



# Clonación y caracterización del gene del receptor derivado de estroma 1 (SDR1), un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas

Nelson D. López, Departamento de Química Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Kyoto Japón. Tobías Mojica, Carlos E. Molano. Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

## ABSTRACT

Using the signal sequence trap (SST) method we isolated and sequenced the Stromal Derived Receptor-1 (SDR1), a new mouse gene. Two cDNAs clones were detected: a and b (1.9 and 2.4 Kb, respectively). SDR1 belongs to the immunoglobulin superfamily with four cysteines located at highly conserved positions. a and b molecules contain a signal peptide, two immunoglobulin-like domains (C2- and V-type), transmembrane and cytoplasmic domains. b form has an additional specific domain encoding a stretch of 116 residues.

## INTRODUCCIÓN

El método de la Trampa por Péptido Señal (TPS del inglés Signal Sequence Trap, SST) (1) se desarrolló con el fin de clonar DNA complementarios que codifican secuencias específicas en el extremo amino-terminal, de su producto como aquellas que codifican para moléculas de comunicación intercelular o para receptores de membrana. Varios fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases (2) fueron clonados usando el método de TPS, a partir de una biblioteca de DNA complementario, construida de la línea celular ST-2, derivada del estroma de la médula ósea de ratón (1). Después de secuenciarlos se encontró que algunos de ellos codificaban para proteínas que portan porciones hidrófobas en su extremo amino-terminal compatibles con la estructura del péptido señal. La com-

paración con secuencias del banco de datos Swiss-Prot, al nivel de proteína, reveló que algunas de ellas aún no habían sido descritas en la literatura, por lo cual se decidió continuar su caracterización. Uno de los clones así obtenidos (TPS-S1) permitió aislar un clon de cDNA que se secuenció en su totalidad. Se demostró que dicho gen, denominado SDR1 (de sus siglas en inglés Stromal Derived Receptor 1), pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las enzimas de restricción, el fragmento klenow de la DNA polimerasa I de *E. Coli* y otras enzimas utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas de Takara Shuzo Co. Ltd. (Kyoto, Japón); oligonucleótidos marcados con fósforo radioactivo se obtuvieron de Amersham.

**Aislamiento del cDNA SDR1 a de ratón:** una biblioteca de DNA complementario se construyó a partir de ARN mensajero obtenido de la línea celular ST-2 de estroma de médula ósea de ratón. El fago para la construcción fue lambda (Igt22A) (1). El fragmento TPS-S1 se utilizó como sonda para aislar el cDNA de SDR1 a (1). TPS-S1 fue marcado radioactivamente por el método de marcación al azar con el kit de marcación de DNA, versión 2 de Takara (Japón) bajo las condiciones

recomendadas por el fabricante. Las membranas se procesaron de acuerdo a protocolos ya descritos (3). Después del tamizaje secundario se seleccionaron cuatro clones independientes para análisis subsecuentes. Cada uno de los clones de fago que contenían el fragmento de interés fueron digeridos con las enzimas Not I y Sal I bajo condiciones recomendadas por el fabricante y subclonados en el plásmido pBluescript (Stratagene). El DNA de los plásmidos fue purificado mediante columnas de QIAGEN para realizar el mapa de restricción y para secuenciamiento de los extremos del DNA insertado utilizando los primers T3 y T7 del pBluescript. El clon que contenía el fragmento de DNA más largo (1.9 KB) fue el que se usó para secuenciar la totalidad del DNA insertado.

**Aislamiento del cDNA SDR1 b de ratón:** la presencia de cDNA de SDR fue investigada en una biblioteca de DNA complementario de cerebro de ratón clonada en el vector Uni-Zap de STRATAGENE. La sonda fue el cDNA completo de SDR1 a. Se analizaron 6 clones independientes, cuatro de los cuales presentaban secuencias de DNA insertadas, de mayor longitud que los dos restantes. Los fragmentos insertados de DNA se subclonaron en el plásmido pBluescript. Se realizó el mismo procedimiento de mapeo de sitios de restricción y de secuenciamiento

de los extremos de los fragmentos insertados como se explicó en la sección anterior. El secuenciamiento reveló que todos los clones tenían secuencias sobrelapadas en sus regiones 5' y 3'. Dos de los clones aislados mostraron una longitud de 1.9kb, igual a la longitud de cDNA de SDR1 a Los cuatro restantes mostraron una longitud de 2.4 Kb. Por esta razón el clon número 5, que mostraba una región no traducida 5' de mayor longitud, fue el elegido para ser secuenciado.

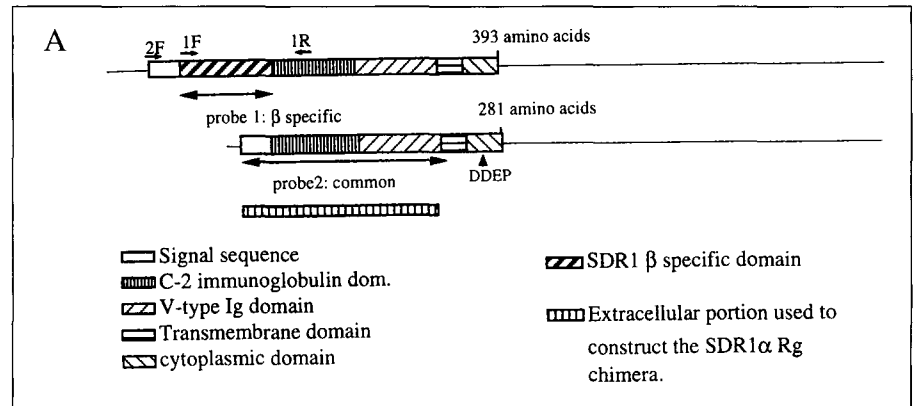
**Secuenciamiento del DNA:** Se utilizaron diferentes sitios de restricción para subclonar fragmentos de cDNA parciales de SDR1 a o b. Se sintetizaron varios primers para secuenciar regiones que mostraron alguna ambigüedad en la composición nucleotídica. La secuencia se determinó en ambas bandas por el método automatizado con fluorescencia de Applied Biosystems Inc.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fragmento de DNA complementario contenido en el clon TPS-S1, se utilizó como sonda para buscar, en una biblioteca de cDNA derivada de la línea celular ST-2 (cebada con oligodT) (2), cuyo resultado fue la clonación de SDR1 a completo y, a su vez, el cDNA a sirvió como sonda para buscar en una biblioteca de cDNA de cerebro de ratón (cebada con oligodT) encontrándose el cDNA correspondiente a la forma b. Ambas formas están representadas esquemáticamente en la figura 1.

### RECEPTOR DERIVADO DE ESTROMA 1a (D50463)

El secuenciamiento fue efectuado siguiendo la estrategia representada en la figura 2. Los sitios reconocidos por diferentes enzimas de restricción fueron empleados para subclonar frag-



**Figura 1.** Representación esquemática de las características estructurales más importantes de SDR1 a y b. Se indican la secuencia inferida del péptido señal, los dominios de las inmunoglobulinas, el dominio específico para la forma b, el segmento inferido que atraviesa la membrana celular y la porción citoplásmica. También se representa la posición de los primers empleados para examinar la región no traducida 5' de los SDR1 cDNA a y b. En la forma a encontramos una inserción (DDEP) presente solo en una fracción de SDR1 b.

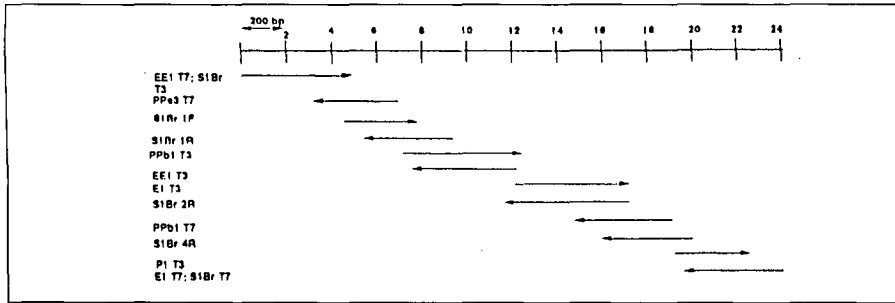
mentos de cDNA y posteriormente secuenciarlos. La designación de los subclonos aparece a la izquierda de la figura 2. Como se muestra en la figura 3, el DNA complementario tiene una longitud de 1915 pares de bases que terminan en una cola de poli(A) de 15 nucleótidos situados en el lado 3' de la secuencia consenso de poliadenilación (AATAAA). La porción no traducida del extremo 5' es de 27 pb seguida de un marco de lectura abierto de 846 pb y una región 3' no traducida de 1042 pb.

La secuencia de DNA especifica una proteína inferida de 281 aminoácidos. El análisis hidropático (fig. 4) demostró la presencia de dos fragmentos con características hidrófobas. El primero está constituido por 27 aminoácidos en el extremo amino del polipéptido y es compatible con la estructura del péptido señal. La segunda región hidrófoba está localizada en la porción C-terminal, consiste de 23 aminoácidos (del 220 al 242) y llena los criterios de una región transmembrana. A partir del aminoácido 243 comienza una región citoplásmica corta que va hasta el aminoácido 281. La forma madura de SDR1 contiene 4 cisteínas en posicio-

nes altamente conservadas dentro de la molécula y dos dominios de inmunoglobulinas: uno hacia el extremo amino que corresponde al tipo C2 (aminoácidos 46 a 110) y el segundo, más cercano a la membrana, es del tipo V (entre los aminoácidos 134 y 207). La región extracelular está compuesta de 192 aminoácidos (desde la posición 28 a la 219). Además, en la proteína SDR1a se encontró una inserción (DDEP) que está presente solo en una fracción de los cDNA de SDR1b.

### RECEPTOR 1b DERIVADO DE ESTROMA

El gen del receptor 1b derivado de estroma tiene 490 nucleótidos más que la forma a, o sea, 2405 pares de bases de longitud. La porción no traducida del extremo 5' está compuesta de 181 nucleótidos. Le sigue un marco abierto de lectura de 1182 pares de bases que codifica para una proteína de 393 aminoácidos. La forma b tiene un dominio adicional específico de 116 aminoácidos. La región no traducida 3' es idéntica a la descrita para la forma a con la secuencia consenso de poliadenilación y la cola de poly (A)



**Figura 2.** Estrategia de secuenciación del clon de DNA complementario de SDR1. La escala indica las posiciones de los nucleótidos (en pares de bases) comenzando por la primera base del cDNA de SDR1 a. Los sitios reconocidos por enzimas de restricción fueron utilizados para generar fragmentos de DNA complementario que se subclonaron para su posterior secuenciación. A la izquierda están las designaciones de los subclones que se obtuvieron. Las flechas indican la dirección y extensión del secuenciación obtenidos para cada uno de los clones.

en las mismas posiciones; como se muestra en las figuras 1 y 3. El análisis de la proteína inferida b demostró la presencia de características similares a la forma a, es decir, un perfil hidropático similar, la presencia de cuatro cisteínas en regiones altamente conservadas y los mismos dominios de inmunoglobulinas (C2 y tipo V). Adicionalmente se encontró un tercer dominio, cuya comparación en el banco de datos no mostró hallazgos de interés.

Para verificar si existe una diferencia real en longitud en el extremo no traducido 5' entre la forma a y b (27 pb y 181 pb respectivamente), se amplificó

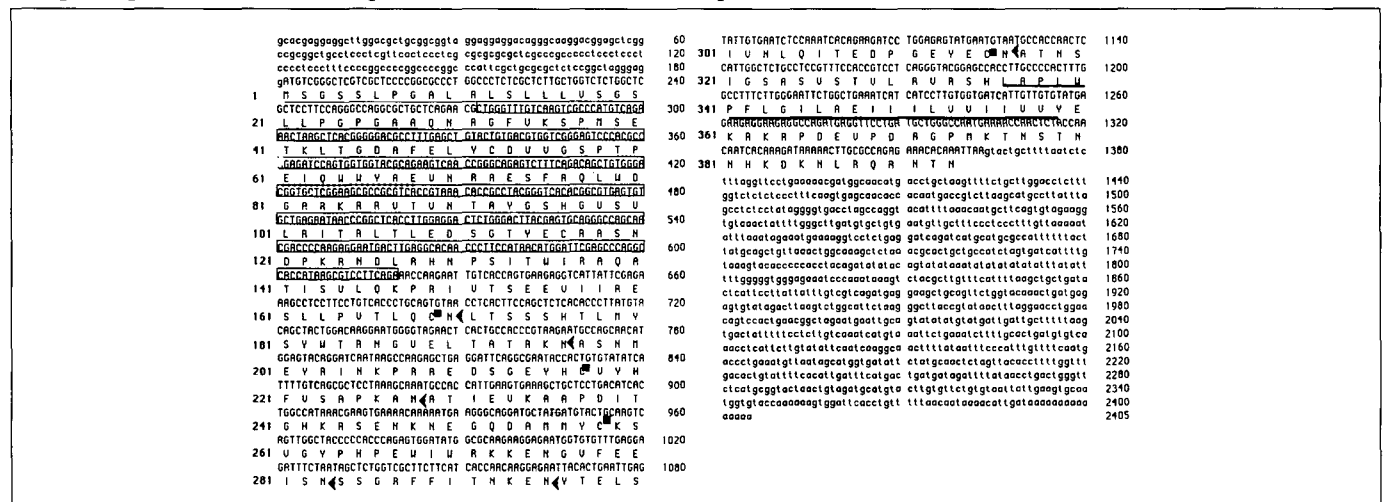
la región por PCR usando un par de primers: uno que mapea en el extremo 5' del cDNA b y otro localizado unos mil pares de bases corriente abajo del mismo, en una región que es común a las formas a y b como se observa en el esquema de la fig. 1. Una biblioteca de cDNA de cerebro de ratón, clonada en el vector Uni-Zap de Stratagene sirvió como molde para la PCR. Se obtuvieron dos bandas de 1 y 0.6 kb (no se muestran) que corresponden a los fragmentos amplificados del cDNA b y a respectivamente, lo que nos permite afirmar que la existencia de solo 27 pb en el cDNAa es debida probablemente a un artefacto durante la construcción de la biblioteca de expresión de donde

se obtuvo.

## HOMOLOGÍA DE SDR1 CON BASIGIN.

La secuencia inferida de aminoácidos de SDR1 se comparó en el banco de datos Swiss-Prot, encontrándose la más alta homología con el producto de un gen denominado basigin, que ha sido ya descrito en varias especies. Basigin codifica para una proteína de membrana implicada en la progresión tumoral (4, 5) y en el desarrollo del sistema nervioso de ratón (6). También se ha detectado su expresión al nivel de la barrera hemato-encefálica (7), y en la retina de aves (8). En el humano, su expresión está aumentada en granulocitos provenientes de pacientes con artritis reumatoidea o artritis reactiva. Estas observaciones sugieren que el gen humano de basigin codifica para una glicoproteína de membrana asociada a la activación de los granulocitos.

La homología de SDR1a con basigin es del 38 por ciento al nivel de la proteína (figura 5). La homología de la porción extracelular es del 32 por ciento, mientras que al nivel de la región transmembrana y citoplásmica corres-



**Figura 3.** Secuencia de nucleótidos (numeración de la derecha) y secuencia de aminoácidos inferida (numeración a la izquierda) de SDR1 a y b. La secuencia que especifica el dominio presente solo en SDR1 b está encerrada en un rectángulo. Las secuencias inferidas del péptido señal y de la región que atraviesa la membrana están subrayadas por líneas delgada y gruesa, respectivamente. Las cuatro cisteínas están representadas por cuadrados oscuros; los sitios potenciales de glucosilación por flechas.

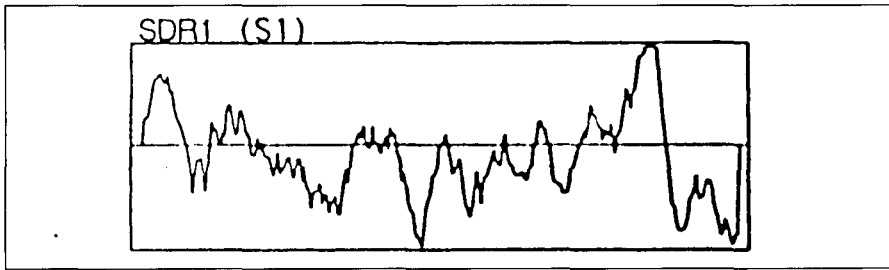


Figura 4. Análisis hidropático de la secuencia inferida de aminoácidos de SDR1.

ponde a un 63 y 52 por ciento respectivamente. La alta conservación al nivel de la región transmembrana de basigin entre las diferentes especies estudiadas sugiere una importante función en esta parte de la molécula que se ha mantenido a lo largo de la evolución. La más alta homología de SDR1 y basigin se encuentra al nivel de la región transmembrana.

**HOMÓLOGOS DE SDR1 EN OTRAS ESPECIES**

La búsqueda con el método FASTA en un banco de secuencias de proteínas reveló que el gen homólogo de SDR1 ya ha sido descrito para la rata. La comparación de la proteína SDR1 de ratón con la secuencia de la proteína reportada para la rata (9) mostró una identidad del 97 por ciento. La identidad con la proteína SDR1 humana es del 94 por ciento (manuscrito en preparación). Es de notar la casi total identidad del fragmento

de DNA específico para la forma b en las tres especies, lo que sugiere un importante papel funcional del gen SDR1.

**CONCLUSIONES**

En el presente artículo hemos descrito la estrategia para clonar y secuenciar el receptor derivado de estroma 1, un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La alta conservación de las secuencias inferidas de proteínas en las diferentes especies nos permite afirmar la importancia funcional de este gen. La comparación de la proteína SDR1 en un banco de proteínas reveló que la más alta homología es con basigin, un gen involucrado en progresión tumoral, así como también en el funcionamiento del sistema nervioso central. Considerando que la homología a nivel estructural tiene una correlación funcional, nos atrevemos a sugerir que SDR1 está de una forma u otra relacionado con funciones del sistema nervioso central.

Para dilucidar la función del gen se está estudiando su patrón de expresión en los diferentes tejidos de ratón (manuscrito en preparación).

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal Sequence Trap: A Cloning Strategy for Secreted Proteins and Type I Membrane Proteins. *Science* 1993; 261:600-603.
2. Shirozu M, Tada H, Tashiro K, Nakamura T, Lopez ND, Nazarea M, Hamada T, Sato T, Nakano T, Honjo T. Characterization of Novel Secreted and Membrane Proteins Isolated by the Signal Sequence Trap Method. *Genomics* 1996; 37:273-280.
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor. Laboratory press, New York, 1989.
4. Izumoto S, Arita N, Hiraga S, Taki T, Hayakawa T. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor and basigin- two names for the same molecule. *Cancer Res* 1996; 56:1440-1444.
5. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995; 55:434-439
6. Igakura T, Kadomatsu K, Taguchi O, Muramatsu H, Kaname T, Miyauchi T, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T. Roles of Basigin, a Member of the Immunoglobulin Superfamily, in Behavior as to an Irritating Odor, Lymphocyte Response, and Blood-Brain Barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224:33-36.
7. Seulberger H, Unger CM, Risan W. HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47-many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain-barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neurosci Lett* 1992; 140:93-97.
8. Fadool JM, Linser PJ. 5A11 Antigen Is a Cell Recognition Molecule Which Is Involved In Neuronal-Glia Interactions In Avian Neural Retina. *Develop Dyn* 1993; 196:252-262
9. Langnaese K, Beesley PW, Gundelfinger ED. Synaptic Membrane Glycoproteins gp65 and gp55 Are New members of the Immunoglobulin Superfamily. *J. Biol Chemistry* 1997; 272:821-827.

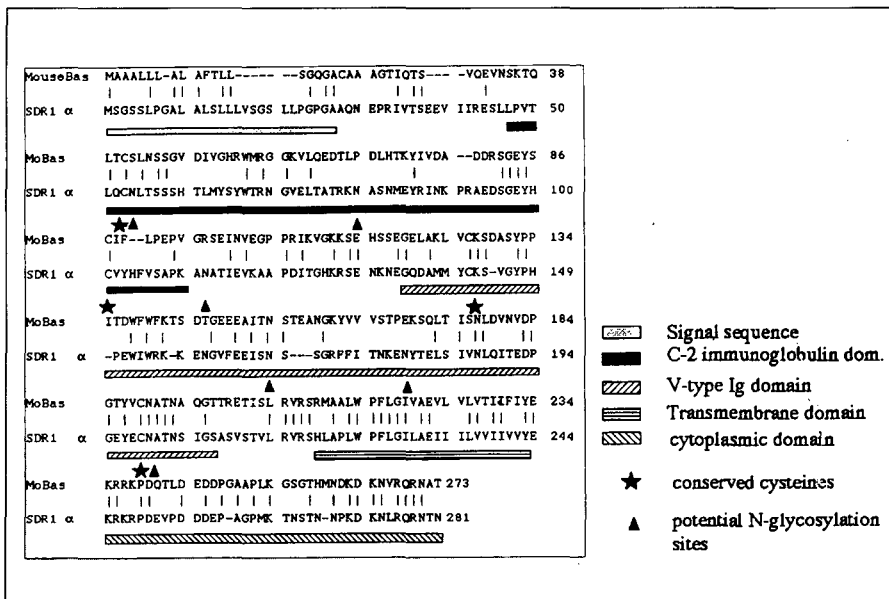


Figura 5. La homología de SDR1 a con basigin.