

BM-II**DISEÑO Y ELABORACIÓN DE MUTANTES TRUNCADAS DEL AUTOANTÍGENO HSRP72, PRESENTE EN DERMATOMIOSITIS PARA IDENTIFICAR SUS SITIOS DE FOSFORILACIÓN**

Arana-Argáez Victor E, Martín-Márquez Beatriz T, Maldonado-González M, Martínez-García Erika A, Delgado-Rizo Vidal, Muñoz Valle José F, Vázquez-Del Mercado Mónica.

Instituto de Investigación en Reumatología y del Sistema Músculo Esquelético, CUCS, Universidad de Guadalajara. e-mail: victoraranaargaez@yahoo.com.mx

Palabras clave: Dermatomiositis, hSRP72, mutantes truncadas.

Introducción: La dermatomiositis (DM) es una enfermedad reumática autoinmune caracterizada por grave afección al tejido muscular y cutáneo, principalmente en la región de la cintura escapular y pélvica, provocando una enfermedad altamente incapacitante y casos severos presentan importante afección a órganos internos tales como corazón y pulmones.^{1,2} En la búsqueda de proteínas fosforiladas reconocidas por el sistema inmune como autoantígenos, se identificó en suero derivado de pacientes con DM, la inmunoprecipitación del complejo SRP (del inglés *Signal Recognition Particle* ó Partícula de Reconocimiento de Señal), en especial la subunidad de 72 kDa humana (hSRP72), la cual es fosforilada selectivamente en sus residuos de serina.³ Esta subunidad tiene un importante papel en la translocación de proteínas de secreción a través de retículo endoplásmico. Sin embargo se desconoce: 1) Si la fosforilación de esta proteína actúa como mecanismo de inducción de autoantigenicidad en DM, 2) La región específica donde la fosforilación ocurre y 3) La cinasa responsable de catalizar este evento postraduccional, resultando la pérdida de la tolerancia hacia esta proteína.

Objetivo: Identificar el o los posibles sitios de fosforilación de la proteína hSRP72, mediante el uso de mutantes truncadas.

Metodología: Con base en la secuencia que codifica a la proteína hSRP72, se realizó un mapeo de residuos de S capaces de fosforilarse y diseñaron primers para amplificar 13 mutantes truncadas mediante PCR (desde el inicio de la proteína hasta el posible sitio de fosforilación) tomando como template al constructo clonado y amplificado pRS314-hSRP72, verificado por secuenciación y digestión con enzimas de restricción *BamHI*, *Xho I*, *Xba I* y *EcoR I*. Los productos se observaron mediante gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se escindieron del gel y se purificaron para separar el ADN plasmídico del ADN bacteriano. Se secuenciaron para verificar su correcta amplificación. Posteriormente se sometieron a fosforilación mediante pruebas de traducción *in vitro* en un sistema de ribosomas libre de células (TNT quick coupled T/T system) y marcaje con ³²P γ ATP, el producto fue analizado por medio de un gel de poliacrilamida al 12% y sometido a autoradiografía.

Resultados: Fue clonado el constructo pRS314hSRP72, el cual fue transformado y amplificado en células competentes *E.coli* Top Ten One Shot Invitrogen™, se purificó el ADN plasmídico de ADN bacteriano y se comprobó la correcta integridad del constructo por digestión por endonucleasas de restricción y secuenciación. Se amplificaron con éxito 13 mutantes truncadas de la proteína hSRP72 mediante PCR usando como template al constructo pRS314-hSRP72. Los productos fueron secuenciados para verificar su integridad y se observaron mediante un gel de agarosa al 2%. La técnica de traducción *in vitro* y marcaje con ³²P α ATP permitió fosforilar con éxito a la proteína hSRP72.

Discusión: Se comprobó la correcta amplificación de cada una de las 13 mutantes truncadas del autoantígeno hSRP72 mediante el uso de endonucleasas de restricción observando los fragmentos esperados y el análisis de los electroferogramas resultantes de la secuenciación. Las pruebas de traducción *in vitro* fueron exitosas al obtenerse la traducción del ADN de las mutantes truncadas amplificadas a su correspondiente secuencias polipeptídica.

Conclusiones: Técnicas de Biología Molecular como clonación directa y el uso de mutantes truncadas nos permitió clonar al autoantígeno hSRP72 y fragmentar esta proteína para la posterior identificación del o los segmentos del autoantígeno en donde la fosforilación ocurre en pacientes con DM, ya que dilucidar mecanismo por los cuales se pierde la tolerancia hacia esta molécula, abre una gran gama de posibilidades para diseñar terapias individualizadas en pacientes que sufren enfermedades autoinmunes y curar de manera definitiva estas enfermedades atacando el origen mismo de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Dalakas MC, et al. *Lancet* 2003; 362: 971-982.
2. García I. *Rev Mex Reumat* 2002; 17: 195-198.
3. Utz PJ, et al. *J Biol Chem* 1998; 273: 35362-35370.