

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**TIMOTESTIN, UN PARADIGMA BIOLÓGICO O UNA FISIOLÓGIA
PROGRAMADA: ESTUDIOS *IN VITRO*.**

Por el

M.C. ROBERTO RANGEL OROZCO

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología.

Julio, 2003

TD
QP251
.R3
2003
c.1



1080124430

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**TIMOTESTIN, UN PARADIGMA BIOLÓGICO O UNA FISIOLÓGIA
PROGRAMADA: ESTUDIOS *IN VITRO*.**

Por el

M.C. ROBERTO RANGEL OROZCO

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología.

Julio, 2003

TD


QP251

*R3

2003



Directores de Tesis



Dr. Héctor Martínez Valdez

Director Externo

Departamento de Inmunología

MD Anderson Cancer Center



Dr. Juan Manuel Alcocer González


Director Interno

Laboratorio de Inmunología y Virología

Facultad de Ciencias Biológicas

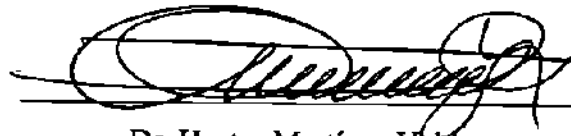
UANL

Comité de Examen de tesis:



Dr. Juan Manuel Alcocer González

Presidente



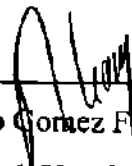
Dr. Hector Martínez Valdez

Secretario



Dra. Diana Reséndez Pérez

Primer Vocal



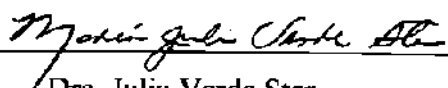
Dr. Ricardo Gómez Flores

Segundo Vocal



Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Tercer Vocal



Dra. Julia Verde Star

Directora de Postgrado

El presente proyecto de investigación se realizó en colaboración entre el Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y el Departamento de Inmunología de la Universidad de Texas-MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, E.U.A.

DEDICATORIA

A Dios

A mi esposa Liliana Guzman Rojas, por apoyarme en todo momento y darme la dicha de ser Papá.

A mi hijo Roberto Rangel Guzman, que esta presente en todo momento de mi vida. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco :

A mis familias Rangel Orozco y Guzman Rojas por apoyarme y entender mis deseos de superación. En todo momento estuvieron conmigo. Gracias.

Al Dr. Héctor Martínez Valdez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y quien contribuyó enormemente en mi carrera científica, gracias por su imagen, confianza, paciencia y afecto.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer Gonzalez, por brindarme la oportunidad de ser su alumno y su ayuda incondicional. Gracias.

Al la Dra. Diana Resendez Perez, al Dr. Ricardo Gomez Flores, y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por su apoyo, críticas y colaboración durante este tiempo. Gracias.

A los Drs. Miles F. Wilkinson, Michael R. Blackburn y Gary Gallick por sus críticas constructivas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los integrantes del laboratorio, a Liliana, Jenny, Connie, Kelly y Cristina, por su ayuda y amistad.

Al Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo brindado.

Al Departamento de Inmunología del la Universidad de Texas-MD Anderson Cancer Center por la facilidades brindadas para realizar este trabajo de investigación.

Al personal de la Sub-Dirección de estudios de Post-Grado de Ciencias Biológicas de la UANL por su amable disposición.

A la fundación Bob R. Smith por la beca doctoral que me otorgó durante la realización de este proyecto de investigación.

Al apoyo económico de la Sociedad de Leucemia y Linfoma (6147-99 ; 6161-03); y a la Sociedad Krause-Davidson por los fondos otorgados para la elaboración de esta tesis doctoral.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	18
1.1. El timo	19
1.2. El tejido testicular	21
1.3. Embriogénesis del sistema inmune y reproductor	23
1.3.a. Sistema inmune	23
1.3.b. Organos reproductores	24
1.4. Proteínas tirosinas cinasas de la familia Src	24
1.4.a. Tirosina cinasa pp60 c-src	25
1.5. Un mecanismo molecular común	26
2. ANTECEDENTES	27
3. HIPOTESIS DEL TRABAJO	29
4. IMPORTANCIA, JUSTIFICACION Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO	30
5. OBJETIVOS	32
5.1. Objetivo general	32
5.2. Objetivos especificos	32
6. MATERIAL Y METODOS	35
6.1 Plásmidos	35
6.2 Reactivos moleculares	35
6.3 Líneas celulares	36
6.3.1. Transfecciones	36
6.4 Anticuerpos	37
6.5. Animales	38
6.5.1. Ratones hipofectomizados	38
6.5.2. Protocolo de inmunización y purificación celular	38
6.6. Aislamiento de ARN total de diferentes tejidos murinos	39
6.7. Purificación celular mediante citometría de flujo	41

6.8. Clonación, secuenciación y caracterización de las clonas	41
6.9. Northern blot y radiomarcaje de sondas	41
6.10. Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	43
6.11. Southern blot	44
6.12. Hibridación <i>in situ</i>	45
6.13. Transcripción/traducción <i>in vitro</i> y SDS-PAGE	48
6.14. Western blot	50
6.15. Programas analíticos	51
6.16. Citocentrifugación celular y microscopía de fluorescencia	52
6.17. Tamizaje de fosforilación (phosphospot)	52
6.18. Ensayo de inmunocomplejos cinasas.	54
6.19. Aislamiento de la fracción del citoesqueleto y citosol	55
7. RESULTADOS	56
7.1. Relevancia de timotestín durante los estadios embrionario, fetal, post-natal y adultos del sistema inmune y reproductor	56
7.1.1.a. Timotestín se expresa durante etapas embrionarias	56
7.1.1.b. Timotestín se expresa en tejidos hematopoyéticos y linfoides durante etapas fetales y adultas	58
7.1.2. Análisis de expresión de timotestín en el sistema inmune	60
7.1.2.a. Timotestín se expresa principalmente en timocitos maduros localizados en la médula del timo	60
7.1.2.b. La expresión de timotestín es antígeno-independiente y exclusiva de la maduración intratímica	64
7.1.3. Análisis de expresión de timotestín en tejido reproductor	67
7.1.3.a. Timotestín se expresa selectivamente en tejido testicular	67
7.1.3.b. Timotestín se expresa en células germinales	68
7.1.3.c. Timotestín se expresa en estadios críticos de la espermatogénesis	69
7.1.3.d. Regulación hormonal sobre la expresión de timotestín	71

7.2. Propiedades estructurales de la proteína timotestin	74
7.2.1. Identificación de los motivos que deducen la localización subcelular y sugieren su relevancia funcional	74
7.2.2. Timotestin es una proteína con una masa molecular de 102 kilo Daltons (kda)	78
7.3. Confirmación de que timotestin se localiza en la membrana celular	80
7.4. Función de timotestin	81
7.4.1 Timotestin activa la proteína tirosina cinasa pp60 c-src	82
7.4.2. Timotestin se co-localiza e interacciona con la proteína tirosina cinasa pp60 c-src en la superficie de linfocitos T	86
7.4.3. Timotestin induce la translocación de pp60 c-src hacia el citoesqueleto	89
8. DISCUSION	92
9. CONCLUSIONES	103
10. ESTUDIOS FUTUROS	104
REFERENCIAS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Timotestín se expresa durante la embriogénesis	57
2	Distribución tisular de timotestín en tejidos embrionarios y adultos	59
3	Timotestín se expresa en linfocitos CD3 ⁺ de timo	62
4	Expresión de timotestín por distintas subpoblaciones de timocitos maduros	63
5	Timotestín se expresa en timocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺	64
6	La expresión de timotestín es antígeno-independiente	66
7	Expresión selectiva de timotestín por el tejido testicular	67
8	Timotestín se expresa selectivamente en espermatozoides	69
9	La expresión de timotestín con la espermatogénesis del ratón	71
10	La hormona luteinizante favorece la expresión de timotestín en testículo	73
11	Secuencia de aminoácidos de la proteína timotestín	77
12	La proteína timotestín tiene una masa molecular de 102 kDa	79
13	Timotestín se localiza en la membrana de células K562	81
14	Análisis de expresión de la proteína GFP en células K562	81
15	Timotestín activa la caseína cinasa II y la proteína tirosina cinasa c-src	83
16	Análisis de expresión y fosforilación de la proteína tirosina pp60 c-src	86
17	Timotestín y la proteína tirosina cinasa pp60 c-src, interaccionan físicamente	88
18	Timotestín y la proteína pp60 c-src se localizan en forma polar en la membrana de la línea celular Jurkat que expresa la proteína recombinante	89
19	Timotestín transloca la proteína cinasa c-src hacia el citoesqueleto	91

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema		Página
1	Organización celular del timo	60
2	Protocolo de inmunización	65
3	Cronología de la maduración de células germinales masculinas murinas	70
4	Control de la espermatogénesis por hormonas del eje hipofisario-testicular	72
5	Modelo hipotético de la proteína timotestin en timocitos y células germinales	78
6	Tamizaje comercial para proteínas cinasas	82
7	Representación gráfica de la proteína tirosina cinasa pp60 c-src y sus principales características fisicoquímicas y biológicas	84
8	Modelo hipotético de interacción entre la proteína timotestin y la tirosina cinasa pp60 c-src	87
9	Timotestin representa un vínculo de unión entre dos fisiologías distintas mediante un mecanismo común: migración asociada a maduración celular	93
10	Representación gráfica de los eventos de migración y maduración de los órganos linfoides y reproductores durante la embriogénesis	99
11	Mecanismo de acción hipotético de la proteína timotestin en los eventos de migración celular	102

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Aminoácidos de la proteína timotestin con una alta probabilidad de fosforilación	76

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
CD	Grupo de diferenciación
cm	Centímetro
Ci	Curie
c-src	Contraparte del virus del sarcoma de Rous
gr	Gramos
G418	Gentamicina
Kb	kilo base
KDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molaridad
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional de Información y Biotecnología
nt	Nucleotidos
ORF	Marco de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
pI	Punto isoeléctrico
pp60	Proteína de 60 Kda
P.M.	Peso molecular

RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundo
TEMED	N',N',N',N', Tetrametiletilendiamino
Tm	Temperatura de apareamiento
V	Volts
W	Watts

LISTA DE SIGNOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
μ	Micra
μgr	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentaje
C	Porcentaje de entrecruzamiento de la acrilamida
T	Porcentaje total de acrilamida