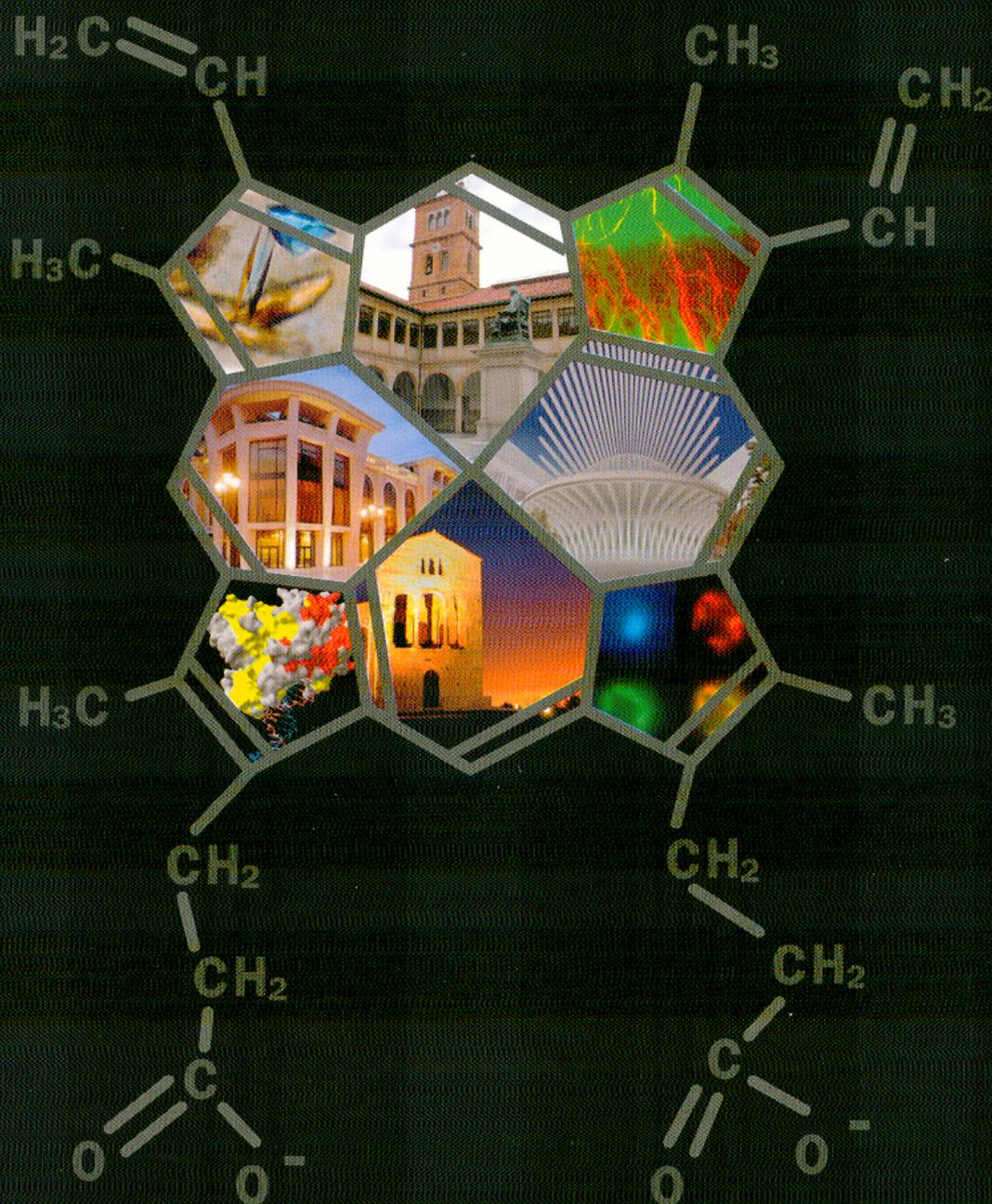


XXXII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



SEBBM - 2009

Oviedo 23-26 de Septiembre

<http://sebbm.bq.ub.es/XXXIICongreso>

e-mail: congreso2009@sebbm.com

MA.91 ESTUDIO DEL FENOTIPO DE UN RATÓN TRANSGÉNICO DE SOBRE EXPRESIÓN DEL GEN FMR1 CON UN NÚMERO DE CGGs EN EL RANGO NORMAL

A. Costa¹, R. Martínez¹, V. Bonilla-Henao², F. Sobrino³, M. Lucas¹, C.O. Pintado⁴, E. Pintado¹

¹Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Hosp. Universitario «Virgen Macarena» y Fac. de Medicina, Universidad de Sevilla. ²Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Biomedicina de Sevilla, Hospital Universitario «Virgen del Rocío», CSIC, Universidad de Sevilla. ³Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Medicina, Universidad de Sevilla. ⁴Centro de Producción y Experimentación Animal, Universidad de Sevilla.

Los pacientes portadores de premutación en el gen FMR1 (55-200 tripletes) se han considerado generalmente asintomáticos, sin embargo pueden presentar un síndrome de tremor ataxia asociado al X frágil (FXTAS) o fallo ovárico precoz en mujeres. La patología se cree que es debida al efecto tóxico del RNA con un número elevado de tripletes. Sin embargo, dado que estos pacientes tienen también niveles muy elevados del mensajero, no puede descartarse un efecto mediado por los niveles de RNA independientemente o no del número de tripletes. Para descartar esta hipótesis hemos generado un ratón transgénico utilizando el vector pSG5 y un cDNA del gen FMR1 con un número de CGGs en el rango normal. Sal I genera dos fragmentos, uno de 4,56 kb correspondiente al cDNA del gen FMR1, el promotor T7, un intrón de la β -globina y el promotor SV40; el otro fragmento de 3,03 kb corresponde al resto del plásmido. El fragmento de 4,56 purificado se inyectó en pronúcleos de ratones FVB y F1 obteniéndose varias líneas fundadoras determinadas por PCR utilizando cebadores que amplifican los dominios KH. Estas líneas se están envejeciendo para obtener grupos de transgénicos con diferentes edades y estudiar el posible fenotipo de FXTAS. Los niveles de RNAm del gen FMR1 por PCR cuantitativa (Applied Biosystems) en cerebro, hígado y músculo de los ratones transgénicos son del orden de 20-50 veces superiores a los encontrados en los ratones controles. En los estudios preliminares en campo claro con ratones de 3 meses de edad parecen existir diferencias aunque no significativas en actividad espontánea y en permanencia en los bordes del campo. Se está incrementando el número y edad de los ratones y poniendo a punto otras determinaciones para profundizar en el estudio fenotípico de estos animales.

MA.92 THE MODELING OF A SINGLE-CHAIN VARIABLE-FRAGMENT (ScFV) ANTIBODY SPECIFIC FOR A β -PEPTIDE

M. Marín-Argany¹, J. Bonet², B. Oliva², S. Villegas¹

¹Dpto. Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain. ²Structural Bioinformatics Group (GRIB), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona. Research Park of Biomedicine (PRBB), Doctor Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain.

The first report on the effectiveness of A β immunotherapy in the PDAPP mouse raised the possibility of finding a cure for Alzheimer's Disease. Single-chain variable fragments (ScFV)-VH and VL domains of any antibody, joined by a linker- have been revealed as an effective therapy in animal models and, more encouraging, do not activate microglia, show better pharmacokinetics, and can be rationally engineered, among other advantages, when compared to complete antibodies.

A 3-D model for a ScFV specific for the A β peptide has been constructed by homology-modeling, built on humanized-IgG VL and VH domains scoring the highest amino-acid sequence identity, as well as having a solved crystal structure in the protein databank (pdb). The ScFV with the pdb code 2GHW-B has the higher score, with a 70% match alignment. This pdb has been used as the template for modeling our sequence with MODELLER, rendering five possible coordinates. Among them, the construct showing the best scores calculated by ProSa was selected. The pseudo-energies are minimal in the FR regions and higher in the CDR regions, as expected from the flexibility required to perform the antigen-recognition function. Concerning energy in the linker region, 10 different structures match the selected model, and their coordinates were submitted to random search for the lowest energy conformation. Even though the best conformer has finally been selected, the fact that several conformers of this region have acceptable scores is not surprising because the sequence of the linker is already engineered to obtain flexibility between the VH and VL domains. This model allows for information relevant for rational design.

Funding: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-PI07-0148), y Fundación Mutua Madrileña (FMM-08).

MA.93 IMPLICACIÓN DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASAS (PTP1B) EN LA DISMINUCIÓN DE LA SEÑAL DE INSULINA EN EL HIPOTÁLAMO CON EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN NUTRICIONAL

M. García-San Frutos¹, T. Fernández-Agulló¹, N. Lauzurica¹, N. Gallardo², A. Andrés², M. Ros¹

¹Dpto. Ciencias de la Salud III, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad «Rey Juan Carlos», Alcorcón, Madrid, España. ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España.

Introducción: La resistencia a insulina se ha relacionado con un aumento de la expresión y/o actividad de proteínas tirosina fosfatasa, especialmente PTP1B, tanto a nivel central como periférico. Las ratas viejas presentan resistencia central a insulina debido a múltiples alteraciones en su vía de señalización. En este trabajo hemos estudiado el posible papel de las PTPs en la resistencia central a insulina durante el envejecimiento y su relación con la restricción nutricional.

Material y métodos: En extractos hipotalámicos de ratas wistar macho de 3 y 24 meses de edad, y de 24 meses sometidas a restricción nutricional crónica se determinó: la actividad fosfatasa total utilizando PNPP y la capacidad de desfosforilar a un péptido fosforilado en tirosina en los sitios de autofosforilación de la cadena b del receptor de insulina mediante el *kit PTP assay kit 1*; la activación de la PTP1B y su asociación con el receptor de insulina (RI) mediante inmunoprecipitación y *western blot*.

Resultados: A pesar de que la actividad fosfatasa total no se modifica en extractos hipotalámicos de ratas viejas, la capacidad de estos extractos para desfosforilar el péptido con la secuencia de autofosforilación en *tyr* del RI aumentó significativamente en ratas viejas. Además se observó un aumento de la fosforilación en *tyr* de PTP1B así como de su asociación con el RI en extractos hipotalámicos de ratas viejas. La restricción nutricional crónica ligeramente revertió estos parámetros.

Conclusiones: En hipotálamos de animales viejos el aumento de la actividad de la PTP1B y de su asociación con el RI podría estar implicado en la menor capacidad del receptor de insulina para activarse en respuesta a insulina. Estos cambios son parcialmente restaurados con una restricción nutricional.

MA.94 CONTRIBUCIÓN DE LA FOSFATASA PTP1B A LA ACCIÓN DE LA INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO: METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y EL GLUCÓGENO

M. Alonso-Chamorro¹, I. Nieto-Vázquez¹, L. García-Guerra¹, M. Montori Grau², A.M. Gómez-Foix², M. Lorenzo Balado¹

¹Dpto. Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. ²Dpto. Bioquímica, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Antecedentes: PTP1B es una proteína fosfatasa específica de residuos tirosina, que participa en procesos de señalización, ejerciendo como regulador negativo de la vía intracelular de la insulina. La expresión de PTP1B se incrementa en estados de inflamación, obesidad y diabetes tipo 2 asociados con resistencia a insulina. **Métodos:** Estudiamos el papel de PTP1B sobre el metabolismo del glucógeno en una cepa de ratones *knock-out* para PTP1B así como en una línea de miocitos inmortalizados, deficientes para esta proteína. Se midió el contenido y la síntesis del glucógeno, las actividades enzimáticas Glucógeno Sintasa (GS) y Glucógeno fosforilasa (GF) y se estudiaron posibles vías de señalización (*western blot*). **Resultados y discusión:** Nuestros estudios previos muestran que, los miocitos deficientes en PTP1B presentan una mayor captación de glucosa así como una mayor translocación de GLUT4 a membrana bajo estímulo de insulina, en comparación con el fenotipo *wild-type*. En los miocitos el contenido y síntesis de glucógeno así como la actividad de la enzima GS, se ven estimulados por la insulina en ambos fenotipos (*knock-out* y *wild-type*), debido a una mayor inhibición de la quinasa GSK3 así como a una menor fosforilación de la enzima GS (más activa). Además, la deficiencia de PTP1B protege frente a la resistencia a la insulina promovida por el TNF- α tanto a nivel de transporte de glucosa como de metabolismo del glucógeno. **Conclusiones:** La ausencia de PTP1B ejercería un papel protector en situaciones de resistencia a insulina, favoreciendo su acción sobre el metabolismo de la glucosa y del glucógeno en el músculo esquelético.

Agradecimientos: CIBERDEM CB07080007 ISCIII, INSINET S-SAL159-2006 (Comunidad de Madrid), Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto BFU-2008-04043).