

UCH-FC

Biot. Molecular

N665

C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

**“SUBCLONAMIENTO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA  
ISOFORMA C DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE  
ENDOTELINA - 1”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

IGNACIO ALFREDO NIECHI GAETE

Director del Seminario de Título: Dr. Julio Tapia Pineda  
Co- Director del Seminario de Título: Dr. Edio Maldonado Maldonado  
Patrocinante del Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono Merino

Abril de 2012  
Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Ignacio Alfredo Niechi Gaete,

### “Subclonamiento, expresión y purificación de la isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina - 1”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

*Dr. Julio Tapia Pineda*  
**Director Seminario de Título**

*Dr. Edio Maldonado*

**Comisión de Evaluación**

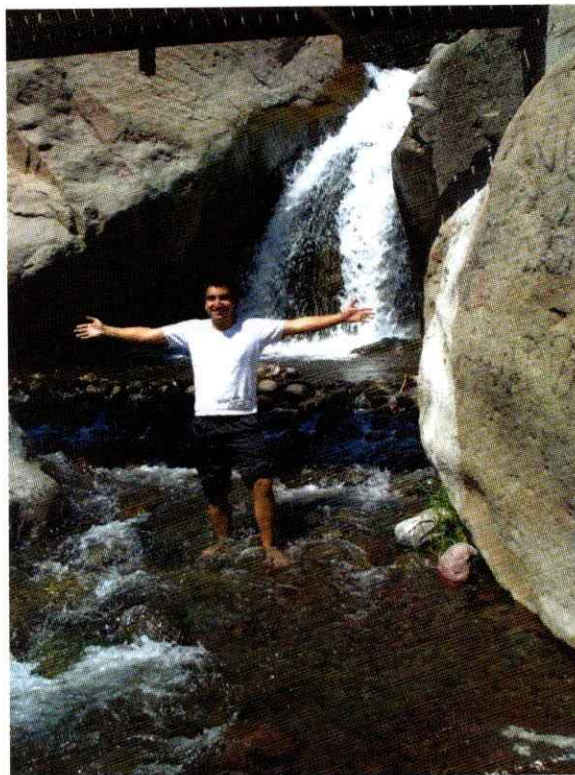
*Dra. Lorena Norambuena*  
**Presidente Comisión**

*Dr. Francisco Chávez*  
**Evaluador**



Santiago de Chile, 12 de Abril de 2012.

## Biografía



Nací en Santiago en Febrero del año 88', rodeado de banderitas chilenas y afiches con arcoiris multicolores con un "NO" en el centro. En ese momento no entendí que significaban y creo que actualmente tampoco. Lo que sí entendí de inmediato, fue el cariño que mis padres me entregaron desde el momento en que nací y quizás desde antes, eso no lo sabré. Fueron cuatro años de los que definitivamente no tengo muchos recuerdos, pero sé que vivimos en Ñuñoa y después migramos a la hermosa y calurosa ciudad de San Felipe, en la quinta región. En esta ciudad tuve mi primer día de clases, en el Colegio Inglés de Los Andes donde estuve 2 años. Luego migramos al otro lado de la cordillera, a la ciudad de Buenos Aires a orillas del río Tigre. Ciertamente, estos fueron los mejores 3 años de mi infancia, de los que tengo los mejores recuerdos. Ingresé al Colegio SEK de Argentina e hice muy buenos amigos, con los que todavía tengo contacto a la lejanía. Creo que en esa época ya tenía como 10 años y nos tocó volver a Chile, a San Felipe nuevamente, donde estuve 5 años más en el mismo colegio Inglés de Los Andes. Incluso volví al mismo curso que

había dejado tiempo atrás, por lo que no fue tan difícil acostumbrarse y hacer amigos. Sin embargo, parece que mi familia disfrutaba de los cambios de casa, así que nos fuimos de vuelta a Santiago, a Peñalolén, donde ingresé al Colegio Altamira en el año 2004. Fueron 2 años en los que pude recontrarme con mis virtudes musicales, donde el saxofón fue un compañero del día a día. En total fueron 12 años de colegio que puedo decir que disfrute al máximo, pero luego tuve que escoger una carrera, así que hice una mezcla de mi padre ingeniero de la USACH y mi madre profesora de biología de la PUC y escogí Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. A finales del 2008 comencé una romántica aventura con una linda estudiante de Educación Parvularia de una universidad vecina, romance que sigue vivo y vigente hasta la actualidad. Posteriormente, a finales del 2009 ingresé al Laboratorio de Transformación Celular (LTC) de la Facultad de Medicina de la misma Universidad dirigido por el Dr. Julio Tapia. Ahí aprendí a hacer experimentos, a equivocarme y a volver a intentar, aprendí a ser perseverante y resiliente. En esa época desarrollé mi unidad de investigación y luego mi Seminario de Título en 2011, el cuál presento en estas páginas venideras.



## Agradecimientos

Este seminario de Título es el fruto de un arduo trabajo que no hubiese sido posible sin el apoyo de toda la gente que ha estado a mi lado durante estos años de universidad y por supuesto durante toda mi vida. Estas páginas no solo representan el trabajo de laboratorio de seis meses, sino que dan cuenta del término de una etapa más de mi vida, en la que es preciso agradecer a todos los protagonistas. Es por esto que quiero comenzar agradeciendo a mi familia, en especial a mis padres que han estado siempre a mi lado educándome, apoyándome, aconsejándome y por sobretodo, queriéndome. Agradezco también a mi hermana Daniela que ha sido parte en cada etapa vivida. Me gustaría también agradecer, o más bien, hacer un reconocimiento a mis amigos, que han sido fundamentales en todo este proceso. Particularmente, hago una mención honrosa a la mujer que ha sido el pilar más importante en esta etapa, mi novia Nataly. Le agradezco por su apoyo infinito y su constante entrega.

Agradezco también al equipo del Laboratorio de Transformación Celular, especialmente al Dr. Julio Tapia por permitir mi ingreso a este lugar de trabajo. A él le agradezco su excelente disposición, sus valiosos consejos y las innumerables conversaciones que no solo influyeron en mi formación como científico, sino que también como persona. De esta misma forma, agradezco particularmente a Daniela Ponce que influyó en mi formación técnica en el laboratorio, enseñándome y ayudándome en todo lo que necesité. En este mismo contexto, agradezco a mis compañeros y amigos, Roger, Eduardo, Pablo y José Luis. A todo el equipo LTC agradezco la calidad humana, la sencillez y la humildad. Espero que al pasar los años, ese espíritu no se desvanezca. Finalmente, agradezco al Dr. Edio Maldonado y a su equipo de laboratorio por ayudarme cuando se presentaron problemas y por ser actores principales en la realización de mi trabajo.

# Índice

0.1. Lista de abreviaturas . . . . .	VII
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1. Cáncer . . . . .	5
1.2. La ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA en el cáncer . . . . .	5
1.3. Endotelina-1 . . . . .	7
1.4. Enzima Convertidora de Endotelina - 1 (ECE-1) . . . . .	9
1.5. Isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina - 1 (ECE-1c) .	11
1.6. Ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA y ECE-1c . . . . .	12
1.7. Fundamento . . . . .	13
1.8. Objetivos . . . . .	14
1.8.1. Objetivo General . . . . .	14
1.8.2. Objetivos específicos . . . . .	14
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>15</b>
2.1. Tampones y soluciones . . . . .	15
2.2. Amplificación y purificación de la secuencia codificante del fragmen- to N-terminal de hECE-1c . . . . .	16
2.3. Subclonamiento en vector pGEM <sup>®</sup> -T-easy . . . . .	18
2.4. Subclonamiento en el vector pGEX <sup>®</sup> -2T . . . . .	18
2.5. Expresión del péptido recombinante . . . . .	21
2.6. Purificación del péptido recombinante . . . . .	23

<b>3. Resultados</b>	<b>25</b>
3.1. Amplificación de la secuencia codificante del fragmento N-terminal de hECE-1c . . . . .	25
3.2. Clonamiento en el vector pGEM <sup>®</sup> -T-easy . . . . .	26
3.3. Subclonamiento en el vector pGEX <sup>®</sup> -2T . . . . .	27
3.4. Expresión del péptido GST-N-ECE-1c recombinante . . . . .	30
3.5. Purificación del péptido GST-NECE-1c recombinante . . . . .	34
<b>4. Discusión</b>	<b>36</b>
<b>5. Conclusiones</b>	<b>41</b>
<b>6. Referencias</b>	<b>42</b>

## Índice de figuras

1.	Biosíntesis de ENDOTELINA-1 . . . . .	8
2.	Estructura de la porción extracelular de la ENZIMA CONVERTIDORA DE ENDOTELINA-1 humana. . . . .	10
3.	Estructura genética y peptídica de las distintas isoformas de ECE-1 . . . . .	11
4.	Mapa del vector pGEX <sup>®</sup> -2T . . . . .	20
5.	Amplicación por PCR de <i>N-Ece-1c</i> desde pCDNA-3-Ece-1c . . . . .	25
6.	Selección de transformantes de pGEM <sup>®</sup> -T-easy por restricción . . . . .	26
7.	Productos para ligación . . . . .	27
8.	Análisis de transformantes por restricción . . . . .	28
9.	Análisis de transformantes por PCR . . . . .	29
10.	Expresión piloto del péptido recombinante . . . . .	31
11.	Estandarización de tiempo de inducción . . . . .	33
12.	Estandarización de la concentración de IPTG . . . . .	33
13.	Purificación de NECE-1c . . . . .	35

## Índice de cuadros

1.	Partidores utilizados . . . . .	17
2.	Programa de PCR . . . . .	17



## 0.1. Lista de abreviaturas

**APC** Adenomatous Poliposis Coli

**Big-ET-1** Big Endotelina 1

**CIAP** *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Fosfatasa alcalina del intestino de ternera)

**CCR** Cáncer Colorectal

**CK1** Caseína Kinasa 1

**CK2** Caseína Kinasa 2

**COX-2** Ciclooxygenasa 2

**C-Terminal** Extremo Carboxilo Terminal de un péptido o proteína

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**cDNA** Ácido desoxirribonucleico codificante

**ECE-1** Enzima Convertidora de Endotelina -1

**End-1** Gen de *Endotelina-1*

**ET-1** Endotelina 1

**ET<sub>a</sub>R** Receptor de Endotelina tipo a

**ET<sub>b</sub>R** Receptor de Endotelina tipo b

**GSK3 $\beta$**  Glicógeno Sintetasa Kinasa 3 beta

**GFP** *Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)

**GST** Glutati3n S-Transferasa

**hECE-1c** Isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina - 1 humana

**IPTG** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**LRP5/6** Proteina relacionada con receptores de LDL

**N-ECE-1c** Extremo Amino Terminal de isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina 1

**N-Terminal** Extremo Amino Terminal de un p3ptido o proteina

**rpm** Revoluciones por minuto

**TCF/LEF** *T-cell factor/lymphocyte enhancer factor-1*

**Wnt** *Wingless-type MMTV integration site*

**VEGF** Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular

## Resumen

La ENZIMA CONVERTIDORA DE ENDOTELINA-1 (ECE-1) es una metaloproteasa de membrana involucrada en la síntesis de ENDOTELINA-1 (ET-1) y su expresión está relacionada con diversos procesos celulares y enfermedades, como el cáncer. Se conocen cuatro isoformas de ECE-1, las cuales presentan exactamente la misma secuencia de transmembrana, porción extracelular y sitio activo, pero presentan diferencias en su extremo N-terminal citoplasmático. Se ha descrito que la isoforma ECE-1c es la que presenta mayores niveles de expresión en células cancerígenas y se ha mostrado que su sobreexpresión se relaciona con un aumento del fenotipo tumoral. Por otro lado, su inhibición resulta en una disminución de dicho fenotipo e incluso se ha planteado que presenta efectos opuestos a otras isoformas, como ECE-1a. Notablemente, se ha relacionado a ECE-1 con la ruta de señalización WNT- $\beta$ -CATENINA, descrita como una vía directamente involucrada en la progresión y desarrollo tumoral. Se sabe también que la isoforma ECE-1c presenta sitios putativos de fosforilación por la proteína kinasa CK2, que es parte del eje central de la misma ruta de señalización. Estos antecedentes y nuestros datos preliminares permiten sugerir a ECE-1c como un potencial blanco para el diagnóstico del cáncer, en especial el extremo N-terminal único de la isoforma.

Este trabajo se ha enfocado en la obtención del péptido recombinante correspondiente a la fracción N-terminal de ECE-1c fusionada a GST. En primer lugar, se amplificó la región nucleotídica codificante de dicho fragmento por PCR, luego se subclonó en el vector transportador pGEM<sup>®</sup>-T-easy y posteriormente se subclonó en el vector de expresión bacteriana pGEX<sup>®</sup>-2T fusionada al extremo 3' de Gst. Finalmente, se estandarizó la expresión del péptido recombinante en la bacteria *E. coli* y se purificó en una columna de afinidad de Glutación-Agarosa.

La obtención del péptido de fusión GST-N-ECE-1c permitirá a corto plazo

el desarrollo de un anticuerpo específico para ECE-1c, ya que en el mercado sólo existen anticuerpos que reconocen a ECE-1 sin distinguir entre las isoformas. Asimismo, el péptido recombinante podría ser utilizado como sustrato en ensayos de fosforilación por CK2 con el fin de estudiar su posible rol en la ruta WNT- $\beta$ -CATENINA u otra.

El estudio presentado en este seminario de título brinda los primeros pasos en una línea de investigación que tiene como objetivo principal comprender las bases celulares del cáncer y el papel específico de la isoforma ECE-1c en esta enfermedad.

## Abstract

ENDOTHELIN CONVERTING ENZYME - 1 (ECE-1) is a membrane metalloprotease involved in ENDOTHELIN-1 (ET-1) synthesis and its expression is related with many cellular process and diseases, including cancer.

There are four different ECE-1 isoforms, which have the same transmembrane sequence, extracellular N-terminal cytoplasmic portion. It has been described that isoform ECE-1c is the most expressed in cancer cells and has been proved that its overexpression leads to an increased tumoral phenotype. On an other hand, the inhibition of ECE-1c leads to a decreased tumor phenotype and it has also proposed having opposite effects in comparisson with other isoforms, like ECE-1a. Noteworthy, ECE-1 has been related with the WNT- $\beta$ -CATENIN signaling pathway, which is directly involved in tumor progression and development. Also, ECE-1c has four putative phosphorylation sites for CK2, which is a protein implicated in this pathway. All this evidence together our preliminary data permit to suggest to ECE-1c as a potencial target to cancer diagnosis specially by its exclusive N-terminal end.

The aim of this work is to obtain the purified recombinant N-terminal end of ECE-1c fused to GST (GST-NECE-1c). In a first step, the nucleotide coding region was amplified by convencional PCR, then cloned in the pGEM<sup>®</sup>-T-easy shuttle vector and finally it was subcloned in the pGEX<sup>®</sup>-2T expression vector fused to the 3' terminal end of Gst. Peptide expression was optimized in *E. coli* and then purified in a Glutathione-Agarose affinity column.

Purified GST-NECE-1c protein will permit to develop a specific ECE-1c antibody in a short time, since only one exists in the commerce that recognize the total ECE-1, without distinguishing between the four isoforms. Likewise, the recombinant peptide will be used in a kinase assay, as a putative CK2 substrate, with the purpose of studying the specific role of ECE-1c in the WNT/ $\beta$ -CATENIN signaling pathway.

The study presented here, contribute with the first steps of a research line that has as a main aim to understand the cellular basis of cancer and the specific role that the specific isoform ECE-1c has into this disease.

# **1. Introducción**

## **1.1. Cáncer**

El cáncer es una enfermedad multifactorial que consiste en la alteración de procesos celulares que conducen a la proliferación descontrolada de un determinado grupo de células. En muchos casos, estas células son capaces de migrar y colonizar otros órganos, estableciéndose y generando un daño muchas veces irreversible en el tejido, pudiendo incluso producir la muerte del individuo. Estas alteraciones son producidas por factores epigenéticos y genéticos que generan desregulaciones en el ciclo celular, dando lugar a células con un aumentado potencial proliferativo.

Existe una gran cantidad de rutas de señalización que regulan el ciclo celular, como la ruta WNT- $\beta$ -CATENINA y una diversidad de moléculas relacionadas con dichos procesos, como ENDOTELINA-1 y CK2. Es por esto que nuestro laboratorio se ha esforzado en estudiar estas vías de señalización y la participación de estas moléculas, a fin de poder desarrollar herramientas que permitan la detección temprana de la enfermedad o nuevas estrategias para su tratamiento.

## **1.2. La ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA en el cáncer**

La ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA regula eventos importantes en el desarrollo y remodelamiento de algunos tejidos, teniendo implicancias directas en la proliferación y migración celular [WIDELITZ Y COL. 2005]. Esta vía se encuentra altamente activa en células epiteliales, tales como las del colon, que están en constante regeneración [KIM Y COL. 2005]. Dichas características fisiológicas son claves en la progresión tumoral y se ha visto un aumento en la activación de esta vía en células de cáncer, incluido el colorectal y el de mamas [WIDELITZ Y COL.

2005].

La proteína central de la vía es  $\beta$ -CATENINA, que actúa como activador transcripcional de genes relacionados con proliferación, migración e invasión celular. Cuando la ruta de señalización está inactiva, el receptor FRIZZLED y el correceptor LRP<sub>5/6</sub> se encuentran libres y  $\beta$ -CATENINA interactúa con un complejo citoplasmático compuesto por las proteínas AXINA, APC, GSK3 $\beta$  y CK1 $\alpha$ . Estas últimas dos corresponden a Ser/Thr-quinasas que fosforilan a  $\beta$ -CATENINA, promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. En contraparte, la unión de un ligando WNT a estos receptores, como WNT1 o WNT3A, impiden que las fosforilaciones ocurran y  $\beta$ -CATENINA queda libre en el citoplasma, permitiéndose su acumulación y migración al núcleo [WIDELITZ Y COL. 2005].

Un conocido regulador positivo de la ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA es la proteína kinasa CK2, que fosforila a más de 300 proteínas en residuos de Ser o Thr, teniendo un rol directo en procesos celulares relacionados con la expresión génica, proliferación y viabilidad celular [AHMED Y COL. 2002]. Diversos estudios permiten sugerir a CK2 como un potencial blanco para el tratamiento y detección del cáncer, ya que su función celular está directamente relacionada con el desarrollo y progresión tumoral [GUERRA E ISSINGER, 1999; ALLENDE Y ALLENDE 1995]. Esta enzima presenta dos tipos de subunidades, una catalítica y una regulatoria ( $\alpha$  ó  $\alpha'$ , y  $\beta$ , respectivamente) formando parte de un tetrámero que se puede encontrar en las combinaciones,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha'\beta_2$  ó  $\alpha\alpha'\beta_2$  [VALERO Y COL. 1995].

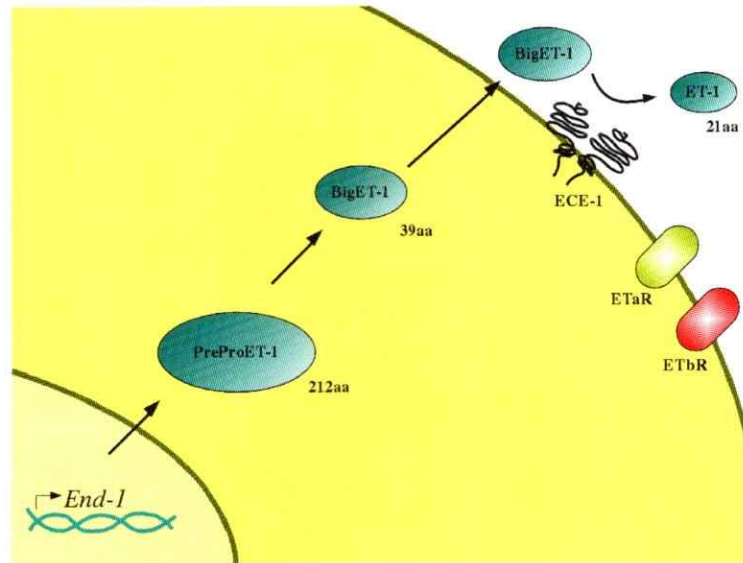
Otros trabajos han demostrado que la proteína CK2 fosforila a  $\beta$ -CATENINA, estabilizándola y protegiéndola de su degradación proteosomal [SONG Y COL. 2000]. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la estabilización de  $\beta$ -CATENINA por otra Ser/Thr-kinasa, AKT/PKB, también sería un evento regulado por CK2, ya que esta última fosforilaría a AKT permitiendo una mejor interacción



con  $\beta$ -CATENINA, promoviendo su estabilización y migración al núcleo [PONCE Y COL. 2011a y 2011b]. Una vez en el núcleo,  $\beta$ -CATENINA es capaz de unirse a los factores de transcripción de la familia TCF/LEF promoviendo la expresión de genes responsables de la proliferación, migración e invasión celular, características típicas del cáncer. Entre estos genes podemos encontrar a *Survivina*, *c-Myc*, *Cox-2*, *Vegf* y *End-1*, los cuales contienen sitios de unión a los factores de transcripción TCF/LEF en sus secuencias promotoras [HE Y COL. 1998; KIM Y COL. 2005; TORRES Y COL. 2006] .

### 1.3. Endotelina-1

Uno de los genes blancos de la ruta WNT/ $\beta$ -CATENINA codifica la ENDOTELINA-1 (ET-1), un péptido con variadas funciones celulares. ET-1 se genera a partir del precursor PREPROENDOTELINA-1 (PRE-PROET-1) de 212 aminoácidos, el cual es procesado por una endopeptidasa a BIG-ENDOTELINA-1 (BIG-ET-1), de 39 aminoácidos. Posteriormente, la generación del péptido (ET-1) se lleva a cabo por la Enzima Convertidora de Endotelina-1 (ECE-1), la cual rompe el enlace entre el triptófano 21 y la valina 22, produciendo un péptido activo (ET-1) de 21 aminoácidos [SHIMADA Y COL. 1995; VALDENNAIRE Y COL. 1999]. Este proceso se detalla esquemáticamente en la Figura 1.



**Figura 1: Biosíntesis de Endotelina.** En la figura se muestra la expresión del gen *End-1*, que codifica el precursor PREPROENDOTELINA-1 (PRE-PROET-1), el cual es procesado intracelularmente por una endopeptidasa a BIG-ENDOTELINA-1 (BIG-ET-1). Posteriormente, la Enzima Convertidora de Endotelina-1 (ECE-1), mostrada como un homodímero de membrana, produce el péptido activo (ET-1) de 21 aminoácidos. La actividad de este péptido es mediada por los receptores de transmembrana ET<sub>a</sub>R y ET<sub>b</sub>R, los cuales median la activación de distintas cascadas de señalización intracelular.

Se ha descrito que ET-1 es un péptido altamente vasoactivo que tiene funciones importantes en la vasoconstricción y regulación cardíaca, por lo que su desregulación influye directamente en la generación de diversas enfermedades, como hipertensión y falla renal aguda [NELSON Y COL. 2003]. Por otro lado, ET-1 participa en el crecimiento y proliferación celular, lo que significa que tiene un alto potencial mitogénico y se se ha sugerido que existe una estrecha relación entre alteraciones en la regulación de ET-1 y diversos tipos de cáncer, entre ellos el colorectal [NELSON Y COL. 2003; CARDUCCI Y COL. 2000].

La actividad de este péptido es mediada por los receptores de transmembrana ET<sub>a</sub>R y ET<sub>b</sub>R, desencadenando diversos eventos de señalización relacionados con su rol vasoactivo y en proliferación celular [KHIMJI Y ROCKEY, 2010]. Se han detectado altos niveles de ET-1 tanto en el plasma sanguíneo como en los tejidos de

pacientes con cáncer, e incluso se ha demostrado que en presencia de un antagonista del receptor  $ET_{aR}$  existe una disminución en el crecimiento tumoral [ASHAM Y COL. 2001]. Es importante destacar que el péptido activo ET-1 tiene una vida media muy corta (1 minuto), por lo que sus efectos biológicos son completamente dependientes de la conversión de BIG-ET-1 a ET-1 por la ECE-1.

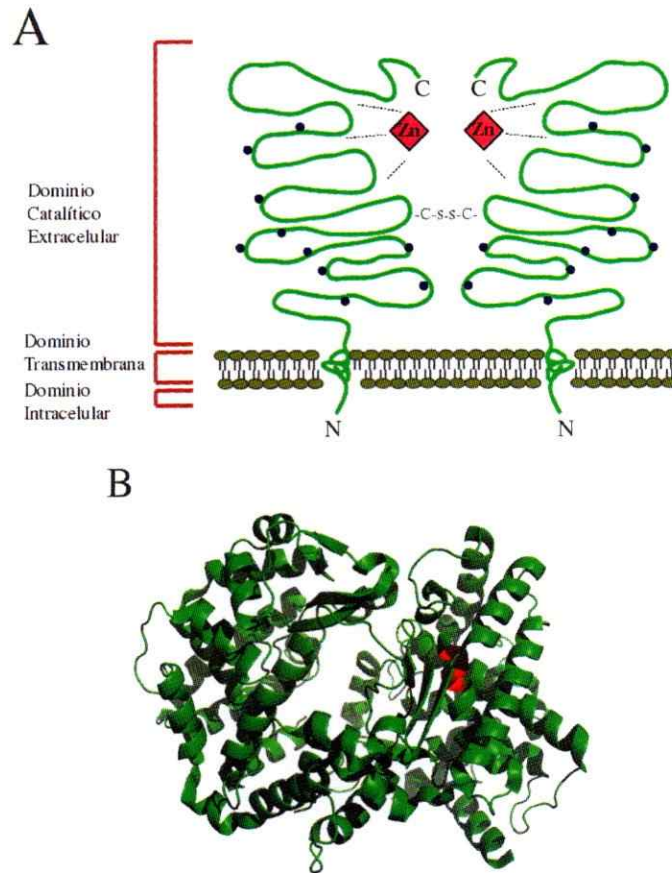
#### **1.4. Enzima Convertidora de Endotelina - 1 (ECE-1)**

Esta proteína de membrana es una metaloproteasa dependiente de zinc, compuesta por un dominio catalítico extracelular (C-terminal), una región de transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático (N-terminal) de aproximadamente 80 aminoácidos. Su localización en la membrana celular corresponde a un homodímero unido por puentes disulfuros (Figura 2A). La enzima presentaría diez glicosilaciones putativas y cada monómero coordinaría un ion de Zinc en el bolsillo del sitio activo [TURNER Y TANZAWA, 1997].

Se han descrito cuatro isoformas de ECE-1 que difieren en la secuencia de la región N-terminal, localización subcelular y distribución en los tejidos, sin embargo, todas tienen propiedades catalíticas similares [SCHULZ Y COL. 2009]. Se ha propuesto que dicha región intracelular estaría jugando un papel importante en el tráfico y localización subcelular de ECE-1 [SCHWEIZER Y COL. 1997; JAFRI Y ERGUL, 2003]. Las cuatro isoformas son codificadas por el mismo gen, pero son reguladas por promotores independientes, tal como se muestra en la Figura 3 [ORZECOWSKI Y COL. 1997; VALDENAIRE Y COL. 1999].

Las variaciones en secuencia son mínimas entre las isoformas b, c y d, diferenciándose en aproximadamente 15 aminoácidos. Por otro lado, la isoforma ECE-1a es la que presenta mayor variedad en la región N-terminal, con una porción intracelular de 32 aminoácidos, totalmente distinta a las otras tres [MACLEOD Y

COL. 2002]. Notablemente, se ha descrito que la expresión de la enzima ECE-1, y en especial la isoforma c, es elevada en distintos tipos de cáncer y su inhibición resulta en una disminución de la capacidad invasiva *in vitro* en células de cáncer prostático [AWANO Y COL. 2006].



**Figura 2: Estructura de la Enzima Convertidora de Endotelina-1 humana.** En **A** se muestra un esquema representativo de ECE-1 en la membrana celular formando un homodímero. En rojo se muestra la coordinación de Zinc en el dominio catalítico y en puntos azules se muestran los diez sitios putativos de glicosilación. Modificado de [TURNER Y TANZAWA 1997]. En **B** se muestra una representación de la estructura cristalográfica de la porción extracelular ECE-1. En rojo se muestra el sitio catalítico de unión a Zinc. No se muestran los 100 primeros aminoácidos correspondientes al dominio transmembrana y a la porción N-terminal característica de cada isoforma debido a que no se cristalizaron [SCHULZ Y COL. 2009]

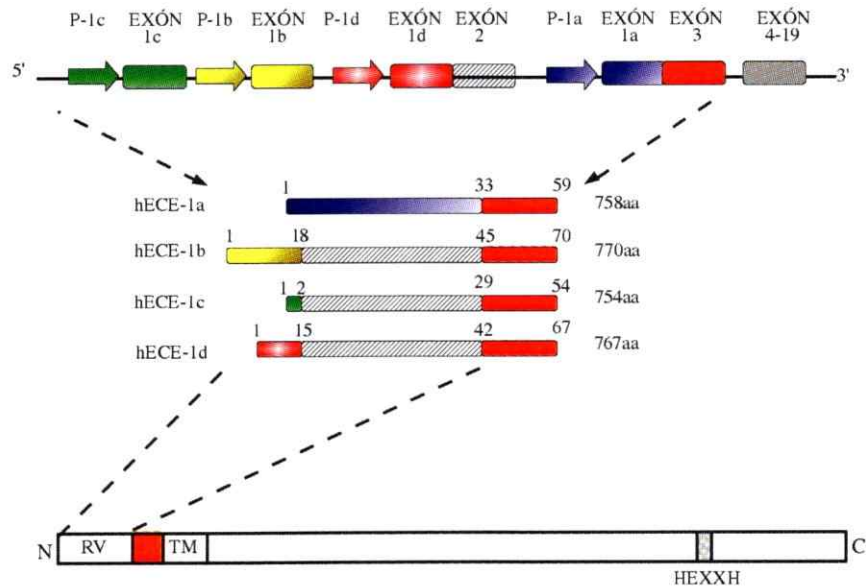


Figura 3: Estructura genética y peptídica de las distintas isoformas de ECE-1. Arriba, los promotores alternativos para cada isoforma. Al medio, las variantes peptídicas de cada isoforma. Abajo, la estructura esquemática de ECE-1, en donde RV es la región intracelular variable de cada isoforma, en naranja la porción intracelular común, y TM la fracción transmembrana. HEXXH corresponde al dominio catalítico de unión a Zinc de ECE-1. Figura modificada de [MACLEOD Y COL. 2002].

## 1.5. Isoforma c de la Enzima Convertidora de Endotelina - 1 (ECE-1c)

Recientemente se ha planteado que la isoforma ECE-1c tiene un rol importante en la progresión tumoral, ya que al ser sobreexpresada en células de cáncer mamario se ha visto un aumento de la invasividad [SMOLLICH Y COL. 2007]. Incluso se ha sugerido que dicho fenotipo puede atribuirse a procesos independientes de los niveles de ET-1 [LAMBERT Y COL. 2009]. Por otro lado, se ha propuesto que la isoforma ECE-1a, a pesar de que también se expresa en la membrana celular [SCHWEIZER Y COL. 1997], tendría un rol opuesto a ECE-1c, contrarrestando el potencial invasivo al ser sobreexpresada en células de cáncer prostático [LAMBERT Y COL. 2009].

Por otro lado, las isoformas ECE-1b y ECE-1d no presentan grandes variaciones en su expresión en células tumorales y tampoco se ha visto que su sobreexpresión inducida incrementa el fenotipo tumoral [LAMBERT Y COL. 2009]. Esto es muy relevante, ya que seguramente sólo un pequeño número de aminoácidos estarían marcando diferencias fisiológicas importantes. Como ya se ha mencionado, estas isoformas presentan distinta localización subcelular y su secuencia peptídica es distinta en la porción N-terminal, lo que sugiere que esta fracción aminoacídica es clave en su distribución y probablemente también en su rol fisiológico.

Se ha descrito que las isoformas ECE-1b, 1c y 1d son constitutivamente fosforiladas en Ser<sup>18</sup> y Ser<sup>20</sup> por la proteína CK1, sin embargo, la isoforma ECE-1a no presenta dichos residuos y no es fosforilada por esta kinasa, lo que puede estar explicando en parte sus diferentes roles fisiológicos [MACLEOD Y COL. 2002]. También se ha descrito que ECE-1 es fosforilada en su extremo N-terminal por la proteína kinasa PKC, lo que aumenta su actividad catalítica y favorece el tráfico a la membrana celular [SMITH Y COL. 2006; KURUPPU Y COL. 2010].

## **1.6. Ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA y ECE-1c**

Resultados preliminares de nuestro grupo sugieren una relación entre ECE-1c y cáncer a través de la ruta WNT/ $\beta$ -CATENINA. En células tumorales, esta ruta se encuentra aberrantemente activada y datos de nuestro laboratorio muestran que esta activación se correlaciona con altos niveles de mensajero de *Ece-1*, específicamente de la isoforma *Ece-1c*. Así también, la activación farmacológica de la vía o la sobreexpresión de ECE-1c aumentan el potencial invasivo en células de epiteliales no tumorales. Otros resultados muestran que la activación de la vía WNT/ $\beta$ -CATENINA produce un aumento de ECE-1 total y de mensajero de *Ece-1c*, sin embargo, no se sabe si estos altos niveles de mensajero se correlacionan con un aumento en los

niveles proteicos, ya que no se cuenta con un anticuerpo que detecte específicamente esta isoforma.

Lo anterior sugiere que la expresión recombinante del extremo N-terminal de ECE-1c sería útil para diseñar un anticuerpo que reconozca específicamente dicha isoforma. Además, resultados de nuestro laboratorio sugieren que pacientes chilenos diagnosticados con cáncer de colon presentan altos niveles de mensajero de *Ece-1c*, pero no se ha demostrado si los niveles proteicos también se encuentran elevados. Incluso, análisis preliminares mediante inmunohistoquímica sugieren que los niveles totales de ECE-1 no presentan variaciones significativas en biopsias de cáncer de colon, lo que hace aún más necesaria la obtención de un anticuerpo que detecte específicamente la isoforma ECE-1c .

Finalmente, un análisis *in silico* mostró que ECE-1c presenta tres sitios putativos de fosforilación por CK2 en Thr<sup>9</sup>, Ser<sup>18</sup> y Ser<sup>20</sup>. Notablemente, estos sitios no están presentes en la isoforma ECE-1a, lo que podría dar luces sobre su rol opuesto a la isoforma c en el desarrollo tumoral. Así, el péptido N-ECE-1c purificado sería útil también para utilizarlo en ensayos kinasa como sustrato de CK2.

## 1.7. Fundamento

El clonamiento, expresión y purificación del fragmento N-terminal de la proteína ECE-1c permitiría utilizarlo para desarrollar un anticuerpo que detecte específicamente dicha isoforma, así como realizar estudios enzimáticos destinados a conocer su rol en la ruta de señalización WNT/ $\beta$ -CATENINA y su relación con CK2.

El trabajo presentado en este seminario de título corresponde a los primeros pasos de una línea de investigación que busca comprender la etiología del cáncer y el papel de ECE-1c y así eventualmente poder generar herramientas que permitan la detección temprana y un mejor tratamiento de la enfermedad.

## 1.8. Objetivos

### 1.8.1. Objetivo General

Expresar y purificar el extremo N-terminal (del aminoácido 1 hasta 100) de la isoforma c de la ENZIMA CONVERTIDORA DE ENDOTELINA-1 humana (hECE-1c).

### 1.8.2. Objetivos específicos

1. Amplificar la secuencia codificante del fragmento N-terminal de hECE-1c a partir del cDNA completo contenido en el vector pCDNA<sup>®</sup>3.
2. Clonar dicha secuencia en el vector transportador pGEM<sup>®</sup>-T-easy.
3. Subclonar la secuencia junto al cDNA de *Glutación-S-Transferasa (Gst)* en el vector pGEX<sup>®</sup>-2T de expresión bacteriana.
4. Estandarizar la expresión del péptido de fusión recombinante, inducido por IPTG, en un clon transformado.
5. Purificar el péptido GST-NECE-1c mediante cromatografía de afinidad en una columna de Glutación-Agarosa.



## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Tampones y soluciones

- **Medio de cultivo LB:** 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L Cloruro de Sodio 5 g/L.
- **Medio de cultivo LBA:** LB suplementado con 100 µg/mL Ampicilina.
- **Medio de cultivo TB:** 12 g/L Triptona, 24 g/L Extracto de Levadura, 0,4 % Glicerol, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
- **Medio de cultivo TBA:** TB suplementado con 100 µg/mL Ampicilina.
- **Buffer STE:** 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0).
- **Buffer universal de digestión:** 1 M Acetato de K<sup>+</sup>, 250 mM de Tris pH 7,6, 100 mM Acetato de Magnesio, 5 mM β-mercaptoetanol, 7 µg/ml BSA.
- **Buffer de Elución de DNA:** Acetato de Na<sup>+</sup>, 0,3 M SDS, 0,1 % MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, 10 mM (pH 6,8).
- **Solución de Tinción:** 0,1 % Azul de Coomassie, 50 % metanol, 10 % Ácido Acético.
- **Solución Decolorante:** 20 % Metanol, 10 % Ácido Acético.
- **Buffer PBS-T:** 1X PBS, 0,1 % Tween20.
- **Buffer PBS-T-L<sub>1</sub>%:** PBS-T, 1 % leche descremada.
- **Buffer PBS-T-L<sub>5</sub>%:** PBS-T, 5 % leche descremada.
- **Buffer de lavado:** 50mM HEPES, 5 % Glicerol, 1mM β-mercaptoetanol.

- **Buffer de lavado con detergentes:** 50 mM HEPES, 5 % Glicerol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,05 % DOC, 1 % Tritón X-100.
- **Buffer denaturante:** 6 M Cloruro de Guanidinio, 10 mM HEPES, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol.
- **Buffer de dilución:** 10 mM HEPES, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 % Glicerol.
- **Buffer de diálisis:** 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,01 % Tritón X-100, 150 mM NaCl, 10 % Glicerol
- **Buffer de lavado de columna:** 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 % Glicerol
- **Buffer de elución:** 50mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 % Glicerol, 1 mL PMSF, 20 mM Glutación.

## **2.2. Amplificación y purificación de la secuencia codificante del fragmento N-terminal de hECE-1c**

Los partidores diseñados amplifican el extremo 5' de *hEce-1c*, correspondiente a los primeros 300 nucleótidos que codifican la región intracelular y la porción transmembrana de la proteína. Al partidore directo se agregó el sitio de restricción para *BamHI*, flanqueando el extremo 5' del amplicón (Cuadro 1) .

Para la reacción de PCR se utilizó la DNA polimerasa Taq Platinum HiFi de Invitrogen®. Se amplificó la banda utilizando el vector pCDNA®3-*hEce-1c* como templado en un volumen total de 50  $\mu$ l y se verificó en un gel de agarosa al 1 % utilizando bromuro de etidio al 0,01 % para la visualización de las bandas de DNA en transiluminador UV. El programa de PCR se detalla en el Cuadro 2.

**Cuadro 1: Partidores utilizados.** NE1 (directo) y NE2 (reverso) amplifican el cDNA del extremo 5' de *hEce-1c* ( primeros 300 nucleótidos de la secuencia). El sitio de corte *BamHI* se encuentra subrayados en NE1. PG1 (directo) y PG2 (reverso) amplifican la secuencia del sitio de multiclonamiento del vector pGEX<sup>®</sup>-2T agregando aproximadamente 40 nucleótidos a la secuencia amplificada contenida en dicho sitio.

Partidor	Secuencia 5' - 3'
NE1	<u>ggatcc</u> atgatgtcgacgtacaagcgggcc
NE2	gcggccgctccatggagctcaagatggag
PG1	gcgaccatcctccaaaatcgg
PG2	atcaccgaaacgcgcgaggg

**Cuadro 2: Programa de PCR que se utilizó para todas las reacciones de amplificación.**

Temperatura (°C)	Tiempo	N° Ciclos
94	3'	—
94	30"	30
60	45"	
72	45"	
72	5'	—

Para la purificación del fragmento, el producto de PCR se cargó en un gel de acrilamida al 5 %, se incubó con bromuro de etidio por 5 minutos y se visualizó en luz UV. Se cortó la porción correspondiente a la banda amplificada y se incubó con 1,2 mL de buffer de elución de DNA a 37°C por toda la noche en agitación fuerte. Luego, para eliminar los restos de acrilamida se centrifugó por 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C. Para precipitar el DNA, el sobrenadante se incubó con 0,7 volúmenes de isopropanol al 100 % por 30 minutos a -80°C y se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm. El pellet obtenido se lavó con etanol al 80 % y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones de velocidad y tiempo. El pellet se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas.

## 2.3. Subclonamiento en vector pGEM<sup>®</sup>-T-easy

### Ligación en pGEM<sup>®</sup>-T-easy

Se mezclaron 7  $\mu$ l de la solución anterior (sin cuantificar), 1  $\mu$ g de vector pGEM<sup>®</sup>-T-easy, 3 unidades de Ligasa del fago T4 (Promega<sup>®</sup>), buffer de ligación, en un volumen final de 10  $\mu$ l y se dejó a temperatura ambiente por 48 horas. Luego, se electroporó 1  $\mu$ l del producto de ligación en 30  $\mu$ l de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes y se dejó creciendo en 1 mL de medio TB por 30 minutos a 37°C con agitación fuerte. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 4.000 rpm a 4°C y se resuspendió el pellet en 200  $\mu$ l de TB. Se sembró dicho volumen en placas LBA/XGal y se incubó a 37°C por 12 horas. A las bacterias transformadas con este constructo se les denominó pGEM<sup>®</sup>-T-easy-*N-Ece-1c*.

### Selección de colonias transformantes

Se seleccionaron 7 colonias blancas y se crecieron toda la noche en 4 mL de medio líquido LBA a 37°C con agitación fuerte por 12 horas. Se extrajo el DNA plasmidial de cada cultivo siguiendo el protocolo estandar de lisis alcalina y luego de liberar el fragmento con la enzima EcoRI<sup>1</sup>, se analizaron a través de electroforesis en agarosa al 1 % en presencia de bromuro de etidio al 0,01 %.

## 2.4. Subclonamiento en el vector pGEX<sup>®</sup>-2T

### Obtención de inserto desde pGEM<sup>®</sup>-T-easy-*N-Ece-1c*

Se seleccionó un clon positivo y se le extrajo el DNA plasmidial correspondiendo al constructo pGEM<sup>®</sup>-T-easy-*N-Ece-1c*. Se realizó la digestión enzimática con

---

<sup>1</sup>El vector pGEM-T-easy contiene dos sitios de restricción de EcoRI flanquendo por ambos extremos la región de inserción en el sitio de multiclonamiento

*BamHI* utilizando 10 unidades de enzima y buffer universal de digestión a una concentración final de 1,5X en un volumen total de 20 µl, y se incubó a 37°C por 10 horas. Se verificó la linearización del vector y se agregaron 10 unidades de *EcoRI*. Finalmente, se verificó la liberación del inserto y se purificó a partir de un gel de acrilamida al 5 %, se eluyó y precipitó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

#### **Digestión de pGEX®-2T**

Se realizó la digestión del vector pGEX®-2T con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* en las mismas condiciones utilizadas en la digestión del inserto (Figura 4). Luego, se purificó en un gel de acrilamida al 5 % y se escindió la banda utilizando el mismo protocolo de purificación y precipitación de DNA descrito anteriormente. El plasmidio se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas.

#### **Desfosforilación de pGEX®-2T**

Para desfosforilar el vector ya digerido, se incubaron los 20 µl obtenidos anteriormente con 0,5 unidades de CIAP y buffer CIAP 1X en 50 µl totales, por 15 minutos a 37°C y 15 minutos a 56°C. Se agregaron 0,5 unidades de CIAP nuevamente y se volvió a incubar en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. El DNA se extrajo adicionando un volumen de fenol/cloroformo 1:1 y centrifugando a 13.000 rpm por 10 minutos. Se colectó la fase superior y se adicionó un volumen de cloroformo. Se centrifugó en las mismas condiciones y se colectó nuevamente la fase superior. Para precipitar el DNA, se agregaron 3 volúmenes de etanol al 100 % y se incubó por 30 minutos a -20°C. Se centrifugó a 4°C a 13.000 rpm por 15 minutos y el pellet se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas.

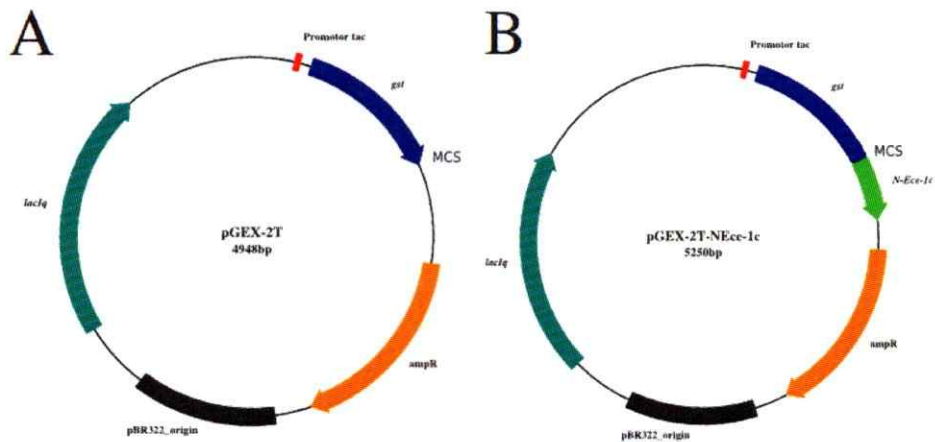


Figura 4: Esquema del vector de expresión pGEX<sup>®</sup>-2T. En A se muestra el esquema del vector vacío que expresa GST (azul) y en B el vector que expresa el péptido fusión GST-NECE-1c (azul-verde). Se muestra el promotor Tac (rojo), el gen codificante del represor LACI (celeste), el origen de replicación bacteriano pBR322\_origin (negro) y el gen de resistencia a Ampicilina (amarillo). MCS: Sitio de multiclomamiento por sus siglas en inglés.

### Ligación en pGEX<sup>®</sup>-2T

Previo a la ligación, se cuantificaron las soluciones de DNA de inserto y vector. La reacción se realizó siguiendo los protocolos de SAMBROOK Y RUSSELL realizando además una ligación control de vector sin inserto. De cada muestra se electroporó 1  $\mu$ l del producto de ligación en 30  $\mu$ l de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes y se dejó creciendo en 1 mL de medio TB por 30 minutos a 37°C con agitación fuerte. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 4.000 rpm a 4°C y se resuspendió el pellet en 200  $\mu$ l de TB. Se sembró todo el volumen en placas LBA y se incubó a 37°C por 12 horas. El mismo procedimiento se realizó con la muestra de control negativo.

## **Selección de colonias transformantes**

Se seleccionaron siete colonias y se crecieron toda la noche en 4 mL de LBA a 37°C con agitación fuerte por 12 horas. Se extrajo el DNA plasmidial de cada cultivo mediante el kit de miniprep Qiagen® y la presencia del inserto se confirmó mediante el análisis de restricción y por PCR convencional.

*Análisis de restricción:* se realizó la digestión con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, utilizando una unidad de cada una y buffer universal de restricción 1,5X.

*Análisis por PCR:* se realizó con tres clones (1, 3 y 5) escogidos al azar entre los transformantes positivos resultantes del análisis de restricción. La reacción se hizo utilizando los partidores del inserto (NE1/NE2), los del sitio de multiclonamiento del vector pGEX®-2T (PG1/PG2) y ambos combinados en las dos orientaciones posibles (NE1/PG2) y (PG1/NE2).

## **2.5. Expresión del péptido recombinante**

### **Análisis de la expresión**

Se realizó una inducción piloto en condiciones estándar de tiempo, temperatura y concentración de IPTG previamente optimizadas en nuestro laboratorio para otros constructos pGEX®. Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 DE3 con el vector pGEX®-2T vacío y con los constructos obtenidos a partir de tres clones positivos (1, 3 y 5) mediante electroporación, siguiendo los mismos protocolos descritos anteriormente. Luego de obtener las placas con los transformantes, se crecieron dos cultivos de cada clon, picando una colonia con una punta estéril y dejándola en 5 mL de medio TBA por 2 horas en agitación fuerte a 37°C hasta  $OD_{600} \approx 0,6$ . Luego

se adicionó 1 mM IPTG al medio de cultivo por cada clon y la inducción se realizó por 2 horas en las mismas condiciones de agitación, pero a 28°C<sup>2</sup>.

Se analizó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de buffer STE y se sonicó por 20 segundos a máxima potencia. Las muestras se denaturaron, se separaron las proteínas por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 10% y se tñieron con azul de coomassie por 10 minutos en agitación suave. Se destñieron con solución decolorante por 2 horas en agitación suave. Las mismas muestras se analizaron por Western Blot.

### Western Blot

Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 350 mA por 2 horas. La membrana se bloqueó con buffer PBS-T-L<sub>5</sub>% toda la noche en agitación suave a 4°C y se incubó con anticuerpo primario anti-GST<sup>3</sup> diluido en buffer PBS-T-L<sub>5</sub>% en proporción 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con PBS-T en agitación suave y se incubó durante 1 hora con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano diluido en buffer PBS-T-L<sub>1</sub>% en proporción 1:5000. Finalmente, se detectó la quimioluminiscencia con el kit EZ-ECL y se reveló en una película fotográfica.

---

<sup>2</sup>La temperatura de inducción fue previamente estandarizada en nuestro laboratorio para vectores pGEX<sup>®</sup> y es recomendada en la literatura [SALUTA Y BELL, 1998]

<sup>3</sup>El anticuerpo Anti-GST está hecho en ratón



## Optimización de la expresión

*Optimización del tiempo:* de un *glicerol-stock* de bacterias BL21 DE3 previamente transformadas con el constructo pGEX<sup>®</sup>-2T-NEce-1c (clon 5), se crecieron seis cultivos de 5 mL de LBA durante dos horas en agitación fuerte a 37°C y se incubó con 1 mM IPTG. La inducción se realizó por 0,5, 1, 2, 3 y 4 horas para los respectivos tubos en agitación fuerte a 28°C.

*Optimización de la concentración de IPTG:* del mismo *glicerol-stock*, se crecieron 6 cultivos de 5 mL de LBA durante 2 horas en agitación fuerte a 37°C hasta OD<sub>600</sub> ≈ 0,6 y se adicionó IPTG en distintas concentraciones (0, 0,25, 0,5, 1, 2 y 4 mM) y se incubaron por 3 horas (tiempo previamente optimizado) en agitación fuerte a 28°C.

## 2.6. Purificación del péptido recombinante

### Producción

Se inocularon 500 mL de medio LBA con un *glicerol-stock* de bacterias BL21 DE3 previamente transformadas con el constructo pGEX<sup>®</sup>-2T-NEce-1c (clon 5) y se creció por 2 horas en agitación fuerte a 37°C hasta OD<sub>600</sub> ≈ 0,6. Se adicionó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó por 3 horas en agitación fuerte a 28°C (condiciones previamente optimizadas)

El cultivo se centrifugó a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C para coleccionar el pellet bacteriano y se resuspendió en 20 mL de STE suplementado con lisozima 0,35 mg/mL. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se sonicó con 5 pulsos de 30 segundos cada uno a máxima potencia. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C y se colectó el

precipitado, correspondiente a la fracción insoluble (la fase soluble se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

### **Disolución de cuerpos de inclusión y renaturación**

El pellet se lavó dos veces con 20 mL de buffer de lavado, centrifugando a 4.000 rpm por 10 minutos después de cada lavado. Se repitieron dos lavados más utilizando el mismo buffer con detergentes. El pellet obtenido se resuspendió en 40 mL de buffer denaturante con 6M cloruro de guanidinio y se incubó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . La muestra se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar los restos celulares insolubles y coleccionar el sobrenadante que contiene la fracción soluble en donde se encuentran las proteínas denaturadas. La fracción obtenida se disolvió agregando lentamente 160 mL de buffer de dilución y se incubó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación moderada a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los 200 mL totales se agregaron a una bolsa de diálisis y se incubaron en buffer de diálisis por 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó todo el volumen desde la bolsa de diálisis y se separaron 25 mL para una prueba de purificación y los 175 mL restantes se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Purificación**

Se cargaron los 25 mL de muestra en una columna de 1 mL de resina Glutati6n-Agarosa previamente empacada y equilibrada con buffer de equilibrio<sup>4</sup>. Se dejó fluir todo el volumen mediante gravedad y se lavó con siete volúmenes de buffer de lavado de columna. Finalmente, el péptido de fusión unido a la columna se eluyó con buffer de elución con glutati6n reducido 20 mM y se coleccionaron fracciones de 500  $\mu\text{l}$ , las que fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot.

---

<sup>4</sup>Se utilizó el mismo buffer de diálisis.

### 3. Resultados

#### 3.1. Amplificación de la secuencia codificante del fragmento N-terminal de hECE-1c

Para expresar el extremo N-terminal de hECE-1c fue necesario primero amplificar la secuencia codificante de dicho fragmento, clonarla en el vector transportador pGEM<sup>®</sup>-T-easy y posteriormente subclonarla en el vector de expresión pGEX<sup>®</sup>-2T.

La amplificación se realizó mediante PCR convencional utilizando como template la construcción pCDNA<sup>®</sup>-3-*hEce-1c*. Para ello, se diseñaron los partidores que amplifican el extremo 5' de *hEce-1c*, correspondiente a los primeros 300 nucleótidos que codifican la región intracelular y la porción transmembrana de la proteína. La secuencia de los partidores utilizados y el programa de PCR se detalla en los Cuadros 1 y 2, respectivamente. La verificación de la amplificación se realizó en un gel de agarosa al 1 % y se muestra en la Figura 5.

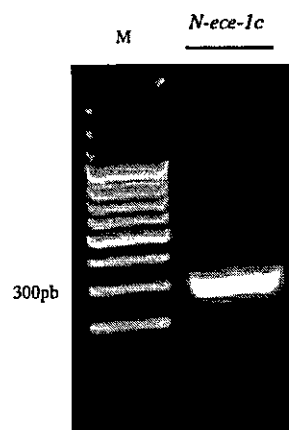


Figura 5: Amplificación por PCR de *N-Ece-1c* desde pCDNA-3-*hEce-1c*. Se observa la banda correspondiente al fragmento de 300pb. M: marcador de tamaño (en pares de bases, pb).

### 3.2. Clonamiento en el vector pGEM<sup>®</sup>-T-easy

Luego de amplificar la secuencia *N-Ece-1c*, ésta se purificó y se ligó en el vector transportador pGEM<sup>®</sup>-T-easy. Este vector transportador permite la ligación directa del producto de PCR, ya que las adeninas libres que deja la Taq polimerasa en el amplicón se ligan a las timinas libres del vector lineal. Asimismo, la selección de transformantes se facilita debido a que el sitio de multiclonamiento se encuentra truncando la secuencia codificante del gen *lacZ*, por lo que las colonias transformantes son blancas o celestes, mientras que las restantes negativas son azules.

De esta forma, se obtuvieron alrededor de 50 colonias, de las que aproximadamente el 10% fueron azules. Para el análisis se seleccionaron 7 colonias blancas y la inserción del fragmento se verificó mediante un análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, que flanquea el sitio de multiclonamiento por ambos extremos. El resultado del análisis se muestra en la Figura 6, donde se observa la liberación de un fragmento de aproximadamente 300 pb en todos los clones analizados, correspondiente al fragmento amplificado y presente en el sitio de multiclonamiento.

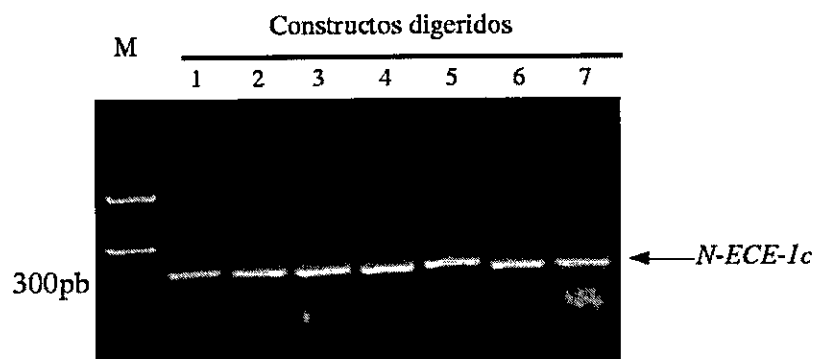


Figura 6: Análisis de transformantes de pGEM<sup>®</sup>-T-easy por digestión con enzimas de restricción. Se extrajo el DNA plasmidial de 7 colonias blancas y se realizó un ensayo de digestión con *EcoRI*. Se observa la liberación del fragmento en todos los clones analizados. M: marcador de tamaño (en pares de bases, pb).

### 3.3. Subclonamiento en el vector pGEX<sup>®</sup>-2T

La secuencia *N-Ece-1c* se escindió desde el vector transportador pGEM<sup>®</sup>-T-easy con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y se purificó posteriormente desde un gel de acrilamida. Además, el vector pGEX<sup>®</sup>-2T fue digerido con las mismas enzimas y fue desfosforilado para disminuir la tasa de religamiento. Las bandas de DNA purificadas para la reacción de ligación se muestran en la Figura 7. Se escogió este vector porque permite inducir con IPTG la expresión del péptido recombinante unido a la proteína GST, para posteriormente purificarlo mediante una columna de Glutación-Agarosa.

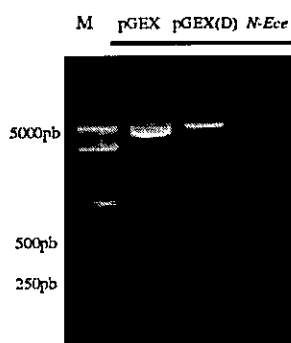


Figura 7: **Productos para ligación.** pGEX: vector pGEX<sup>®</sup>-2T sin digerir. pGEX(D): vector pGEX<sup>®</sup>-2T digerido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, desfosforilado con CIAP y purificado por gel de acrilamida. *N-Ece*: fragmento *N-Ece-1c* escindido desde el constructo pGEM<sup>®</sup>-T-easy-*N-Ece-1c* con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y purificado por gel de acrilamida. M: marcador de tamaño (en pares de bases, pb).

Luego de purificar los fragmentos, se realizó la reacción de ligación en proporción molar de inserto y vector de 1:3, respectivamente, y un control negativo sin inserto. Los productos de ligación se transformaron en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ . En la primera reacción se obtuvieron al menos 100 colonias y en el control negativo no hubo crecimiento bacteriano, por lo que la tasa de religamiento prácticamente fue nula. De esas 100 colonias, se escogieron 7 para comprobar la inserción del

fragmento mediante un análisis de restricción, PCR convencional y luego por secuenciación.

El análisis de restricción (Figura 8) mostró que en 6 clones existía un inserto de aproximadamente 300 pb conteniendo los sitios de restricción, con los que fue escindido desde el constructo pGEM<sup>®</sup>-T-easy-*N-Ece-1c*.

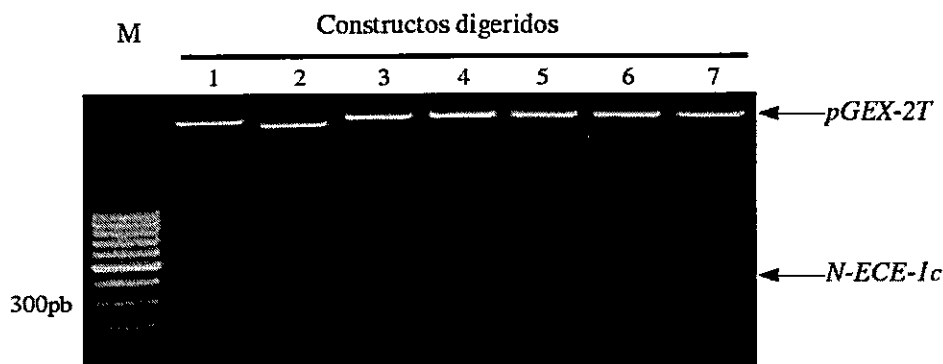


Figura 8: Análisis de restricción de transformantes. Se escogieron 7 transformantes y se les extrajo el DNA plasmidial, mediante un kit miniprep. Los constructos fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Se observa la liberación del fragmento de aproximadamente 300 pb en todos los carriles, excepto en el clon N°2. Arriba se muestra el vector pGEX<sup>®</sup>-2T linealizado M: marcador de tamaño (en pares de bases, pb).

De los 6 clones que resultaron positivos al análisis de restricción, se escogieron 3 y se analizaron por PCR utilizando las distintas combinaciones de partidores, tal como se muestra en la Figura 9A. Con la combinación de partidores específicos del inserto (NE1/NE2, ver Cuadro 2) se obtuvo una banda de 300 pb correspondientes a *N-Ece-1c* (Figura 9B).

También se observó que al utilizar los partidores específicos del sitio de multiclonamiento del vector pGEX<sup>®</sup>-2T (PG1/PG2, ver Cuadro 2), se obtuvo una banda de aproximadamente 350 pb, ya que cada partidor aporta con cerca de 25 pb extras en los extremos 5' y 3', respectivamente. En los últimos seis carriles, se muestra la amplificación con los partidores combinados, arrojando un producto entre los 300 y 350 pb (Figura 9B).

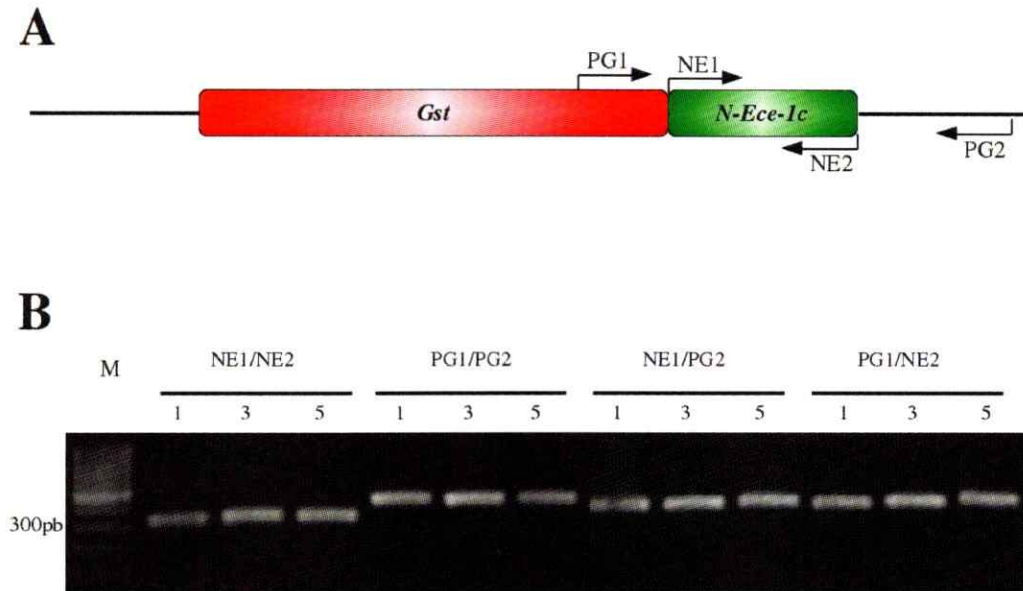


Figura 9: **Análisis de transformantes por PCR.** En **A** se muestra el constructo pGEX<sup>®</sup>-2T-*N-Ece-1c* y se indican los partidores utilizados en el análisis por PCR. En **B** se muestra el análisis por PCR convencional de tres clones (1, 3 y 5) escogidos al azar entre los transformantes positivos resultantes del análisis de restricción mostrado en la Figura 8. Se extrajo el DNA plasmidial de cada clon mediante miniprep y se analizaron por PCR utilizando los partidores del inserto (NE1/NE2), los del sitio de multiclonamiento del vector pGEX<sup>®</sup>-2T (PG1/PG2) y ambos combinados en las dos orientaciones posibles (es decir, NE1/PG2 y PG1/NE2). Se observa la amplificación de la banda esperada para todas las combinaciones de partidores utilizados. **M**: marcador de tamaño (en pares de bases, bp).

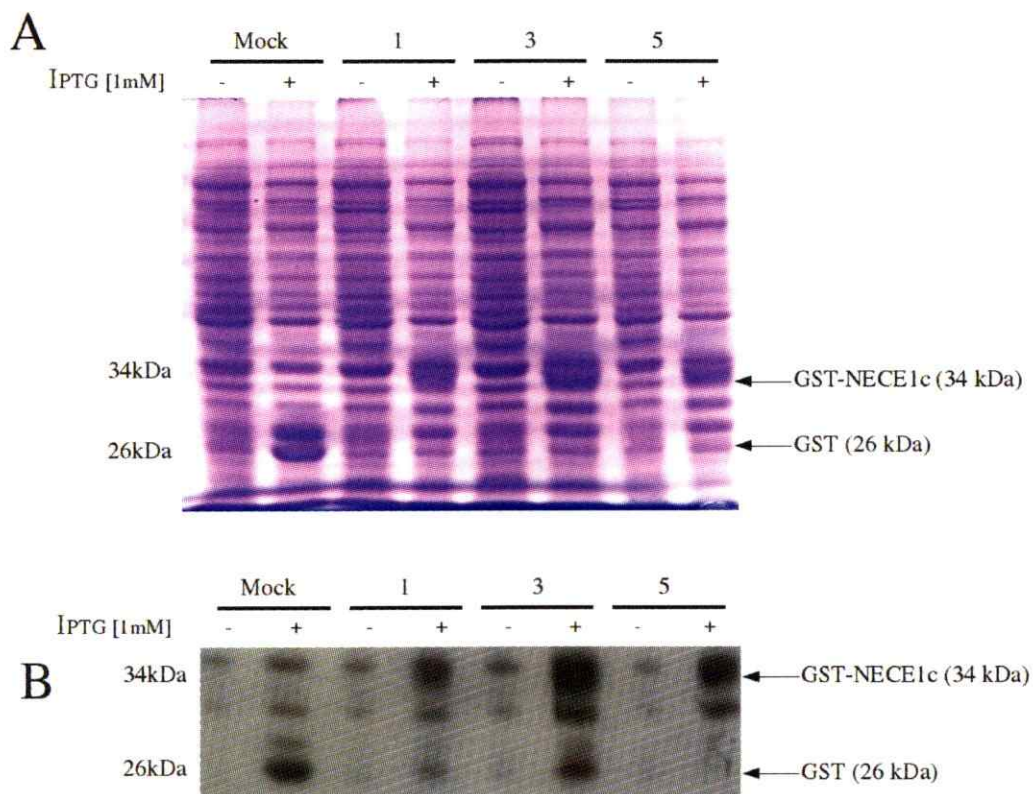
Todos estos análisis permitieron comprobar la presencia del inserto *N-Ece-1c* en el sitio de multiclonamiento del vector pGEX<sup>®</sup>-2T y en la orientación esperada. Este resultado fue validado mediante secuenciación, demostrándose además la ausencia de mutaciones y la correcta alineación con el marco de lectura de la secuencia del cDNA de GST.

### 3.4. Expresión del péptido GST-N-ECE-1c recombinante

#### Análisis de la expresión

Antes de inducir la expresión del péptido, fue necesario demostrar que el fragmento subclonado en el vector pGEX<sup>®</sup>-2T efectivamente se traduce en una proteína de fusión al inducir su expresión en bacterias *E. coli* BL21 DE3 transformadas. Para ello, se realizó una inducción piloto por 2 horas con 1 mM IPTG a 28°C de los 3 constructos obtenidos. Se utilizó como control positivo el vector vacío que sólo expresa GST. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó, se resuspendió en buffer STE y se sonicó. El lisado bacteriano se analizó por SDS-PAGE en un gel de acrilamida y se tiñó con azul de *coomassie*. Los resultados se muestran en la Figura 10, lo cual se verifica además por la detección de GST mediante Western Blot con un anticuerpo específico anti-GST (Figura 10B).





**Figura 10: Expresión piloto del péptido recombinante.** Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 DE3 con el vector vacío pGEX<sup>®</sup>-2T que expresa GST (mock) y con los constructos de los clones 1, 3 y 5 y se analizó la expresión en ausencia y presencia de IPTG 1 mM a 28°C por 3 horas. Las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer STE y luego sonicadas. El análisis de los lisados proteicos bacterianos se realizó por SDS-PAGE y con tinción de azul de *coomassie* (A). En B se muestra el Western Blot correspondiente utilizando un anticuero ANTI-GST.

Se observa que el vector vacío expresó GST (~26 kDa) y los clones 1, 3 y 5 expresaron un polipéptido de aproximadamente 34 kDa. Esto fue lo esperado, ya que un análisis *in silico* realizado en nuestro laboratorio muestra que los 100 aminoácidos que son codificados por la secuencia subclonada debieran aportar entre 8 y 10 kDa<sup>5</sup> a los 26 kDa de la proteína GST. Asimismo, se observa que el clon 5 fue el que presentó mayores niveles de expresión proteica, por lo que fue utilizado en los análisis posteriores. Cabe destacar, que se observaron bandas inespecíficas

<sup>5</sup>[http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)

en el ensayo de Western Blot que no corresponden a la detección de GST. Esto se confirmó observando que los mayores niveles de expresión se detectan justamente en los pesos moleculares de 34kDa y 26kDa correspondientes a GST-NECE-1c y GST respectivamente. En esta misma figura, se observa la expresión de una banda en el *Mock* en presencia y ausencia de IPTG, muy cercana a los 34kDa. Por lo que la alta expresión que se aprecia utilizando los clones 1, 3 y 5, corresponde en realidad a una doble banda que comprende a una proteína de la bacteria (unida inespecíficamente al anticuerpo) sumado al péptido recombinante, que poseen un similar patrón de migración electroforético.

### **Optimización de la expresión**

Para inducir la proteína de fusión a mayor escala fue necesario encontrar las condiciones óptimas de expresión, tanto de concentración del inductor IPTG como del tiempo de inducción. La temperatura utilizada fue de 28°C, la que previamente había sido estandarizada en nuestro laboratorio para los vectores pGEX® y es también recomendada en la literatura. Para ello, se indujo la proteína en distintas condiciones de tiempo y concentración de IPTG.

En primer lugar, se utilizó una concentración estándar de IPTG (1 mM) y se varió el tiempo de inducción entre 0 y 4 horas (Figura 11). Luego de estandarizar dicha condición en 3 horas, se procedió a variar la concentración de IPTG entre 0 y 4 mM (Figura 12).

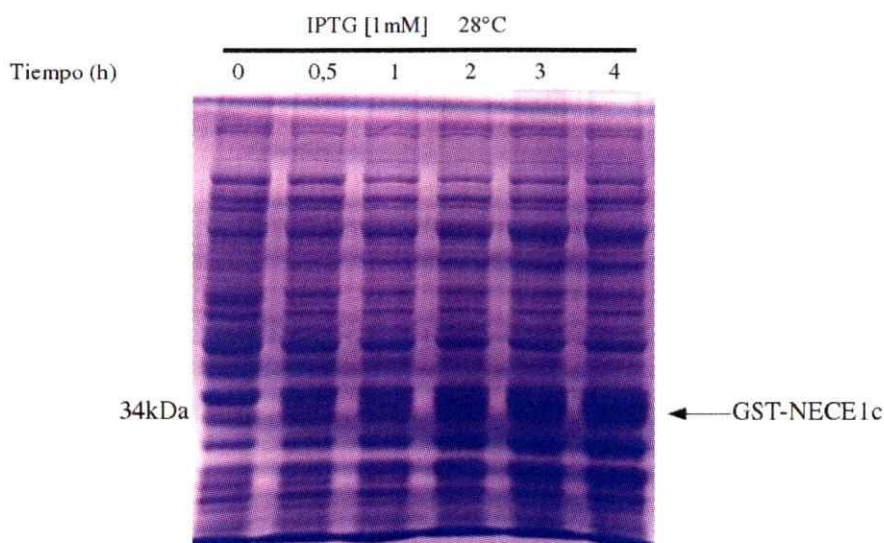


Figura 11: Estandarización del tiempo de inducción del péptido GST-NECE-1c. La inducción se realizó a 28°C a 1mM IPTG desde 0 a 4 horas. Se observa un aumento en los niveles del péptido recombinante a medida que aumenta el tiempo de inducción y se satura su expresión luego de 3 horas.

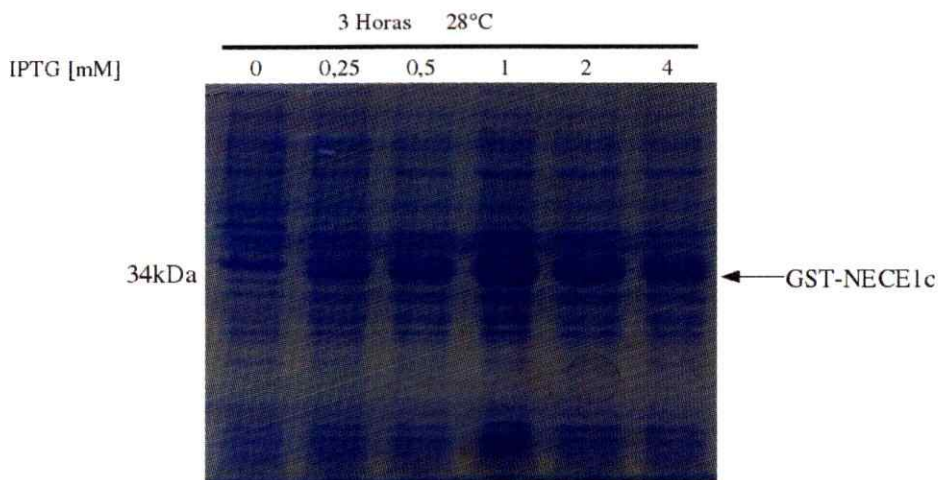


Figura 12: Estandarización de la concentración de IPTG. La inducción se realizó a 28°C por 3 horas en concentraciones crecientes de IPTG. Se observa un aumento en los niveles del péptido recombinante a medida que aumenta la concentración de inductor y se satura su expresión luego de 1mM.

De esta manera, se obtuvieron las condiciones óptimas de inducción que corresponden a **0,5 mM de IPTG y 3 horas**. La temperatura de **28°C** no fue modificada.

Estas condiciones fueron utilizadas para inducir la expresión del péptido recombinante a mayor escala.

### **3.5. Purificación del péptido GST-NECE-1c recombinante**

La expresión del péptido recombinante se indujo a mayor escala utilizando 500 mL de cultivo bacteriano con 0,5 mM IPTG a 28°C, el cual luego de 3 horas se centrifugó, se resuspendió en buffer STE y se sonicó.

Posteriormente, se centrifugó a máxima potencia para coleccionar la fase insoluble que contiene los cuerpos de inclusión<sup>6</sup>. Se trató con 6M cloruro de guanidinio, se dializó y la solución resultante se cargó en una columna de Glutación-Agarosa previamente empacada y equilibrada. Luego de siete lavados, el péptido recombinante se eluyó con glutación reducido 20 mM y se coleccionaron fracciones de 500 µl. El procedimiento se explica detalladamente en la sección de Materiales y Métodos y el resultado se muestra en la Figura 13.

---

<sup>6</sup>Esto se debe a que se encontraron mayores niveles de expresión en la fase insoluble en comparación con la fase soluble (datos no mostrados)

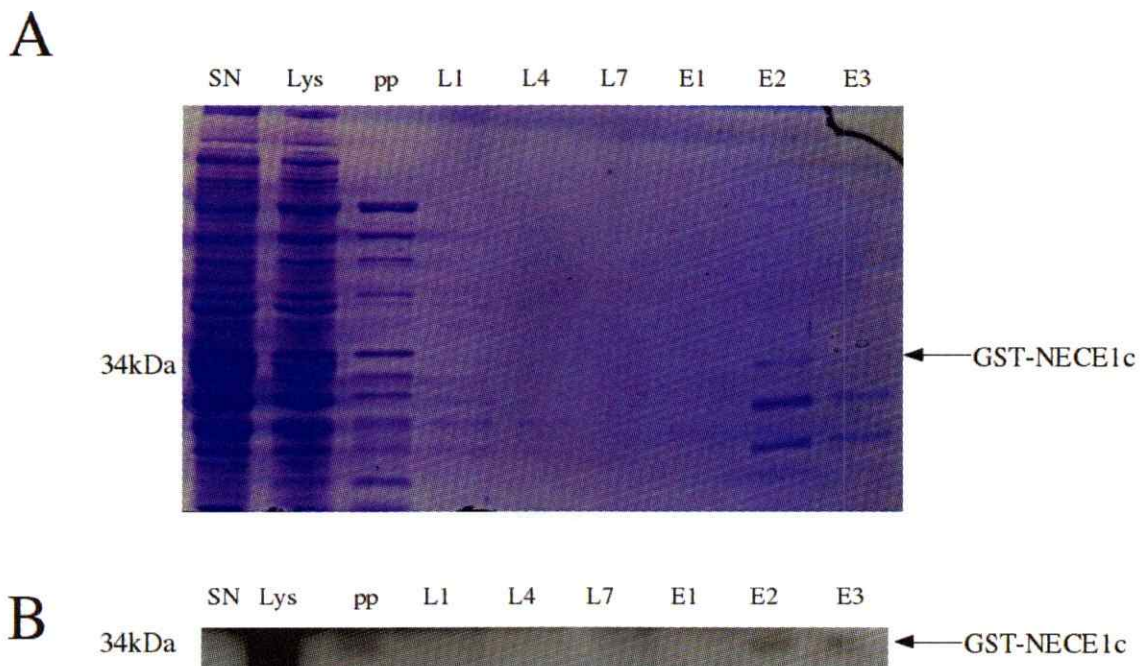


Figura 13: **Purificación del péptido GST-NECE-1c.** A. El péptido se indujo por 3 horas a 28°C utilizando 0,5 mM IPTG. Se obtuvo la fracción insoluble, se sometió al tratamiento con 6M cloruro de guanidinio, luego se diluyó y dializó. La solución se cargó en una columna de Glutación-Agarosa y se eluyó con glutatión reducido (20mM). Lys: lisado celular. SN: Sobrenadante, fracción soluble. pp: precipitado, fracción insoluble. L: lavados. E: Eluidos. En B se muestra el Western Blot correspondiente utilizando un anticupero ANTI-GST.

En el ensayo de SDS-PAGE se observan al menos tres bandas en E2 y E3, correspondientes a las proteínas purificadas en dichas fracciones. Por peso molecular, se concluye que la banda marcada con una flecha en E2, en los 34kDa, corresponde al péptido purificado. Esto se confirma por Western Blot, en donde se detecta específicamente el péptido con un anticupero ANTI-GST mayormente en E2 y en muy poca cantidad en E3. En este ensayo no se observaron detecciones inespecíficas del anticupero, por lo que se se concluye que la purificación se realizó con éxito<sup>7</sup>.

<sup>7</sup>La banda fue cortada digitalmente con el fin de mostrar solo la banda purificada

## 4. Discusión

La metodología que implica expresar un péptido recombinante requiere la formulación de un protocolo que contiene una gran cantidad de variables. En primer lugar, es necesario determinar de dónde se obtendrá la secuencia de DNA que se pretende clonar, con el fin de construir un protocolo de amplificación eficiente. En este trabajo, el cDNA de la secuencia N-terminal de la proteína humana ECE-1c se obtuvo a partir de un constructo de expresión eucarionte que contiene la secuencia codificante completa y su amplificación mediante PCR se realizó sin mayores inconvenientes.

Por otro lado, es necesario saber qué vector de expresión es el más adecuado y conocer los sitios de restricción disponibles en el mismo, además que no estén contenidos dentro del inserto a clonar y agregarlos en los partidores. La elección del vector también va a depender de otros factores, como por ejemplo el tamaño del fragmento que se busca expresar. En este caso, el vector escogido, pGEX<sup>®</sup> de aproximadamente 5kb, hizo totalmente factible clonar un fragmento de 300 pb, el cual quedó fusionado al extremo 3' del gen que codifica GST. Este método había sido probado en el laboratorio y con muy buenos resultados, lo que facilitó su estandarización.

Para escoger el sistema de expresión, fue preciso tener en cuenta para qué iba a ser utilizado el péptido, si se necesitaba denaturado o en forma nativa, libre o fusionado a una proteína, entre otros factores. En este caso, la purificación del péptido tuvo dos fines principales, el estudio de su potencial rol como sustrato de proteínas kinasas y el desarrollo de un anticuerpo específico que reconozca el extremo N-terminal de ECE-1c para su uso en ensayos tipo Western Blot, inmunocitoquímica o microscopía de inmunofluorescencia.

Otra opción hubiese sido escoger un vector que permitiera la purificación de un péptido con una cola de histidinas, sin embargo, se ha descrito que para péptidos pequeños (ie. aprox. 100 aa) es recomendable purificarlos fusionados a una proteína de mayor tamaño, como GST, favoreciendo la interacción con la columna de afinidad en la purificación y además facilitando el plegamiento del péptido pequeño. Sin embargo, si el péptido es muy pequeño (ie. aprox 50 aa), para hacer el anticuerpo sería necesario utilizar un adyuvante que favoreciera la respuesta inmune. Por otro lado, si se utiliza la proteína completa, como es de membrana, se favorecería la formación de cuerpos de inclusión por un alto número de aminoácidos hidrofóbicos y el clonamiento sería más difícil por la gran cantidad de nucleótidos comprendidos. Otro motivo por el cual se escogió este sistema de expresión, es que en el extremo 3' de GST existe una secuencia que codifica un sitio de corte peptídico de TROMBINA, lo que hace factible liberar al péptido si se requiere separado de GST.

Una vez escogido el sistema de expresión hubo que considerar cómo se iba a clonar la secuencia dentro del vector. Si se realizaba la digestión directamente desde el producto de PCR, no se tendría la certeza si la enzima de restricción había cortado los sitios escogidos, ya que no se podría comprobar. Asimismo, la enzima de restricción tendría un espacio reducido para posicionarse en el DNA, interactuar y catalizar la reacción de corte. Para evitar este problema, se utilizó un vector transportador, en este caso pGEM<sup>®</sup>-T-easy, que tiene la ventaja de permitir el subclonamiento directamente de un producto de PCR, ya que contiene timinas libres en sus extremos que se ligan a las adeninas libres que deja la Taq polimerasa en los extremos del amplicón. Obteniendo este constructo, se facilita la digestión con las respectivas enzimas y se asegura la obtención de un fragmento de DNA que contenga en sus extremos los sitios de corte requeridos.

Una vez seleccionado un clon positivo que contuviera el fragmento, se procedió con la digestión y purificación del inserto, para posteriormente realizar la ligación en el vector de expresión. En este paso, un factor a considerar fue la eficiencia de la ligación, por lo que se recomienda realizar los respectivos controles, por ejemplo la ligación del vector sin inserto para evaluar la tasa de religamiento, lo que previamente se reduce con la desfosforilación del vector vacío. Esto se debe a que la ligasa del fago T4 requiere de al menos un extremo fosforilado (vector y/o inserto) para catalizar la reacción de ligación. Por lo tanto, si no se desforforila el vector se puede favorecer su recircularización aunque tenga extremos cohesivos distintos.

Un punto importante de discutir es sobre las células que se utilizaron para amplificar y obtener los constructos y para expresar el péptido recombinante. En primer lugar, los vectores escogidos tanto transportador como de expresión, tienen un origen de replicación bacteriano, por lo que se utilizó *E. coli*. Específicamente, para el clonamiento se escogió la cepa DH5 $\alpha$  y para la expresión, BL21 DE3. Ambas cepas han sido ampliamente utilizadas para estos fines y la literatura aporta muchos datos que apoyan su utilización. En el caso de la cepa DH5 $\alpha$ , básicamente tiene una tasa de recombinación génica reducida, siendo especial para clonamientos y amplificación de constructos, evitando así la generación de mutaciones. Por otro lado, la cepa BL21 DE3 ha sido catalogada como una de las cepas más apropiadas para la expresión de un péptido, ya que su actividad proteasa se encuentra disminuida. Si bien existen otras cepas de *E. coli* con semejantes características, los fabricantes de los vectores utilizados recomiendan DH5 $\alpha$  y BL21 DE3 para un rendimiento apropiado de amplificación plasmidial y expresión proteica, respectivamente.

La estandarización de la expresión del péptido recombinante resultó en una



alta expresión proteica que concluyó con la saturación del sistema y favoreció la formación de cuerpos de inclusión. Dicho resultado se ve reflejado en los altos niveles proteicos del péptido de fusión encontrados en la fracción insoluble. En principio, este resultado complicó el proceso de purificación, ya que la columna de Glutación-Agarosa funciona en base a la unión por afinidad de sustrato a la enzima GST acoplada al péptido recombinante y se requiere de esta enzima en su forma nativa y con su sitio activo libre y correctamente plegado. Al formarse los cuerpos de inclusión se produce un aglutinamiento del péptido sobreexpresado. Estos agregados no necesariamente corresponden al péptido en su forma nativa, por lo que su purificación por afinidad en la columna se desfavorece notablemente.

En este escenario, es posible plantearse al menos dos formas de resolver dicho problema. En primer lugar, se puede estandarizar nuevamente la expresión en una cepa distinta con capacidad de expresión menor, como BL21 pLys o DH5 $\alpha$ . Asimismo, se puede variar la temperatura, tiempo de inducción y concentración de inductor. De esta forma, es posible disminuir los niveles de expresión, favoreciendo la forma soluble de la proteína y disminuyendo la formación de agregados proteicos. Para esto sería necesario analizar las fases solubles e insolubles de cada una de las condiciones. La gran ventaja de este proceso es que se puede purificar directamente desde la fase soluble del cultivo bacteriano luego de inducir la expresión, ya que la proteína en su forma soluble se presenta en su estado nativo. Sin embargo, la desventaja radica en los bajos niveles proteicos que generalmente se obtienen al reducir la formación de cuerpos de inclusión.

Por otro lado, existe la opción de saturar el sistema asegurando una alta expresión recombinante, que fue lo que finalmente se hizo en este trabajo. La desventaja es que se requiere disolver los cuerpos de inclusión con un agente caotrópico y luego renaturar la proteína mediante diálisis. Cabe destacar que con este méto-

do, solo se recupera el PÉPTIDO-GST que haya logrado un correcto plegamiento, al menos del sitio de unión a glutatión. Una desventaja de este método tiene relación con la pérdida de muestra al denaturar y luego renaturar. Sin embargo, como se parte de un sistema sobresaturado, la pérdida de muestra es marginal en relación a la cantidad de proteína recuperada luego de la purificación.

Finalmente, como proyecciones de este Seminario de Título, se podría mencionar que en un primer paso debiese realizarse un ensayo kinasa con la proteína CK2. Esto sería totalmente factible utilizando la fracción E2 del ensayo de purificación, ya que si bien no se obtuvo un péptido recombinante totalmente purificado, no se ha descrito que CK2 fosforile a proteínas bacterianas ni a GST. Si se comprueba que esta enzima efectivamente fosforila al extremo N-terminal de la ECE-1c, se podría establecer una relación mucho más directa con el papel de esta metaloproteasa en el desarrollo tumoral. Por ejemplo, al ser fosforilada por CK2, ECE-1c podría aumentar su actividad catalítica o favorecer su localización en la membrana plasmática, lo que tendría relación directa con la mayor producción de ET-1 y, por lo tanto, dadas las múltiples funciones de este péptido en la viabilidad de las células, observar un incremento de la tasa proliferativa. Se sabe que CK2 provoca efectos similares con otras proteínas, por ejemplo, al fosforilar a la kinasa AKT se promueve la estabilización de  $\beta$ -CATENINA, aumentando la resistencia a la apoptosis [PONCE Y COL. 2011]. Es posible entonces que esté sucediendo algo similar con ECE-1c. Además se ha descrito que existen otras kinasas que fosforilan a ECE-1 y que aumentan su actividad catalítica y/o cambian su localización subcelular [SMITH Y COL. 2006; KURUPPU Y COL. 2010].

Tal como se mencionó anteriormente, es de suma importancia obtener un anticuerpo que permita detectar específicamente a la isoforma c de ECE-1. Para esto

sería necesario utilizar la fracción E2 y no la E3, ya que fue en la que se encontraron mayores niveles del péptido recombinante. Si bien la proteína no se encuentra en un estado de alta pureza, es factible seleccionar los anticuerpos específicos, por ejemplo, sobreexpresando ECE-1c en una célula eucarionte y detectar qué anticuerpos la detectan y cuáles no. Estos últimos, seguramente corresponderían a anticuerpos en contra de las proteínas que fueron purificadas de forma inespecífica. Tener este anticuerpo es crucial, ya que se sabe que los niveles de mensajero de *Ece-1c* se encuentran aumentados en células tumorales y en modelos de activación de la ruta WNT/ $\beta$ -CATENINA, pero no se sabe qué sucede con los niveles de proteína. Esto es muy importante, ya que eventualmente dicha isoforma puede tener un papel clave en el desarrollo tumoral, como productora de ET-1 o a través de un mecanismo distinto e independiente de ET-1.

## 5. Conclusiones

El objetivo general de este trabajo era purificar el péptido recombinante para posteriormente ser utilizado en diversas técnicas de biología celular y molecular, dentro de una línea de investigación que pretende comprender la biología del cáncer, específicamente el de colon. Finalmente, se obtuvo un péptido relativamente puro, solo con algunas bandas inespecíficas, pero como ya se mencionó no afectarían de gran manera ni en la realización del ensayo kinasa, ni en la producción del anticuerpo. Según esto, además de considerar que el objetivo se cumplió, este Seminario de Título se presenta como un trabajo con importantes proyecciones a futuro.

## 6. Referencias

Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* **12**(5):226-30

Allende JE, Allende CC. (1995). Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB J.* **9**(5):313-23.

Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G, Taylor I. (2001). Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer.* **85**(11):1759-63.

Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell.* **103**(2):311-20.

Awano S, Dawson LA, Hunter AR, Turner AJ, Usmani BA. (2006). Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: specific siRNA targeting of ECE-1 blocks cell proliferation. *Int J Cancer.* **118**(7):1645-52.

Guerra B, Niefind K, Pinna LA, Schomburg D, Issinger OG. (1998). Expression, purification and crystallization of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **54**(Pt 1):143-5.

Guerra B, Issinger OG. (1999). Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis.* **20**(2):391-408.

Guerra B, Issinger OG. (2008). Protein kinase CK2 in human diseases. *Curr Med Chem.* **5**(19):1870-86.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. **281**(5382):1509-12.

Jafri F, Ergul A. (2003). Nuclear localization of endothelin-converting enzyme-1: subisoform specificity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **23**(12):2192-6.

Kim TH, Xiong H, Zhang Z, Ren B. (2005).  $\beta$ -Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene*. **24**(4):597-604.

Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Smith AI. (2010. )Role of Protein Kinase C in Endothelin Converting Enzyme-1 trafficking and shedding from endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **398**(2):173-7.

Lambert LA, Whiteside AR, Turner AJ, Usmani BA. (2009). Isoforms of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) have opposing effects on prostate cancer cell invasion. *Br J Cancer*. **99**(7):1114-20.

MacLeod KJ, Fuller RS, Scholten JD, Ahn K. (2001). Conserved cysteine and tryptophan residues of the endothelin-converting enzyme-1 CXAW motif are critical for protein maturation and enzyme activity. *J Biol Chem*. **276**(33):30608-14.

MacLeod KJ, Husain RD, Gage DA, Ahn K. (2002). Constitutive phosphorylation of human endothelin-converting enzyme-1 isoforms. *J Biol Chem*. **277**(48):46355-63.

Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, Kröger B, Schmidt M, Menzel S, Bohne-meier H, Paul M. Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression

of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. (1997). *J Mol Med (Berl)*. **75**(7):512-21.

Ponce DP, Yefi R, Cabello P, Maturana JL, Niechi I, Silva E, Galindo M, Antonelli M, Marcelain K, Armisen R, Tapia JC. CK2 functionally interacts with AKT/PKB to promote the  $\beta$ -catenin-dependent expression of survivin and enhance cell survival. (2011). *Mol Cell Biochem*. **356**(1-2):127-32.

Ponce DP, Maturana JL, Cabello P, Yefi R, Niechi I, Silva E, Armisen R, Galindo M, Antonelli M, Tapia JC. (2011). Phosphorylation of AKT/PKB by CK2 is necessary for the AKT-dependent up-regulation of  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *J Cell Physiol*. **226**(7):1953-9. doi: 10.1002/jcp.22527.

Schulz H, Dale GE, Karimi-Nejad Y, Oefner C. (2009). Structure of human endothelin-converting enzyme I complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol*. **385**(1):178-87.

Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM. (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J*. **328** (3):871-7.

Smollich M, Wülfing P. (2007). The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies. *Curr Vasc Pharmacol*. **5**(3):239-48.

Smollich M, Götte M, Kersting C, Fischgräbe J, Kiesel L, Wülfing P. (2008). Selective ETAR antagonist atrasentan inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat*. **108**(2):175-82.

Smith AI, Lew RA, Thomas WG, Tochon-Danguy N. (2006). Protein Kinase C Regulates the Cell Surface Activity of Endothelin-Converting Enzyme-1. *Int J Pept Res Ther.* **12**(3):291-295.

Song DH, Sussman DJ, Seldin DC. (2000). Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* **275**(31):23790-7.

Turner AJ, Tanzawa K. (1997). Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* **11**(5):355-64.

Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem.* **264**(2):341-9.

Valero E, De Bonis S, Filhol O, Wade RH, Langowski J, Chambaz EM, Cochet C. (1995). Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J Biol Chem.* **270**(14):8345-52.

Widelitz R. Growth Factors. (2005). Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors.* **23**(2):111-6.