

CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA DEL PLASMA SEMINAL OVINO CON CAPACIDAD REPARADORA Y PROTECTORA DEL DAÑO POR FRÍO

M. Fernández-Juan, S. Acín, J. Osada, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La existencia de factores en el plasma seminal que modulan la calidad espermática es un hecho ampliamente aceptado. Particularmente, a la fracción proteica G6 del plasma seminal ovino se le ha asignado capacidad protectora y reparadora del daño ejercido por choque térmico [1] denominando a las proteínas que mayoritariamente la componen, de 14 y 20.5 kDa, como RSVP o Ram Seminal Vesicle Proteins.

La posibilidad del uso generalizado, como crioprotectores, de estas proteínas implica disponer de ellas en cantidad adecuada. Esto, entre otras posibilidades, requiere la determinación de su origen biosintético, para una futura clonación y sobreexpresión.

Resultados preliminares indicaban que la principal fuente de las proteínas de la fracción G6 serían las vesículas seminales. Si bien, el conducto deferente podría ser otro de los tejidos involucrado en su síntesis. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido determinar y verificar cual o cuales de los tejidos del aparato genital de morueco están realmente implicados en la síntesis de esta fracción con capacidad protectora y reparadora [1].

MATERIAL Y MÉTODOS

Las vesículas seminales y el conducto deferente, tejidos objeto de estudio, procedían de dos machos, moruecos de la raza *Rasa Aragonesa*. Estos tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C.

El RNA total se obtuvo por homogenización del tejido en el medio TRI-REAGENT™, mezcla compuesta por guanidinio tiocianato y fenol, (Sigma) [2, 3]. El Poli (A)⁺ RNA fue aislado usando el PolyATtract mRNA Isolation System (Promega) [4]. La retrotranscripción-RT se realizó a partir de 70-80 ng de mRNA de vesícula seminal utilizando como primer Oligo (dT)₂₀, y la enzima SuperScript™ III RT (Invitrogen™). Las muestras de cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Una vez que las muestras fueron retro-transcriptas se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa-PCR (SuperScript™ III RT-PCR System, Invitrogene). Se realizó una PCR de 30 a 35 ciclos, según primers, a partir de los cDNAs procedentes de la vesícula seminal. Las condiciones iniciales constaban de una etapa de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, una etapa de hibridación de 1 minuto y 30 segundos, y 3 minutos de extensión a 72°C. Previo a la reacción en cadena de la polimerasa las muestras de cDNA se desnaturalizaron a 94°C durante 1 minuto, y como etapa final se realizó una elongación de 10 minutos a 72°C. El proceso se llevó a cabo adicionando 1 U de la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogene) y 2-3 µl del cDNA a cada tubo de reacción.

La síntesis de los cebadores o primers se basó, inicialmente, en la secuencia primaria de aminoácidos obtenida a partir de la secuenciación de Edman (secuenciación del extremo amino terminal). De la RSVP-20 se conocían 29 aminoácidos del extremo amino-terminal (Asp Glu Pro Leu Pro Asp Val Tyr Asp Val Leu Gly Met Leu Cys Cys Thr Trp Ser Tyr Tyr Tyr Ala Asp Gln Gly Gly Pro Pro).

Los cebadores RSVP20-5' (5'-GATGAICCTICCTICIGA-3') y RSVP20-3' (5'-ATGCTITGCTGCACITGG-3') se diseñaron basándose en los residuos de aminoácidos 1-6 y 13-18, respectivamente; la longitud esperada, del fragmento amplificado por RT-PCR, era de 500 pb. Para los cebadores VS2-right (5'-CTGCCAAGCATATTCTCGCT-3') y VS2-left (5'-GCTGGTGCTCAAGTGGAGA-3') se utilizó el programa Primer3 (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi), según la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de una amplificación inicial, mediante PCR, de los cDNAs generados por el primer RSVP20-5'. En este caso la longitud esperada, del fragmento amplificado por RT-PCR era de 300 pb.

El alineamiento de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante el programa Clustal X (1.81). Se realizaron búsquedas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de las secuencias de nucleótidos, DNA, con homologías significativas con las secuencias obtenidas, mediante amplificación, a partir de nuestros primers. Igualmente, se realizaron búsquedas de las secuencias de aminoácidos, secuencia de DNA trasladada a proteína, con homologías significativas con las secuencias generadas por PCR.

El aislamiento de DNA de un gel de agarosa se realizó mediante el kit de aislamiento GeneClean Turbo [5] y la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR fue realizada por la Unidad de Genómica, Servicio Interdepartamental de Investigación (Universidad Autónoma de Madrid).

Para la técnica del Northern-Blot el RNA total, a partir de vesícula seminal y conducto deferente, se obtuvo por homogenización del tejido según se indica anteriormente. Las muestras problema, aproximadamente 5 µg de RNA total, se cargaron por triplicado, junto a la calle referencia (calle que permite determinar la movilidad del RNA en el gel). El gel se corrió durante 18 horas a 25 voltios. La transferencia se llevó a cabo durante 1 hora a 30 V máximo, y el revelado se realizó con la sonda RSVP-20 marcada radiactivamente con α -³²P-dCTP obtenida a partir de la RT-PCR. En todos los casos se cargó como control de carga la β -actina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estrategia utilizada para analizar la implicación de cada tejido se ha basado en la obtención de sondas específicas para la secuencia génica de las proteínas mayoritarias de la fracción G6 y su uso mediante Northern-blot para el análisis de los mRNAs de ambos tejidos.

A partir del cebador RSVP20-3', coincidente con una región amino-terminal de la proteína con menor degeneración, se sintetizó el cDNA utilizado como sonda. Este cebador, con una temperatura de fusión 62.7°C, aportó amplificaciones inespecíficas, dando lugar a dos productos de PCR con unos tamaños de aproximadamente 450 pb y 500 pb cuando se realizó la hibridación a 57°C. Esto implicaba la utilización de ambos productos como sonda radiactiva y por tanto la complicación en la técnica del Northern-blot.

Simultáneamente se probó el cebador RSVP20-5', diseñado a partir de una secuencia con mayor degeneración, con una temperatura de fusión 52.6°C, dando lugar a una amplificación específica con un tamaño del producto de PCR acorde a lo esperado, de aproximadamente 500 pb, cuando se realizó la hibridación a 52°C.

Puesto que el producto de amplificación obtenido con el primer RSVP 20-5' era único y por tanto la reacción en cadena de la polimerasa para este cebador era específica, se utilizó éste como cebador que permitiría obtener la sonda para el Northern-blot. Esta técnica permite determinar la expresión génica en los tejidos de estudio.

Cuando la sonda utilizada procedía de los cDNAs obtenidos mediante el primer RSVP 20-5' el conducto deferente representaba el 2.30% de la síntesis de la RSVP-20 con respecto a la vesícula seminal, considerando este último tejido como el 100% (imagen no presentada en texto), siendo la longitud media calculada para el mRNA que codifica para la RSVP-20 de 600 pb.

La secuenciación de este producto de amplificación permitió por un lado la síntesis de nuevos primers más específicos y por otro la búsqueda de homologías en las bases de datos.

Resultados posteriores, obtenidos mediante Northern-blot, demostraron que la síntesis del mRNA que codifica para la RSVP-20 es exclusiva de la vesícula seminal. En este experimento la sonda utilizada procedía del fragmento amplificado a partir del par de cebadores VS2-right + VS2-left (Fig. 1). Ambos cebadores VS2-right + VS2-left, con unas temperaturas de fusión de 64.2 y 64.4 respectivamente, fueron ensayados a una temperatura de hibridación de 66°C.

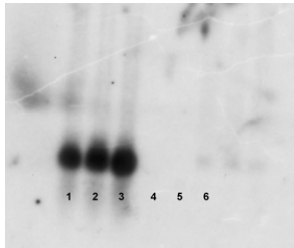


Figura 1: Análisis de la expresión génica para la RSVP-20 mediante Northern-blot. Líneas 1, 2 y 3: 5 µg de RNA total de vesícula seminal por calle; Líneas 4, 5 y 6: 5 µg de RNA total de conducto deferente por calle. La sonda, 65 ng, procede del producto de amplificación obtenido a partir de los primers VS2-right + VS2-left.

Estos resultados permiten afirmar que la expresión génica de la RSVP-20 es atribuible a la vesícula seminal, dato que confirma resultados preliminares obtenidos a partir de técnicas inmunoquímicas e inmunohistoquímicas a partir de los anticuerpos policlonales anti-G6, y anti RSVP-20, producidos en conejo mediante la inmunización de estos animales y posterior sangrado.

La búsqueda en las bases de datos NCBI confirman homologías de la secuencia de 500 pb obtenida mediante RT-PCR con el cebador RSVP 20-5' con diversas proteínas del plasma seminal y con proteínas de secreción vesicular entre la que destaca la proteína del plasma seminal 30K de *Bos taurus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. *Biol Reprod* 63(5): 1531-7, 2000.
2. Chomczynski P. *Biotechniques* 15(3): 532-4, 536-7, 1993.
3. Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem* 162(1): 156-9, 1987.
4. Wallace DM. *Methods Enzymol* 152: 41-8, 1987.
5. Vogelstein B, Gillespie D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(2): 615-9, 1979.

*** Este trabajo ha sido financiado por las ayudas CICYT AGL 2002-00097, INIA RZ03-035 y CICYT-FEDER AGL 2004-02882.**