

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y  
Agropecuarias



*"Caracterización de los sitios 33-35, 360 y 654 en  
conflicto del gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa,  
en población de Jalisco"*

Tesis Profesional que para obtener el título de  
Licenciado en Biología

Presenta:

Carlos Córdova Fletes

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Enero 2005

Dr. Carlos Álvarez Moya.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad "tesis", opción "tesis e informes" con el título: "Caracterización de los sitios en conflicto 33-35, 360 y 654 del gen de la Subunidad β de la fosfodiesterasa, en población de Jalisco" que realizó el/la pasante Carlos Córdova Fletes con número de código 394025443 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas, Zapopan, Jal., 06 de enero de 2005

Directora de tesis

*Claudia Medina Lozano*  
 M. en C. Claudina Medina Lozano

Asesores

*Silvia Josefina López Pérez*  
 Dra. Silvia Josefina López Pérez  
 M. En C. Isabel Cristina Núñez Gutiérrez

*Isabel Cristina Núñez Gutiérrez*

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado el anteproyecto	Fecha de aprobación
Carlos Álvarez Moya	<i>[Firma]</i>	6/Enero/05
Ramón Reynoso Orozco	<i>[Firma]</i>	6/enero/05
Patricia Castro Félix	<i>[Firma]</i>	6 enero/05
Supl. Anne Santore Lucas	<i>[Firma]</i>	6 enero 2005

*[Firma]*  
 6/Enero/05

Dr. Carlos Álvarez Moya  
 Presidente del Comité de Titulación  
 Carrera de Licenciado en Biología  
 Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
 Presente.

Por este conducto me permito poner a su consideración mi anteproyecto de titulación modalidad "Tesis e informes" opción "Tesis" titulado: "Caracterización de los sitios 1, 8 y 16 en conflicto del gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa, en población del occidente de México", el cual se anexa para que sea turnado al Comité de Titulación de esta carrera para su revisión y, en su caso, aprobación.

Así mismo, señalo como directora de titulación a: M. en C. Claudina Medina Lozano y como asesores a: Dra. Silvia Josefina López Pérez (interno) y M. en C. Isabel Cristina Nuñez (externo) Sin otro particular y en espera de su resolución, quedo de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Guadalajara, Jal. A 19 de Octubre de 2004.

Firma V. Bo.

*Claudina Medina L.*  
 Nombre completo y firma del director o directora

*Carlos Córdoba Flatores*  
 nombre completo  
 firma del/a estudiante

*Silvia J. López Pérez*  
 ASesor  
 Nombre y firma Dra. Silvia J. López Pérez

Nombre de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación del anteproyecto	Fecha de aprobación
Ramón Raymundo Orozco	<i>Ramón Orozco</i>	1 de dic. 04
Silvia Álvarez Muñoz	<i>Silvia Álvarez Muñoz</i>	15 de Dic. 04
Anne Santerre L	<i>Anne Santerre</i>	1º de Dic. 2004
Patricia Castro	<i>Patricia Castro</i>	1º de Dic. 2004

*RECIBI  
 11/10/2004  
 [Firma]*

Agradecimientos:

Agradezco a mi padre y a mi madre el apoyo incondicional que me han brindado para realizar mis estudios, al igual a mis hermanos que indirectamente me han dejado sus experiencias de las cuales he aprendido mucho.

Quiero agradecer a mi directora de tesis, mis asesores, mis compañeros y amigos, además a mis sinodales, todo el apoyo que me han ofrecido a lo largo de mis estancias.

A mi tutora de carrera que sin duda me guió satisfactoriamente en mi carrera, y me ofreció su ayuda en todo momento.

También a todas aquellas personas (amigos, compañeros, etc.) que me han dejado sus conocimientos y experiencias.

Gracias a todos por creer en mí.

TITULO:

**“Caracterización de los sitios 33-35, 360 y 654 en conflicto del gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa en población de Jalisco”**

PRESENTA:

**Carlos Córdova Fletes**

Para obtener el grado de: Licenciatura en Biología

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Claudina Medina Lozano

Adscripción: Investigador Titular A, División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

ASESORES:

INTERNO: Dra. Silvia Josefina López Pérez

Adscripción: Investigador Asociado, Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UdeG.

EXTERNO: QFB Isabel Cristina Núñez Gutiérrez.

Pasante del Doctorado en Genética Humana, UdeG.

Adscripción: Profesor Tiempo Completo, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.

## INDICE

Capítulo		Página
1	Introducción	4
2	Antecedentes	6
3	Planteamiento del problema	10
4	Justificación	11
5	Objetivo General	12
6	Materiales y Métodos	12
7	Resultados y Discusión	19
8	Conclusiones	25
9	Bibliografía	26
	Anexo 1. Protocolos de las técnicas utilizadas	29
	Anexo 2. Características bioquímicas generales de los aminoácidos implicados en los sitios en conflicto 33-35,360 y 654	49

## 1. INTRODUCCIÓN

La existencia de las fosfodiesterasas (PDEs) de nucleótidos cíclicos fue evidenciada por el Dr. Earl Sutherland y colaboradores en los estudios de la degradación del adenosín 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) y su relevancia fisiológica como segundo mensajero, posteriormente, la actividad PDE específica para guanosín monofosfato cíclico (GMPc) fue también demostrada, propiciando una explosión de conocimientos sobre las PDEs de los nucleótidos cíclicos, en particular sobre el gran número de isoenzimas que presentan (Figura 1) (1).

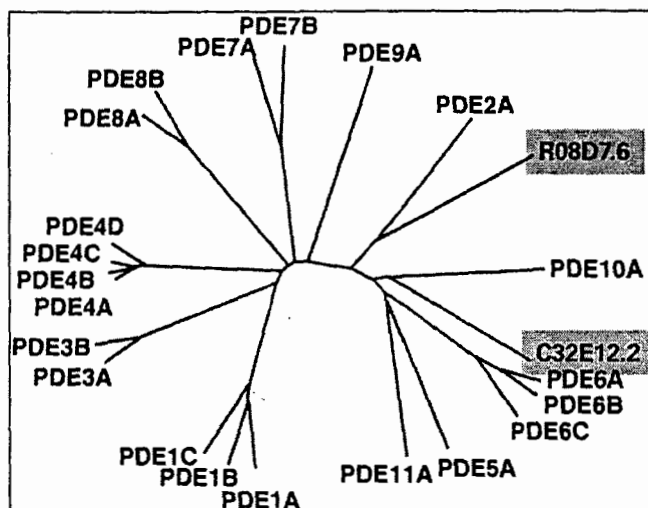


Figura 1. Árbol filogenético de las familias PDE inferidas por la alineación múltiple de las secuencias de los dominios catalíticos de PDEs de humano y de *C. elegans* (sombreados), generado por el algoritmo NJ de PHILIPS (2).

En mamíferos existen al menos siete diferentes familias de genes para PDEs, en la familia 6, una de las más abundantes isoenzimas es la fosfodiesterasa del GMPc (PDE6), la cual se encuentra asociada a la membrana del segmento externo de las células fotorreceptoras "bastón" de la retina (1). La PDE6 es una proteína heterotetramérica, constituida por dos subunidades catalíticas  $\alpha/\beta$  y dos subunidades inhibitorias  $\gamma$  (Figura 2) (1,3). Las subunidades  $\alpha$  (PDE6A) y  $\beta$  (PDE6B) contienen secuencias altamente conservadas como son el dominio catalítico o PDEasa y el dominio receptor del GMPc o GAF, presentes también en otras PDEs (1).



Figura 2. Fosfodiesterasa específica del cGMP humana (PDE6) (estructura heterotetramérica).

Las subunidades PDE6A y PDE6B que forman la holoenzima PDE6 al ser activada por la transducina cataliza conversión específica del GMPc a 5'GMP; al disminuir la concentración citosólica de GMPc se cierra el canal catiónico en el segmento exterior de la membrana del bastón, produciendo un potencial hiperpolarizante que se transmite al segmento interior y finalmente se genera una respuesta sináptica. El cierre del canal catiónico del segmento externo de las células fotorreceptoras representa el paso final en la cascada enzimática que se inicia con la absorción de un fotón de luz (4).



Potencialmente, cualquier defecto en genes involucrados en los procesos de fototransducción, recuperación del estadio de oscuridad, metabolismo de la vitamina A y la estructura de las células fotorreceptoras, pueden dar lugar a una degeneración retiniana hereditaria (5).

La Retinosis Pigmentosa (RP) es un grupo heterogéneo de enfermedades degenerativas de la retina (6) y una de las causas más comunes de ceguera hereditaria (6). Afecta a más de 1'500,000 individuos en el mundo (7). Estados Unidos y Europa presentan una incidencia de 1:3,000-5,000 individuos (6,8,9). La causa mas común de RP de herencia autosómica recesiva son las mutaciones en el gen de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa del GMPc (PDEB) que afectan la función catalítica de la PDE6B (5).

Este trabajo se derivó del proyecto que tiene como objetivo general el de detectar y caracterizar las mutaciones en el gen de la subunidad beta de la fosfodiesterasa específica de GMPc (PDEB) en pacientes con Retinosis Pigmentosa (RP), que lo realiza nuestro grupo de trabajo en la División de Genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

## **2. ANTECEDENTES**

La secuencia del gen PDEB se obtuvo al estudiar el gen de la enfermedad de Huntington; su identificación y aislamiento se realizó

considerando las similitudes con los genes "pdeb" de ratón y vaca, clonados previamente (2).

El gen de PDEB mide 43kb, está constituido por 22 exones y 21 intrones, se localiza en el cromosoma 4p16.3 (Figura 3) y codifica para la proteína PDE6B de 854 aminoácidos (3,10).



Figura 3. Localización del gen PDEB humano en el cromosoma 4p16.3 (10)

La proteína PDE6B, al igual que la PDE6A, contiene dos dominios GAF (GAF-I y GAF-II) en la primera porción amino (N-ter) y un dominio PDEasa hacia la porción carboxilo (C-ter) (Figura 4) (2,11).

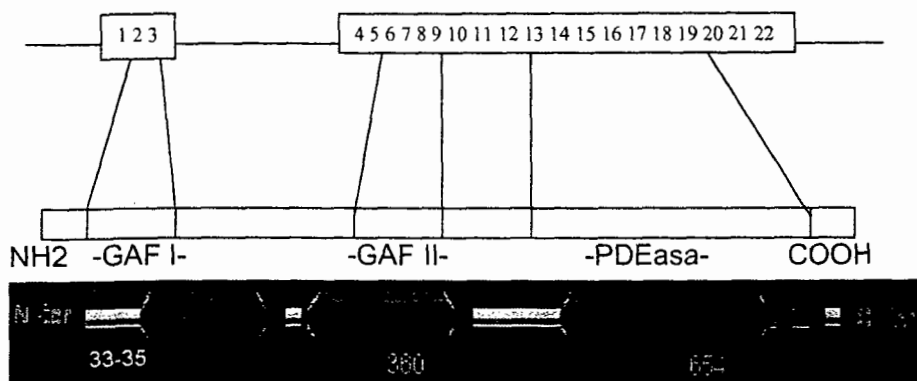


Figura 4. Correlación de las regiones consenso (exones) del gen PDEB y los dominios GAF-I, GAF-II y PDEasa de la proteína PDE6B. (11)

El dominio GAF está presente en fitocromos y en las fosfodiesterasas específicas para cGMP, es el receptor del cGMP y cataliza la

conversión de cGMP a 5' guanosín monofosfato (5'GMP) (Figura 5) (12). El dominio PDEasa pertenece a una superfamilia de enzimas con actividad fosfohidrolasa. Estas enzimas participan en el metabolismo de nucleótidos, en las señales de fototransducción y posiblemente en otras funciones en bacterias, archaeobacterias y eucariotas. El hecho de que todos los residuos altamente conservados sean histidina o aspartato sugiere que la coordinación de cationes divalentes es esencial para la actividad de estas proteínas (13). Mutaciones en estos dominios de la PDEB causan RP de herencia autosómica recesiva.

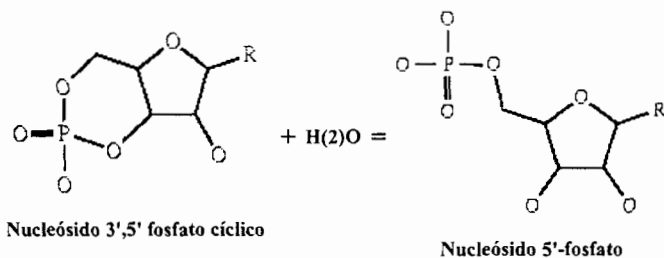


Figura 5. Reacción que cataliza la enzima PDE6B (EC 3.1.4.17) (14)

En 1991, Weber y colaboradores describieron por primera vez la secuencia nucleotídica y la organización del gen PDEB humano (3), posteriormente, otros autores han realizado estudios similares en clonas de diversos tejidos, pero principalmente de retina (15,16). Las secuencias nucleotídicas tanto del ADN genómico como del ADNc, así como la secuencia de los aminoácidos codificados, reportadas hasta la fecha por diferentes autores tienen en total 7 importantes

discrepancias que se conocen en la nomenclatura del genoma humano como "regiones en conflicto" (Cuadro 1) (3, 15,16).

Cuadro 1. Alineación pareada de la secuencia de los 854 aminoácidos de la PDE6B de las versiones de Weber y cols. (rojo) (3) y la de otros autores: Collins y cols. (4), y Strausberg y cols.(5) (negro), señalando los 7 "sitios en conflicto" (azul y rosa, respectivamente).

1	MSLSEEQARSFLDQNPDFARQYFGKKLSPENVGRGCEGDCPPDC (WEBER)
1	MSLSEEQARSFLDQNPDFARQYFGKKLSPENVAACEDGDCPPDC (COLLINS, STRAUSBERG)
45	DSLRLDLCQVEESTALLELVQDMQESINMERVVFKVLRRLCTLLQADRCSLFMYRQRNG
45	DSLRLDLCQVEESTALLELVQDMQESINMERVVFKVLRRLCTLLQADRCSLFMYRQRNG
103	VAELATRLFSVQPDSVLEDCLVPPDSEIVFPLDIGVVGHVAQTKKMVNVEDVAECPHF
103	VAELATRLFSVQPDSVLEDCLVPPDSEIVFPLDIGVVGHVAQTKKMVNVEDVAECPHF
161	SSFADELTDYKTKNMLATPIMNGKDVVAVIMAVNKLNGPFFTSEDEDVFLKYLNFATL
161	SSFADELTDYKTKNMLATPIMNGKDVVAVIMAVNKLNGPFFTSEDEDVFLKYLNFATL
218	YLKIYHLSYLHNCETRERGQVLLWSANKVFEELTDIERQFHAFYTVRAYLNCERYSVG
218	YLKIYHLSYLHNCETRERGQVLLWSANKVFEELTDIERQFHAFYTVRAYLNCERYSVG
275	LLDMTKEKEFFDVWSVLMGESQPYSGPRTPDGREIVFYQVIDYLLHGKEEIKVIPTPS
275	LLDMTKEKEFFDVWSVLMGESQPYSGPRTPDGREIVFYKVIDYLLHGKEEIKVIPTPS
332	ADHWALASGLPSYVAESGFICINMNRSADEMFKFQEGALDDSGWLIKNVLSMPIVNKK
332	ADHWALASGLPSYVAESGFICINMNASADEMFKFQEGALDDSGWLIKNVLSMPIVNKK
389	EEIVGVATFYNRKDGKPFDEQDEVLMESLTQFLGWSVMNTDTYDKMNKLENRKDIAQD
389	EEIVGVATFYNRKDGKPFDEQDEVLMESLTQFLGWSVMNTDTYDKMNKLENRKDIAQD
446	MVLYHVKCDRDEIQLILPTRARLGKEPADCEDELGEILKEELPGPTTFDIYEFHFSD
446	MVLYHVKCDRDEIQLILPTRARLGKEPADCEDELGEILKEELPGPTTFDIYEFHFSD
503	LECTELDLVKCGIQMYELGVVRKFQIPQEVLRFLFSISKGYRRITYHNWRHGFNVA
503	LECTELDLVKCGIQMYELGVVRKFQIPQEVLRFLFSISKGYRRITYHNWRHGFNVA
560	QTMFTLLMTGKLSYYTDLEAFAMVTAGLCHDIDHRGTNNLYQMKSQNPLAKLHGSSI
560	QTMFTLLMTGKLSYYTDLEAFAMVTAGLCHDIDHRGTNNLYQMKSQNPLAKLHGSSI
617	LERHHLEFGKFLLSSETLNIYQNLNRRQHEHVIHLMDIAIATDLALYFKKRAMFQKI
617	LERHHLEFGKFLLSSETLNIYQNLNRRQHDHVIHLMDIAIATDLALYFKKRAMFQKI
674	VDESKNYQDKKSWVEILSLETTKEIVMAMMMTACDLSAITKPWEVQSKVALLVAAEF
674	VDESKNYQDKKSWVEILSLETTKEIVMAMMMTACDLSAITKPWEVQSKVALLVAAEF
731	WEQGDLERTVLDQQPIPMMDRNKAAELPKLQVGFIDFVCTFVYKEFSRFHEEILPMFD
731	WEQGDLERTVLDQQPIPMMDRNKAAELPKLQVGFIDFVCTFVYKEFSRFHEEILPMFD
788	RLQNNRKEWKALADEYEAKVKALEEKEEEERVAACKVGTETICNGGPAPKSSTCCIL 854
788	RLQNNRKEWKALADEYEAKVKALEEKEEEERVAACKVGTETICNGGPAPKSSTCCIL 853

El conflicto en los siete sitios se origina por estar reportados dos nucleótidos diferentes para la misma posición originando dos versiones de tripletes y en consecuencia el código para diferentes aminoácidos. Los siete sitios en conflicto se ubican en diferentes regiones de la proteína (Cuadro 2) (17).

Cuadro 2. Localización de los 7 "sitios en conflicto" en el gen y la proteína de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa del GMPc. Señalando en negritas los 3 sitios en conflicto estudiados en este trabajo.

Exon	Nucleótidos en conflicto	Posición triplete	Aminoácidos en conflicto	Región Proteica
1	<b>ggccgcggc</b> → <b>gccgcggcc</b>	<b>33-35</b>	<b>GRG</b> → <b>AAA</b>	<b>N-ter</b>
6-I	<b>aaa</b> → <b>caa</b>	315	K → Q	GAF-II
6-II	<b>atc</b> → <b>ctc</b>	320	I → L	GAF-II
<b>8</b>	<b>gct</b> → <b>cgt</b>	<b>360</b>	<b>A</b> → R	<b>GAF-II</b>
<b>16</b>	<b>gag</b> → <b>gat</b>	<b>654</b>	<b>E</b> → D	<b>PDEasa</b>
17	<b>tac</b> → <b>atc</b>	698	Y → I	PDEasa
20 - 21	<b>gta</b> → <b>indefinido</b>	835	V → G	C-ter

A (Ala), D (Asp), E (Glu), G (Gli), I (Iso), K (Lis), L (Leu), Q (Gln), R (Arg), V (Val), Y (Tir)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha no existen reportes de estudios con el objetivo de resolver alguno de los siete sitios en conflicto del gen PDEB, por lo que permanecen vigentes en la base de datos del Genoma Humano. El estudio de estos sitios puede realizarse por medio de dos abordajes en general: uno sería la identificación de los nucleótidos en conflicto en

el gen PDEB para después inferir el o los aminoácidos codificados por los tripletes comprometidos; el otro, sería la identificación de los aminoácidos en conflicto en la proteína PDE6B purificada de células bastón. El resultado de cualquiera de estos abordajes pudiera quedar como una versión más sobre el gen o la proteína si se realizara utilizando una clona en particular, sin embargo, un abordaje que contemple el estudio en múltiples genomas humanos, como sería un estudio poblacional, que identificaría a la vez que corroboraría, en cada genoma estudiado, los nucleótidos implicados en los conflictos y, por otra parte, abriría la posibilidad de que las versiones reportadas de estos sitios, resultado de estudios en células clonas, sean producto de la manipulación biotecnológica o que representen algún alelo mutante o polimórfico.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El esclarecimiento de los sitios en conflicto en el gen PDEB, en particular los sitios 33-35, 360 y 654, con un abordaje poblacional, permitirá conocer cuáles son los nucleótidos en cada uno de los genomas estudiados y en consecuencia conocer cuántos alelos existen en la población estudiada. Por otro lado, un análisis de las características bioquímicas de los aminoácidos identificados permitirá inferir su impacto en la estructura y/o función proteica. Finalmente, una comparación de los dominios que contienen los aminoácidos identificados en la población de estudio con los de otras especies, nos permitirá conocer su conservación evolutiva.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los sitios en conflicto 33-35, 360 y 654 del gen PDEB en población de Jalisco.

Objetivos Particulares:

1. Identificar los nucleótidos e interpretar los aminoácidos codificados por los tripletes comprometidos en los sitios 33-35, 360 y 654.
2. Comparar la secuencia de los dominios con los aminoácidos identificados con los de otras especies
3. . Analizar las propiedades de los aminoácidos identificados y su impacto en la estructura o función de la proteína PDE6B.

## **6. MATERIAL Y MÉTODO**

### **6.1 MATERIAL**

#### **Universo de Estudio**

Se analizaron las muestras de 50 individuos originarios del estado de Jalisco, quienes fueron donadores voluntarios del Banco de Sangre Central del Centro Medico de Occidente del IMSS.

### **6.2 MÉTODO**

#### **6.2.1 Abordaje metodológico**

Nuestro grupo de trabajo realizó la caracterización del sitio en conflicto 698 (Cuadro2) (datos no publicados) utilizando el mismo abordaje

metodológico que se presenta en este trabajo. Los sitios en conflicto 315, 320 y 835 requieren de otros abordajes para su caracterización. Los nucleótidos implicados en los sitios 33-35, 360 y 654 se identificaron por la ausencia o presencia de sitios de restricción que reconocen alguno de los dos nucleótidos en conflicto.

Enzima	Sitio de Corte	Secuencia en Conflicto Reconocida	Aminoácidos Codificados	Autor
SacII	ccgc↓gg	ggccgcggc	Gli Arg Gli	Weber y cols.
BsmI	gaatgcN↓	gct	Ala	Collins y cols.
BssSI	3' gtgcttc 5'	5' gag 3' 3' gtgctc 5'	Glu	Weber y cols.

El análisis comparativo de la secuencia de los dominios que contienen los aminoácidos 33-35, 360 y 654 con otras PDEs similares en otras especies nos informará sobre la conservación evolutiva de ellos. Las características bioquímicas de los aminoácidos y el análisis tridimensional de la proteína nos informarán como repercuten en la estructura de la PDE6B y en su posible función.

## 6.2.2 Metodología

### 6.2.2.1 Identificación de los nucleótidos e interpretación de los aminoácidos de los sitios en conflicto 33-35, 360 y 654.

Para realizar este objetivo se utilizó la siguiente metodología (la descripción completa de los protocolos se encuentra en el ANEXO 1):

1. Obtención y purificación de ADN por precipitación con sales por el método de S. A. Miller (18).



2. Análisis de calidad y cantidad de ADN por electroforesis en agarosa al 1% y cuantificación espectrofotométrica, respectivamente (19).
3. Amplificación de los exones 1, 8 y 16 por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de acuerdo a las condiciones descritas por McLaughlin y colaboradores (20).
4. Digestión de los amplificadores de los exones 1, 8 y 16 con las enzimas de restricción: *SacII*, *BsmI* y *BssSI*, respectivamente.
5. Separación de los productos de digestión por electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar la ausencia o presencia del sitio de restricción de acuerdo al patrón de bandas.
6. Corroboración del peso molecular de las bandas electroforéticas de los productos de la digestión enzimática con el software *Quantity One* de BIO-RAD.

#### **6.2.2.2. Comparación de las secuencias de los dominios con los aminoácidos identificados con los de otras especies**

Para realizar este objetivo se consultó el programa de Dominios Conservados que ofrece el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (21) para comparar las secuencias de los dominios GAF y PDEasa de la proteína PDE6B humana con las de otras especies que poseen "pdeb" con dominios similares. La información que se obtiene, entre otras, son un listado de todas las secuencias encontradas en orden de mayor a menor similitud, así como, las secuencias de aminoácidos pareados en las que se distingue las

secuencias o aminoácidos mas conservados (con mayor similitud) como aquellos que varían entre especies.

### 6.2.2.3. Análisis de las propiedades bioquímicas de los aminoácidos identificados y su impacto en la estructura de la proteína PDE6B.

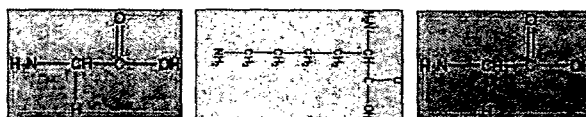
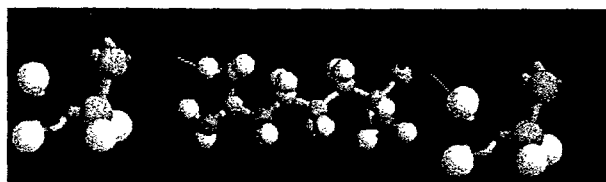
Una introducción general de las características bioquímicas de los aminoácidos se presenta en el ANEXO 2.

1. Las características de los aminoácidos implicados en los sitios 33-35, 360 y 654 se presentan en el Cuadro 3.

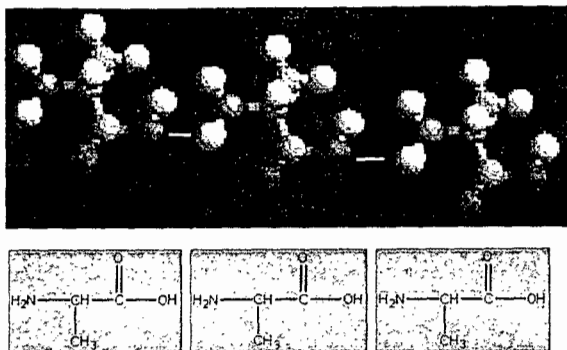
Cuadro 3. Características generales de los aminoácidos implicados en los sitios 33-35, 360 y 654 (22)

Aminoácido	Símbolo	Polaridad	Grupo R	Afinidad al H <sub>2</sub> O por grupo R
Glicina	Gli	No polar	Alifático	Hidrofóbico
Arginina	Arg	Polar	Básico	Hidrofílico
Alanina	Ala	No polar	Alifático	Hidrofóbico
Acido Aspártico	Asp	Polar	Acido o amida	Hidrofílico
Acido Glutámico	Glu	Polar	Acido o amida	Hidrofílico

2. La secuencia de los aminoácidos Gli, Arg y Ala implicados en el sitio en conflicto 33-35 se presentan en dos versiones (Weber y cols. y Strausberg y cols. respectivamente):



Secuencia reportada por Weber y cols.: Gli-Arg-Gli (Gli - aa no polar y Arg - aa polar)



Secuencia reportada por Strausberg y cols.: Ala-Ala-Ala (Ala - aa no polar)

Figura 6. Estructura de los aminoácidos implicados en el sitio en conflicto 33-35.

3. Los aminoácidos Ala y Arg son los implicados en el sitio en conflicto 360, Arg es reportada por Weber y cols., y Ala por Strausberg y cols.:

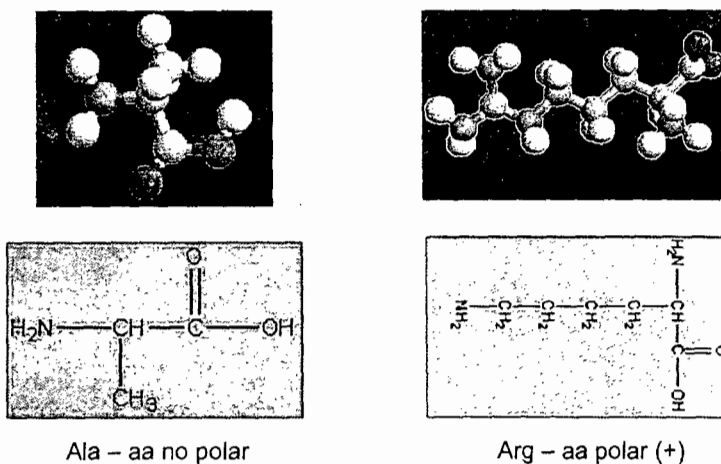


Figura 7. Estructura de los aminoácidos implicados en el sitio en conflicto 360.

4. Los aminoácidos Glu y Asp son los implicados en el sitio en conflicto 654. Weber y cols. reportaron para este sitio el aminoácido Glu y Strausberg y cols Asp. La estructura tridimensional de la proteína PDE6B, desde el aminoácido 479 al 809, que contiene el dominio PDEasa fue obtenida de la base de datos del Instituto de Bioinformática SwissProt con el número de identificación P35913 (23), y en el cual se señalan los aminoácidos Glu y Asp en la posición 654 (Figura 8).

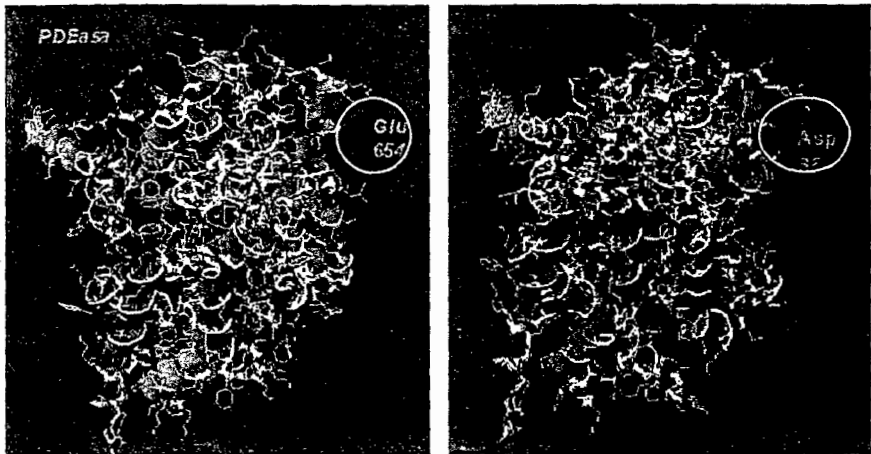
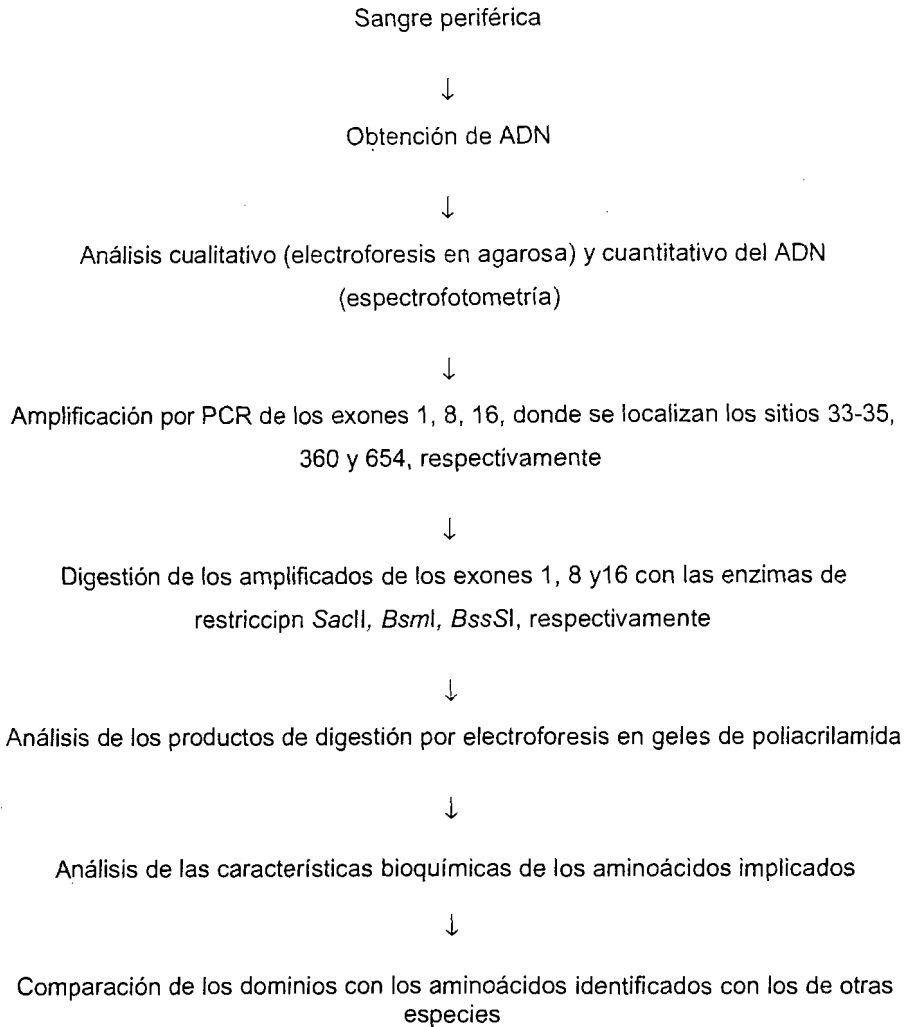


Figura 8. Estructura tridimensional del dominio PDEasa mostrando los aminoácidos Glu y Asp en la posición 654 (22)

## DIAGRAMA DEL FLUJO METODOLOGICO



## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### *Identificación de los nucleótidos e interpretación de los aminoácidos de los sitios en conflicto 33-35, 360 y 654.*

1. El sitio en conflicto 33-35 se encuentra en el exon1 y la secuencia que reconoce la enzima de restricción SacII es una parte de la secuencia que reporta Weber y cols. (ggccgc↓ggc) que contiene tres tripletes que codifican para los aminoácidos Gli-Arg-Gli. Los digeridos del exon 1 de las 50 muestras fueron positivos para el sitio de corte (Figura 9), no se observó ninguna digestión parcial que indicara un estado heterocigoto o la presencia de otra secuencia diferente, lo que significa que la secuencia propuesta por Weber está presente en los 100 genes PDEB analizados, por consiguiente los resultados nos indican que en la población estudiada tienen los aminoácidos Gli-Arg-Gli en las posiciones 33, 34 y 35 de la proteína PDE6B.

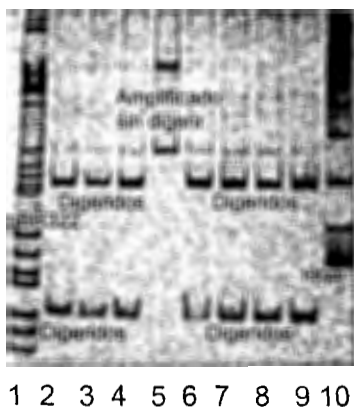


Figura 9. Se muestra el corrimiento en gel de poliacrilamida con un amplificado del exón 8 sin digerir (carril 5), y las muestras digeridas (carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9) en relación a un marcador pBR322 y uno de 100pb (carriles 1 y 10 respectivamente)

2. El sitio en conflicto 360 se encuentra en el exon 8 y la secuencia que reconoce la enzima de restricción *BsmI* (gaatgcN↓) contiene una parte del triplete **gct** que reporta Collins y cols., el cual codifica para el aminoácido Ala. Los amplificados del exon 8 de las 50 muestras fueron positivos para el sitio de corte (Figura 10), lo que significa que la secuencia propuesta por Collins está presente en los 50 genomas analizados. No se observó ninguna digestión parcial que indicara un estado heterocigoto o la presencia de otra secuencia diferente, por consiguiente los resultados nos indican que en la población estudiada tiene el aminoácido Ala en la posición 360 de la proteína PDE6B.

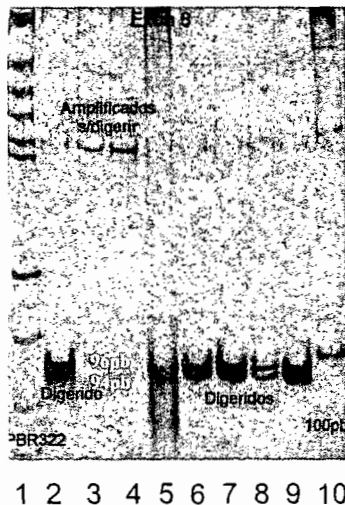
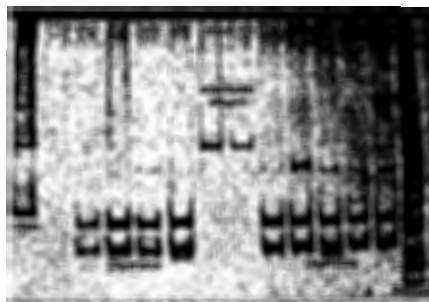


Figura. 10. Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida donde se muestra en los carriles 2, 6-9 amplificados digeridos con los dos fragmento esperados (94 y 96 pb) por la digestión con la enzima *BsmI*, en los carriles 3 y 4 amplificados sin digerir como controles, carril 1 marcador pBR 322 y carril 10 marcador de 100pb

3. El sitio en conflicto 654 se encuentra en el exon 16 y la secuencia que reconoce la enzima de restricción *BssSI* (3' gtgctc 5') contiene el triplete 3' **ctc** 5' que reporta Weber y cols., el cual codifica para el aminoácido Glu. Los amplificadores del exon 16 de las 50 muestras fueron positivos para el sitio de corte (Figura 11), lo que significa que la secuencia propuesta por Weber está presente en los 50 genomas analizados. No se observó ninguna digestión parcial que indicara un estado heterocigoto o la presencia de otra secuencia diferente, por consiguiente los resultados nos indican que en la población estudiada tiene el aminoácido Glu en la posición 654 de la proteína PDE6B



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Figura. 11. Se muestra el corrimiento en gel de poliacrilamida con los amplificadores del exón 16 sin digerir (carriles 7 y 8), y las muestras digeridas (carriles 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13) en relación con los marcadores pBR322 y 100pb (carriles 1 y 14 respectivamente)

### **Comparación entre los dominios GAF y PDEasa con los aminoácidos identificados y los dominios de otras especies**

4. No se obtuvo información de la base de datos de dominios conservados en otras especies para la región que contiene los



aminoácidos 33, 34 y 35 por estar fuera de un dominio en la PDE6B, por lo que se comparó la secuencia completa de la PDE6 con otras especies, los resultados arrojan que los aminoácidos Gly-Arg-Gli no están conservados en otras PDEs (Cuadro 4), sin embargo, uno de los aminoácidos más conservados en otras especies es Ala, y llama la atención que la secuencia Ala-Ala-Ala reportada por Strausberg y cols. se encuentre también en *Rana pipiens*.

Cuadro 4. Comparación de secuencias completa de PDE, resaltando los sitios pareados con las posiciones 33-35 de la PDE6B.

Alineación de aminoácidos	Proteína	Especie
GRG 33-35	PDE6B	<i>Homo Sapiens</i>
AGA	PDEB	<i>Mus musculus</i>
ANA	PDEB	<i>Bos taurus</i>
AGA	PDEB	<i>Canis familiaris</i>
AAA	PDE de retina	<i>Rana pipiens</i>

G (Gli), R (Arg), A (Ala), N (Asn)

5. El análisis entre los diferentes dominios GAF mostró que el aminoácido Ala 360 de la PDE6B está presente en otras PDEs tanto humanas como de otras especies como *Mus musculus*, *Bos taurus* y *Nostoc sp*, sin embargo, en las dos últimas existen otras PDEs con aminoácido diferente (Cuadro 5). Las siete secuencias pareadas para este dominio son las mas similares y de ellas el 70 % presentan Ala pareadas con la posición 360 de la PDE6B, indicando una elevada conservación y posiblemente una función importante. (13)

Cuadro 5. Dominios GAF mas similares de diferentes especies

Alineación de aminoácidos	Proteína	Especie
A 360	PDE6B	<i>Homo Sapiens</i>
A	PDEA	<i>Homo sapiens</i>
A	PDE 2 <sup>a</sup>	<i>Mus musculus</i>
A	PDE5A	<i>Bos taurus</i>
T	PDE V-B1	<i>Bos taurus</i>
L	AC	<i>Nostoc sp.</i>
A	AC	<i>Nostoc sp.</i>

A (Ala), T (Tre), L (Leu)

6. Para el dominio PDEasa se obtuvieron ocho secuencias de otras PDEs con mayor similitud, cuatro son humanas, dos *Bos taurus*, y dos de *C. elegans*, de ellas, solo la PDE6B es la que presenta Glu en la posición pareada con la 654, y leucina (Leu) es la más conservada (Cuadro 6) (13) Llama la atención que siendo Glu un aminoácido polar esté presente en esta posición cuando es ocupado por un aminoácido no polar en las otras PDEs.

Cuadro 6. Dominios PDEasa mas similares en diferentes especies.

Alineación de aminoácidos	Proteína	Especie
E 654	PDE6B	<i>Homo sapiens</i>
L	PDE4b2b Cadena A	<i>Homo sapiens</i>
I	PDE10A	<i>Homo sapiens</i>
I	PDEA	<i>Homo sapiens</i>
L	cGSPDE	<i>Bos taurus</i>
L	PDE5A	<i>Bos taurus</i>
L	PDE R08D7.5	<i>C. elegans</i>
L	PDE C32E12.2	<i>C. elegans</i>

E (Glu), L (Leu), I (Iso)

***Propiedades bioquímicas de los aminoácidos identificados y su impacto en la estructura de la proteína PDE6B.***

7. Los aminoácidos Gli-Arg-Gli de las posiciones 33, 34 y 35 se encuentran en la región proximal al N-ter de la proteína y fuera de el dominio GAF I, por lo que se infiere que no participan en la función catalítica de la proteína y posiblemente su función sea "estructural".

Los aminoácidos implicados en el conflicto 33-35, los cuales son Gli-Arg-Gli, en una versión y en la otra Ala-Ala-Ala tienen las siguientes características bioquímicas: Gli y Ala son aminoácidos alifáticos, no polares, hidrofóbicos y estructuralmente muy similares que les permite estar en espacios reducidos, de formar dobles (Gli) y de proyectarse hacia el interior de la molécula (Ala), por otra parte, Arg es un aminoácido con una cadena lateral mucho mayor y con polaridad positiva y como otros aminoácidos polares son importantes para la estabilidad de las conformaciones proteicas.

Considerando que los aminoácidos 33, 34 y 35 se encuentran en una región estructural, las características bioquímicas que deben tener los aminoácidos para proporcionar estabilidad son aportadas por la secuencia Gli-Arg-Gli, esta posibilidad teórica es apoyada por nuestros resultados.

8. Los resultados del exon 8 nos indican que Ala se encuentra en la posición 360 que forma parte del dominio GAF II de la proteína PDE6B. Como se mencionó anteriormente, Ala es un aminoácido no polar e hidrofóbico y por su conservación en otras PDEs sea

importante para la estructura y/o función para el dominio GAF II en que se encuentra.

9. Los aminoácidos Glu y Asp implicados en el conflicto 654, presentan características bioquímicas similares: polares con carga negativa, que tienden a localizarse en la parte externa de las proteínas, lo que en teoría cualquiera de los dos conservaría la función del dominio PDEasa. Nuestros resultados indican que es Glu el que está presente en la posición 654 de la PDE6B. Por otra parte, llama la atención que en otras PDEs el aminoácido más conservado para esta posición es Leu, un aminoácido no polar.

## 8. CONCLUSIONES

1. En la población estudiada, el gen PDEB presenta la misma versión para las secuencias nucleotídicas de los sitios 33-35, 360 y 654, por lo tanto:

a. Los aminoácidos Gli-Arg-Gli son los que están presentes en las posiciones 33, 34 y 35 de la PDE6B.

b. El aminoácido Ala está presente en la posición 360 de la PDE6B.

c. El aminoácido Glu está presente en la posición 654 de la PDE6B.

2. La conservación de los aminoácidos identificados para los sitios 33-35, 360 y 654 en relación a otras especies son las siguientes:

a. Los aminoácidos Gli-Arg-Gli (33-35) no se encuentran conservados en otras PDEs.

b. El aminoácido Ala 360 se encuentra conservado en un 70% en otras especies.

c. El aminoácido Glu 654, no está conservado, sin embargo, es Leu la más frecuente en la mayoría de las especies.

3. Con respecto a las propiedades bioquímicas y su posible impacto en la estructura y/o función de la PDE6B, concluimos que:

a. Los aminoácidos 33, 34 y 35 se encuentran en una región estructural, las características bioquímicas que tienen los aminoácidos Gli-Arg-Gli proporcionan la estabilidad que necesita esta región.

b. Ala 360 es un aminoácido no polar altamente conservado en otras especies, por lo que teóricamente es importante para la estructura y/o función del dominio GAF II.

c. Glu 654 es un aminoácido polar negativo y no está conservado en los dominios PDEasa de otras especies, en los que aparece preferentemente Leu, aminoácido no polar, por lo que consideramos que Glu no sea relevante para la estructura y/o función.

4. El haber demostrado que 100 genes PDEB presentan las mismas secuencias nucleótídicas en los sitios 33-35, 360 y 654 nos permite concluir que estos sitios no deben seguir considerándose como “en conflicto” en la población de estudio. Se sugiere que las versiones de los autores que crearon los conflictos deban ser re-evaluadas para establecer el origen de ellos.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Beavo A. J., Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms. *Physiological Reviews*. Vol. 75, N°4 (pp 725-748), 1995.
2. Fujishige K, Kotera J, Yuasa K and Omori K. The human phosphodiesterase PDE10A gene. Genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. *EJ Biochem* 267(19):5943;2000
3. Weber B., Riess O., Hutchinson G., Collins C. Lin B. Kowbel, Andrew S., Schappert K. And hayden R. M. Genomic organization and complete sequence of the human gene encoding the  $\beta$ -subunit of the cGMP phosphodiesterase and its localisation to 4p16.3. *Nucleic Acid Research* 19:6263-6268;1991.
4. Ganong F. W., *Visión. en Fisiología Médica.* (pp 163-165). 17<sup>a</sup> Edición, editorial Manual Moderno, S.A. de C.V. 2000.
5. Bayés M., Valverde D., Balcells S., Grinberg D. Vilageliu L., Benitez J., Ayuso C., Beneyto M., Baiget M., González-Duarte R. Evidence against of recoverin in autosomal recessive retinitis pigmentosa in 42 Spanish families. *Hum Genet* 96:89;1995.
6. Shastri B. S. Retinitis Pigmentosa and related disorders: phenotypes of rhodopsin and peripherin/RDS mutations. *Am J Med Genet* 52:467;1994.
7. Banerjee P., Kleyn P. W., Knowles J. A., Lewis Ch. A., Ross B. M., Parano E., Kovats S. G., Lee J.J., Penchaszadeh G. K., Ott J., Jacobson S. G., Gilliam T. C., TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 18:177;1998.
8. Bayés M., Giordano M., Barcells S., Grinberg D., Vilageliu L., Martinez Y., Ayusco C., Benitez J., Ramos-Arroyo M.A., Chivelet P. Homozygous tandem duplication within the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase as cause for autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 1995; 5(3):228.

9. Rosenfeld P.J., Cowley G.S., McGee T.L., Sandberg M.A., Berson E.L., Dryja T.P. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1992; 1:209.
10. Weizmann Institute of Science Gene Cards. <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?PDE6B&search=PDEB&suff=txt> 1997-2004 Cromosoma 4
11. Conserved Domain Summary [database on the Internet in National Center Biotechnology Information. ID: 544052. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=precalc&SEQUENCE=544052](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=precalc&SEQUENCE=544052) (base de datos) (01-01-2003)
12. InterPro en: European Bioinformatic Institute. (base de datos) (04-07-2000) <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR003018> GAF
13. InterPro en: European Bioinformatic Institute. (base de datos) (09-03-2001) <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR003607> PDEasa
14. InterPro en: European Bioinformatic Institute. (Molecule diagrams generated from .mol files obtained from the [KEGG ftp site](#)) (base de datos) (16-05-2000) <http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/cgibin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1f0j>
15. Collins, C., Hutchinson, G., Kowbel, D., Riess, O., Weber, B. and Hayden, M.R. E, The human beta-subunit of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase complete retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain. *Genomics* 13 (3):698-704;1992
16. Sequence of residues 1-854 PEDB. Strausberg R. Direct Submission in National Center Biotechnology Information: entrez nucleotide: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=12652976> Secuencia Strausberg (29-06-2004)
17. NiceProt View of Swiss-Prot [base de datos] in Swiss Institute of Bioinformatics. ID: P35913 [últimas anotaciones en Julio 2004]. Available from: <http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P35913>. (Gasteiger E,



- Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31:3784-3788; 2003).
18. Miller S. A., D.D. Dykes and H.F. Polesky Memorial Blood Center of Minneapolis, 2304 Park Avenue South, Minneapolis, MN 55404, USA Submitted November 18, 1987 *Nucleic Acids Research* Volume 16- Number 3, (pp 1215); 1988.
  19. Sambrook J, Russel D.W. *Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis, Molecular Cloning, Third Edition, Volume 1* Chapter 5.1, 2001
  20. McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL and Dryja TP: Mutation spectrum of the gene encoding the b subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:3249-3253; 1995.
  21. Conserved Domains en National Center for Biotechnology Information (Base de Datos) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=cdd>
  22. Murray R., Granner D., Mayes P., Rodwell V. *Aminoacids, Harper's Biochemistry*, Chapter 4:27-37; 1993
  23. Swiss-Prot (Protein knowledgebase) en: Expert Protein Analysis System (ExPaSy) <http://www.expasy.org/sprot/> (21-12-2004)
  24. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RestrictionEnzymes.html> (pagina web) (09-06-2003)

## ANEXO 1

**Descripción de los protocolos de la metodología utilizada para la identificación de los nucleótidos e interpretación de los aminoácidos implicados en los sitios en conflicto 33-35, 36 y 654 de PDEB**

### **1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CÉLULAS NUCLEADAS**

**Fundamento.** Uno de los obstáculos encontrados para la extracción de ADN de un gran número de muestras es la etapa de desproteínización de las células, previamente digeridas enzimáticamente, con solventes orgánicos peligrosos como el fenol y el isocloroformo. Se han publicado otros procedimientos de extracción no tóxica, pero tienen el inconveniente de requerir extensas diálisis o filtración. Un método rápido, seguro y barato, fue desarrollado para simplificar la desproteínización, e implica la salación de las proteínas celulares por deshidratación y precipitación con una solución saturada de NaCl. El ADN obtenido con esta simple técnica produce cantidades comparables a las del método de fenol-cloroformo. La relación de las densidades ópticas a 260/280 nm comprueba la óptima desproteínización (9). A continuación se describe la técnica.

### Reactivos:

No	Solución	Concentración	Volumen (ml)
1	Buffer de lisis de eritrocitos NH <sub>4</sub> Cl/NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.144M / 0.01M	10.0 X n
2	Buffer de lisis de leucocitos TRIS-HCl, NaCl, EDTA-Na <sub>2</sub> , pH 8.2	TRIS-HCl 10mM NaCl 400mM EDTA-Na <sub>2</sub> 2mM	3.0
3	SDS Solución enzimática de Proteinasa K en SDS/EDTA-Na <sub>2</sub>	SDS 10% Proteinasa K (1mg/ml de SDS 1% / EDTA-Na <sub>2</sub> 2Mm)	0.2 0.5
4	Solución de NaCl	6M	1.0
5	Etanol	ABSOLUTO	10.0
6	Etanol	70%	1.0 X n
7	Buffer TE (TRIS-HCl, EDTA, pH 7.5)	TRIS HCl 10mM EDTA 0.2mM	0.3

### Procedimiento:

1. Obtención de 5.0 ml. sangre periférica con EDTA al 10% como anticoagulante.
2. Agregar 2 volúmenes (10 ml. aproximadamente) de solución de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl 0.144M / NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.01M). Reposar sin agitar durante 10 minutos en refrigeración a 14°C. Posteriormente, centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 15 minutos.
3. Repetir el paso anterior, utilizando 20 ml. de solución de lisis.
4. Repetir cuantas veces sean necesarias hasta limpiar de eritrocitos el botón de leucocitos. En este paso se pueden hacer "micro-lavados" resuspendiendo y aspirando suavemente la capa de eritrocitos exclusivamente sin tocar los leucocitos, para posteriormente continuar con otro proceso normal de lisis.
5. Resuspender el botón de leucocitos con 3 ml. de buffer de "Miller" (lisis de leucocitos) (Tris-HCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 2mM,

pH 8.2). Agitar vigorosamente para deshacer los grumos de células.

6. Agregar al lisado de leucocitos 0.2 ml. de SDS 10% y 0.5 ml. de solución de enzimática de proteinasa K (1mg de proteinasa K en 1 ml. de SDS 1%/EDTA-Na<sub>2</sub> 2mM ). Incubar en baño maría a 37°C durante toda la noche.

7. Añadir 1 ml. de solución NaCl 6M. Agitar vigorosamente por unos 15 segundos y centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos (o 4500 rpm/45 min.). En este paso se asegura la precipitación parcial de los restos celulares y el ADN queda en el sobrenadante.

8. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo de 50ml.

9. Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto frío e invertir el tubo suavemente 2-3 veces hasta que el ADN precipite. El ADN se transfiere a un microtubo eppendorff (de 1.5ml).

10. Lavar con etanol al 70 %, agitando en repetidas ocasiones para eliminar el exceso de sales. Este paso se repite hasta que el ADN se vea como una "maraña de algodón".

11. Dejar secar y agregar 1 ml. de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 0.2mM, pH 7.5). Dejar disolviendo a 37°C, el tiempo que sea necesario.

## **2. ANÁLISIS DE CALIDAD Y CANTIDAD DEL ADN (19)**

### **2.1 ANALISIS DE CALIDAD DEL ADN**

#### **2.1.1 ELECTROFORESIS EN AGAROSA**

**Fundamento.** Los ácidos nucleicos que han sido sujetos a electroforesis en geles de agarosa pueden ser detectados por tinción

con bromuro de etidio y visualizados por iluminación con luz UV 300 nm. En este análisis se evalúa la integridad o el grado de desnaturalización del ADN. Para asegurar el éxito en las técnicas en las cuales se utilice ADN, es importante asegurar una buena calidad de él. El método más común para este fin es el de evaluar las características del corrimiento electroforético del ADN en un gel de agarosa. Una sola banda con bordes bien delimitados representa un ADN íntegro, un barrido a lo largo de su migración representa un ADN desnaturalizado y, una banda con bordes irregulares, en general, representa exceso de sales en la solución de ADN.

### Reactivos:

No	Reactivo	Volumen/Concentración
1	Agarosa*	33ml / 0.825gr
2	Buffer TBE 10X, TBE 1X*	3.3ml
3	H <sub>2</sub> O destilada*	27ml
4	ADN amplificado*	4.0µl
7	Buffer cargador	Azul de bromofenol 0.025gr Xilencianol 0.025gr Glicerol 3ml

\* Elementos de corrimiento electroforético

### Procedimiento

1. Preparación del gel de agarosa.
2. Mezclar 5µl de la solución de ADN a evaluar, con 3µl de buffer cargador.

3. Colocar la mezcla en un pozo del gel de agarosa.
4. Realizar el corrimiento electroforético a 130 V por 2 horas aproximadamente.
5. Teñir el gel con la Técnica de bromuro de etidio (2.1.2)
6. Observar bajo la luz UV de un transiluminador las características de la migración del ADN.

### 2.1.2 TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO (18)

**Fundamento.** El método más utilizado y conveniente para visualizar ADN en geles de agarosa es la tinción fluorescente con bromuro de etidio, el cual contiene un grupo planar tricíclico que se intercala entre las bases. El bromuro de etidio se une al ADN con poca o ninguna preferencia a alguna secuencia. En soluciones saturadas con alta fuerza iónica, aproximadamente una molécula de bromuro de etidio se intercala cada 2.5 par de bases. Después de la inserción dentro de la helice el tinte se pone perpendicular al eje helicoidal y hace contactos de van der Waals con los pares bases arriba y abajo. La posición fija del grupo planar y su proximidad a las bases causa la unión del colorante al ADN y desarrolla un incremento en la fluorescencia, comparada con la tinción en solución libre. La radiación UV a 254 nm es absorbida por el ADN y transmitida al colorante; la radiación a 302 nm y 366 nm es absorbida por el colorante mismo. En ambos casos, la energía es re-emitida a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. Por que la fluorescencia del complejo ADN-bromuro de etidio es 20-30 veces mayor que el colorante mismo, las bandas que contienen al menos 10 ng de ADN pueden ser detectadas en presencia de bromuro de etidio libre (0.5µg/ml) en el gel.

## Reactivos

Reactivo	Volumen
Solucion de bromuro de etidio	Variable
H <sub>2</sub> O destilada para lavados	400ml

## Procedimiento

1. Colocarse todos los instrumentos de seguridad: doble guante, careta protectora, bata.
2. Tomar el gel con una espátula y llevarlo a una charola de tinción (única para bromuro),
3. Verter 200ml de solución de bromuro de etidio, dejar el gel ahí durante unos 45 segundos.
4. Sacar el gel con la misma espátula y colocarlo en la charola de enjuague (agua destilada), alrededor de 10-11 minutos.
5. Sacarlo y llevarlo al transiluminador y observarlo.
6. Una vez revisado desechar el gel en una charola con carbón activado.

## 2.2 CUANTIFICACION DE ADN

La relación de las densidades ópticas (DO) a las longitudes de 260/280 nm nos da información de la proporción en la concentración de ADN y de proteínas, respectivamente, en una muestra.

## Reactivos

Reactivos	Volumen
Solución problema de ADN en buffer TE	1 $\mu$ l
Agua estéril	1ml

## Procedimiento

1. Programar el espectrofotómetro de amplio espectro (Marca Zeiss, Modelo PMQ3) a la función de "Medición de Ácidos Nucleicos", el cual hace lecturas simultáneas a longitudes de 260 y 280 nm, y proporciona la relación de las DO 260/280 y 280/260, así como la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en  $\mu$ g/ml.
2. Colocar 1ml de agua estéril en una celdilla de cuarzo (perfectamente limpia). Tomar lectura de DO a 260 y 280 nm; o ajustar una DO a cero "0" en ambas longitudes previamente a las lecturas de las soluciones problemas de ADN.
3. Colocar 1 $\mu$ l de la solución problema ADN en la celdilla con agua estéril, mezclar suavemente.
4. Medir DO de cada solución problema de ADN.  
Utilizar el espectrofotómetro de amplio espectro (PMQ3 Zeiss), y designar la función que determina ácidos nucleicos, y leer a una longitud de onda de 260nm, con lámpara UV.
5. Registrar las lecturas de DO, relaciones 260/280 y 280/260, y concentración de proteínas y ácidos nucleicos.



### **3. AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 1, 8 Y 16 POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP) (8)**

**Fundamento.** La RCP es un proceso que permite la síntesis de ADN de novo a partir de un fragmento de ADN molde mediante tres etapas básicas: 1) desnaturalización por calor del molde, 2) alineación de los oligonucleótidos (oligos) iniciadores que delimitan el fragmento a amplificar y que son complementarios a los dos sentidos de las cadenas de ADN ( $5' \rightarrow$  y  $3' \rightarrow$ ), y 3) etapa de síntesis o de extensión realizada por una ADN Polimerasa termoestable, a partir de los oligonucleótidos alineados.

**Desnaturalización.** La temperatura requerida para la desnaturalización de la doble cadena de ADN se determina principalmente por el contenido de guaninas y citosinas (G+C) en el fragmento a amplificar. Una proporción alta de G+C requiere de temperaturas mayores para separar la doble cadena del ADN molde. También es importante la longitud del fragmento ADN a amplificar ya que a mayor longitud mayor el tiempo requerido en la temperatura de desnaturalización elegida para separar las dos cadenas completamente. La RCP es catalizada por la Taq ADN polimerasa, la desnaturalización se realiza a  $94-95^{\circ}\text{C}$ , es la temperatura más alta que resiste la enzima por 30 o más ciclos sin presentar un daño significativo.

**Alineamiento de los oligos (primers) al molde de ADN.** La temperatura usada para el alineamiento ( $T_a$ ), es crítico. Si la temperatura de alineamiento es muy alta, el alineamiento de

oligonucleótidos es pobre, y la producción de amplificado es muy baja. Si la temperatura de alineamiento es muy baja, puede ocurrir un alineamiento inespecífico de primers, resultando en la amplificación de segmentos no buscados.

**Extensión de oligonucleótidos.** Es realizado cerca de la temperatura óptima para la síntesis de ADN, catalizada por la polimerasa termoestable, la cual en el caso de la Taq polimerasa es entre 72-78°C. En los primeros dos ciclos, la extensión a partir de un iniciador continúa sobre la secuencia complementaria hasta unirse al oligonucleótido del otro extremo. En el siguiente ciclo, las primeras moléculas son producidas en una longitud igual al segmento delimitado por los oligos. Del tercer ciclo en adelante, este segmento de ADN es amplificado aritméticamente. (19)

Es importante mencionar que esta técnica es utilizada para amplificar de manera exponencial, las secuencias de ADN que contienen el sitio en conflicto, estas secuencias son limitadas y/o flanqueadas por los oligos correspondientes (esquemas 1a, 1b, 1c)

En los cuadros 5, 6, y 7 se observan los esquemas de reacción para cada una de las secuencias exónicas amplificadas, y las temperaturas óptimas de reacción.

Se muestra la secuencia a amplificar de los exones implicados con sus respectivos *oligos* (azul) y el sitio en conflicto marcado en negritas.

**EXON 1 S/33-35**

**Oligo 1: 5'---3'**

<p>GGACCAGAACCCCGATTTTGCCCGCCAGTACTTTGGGAAGAAACTGAGCCCTGAGAAATGTT  GGCCGCGGCTGCGAGGACGGGTGCCCGCCGGACTGCGACAGCCTCCGGGACCTCTGCCAGG  TGGAGGAGAGCACGGCGCTGCTGGAGCTGGTG CAGGATATGCAGGAGAGCATCAACATGGA  GCGCGTGGTCTTCAAGGTCCTGCGGCGCCTCTGCACCCTCCTGCAGGCCGACCGTGCAGC  CTCTT<b>CATGTACCGCCAGCGCAAC</b></p>
---

**Oligo 2: 3'---5'**

Esquema 1a. Secuencia a amplificar que presenta el sitio en conflicto 33-35

**Cuadro 5.** Sistema de reacción RCP para el exon 1

REACTANTES	CONCENTRACION	VOLUMEN	TERMOCICLADOR
BUFFER	10X	2ML	1. 94°C – 5´
DNTP	1.25mM	3.2ML	2. 94°C – 1´
RP1A	25pmol/1µl	4µl	3. 59°C – 1´
RP1A´	25pmol/1µl	4µl	4. 72°C – 1´
Taq POL	5u/µl	0.2µl	5. del 2 - 4 37veces
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0.4µl	6. 72°C – 5´
H2O DEST.		4.5µl	7. 4.0°C – 5´
DNA	100ng	1.7µl	

EXON 8 S/360

Oligo 1: 5'----3'

GGCCACAGAGGCCATTTTAGATCATAACAGACCTTCCGCTGTTTTGGATGAAATCGTTTTT  
CTGATGCTTTTTTCAGATTTGTAACATCATGAATCGTTCCGCTGACGAAATGTTCAAATTC  
AGGTATCTGTCTGTCCTTGGTAGAAATTATACTTACTTACAAAAGAGGAGATTTTGATTC  
AGCGATG

Oligo 2: 3'----5'

Esquema 1b. Secuencia a amplificar que presenta el sitio en conflicto 360

Cuadro 6. Sistema de reacción RCP para el exon 8

REACTANTES	CONCENTRACION	VOLUMEN	TERMOCICLADOR
BUFFER	10X	2ML	1. 94°C – 3'
DNTP	1.25mM	3.2ML	2. 92°C – 8''
RP8	25pmol/1µl	2µl	3. 53°C – 45''
RP8'	25pmol/1µl	2µl	4. 72°C – 40''
Taq POL	5u/µl	0.2µl	5. del 2-437 veces
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0.4µl	6. 72°C – 5'
H <sub>2</sub> O DEST.		8.5µl	7. 4.0°C – 5'
DNA	100ng	1.7µl	

## EXON 16 S/654

### Oligo 1: 5'----3'

CCTGACGCCCTGGGCATAACCTCCGACACCCTGAACATCTACCAGAACCTGAACCGGGCGG  
CAGCACGAGCACGTGATCCACCTGATGGACATCGCCATCATCGCCACGGACCTGGCCCTGT  
ACTTCAAGTGC GCGCGCCTTCCGGGAGGGGCGCC

### Oligo 2: 3'----5'

Esquema 1c. Secuencia a amplificar que presenta el sitio en conflicto 654

Cuadro 7. Sistema de reacción RCP para el exon 16

REACTANTES	CONCENTRACION	VOLUMEN	TERMOCICLADOR
BUFFER	10X	2ML	1. 94°C - 3'
DNTP	1.25mM	3.2ML	2. 92°C - 1'
RP16	25pmol/1µl	1µl	3. 60°C - 45''
RP16'	25pmol/1µl	1µl	4. 72°C - 40''
Taq POL	5u/µl	0.2µl	5. del 2 - 4 37 veces
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0.4µl	6. 72°C - 5'
H <sub>2</sub> O DEST.		10.5µl	7. 4.0°C - 5'
DNA	100ng	1.7µl	

## Procedimiento

1. Preparar los tubos de reacción eppendorff de 0.5ml, rotularlos.
2. Realizar la mezcla correspondiente de reactantes, en un tubo eppendorff de 0.5ml.
3. Distribuir la mezcla entre los tubos requeridos para (n) cantidad de muestras.
4. Colocar los tubos en el termociclador, con el programa correspondiente a el exon.
5. esperar a que terminen los ciclos y guardar las muestras en refrigeración.

\* La preparación de la mezcla se hace en presencia de hielo

#### 4.DIGESTIÓN DE LOS AMPLIFICADOS DE LOS EXONES 1, 8 Y 16 CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: SACII, BSMI Y BSSSI, RESPECTIVAMENTE

Las enzimas de restricción son enzimas que cortan ADN y se encuentran en bacterias (son cosechadas para su uso). Las enzimas cortan dentro de la molécula de ADN, y por esto suelen llamarse endonucleasas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen y cortan ADN en solo una particular secuencia de nucleotidos. Por ejemplo la bacteria *Haemophilus aegypticus* produce una enzima llamada *HaeIII* que corta ADN donde quiera que se encuentre la secuencia: 5'GGCC3' y el corte es hecho entre G y C (24). La finalidad de utilizar enzimas de restricción para analizar los amplificados es por que son específicas para las secuencias nucleotídicas en conflicto, de esta manera cada enzima reconoce parte o completamente los nucleótidos implicados (cuadro 8) y además producen fragmentos de determinado peso molecular (tamaño) que pueden ser monitoreados con marcadores de peso molecular. Las enzimas requieren de una temperatura optima para su desempeño, así como para su inactivación.

**Cuadro 8.** Enzimas utilizadas para el análisis de restricción

EXON	ENZIMA	CORTE	FRAGMENTOS
Exon 1	SacII	cgc/gg	201+ 70pb
Exon 8	BsmI	gaatgcN/↓	96 + 94pb
Exon 16	BssSI	3' gtgctc 5'	70 + 87pb

**Sistemas de reacción para digestión de exones amplificados  
(cuadros 9, 10, 11)**

**Cuadro 9.** Sistema de reacción para el exon 1

<b>REACTANTES</b>	<b>VOLUMEN</b>
BUFFER 10X	2.0 $\mu$ l
ENZIMA SacI	1.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEST.	12.0 $\mu$ l
AMPLIFICADO	5.0 $\mu$ l

**CONDICIONES: INCUBAR 4 HORAS 40 MIN. A 37° C, INACTIVAR 20 MIN. A 80°C.**

**Cuadro 10.** sistema de reacción para el exon 8

<b>REACTANTES</b>	<b>VOLUMEN</b>
BUFFER 10X	2.0 $\mu$ l
ENZIMA BsmI	1.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEST.	12.0 $\mu$ l
AMPLIFICADO	5.0 $\mu$ l

**CONDICIONES: INCUBAR 4 HORAS A 37° C, INACTIVAR 20 MIN. A 80°C.**

**Cuadro 11.** Sistema de reacción para el exon 16

REACTANTES	VOLUMEN
BUFFER 10X	2.0 $\mu$ l
ENZIMA BssSI	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEST.	12.5 $\mu$ l
AMPLIFICADO	5.0 $\mu$ l

**CONDICIONES: INCUBAR 4 HORAS A 37° C, INACTIVAR 20 MIN. A 80°C.**



## 5. SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTIÓN POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA PARA DETERMINAR LA AUSENCIA O PRESENCIA DEL SITIO DE RESTRICCIÓN DE ACUERDO AL PATRÓN DE BANDAS

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida neutral (19):**

El método de electroforesis en cadenas reticuladas de poliacrilamida, introducido como MATRICES para electroforesis por Raymond y Weintraub (1959), son usados como matrices eléctricamente neutrales para separar fragmentos de doble cadena de ADN de acuerdo a su tamaño y ADN de cadena simple de acuerdo a su tamaño y conformación. Los geles de poliacrilamida poseen tres ventajas sobre los geles de agarosa: (1) su poder de resolución es muy grande, ya que puede separar molécula de ADN cuya longitud difiere por apenas 0.1% (1pb en 1000pb). (2) pueden acomodarse a cantidades mucho más grandes de DNA que los geles de agarosa. Arriba de 10µg de ADN puede ser aplicado en un solo pozo (1cm x 1mm) en un típico gel de poliacrilamida sin perder una significativa resolución. El DNA recuperado a partir de geles de poliacrilamida es extremadamente puro y puede ser usado para diferentes propósitos. Hay dos tipos comunes de geles de poliacrilamida: Geles de poliacrilamida desnaturizantes que son usados para la separación y purificación de fragmentos de ADN de cadena sencilla. Estos geles se polimerizan en presencia de un agente (urea y/o menos frecuentemente, formamida). Y geles de poliacrilamida no desnaturizantes que son usados para la separación y purificación de fragmentos de ADN de doble cadena. Como regla general, el ADN de doble cadena migra a través del gel no

desnaturalizante en rangos que son inversamente proporcionales al  $\log_{10}$  de su tamaño. Sin embargo, la movilidad electrofóretica es también afectada por la composición de bases y secuencia, así que el dúplex de ADN de exactamente el mismo tamaño puede diferir en movilidad aproximadamente un 10%.

La estructura de la poliacrilamida es la siguiente: Los monómeros de acrilamida son polimerizados en largas cadenas en una reacción iniciada por radicales libres. En la presencia de N,N' - metilenbisacrilamida, sus cadenas se convierten en malla para formar un gel. En donde el diámetro de los poros formados en la malla es determinado por las concentraciones de los monómeros de acrilamida.

(19)

A continuación son descritos los elementos de electroforesis.

### Reactivos

REACTIVOS	VOLUMEN / CONCENTRACION	VOLUMEN APLICADO
ACRILAMIDA	18ml / 29gr	8 $\mu$ l
BUFFER TBE	4.5ml / 10X	4.5
H <sub>2</sub> O DEST.	21.6ml	21.6ml
PERSULFATO DE AMONIO	450 $\mu$ l / 10%	450 $\mu$ l
TEMED	45 $\mu$ l	45 $\mu$ l

### Procedimiento

1. Armar el juego de cristales (libres de polvo y grasa) para camara de electroforesis vertical.
2. Preparar la mezcla de reactivos, dejando hasta el final el TEMED (cataliza la reacción).

3. Una vez agregado el TEMED depositar la mezcla entre la separación de los cristales, colocar el peine y esperar hasta que polimerice.
4. Retirar el peine y colocar el juego de cristales con el gel polimerizado, en la cámara vertical, sujetando los cristales con las pinzas de presión.
5. Llenar la cámara con buffer TBE 1X de corrimiento, y conectar la cámara a una fuente de poder.
6. Realizar un pre-corrimento de 1 hora a 100V.
7. Parar el pre-corrimento y limpiar el exceso de poliacrilamida y burbujas de los pozos.
8. Cargar los pozos con la mezcla de digeridos de ADN-buffer cargador.
9. Realizar el corrimiento a 200V en 3 horas o el tiempo que sea requerido (dependiendo de la concentración del gel)

### **5.1 Tinción con Nitrato de Plata para geles de Poliacrilamida**

Los geles obtenidos tras el corrimiento electroforético son sometidos a tinción utilizando como colorante la solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ )

## Reactivos

Reactivo	Volumen
Solución Fijadora (100ml de etanol absoluto, 5ml de ácido acético, aforar a 1L con H <sub>2</sub> O)	100ml
Solución con AgNO <sub>3</sub> (0.2gr de AgNO <sub>3</sub> , aforar a 100ml con solución fijadora)	100ml
Solución reveladora (30gr de hidróxido de sodio -NaOH-, 5ml de formaldehído, aforar a 1L con H <sub>2</sub> O)	100ml

## Procedimiento

1. Tomar el previamente corrido, y quitarle los empaques.
2. Con mucho cuidado separar los cristales del gel.
3. Colocar el gel en una charola de tinción, y agregarle 100ml de solución fijadora durante 10 minutos. Agitar suavemente
4. Retirar la solución fijadora y agregar la solución de AgNO<sub>3</sub> durante 10 minutos. Agitar suavemente
5. Retirar la solución de AgNO<sub>3</sub> y enjuagar con H<sub>2</sub>O durante 20 segundos.
6. Desechar el H<sub>2</sub>O y agregar la solución reveladora, agitando suavemente hasta que revele.
7. Retirar la solución reveladora y guardar el gel en una bolsa plástica en refrigeración.

## 6. INTERPRETACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y LOS AMINOÁCIDOS PRESENTES EN LAS REGIONES ANALIZADAS POR EL SOFTWARE QUANTITY ONE DE BIO-RAD.

El Quantity One (BIO-RAD) es un flexible software para analizar imágenes en 1-dimensión, como geles de electroforesis. El software tiene una interfase grafica con herramientas y menú estándar. El Quantity One puede analizar imágenes de una amplia variedad de datos biológicos, incluyendo radiactividad, quimioluminiscencia, fluorescencia, muestras de color adquiridas en densitómetros y sistemas de documentación de gel. Las imágenes pueden ser mejoradas, anotadas, rotadas y aumentadas. Las funciones basadas en los carriles, pueden ser utilizadas para calcular *peso molecular*, puntos isoeléctricos, VNTRs, valores Rf. El software puede medir cantidades totales y promedios, puede ajustar bandas y carriles.

Los dispositivos de proyección de imagen que apoyan a Quantity One, se basan en la luz y/o detectores de radiación que convierten las señales de muestras biológicas en datos digitales, manejando las imágenes en escalas de color y grises.

## ANEXO 2

### **Características bioquímicas de los aminoácidos implicados en los sitios en conflicto 33-35, 360 y 654 del gen PDEB**

#### GENERALIDADES

Las propiedades de los aminoácidos se determinan por la naturaleza de sus grupos alfa-R (cadena lateral), que les permite una ubicación y función en la estructura de las proteínas, por ejemplo, la glicina, el más simple y pequeño de los aminoácidos, se le localiza en las regiones más inaccesible para otros aminoácidos y en regiones donde los péptidos se doblan en forma aguda.

Las características químicas de los grupos R de los aminoácidos y de acuerdo a su ubicación en la estructura de una proteína le confieren las características bioquímicas a ellas, así, los aminoácidos con grupo R alifático (alanina, valina, leucina e isoleucina) y con grupo R aromático (fenilalanina, tirosina y triptófano) que son hidrofóbicos, actúan en el ordenamiento de las moléculas de agua que están en la vecindad inmediata de las proteínas (figura 6) (24).

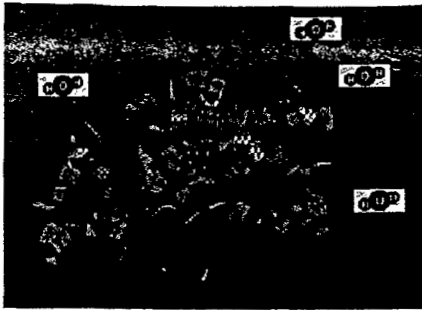


Figura.6. Representación de una proteína en solución en la cual se observa la importancia de la polaridad de los aminoácidos en contacto con H<sub>2</sub>O

Los aminoácidos con grupos R con carga básica o ácida tienen funciones clave en la estabilización de la estructura proteica la formación de enlaces salinos, por ejemplo, la ruptura y reconstrucción de enlaces salinos que acompaña a la oxigenación y desoxigenación de la hemoglobina. Además, estos aminoácidos funcionan en los sistemas de "transmisión de cargas" durante catálisis enzimáticas. Por último, la histidina ocupa un lugar importante, único en la catálisis enzimática, por la propiedad de su protón imidazólico que a un pH 7.0 funciona alternativamente como base o como ácido catalítico (24).

Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B., Buetow K.H., Schaefer C.F., Bhat N.K., Hopkins R.F., Jordan H., Moore T., Max S.I., Wang J., Marra M.A. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903;2002.