



# Expresión del gen RARRES1

**Autores:** Daniel Castrillo Vivancos

Alicia Claramunt Ortega

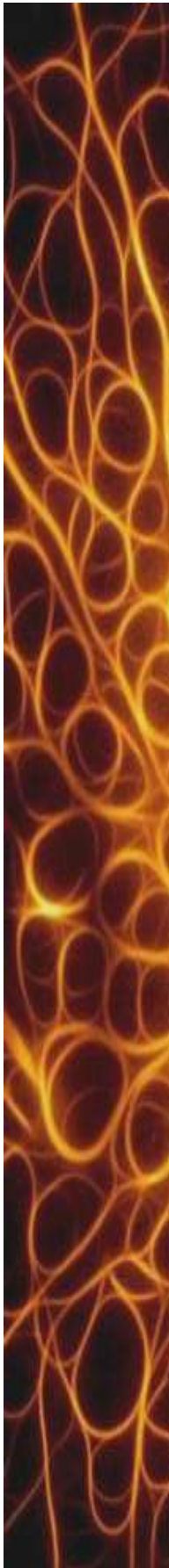
Glòria Macià Muñoz

**Tutora:** Mireia Panadés

**Centro educativo:** INS Escola Industrial

**Nivel:** 2º de Bachillerato

**Fecha de entrega:** 4 de octubre del 2011



**"LA CIENCIA SIEMPRE SERÁ UNA BÚSQUEDA, NUNCA UN DESCUBRIMIENTO REAL.**

**ES UN VIAJE, NUNCA UNA LLEGADA."**

**KARL POPPER**

# ÍNDICE

	Página
1. MOTIVACIÓN	1
2. AGRADECIMIENTOS	1
3. MARCO TEÓRICO	2
4. OBJETIVOS GENERALES	5
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5.1 Experimento 1	6
5.2 Experimento 2	7
5.3 Experimento 3	8
6. HIPÓTESIS	8
7. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	9
8. RESULTADOS	11
9. DISCUSIÓN	14
9.1 Experimento 1	14
9.2 Experimento 2	15
9.3 Experimento 3	16
9.4 Análisis comparativo	17
10. CONCLUSIONES	18
11. VALORACIÓN PERSONAL	18
12. BIBLIOGRAFIA	19
13. ANEXOS	21
13.1 Los vectores y la transformación	21
13.2 La transfección	22
13.3 Protocolos experimentales	24
* BREVE INFORME DEL TRABAJO “EXPRESION DEL GEN RARRES1”	38

*Este trabajo de investigación ha sido realizado en el marco del trabajo de investigación obligatorio en Cataluña para la obtención del título del Bachillerato.*

## 1. MOTIVACIÓN

Nuestro grupo siempre tuvo muy claro que el trabajo a realizar estaría relacionado con la biología. En primer lugar, porque ésta nos encanta y nos gustaría dedicarnos a ella y, en segundo lugar, porque teníamos un gran interés en aprovechar esta oportunidad para entrar en contacto con el trabajo de laboratorio.

Por estos motivos, nos llamó la atención el proyecto ARGÓ —promovido por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)— que ofrecía diferentes estancias de biología entre las que nos atrajo una titulada "Proteínas para la clonación" del departamento de Ingeniería de Proteínas y Enzimología, de la unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB). Hicimos la solicitud y tuvimos la suerte de que uno de los componentes de nuestro grupo, Aícia Claramunt, fue seleccionada y así empezamos, animados, el trabajo de investigación en un tema que respondía tanto a nuestras inquietudes por la biotecnología como por la bioquímica.

## 2. AGRADECIMIENTOS

Habiendo realizado este trabajo de investigación quisiéramos dar las gracias al proyecto Argó de la Universidad Autónoma de Barcelona porque nos ha dado la oportunidad de entrar en contacto con el mundo de la investigación científica.

También queremos agradecer el interés y dedicación de la doctora Júlia Lorenzo, principal responsable de nuestra estancia de investigación, y de todo el departamento de Ingeniería de Proteínas y Enzimología por haber estado siempre dispuesto a echarnos una mano. Vaya también nuestro agradecimiento a la biotecnóloga Olívia Tort, que ha sido indispensable en la realización de nuestra investigación, ayudándonos en todo momento tanto en el laboratorio como posteriormente, en la redacción de este trabajo.

Por último, nos gustaría dar las gracias a la bióloga Mireia Panadés, tutora de nuestro trabajo de investigación, por su incondicional apoyo, atención, orientación, motivación... y por habernos cedido el 200% de su tiempo libre. Y también, a los familiares y amigos, que nos han acompañado durante este proceso con su apoyo.

### 3. MARCO TEÓRICO

La **célula** es la unidad morfológica y funcional de todos los seres vivos.<sup>\*[1] [13]</sup> Según si presentan núcleo definido o no las clasificamos en eucariotas — cuando sí lo presentan— y procariotas —cuando no lo presentan—.

Las **bacterias** son células procariotas y por tanto son un tipo de organismos unicelulares caracterizados por no disponer de núcleo celular diferenciado, es decir, que su material genético no se encuentra en el núcleo sino en el citoplasma, en una región llamada nucleoide. Aunque existen muchas especies diferentes de bacterias, en este trabajo de investigación se ha escogido la bacteria ***Escherichia coli*** (*E. coli*), ya que es tan manipulable que se considera el organismo modelo de laboratorio y por tanto es el más estudiado por la comunidad científica.

La *E. coli* es una enterobacteria saprófita que vive en los intestinos de los animales, incluidos los humanos. Presenta una gran variedad de cepas —pequeñas diferencias genéticas de una misma especie— la mayoría de ellas inofensivas como la BL21, que se utiliza en este trabajo, pero algunas de extremadamente patógenas.<sup>[2] [15]</sup>

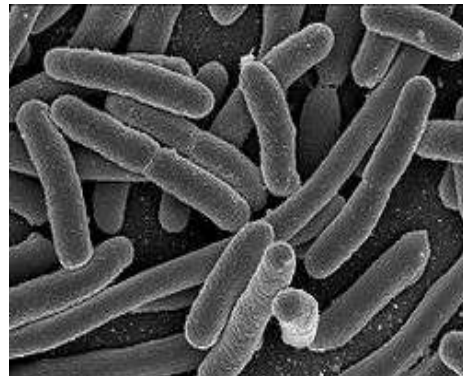


Figura 1: *E. coli* <sup>[2]</sup>

La información de las células se encuentra en los **genes**, regiones concretas del **ADN** (*Ácido Desoxirribonucleico*) que los organismos heredamos, transcribimos, traducimos y convertimos en proteínas, las cuales realizan un gran número de funciones en nuestro organismo.<sup>[3] [11]</sup>

Las **proteínas** son polímeros formados por una o más cadenas polipeptídicas —secuencias de aminoácidos—

[4] [12]

Los **aminoácidos** (aa) son moléculas que presentan, siempre un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo ácido (-COOH). Todos los aa tienen una parte común constituida por el grupo ácido, el grupo amino y el hidrógeno y otra variable constituida por el radical.

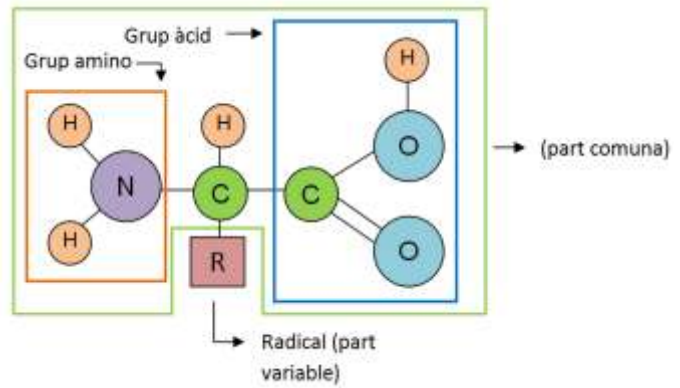


Figura 2: esquema general de un aa, de izquierda a derecha: grupo amino, grupo ácido, radical (parte variable) y la parte común.

En función de cuál sea este radical distinguimos 20 tipos diferentes de aa primarios, 10 de los cuales —los llamados aa esenciales— sólo pueden ser obtenidos a través de la dieta. [5]

Gracias al **enlace peptídico** —un enlace covalente que tiene lugar entre el grupo carboxílico del primer aa y el grupo amino del segundo—, los aminoácidos se unen unos a otros formando unas cadenas que llamamos péptidos. En la formación del enlace peptídico, también se desprende una molécula de agua tal como muestra el siguiente esquema:

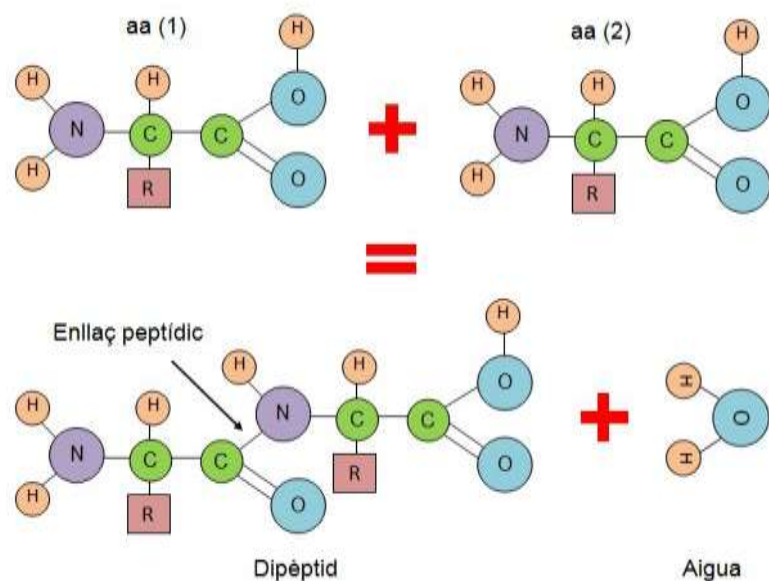


Figura 3: unión de aa. De izquierda a derecha: enlace peptídico, dipéptido y agua.

La secuencia de aa de la proteína es su **estructura primaria** y está determinada por la secuencia de nucleótidos del ADN. Las proteínas, se diferencian unas de otras por el orden, el número y el tipo de aa que componen su estructura primaria.

Según la disposición en el espacio de la estructura primaria, encontramos tres tipos de **estructura secundaria**: la hélice alfa —si la cadena polipeptídica se enrolla helicoidalmente—, la lámina beta —si se pliega en forma de zig-zag— y la hélice de colágeno —si debido a la abundancia de los aa prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina no se puede formar la hélice alfa y, por tanto, se forma una hélice mucho más extendida que se llama hélice de colágeno—.

A su vez, la disposición en el espacio de la estructura secundaria determina su **estructura terciaria** la que está íntimamente relacionada con la función que llevará a cabo la proteína. Según su estructura terciaria las proteínas pueden ser globulares —si la estructura secundaria se pliega sobre sí misma— o filamentosas —si se mantiene la estructura secundaria—.

Por último, la unión de dos o más cadenas polipeptídicas —también llamadas protómeros— iguales o distintas mediante enlaces débiles entre radicales enfrentados y / o puentes disulfuro da lugar a la **estructura cuaternaria**.<sup>[6][14]</sup>

A pesar de que existen un gran número de proteínas, este trabajo se centra en **RARRES1**, la proteína de membrana para la que codifica el gen retinoico *Acid Receptor Responder 1* —también llamado RARRES1—.<sup>[16][17][18]</sup>

El gen, también conocido por *tazarotene-induced gene 1*, fue primeramente identificado como un gen responsable de la producción de ácido retinoico en la piel. Sin embargo, investigaciones recientes han descubierto que su proteína forma parte de un complejo proteico involucrado en la regulación de la función de los microtúbulos —publicaciones actuales muestran que RARRES1 interactúa con la carboxipeptidasa citoplasmática 2 (CCP2) para regular el ciclo de la tubulina—.<sup>[19][20]</sup>

Los **microtúbulos** son los integrantes del huso acromático de la célula, una red proteica que organiza los procesos de división celular —mitosis y meiosis—, tan indispensables en los organismos. Sin embargo, un descontrol en estos

procesos podría dar lugar a muchas mitosis sucesivas y terminar desencadenando un **cáncer**.<sup>[7]</sup>

Ahora bien, éste se podría evitar gracias a RARRES1, el cual detendría las mitosis alterando la afinidad de los microtúbulos por las proteínas a que se unen y, consecuentemente, alterando el transporte de moléculas a través de los microtúbulos. Por este motivo, se cree que, en un futuro próximo, RARRES1 podría ser un importante **supresor tumoral**.<sup>[11]</sup>

Sin embargo, actualmente el gen y la proteína RARRES1 son bastante desconocidos. Por ello, en este trabajo se propone como objetivo la expresión de gen RARRES1, ya que ésta permitiría a los expertos conocer muchos más aspectos sobre la estructura y las funciones de la proteína.

**En resumen pues, esta investigación podría ser el inicio de un largo proceso que ayudaría a frenar el desarrollo de un cáncer.**

#### 4. OBJETIVOS GENERALES

- Expresar el gen RARRES1 y detectar la proteína de forma soluble, es decir, bien plegada y funcional, en el citosol.
- Analizar e interpretar correctamente los resultados a partir de su visualización.
- Seguir adecuadamente, durante un período de 3 semanas, todos los protocolos del laboratorio del departamento de Ingeniería de Proteínas y Enzimología (unidad de Proteómica del IBB) necesarios para realizar los tres experimentos.
- Aprender muchos conceptos y técnicas nuevas utilizadas en un laboratorio de investigación biomédica y profundizar en el ámbito biológico, sobre todo, en el relacionado con las proteínas.



## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 5.1 EXPERIMENTO 1

Expresión de pTriEx-6 – RARRES1 en *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 y posterior análisis.

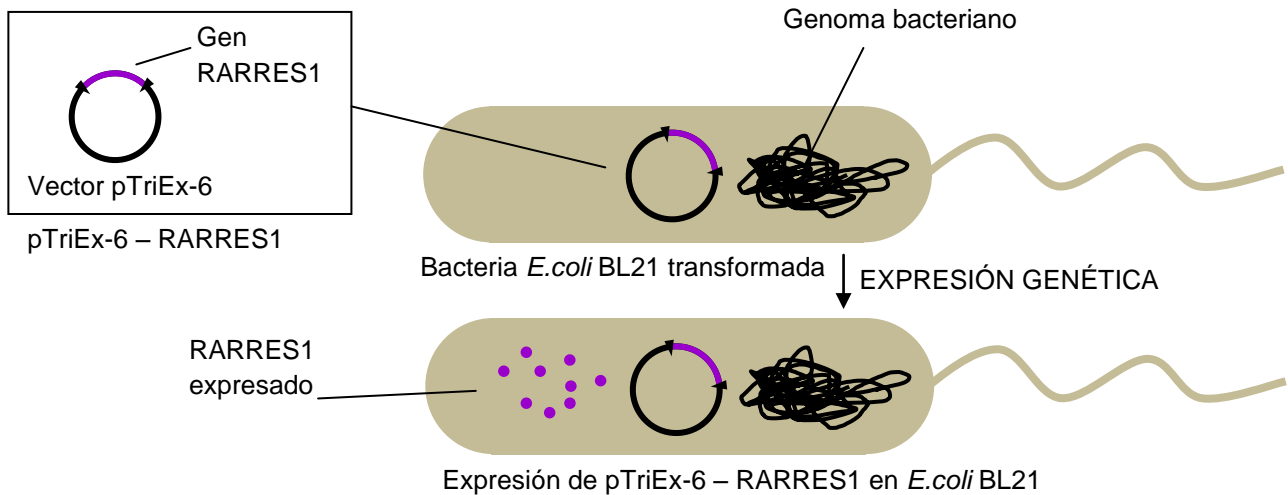


Figura 4: expresión de pTriEx-6 – RARRES1 en *E. coli* BL21

#### Antecedentes:

Glicerinado de *E. coli* BL21 previamente transformado con pTriEx-6 – RARRES1.

#### Objetivos:

- Expresar el gen RARRES1 variando los parámetros: tiempo, temperatura, [IPTG] y dosis de IPTG.
- Analizar la expresión del gen: si se expresa RARRES1 o no y, en el caso de que lo haga, si se detecta en el citosol (fracción intracelular soluble, FIS), o en cuerpos de inclusión (fracción insoluble o *pellet* de membranas).
- Comparar los resultados obtenidos con los de los demás experimentos.

## 5.2 EXPERIMENTO 2

Transformación y expresión de pGAT2 – dominio RARRES1 en *E.coli* BL21 (esquema 2) y posterior análisis.

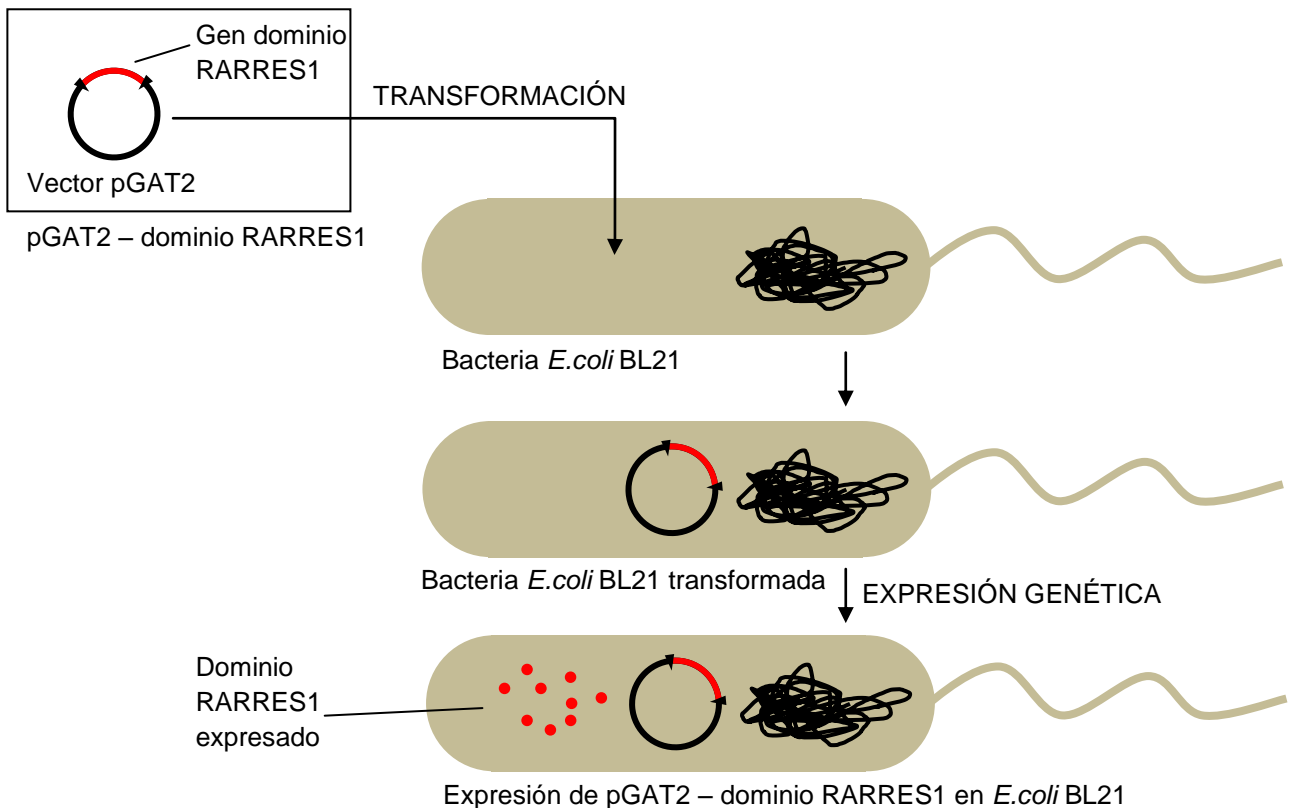


Figura 5: transformación y expresión de pGAT2 – dominio RARRES1 en *E. coli* BL21.

### Antecedentes:

Vector pGAT2 – dominio RARRES1 y la cepa de *E. coli* BL21 competente (que admite ADN extranjero).

### Objetivos:

- Transformar el vector pGAT2 – dominio RARRES1 en la cepa de *E. coli* BL21.
- Expresar el gen del dominio soluble de RARRES1, sin el segmento transmembrana y homólogo a la proteína LATEXINA, variando los parámetros: tiempo, temperatura, [IPTG] y dosis de IPTG.
- Analizar la expresión del gen: si se expresa RARRES1 o no y, en el caso de que lo haga, si se detecta en el citosol (FIS), o en cuerpos de inclusión (*pellet* de membranas).
- Comparar los resultados obtenidos con los de los demás experimentos.

### 5.3 EXPERIMENTO 3

Expresión de pTriEx-6 – RARRES1 en HEK 293 F (célula mamífero).

#### **Antecedentes:**

2 *pellet* procedentes de 10 mL de cultivo de HEK 293 F en suspensión. Estos son:

- *Pellet* de células HEK 293 F transfectadas.
- *Pellet* de células HEK 293 F no transfectadas o *pellet* de control.

#### **Objetivos:**

- Analizar la expresión del gen: si se expresa RARRES1 o no y, en el caso de que lo haga, si se detecta en el citosol (FIS), o en cuerpos de inclusión (*pellet* de membranas).
- Comparar los resultados obtenidos con los de los demás experimentos.

## 6. HIPÓTESIS

- En el experimento 1, que trata de expresar el gen RARRES1, es posible que las bacterias no reconozcan la proteína recombinante RARRES1 y la agreguen en cuerpos de inclusión. Esto puede pasar porque RARRES1 es una proteína de membrana propia de las células de mamífero y las bacterias no acostumbran a sintetizarlas correctamente enteras (con el dominio de membrana incluido).
- El experimento 2 busca expresar el gen del dominio soluble de RARRES1. Si el proceso de transformación sale bien, seguramente, las bacterias podrán sintetizar correctamente el dominio soluble de la proteína recombinante RARRES1 en el citosol.
- El experimento 3 también intenta expresar el gen RARRES1 y probablemente las células HEK 293 F transfectadas sobreexpresarán el gen de la proteína recombinante RARRES1 de forma soluble en el citosol, ya que RARRES1 es una proteína endógena de las células de mamífero.

## 7. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

FECHA	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	EXPERIMENTO 3
	Expresión de pTriEx-6 – RARRES1 en <i>E.coli</i> BL21 i posterior análisis	Transformación y expresión de pGAT2 – dominio RARRES1 en <i>E.coli</i> BL21 i posterior análisis	Expresión de pTriEx-6 – RARRES1 en HEK 293 F (células de mamífero) y posterior análisis
28.6.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del inductor IPTG</li> </ul>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del preinóculo.</li> </ul>		
29.6.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del inóculo.</li> <li>• Expresión del gen RARRES1 variando diferentes parámetros.</li> <li>• Recogida de muestras <math>t_0 = 0</math> h</li> </ul>		
30.6.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recogida de muestras <math>t_1 = 21</math> h</li> <li>• Segunda dosis de IPTG.</li> <li>• Recogida de muestras <math>t_2 = 23</math> h</li> <li>• Recogida de muestras <math>t_3 = 28</math> h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transformación de pGAT2 – dominio RARRES1 en <i>E.coli</i> BL21</li> <li>• Siembra del cultivo.</li> </ul>	
1.7.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recogida de muestras <math>t_4 = 45</math> h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guardar la placa de petri con el cultivo a la nevera (4 °C).</li> </ul>	
3.7.11		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del preinóculo.</li> </ul>	

Expresión del gen RARRES1

4.7.11		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del inóculo.</li> <li>• Expresión del gen del dominio soluble de RARRES1 variando diferentes parámetros.</li> </ul> <p>Proceso sin éxito.</p>	
5.7.11		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetir proceso día anterior con éxito.</li> <li>• Recogida de muestras <math>t_0 = 0</math> h</li> <li>• Recogida de muestras <math>t_1 = 3</math> h 15 min.</li> <li>• Segunda dosis de IPTG.</li> </ul>	
6.7.11		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recogida de muestras <math>t_2 = 16</math> h 15 min.</li> <li>• Recogida de muestras <math>t_3 = 19</math> h 15 min.</li> </ul>	
7.7.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisis de las células de las muestras de cultivo de <i>E.coli</i>.</li> </ul>		
11.7.11		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electroforesis discontinua en presencia de SDS.</li> </ul>	
12.7.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electroforesis discontinua en presencia de SDS.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisis de las células de las muestras de cultivo de HEK 293 F</li> <li>• Electroforesis discontinua en presencia de SDS.</li> </ul>
13.7.11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Western Blot.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tinción con azul de Coomassie.</li> <li>• Western Blot.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Western Blot.</li> </ul>

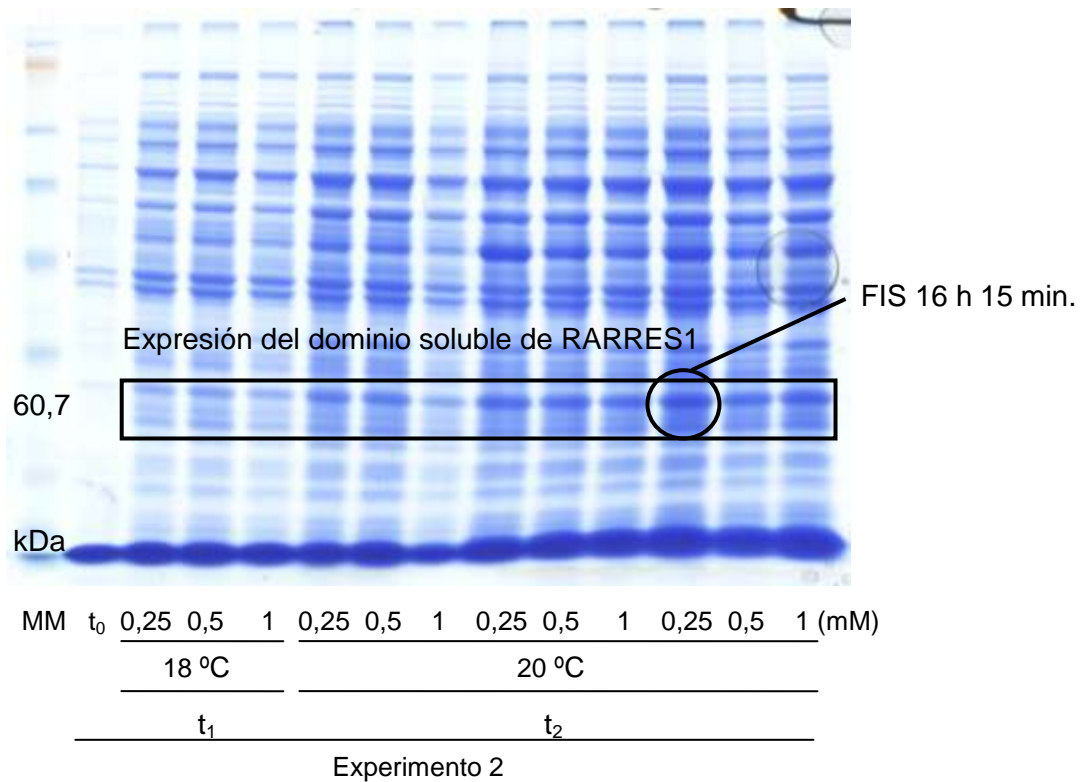
## 8. RESULTADOS

Tablas de distribución de las muestras seleccionadas en los bolsillos de los 5 geles SDS-PAGE y posterior visualización mediante:

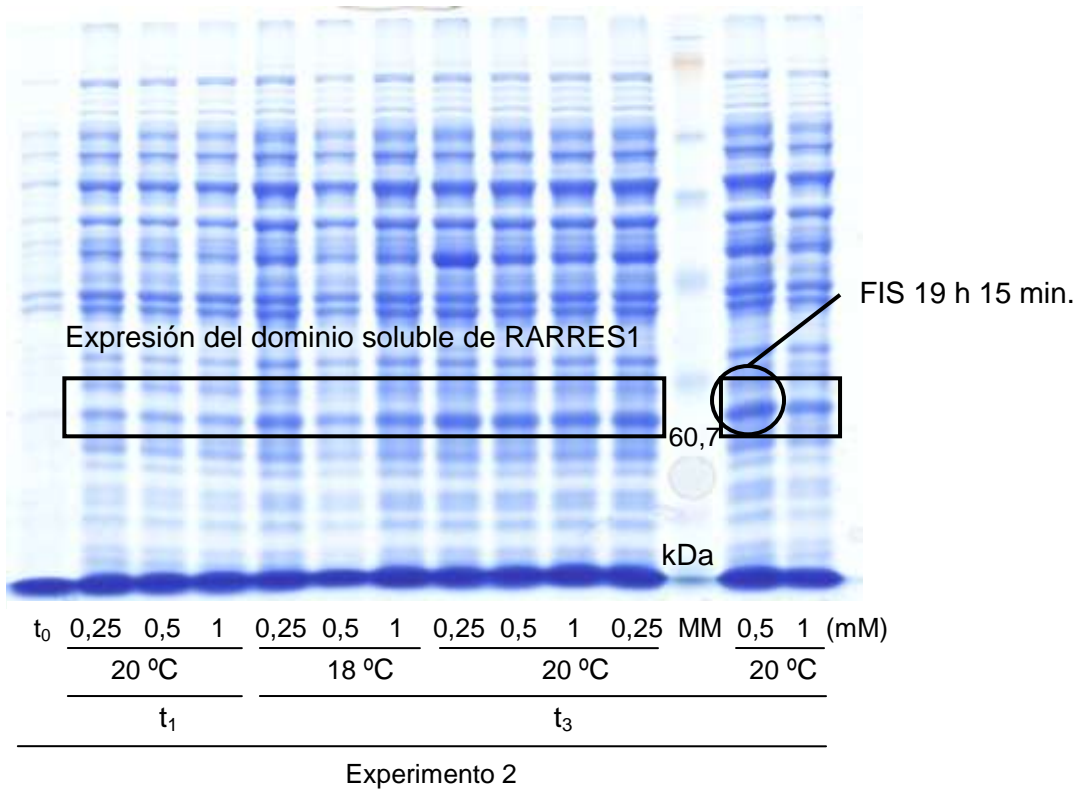
- La tinción de 2 geles con azul de Coomassie.
- El WB de 3 geles.

### 8.1 VISUALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS MEDIANTE LA TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

- Tinción 1:

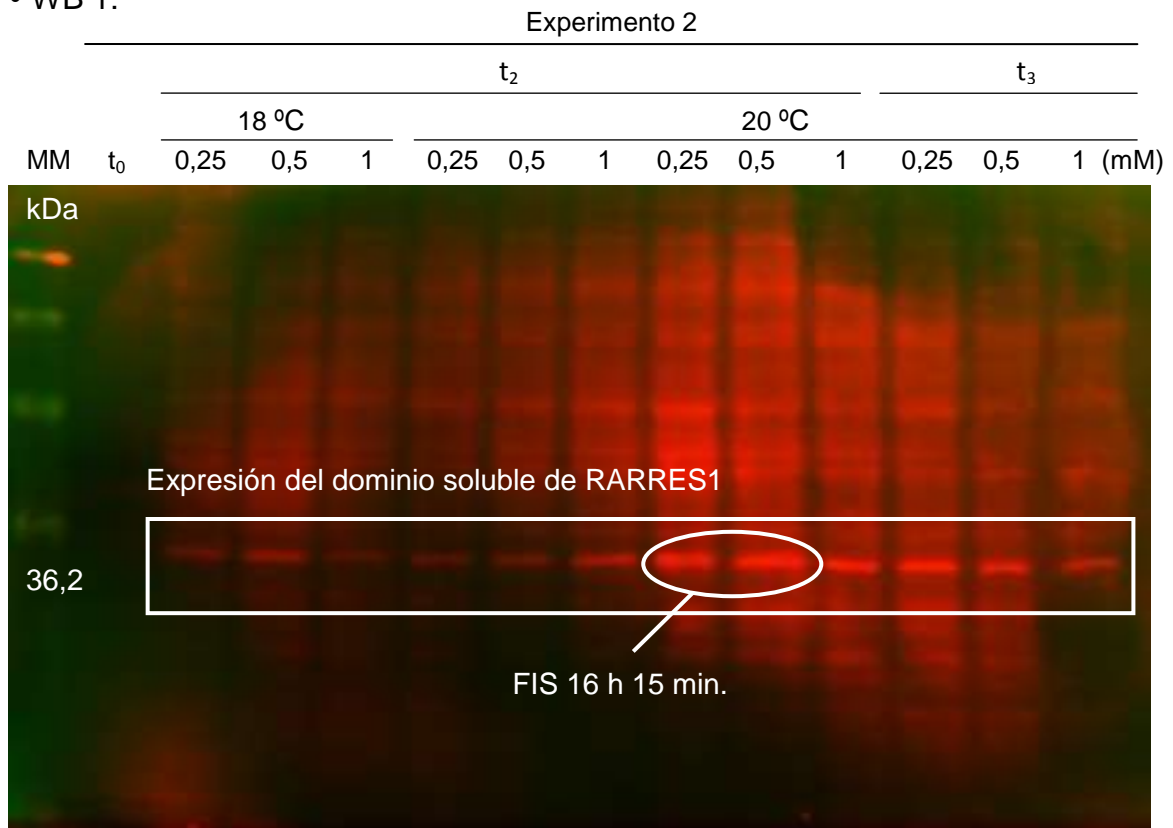


• Tinción 2:

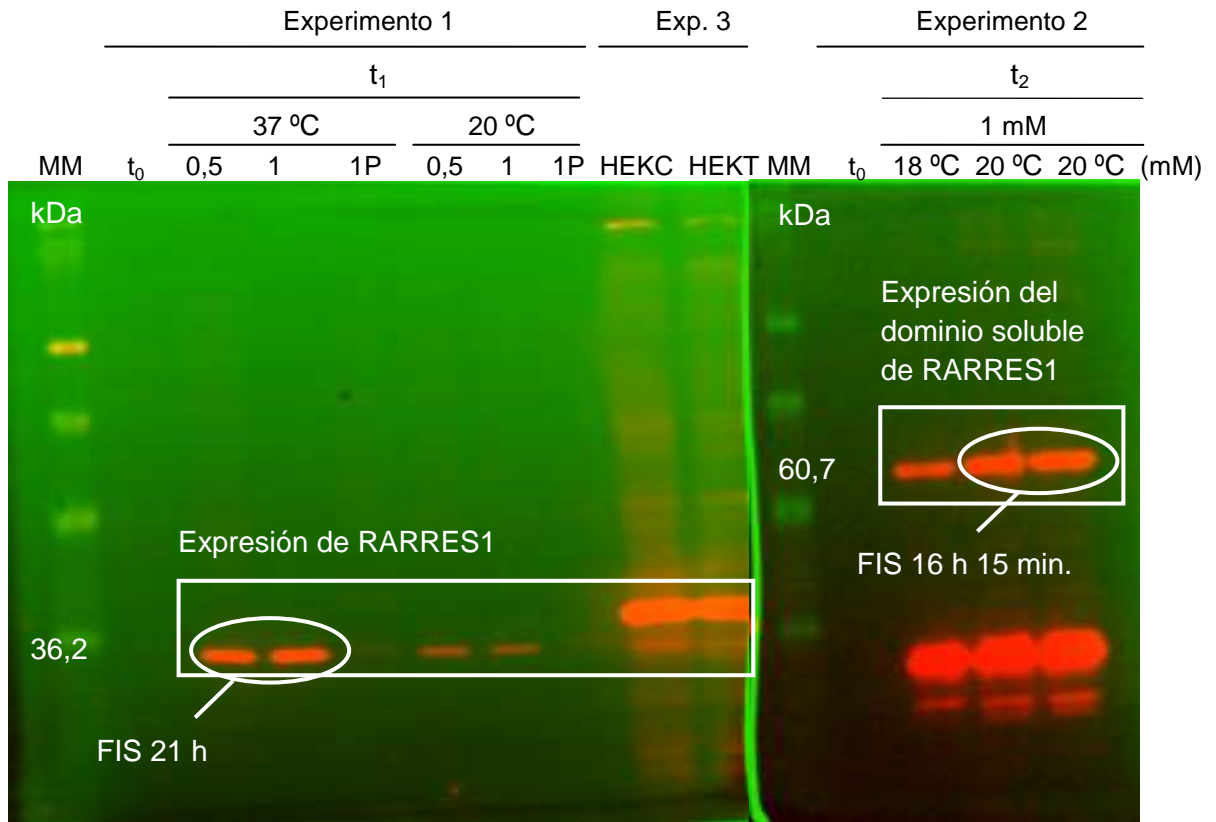


8.2 VISUALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS MEDIANTE WESTERN BLOT

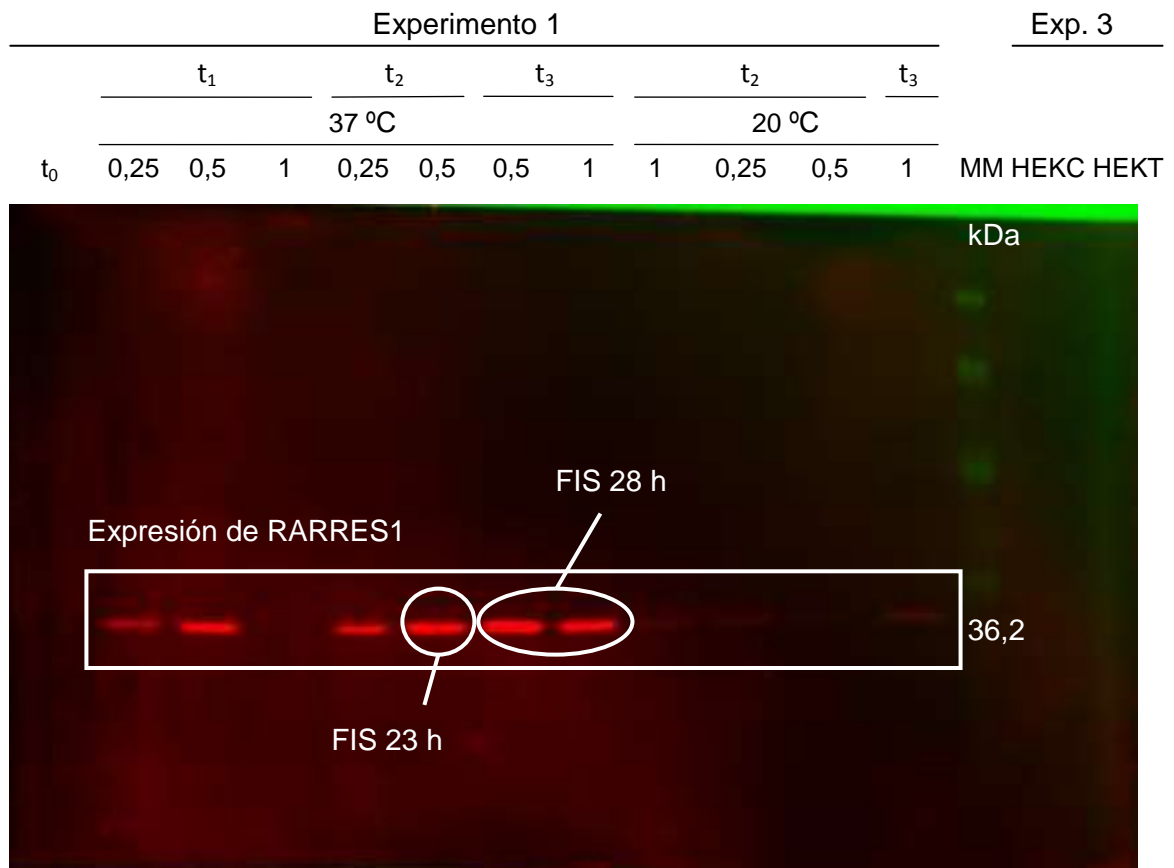
• WB 1:



• WB 2:



• WB 3:





## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 EXPERIMENTO 1

- Se visualizan las bandas de la proteína RARRES1 en muchos carriles de los revelados de los WB 2 y 3.

La presencia de las bandas en los carriles correspondientes a las muestras de la FIS indica que la bacteria ha sintetizado la proteína en el citosol y que, por lo tanto, RARRES1 es soluble.

- En el WB 2, no se visualizan las bandas de la proteína RARRES1 en los dos carriles que corresponden a las muestras de *pellet* de membranas.

Este hecho confirma que la bacteria ha sintetizado correctamente la proteína RARRES1 en el citosol y que es soluble. Si la hubiera sintetizado en la membrana o hubiera formado cuerpos de inclusión, la banda de RARRES1 se visualizaría en los carriles correspondientes a las muestras de *pellet* de membranas.

- Las condiciones óptimas de expresión del gen RARRES1 en *E.coli* BL21 son:
  - Tiempo:  $t_3 = 28$  h
  - Temperatura: 37 °C
  - [IPTG]: 0,5 mM
  - Dosis de IPTG: 1

- Las muestras que, a pesar de no corresponderse con las condiciones de expresión óptimas, también han expresado el gen RARRES1 de forma muy satisfactoria tienen en común un tiempo mínimo de 21 h y la temperatura de 37 °C.

Esta unanimidad en las mejores muestras significa que el tiempo y la temperatura son los parámetros que más influyen en la expresión del gen RARRES1.

- No se visualiza la banda de la proteína RARRES1 a  $t_0 = 0$  h en los WB 2 y 3. El gen RARRES1 introducido en la bacteria tiene un promotor inducible por IPTG. Sin la presencia de IPTG no se induce la expresión del gen, por este motivo, en el tiempo inicial todavía no se ha expresado.

## 9.2 EXPERIMENTO 2

- Se visualizan las bandas del dominio de la proteína RARRES1 en la mayoría de los carriles de las tinciones 1 y 2 y del revelado del WB 1.

La presencia de las bandas en los carriles correspondientes a las muestras de la FIS indica que la bacteria ha sintetizado RARRES1 sin el segmento transmembrana en el citosol y que, por lo tanto, es soluble.

- En el WB 2, situadas paralelamente a las bandas correspondientes al vector pGAT2 – dominio RARRES1 (60,7 kDa), se visualizan unas bandas muy intensas también correspondientes al dominio de RARRES1 pero con una MM muy inferior a la habitual.

Este hecho se debe a que algunos de los dominios de la proteína RARRES1 han sufrido una degradación por la acción de proteasas endógenas y, por lo tanto, tienen una MM inferior. Por este motivo, han hecho un recorrido más largo en el gel SDS-PAGE y se encuentran formando una nueva banda en la parte inferior del WB.

- Las condiciones óptimas de expresión del dominio de la proteína RARRES1 en *E.coli* BL21 son:

- Tiempo:  $t_2 = 16 \text{ h } 15 \text{ min.}$
- Temperatura: 20 °C
- [IPTG]: 0,5 mM
- Dosis de IPTG: 2

- Las muestras que, a pesar de no corresponderse con las condiciones de expresión óptimas, también han expresado el gen del dominio de RARRES1 de forma muy satisfactoria tienen en común un tiempo mínimo de 16 h 15 min., la temperatura de 20 °C y las 2 dosis de IPTG.

Esta unanimidad en las mejores muestras indica que el tiempo, la temperatura y las dosis de IPTG son los parámetros que más influyen en la expresión genética de este experimento.

- No se visualiza la banda del dominio de RARRES1 a  $t_0 = 0$  h en las tinciones 1 y 2 y los WB 1 y 2.

El gen del dominio de RARRES1 introducido en la bacteria tiene un promotor inducible por IPTG. Sin la presencia de IPTG no se induce la expresión del gen, por este motivo, en el tiempo inicial todavía no se ha expresado.

### 9.3 EXPERIMENTO 3

- Se visualizan las bandas de la proteína RARRES1 de forma idéntica en los dos carriles que corresponden a las muestras de las HEKC i HEKT del WB 2. Este hecho podría ser debido: al error de introducir una misma muestra, probablemente la de las HEKT, en los dos carriles; o también, a que no fue bien la transfección y es necesario optimizar, por ejemplo, la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN), el tipo celular o la relación entre el ADN y el agente de transfección.

En el carril que corresponde a las HEKC se tendrían que visualizar menos bandas, ya que las células de esta muestra no han estado transfectadas y, por lo tanto, no tendrían expresado el gen de la proteína RARRES1 recombinante.

- Se visualizan dos bandas muy intensas de la proteína RARRES1 en los dos carriles que corresponden a las muestras de las HEKC y HEKT del WB 2.

Su visualización en una MM que no corresponde a la del vector pTriEx-6 – RARRES1 (36,2 kDa) significa que la proteína sintetizada en mayor cantidad es la RARRES1 endógena.

- En los dos carriles que corresponden a las muestras de las HEKC i HEKT del WB 2, se visualizan dos bandas débiles de la proteína RARRES1 de MM correspondiente a la del vector pTriEx-6 – RARRES1.

El hecho que este par de bandas débiles (aunque sean las más destacadas de los dos carriles, después de las correspondientes a la proteína RARRES1 endógena) correspondan a la MM del vector pTriEx-6 – RARRES1 puede indicar que la proteína recombinante RARRES1 se ha sintetizado, aunque en menor cantidad respecto a la proteína endógena. Sin embargo, la poca intensidad de estas bandas no permite descartar del todo la posibilidad de que todas las bandas presentes en los dos carriles sean endógenas.

- No se visualizan las bandas de la proteína RARRES1 en los carriles del revelado del WB 3.

Las bandas de la proteína no se observan porque RARRES1 se expresa en mucha menor cantidad en las HEK 293 F respecto las bacterias *E.coli* y el anticuerpo no es muy sensible; solamente da señal cuando hay una buena cantidad de la proteína.

#### 9.4 ANÁLISIS COMPARATIVO

- Los parámetros que más influyen en la expresión recombinante de un gen en bacterias son el tiempo y la temperatura tal y como indican los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2.
- Los resultados de los experimentos 1 y 2 confirman que la temperatura óptima de expresión recombinante de un gen en bacterias es la más alta: 37 °C i 20 °C respectivamente.

El hecho que el gen RARRES1 se exprese mejor en las temperaturas más altas es debido a que RARRES1 es una proteína de mamífero y, por lo tanto, la temperatura habitual de síntesis de la proteína es de unos 37 °C. Además, es necesario considerar que cuando se trata de proteínas recombinantes el organismo necesita más energía para plegarlas y que *E.coli* está evolutivamente acostumbrado a vivir dentro de los intestinos de mamíferos, donde la temperatura también suele ser próxima a los 37 °C.

Con una temperatura alta la formación de las proteínas será más rápida y su plegamiento se realizará mejor, a pesar de que es necesario tener en cuenta que no se puede sobrepasar el límite de los 40 °C, ya que la mayoría de las proteínas empiezan a desnaturalizarse.

- La [IPTG] óptima de expresión recombinante de un gen en bacterias es 0,5 mM.

Seguramente, una [IPTG] inferior resulta insuficiente para inducir todas las bacterias correctamente y una concentración superior a 1 mM puede resultar tóxica por las células, ya que en diferentes experimentos dónde se induce *E.coli* BL21 con IPTG se precisa que no se debe sobrepasar este valor. Sin embargo, se trata de un parámetro que puede variar en el caso concreto de cada experimento.

## 10. CONCLUSIONES

- En el experimento 1 se ha expresado el gen RARRES1, a pesar de que se trata de una proteína con segmento transmembrana. No se esperaba en la hipótesis inicial. El análisis de los resultados confirma que las bacterias han sintetizado correctamente la proteína recombinante RARRES1, que se ha detectado en el citosol y es soluble.
- En el experimento 2 se ha expresado el gen del dominio soluble de RARRES1. El análisis de los resultados corrobora que el proceso de transformación ha tenido éxito y las bacterias han sintetizado bien el dominio soluble de RARRES1, que se ha detectado en el citosol.
- En el experimento 3 se ha expresado el gen RARRES1. Las células HEK 293 F transfectadas han sintetizado correctamente la proteína RARRES1, sin embargo, el análisis de los resultados no permite aclarar si la proteína RARRES1 detectada de forma soluble en el citosol es tan solo la endógena o también hay la recombinante.

En conclusión, los tres experimentos han permitido expresar satisfactoriamente RARRES1, hecho sorprendentemente positivo teniendo en cuenta la elevada complejidad de la proteína. Así pues, esta investigación permitirá a los investigadores del IBB profundizar en el estudio de este gen (y su respectiva proteína) que todos esperamos que represente, en un futuro próximo, un importante supresor tumoral.

## 11. VALORACIÓN PERSONAL

Consideramos que este trabajo ha sido de gran utilidad para todos nosotros ya que durante las 3 semanas que Alcía Claramunt investigado en el laboratorio y los meses que, todos juntos, hemos dedicado luego a redactarlo y rectificarlo hasta dejarlo tal y como lo podéis leer, hemos tenido que aprender un gran número de nuevos conceptos —que por otra parte quizá no habríamos tenido tiempo de aprender en clase— así como también profundizar en los que ya conocíamos.

Con este trabajo también hemos aprendido muchos procedimientos y técnicas de laboratorio, y nos hemos tenido que enfrentar a la organización de un experimento largo y complejo para nosotros, donde hemos tenido que relacionar y comparar conceptos, procedimientos y resultados así como diseñar y elaborar una gran cantidad de figuras para esquematizar diferentes procesos. Por todo ello, nos sentimos orgullosos de ver este proyecto terminado.

Además, recientemente hemos sabido que los investigadores de la UAB y del CSIC han diseñado una molécula —similar a la que se presenta en este trabajo de investigación— que en experimentaciones con ratones ha probado ser un inhibidor tumoral.

Esperamos pues, que el esfuerzo dedicado al gen a la proteína RARRES1 represente los primeros pasos de una investigación muy prometedora.

## 12. BIBLIOGRAFIA

Todos los esquemas que acompañan los distintos procedimientos han sido elaborados por los mismos autores del trabajo (Daniel Castrillo, Alícia Claramunt y Glòria Macià).

### PÁGINAS WEB

1. <http://www.librosvivos.net/smtc/homeTC.asp?TemaClave=1063> [30.06.2011]
2. [http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli) [18.07.2011]
3. <http://es.wikipedia.org/wiki/ADN> [2.07.2011]
4. <http://ca.wikipedia.org/wiki/Amino%C3%A0cid> [3.07.2011]
5. <http://ca.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%AFnes> [3.07.2011]
6. <http://www.um.es/molecula/prot.htm> [25.07.2011]
7. <http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/7-microtubulos.php> [2.08.2011]
8. [http://es.wikipedia.org/wiki/Transformación\\_\(genética\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Transformaci3n_(gen3tica)) [19.07.2011]
9. [http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/17transforma.htm#\\_Toc6455425](http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/17transforma.htm#_Toc6455425) [21.07.2011]

10. <http://www2.uah.es/bioquimica/b-fbbma/notas4.pdf> [12.09.2011]

## LIBROS

11. Harvey Lodish, James Darnell (2006). *Biología Celular y Molecular* (5ª edición) Panamericana
12. Gary Walsh (2001) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. Paperback
13. Ballesteros Vázquez Manuel, Jimeno Fernández Antonio, Ugedo Ucar Luis (2009) *Biología 1º Batchillerato*. Santillana
14. 1. Ballesteros Vázquez Manuel, Jimeno Fernández Antonio, Ugedo Ucar Luis (2009) *Biología 2º Batchillerato*. Santillana
15. Gran Enciclopèdia Catalana. *Grup Enciclopèdia Catalana*

## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

16. Chambon P. *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. *Faseb J.* 1996;10:940-54
17. Leid M, Kastner P, Chambon P. *Multiplicity Generates Diversity in the Retinoic Acid Signaling Pathways*. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:427-33
18. Wu CC, Shyu RY, Chou JM, Jao SW, Chao PC, Kang JC. et al. *RARRES1 expression is significantly related to tumor differentiation and staging in colorectal adenocarcinoma*. *Eur J Cancer.* 2006;42:557-65
19. Ziad J. Sahab, Michael D. Hall, Lihua Zhang, Amrita K. Cheema, Stephen W. Byers. *Tumor Suppressor RARRES1 Regulates DLG2, PP2A, VCP, EB1, and Ankrd26*. *J Cancer* 2010; 1:14-22. doi:10.7150/jca.1.14
20. Ziad J. Sahab, Michael D. Hall, You Me Sung (2011). *Tumor Suppressor RARRES1 Interacts with Cytoplasmic Carboxypeptidase AGL2 to Regulate the  $\alpha$ -Tubulin Tyrosination Cycle*. *American Association for Cancer Research. www.aacrjournals.org* 1219.

## 13. ANEXOS

### 13.1 LOS VECTORES Y LA TRANSFORMACIÓN

Un vector es un agente—que puede ser infeccioso o no— que transfiere información genética de un organismo a otro. Se utiliza para llevar una secuencia de ADN de una célula donante a otra de receptora. Además del gen protagonista, los vectores también llevan otros genes, llamados marcadores, que sirven para identificar a las células receptoras que lo han integrado.<sup>[8]</sup>

La célula que adquiere los genes foráneos se llama transformada, y el proceso realizado para insertar información genética se llama transformación. Está constituido por los siguientes pasos:

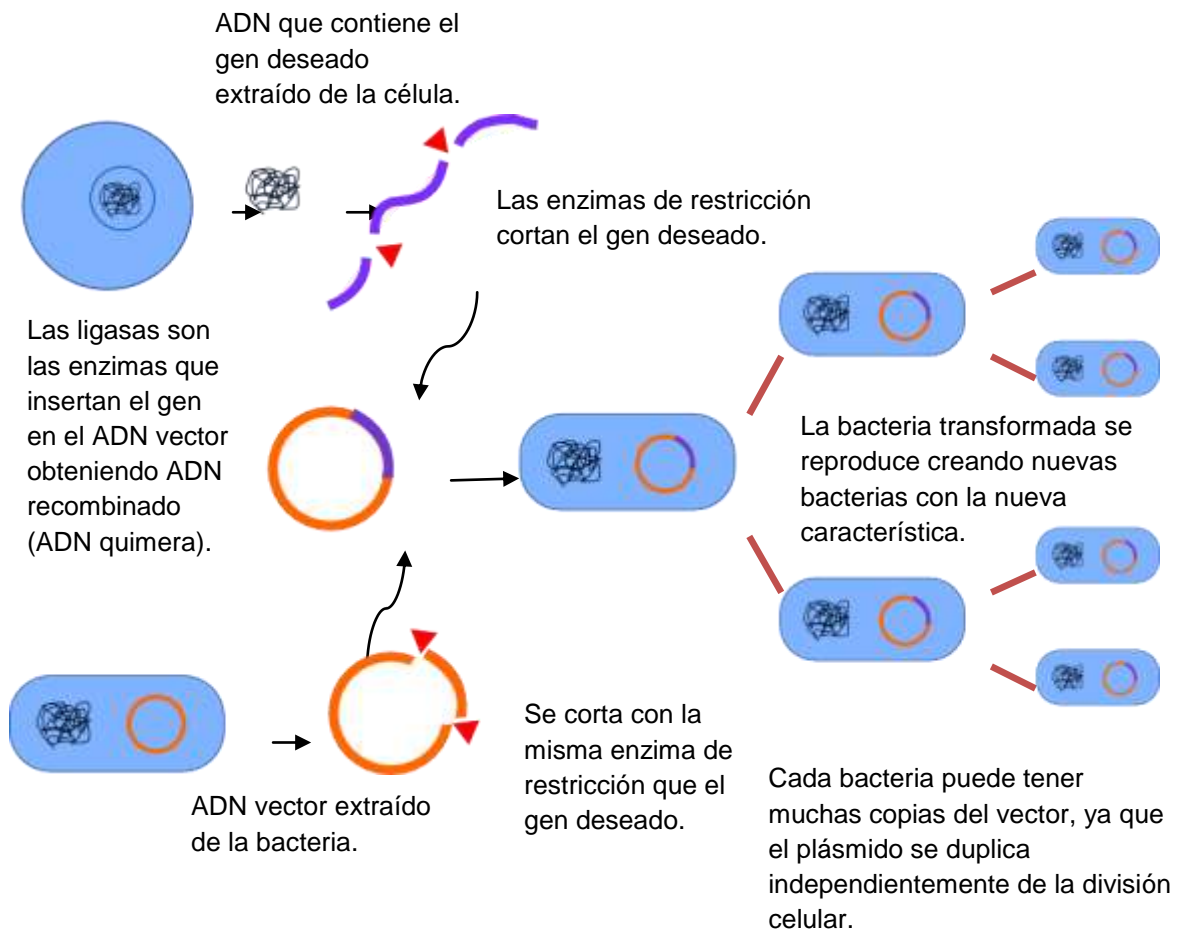


Figura 6: esquema del proceso de transformación.<sup>[6]</sup>

Para conocer cuáles son las nuevas bacterias, se utiliza como marcador un gen de resistencia al antibiótico. Así, cuando se ponen en un medio de cultivo con el antibiótico correspondiente sólo sobreviven las que contienen el gen



deseado. Lo que diferencia los vectores entre sí son los marcadores y el fragmento de ADN que contienen, ya sea el bacteriano o el recombinado.<sup>[6]</sup>

### 13.2 LA TRANSFECCIÓN

La transfección consiste en la introducción de material genético en una célula eucariota mediante un vector —que tiene una parte vírica— y un polímero catiónico. La finalidad de este proceso es que la célula transfectada sintetice la proteína deseada. Podemos distinguir entre:

- **Transfección transitoria:** el vector queda en el núcleo en forma episomal, es decir, extracromosomal, ya que el ADN del plásmido no se integra en el genoma de la célula transfectada.
- **Transfección estable:** el nuevo material genético —ADN del vector— se incorpora en el genoma de la célula transfectada. En estos casos, la selección de los clones se hace mediante antibióticos.

El caso de las HEK 293 F del experimento 3 es de transfección transitoria: el vector pTriEx-6 - RARRES1 —cargado negativamente— es envuelto con el polímero catiónico PEI (polietilenimina) para que el conjunto adquiera carga positiva. Debido al hecho de que las membranas plasmáticas tengan la cara externa la membrana cargada negativamente permite unirse al PEI. Entonces, el complejo entra dentro de la célula de mamífero HEK293 F por endocitosis. A continuación, el plásmido se mete dentro del núcleo, donde queda en forma episomal. En este punto, la transcripción y la traducción pueden tener lugar y la proteína RARRES1 puede ser sintetizada.<sup>[9]</sup>

Nosotros utilizaremos la técnica Western Blot (WB) para saber si la proteína RARRES1 ha sobreexpresado o no.

Expresión del gen RARRES1

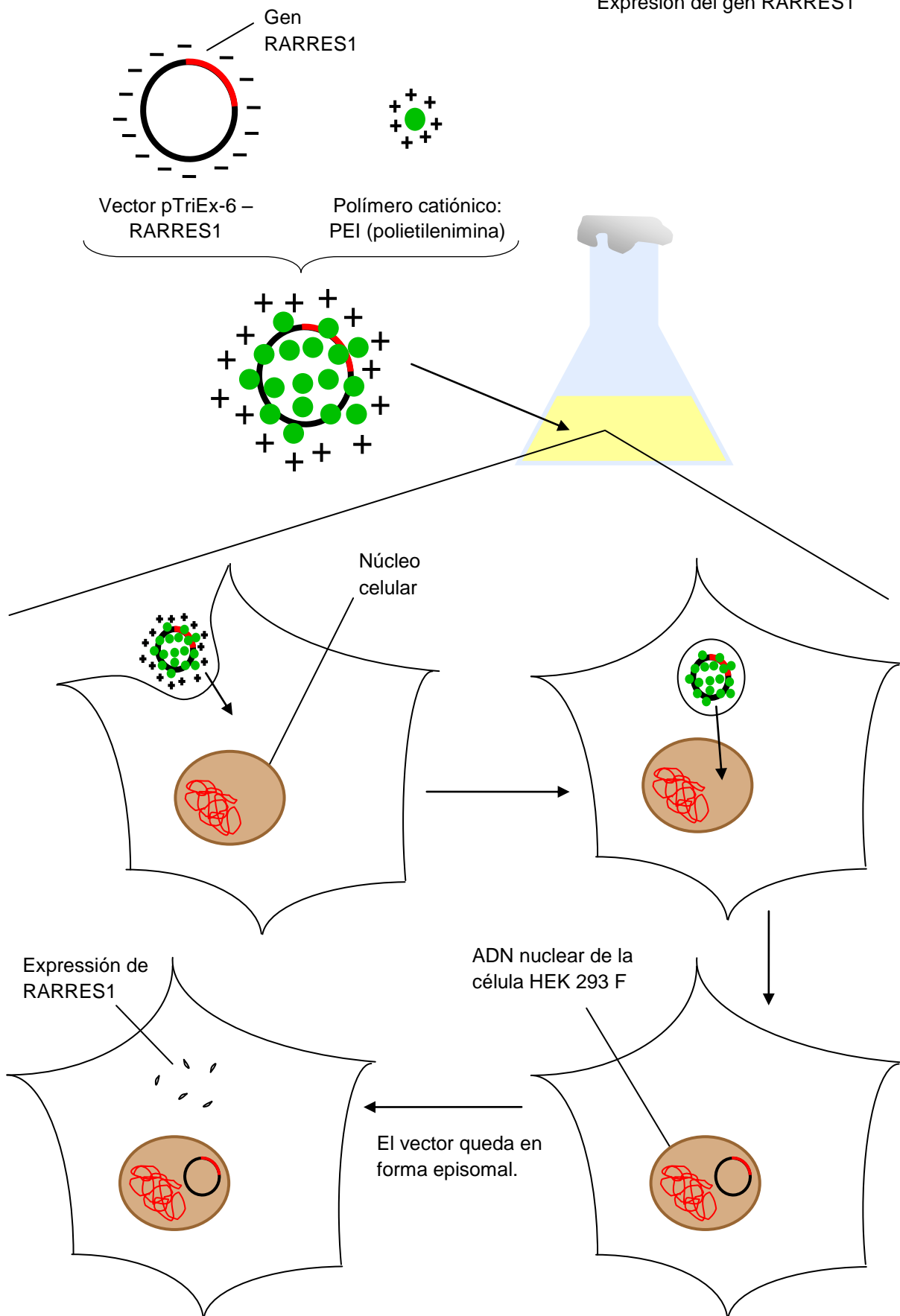


Figura 7: esquema del proceso de transfección.

13.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTALESEXPERIMENTO 2:TRANSFORMACIÓN DE pGAT2 - dominio RARRES1 EN E.coli BL21

Proceso de transformación del vector pGAT2 - dominio RARRES1 en E.coli BL21:

1. Introducir 200  $\mu$ l de E. Coli BL21 (células competentes) y 5  $\mu$ l del vector pGAT2 - RARRES1 en un tubo eppendorf de 1,5 mL.
2. Incubar 30 min. en gel el tubo eppendorf que contiene la muestra preparada.
3. Hacer un choque térmico en la muestra en un Thermoblock durante 45 segundos (45 s) a 42 ° C.
4. Dejar reposar el tubo eppendorf en gel para que las células se recuperen.
5. Añadir 600 ul de LB (medio) e incubar-lo durante 30 min. en un agitador (250 rpm) a 37 ° C.
6. Centrifugar la muestra durante 1 min. a 13.000 rpm para conseguir separar las células del medio.
7. Extraer una parte del medio.
8. Resuspender las células con el medio restante: unos 100  $\mu$ l aproximadamente.

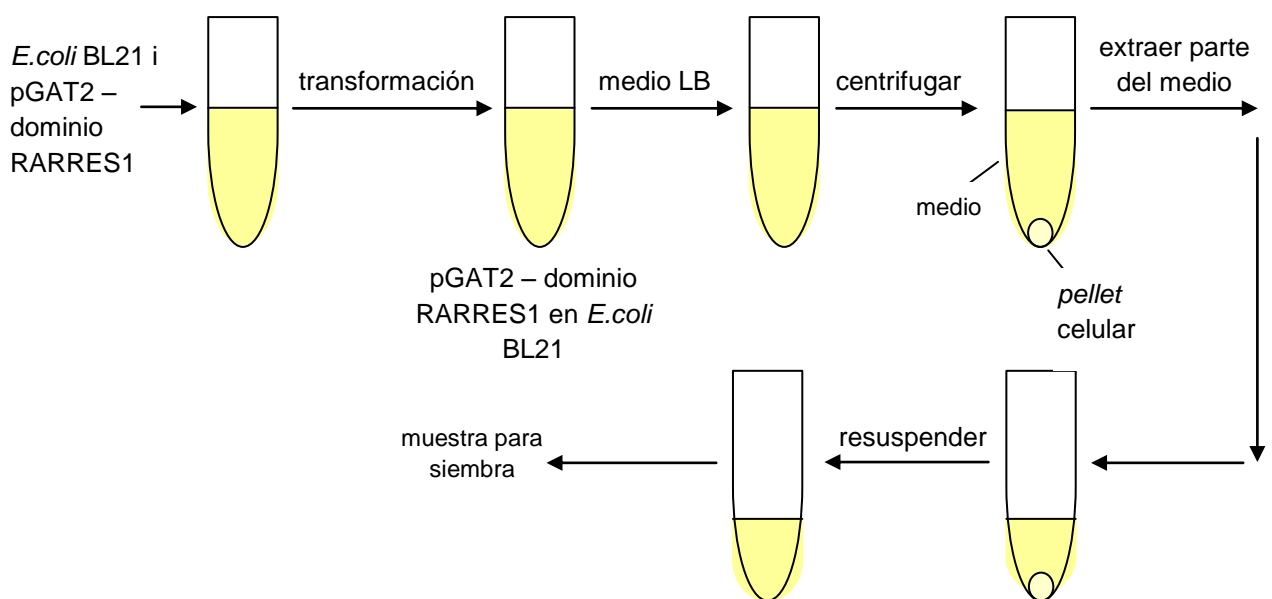


Figura 8: transformación de pGAT2 – dominio RARRES1 en E.coli BL21.



Figura 9



Figura 10



Figura 11

Figura 9: introducción de *E.coli* BL21 en el tubo eppendorf.

Figura 10: introducción del vector pGAT2 – dominio RARRES1 en el tubo eppendorf.

Figura 11: thermoblock utilizado para el choque térmico.

## SIEMBRA DEL CULTIVO

Proceso de siembra de las bacterias en placas de Petri:

1. Coger una placa de Petri a 4 ° C de LB y ampicilina ya preparada.
2. Sembrar: verter la muestra en la placa. Proceso de siembra:
  - a. Recoger la muestra obtenida del proceso de transformación.
  - b. Resuspender la muestra con un pipeteador y verterla en la superficie de la placa.
  - c. Esterilizar el asa de Digralesky con etanol 70 ° y secarla con un pico de Bunsen.
  - d. Desplazar longitudinalmente el asa por la placa al mismo tiempo que hacemos girar esta sobre sí misma.
  - e. Tapar la placa y no invertirla para que las células se adhieran.
3. Pasados unos 10 min., Poner la placa sembrada boca abajo, en incubación a 37 ° C durante 24 h.
4. Pasado este tiempo, guardar la placa de Petri con los cultivos en una nevera (4 ° C).

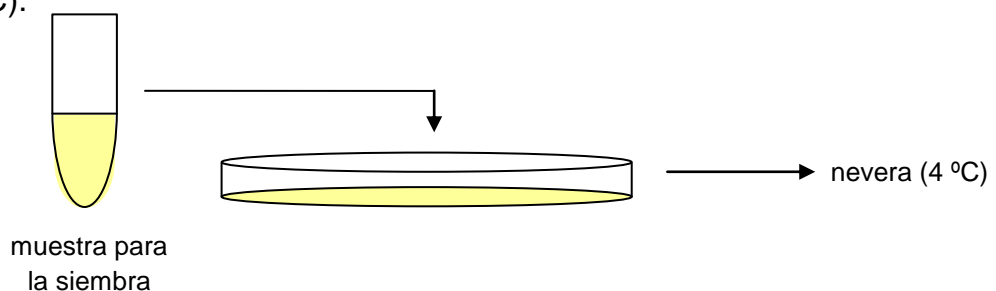


Figura 12: siembra del cultivo.

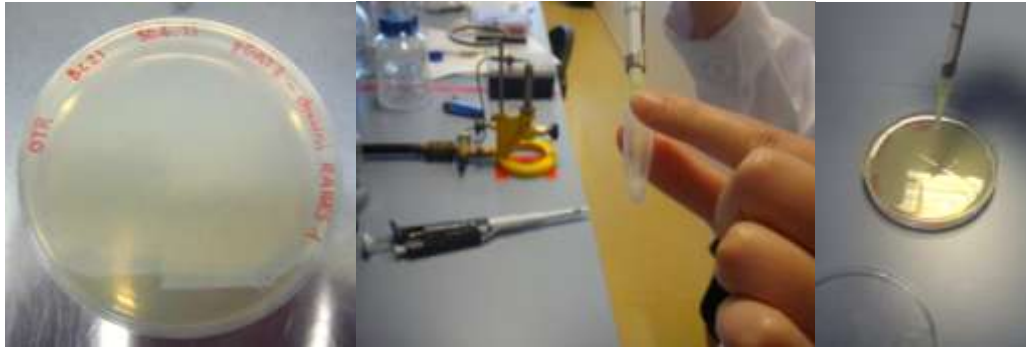


Figura 13

Figura 14

Figura 15

Figura 13: placa de Petri con LB i ampicilina.

Figura 14: resuspensión de la muestra.

Figura 15: vertido de la muestra sobre la superficie de la placa.



Figura 16

Figura 17

Figura 18

Figura 16: siembra del cultivo con la nansa de Digrafsky.

Figura 17: incubación de la placa de Petri.

Figura 18: placa de Petri con el cultivo.

## EXPRESIÓN DEL GEN DEL DOMINIO SOLUBLE DE RARRES1 VARIANDO DIFERENTES PARÁMETROS

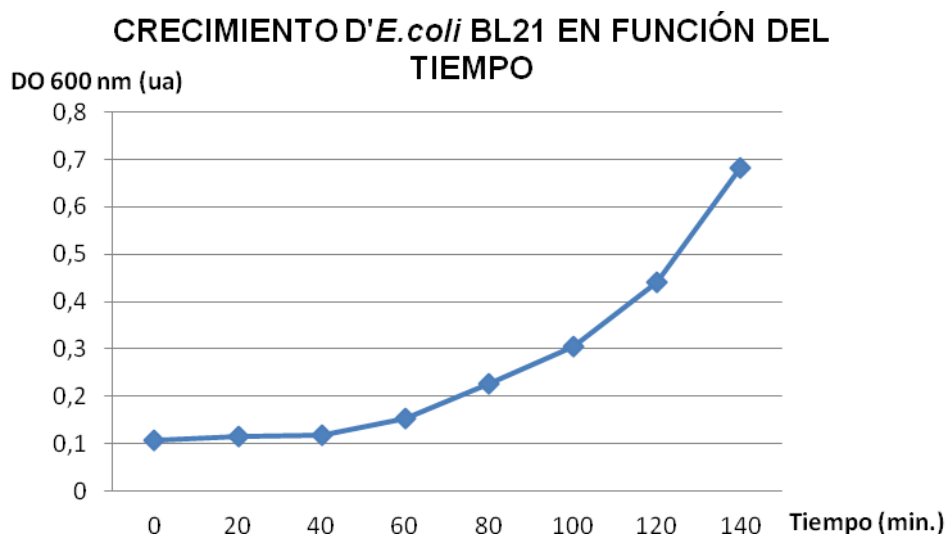
Protocolo seguido para expresar el gen del dominio de RARRES1 variando los parámetros: tiempo, temperatura, [IPTG] y dosis de IPTG.

1. Repartir 10 mL de inóculo del matraz Erlenmeyer en 10 tubos falcon de 50 mL cada uno:
  - a. 9 tubos falcon para hacer 9 cultivos con diferentes parámetros de expresión.
  - b. 1 tubo falcon extra para hacer el seguimiento de la DO.
2. Etiquetar los 9 tubos falcon escribiendo las siguientes combinaciones de temperatura y [IPTG]:

	18 °C	20 °C	20 °C
0,25 mM	0,25 mM – 18 °C	0,25 mM – 20 °C	0,25 mM – 20 °C 2D
0,5 mM	0,5 mM – 18 °C	0,5 mM – 20 °C	0,5 mM – 20 °C 2D
1 mM	1 mM – 18 °C	1 mM – 20 °C	1 mM – 20 °C 2D

3. Colocar los 10 tubos falcon en el agitador a 37 ° C y 250 rpm.
4. Hacer el seguimiento de la DO del tubo falcon extra tomando una muestra cada 20 min. Utilizar el espectrofotómetro para analizar el crecimiento de los cultivos.
5. Lecturas de la DO en  $\lambda = 600 \text{ nm}$ :

READ	DO 600 nm	Tiempo (min.)
1	0,1061	0
2	0,1140	20
3	0,1179	40
4	0,1540	60
5	0,2262	80
6	0,3039	100
7	0,4421	120
8	→ 0,6830	140



6. Cuando la DO es aproximadamente de 600 nm, recoger las muestras a  $t_0 = 0$  h (17:45 h) e inducir todas las muestras con IPTG.
7. Calcular la cantidad de IPTG necesaria para conseguir las concentraciones de 0,25, 0,5, y 1 mM y añadir a los tubos correspondientes (según indique la etiqueta).
8. Posteriormente, introducir los tubos falcon en el agitador (250 rpm) a la temperatura correspondiente.

RECOGIDA DE MUESTRAS  $t_2 = 16$  h 15 min

Recoger 9 muestras en  $t_2 = 16$  h 15 min. (10:00 h - 06/07/11) de 1 mL de los 9 cultivos diferentes:

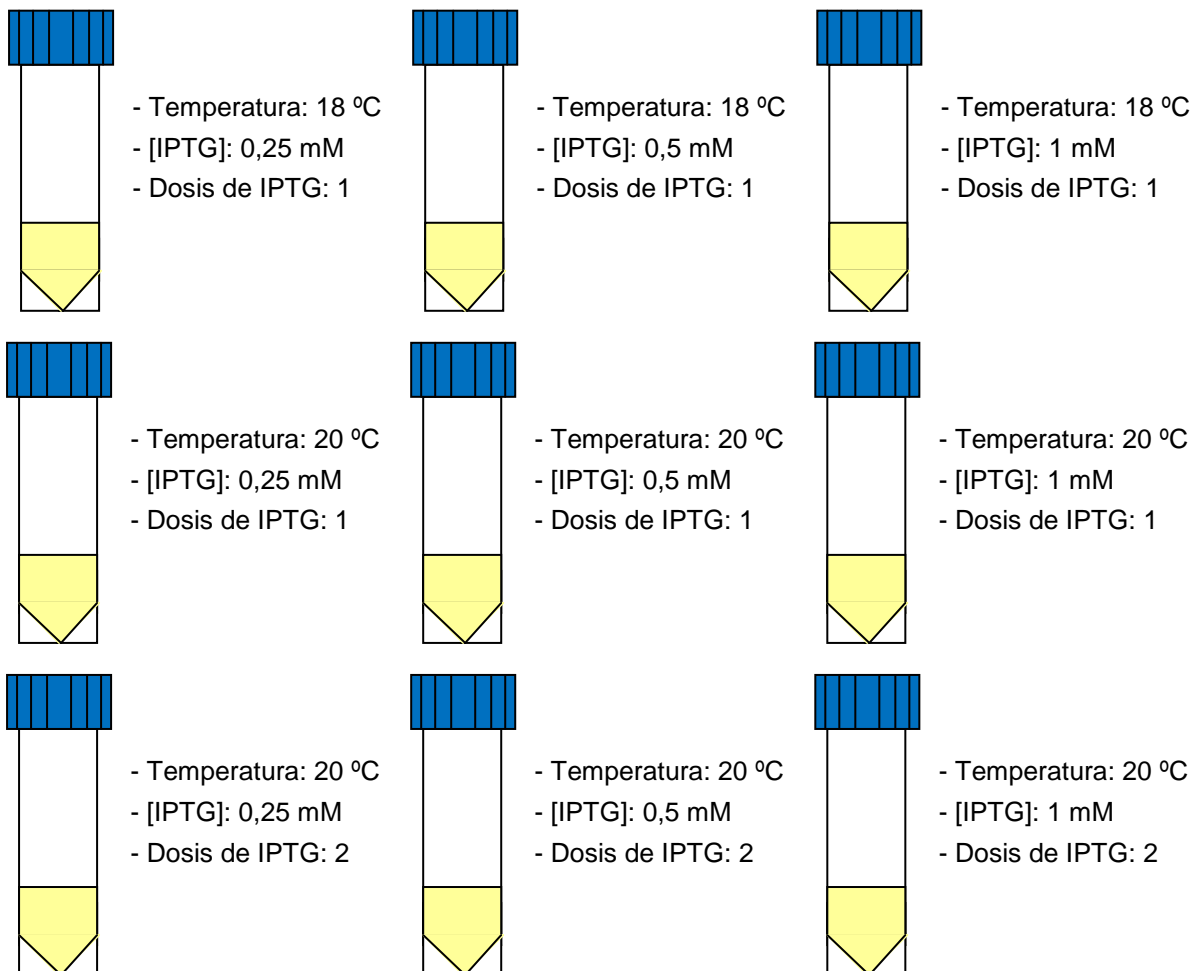


Figura 19: muestras de los 9 cultivos diferentes (en tubos falcon de 50 mL).

## EXPERIMENTO 1: LISI DE LAS CÉLULAS DE LAS MUESTRAS DE CULTIVO DE *E. Coli* BL21

Protocolo para lisar las células bacterianas:

1. Recoger las muestras del congelador (-20 ° C).
2. Introducir cada muestra 250 µl de tampón de lisis, a pH 8.
3. Añadir 1 mg / mL de lisozima y 1 mM de PMSF a cada muestra.
4. Dejarlo incubar 30 min. a temperatura ambiente.
5. Resuspender las muestras con el vórtice.
6. Dejarlo incubar 15 min. en gel para que tenga lugar la lisis.
7. Centrifugar a 1300 rpm el lisado durante 10 min. para separar la fracción intracelular soluble (FIS) o fracción citosólica de la fracción insoluble o pellet de membranas.
8. Extraer la FIS de cada muestra, introducirlas en nuevos tubos eppendorf y etiquetarlos.
9. Guardar todas las muestras (tanto los que contienen la FIS como las que contienen la fracción insoluble) en el congelador (-20 ° C).

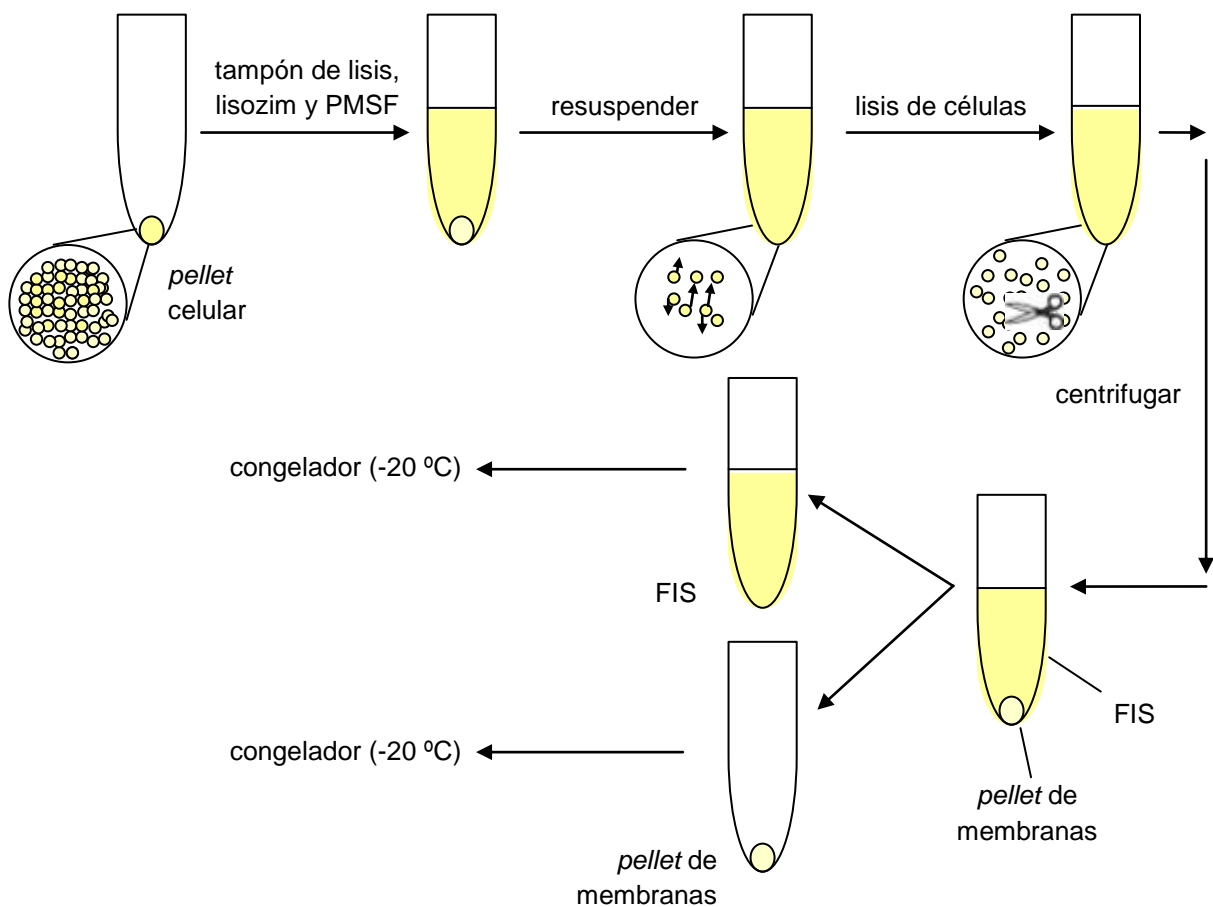


Figura 20: lisis de las muestras del cultivo de *E.coli*.



## ELECTROFORESIS DISCONTINUA EN PRESENCIA DE SDS

Las proteínas se pueden analizar mediante su separación en geles de electroforesis gracias a la aplicación de un campo eléctrico.

En la técnica de electroforesis para proteínas, se utiliza un gel de poliácridamida (Pa), una red porosa formada por cadenas de las moléculas acrilamida y bis-acrilamida que permite separar las proteínas desnaturalizadas según su masa molecular —ya que si no hubieran perdido su estructura esta influiría en la capacidad de las proteínas de atravesar el gel— <sup>[10]</sup>.

En primer lugar, se añade a las muestras proteicas el tampón de carga, una solución compuesta principalmente por un agente desnaturalizante y reductor, un compuesto que les da densidad y un colorante que permite visualizarlas.

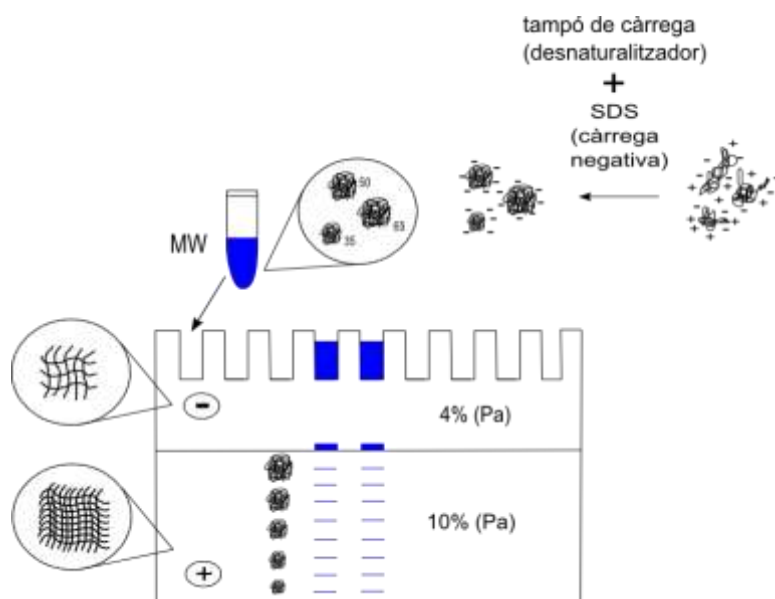
A continuación, hay que añadir a las muestras otro producto: el SDS, un detergente cargado negativamente, que da a las proteínas carga negativa para que se desplacen hacia el cátodo. Para facilitar el proceso, las muestras se calientan a una temperatura cercana a los 98 ° C, punto de ebullición de las proteínas.

Como se trata de electroforesis discontinua, es decir, una clase de electroforesis caracterizada por la existencia de dos geles de diferentes densidades, las muestras preparadas y el marcador de masa molecular (MM) se introducen con una pipeta en el interior de los bolsillos o pocillos del gel superior o concentrador.

Finalmente, al aplicar un campo eléctrico las proteínas empiezan a desplazarse desde el gel concentrador hacia el separador, quedando separadas por su masa molecular.

Figura 21: gel SDS-PAGE.

De arriba a abajo: tampón de carga (desnaturalizador), SDS (carga negativa)



Cuando el colorante del frente se sitúa en la parte final del gel, éste se retira. A partir de aquí hay dos métodos de visualización de las proteínas del gel:

- La tinción con azul de Coomassie: se sumerge el gel dentro de la solución del colorante entre 10 y 15 min. aproximadamente, a temperatura ambiente y en agitación suave.
- La transferencia de las proteínas a membrana mediante la técnica del Western Blot (WB).

### ELECTROFORESIS DISCONTÍNUA EN PRESENCIA DE SDS

Protocolo seguido para preparar las muestras de la FIS para la electroforesis:

1. Transferir 15  $\mu$ l de la FIS de las muestras a tubos eppendorf, etiquetarlos y guardar las muestras con la FIS restante en el congelador (-20 ° C).
2. Añadir 3  $\mu$ l de tampón de carga a cada muestra de 15  $\mu$ l de la FIS.
3. Hervir las muestras en un Thermoblock durante 10 min. a una temperatura aproximada de 100 ° C.

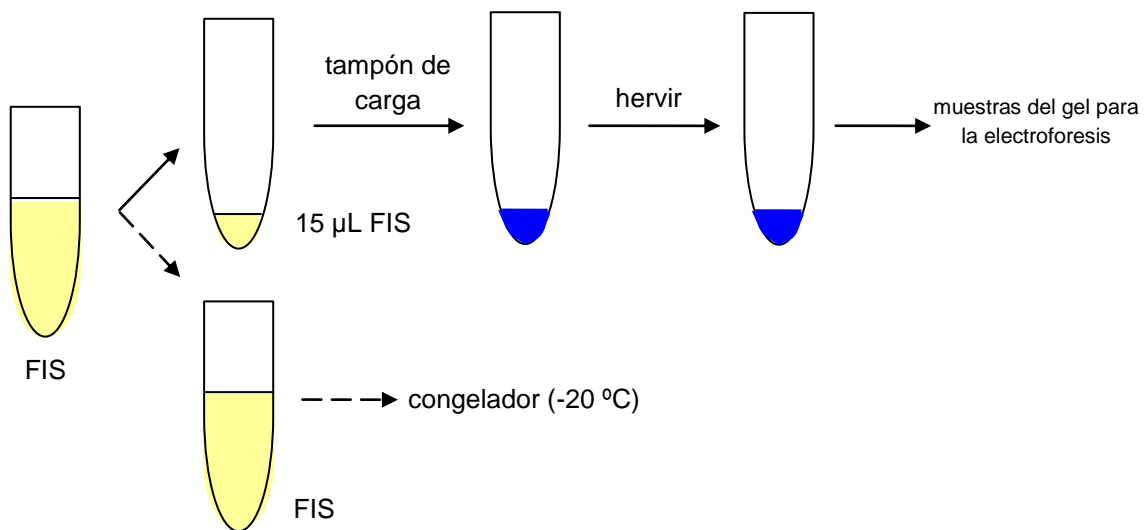


Figura 22: protocolo seguido para preparar las muestras FIS para la electroforesis.

Protocolo seguido para preparar las muestras de pellet de membranas para la electroforesis:

1. Seleccionar 2 fracciones insolubles: t1, 1 mM de IPTG, 20 ° C y 37 ° C, de las muestras guardadas en el congelador.

2. Introducir cada muestra 250  $\mu$ l de tampón de lisis, a pH 8, preparado previamente y un 1% (2,5  $\mu$ l) de SDS.
3. Añadir 1 mg / mL de lisozima y 1 mM de PMSF a cada muestra.
4. Dejarlo incubar 30 min. a temperatura ambiente.
5. Resuspender las muestras con el vórtice.
6. Dejarlo incubar 15 min. en gel.
7. Centrifugar las muestras durante 5 min. a 13.000 rpm.
8. Hervir las 2 muestras a 100 ° C durante 10 min. en un Thermoblock.
9. Transferir 15  $\mu$ l de la FIS resultante de la centrifugación a tubos eppendorf, etiquetarlos y guardar el restante en el congelador (-20 ° C).
10. Añadir 3  $\mu$ l de tampón de carga a cada muestra.
11. Hervir otra vez las muestras en un Thermoblock durante 10 min. a una temperatura aproximada de 98 ° C.

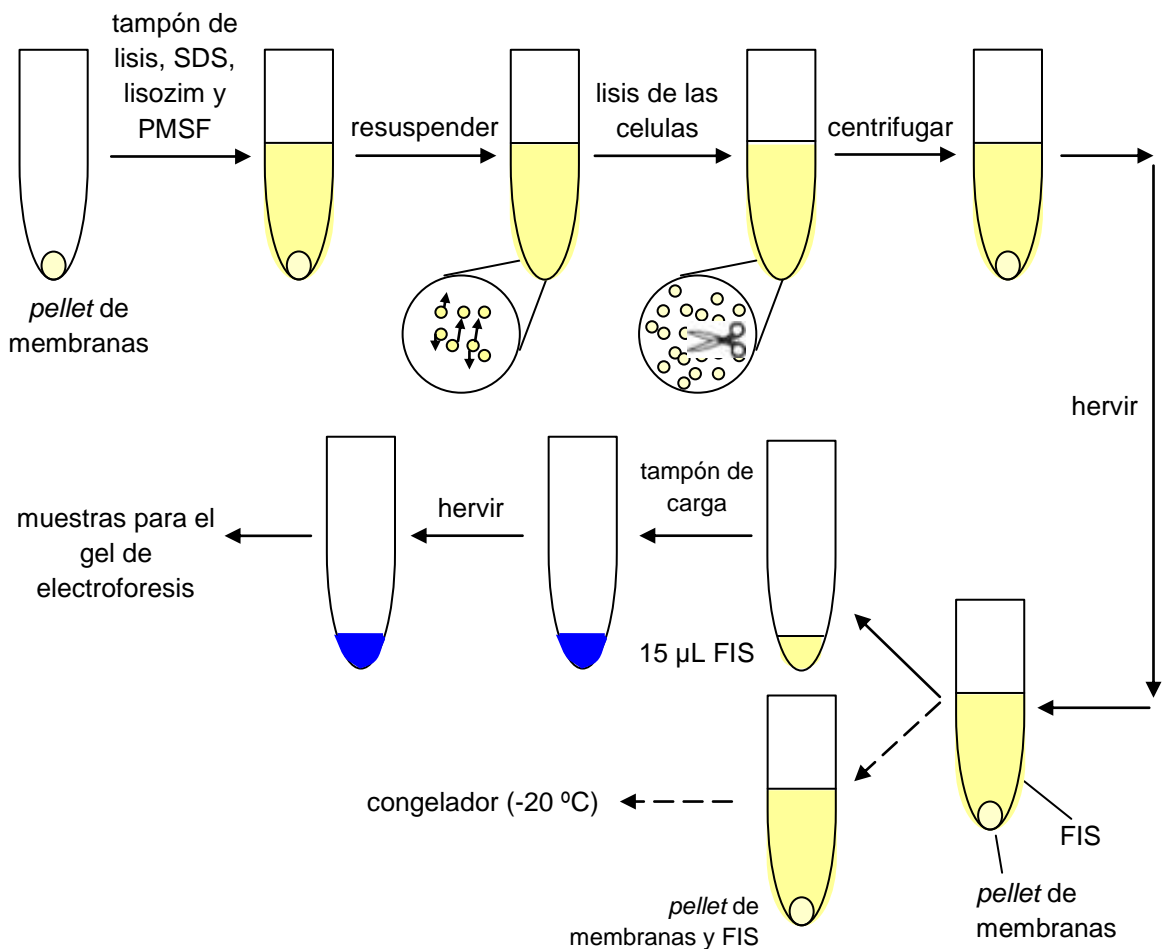


Figura 23: protocolo seguido para preparar las muestras de pellet para la electroforesis.

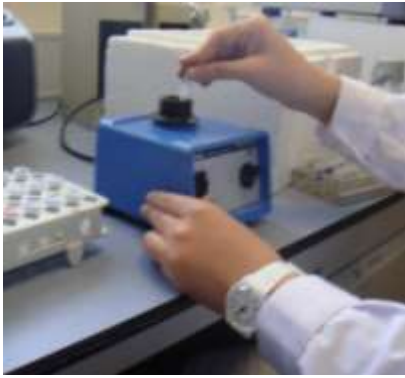


Figura 24



Figura 25



Figura 26

*Figura 24: resuspensión de las muestras con el vórtice.*

*Figura 25: ebullición de las muestras a unos 98 ° C mediante el Thermoblock.*

*Figura 26: introducción de 3 µl de tampón de carga a cada muestra.*

Protocolo de preparación de la electroforesis:

1. Seleccionar y distribuir las muestras en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE de electroforesis.
2. Cargar los bolsillos de los geles de electroforesis con 16 µl de cada muestra seleccionada.
3. Con una fuente de electroforesis, aplicar un campo eléctrico de unos 950 miliamperios (mA) y 77 voltios (V) en la cubeta electroforética donde están los geles que contienen las muestras para que las proteínas se separen por masa molecular.
4. Retirar los geles de la cubeta de electroforesis cuando el marcador de masa molecular (MM) se encuentre en la parte inferior de los geles.



Figura 27



Figura 28

*Figura 27: extracción de 16 µL de cada muestra.*

*Figura 28: Introducción de las muestras en el gel.*

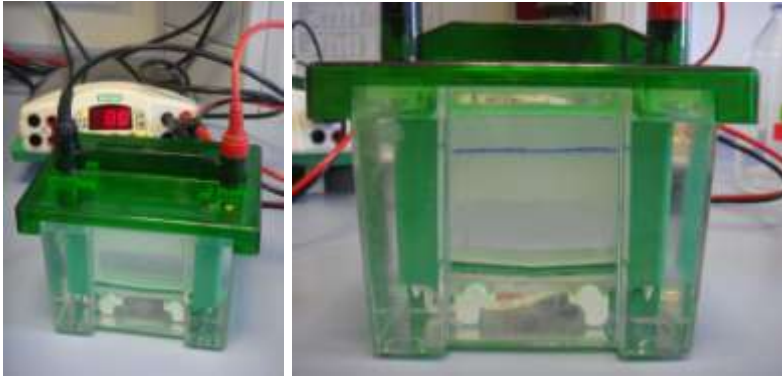


Figura 29

Figura 30

Figura 29: cubeta y fuente de electroforesis.

Figura 30: cubeta de electroforesis con los geles de electroforesis cargados.

## WESTERN BLOT

El término blotting se refiere a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y la posterior detección en la superficie de ésta.

En la técnica del WB, también llamada "immunoblotting", utiliza anticuerpos para detectar el antígeno de interés. La unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) permite la detección de una proteína específica dentro de una mezcla compleja de otras proteínas.

La técnica del WB se lleva a cabo con un anticuerpo primario que se une al antígeno que reconoce y, a continuación, un anticuerpo secundario marcado que reconoce al primario. La elección del anticuerpo secundario depende de la región constante (específica de cada especie) del anticuerpo primario y la marca consiste en una sustancia que permite detectarlo.

En nuestro trabajo de investigación, el protocolo del WB se llevará a cabo con los anticuerpos antiRARRES1, antiHistag y antiMouse

1. Transferencia a membrana: las proteínas pasan del gel resultante de la electroforesis a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico.
2. Bloqueo: añadir 10 ml de leche 5% en PBS-T 0,05%. Las proteínas de la leche llenan los espacios vacíos de proteínas de la membrana. La finalidad del bloqueo es impedir que los anticuerpos que se añadirán a continuación se unan a la membrana de forma inespecífica, debido a que también son proteínas y por tanto la membrana tiene afinidad por los

anticuerpos. Se quiere conseguir que los anticuerpos se sitúen únicamente allí donde se encuentra la proteína que reconocen.

3. Limpiar la muestra del exceso de anticuerpo con un lavado en PBS-T de 1 min.

4. Anticuerpo primario antiRARRES1 y antiHistag: añadir una solución al 2% de leche en PBS-T, que incluye los anticuerpos primarios.

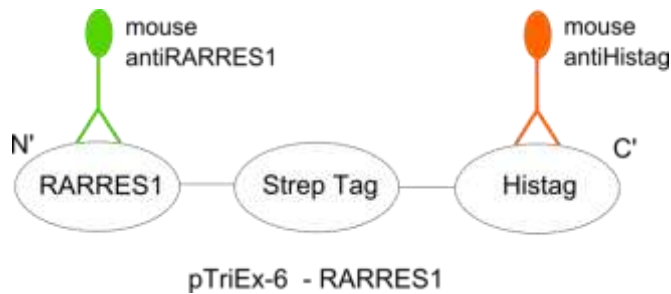


Figura 31: reconocimiento entre los anticuerpos primarios y la proteína RARRES1.

5. Colocar la muestra 1 en el agitador, a temperatura ambiente.

6. Limpiar la muestra del exceso de anticuerpo con 4 lavados en PBS-T, de 5 min. cada uno.

7. Anticuerpo secundario antiMouse (ver los anticuerpos de la página 75) con peroxidasa de rábano (HRP): preparar una solución al 2% de leche y diluir en él el anticuerpo secundario 1/5000.

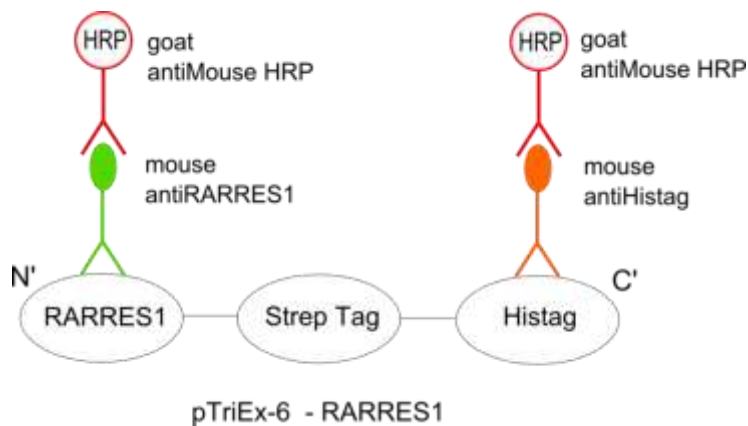


Figura 32: reconocimiento entre el anticuerpo secundario y el primario.

8. Colocar la muestra 1 en el agitador, a temperatura ambiente.

9. Limpiar la muestra del exceso de anticuerpo con 4 lavados en PBS-T, de 5 min. cada uno.

10. Revelado quimioluminiscente del luminol por el reactivo peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este revelado es posible gracias a una reacción enzimática de la HRP que está conjugada al anticuerpo secundario.

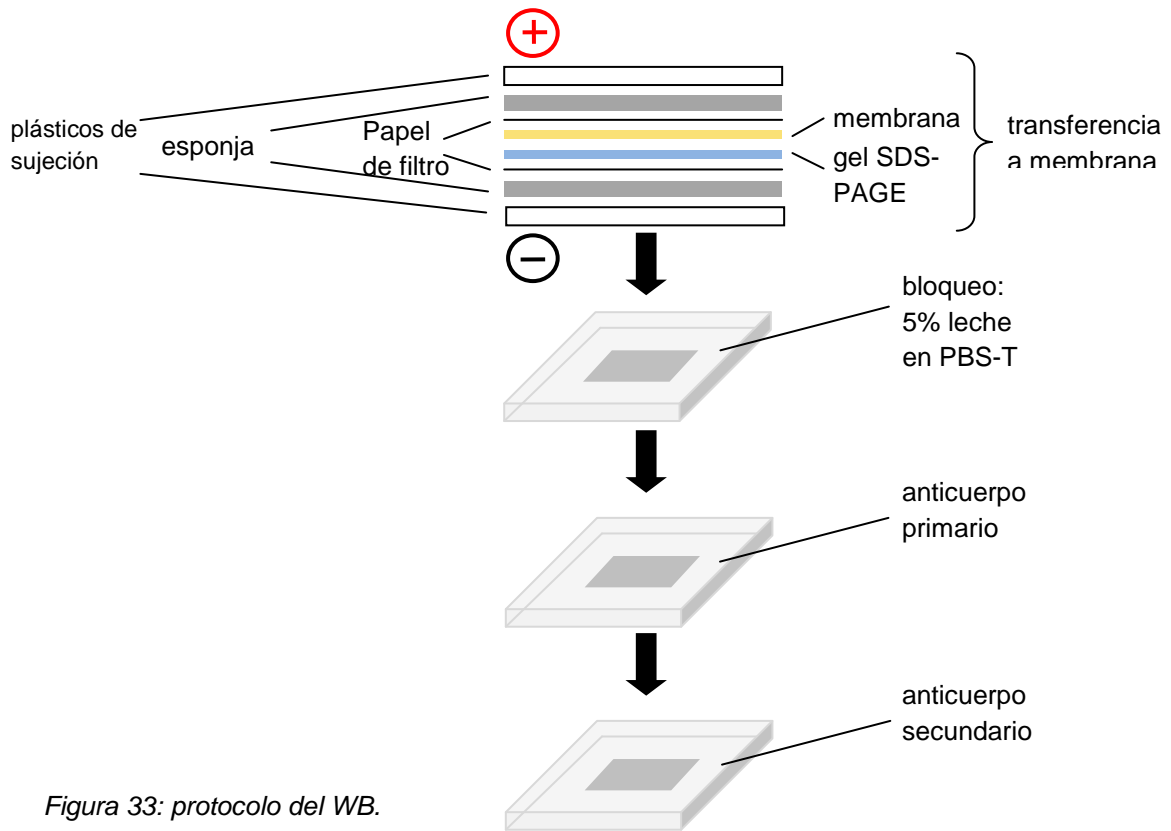


Figura 33: protocolo del WB.



Figura 34



Figura 35



Figura 36



Figura 37



Figura 40

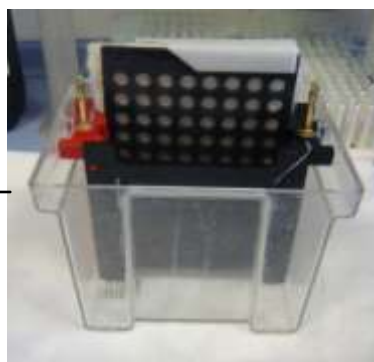


Figura 39



Figura 38

*Figuras 34-40: proceso de la transferencia a membrana.*

*Figura 34: plásticos de sujeción y contenido.*

*Figura 35: esponjas.*

*Figura 36: papel de filtro.*

*Figura 37: membrana (sobre el papel de filtro superior) y gel SDS-PAGE (sobre el papel de filtro inferior).*

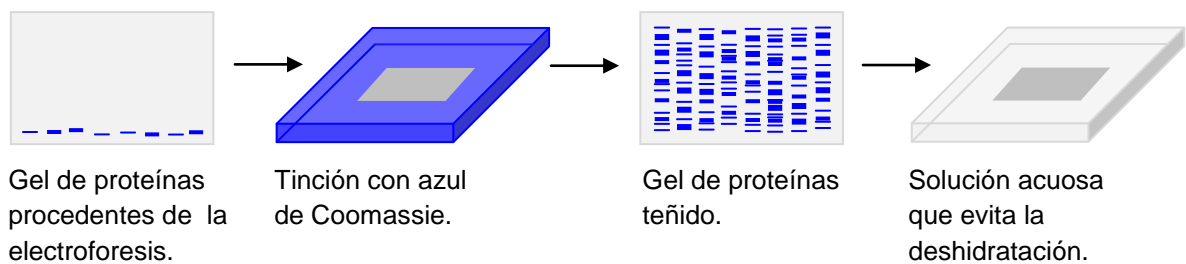
*Figura 38: conjunto de elementos para hacer la transferencia a membrana.*

*Figura 39 y 40: cubeta del WB.*

## TINCIÓN CON AZUL DE COMASSIE

Protocolo de tinción:

1. Sumergir el gel proveniente de la electroforesis en la solución del colorante azul de Coomassie entre 10 y 15 min. a temperatura ambiente y en agitación suave.
2. Retirar el gel y dejar reposar en una solución acuosa el tiempo que requiera el análisis de los resultados.



*Figura 41: tinción con azul de Coomassie.*



## **\* BREVE INFORME DEL TRABAJO “EXPRESION DEL GEN RARRES1”**

Nuestro grupo siempre tuvo muy claro que el trabajo de investigación, realizado en el marco del trabajo de investigación obligatorio en Cataluña para la obtención del título del Bachillerato, estaría relacionado con una investigación real. En primer lugar, porque consideramos necesario promover la investigación científica en el Estado Español y, en segundo lugar, porque teníamos un gran interés en aprovechar esta oportunidad para entrar en contacto con el trabajo del laboratorio.

Por estos motivos, nos llamó la atención el proyecto ARGÓ —promovido por la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)— que ofrecía diferentes estancias de biología entre las que nos atrajo una titulada "Proteínas para la clonación" del departamento de Ingeniería de Proteínas y Enzimología, de la unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB). Hicimos la solicitud y tuvimos la suerte de que uno de los componentes de nuestro grupo, Alicia Claramunt, fue seleccionada y así empezamos, animados, el trabajo de investigación en un tema que respondía tanto a nuestras inquietudes por la biotecnología como por la bioquímica.

Este trabajo, que tiene como objetivo expresar el gen RARRES1, busca ser el inicio de un largo proceso para descubrir muchos más aspectos sobre este gen, que en un futuro próximo, podría ser un importante supresor tumoral.

Para expresar RARRES1, hemos utilizado tres métodos diferentes que corresponden a los tres experimentos realizados:

- Experimento 1: expresión del gen RARRES1, mediante el vector pTriEx-6, en la bacteria E.coli BL21 variando los parámetros: tiempo, temperatura, concentración y dosis de inductor. Posterior detección de la proteína en el citosol.
- Experimento 2: expresión de un dominio del gen RARRES1, mediante el vector pGAT2, en la bacteria E.coli BL21 variando los parámetros: tiempo,

temperatura, concentración y dosis de inductor. Posterior detección de la proteína en el citosol.

- Experimento 3: expresión del gen RARRES1, mediante el vector pTriEx-6, en la célula de mamífero HEK 293 F. Posterior detección de la proteína en el citosol.

Posteriormente, hemos analizado los resultados obtenidos en las tinciones con azul de comassie y los Western Blot para conocer las condiciones óptimas de expresión del gen RARRES1.

En conclusión, los tres experimentos han permitido expresar satisfactoriamente RARRES1, hecho sorprendentemente positivo teniendo en cuenta la elevada complejidad de la proteína. Así pues, esta investigación permitirá a los investigadores del IBB profundizar en el estudio de este gen (y su respectiva proteína) que todos esperamos que represente, en un futuro próximo, un importante supresor tumoral.

Finalmente, habiendo realizado este trabajo de investigación quisiéramos dar las gracias al proyecto Argó de la Universidad Autónoma de Barcelona porque nos ha dado la oportunidad de entrar en contacto con el mundo de la investigación científica.

Asimismo queremos agradecer el interés y dedicación de la doctora Júlia Lorenzo, principal responsable de nuestra estancia de investigación, y de todo el departamento de Ingeniería de Proteínas y Enzimología por haber estado siempre dispuesto a echarnos una mano. Vaya también nuestro agradecimiento a la biotecnóloga Olívia Tort, que ha sido indispensable en la realización de nuestra investigación, ayudándonos en todo momento tanto en el laboratorio como posteriormente, en la redacción de este trabajo.

Por último, nos gustaría dar las gracias a la bióloga Mireia Panadés, tutora de nuestro trabajo de investigación, por su incondicional apoyo, atención, orientación, motivación... y por habernos cedido el 200% de su tiempo libre. Además, fue ella quien nos animó a participar en este concurso y nos guió en

la realización de una bibliografía extensa, estructurada y muy rigurosa cuyo objetivo es respetar en todo momento a los autores de nuestras diferentes fuentes de información ya sean éstas artículos científicos, libros o páginas web.

Por último, dar la gracias a familiares y amigos, que nos han acompañado durante este proceso con su apoyo.