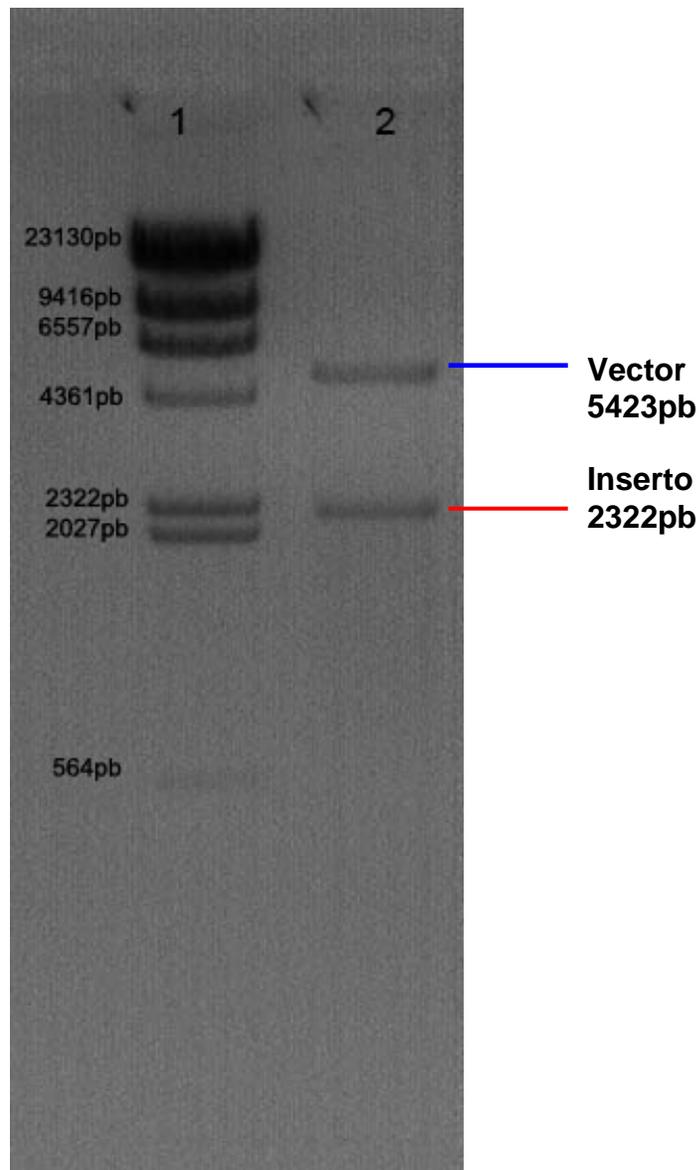
Figura 6: Esquema del plasmidio pSuper (sitios de clonamiento y marcadores).

Estas fueron insertadas en el vector después de su linearización con la enzima de restricción *HindIII* (sección 3.2.11). Luego se procedió a digerir el vector con el fragmento del fago lambda insertado con la enzima de restricción *BglII*, y se verificó la linearización total en un gel de agarosa 1,3%, como muestra la figura 7. Después se purificó el fragmento linearizado por extracción desde un gel de agarosa (sección 3.2.8) y el DNA fue digerido con la enzima de restricción *HindIII*, donde se verificó la pérdida del fragmento insertado en un gel de agarosa 1,3% (Figura 8). Luego se llevó a cabo la extracción del fragmento de 5423 pb desde un gel de agarosa (sección 3.2.8). Este tratamiento garantiza un vector con la doble digestión y que presenta escasas posibilidades de religación al momento de clonar los oligos de silenciamiento.

Luego de obtener el vector doblemente digerido con *HindIII* y *BglII* y purificarlo, se procedió con el clonamiento de los oligos para cada transcrito blanco. Basados en el análisis de las librerías génicas disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), propusimos el diseño de los oligos los cuales fueron verificados por Dharmacon (Lafayette, CO, USA) como posibles blancos de hGBF1, hBIG1 y hBIG2. Para confirmar el clonamiento de los oligos en el vector pSuper existen dos formas según lo descrito por el proveedor, que consiste en dos análisis de restricción. El primero mediante digestión con la enzima de restricción *BglII*, ya que este sitio se pierde cuando las secuencias son clonadas y el segundo mediante el análisis por doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, con lo que se puede observar una diferencia de 60 pb en las construcciones positivas respecto al control (vector vacío).



**Figura 7: Análisis de restricción de pSuper con fragmento del bacteriófago lambda insertado.** Gel agarosa 1,3%. carril 1: estándar lambda *Hind*III; carril 2 pSuper modificado con fragmento 2322pb (7751pb); Resultado de la digestión con la enzima de restricción *Bgl*II de pSuper modificado.



**Figura 8: Análisis de restricción de la doble digestión de pSuper con fragmento del fago lambda insertado.** Gel agarosa 1,3%. carril 1: estándar lambda *Hind*III; carril 2: resultado de la doble digestión con *Bgl*II y *Hind*III de pSuper modificado, que muestra la liberación del inserto de 2322 pb proveniente del DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III.

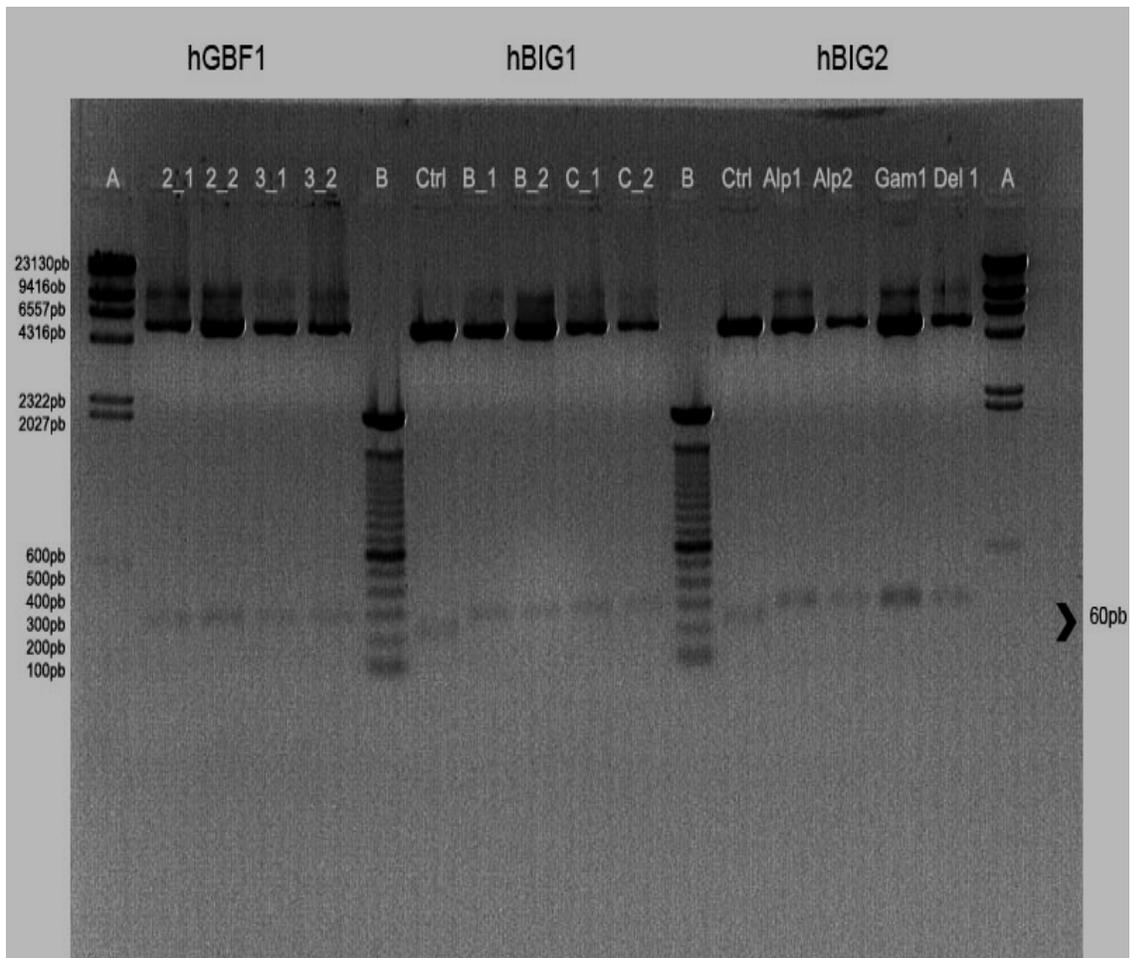
El resultado en cuanto al primer análisis de restricción presentó complicaciones con las construcciones para la secuencia 2 (hGBF1), ya que estos oligos presentan un sitio para *Bgl*II (ver secuencias sección 3.2.10.1), no obstante se confirmó con el segundo análisis que se ilustra en la figura 9.

Una vez obtenidas las construcciones para cada transcrito blanco, se analizó la eficiencia de cada una en el silenciamiento de la expresión de cada proteína. Como muestran las figuras 10 y 11, se hicieron transfecciones transientes (Sección 3.2.15) a las líneas celulares HeLa y 293 EBNA. Las muestras se procesaron para inmunotinciones con los anticuerpos 9D4 y 9D3, que reconocen el dominio sec7 de hGBF1 y hBIG1 respectivamente. El resultado fue un apagamiento sustancial de las proteínas blanco, y similar en cuanto a la eficiencia de cada construcción. Además se aprecia con claridad las células transformadas de las que no, por la expresión del marcador de transfección de pSuper, GFP.

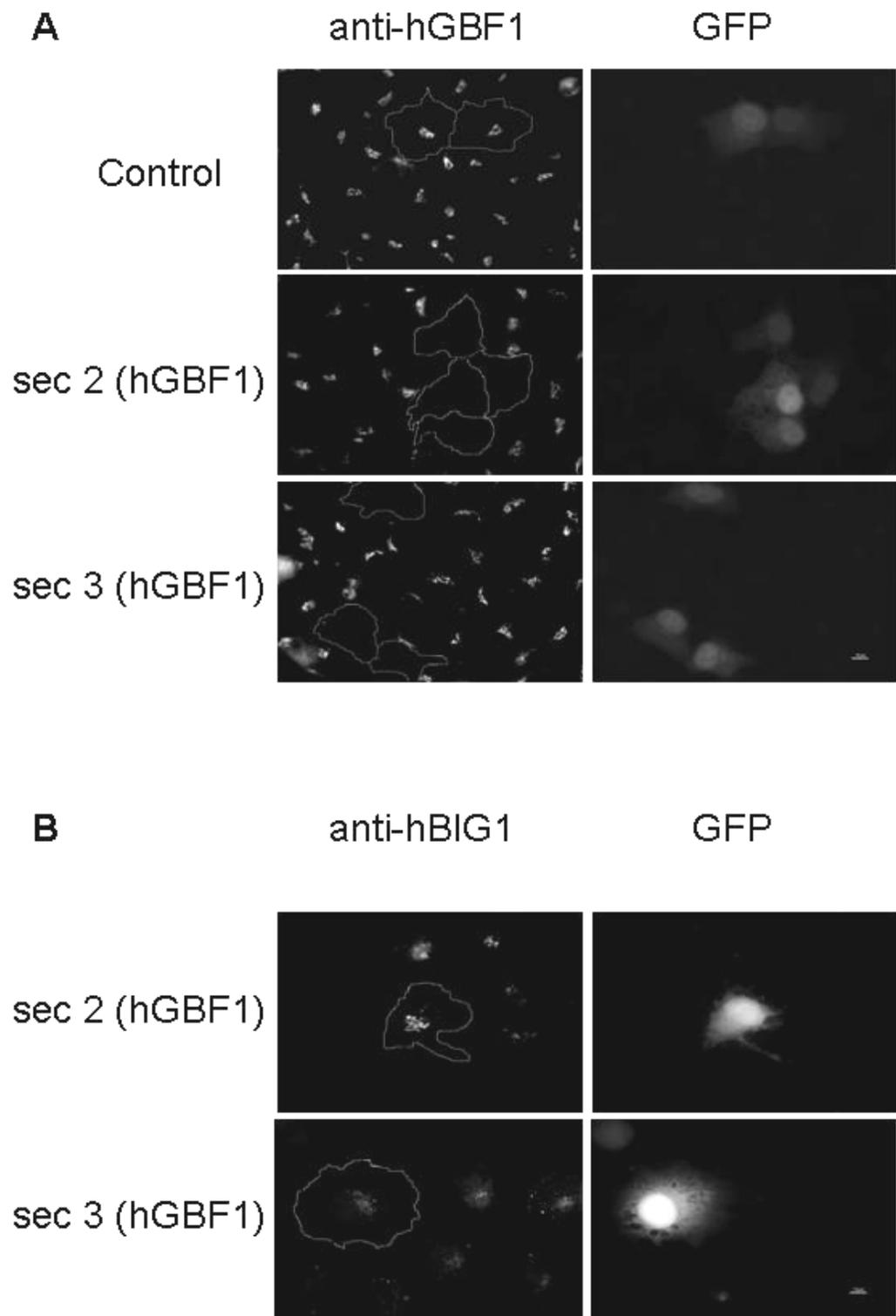
Luego de verificar la eficiencia de la inhibición por las secuencias para cada proteína, lo primero fue determinar lo que ocurre con la inhibición entre hGBF1 y hBIG1. Como se ilustra en las figuras 10 y 11 (panel B), el silenciamiento individual de cada GEF no altera la expresión del otro y viceversa.

#### **4.2. Análisis cuantitativo del silenciamiento de hGBF1 y hBIG1 por Western Blot no es suficientemente sensible.**

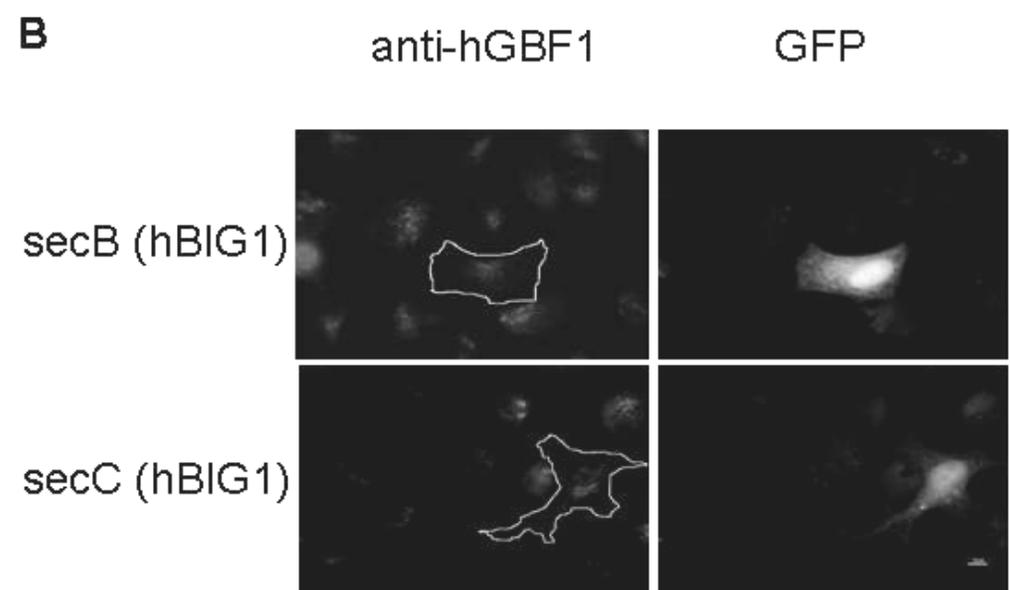
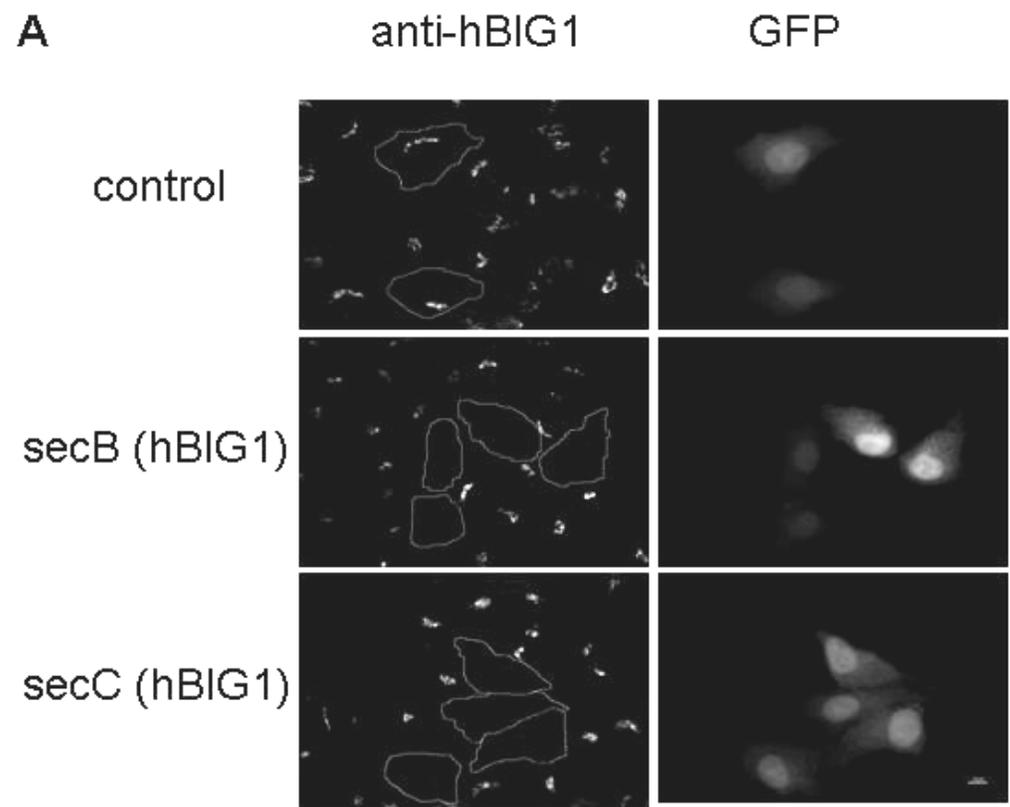
Células 293 EBNA fueron transformadas con los plasmidios que expresan las secuencias inhibitorias para hGBF1 y hBIG1. Al alcanzar 92 h se llevo a cabo la extracción de proteínas (sección 3.2.18). Luego de efectuar una electroforésis en gel de



**Figura 9: Doble digestión *HindIII* y *EcoRI* para la verificación de las secuencias clonada en pSuper.** Gel agarosa 2%. A: estándar DNA fago lambda digerido *HindIII*; B: estándar 100pb; Ctrl corresponde a pSuper vacío; la leyenda superior indica las secuencias y clones verificados. Se señala la diferencia de 60 pb entre el vector vacío (Ctrl) y los clones positivos.



**Figura 10: Eficiente silenciamiento de hGBF1 no afecta la expresión de hBIG1.** A: panel de inhibición por construcción (sec2 y sec3) de hGBF1. B: panel de efecto sobre de hBIG1 por silenciamiento de hGBF1. El contorno de las células transformadas con pSuper (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10 $\mu$ m.



**Figura 11: Eficiente silenciamiento de hBIG1 no afecta la expresión de hGBF1.** A: panel de inhibición por construcción (sec B y sec C) de hBIG1. B: panel de efecto sobre de hGBF1 por silenciamiento de hBIG1. El contorno de las células transformadas con pSuper (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10µm.

poliacrilamida en condiciones denaturantes (sección 3.2.19), se procedió a hacer la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Una vez hecho el tratamiento del blot con anticuerpos específicos para cada proteína (9D3 para la región sec 7 de hBIG1 y 9D4 para región sec 7 hGBF1), se procedió a revelar la membrana (sección 3.2.20).

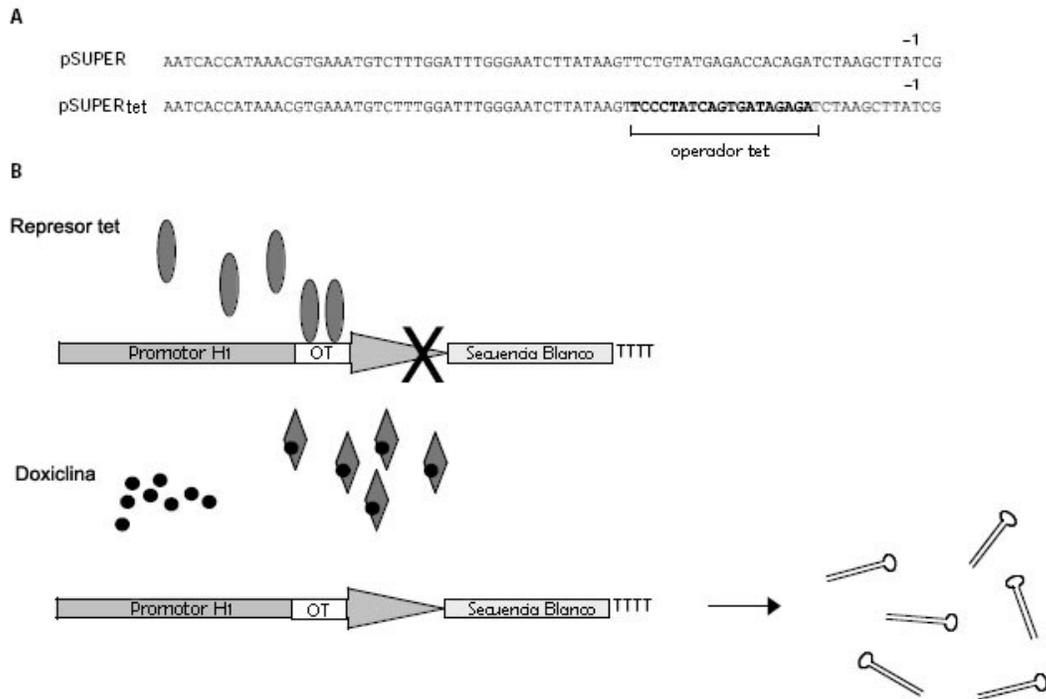
El resultado obtenido (no mostrado), no presentó una disminución reproducible de la cantidad de señal para cada proteína. Esto ocurre, ya que la transformación de las células no sobrepasa el 30%, y la inhibición total de estas células alcanza un valor de 80% aproximadamente (Tabla 1). Luego en el mejor de los casos, esperamos una disminución del 20% en los niveles de cada GEF en la población celular, lo que cae dentro del error experimental de este tipo de determinación.

#### **4.3. Creación de pSuper inducible, un vector más versátil.**

Después de nuestros primeros resultados, decidimos crear una línea celular estable, que sea manejable en cuanto a la expresión temporal de los siRNAs. Con este motivo se buscó información relacionada a líneas celulares inducibles. Encontramos una referencia respecto a la modificación del promotor H1 presente en pSuper la cual se esquematiza en la Figura 13. En ésta se ilustra la modificación necesaria en el DNA que consiste en el reemplazo de 19 pb en el promotor, cercano al sitio de inicio de la transcripción (posición -23 a la -5). En esta región (operador Tet), ocurre la unión del represor Tet, el cual es expresado por ciertas líneas celulares y es capaz de bloquear la expresión de las horquillas de siRNA contra los transcritos de las proteínas blanco.

<b>Silenciamiento de hGBF1</b>		<b>Silenciamiento de hBIG1</b>	
<b>Total</b>	78%	<b>Total</b>	82%
<b>Parcial</b>	19%	<b>Parcial</b>	16%
<b>Sin Efecto</b>	3%	<b>Sin Efecto</b>	2%

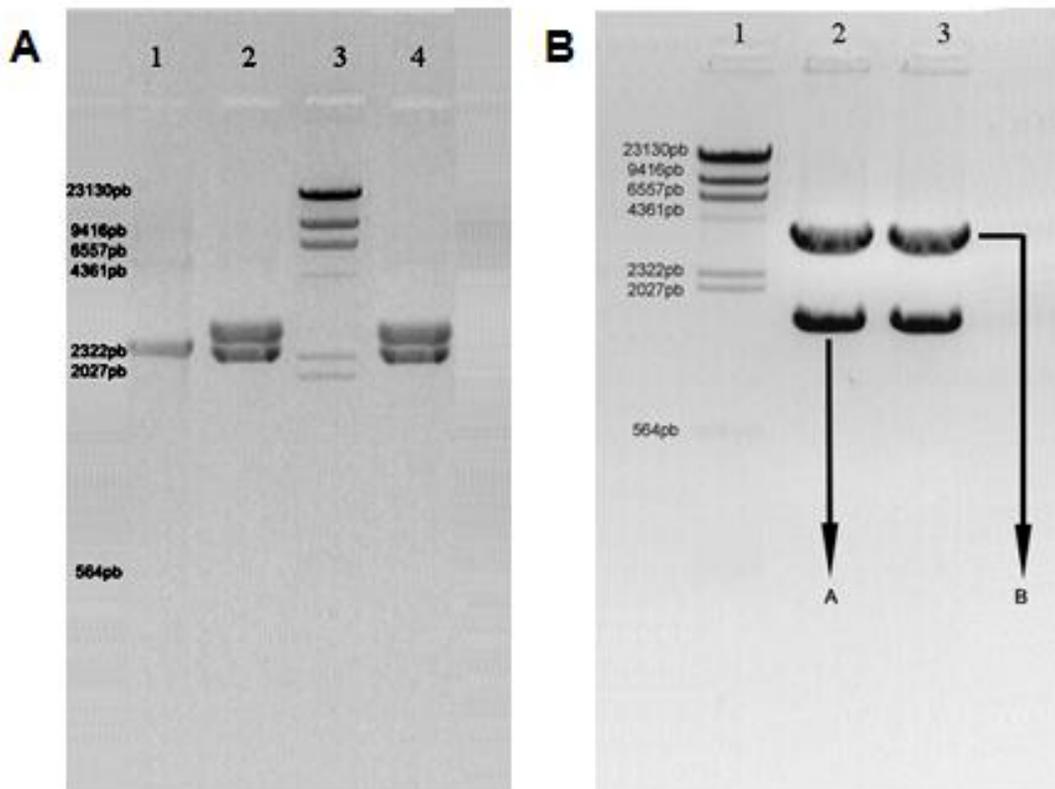
**Tabla 1: Porcentaje de células GFP positivas que exhiben apagamiento para el GEF blanco por inmunofluorescencia.** Se procesaron 11 campos oculares con  $n=13\pm 2$  células con 30% de transformación (GFP positivas).



**Figura 12: Esquema de modificación de promotor H1.** A: ilustra las modificaciones en la secuencia de pSuper a pSuper\_tet; B: mecanismo de acción del represor tet, bloqueo de expresión de horquillas de RNA y liberación por interacción de Doxiciclina con el represor tet. Imagen modificada desde van de Wetering *et al.*, 2003.

Este evento puede ser inhibido por antibióticos como tetraciclina y doxiciclina (derivado semi-sintético de tetraciclina), que se unen al represor cambiando su conformación y así evitan la unión de éste al operador Tet.

Para la obtención de pSuper inducible se diseñó un protocolo de PCR mutagénico, en el cual se utilizaron partidores complementarios a la secuencia del promotor H1 presente en pSuper que contienen la secuencia del operador Tet. Este fragmento fue amplificado usando una mezcla de DNA polimerasas *pfu* y *Taq* en relación 1:5U. En la figura 13A (carril 1) se muestra el producto de PCR, un fragmento de 2566 pb que corresponde al tamaño esperado. Luego éste se subclonó en pGEM-T Easy, del que fue liberado con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Hind*III (Figura 13A, carril 2). Después de la liberación del fragmento con las enzimas de restricción mencionadas, se encontró un problema por la escasa separación entre la banda deseada y la del vector en un gel de agarosa 1,3%. Esta mínima separación dificultó la extracción y purificación. Para solucionar este problema se utilizó una estrategia diferente, la cual consistió en explorar el mapa físico de pSuper y buscar un sitio de restricción cercano al sitio *Hind*III, que incorporara la modificación y con esto aumentar la diferencia de los fragmentos, para facilitar el aislamiento y purificación. Como se muestra en la figura 13B, los sitios utilizados fueron *Hind*III y *Afl*I con lo cual se logró aumentar la diferencia de tamaño y subsecuente separación de los fragmentos en un gel de agarosa, lo que permite una mejor manipulación en cuanto a la purificación tanto en pGEM-T Easy como en pSuper.

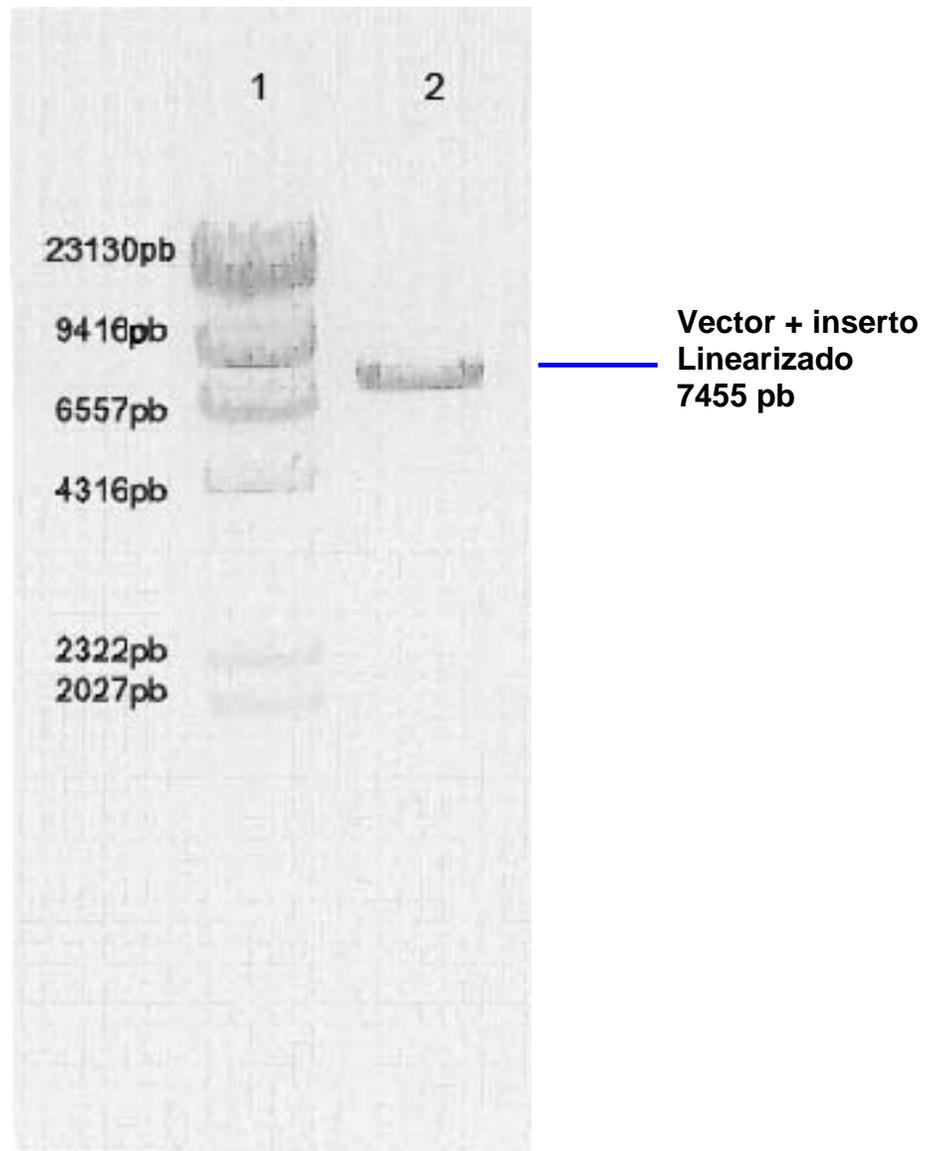


**Figura 13: Modificaciones y preparación de pSuper\_tet.** Geles de agarosa 1,3%. **A** carril 1: producto de PCR del promotor H1 modificado. carril 2: liberación del producto de PCR del promotor H1 tet desde pGEM-T Easy con *HindIII* y *BamHI*; carril 3: Std Lambda *HindIII*; carril 4: pSuper digerido con *HindIII* y *BamHI*. **B** carril 1: Std Lambda *HindIII*, carril 2: liberación de producto PCR promotor H1 modificado desde pGEM-T Easy con *HindIII* y *AflI*; carril 3: pSuper digerido con *HindIII* y *AflI*. A indica la banda extraída que corresponde a la liberación del fragmento de PCR desde pGEM-T Easy y B a la banda extraída de pSuper para su posterior ligación

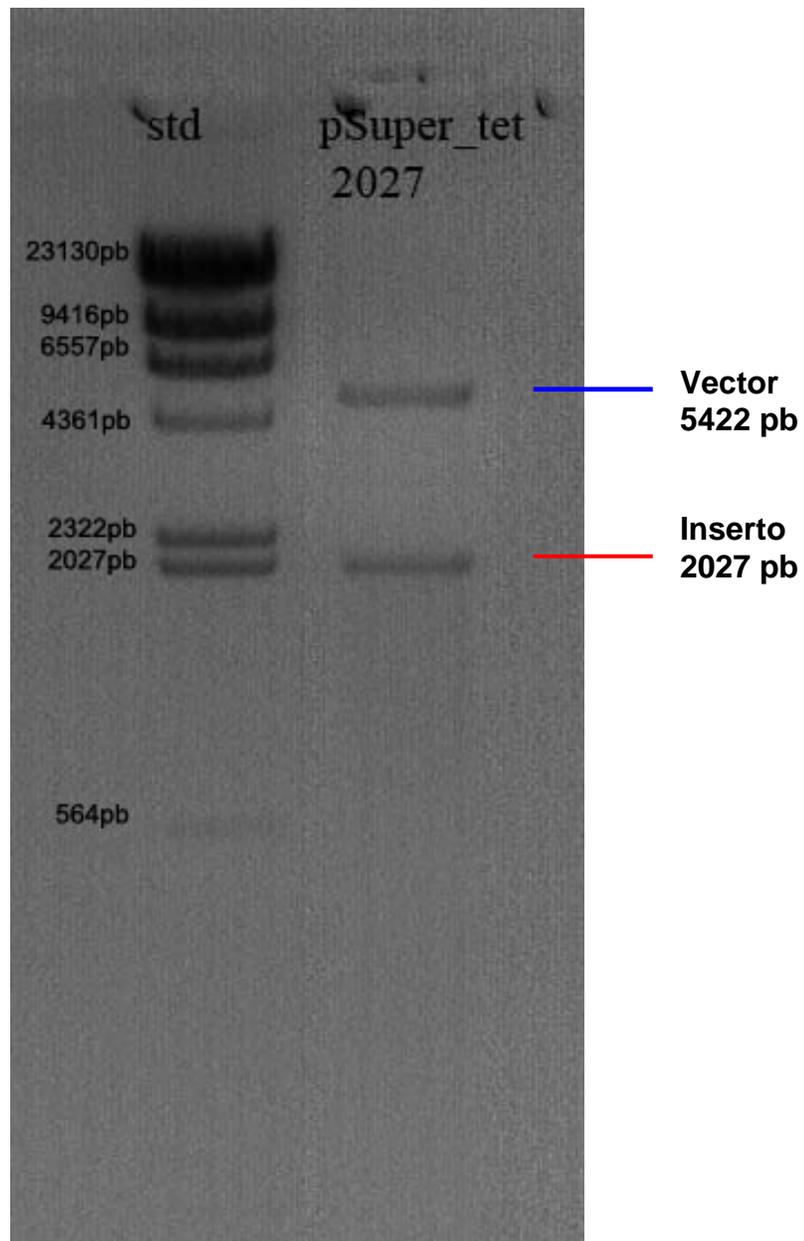
Después de purificar los fragmentos que se ilustran en la figura 13B (fragmentos A y B) se llevo a cabo la reconstrucción de pSuper con el promotor H1 modificado (pSuper\_tet). Luego se verificó la integridad de pSuper inducible por medio de análisis de restricción y secuenciación.

#### **4.4. Optimización de pSuper\_tet para clonamiento de oligos siRNA.**

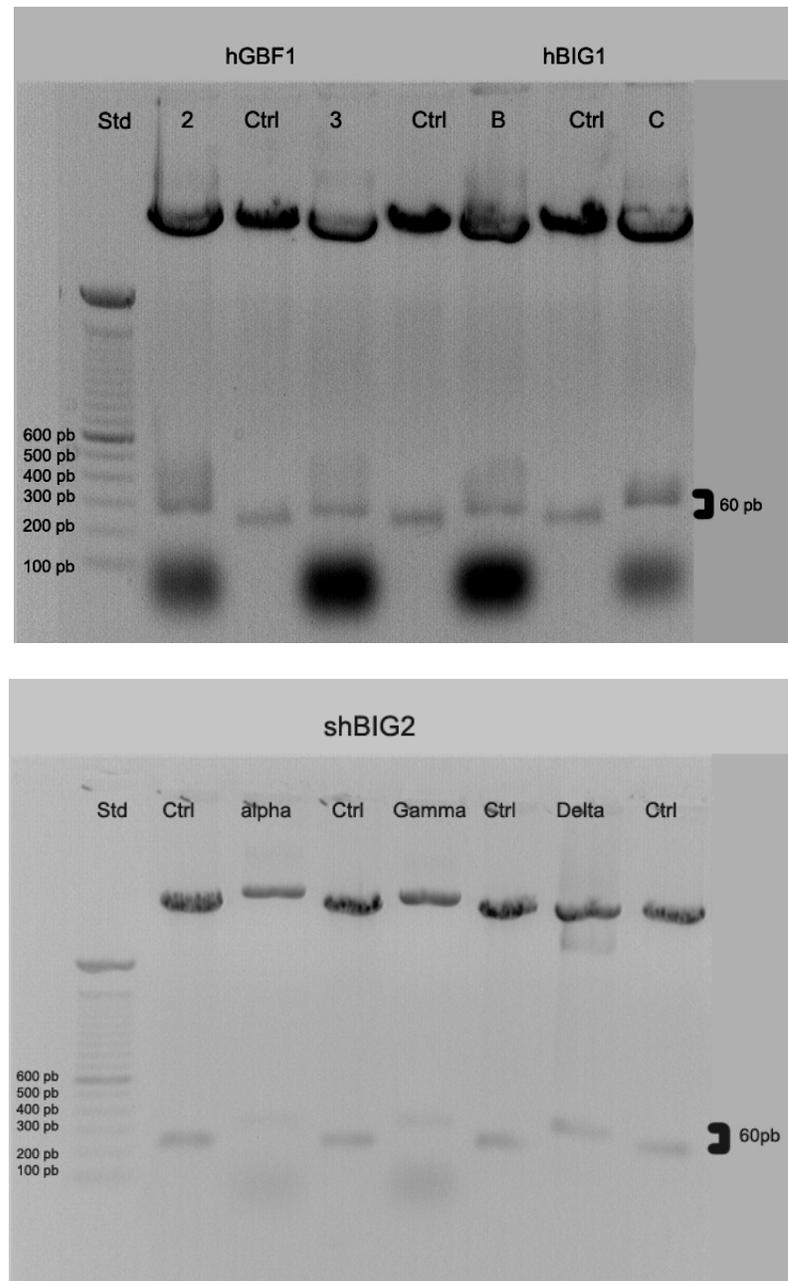
Después de la obtención de pSuper\_tet, se siguió el procedimiento descrito para la doble digestión enzimática de pSuper con *HindIII* y *BglII* (Sección 3.2.11), que optimiza el clonamiento de los oligos para hGBF1, hBIG1 y hBIG2. Como ilustra la figura 14, el clonamiento del fragmento del fago lambda pSuper\_tet, muestra que al ser digerido con la enzima de restricción *BglII* hay una linearización, la cual arroja un fragmento de 7455 pb, que es el resultado de la suma de pSuper\_tet (5428 pb) y el fragmento del fago lambda (2027 pb). Luego este fragmento (7455 pb) fue purificado desde un gel de agarosa (sección 3.2.8) y digerido con la enzima de restricción *HindIII*, lo que resulta en la pérdida del fragmento del fago lambda antes mencionado (Figura 15). Después este fragmento de 5422 pb fue purificado por extracción desde un gel de agarosa. Luego de obtener el vector doblemente digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *BglII*, se purifico y llevó a cabo la inserción de los distintos oligos dirigidos contra cada uno de los transcritos blanco. En la figura 16 se ilustra el resultado del clonamiento por doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* que muestra una diferencia de 60 pb del control (pSuper\_tet vacío) con las construcciones con clonamiento positivo.



**Figura 14: Análisis de restricción de pSuper inducible modificado con fragmento del bacteriófago lambda.** Gel de agarosa 1,3%. carril 1: estándar lambda *Hind*III; carril 2 pSuper\_tet modificado con fragmento 2027 pb proveniente del DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III (7455 pb);



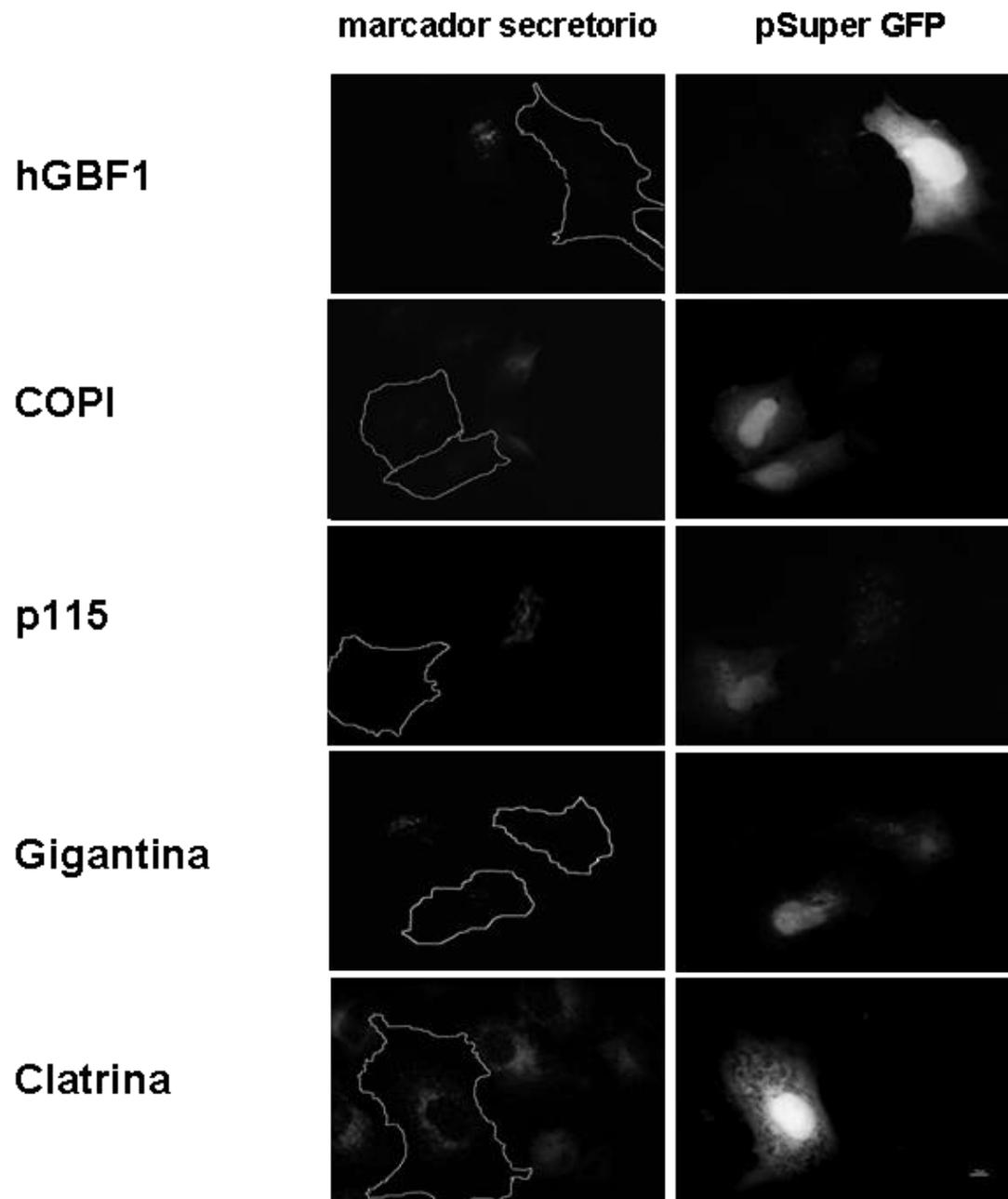
**Figura 15: Análisis de restricción de la doble digestión pSuper\_tet modificado con fragmento del fago lambda.** Gel de agarosa 1,3%. carril 1: estándar lambda *Hind*III; carril 2: resultado de la doble digestión con *Bgl*II y *Hind*III de pSuper\_tet modificado, que muestra la liberación del inserto de 2027 pb proveniente del DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III .



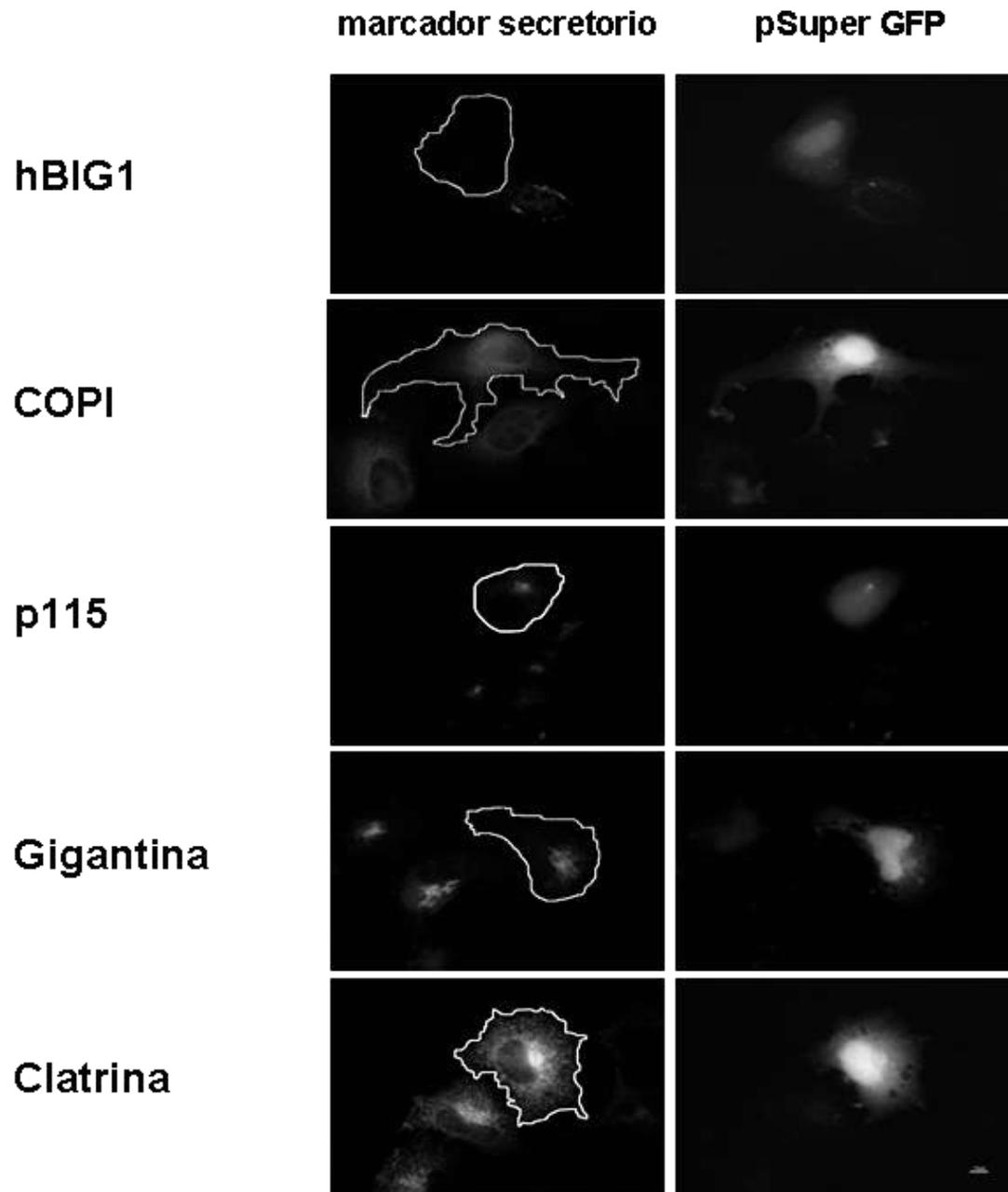
**Figura 16: Confirmación de las secuencias clonada en pSuper\_tet por doble digestión *HindIII* y *EcoRI*.** Geles de agarosa 2%. std: estándar 100 pb; Ctrl: corresponde a pSuper\_tet vacío; leyenda superior indica las secuencias verificadas. Se señala la diferencia de 60 pb entre el vector vacío (Ctrl) y los clones positivos.

#### **4.5. Efecto del silenciamiento de hGBF1 y hBIGs sobre los marcadores de la vía secretoria.**

Con las nuevas construcciones basadas en pSuper inducible que silencian la expresión de hGBF1 y hBIGs, se llevo a cabo el análisis de los marcadores de la vía secretoria. Para este análisis se utilizaron las construcciones en transfecciones transientes en las líneas celulares HeLa y 293 EBNA. Las muestras se procesaron con un análisis cualitativo de inmunotinción con anticuerpos específicos para algunos de los marcadores de la vía secretoria (Sección 3.1.1). Como muestra la figura 17 (panel superior), al silenciar la expresión de hGBF1, hay dispersión de la señal para el marcador COPI. Estudios cuantitativos indicaron que el 80% de las células transformadas (GFP positivas) arrojan este patrón, que muestra una perdida detectable de estructuras de Golgi. El silenciamiento de hGBF1 causa además una redistribución en marcadores de cis-Golgi, tal es el caso de p115 y de la matriz del Golgi (Gigantina). Esta última una fracción se acumula en forma puntiforme como se aprecia en la figura 17 (panel superior). Al observar el marcador clatrina no se observa ninguna alteración en células GFP positivas, al compararlas con el control. Estos resultados confirman que la presencia de hGBF1 es requerida para el reclutamiento de COP1 y así estabilizar el complejo de Golgi. Estudiamos también el efecto del silenciamiento de los GEFs hBIG1 y hBIG2 sobre la vía secretoria. Como ilustra la Figura 18, no existe un efecto aparente y significativo de estos en los marcadores estudiados de la vía secretoria desde cis a trans-Golgi, tanto en el silenciamiento simultaneo de hBIG1 y hBIG2, como en forma individual (datos no mostrados).

**shRNA anti- hGBF1**

**Figura 17: Inhibición en la expresión de hBGF1 por medio de shRNAs altera la distribución de los marcadores tempranos de la vía secretoria.** El contorno de las células transformadas con pSuper\_tet (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10 $\mu$ m.

**shRNA anti-hBIGs**

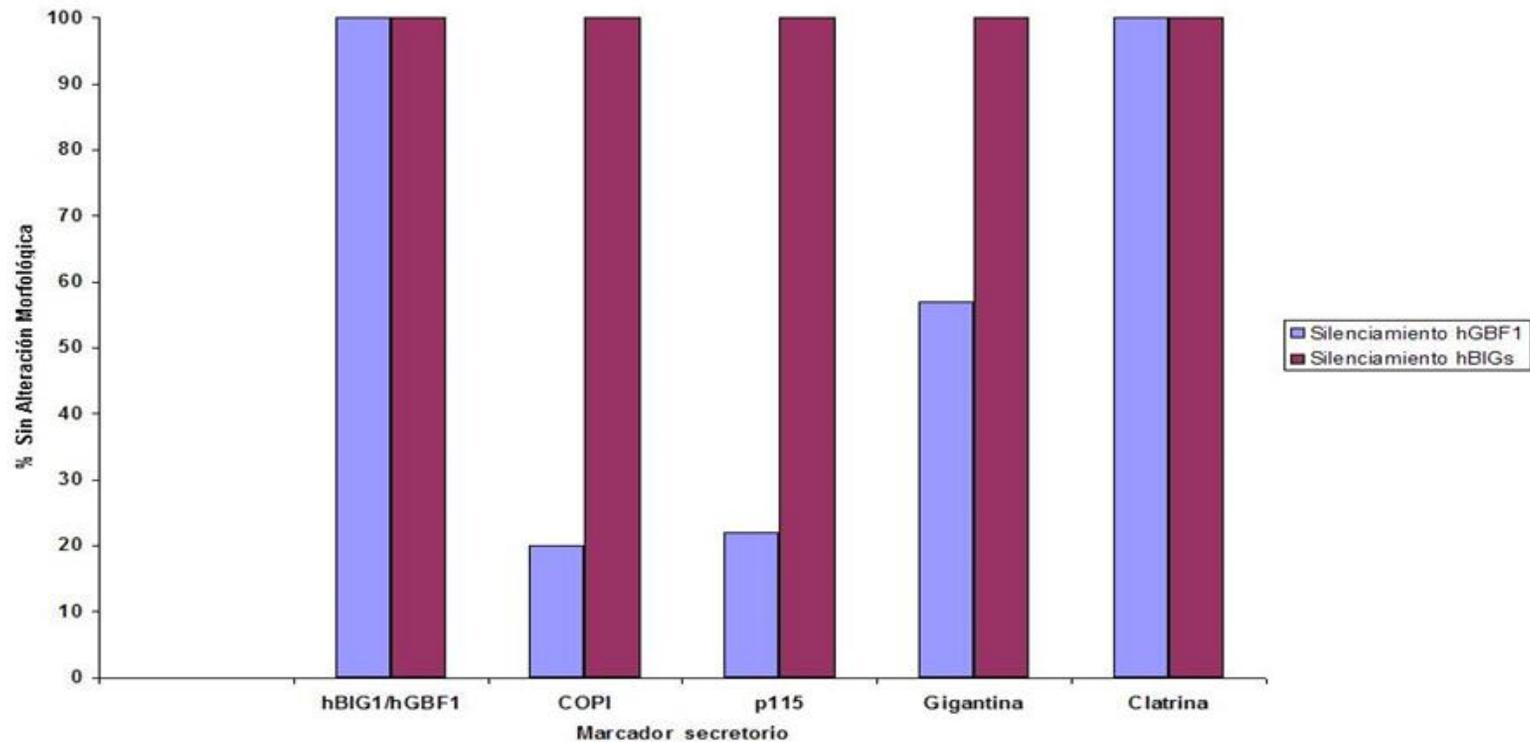
**Figura 18: Inhibición en la expresión de hBIGs por medio de shRNAs no altera la distribución de los marcadores de la vía secretoria.** El contorno de las células transformadas con pSuper\_tet (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10µm.

#### **4.6. Los análisis cuantitativos confirman los resultados observados en los marcadores por inhibición de la expresión de hGBF1 y hBIGs.**

Para confirmar si los resultados observados con los marcadores de la vía secretoria son representativos, se realizó un catastro de todas las imágenes obtenidas de los experimentos efectuados. Se llevo a cabo un recuento del total de células por campo ocular ( $n=13\pm 2$ ) de cada imagen, las cuales tienen una transformación aproximada de 30% (GFP positivas). El resultado estadístico arrojó valores que manifiestan que el análisis de los marcadores de la vía secretoria es representativo para el efecto de inhibición de la expresión de cada GEF (Tabla 1 y Figura 19).

#### **4.7. La inhibición de la expresión de hGBF1 mediante shRNAs bloquea la secreción de la proteína VSV-G.**

Después de los efectos observados en los marcadores de la vía secretoria, se confeccionó el protocolo que se describe en la sección 3.2.16, para demostrar el efecto que la inhibición de la expresión de hGBF1 y hBIGs produce en el tráfico de una proteína secretada a la membrana plasmática. Para esto, células HeLa fueron transformadas con plasmidios pSuper\_tet que expresan las secuencias inhibitorias contra hGBF1 ó hBIGs y después de 72 horas re-transformadas con un plasmidio que expresa la proteína VSV-G-ts-045. Posteriormente fueron incubadas a temperatura no permisiva (40°C) donde esta proteína es retenida en el retículo endoplásmico debido a que se encuentra mal plegada. Finalmente una vez completado el tiempo requerido (92 h), las placas fueron llevadas a un baño termorregulado a 32°C, temperatura en la

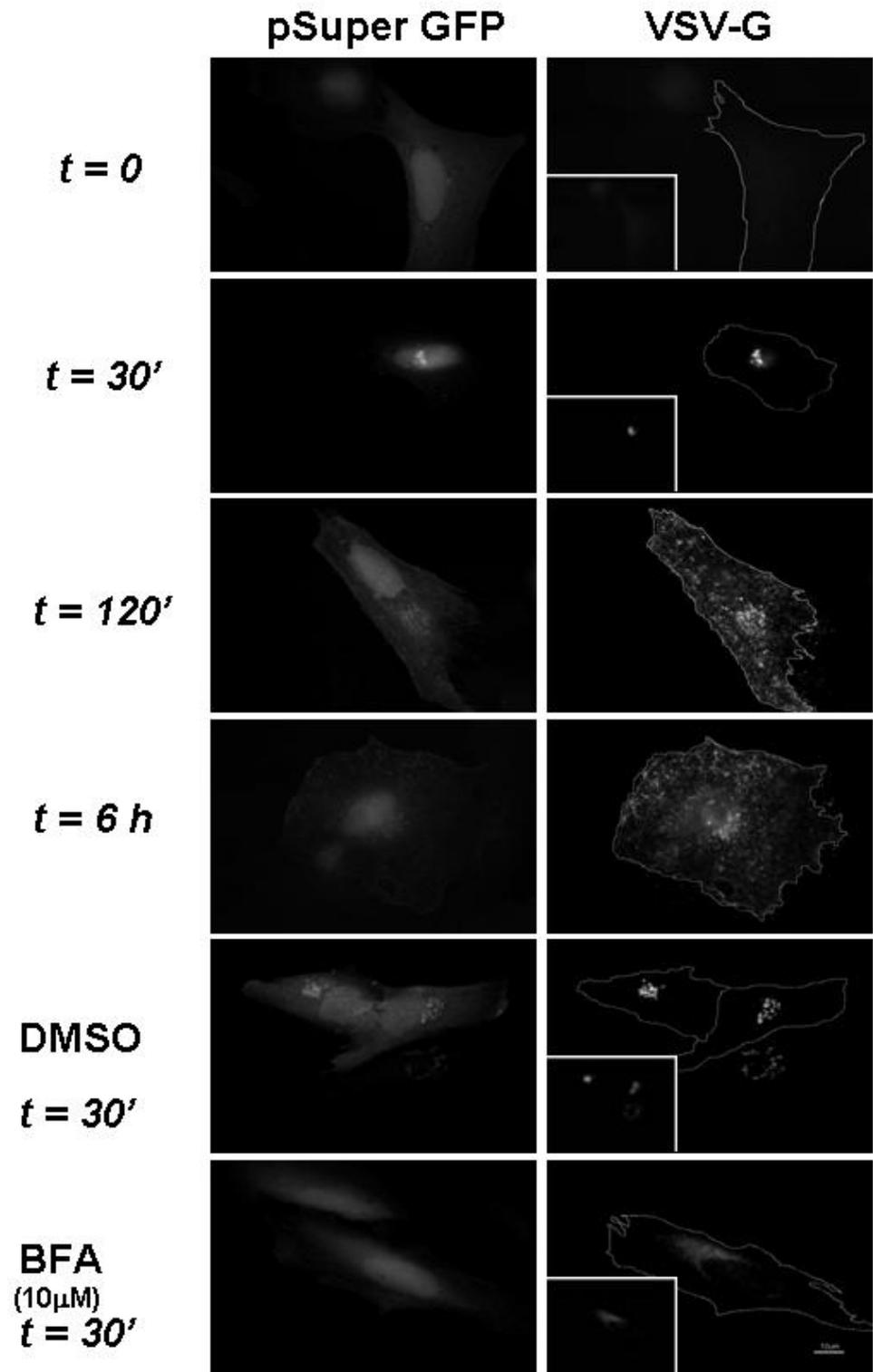


**Figura 19: Análisis cuantitativo de los marcadores de la vía secretoria no alterados por inhibición de la expresión de hGBF1 y hBIGs.** La grafica representa el patrón no alterado de cada marcador respecto al efecto en el silenciamiento de hGBF1 y hBIGs. Se procesaron 11 campos oculares con  $n=13\pm 2$  células con 30% de transformación (GFP positivas).

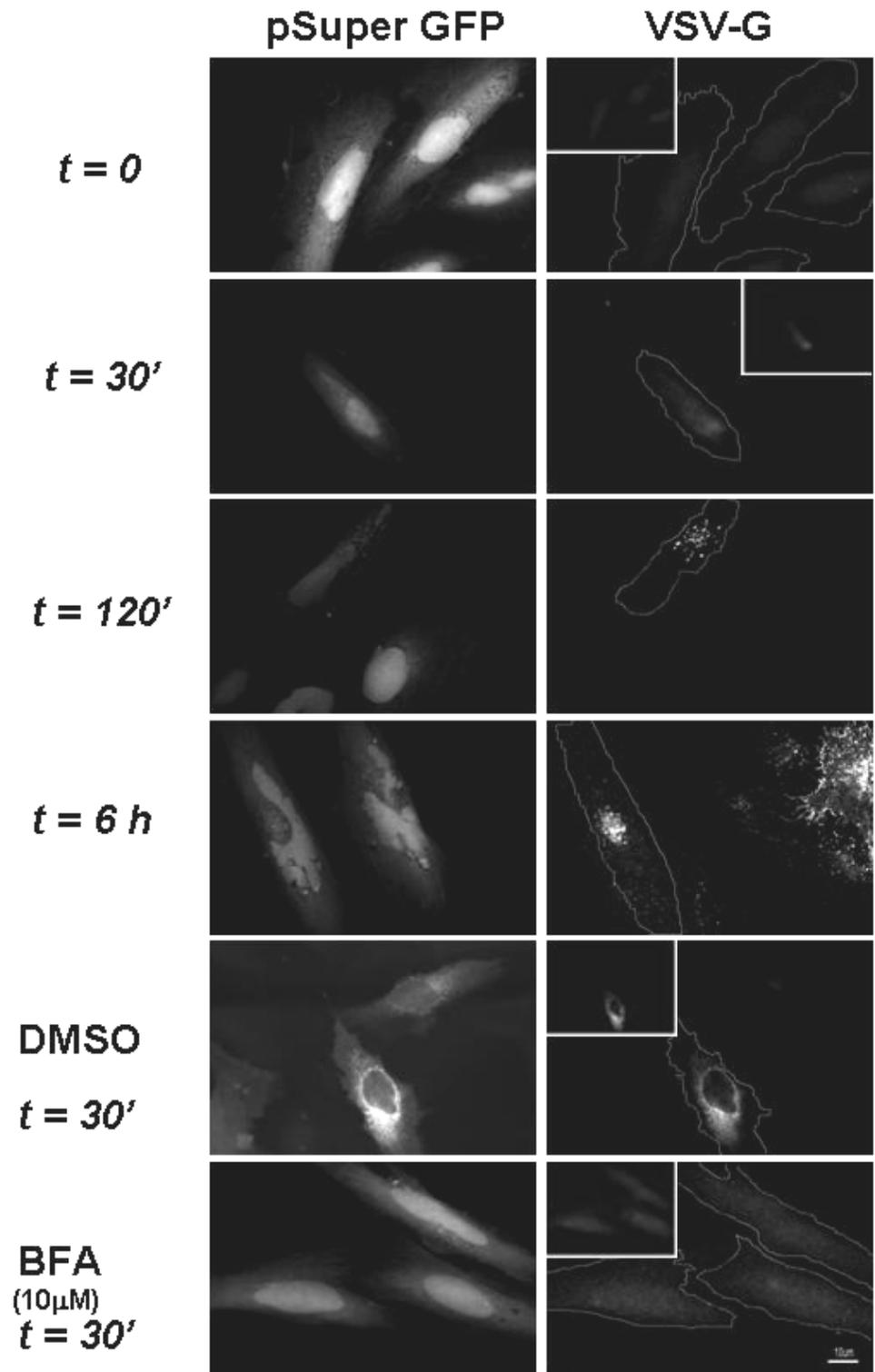
que la proteína obtiene un correcto plegamiento y es secretada desde el RE. Luego las muestras fueron fijadas con paraformaldehído a los tiempos indicados y procesadas para microscopía confocal utilizando el anticuerpo monoclonal anti-VSVG.

Como ilustra el control (Figura 20) la secreción de la proteína VSV-G a temperatura permisiva (32°C), muestra que a tiempo cero esta proteína se encuentra acumulada en RE, luego a los 30 min se encuentra en compartimentos asociado a Golgi y ya a tiempos posteriores (120 min y 6 h) se encuentra finalmente en la membrana plasmática. En cambio el resultado arrojado al inhibir la expresión de hGBF1 muestra que se bloquea totalmente el tráfico de VSV-G en compartimentos puntiformes correspondientes aparentemente al ERGIC-Golgi (Figura 21). Al observar detenidamente los experimentos se observa una acumulación puntiforme de estructuras brillantes después de 2 horas de liberación por cambio de temperatura (32°C) desde RER. Esta acumulación particular no es causada por stress celular o agregación de proteínas no secretadas a una temperatura no permisiva (40°C), ya que este fenómeno es también observado cuando hay un cambio directo a 32°C, evitando la incubación a 40°C (Figura 21; 6 horas).

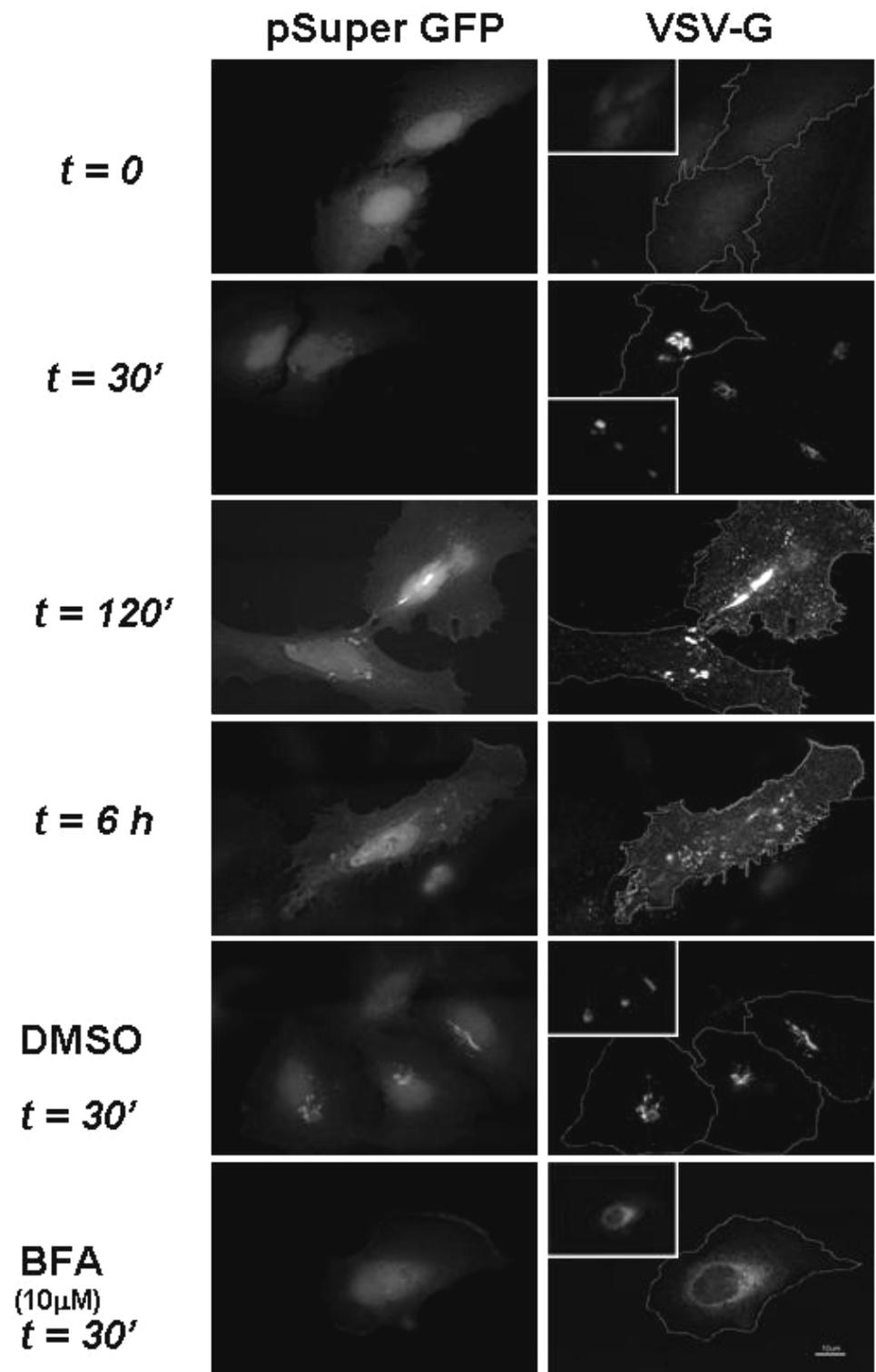
Al analizar el efecto con la inhibición de la expresión de hBIGs, como ilustra la figura 22, no se observa bloqueo de la secreción de VSV-G a temperatura permisiva (32°C) post-liberación de RER. La secreción de VSV-G en células transformadas con las construcciones que inhiben la expresión de hBIGs corresponde al patrón arrojado por las células control, o sea, aquellas que fueron transformadas con el vector vacío (Figura 20).



**Figura 20: pSuper\_tet vacío no bloquea la secreción de VSV-G.** Células Hela fueron transformadas con pSuper\_tet vacío y re-transformadas después de 72 horas con un plasmidio que expresa la proteína VSV-G. Las células fueron incubadas y procesadas por los tiempos y condiciones como se indica en métodos sección 3.2.16. El contorno de las células transformadas con pSuper\_tet (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10 $\mu$ m.



**Figura 21: La inhibición de la expresión de hGBF1 bloquea la secreción de VSV-G.** Células Hela fueron transformadas con los plasmidios que expresan las secuencias inhibitorias contra hGBF1 y re-transformadas después de 72 horas con un plasmidio que expresa la proteína VSV-G. Las células fueron incubadas y procesadas por los tiempos y condiciones como se indica en métodos sección 3.2.16. El contorno de las células transformadas con pSuper (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10 $\mu$ m.



**Figura 22: La inhibición de la expresión de hBIGs no bloquea la secreción de VSV-G.** Células Hela fueron transformadas con plasmidios que expresa las secuencias inhibitorias contra hBIGs y re-transformadas después de 72 horas con un plasmidio que expresa la proteína VSV-G. Las células fueron incubadas y procesadas por los tiempos y condiciones como se indica en la sección 3.2.16. El contorno de las células transformadas con pSuper (GFP-positivas) ha sido marcado en Adobe Photoshop. Barra indica 10 $\mu$ m.

Brefeldina A fue utilizada en estos experimentos como un control de secreción. El efecto mostró un patrón esperado, ya que esta droga es capaz de inhibir la activación de ARF, lo que impide el reclutamiento de COPI, provocando el bloqueo de la vía secretoria. En nuestros resultados, al emplear esta droga, no hay salida de VSV-G desde el RER hacia la membrana plasmática (Figura 20, 21 y 22). En cambio los experimentos en los cuales se utilizó sólo el solvente (DMSO), estos no mostraron alteración en la secreción de VSV-G, ya que esta proteína presentó salida normal del RER (Figura 20), evento también observado en el silenciamiento de hBIGs (Figura 22). Sin embargo, en la figura 21, se observa retención de la proteína, debido al silenciamiento de hGBF1 en presencia del solvente. Por lo tanto, concluimos que el bloqueo secretorio causado por el silenciamiento de GBF1, ocurre en una etapa posterior a la salida de VSV-G desde el retículo endoplásmico.

## 5. DISCUSIÓN

En la presente tesis se realizó un estudio de la función de GBF1, BIG1 y BIG2 en la vía secretoria mediante la inhibición de su expresión a través la técnica de siRNA. Para este propósito, el trabajo se dividió básicamente en dos etapas. La primera consistió en la elaboración de las herramientas para nuestro estudio, donde se diseñaron los oligos siRNA para los transcritos blancos y el clonamiento de estos en el vector pSuper. La siguiente etapa, consistió en la aplicación de las herramientas descritas, en la cual se observó que el silenciamiento de hGBF1 provocó alteración de los marcadores tempranos de la vía secretoria y por consiguiente el bloqueo de VSV-G-ts-045 en la región entre el retículo endoplasmático y el Golgi correspondiente a ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment). El silenciamiento de hBIG1 y/ó hBIG2 por su parte, no provocaron alteraciones observables.

El transporte vesicular entre las cisternas de Golgi, y el transporte retrógrado desde el Golgi al retículo endoplasmático, depende específicamente del manto protéico COPI y de la GTPasa ARF1 (Donaldson *et al.*, 1992a). El manto COPI, que corresponde a un complejo proteico citosólico pre-ensamblado (Waters *et al.*, 1991), es reclutado por ARF1 en las membranas para la producción de yemas, que eventualmente darán origen a vesículas recubiertas. La activación de ARFs es causada por intercambio de GDP unido a la proteína por GTP, regulado por factores de intercambio de GTP o GEFs (GTP Exchange Factors).

Brefeldina A, es una lactona heterocíclica de origen fúngico que provoca dispersión de los marcadores de Golgi (Klausner *et al.*, 1992 y Pelham, 1991) y es capaz de inhibir la

activación de ARF, debido al bloqueo del intercambio de GDP por GTP, lo que impide el cambio conformacional requerido para su asociación a las membranas de Golgi (Donaldson *et al.*, 1992b; Helms y Rothman, 1992; Randazzo *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1995; Franco *et al.*, 1996). Este bloqueo es causado porque esta droga es capaz de unir y estabilizar el complejo ARF/GDP/GEF (Peyroche *et al.*, 1999 y Mansour *et al.*, 1999).

Mencionando algunas características descritas de los GEFs involucrados en este trabajo, podemos señalar que GBF1 se desplaza cíclicamente entre el citosol y las membranas de Golgi y la región ERES/VTC (Zhao *et al.*, 2002). Es el único integrante del grupo de GEFs de alto peso molecular que es resistente a BFA *in vitro* (Claude *et al.*, 1999). La resistencia inducida por GBF1, se manifiesta tanto en la capacidad de las células sensibles a crecer en presencia de esta droga, como de mantener la estructura normal del Golgi en altas concentraciones de este compuesto cuando GBF1 es sobreexpresado. Recientes investigaciones han revelado que los enterovirus (ej. virus del polio y virus coxsackie), miembros de la familia de picornavirus, importantes patógenos humanos por producir una amplia variedad de enfermedades, inhiben el reclutamiento de COPI sobre el Golgi por inactivación de GBF1 (Wessels *et al.*, 2007). Sin embargo, la sobreexpresión de este GEF es capaz de recuperar la transcripción del virus del polio cuando este proceso ha sido inhibido por el uso de BFA (Belov *et al.*, 2005), lo que implica que la actividad de GBF1, es requerida para la función y formación de los complejos de replicación viral y que estos requerimientos son la causa la inhibición del crecimiento del virus con el uso de esta droga.

De BIG1 y BIG2 por su parte, se ha descrito que fueron co-purificados a partir de un heterodímero desde extractos de cerebro de bovino y ensayos de inmunofluorescencia indican que estos colocalizan en la región *trans* del Golgi (Yamaji *et al.*, 2000). Por otro lado se ha revelado que tanto BIG1 como BIG2 son incapaces de generar resistencia celular frente a BFA en ensayos de sobreexpresión en células sensibles a la droga (Claude *et al.*, 1999; Shinotsuka *et al.*, 2002).

Se han efectuado experimentos que describen a los ortólogos de los GEFs de nuestro estudio, Gea1p, Gea2p y Sec7p, en levaduras (*S. cerevisiae*), como esenciales para el funcionamiento de la vía secretoria en estas células (Peyroche *et al.*, 1999). Se ha demostrado además que la función individual de estos GEFs no es intercambiable. Es así que los resultados de los experimentos realizados han revelado que la inactivación individual de Gea1p ó Gea2p no muestran un fenotipo alterado, sin embargo, las doble mutantes de Gea1p y Gea2p son inviables. Estos también han sido observados en la inactivación de Sec7p. Por lo tanto, esto demuestra que existe familias funcionales para estos GEFs, lo cual se espera también ocurra en mamífero, GBF1 y BIGs (BIG1 y BIG2). Por esta razón se decidió utilizar el doble silenciamiento de hBIG1 y hBIG2, para asegurar la obtención de un fenotipo observable.

Ensayos en los cuales se ha bloqueado la interacción entre ARF y COPI, ya sea por el uso de BFA (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998) o por inhibición de GBF1 por virus (Wessels *et al.*, 2007), desencadenan la tubulación de las membranas de Golgi y su posterior absorción por el retículo endoplasmático produciendo una dispersión de los elementos internos de Golgi.

## 5.1. Confección y mejoramiento de herramientas

El trabajo con la técnica de siRNA, requiere de preparación para un silenciamiento específico. Como fue descrito las secuencias de los transcritos blanco se obtuvieron a partir de las bibliotecas génicas del NCBI. Se ha descrito que para un correcto desempeño en el silenciamiento, las secuencias seleccionadas deben presentar una homología exacta con el mensajero de la proteína blanco correspondiente. Además, su contenido de GC debe estar entre un 36-52% y no presentar repeticiones del contenido de timinas, ya que éstas pueden producir un codón de término para la polimerasa III evitando así su expresión (Reynolds *et al.*, 2004).

Una vez superada la etapa de selección y análisis de las secuencias utilizadas, la elección de un vector capaz de expresar estas secuencias fue fundamental. Nuestra elección fue pSuper un vector plasmidial de 5429 pb (Oligoengine, Seattle, USA), que expresa horquillas de RNA y que además posee un marcador de selección para la manipulación y clonamiento de los oligos en bacterias. Para el trabajo con células de mamífero este vector también posee marcadores, uno de selección (neomicina) y otro de expresión (EGFP), siendo este último muy importante a la hora de realizar un análisis cualitativo de expresión de proteínas, ya que nos permite la identificación de las células blanco (GFP positivas).

Aún con todos los requisitos mencionados, hay factores que son determinantes para un análisis en profundidad con esta técnica. Como fue mencionado en los resultados de la sección 4.2, un estudio por la técnica de Western blot requiere de una transformación celular superior al 60%, con lo cual se pueda apreciar claramente la variación en la

expresión de una proteína. En nuestro caso sólo fue posible alcanzar hasta un 30% de transformación con nuestras construcciones, por lo tanto, no fue posible realizar un estudio detallado del silenciamiento de cada GEF a través de esta técnica.

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares HeLa y 293 EBNA. Una característica de la línea celular HeLa es que presenta estructuras con mejor definición a la hora de observar la localización de proteínas por inmunofluorescencia. En esta línea celular no fue posible electroporar debido a la dificultad de estandarizar un procedimiento adecuado y reproducible. Por otro lado, la máxima transfección alcanzada con lípidos catiónicos fue hasta un 30%, lo que nos permitió un análisis de fenotipo por inmunofluorescencia. La línea celular 293 EBNA fue utilizada en extracción de proteínas para un análisis de expresión con la técnica de Western blot, donde nos encontramos con los problemas de baja eficiencia en la transfección ya mencionados.

Debido a este problema y con el propósito de solucionarlo en un futuro, se ideó una forma de crear una línea celular que exprese los siRNA de forma controlada, lo que consistió en agregar un elemento adicional al vector pSuper. La inducción de la expresión de siRNAs en células que expresan un represor de la transcripción ha sido estudiado en detalle (van de Wetering *et al.*, 2003). Este represor es capaz de unirse al operador Tet, que corresponde a una secuencia específica que puede ser ubicada en el promotor H1, cercano al sitio de inicio de la transcripción de pSuper, bloqueandola (Yao *et al.*, 1998). Este represor además puede ser inhibido en células que lo expresan por el uso de doxiciclina (derivado semisintético de tetraciclina) adicionado directamente al medio de cultivo.

Después de efectuar el reemplazo de secuencia del promotor H1 presente en pSuper a través de la técnica de PCR y luego de clonar los oligos, se transfectaron las nuevas construcciones ahora en pSuper\_tet. Luego de observar las células, se confirmó que el vector modificado cumplía el objetivo principal de expresar siRNA contra las proteínas blanco por medio de ensayos de inmunotinción con anticuerpos específicos de igual manera que las confeccionadas en el vector original. Esta nueva herramienta, será evaluada en el futuro próximo mediante la creación de líneas celulares estables.

## **5.2. Efectos obtenidos con la aplicación de las herramientas confeccionadas.**

Una vez terminado el trabajo de diseño y confección de nuestras herramientas, comenzó la etapa de aplicación experimental de éstas.

Las células HeLa y 293 EBNA, fueron transformadas con las construcciones según lo descrito y luego de procesar las muestras para inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para cada proteína blanco (9D3 y 9D4 dirigidos contra sec7 de hBIG1 y hGBF1 respectivamente), observamos que éstas silenciaban su expresión de forma específica y sustancial (Figuras 10 y 11). Para hBIG2 en cambio, no se pudo observar el efecto de inhibición, debido a que carecíamos del anticuerpo específico dirigido contra esta proteína. Sin embargo, el laboratorio del Dr. Paul Melançon (U. de Alberta, Canadá) en colaboración, evaluó nuestras construcciones donde se comprobó de forma positiva el silenciamiento de dicho GEF a través de ensayos de inmunotinción (datos no mostrados).

Refiriéndonos específicamente a los efectos relacionados con el silenciamiento de hGBF1, el descenso de los niveles de expresión de este GEF provoca alteraciones en los marcadores tempranos de la vía secretoria como se ilustra en la Figura 18. COPI, se presenta en su forma soluble, disperso en el citoplasma, lo que indica que éste no está asociado a las membranas del aparato de Golgi en las células transformadas (GFP positivas). Este suceso fue confirmado al observar una dispersión de p115, proteína originalmente identificada como el factor necesario para el transporte a través de Golgi (Waters *et al.*, 1992). Gigantina, una proteína integral del complejo de Golgi (Soennichsen *et al.*, 1998) se presenta dispersa, fenómeno que puede atribuirse a la ausencia del reclutamiento de COPI por ARF, lo que desestabiliza las membranas del complejo de Golgi. Sin embargo el marcador clatrina, no presenta alteración alguna en su patrón normal de distribución. Esta proteína, que media la endocitosis y el transporte entre el TGN y los endosomas probablemente no se muestra afectada, debido a que está regulada por otros tipos de proteínas denominadas Adaptinas (Gallusser y Kirchhausen, 1993).

Para la secreción de una glicoproteína, con la mutante termosensible VSV-G-ts-045 (Presley *et al.*, 1997), se pudo observar que la participación de GBF1 es imprescindible en la vía secretoria. Encontramos que existe un bloqueo total en su secreción a temperatura permisiva (32°C), con acumulación de esta proteína entre el retículo endoplásmico y el Golgi, estructura correspondiente a ERGIC (Figura 20). Este resultado es una clara confirmación de los efectos que se presentan cuando es utilizada la droga BFA (Pelham, 1991 y Klausner *et al.*, 1992) y por la infección con enterovirus (Wessels *et al.*, 2007) al inhibir la actividad de GBF. Se corrobora la importancia de

GBF1 en el transporte retrógrado, que al estar silenciada no existe activación de ARF y por consiguiente, al no efectuarse el reclutamiento de COPI, se produce una desestabilización del complejo de Golgi y el consecuente bloqueo de la vía secretoria. Este silenciamiento de GBF1 provoca la tubulación de las membranas de Golgi (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998), las cuales finalmente al fusionarse con el retículo endoplasmático desencadenaría la absorción de todo el contenido del primero por el segundo, llevando finalmente a la desaparición del complejo de Golgi y un bloqueo de la vía secretoria.

Con todos los antecedentes descritos, postulamos el siguiente modelo:

GBF1 es fundamental para el correcto funcionamiento del eje central de la vía secretoria, sin embargo, BIG1 y/o BIG2 no parecen ser necesarios en esta ruta ya que podrían estar asociados a una vía lateral que interconecta al TGN con los endosomas.

En base a este modelo, el silenciamiento de hBIG1 y/o hBIG2, no parece ser fundamental para la mantención del complejo de Golgi y la secreción de proteínas a la membrana plasmática. Al observar las células transformadas con las construcciones dirigidas contra hBIG1 y/o hBIG2 estas no muestran alteración alguna de los marcadores de la vía secretoria utilizados (Figura 18), ni en la secreción de la glicoproteína modelo (VSV-G-ts-045) hacia la membrana plasmática (Figura 22). Como se mencionó antes, estas proteínas colocalizan y conforman un heterodímero (Yamaji *et al.*, 2000). Esto sugiere que hBIG1 pudiese tener la misma función biológica que hBIG2 en la vía secretoria. Por lo tanto existe la posibilidad que el silenciamiento individual de estos GEFs no produzca ningún fenotipo, puesto que el GEF restante puede suplir la

función del silenciado. Como precedente, rescatamos los resultados obtenidos en levaduras con respecto a los GEFs Gea1p y Gea2p, donde las mutantes de una u otra proteína no producen un fenotipo alterado (Peyroche *et al.*, 1996), pero la mutación simultánea de ambos genes es inviable. También se ha observado que aquellos enterovirus que bloquean la vía secretoria, inhiben la función de GBF1 y no de BIG1 ó BIG2. Esto es una clara señal de la importancia de GBF1 frente a los procesos, como la función y formación de los complejos de replicación viral (Wessels *et al.*, 2007), que estos virus la requieren para su ciclo de vida.

Recientemente, resultados obtenidos con nuestros colaboradores han comprobado que la inhibición simultánea de BIG1 y BIG2 bloquea el tráfico desde el TGN (Trans Golgi Network) hacia los endosomas (Manolea *et al.*, 2007). Estos interesantes experimentos no se pudieron realizar en nuestro laboratorio por la carencia de anticuerpos específicos para BIG2 y para la vía endosomal.

La técnica de siRNA es ampliamente utilizada en la actualidad para el silenciamiento de genes. Con las herramientas confeccionadas en este trabajo, se abren nuevas puertas para continuar la investigación y caracterización de la función de estos GEFs. Esta metodología podría ser una buena manera de esclarecer la función de los procesos relacionados con BIG1 y BIG2, los que aún se desconocen en gran parte. Además, las construcciones que ofrecen control de la expresión de los siRNAs en pSuper\_tet (inducible), eventualmente podrían ser parte integral de una línea celular modificada con expresión del represor Tet, y así facilitar el análisis de la función de los procesos que involucran la vía secretoria. Este sistema regulado, brindará la posibilidad de realizar un

estudio más refinado de la función de estos GEFs asociados a los procesos de tráfico secretorio, al disponer de flexibilidad para seleccionar clones y controlar los tiempos de silenciamiento.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Antonny, B., I. Huber, S. Paris, M. Chabre, y D. Cassel. 1997. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem.* 272:30848-51.
- Belov, G.A., M.H. Fogg, y E. Ehrenfeld. 2005. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor. *J Virol.* 79:7207-16.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, y G.J. Hannon. 2001a. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-6.
- Bernstein, E., A.M. Denli, y G.J. Hannon. 2001b. The rest is silence. *Rna.* 7:1509-21.
- Brummelkamp, T.R., R. Bernards, y R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296:550-3.
- Castanotto, D., H. Li, y J.J. Rossi. 2002. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *Rna.* 8:1454-60.
- Claude, A., B.P. Zhao, C.E. Kuziemy, S. Dahan, S.J. Berger, J.P. Yan, A.D. Arnold, E.M. Sullivan, y P. Melancon. 1999. GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol.* 146:71-84.
- Chavrier, P., y B. Goud. 1999. The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 11:466-75.
- Donaldson, J.G., D. Cassel, R.A. Kahn, y R.D. Klausner. 1992a. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6408-12.

- Donaldson, J.G., D. Finazzi, y R.D. Klausner. 1992b. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*. 360:350-2.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, y T. Tuschl. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411:494-8.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, y T. Tuschl. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 15:188-200.
- Fire, A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*. 15:358-63.
- Franco, M., P. Chardin, M. Chabre, y S. Paris. 1996. Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*. 271:1573-8.
- Franco, M., S. Paris, y M. Chabre. 1995. The small G-protein ARF1GDP binds to the Gt beta gamma subunit of transducin, but not to Gt alpha GDP-Gt beta gamma. *FEBS Lett*. 362:286-90.
- Gallusser, A., y T. Kirchhausen. 1993. The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *Embo J*. 12:5237-44.
- Garcia-Mata, R., T. Szul, C. Alvarez, y E. Sztul. 2003. ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell*. 14:2250-61.
- Hammond, S.M., A.A. Caudy, y G.J. Hannon. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*. 2:110-9.

- Helms, J.B., y J.E. Rothman. 1992. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*. 360:352-4.
- Jackson, C.L., y J.E. Casanova. 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*. 10:60-7.
- Kawamoto, K., Y. Yoshida, H. Tamaki, S. Torii, C. Shinotsuka, S. Yamashina, y K. Nakayama. 2002. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic*. 3:483-95.
- Ketting, R.F., S.E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G.J. Hannon, y R.H. Plasterk. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 15:2654-9.
- Klausner, R.D., J.G. Donaldson, y J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol*. 116:1071-80.
- Laemmli, U.K., F. Beguin, y G. Gujer-Kellenberger. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*. 47:69-85.
- Lee, N.S., T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M.J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra, y J. Rossi. 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*. 20:500-5.
- Lippincott-Schwartz, J., N.B. Cole, y J.G. Donaldson. 1998. Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem Cell Biol*. 109:449-62.

- Manolea, J., A. Claude, J. Chun, J. Rosas y P. Melancon. 2007. Functional analysis of Golgi-Arf-GEFs GBF1 and BIGs through overexpression and knockdown studies. *J Cell Biol.* in revision.
- Mansour, S.J., J. Skaug, X.H. Zhao, J. Giordano, S.W. Scherer, y P. Melancon. 1999. p200 ARF-GEP1: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7968-73.
- Misumi, Y., Y. Misumi, K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura, y Y. Ikehara. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 261:11398-403.
- Miyagishi, M., y K. Taira. 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 20:497-500.
- Morinaga, N., S.C. Tsai, J. Moss, y M. Vaughan. 1996. Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12856-60.
- Moss, E.G. 2001. RNA interference: it's a small RNA world. *Curr Biol.* 11:R772-5.
- Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, y D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol.* 20:505-8.
- Pelham, H.R. 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell.* 67:449-51.

- Peyroche, A., B. Antony, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, y C.L. Jackson. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*. 3:275-85.
- Peyroche, A., S. Paris, y C.L. Jackson. 1996. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature*. 384:479-81.
- Randazzo, P.A., Y.C. Yang, C. Rulka, y R.A. Kahn. 1993. Activation of ADP-ribosylation factor by Golgi membranes. Evidence for a brefeldin A- and protease-sensitive activating factor on Golgi membranes. *J Biol Chem*. 268:9555-63.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, y A. Khvorova. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 22:326-30.
- Rudchenko, O.N., N.A. Likhacheva, N.V. Timakova, y B.N. Illiashenko. 1975. [Competence in Escherichia coli cells. III. Formation of competent states in Escherichia coli X7026 and Escherichia coli Hfr H cells during storage in different conditions]. *Genetika*. 11:101-9.
- Sharp, P.A. 2001. RNA interference--2001. *Genes Dev*. 15:485-90.
- Shinotsuka, C., Y. Yoshida, K. Kawamoto, H. Takatsu, y K. Nakayama. 2002. Overexpression of an ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *J Biol Chem*. 277:9468-73.
- Soennichsen, B., M. Lowe, T. Levine, E. Jamsa, B. Dirac-Svejstrup, y G. Warren. 1998. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol*. 140:1013-21.

- Togawa, A., N. Morinaga, M. Ogasawara, J. Moss, y M. Vaughan. 1999. Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem.* 274:12308-15.
- Tuschl, T. 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem.* 2:239-45.
- van de Wetering, M., I. Oving, V. Muncan, M.T. Pon Fong, H. Brantjes, D. van Leenen, F.C. Holstege, T.R. Brummelkamp, R. Agami, y H. Clevers. 2003. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 4:609-15.
- Waters, M.G., D.O. Clary, y J.E. Rothman. 1992. A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol.* 118:1015-26.
- Waters, M.G., T. Serafini, y J.E. Rothman. 1991. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature.* 349:248-51.
- Wessels, E., D. Duijsings, K.H. Lanke, W.J. Melchers, C.L. Jackson, y F.J. van Kuppeveld. 2007. Molecular determinants of the interaction between coxsackievirus protein 3A and guanine nucleotide exchange factor GBF1. *J Virol.* 81:5238-45.
- Yamaji, R., R. Adamik, K. Takeda, A. Togawa, G. Pacheco-Rodriguez, V.J. Ferrans, J. Moss, y M. Vaughan. 2000. Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2567-72.

- Yao, F., T. Svensjo, T. Winkler, M. Lu, C. Eriksson, y E. Eriksson. 1998. Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther.* 9:1939-50.
- Zhao, X., T.K. Lasell, y P. Melancon. 2002. Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell.* 13:119-33.