

CLONACION Y CARACTERIZACION DE LOS GENES ATX1, ASHH1, ASHH2 DE ARABIDOPSIS THALIANA PARA SU POSTERIOR ESTUDIO EN LA DETERMINACION DE INTERACCIONES PROTEICAS CON EL SISTEMA DE DOS HIBRIDOS EN LEVADURA

Rivera Díaz, F.;

Alvarez Venegas, R.; Camas A.

Facultad de Química Universidad Autónoma de Querétaro / CINVESTAV Irapuato

RESUMEN

Se realizó la clonación y caracterización de los genes ATX1, ASHH1 Y ASHH2 de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para proteínas metil-transferasas de histonas. Para posteriormente comprobar su potencial de interacción entre ellas mediante el sistema de dos híbridos en levadura.

Se comenzó con la elaboración de DNA complementario (cDNA) de las secuencias de los genes de interés, partiendo de RNA total previamente extraído de distintos tejidos de la planta y ya preservado en el laboratorio. Por medio de una reacción de RT-PCR obtuvimos cDNA de las secuencias de los genes mencionados; posteriormente se pasó a la ligación de la secuencia de los genes de interés al vector, en donde se utilizaron dos vectores (*PGBK* y *PGAD*), ligando cada gen por separado. Después de esto se transformaron células competentes (*E. coli DH5α*) mediante electroporación con el vector anteriormente ligado. En seguida se cultivaron las células en medio con antibiótico para seleccionar las transformadas, una vez que se tienen las colonias seleccionadas se comenzó con minipreps para extraer el DNA de las células y buscar mediante una electroforesis si realmente se insertó nuestro gen de interés. Después de seleccionar las colonias con el inserto, se vuelve a extraer DNA para mandar a secuenciar y confirmar que tienen el gen, al final se guardan en glicerol para sus próximos estudios.

INTRODUCCIÓN

Muchos fenómenos genéticos están regulados de manera epigenética, es decir, a través de cambios heredables en la expresión génica que no son explicados por cambios en la secuencia de las bases del DNA, sino que son debidos a modificaciones estructurales de la cromatina o a modificaciones químicas en las bases del DNA, o en proteínas asociadas directamente al DNA, como las histonas. Actualmente se sabe que la metilación directa del DNA tiene un papel determinante en la regulación de la expresión de genes. Por ejemplo la enzima 5-metil-citosina DNA metiltransferasa es la responsable de modificar químicamente ciertas citosinas del DNA mediante la transferencia de un grupo metilo, 5metCpG. Esta reacción es llevada a cabo mediante la interacción con otras proteínas para formar un complejo activo de unión al DNA, el cual interviene en la regulación de las secuencias metiladas. A partir de muchos estudios en levadura, ha sido evidente que las histonas H3 y H4 son muy importantes, en particular sus “colas” o porciones amino terminales, las cuales están directamente involucradas en la formación de heterocromatina (asociada con los estados silenciosos o reprimidos), pero también son importantes en la formación de eucromatina (asociada con la porción activa de los cromosomas para la expresión de los genes). Por ejemplo, el cuerpo de Barr en las mujeres es un ejemplo de silenciamiento epigenético en el cromosoma X, el cual llega a ser visible citológicamente como heterocromatina condensada.

Por otro lado, existen distintos grupos de enzimas metiltransferasas con capacidad para transferir grupos metilo a residuos de Arginina (HRMTs) o a residuos de Lisina (HKMTs) ubicados en las colas de las histonas H3 y H4. Podemos encontrar a estas, clasificadas en dos grupos, el Grupo

Polycomb (PcG) y el grupo Tritorax (TrxgG); mientras que las primeras bloquean la expresión, las segundas la activan. Ambos grupos regulan la expresión de agrupaciones de genes durante el desarrollo, en particular, para mantener la identidad y la proliferación celular en organismos multicelulares. El hecho de que estos estados, de represión y de activación pudieran ser transmitidos establemente durante la división celular, sugirió que un mecanismo epigenético subyacía a este proceso. En particular este mecanismo de control epigenético es esencial para la regulación de los genes en la línea celular germinal.

Las plantas han llegado a ser una fuente rica en descubrimientos epigenéticos y dentro de ellas *Arabidopsis* se usa como planta modelo para el entendimiento del desarrollo vegetal. En las plantas, estos grupos de genes también regulan la identidad y proliferación celular, así como los genes de vernalización.

Las proteínas codificadas por estos genes (ATX1, ASHH1 y ASHH2) actúan de manera importante sobre la activación de diversos genes en la planta, a través de interaccionar y formar complejos con varias proteínas, las cuales interactúan entre si a través de dominios conservados que comparten, como el dominio SET (Suvar-Enhancer of Zeste y Tritorax=SET). Un ejemplo de esto, es que se sabe que ATX1 tiene una regulación epigenética sobre la floración de la planta, ya que activa genes de flores. Todo esto es lo que nos lleva al interés de comprobar la interacción de estas proteínas entre si y con otras proteínas por medio del sistema de detección de interacciones proteína-proteína conocido como Y2HS (Yeast Two Hybrid System).

METODOS

A partir de RNA total se pasó a sintetizar cDNA mediante una reacción de RT-PCR, después de esto se realizó una PCR con los primers específicos de las secuencias de los genes a clonar

Ligación: se ligaron las secuencias correspondientes a los dominios SET de los genes ATX1, ASHH1 y ASHH2 en los vectores PGBK y PGAD utilizando T4 DNA Ligase de Invitrogen, cada secuencia se ligó por separado obteniendo un total de 6 ligaciones. Se realizó en tubos a los cuales se les agrego en proporción 3:1 el inserto y vector, 5X Ligase Reaction Buffer, T4 DNA Ligase y agua estéril, se mezcló suavemente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Transformación de células: se utilizaron células competentes de *E.coli* DH5 α que fueron transformadas por medio de electroporación. Las celdas fueron preparadas con 2 μ l de vector y 20 μ l de células.

Después de llevar a cabo la transformación las células se resuspendieron en medio Lb líquido sin antibiótico y se incubaron por 1 hora para después seleccionar las transformadas en caja petri con medio Lb sólido con antibiótico para obtener colonias aisladas y se extrajo el DNA de cada clona mediante miniprep.

El DNA de plásmido extraído se digirió con enzimas de restricción, las cuales cortan específicamente los extremos de la secuencia que había sido ligada con el vector al inicio del trabajo. Una vez hecho esto se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar si realmente las células tienen el plásmido con el inserto que nos interesa. Después de seleccionarlás se vuelve a extraer DNA de dichas colonias, se digiere y se manda a secuenciar para corroborar que se trata de la secuencia de interés que se insertó correctamente. Al final se guardan las células transformadas correctamente en glicerol para su posterior estudio.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron favorables, al inicio se amplificaron exitosamente fragmentos de la secuencia de los genes ATX1-3S, ASHH13S Y ASHH2-3S a partir del cDNA del mRNA extraído de la planta. Los fragmentos de secuencia de estos genes fueron amplificados por PCR

con los primers específicos para cada uno, esto fue corroborado mediante una electroforesis (figura 1). Ya que es muy importante estar seguro de la amplificación de dichos genes, para poder pasar a la reacción de ligación con el vector.

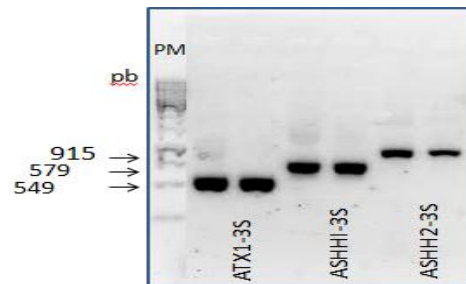


Figura 1. Amplificación por PCR con primers específicos para cada aen.

Después de la ligación del gen con el vector, se llevó a cabo la transformación de las células DH5 α , la cual nos dio resultados positivos, ya que crecieron satisfactoriamente en medio Lb con antibiótico, lo cual indica que si se insertó el vector que es el que le confiere la resistencia a la célula. Una vez que crecieron en placa, se fueron haciendo cultivos de colonias aisladas para extraer el DNA, digerirlo con las enzimas correspondientes al inserto del gen y buscó si efectivamente se libera el inserto mediante una electroforesis. Al inicio solo se insertaba al vector el dominio SET de las proteínas, (figura 2 y 3).

Se buscó hasta obtener colonias que tuvieran el dominio SET de ATX1-3s, ASHH1-3s y ASHH2-3s.

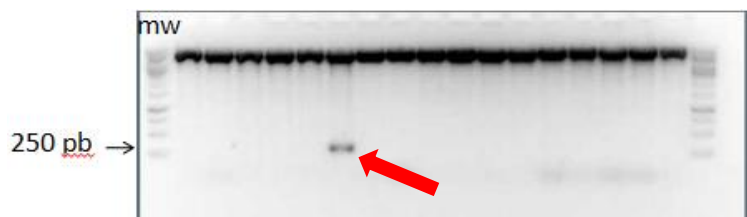


Figura 2. Electroforesis con digestión del dominio set en PGBK de ASHH1-3S con NdeI-ScaI. En el carril 6 se muestra la única colonia que presento el inserto

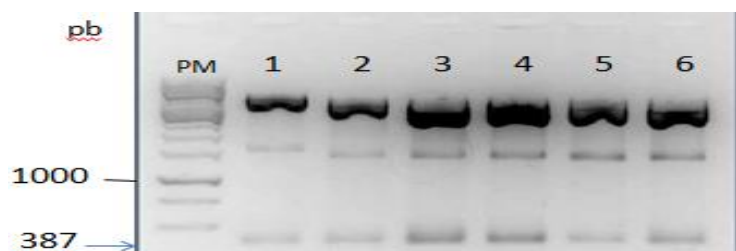


Figura 3. Electroforesis con digestión del dominio set de ASHH2-3s con NcoI-BamHI.

La finalidad de insertar en el vector solo el dominio SET de la proteína o la secuencia completa es para que al realizar el estudio de su interacción en el sistema de dos híbridos en levadura, sepamos si es necesaria toda la proteína o solo algunos dominios de ella. Después de tener seleccionadas las colonias que tienen correctamente insertado la secuencia del dominio SET de las proteínas, se comenzó a buscar las colonias que tuvieran la secuencia de la proteína completa (figura 3).

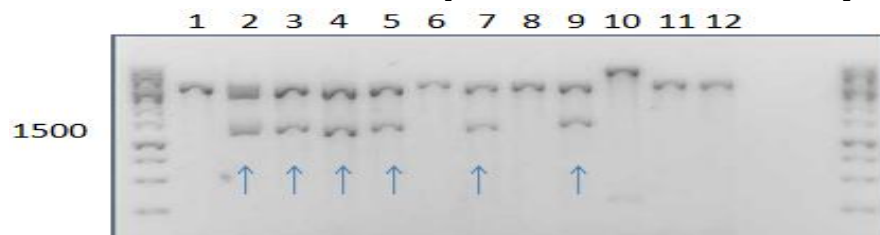


Figura 3. Electroforesis con digestión para ASHHI-C completo con EcoRI-BamHI. Los carriles señalados son colonias diferentes donde se encontró el inserto esperado.

Una vez que fueron seleccionadas las colonias con el inserto tanto del dominio SET como de la proteína completa en todos los casos, se volvió a extraer DNA de dichas colonias y se mandó a secuenciar para asegurar que la transformación fuera correcta y que los insertos están correctos. Lo cual es muy importante porque si la secuencia se insertó pero no completa, puede cambiar la lectura de los codones y codificar para polipeptidos completamente diferentes. Al final que ya se está seguro de las secuencias, se guardan las células en glicerol para su posterior análisis por el sistema de dos híbridos en levadura.

CONCLUSION

La transformación de las células DH5 α fue hecha con resultados positivos, ya que crecieron de buena manera en medio con antibiótico, la búsqueda y selección de las colonias transformadas correctamente fue exitosa, se pudo aislar colonias con los genes interés y con los dos vectores que se utilizaron. Este trabajo es muy importante ya que esto permitirá un buen análisis para determinar el potencial de interacción de estas proteínas con ellas mismas y con todas las demás proteínas de la planta *Arabidopsis thaliana* mediante el sistema de dos híbridos en levadura.

Este trabajo me sirvió de mucho ya que pude aprender tanto técnicas moleculares como instrumentales muy importantes en el ramo de la biotecnología, lo cual me será de mucha ayuda en futuros laboratorios.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Edited by C. David Allis, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg, Marie-Laure Caparros. “Epigenetics”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2007

Raul Alvarez Venegas, Stephane Pien, Monther Sadler, Xiaohong Witmer, Ueli Grossniklaus and Zoya Avramova, “ATX-1, an Arabidopsis Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes” Current Biology, Vol. 13, 627–637, April 15, 2003.