



## TESINA DE GRADUACIÓN DE LICENCIADO EN BIOQUÍMICA

### Profundización en Biología Molecular

**Secuenciación del gen expresado diferencialmente en la profase meiótica masculina de la rata *CCDC14*, y producción de una proteína *CCDC14* recombinante.**

**Gabriel Lassabe Harguindeguy**

**Orientadora:** Dra. Adriana Geisinger

**Evaluator externo:** Dr. Claudio Martínez

Agosto, 2011

# **AGRADECIMIENTOS**

A mi orientadora, Dra. Adriana Geisinger por el espacio que me brindó en su grupo de trabajo, y por su constante apoyo y atención durante el transcurso de mi tesis.

A la Lic. Evangelina González por enseñarme a desenvolverme dentro del laboratorio y por transmitirme sus conocimientos día a día con la paciencia requerida y su permanente simpatía.

Al grupo de laboratorio del Departamento de Biología Molecular del IIBCE por el respeto, el orden y la seriedad con que se trabaja.

Al Dr. Claudio Martínez por ser el evaluador externo de mi tesis.

# RESUMEN

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular muy complejo que resulta fundamental para la reproducción sexual de las especies. El análisis de la expresión génica diferencial de la espermatogénesis en mamíferos se torna muy complicado debido, principalmente, a la alta complejidad que presenta el testículo como tejido. Aun así, entender dicho proceso a nivel molecular resulta muy interesante, debido a la gran cantidad de genes expresados diferencialmente y a las peculiares formas de regulación de la expresión génica que se presentan. A pesar de la complejidad del tejido, se han diseñado numerosas estrategias para la detección de genes expresados diferencialmente en las etapas del proceso.

El grupo de investigación de Biología Molecular de la Reproducción del Departamento de Biología Molecular del IIBCE, ha estado trabajando en la identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente en la profase meiótica masculina de los roedores. En base a un trabajo inicial en el que se implementó la técnica *mRNA differential display*, se logró identificar un gran número genes expresados diferencialmente en espermatoцитos paquiténicos de rata, varios de los cuales han sido luego estudiados y caracterizados individualmente en distintos trabajos de investigación.

Uno de los genes cuyo ARNm fue identificado como de expresión diferencial en los espermatoцитos paquiténicos (profase meiótica) en comparación con espermátidas redondas (espermiogénesis), es el gen *CCDC14*.

El objetivo de este trabajo fue la obtención de la secuencia codificante completa del gen *CCDC14* de la rata (*Rattus norvegicus*), la selección de una porción de la misma para su clonado en un vector de expresión, y la expresión y purificación de la proteína recombinante para ser usada en la producción de anticuerpos anti-CCDC14. Esos anticuerpos serían empleados posteriormente en la caracterización de la proteína CCDC14 en el testículo mediante experimentos como *Western blot*, inmunohistoquímica, y otros.

Como resultado se logró obtener empíricamente la secuencia completa del gen *CCDC14*. Posteriormente se seleccionó un fragmento dentro de la secuencia codificante, se amplificó y se clonó en el vector de expresión pGEX-5x-3 ligado al gen codificante para la GST. Como último paso se realizó la expresión y purificación de la proteína de fusión, encontrándose las condiciones óptimas para llegar a las cantidades necesarias para realizar una inmunización en conejo y lograr la consecuente producción de anticuerpos anti-CCDC14.

# TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iii
<b>1- INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I- Antecedentes Generales.....</b>	<b>1</b>
I.A- Reproducción sexual en mamíferos.....	1
I.B- Desarrollo y estructura de la gónada masculina.....	1
I.C- Espermatogénesis.....	3
I.D- Expresión génica diferencial en la espermatogénesis de los mamíferos.....	6
I.E- Métodos de análisis de la expresión génica diferencial en la espermatogénesis.....	9
<b>II- Antecedentes Específico.....</b>	<b>13</b>
II.A- <i>mRNA differential display</i> .....	13
II.B- Análisis y caracterización de los genes <i>pecanex1</i> y <i>Spats1</i> .....	16
II.C- Análisis y caracterización del gen <i>CCDC14</i> .....	16
<b>2- OBJETIVOS</b>	
<b>I- Objetivos generales.....</b>	<b>19</b>
<b>II- Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>3- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>I- RT-PCR del ADNc de <i>CCDC14</i>.....</b>	<b>20</b>
I.A- RT.....	20
I.B- PCR.....	20
<b>II- Clonación de la secuencia codificante para un fragmento de la proteína         CCDC14 en el vector de expresión pGEX-5x3.....</b>	<b>22</b>
II.A- Amplificación y purificación del fragmento a clonar.....	22

II.B- Pasaje por “vector T” .....	23
II.C- Clonado en el vector de expresión .....	24
II.C.1- El vector pGEX-5x-3 .....	24
<b>II.C.2- Obtención del vector pGEX-5x-3, en condiciones para ser ligado             al fragmento <i>CCDC14</i> .....</b>	<b>26</b>
II.C.3- Ligación del fragmento <i>CCDC14</i> al vector pGEX-5x-3 y clonado en células BL21 Star .....	26
<b>III- Obtención de la proteína recombinante GST-CCDC14.....</b>	<b>27</b>
III.A- Optimización de la expresión proteica .....	27
III.A.1- Ensayos de expresión de la proteína recombinante .....	27
III.A.2- Análisis con distintas concentraciones de IPTG .....	28
III.A.3- Análisis de la proteína de expresión en las fracciones solubles e insolubles de los extractos celulares .....	28
III.B- Expresión y purificación de la proteína recombinante .....	29
III.C- Análisis de la proteína purificada .....	30
III.C.1- Medidas de concentración y visualización de los productos mediante SDS-PAGE .....	30
III.C.2- Confirmación mediante ensayos de <i>Western blot</i> con anticuerpo anti-GST .....	30
<b>IV- Protocolos generales .....</b>	<b>31</b>
IV.A- Minipreparación de ADN plasmídico .....	31
IV.B- Electroforesis en gel de agarosa .....	32
IV.C- Elución y purificación de bandas de geles de agarosa .....	32
IV.D- Cuantificación de ácidos nucleicos .....	32
IV.E- Digestión con enzimas de restricción .....	32
IV.F- Reacciones de secuenciación y análisis de secuencias .....	33
IV.G- Generación de células competentes <i>E. coli</i> BL21 Star .....	33
IV.H- Electroforesis de proteínas SDS-PAGE .....	34

<b>4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
I- RT-PCR y secuenciación del ADNc de <i>CCDC14</i> .....	35
<b>II- Clonación de la secuencia codificante para un fragmento de la proteína</b>	
<b>CCDC14 en el vector de expresión pGEX-5x-3</b> .....	<b>40</b>
II.A- Obtención de la secuencia codificante para su uso	
en una posterior ligación.....	40
II.A.1- RT-PCR y purificación del fragmento <i>CCDC14</i> .....	40
II.A.2- Ligación del producto de PCR en vector pGEM-T Easy,	
selección de clones y secuenciación de los mismos.....	41
II.A.3- Elución del fragmento <i>CCDC14</i> para su uso en ligaciones posteriores...	42
II.B- Obtención del vector pGEX-5x-3, en condiciones para	
ser ligado al fragmento <i>CCDC14</i> .....	42
II.C- Ligación del fragmento <i>CCDC14</i> al vector pGEX-5x-3	
y clonación en células BL21 Star.....	43
<b>III- Obtención de la proteína recombinante GST-CCDC14</b> .....	<b>45</b>
III.A- Optimización de la expresión proteica.....	45
III.A.1- Ensayos de expresión de la proteína recombinante.....	45
III.A.2- Análisis de inducción con distintas concentraciones de IPTG.....	47
III.A.3- Análisis de localización de la proteína de fusión en las	
fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares.....	48
III.B- Purificación y análisis de la proteína recombinante.....	50
III.B.1-Medidas de concentración de las distintas fracciones obtenidas.....	50
III.B.2-Visualización de los productos de purificación mediante SDS-PAGE....	51
III.B.3- Confirmación mediante ensayos de <i>Western blot</i> con	
anticuerpo anti-GST.....	52
<b>5- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>55</b>
<b>6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>

# **1- INTRODUCCIÓN**

## **I- Antecedentes Generales**

### **I.A- Reproducción sexual en los mamíferos**

La variación genética en los seres vivos brindada por la reproducción sexual, ha sido de gran beneficio para la adaptación de los mismos a lo largo de la evolución (Solomon *et. al.*, 1996). Este tipo de reproducción puede considerarse como un ciclo en el cual se da una alternancia de células haploides y diploides, y donde se destacan eventos como la fecundación, desarrollo embrionario y madurez de un individuo.

El encuentro de los dos gametos (femenino y masculino), que en los mamíferos se da dentro del aparato reproductor femenino, da lugar a la creación de un nuevo cigoto con número diploide de cromosomas. Este fenómeno, conocido como fecundación, requiere que los gametos presenten características muy especiales y particulares con respecto a las de cualquier otro tipo celular.

El huevo fecundado comienza un nuevo programa de desarrollo, con una proliferación mitótica y la formación de la blástula con un número determinado de células iguales. Luego, la blástula se transforma en un embrión de tres capas con la consecuente constitución de la gástrula, a través de un proceso conocido como gastrulación. Las tres capas, denominadas endodermo, ectodermo y mesodermo, son las que dan lugar a la formación de los distintos tejidos y órganos del individuo formado. Es en este momento que las gónadas sexuales se originan a partir del mesodermo y comienzan su propio programa desarrollo, el cual incluye un enriquecimiento de células germinales primordiales.

Por último, el ciclo se cierra con la formación del individuo y el completo desarrollo del aparato reproductor, y la formación de los gametos correspondientes, prontos para una nueva fecundación (Gilbert, 2005).

### **I.B- Desarrollo y estructura de la gónada masculina**

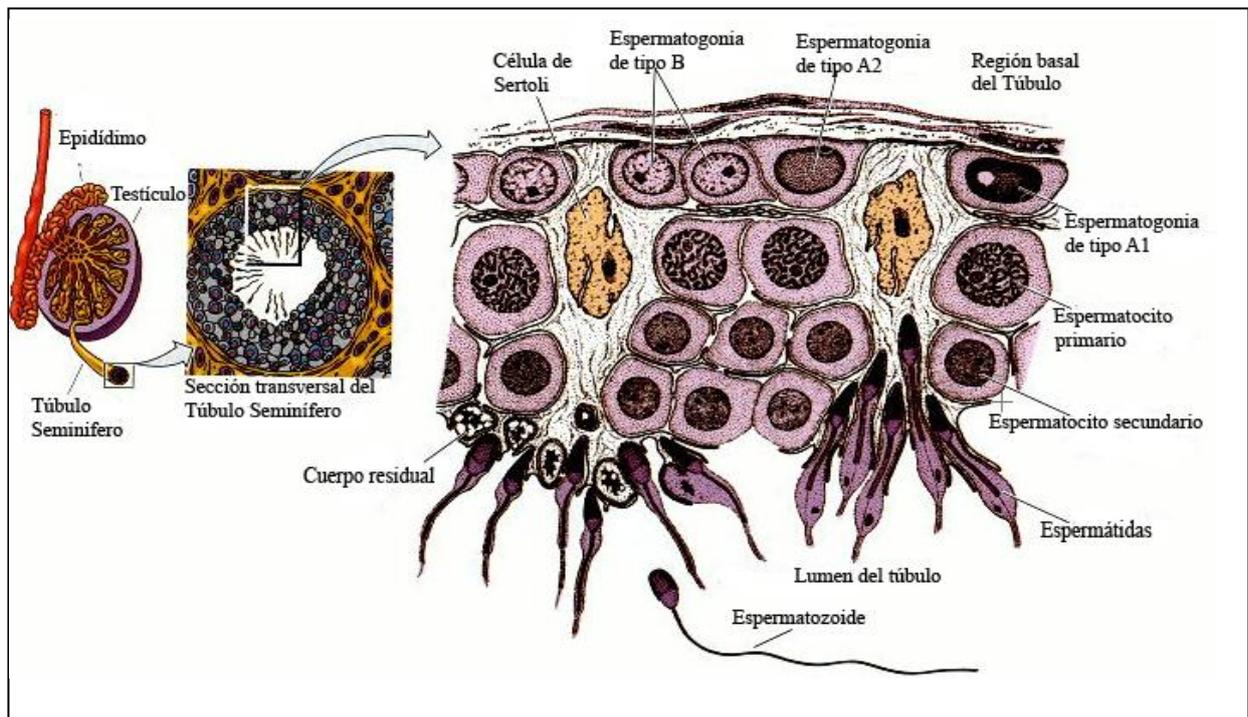
Una etapa importante en el desarrollo embrionario, es el tipo de gónada que va formar el individuo en desarrollo y su consecuente diferenciación sexual. En los mamíferos, lo primero que va a marcar una diferenciación es el cariotipo del individuo. Si el cariotipo consiste en cromosomas homólogos XX, el individuo será hembra, y si consiste en cromosomas XY, el individuo será macho.

La gónada entonces, será masculina al expresarse el gen *Sry* ubicado en el cromosoma Y. El producto de *Sry*, *SRY*, es un factor de transcripción que en combinación con otras proteínas de regulación activará genes involucrados en la formación y el desarrollo de los testículos, e inhibirá vías que median la formación y el desarrollo de las gónadas femeninas. Así, se activarán vías encargadas de la formación de hormonas como la hormona anti-mulleriana (AMH), testosterona, di-hidro testosterona (DHT), y hormona folículo estimulante (FSH), entre otras, que darán lugar a la diferenciación de células somáticas específicas de testículo como las de Sertoli y Leydig, y a la diferenciación de las células germinales para comenzar el proceso de espermatogénesis. (Walker & Cheng, 2005; Gilbert, 2005; Sekido, 2010; Barrionuevo & Scherer, 2010).

Una vez formado, el testículo se compone principalmente de una red de túbulos seminíferos. En la parte externa de éstos se presentan las células de Leydig, las mioideas peritubulares y capilares adyacentes, mientras que en la parte interna de los túbulos se presentan las células germinales y las células de Sertoli.

Las células de Sertoli se fusionan entre sí a través de uniones herméticas, marcando límites que dan lugar a la formación de dos compartimientos (basal y luminal). El compartimiento basal, llamado así porque se ubica en la región basal del túbulo, es la región donde están las células madre espermatogónicas y donde comienza el desarrollo de la espermatogénesis. Por su parte, el compartimiento luminal, llamado así porque se ubica en la región donde se hace presente la luz del túbulo, contiene las células de la línea germinal correspondientes a las siguientes fases de la espermatogénesis. En su interior, se puede correlacionar la secuencia de fases ascendentes en el desarrollo con el progreso de las relativas células desde la membrana basal hacia la luz del túbulo, concluyendo con el espermatozoide localizado en el centro del túbulo (Figura 1).

La organización de estos túbulos, en los cuales las células de Sertoli y las de Leydig están encargadas en la producción de proteínas y hormonas, genera un microambiente ideal para la protección y nutrición de las distintas células germinales, permitiendo el consecuente desarrollo de la espermatogénesis (Berne & Matthew, 1998; Gilbert, 2005).



**Fig. 1. Esquema de una sección del túbulo seminífero de mamífero.** Muestra la relación entre las células de Sertoli y las de la línea germinal. A medida que las células maduran, progresan hacia el lumen del túbulo. (Foto modificada de Gilbert, 2005).

### **I. C- Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación celular que da lugar a la formación del espermatozoide. Comienza al poco tiempo del nacimiento del individuo, en la etapa pre-puberal, y los numerosos tipos celulares que se forman en el transcurso de la espermatogénesis pueden ser agrupados dentro de las tres fases de la misma: proliferación, meiosis y espermiogénesis (Figura 2) (Hess, 1999).

**Proliferación:** Esta etapa ocurre en el compartimiento basal del túbulo seminífero y consiste en una serie de divisiones mitóticas rápidas y continuas para aumentar la población celular. Comienza con la formación de las espermatogonias madre a partir de las células germinales primordiales.

Influenciadas por niveles del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF) secretado por las células Sertoli, las espermatogonias, una vez formadas podrán, bien continuar una renovación indiferenciada de las mismas, o bien diferenciarse en espermatogonias del tipo A1 (Meng *et al.*, 2000). Este tipo de diferenciación continúa hasta la

formación de los espermatoцитos primarios, pasando por espermatogonias diferenciadas de tipo A2, A3, A4, AI y B, en las cuales los principales cambios que se observan de una célula a la otra, son la disminución del tamaño y condensación de la cromatina.

La fase de proliferación concluye con los espermatoцитos primarios como las células más pequeñas, y con la heterocromatina más condensada de la etapa de proliferación (Bellvé *et al.*, 1977; De Rooij, 2001; Gilbert, 2005).

Meiosis: A diferencia de la mitosis, la meiosis consta de dos divisiones nucleares a partir de un único período S de duplicación del ADN. Como consecuencia, se obtienen 4 células hijas con número haploide de cromosomas (cantidad C de ADN) a partir del espermatoцитo primario diploide que había duplicado su cantidad de ADN de 2C a 4C. La meiosis comienza entonces, a partir de una fase S pre-meiótica donde se da la síntesis y/o replicación del ADN, generándose como resultado 4 copias de cada cromosoma (los dos homólogos y sus respectivas cromátides hermanas).

Al igual que la mitosis, cada una de las dos divisiones nucleares que suceden en la meiosis se dividen en las etapas denominadas profase (I y II), metafase (I y II), anafase (I y II) y telofase (I y II).

En la meiosis, ocurren eventos tan importantes como la sinapsis, recombinación (*crossing over*) - ambos durante la profase de la división meiótica I - y segregación de los cromosomas. La sinapsis y recombinación están mediadas por un complejo de proteínas específico de la meiosis, conocido como el complejo sinaptonémico (Pelttari *et al.*, 2001). Estos eventos hacen a la profase I la etapa más larga de la meiosis, siendo necesaria su división en las subfases Leptoteno, Zigoteno, Paquiteno, Diploteno y Diacinesis. Además durante la profase I el tamaño nuclear y celular aumenta considerablemente, alcanzándose el tamaño máximo en el paquiteno (Hess, 1999).

Al final de la meiosis I se obtienen dos células hijas llamadas espermatoцитos secundarios, cada uno conteniendo uno de los dos cromosomas homólogos con su respectiva cromátide hermana. Ambas células pasan de tener un contenido 4C de ADN a tener una cantidad 2C, generándose células haploides de menor tamaño con la mitad del material genético que sus progenitoras (Bellvé *et al.*, 1977, Malkov *et al.*, 1998).

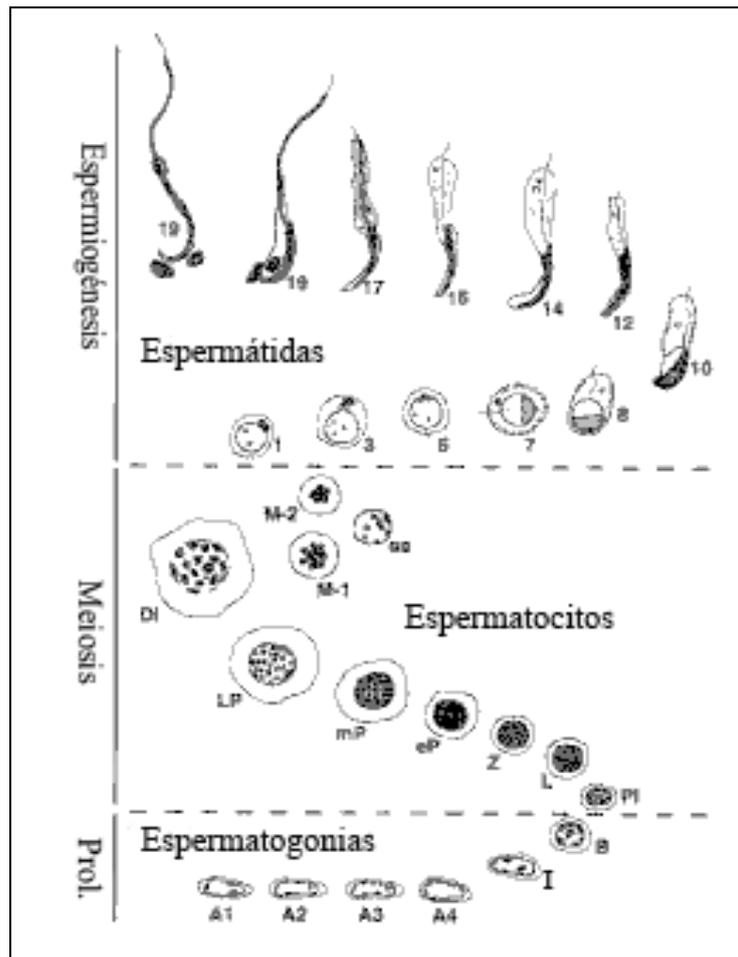
Al final de la meiosis II, a partir de un espermatocito primario se obtienen 4 células llamadas espermátidas, cada una con una cantidad C de ADN y aún más pequeñas que los espermatocitos primarios al inicio de la profase (Bellvé *et al.*, 1977).

A pesar de que estas células tendrán genomas diferentes a causa de los eventos de recombinación y de segregación cromosómica, durante el desarrollo del espermatozoide todas se comportan de la misma manera debido a la incompleta separación de los citoplasmas. Las espermátidas permanecen juntas en un sincitio conectadas por puentes intercelulares, que permitirán el pasaje de la totalidad de los componentes citoplasmáticos tales como los ARNs y proteínas, generándose un fenotipo equivalente en todas las células (Braun *et al.*, 1989).

Espermiogénesis: Consiste en numerosos cambios morfológicos que sufren las células de la línea germinal, desde las espermátidas redondas hasta la formación del espermatozoide. Consta de 16 y 19 pasos clave en la espermiogénesis de ratón y rata respectivamente, los cuales son divididos en tres etapas bien diferenciadas: espermátidas tempranas o redondas, espermátidas elongadas y espermátidas tardías (Leblond & Clermont, 1952; Oakberg, 1956).

De entre los cambios más importantes que se pueden notar en este desarrollo, se destacan los relacionados a la condensación de la cromatina: a medida que avanza la espermiogénesis, se observa un aumento en la condensación de la cromatina debida a cambios que sufren las histonas. Estos cambios pueden estar dados por modificaciones postraduccionales de las mismas o sustituciones por histonas transitorias específicas de testículo, y posteriormente por las proteínas básicas ricas en arginina llamadas protaminas. El aumento de la condensación de la cromatina desde las espermátidas redondas hasta las espermátidas elongadas conlleva una notoria disminución en la actividad transcripcional (Kierszenbaum and Tres 1975; Peschon *et al.*, 1987; Hecht, 1998; Govin *et al.*, 2004).

Además de los cambios en la cromatina, en la etapa final de la espermiogénesis se observa una condensación y estrechamiento del núcleo, un desecho de material citoplasmático sobrante en forma de cuerpos residuales, la formación del flagelo y una reorganización de las mitocondrias para formar un anillo alrededor de la base del flagelo.



**Fig. 2. Esquematación de las diferentes etapas de la espermatogénesis de rata.** La fase de proliferación (Prol.) incluye las divisiones espermatogónicas desde la espermatogonia de tipo A (A1 - A4) hasta las células intermedia (I) y de tipo B (B). La fase de meiosis comienza luego que las espermatogonias de tipo B se diferencian en espermatocitos pre-leptoténicos (PI). La profase meiótica comienza con pequeños espermatocitos leptoténicos (L) y continúa a través de los espermatocitos zigoténicos (Z), paquiténicos tempranos (eP), medios (mP) y tardíos (LP). Una vez en el diploteno (DI), las células se someten a la primera división meiótica (M-1) produciendo los espermatocitos secundarios (ss). Luego de la segunda división (M-2), las células haploides llamadas espermatidas comienzan la fase de espermiogénesis con la formación de las espermatidas redondas (1-7), continúan con una transformación hacia células elongadas (8-10) y finalizan con la formación del espermatozoide. (Foto modificada de Hess, 1999).

### **I.D- Expresión génica diferencial en la espermatogénesis de los mamíferos**

El testículo de los mamíferos adultos presenta un tejido muy complejo, donde además de las distintas células somáticas, se encuentran los numerosos estados de diferenciación celular del proceso de espermatogénesis. Estos continuos cambios de estado de una célula

durante la espermatogénesis, en donde atraviesa numerosas modificaciones morfológicas, momentos de recombinación, sinapsis y segregación cromosómica entre otras cosas, involucran una gran cantidad de mecanismos reguladores y hacen que este proceso presente una expresión génica extremadamente alta en relación al genoma completo (aproximadamente requiere de la expresión de un 50% del genoma en la rata) (Shima *et al.*, 2004). Pese a que ha habido grandes avances en su estudio, hasta ahora hay un escaso conocimiento de la espermatogénesis a nivel molecular.

Debido a este patrón atípico de expresión génica, comienza la aparición de nuevas isoformas de proteínas y enzimas con nuevas funciones dentro del testículo. Éstas son específicas de la línea germinal, ya sea porque el producto del gen es específico de la misma, o porque el transcripto sufre modificaciones que no ocurren en células somáticas. Lo cierto es que para que se dé la expresión de estas nuevas proteínas, son necesarios ciertos mecanismos de regulación presentes a nivel transcripcional y a nivel postranscripcional (Kleene, 2001).

Regulación transcripcional: El hecho de que las células deban enfrentar un evento muy particular como la meiosis, genera comportamientos inusuales de la cromatina y por lo tanto, probablemente, provoca alteraciones en la accesibilidad de elementos promotores que son de uso habitual en las células somáticas. Por otro lado, también se da la exposición de nuevos promotores que son, en este caso, específicos de las células espermatogénicas y dan lugar a nuevos transcriptos, y por lo tanto a nuevas proteínas o proteínas truncadas con respecto a las somáticas (proteínas específicas de las células espermatogénicas). Dichos promotores alternativos presentan características diferentes a los presentes en células somáticas y su accesibilidad a ellos involucra diferentes mecanismos reguladores que afectan drásticamente la expresión génica de las células espermatogénicas. Entre las distintas características, una de las más destacadas es la ausencia de la caja TATA en los promotores (promotores TATA-independientes) de la mayoría de los genes expresados específicamente en células espermatogénicas. (Goldberg, 1996; Hetch, 1998; Kleene, 2001; Geisinger, 2008).

Sin embargo, la accesibilidad a promotores alternativos no es la única responsable de la expresión génica tan peculiar, donde también la activación o represión de los mismos depende de la actividad de factores reguladores de la transcripción, que también pueden actuar de manera específica en la regulación génica del testículo. Incluso, hay numerosos casos en que los promotores alternativos presentan elementos conservados que son blancos de factores

activadores o represores que varían entre las células de la línea germinal y las somáticas. Por ejemplo, en muchos promotores de genes específicos de testículos se encuentra la secuencia conservada correspondiente al elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE), la cual es blanco de una isoforma moduladora de CRE (CREM $\tau$ ) que actúa específicamente como activador transcripcional en células germinales post-meióticas (Goldberg, 1996; Hetch, 1998; Kleene, 2001; Geisinger, 2008).

Regulación postranscripcional: Muchos genes se ven sobreexpresados en las células espermatogénicas con respecto a las somáticas, principalmente en los espermatocitos paquiténicos y en células haploides tempranas (espermátidas redondas) (Kleene, 2001; Kleene, 2003). Aún así, frecuentemente los niveles proteicos son mucho menores a los niveles de sus respectivos transcriptos sobreexpresados. Es en estos tipos celulares que se observa una regulación postranscripcional que conlleva a una regulación en la traducción, observándose en este caso específico una inhibición de la síntesis proteica a partir de los ARNs mensajeros (ARNms) (Kleene, 2001; Kleene, 2003). Como estrategia inhibitoria, los ARNms suelen hallarse en forma de ribonucleoproteínas (RNPs) y carentes de polirribosomas. Luego, algunos de éstos vuelven a encontrarse rodeados de polirribosomas y por lo tanto traduccionalmente activos hacia las etapas finales de la espermatogénesis, más precisamente en las espermátidas elongadas (Kleene, 2001; Kleene, 2003).

Una de las razones de la sobreexpresión y consecutiva inhibición de la traducción, es que las espermátidas elongadas no presentan transcripción debido al empaquetamiento del ADN con las protaminas, por lo cual los productos génicos requeridos por estas células provendrían de fases anteriores en forma de RNPs y se verían traducidos en esta etapa. Por otro lado, la eficiencia de la traducción nunca es 100% comparada con la síntesis excesiva de ARNms, por lo cual, entre otras hipótesis planteadas, cabría la posibilidad de que la inhibición es un mecanismo para contrarrestar la sobreexpresión, o bien que hay sobreexpresión para contrarrestar la baja eficiencia de traducción (Kleene, 2001).

Más allá de cuál sea la razón, lo cierto es que en la mayoría de los estudios en las células de la línea germinal, las cantidades de transcriptos nunca coinciden con los niveles de los respectivos productos, pudiéndose entender que hay gran participación de mecanismos reguladores a nivel postranscripcional. La gran variedad de éstos hace que en la espermatogénesis se presente un patrón atípico de expresión génica. Entre las peculiaridades

que se observan se pueden destacar el uso más frecuente que en ningún otro tejido del mecanismo de corte y empalme (*splicing*) alternativo, la presencia de un altísimo número de proteínas de unión a ARNs (responsables de la ejecución de los mecanismos de regulación postranscripcional), la variabilidad en los largos de las colas poli A con respecto a los mismos transcritos en células somáticas, dejando expuestas regiones de reconocimiento para factores específicos de regulación en los extremos 3' no traducidos (UTRs: *untranslated regions*), la presencia de nuevos marcos abiertos de lectura en los transcritos, y la presencia de gran cantidad de microARNs implicados en la regulación postranscripcional (Hecht, 1998; Kleene, 2001; Elliott 2003; Kleene, 2003; Geisinger, 2008).

### **I.E – Métodos de análisis de la expresión génica diferencial en la espermatogénesis**

Para lograr estudios a nivel molecular y la identificación de genes específicos de un tipo celular, se requiere del aislamiento y obtención de poblaciones homogéneas de dicho tipo celular. No obstante, realizar este aislamiento en células que forman parte de la línea germinal en el testículo es de gran dificultad, ya que se presentan problemas como la complejidad del tejido, con una gran cantidad de tipos celulares diferentes, y la falta de conocimiento acerca de las condiciones bioquímicas que podrían promover la diferenciación y supervivencia de las células germinales en cultivos *in vitro* (Bellvé *et al.*, 1977; Sofikitis *et al.*, 2005).

Igualmente, como ya se pudo ver anteriormente, hay un cierto conocimiento acerca de la expresión génica en la espermatogénesis, y esto se ha logrado por la creciente disponibilidad de métodos que permiten realizar aislamientos celulares específicos y asignar transcritos y proteínas a cada tipo celular.

Una de las primeras estrategias para el estudio individual de una célula en este complejo tejido, fue la de extraer las células del testículo en distintos días luego del nacimiento del ratón o la rata antes de llegar a la madurez. Es posible lograr un buen aislamiento de las espermatogonias del tipo A, tipo B, espermátocitos pre-leptoténicos, paquiténicos, espermátidas redondas, elongadas y células Sertoli al conocer los tamaños, las características morfológicas y la aparición temporal de cada una de las células espermatogénicas en la etapa pre-puberal de estos animales. Así, a los días 6, 9, 14, 21, 35 y 60 luego del nacimiento del ratón, es posible realizar una extracción de las respectivas células germinales seguida de una separación basada en el coeficiente de sedimentación de cada tipo celular (Bellvé *et al.*, 1977; Yu *et al.*, 2003).

El problema de esta estrategia, es que no es posible un aislamiento y obtención altamente enriquecida de ciertas poblaciones celulares debido a la corta duración que presentan en la espermatogénesis, como es el caso de las células en los estadios más tempranos de la profase (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2011), o entre los estadios del diploteno y el espermatozoido secundario. Además el hecho de asociar técnicas de separación a la estrategia del uso de roedores jóvenes, lleva consigo un trabajo arduo y laborioso en el momento de la suspensión celular (ver a continuación), donde se pueden dañar los tipos celulares en estudio y generar cambios no deseados en la expresión génica (Wrobel & Priming, 2005).

El primer paso para la purificación de células es la preparación de una suspensión celular. Se han realizado distintos protocolos de disociación mecánica de células, pero estos métodos no son del todo apropiados para un posterior análisis de la expresión génica, ya que requieren mucho tiempo de trabajo, gran manipulación y son de bajo rendimiento. Sin embargo, un trabajo reciente describió un nuevo protocolo que usa un sistema llamado “Medimachine System”, el cual permite la suspensión de las células a partir de testículo en tan solo 15 minutos, con poca manipulación, sin requerir de acción enzimática, minimizando agregados celulares, y presentando una buena reproducibilidad y relativamente alto rendimiento (Rodríguez-Casuriaga *et al.*, 2009).

Luego de logradas las suspensiones celulares, se continúa con una separación de las células. Como ya se vio, un tipo de técnicas empleadas son las basadas en el coeficiente de sedimentación, aprovechando que las distintas células espermatogénicas presentan distintos tamaños entre sí. Dentro de estas técnicas de separación, una muy usada ha sido la elutriación. Consiste en la separación de las células por centrifugación diferencial de acuerdo a su velocidad de sedimentación, que a su vez se ve influida por la densidad y tamaño celular. Las células son suspendidas en algún medio y vertidas a una cámara de elutriación donde se someten a una fuerza centrípeta. En esta cámara es posible producir gradientes de velocidades del flujo haciendo que las células migren a zonas del flujo donde existe un balance con su velocidad de sedimentación. Así, manejando las velocidades de la centrífuga, es posible manejar las velocidades del flujo, y por lo tanto la obtención de fracciones con células purificadas provenientes de una población heterogénea (Bachère *et al.*, 1988). A partir de esta centrifugación se puede purificar una gran cantidad de células de una manera rápida en relación a otras técnicas, como lo es la decantación basada en la formación de un gradiente de densidad (STA-PUT) (Romrell *et al.*, 1976, Geisinger, 2008).

Otra estrategia de separación más reciente es la clasificación celular (*cell sorting*) mediante el uso de citometría de flujo, donde las células pueden ser separadas por su contenido en ADN, tamaño celular, morfología y tamaño del núcleo. Esta técnica presenta varias ventajas con respecto a las otras técnicas de separación. Primero, es posible obtener poblaciones celulares con mayor pureza que mediante la elutriación. Segundo, la mayoría de las células son individualizadas por el aparato, debido a la cantidad de parámetros que se pueden utilizar para la discriminación celular. Tercero, toda población celular que sea individualizada en los gráficos de puntos del citómetro podrá ser purificada por el aparato. Cuarto, a pesar de que el número de células purificadas es menor al obtenido por elutriación, las cantidades obtenidas se pueden regular variando parámetros como la concentración de la muestra y la duración del *sorting*. Además, las cantidades obtenidas por esta técnica son suficientes para un posterior análisis de expresión génica mediante las tecnologías modernas, que no requieren de grandes cantidades de material de partida (Malkov *et al.*, 1998; Geisinger & Rodriguez, 2010).

A partir de lograr una población enriquecida de células de interés, se está en condiciones de realizar un análisis de la expresión génica de las mismas. Estos análisis se pueden efectuar mediante el uso de una gran variedad de técnicas presentes actualmente. Una de las técnicas más llamativas desde el punto de vista informativo es la hibridación en microarreglos, debido a que es posible evaluar la expresión de miles de genes en una plataforma a partir de tan solo una muestra biológica (Shima *et al.*, 2004; Iguchi *et al.*, 2005). La técnica consiste en fijar miles de secuencias de ácidos nucleicos como oligonucleótidos en matrices sólidas. Luego esas matrices serán sometidas a una mezcla (*pool*) de ADN copia (ADNc) con algún tipo de marcación (fluorescente o radiactiva) proveniente del ARN total de un tipo celular específico a estudiar. Los ADNc que reconozcan un ácido nucleico de algún pocillo se hibridarán y darán una señal correspondiente a la cantidad de ADNc unido. Así, es posible realizar una comparación de dos conjuntos de ARNm de distintos tipos celulares utilizando dos matrices y comparando entre éstas, los cambios en la intensidad de señal que ocurren en cada pocillo (Tagu & Moussard, 2006). De este modo, mediante microarreglos se puede identificar cambios en las cantidades y en las poblaciones de ARNms entre las células germinales y las células somáticas del mismo tejido, así como también realizar comparaciones de expresión génica entre testículos de mamíferos en distintas etapas del desarrollo (Yu, 2002; Wrobel & Primig, 2005; Iguchi, 2006).

Aunque el microarreglo ha sido una técnica muy utilizada hasta el momento, otras técnicas desarrolladas previamente y menos “masivas”, también han resultado muy útiles para identificar genes expresados en etapas diferenciales de la espermatogénesis, como por ejemplo la técnica conocida como *mRNA differential display* (DD) (Liang & pardee, 1992). Ésta consiste en la comparación de expresión de ARNm provenientes de dos poblaciones celulares diferentes mediante un procedimiento que se basa principalmente en tres pasos clave: i) transcripción reversa (RT) de los ARNm para obtener ADNc de una sola cadena, a partir de iniciadores 3'oligo dT con dos nucleótidos extra M y N (T<sub>12</sub>MN, donde M representa a los nucleótidos A, C o G y N a los nucleótidos A, C, G o T); ii) amplificación por PCR de los ADNc (RT-PCR), utilizando una variedad de iniciadores 5' de tamaños que varían entre 8 y 10 nucleótidos, e incorporando una marca radiactiva; iii) separación electroforética y visualización de los ADNc de doble cadena en geles de secuenciación de poliacrilamida, revelados por autorradiografía. Además, esta técnica permite que las bandas de ADNc de interés puedan ser cortadas del gel, re-amplificadas y utilizadas para clonación, secuenciación y síntesis de sondas útiles en ensayos de *Northern* y *Southern blot*.

Estas ventajas, sumadas al hecho de que se trata de una técnica relativamente rápida, sensible, reproducible y que permite la detección de múltiples genes expresados diferencialmente entre dos poblaciones, además de la identificación de genes nuevos, hace que a veces siga siendo la técnica de elección (Liang & pardee, 1992; Tagu & Moussard, 2006).

Entre otras técnicas que se han utilizado hasta el momento, se encuentran la hibridación substractiva (Fuji *et al.*, 2002) y el SAGE (*serial analysis of gene expression*) (Lee *et al.*, 2006).

Actualmente, el surgimiento de las técnicas de secuenciación masiva (RNAseq) permite la obtención de transcriptomas completos en muy breves períodos de tiempo. Si bien aún no existen reportes de transcriptomas de células de la línea germinal mediante estas metodologías, es de esperar que las mismas representen un avance significativo en el conocimiento de los patrones de expresión génica en estas células.

Sin embargo con todas estas técnicas es posible analizar la diferencia de expresión génica entre poblaciones celulares pero no así el análisis a nivel proteico, y el hecho de identificar un ARNm en cierta etapa, no significa que se dé la expresión de la proteína en ese momento. Como ya se ha visto, ciertos ARNm transcriptos en una etapa de la espermatogénesis son inhibidos traduccionalmente siendo secuestrados en RNPs, y serán luego traducidos en

etapas siguientes donde se encuentran rodeados por los polirribosomas. La técnica de centrifugación en gradientes de sacarosa permite la obtención de fracciones de ARNs enriquecidos en polirribosomas y fracciones enriquecidas en RNPs. En base a esto, es posible realizar perfiles de expresión y saber si un gen está siendo traduccionalmente activo o inhibido, sometiendo una *pool* de ARNs en estudio a la centrifugación en gradientes de sacarosa y posteriormente analizando, por ejemplo, por microarreglos, las fracciones obtenidas de la centrifugación (Iguchi *et al.*, 2005).

Para realizar un análisis del producto proteico, es necesario emplear ciertas estrategias que permitan al investigador relacionar su gen obtenido a partir de alguna de las técnicas ya nombradas con un estudio completo y detallado de la proteína correspondiente.

Se han realizado distintos análisis a nivel proteico para el estudio de la expresión génica diferencial. Una de las técnicas más aplicadas es el uso de anticuerpos “anti-proteína de interés” conjugados a marcadores fluorescentes para realizar estudios de inmunohistoquímica (hibridación en cortes histológicos), o inmunocitoquímica (en un *pool* de células aisladas y purificadas), y visualizando los resultados con microscopia de luz y electrónica (en este último caso se suelen utilizar anticuerpos conjugados a oro coloidal). Habitualmente estas técnicas se acoplan en los trabajos de investigación a ensayos de proteínas como el SDS PAGE y *Western blot*, para lograr una mejor caracterización de la proteína en estudio (Smith & Benavente, 1992; Vester *et al.*, 1993; Alsheimer *et al.*, 1998, y otros).

## **II- Antecedentes Específicos**

El grupo de investigación en Biología Molecular de la Reproducción del Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), ha diseñado un plan de trabajo para la identificación y caracterización de genes expresados diferencialmente en la profase meiótica masculina de los roedores. En dicho trabajo se involucran técnicas ya descritas, como la elutriación y el DD.

### **II.A- mRNA differential display**

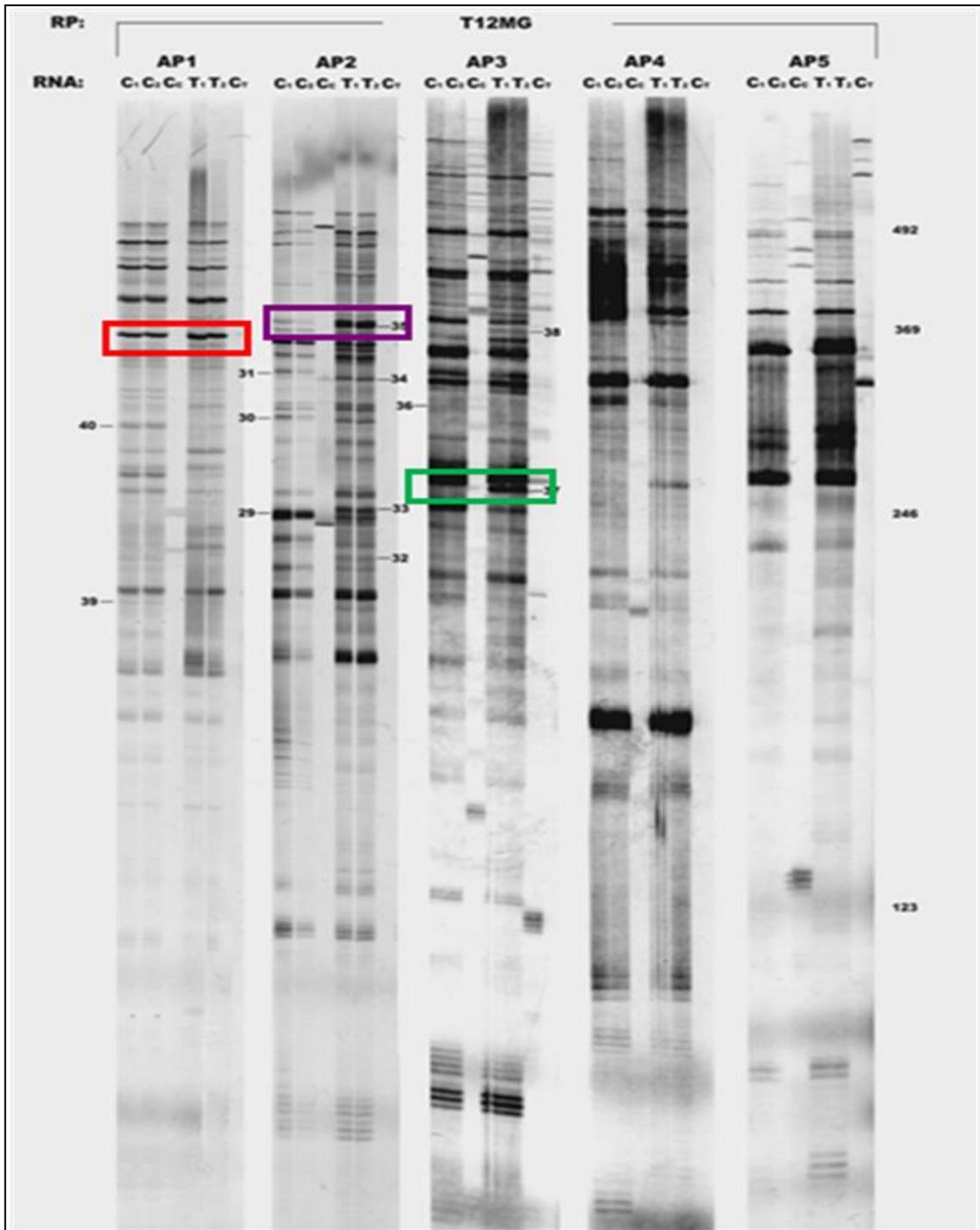
Con el fin de identificar genes expresados diferencialmente en las etapas meióticas y post-meióticas o haploides de la espermatogénesis de la rata (*Rattus norvegicus*), se realizó una separación celular mediante elutriación. Merced a esta técnica fue posible obtener poblaciones

altamente enriquecidas en espermátocitos paquiténicos (células meióticas), por un lado, y espermátidas redondas (células post-meióticas), por el otro.

A estas dos poblaciones celulares se les extrajo el ARN total y se les sometió a la técnica de DD (Figura 3).

En los geles de poliacrilamida, cada banda corresponde a un fragmento de ADNc obtenido a partir de la RT-PCR, y comparando los carriles de ambas poblaciones celulares se pueden observar diferencias en intensidad de ciertas bandas o incluso aparición de banda sólo en una de las dos poblaciones. Un 23% del total de las bandas mostró una expresión génica diferencial en una de las dos poblaciones, del cual 74% fueron bandas específicas de espermátidas y 26% de espermátocitos. Con el fin de evaluar la técnica realizada, un conjunto de bandas que aparecieron como específicas de uno u otro estadio se eluyeron del gel de poliacrilamida, se re-amplificaron y se marcaron radiactivamente para su uso como sondas en ensayos de *Northern blot* contra ARN de espermátocitos, por un lado, y ARN de espermátidas, por otro. Dichos ensayos mostraron resultados positivos, coincidiendo en gran medida con los resultados obtenidos en el DD (Geisinger *et al.*, 1996; Geisinger, 2003).

Con esta técnica fue posible cortar las bandas de interés, purificarlas, clonarlas en el vector pGEM-T (Promega), y transformar células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*), a partir de las cuales se realizaron glicerolitos que fueron almacenados a -80 °C. Estos glicerolitos quedaron listos para su uso en un posterior análisis de los genes correspondientes (Geisinger, 2003).



**Fig. 3. “Differential Display” de ARNm de espermatocitos paquiténicos y espermatidas redondas de rata, usando como iniciador 3' T<sub>12</sub>MG, en combinación con 5 juegos de decámeros como iniciadores 5'. Los experimentos fueron realizados por duplicado, y los duplicados corridos en carriles adyacentes, seguidos de un control negativo sin RT. C: espermatocitos; T: espermatidas; RP: Iniciador 3'T<sub>12</sub>MG; AP: Iniciadores 5' arbitrarios. El cuadro de color rojo marca bandas que aparecen en ambas poblaciones con similar intensidad; el cuadro de color violeta marca bandas que aparecen en ambas poblaciones pero con intensidad diferente; el cuadro de color verde marca bandas que aparecen sólo en una de las dos poblaciones. (Foto tomada de Geisinger, 2003).**

## **II.B- Análisis y caracterización de los genes *pecanex1* y *Spats1***

En años recientes, se ha trabajado en la identificación de bandas obtenidas en el DD, correspondientes a ADNc expresados diferencialmente en espermatoцитos paquiténicos. Para esto fue necesario realizar una serie de trabajos en paralelo. Por un lado, a partir de los clones pGEM-T conteniendo la secuencia correspondiente a las bandas de interés, se realizaron análisis de secuencias y síntesis de sondas de hibridación para la realización de diversos ensayos. Por otro lado, se realizó una genoteca de vectores  $\lambda$ /ZAP (Stratagene) con la mezcla de ARN total correspondiente a los espermatoцитos paquiténicos. Así, se utilizaron las sondas sintetizadas para realizar un rastreo del ADNc de interés en la genoteca, donde los clones que presentaban señal correspondían a clones positivos que contenían el inserto de interés.

En dos trabajos diferentes, se lograron identificar fragmentos de interés, que luego se ensamblaron con secuencias provenientes de la base de datos del banco de genes (Genbank) para obtener más información a nivel nucleotídico. Estos trabajos condujeron a la identificación de los genes *pecanex1* y *Spats*, ambos de expresión diferencial durante la meiosis de la rata, y que no habían sido descritos previamente (Geisinger *et al.*, 2002; Geisinger *et al.*, 2005). Para la caracterización completa se realizaron análisis a nivel proteico, para los cuales fue necesaria la producción de anticuerpos, usados en posteriores ensayos de *Western blot* e inmunohistoquímica.

Un paso clave para realizar los estudios a nivel proteico fue la obtención de un péptido representativo de cada proteína, utilizado posteriormente en la inmunización de conejos. Este péptido fue obtenido a partir de la ligación de un fragmento de la secuencia nucleotídica en un vector de expresión y su posterior clonación en células con buen rendimiento a la hora de expresar proteínas recombinantes, como la *E. coli* BL21 Star (Invitrogene). El fragmento fue ligado adyacente a la secuencia codificante para una proteína marcadora (*tag*), usada para realizar la purificación del “fragmento peptídico-tag” (Geisinger *et al.*, 2005; Capoano *et al.*, 2010).

## **II.C- Análisis y caracterización del gen *CCDC14***

Posteriormente a la identificación de los genes arriba mencionados, se realizó una selección de clones adicionales, conteniendo vectores pGEM-T con insertos correspondientes a 8 bandas diferentes, procedentes del DD, que presumiblemente representaban genes expresados diferencialmente en los espermatoцитos paquiténicos. A partir de la secuenciación de los clones

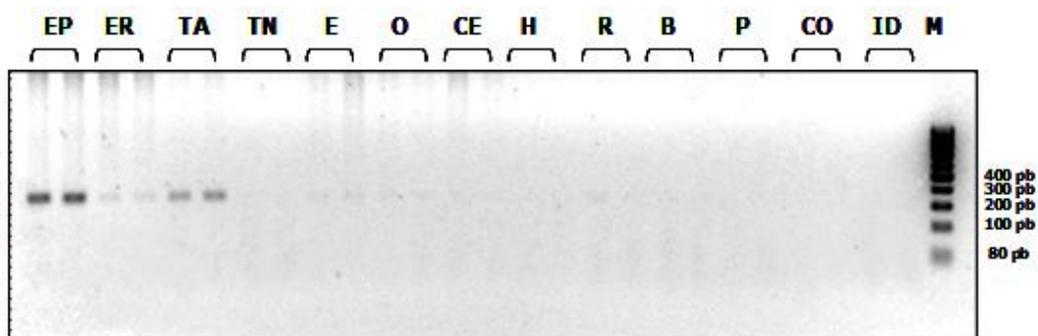
se diseñaron juegos de iniciadores específicos para realizar RT-PCR con bajo número de ciclos (semicuantitativo) en poblaciones de ARNs provenientes de espermatocitos paquiténicos y espermátidas redondas, como forma de confirmar el patrón de expresión diferencial observado en el DD. En paralelo, se analizó la expresión de esos ARNs, también mediante RT-PCR, en testículo total de rata adulta, en testículo de ratas neonatas de 1 día, y en otros 9 tejidos. Así, fue posible comparar entre las distintas células y tejidos, la presencia del ARNm que se quiso amplificar. Todos los clones coincidieron con lo esperado (expresión únicamente detectada en testículo, y diferencial en espermatocitos con respecto a espermátidas), aunque algunos en mayor medida que otros. De esos 8, fue seleccionado uno para continuar con el presente trabajo de investigación (Figura 4).

El elegido fue un clon cuya secuencia codificante predicha correspondió al homólogo de una proteína hipotética de ratón, aún no identificada ni caracterizada, y para la cual ni siquiera existía la descripción del gen en rata. Esta proteína hipotética sería portadora de una secuencia conservada conocida como “dominio superhelice” (*coiled coil domain*), por lo cual la proteína hipotética de ratón figuraba en el Genbank con el nombre de *coiled coil domain containing 14* (CCDC14). Los motivos de tipo *coiled coil* consisten en varias regiones de  $\alpha$ -hélice que giran una alrededor de la otra, formando, generalmente, estructuras rígidas y largas, y por lo general dan lugar a la formación de dímeros (homo o heterodímeros) o multímeros. A pesar de la relativa simplicidad arquitectónica, estos motivos pueden brindar una variedad de propiedades a las proteínas que los contienen; por ejemplo, se han identificado en proteínas de unión ADN, de unión a otras proteínas, en proteínas motoras, estructurales, y formadoras de canales iónicos, entre otras, cuya función se ve influenciada por el motivo *coiled coil* (Burkhard *et al.*, 2001). Por otra parte, también se han identificado proteínas con este motivo que actúan a nivel de la espermatogénesis, como es el caso de las proteínas formadoras del complejo sinaptonémico (Meuwissen *et al.*, 1992), y en las laminas, de las cuales existen versiones testículo-específicas (Strelkov *et al.*, 2003).

Con el fin de encontrar alguna secuencia más larga que la obtenida a partir del DD y así conseguir más información acerca de la secuencia codificante del gen, el inserto del correspondiente clon fue usado para la síntesis de una sonda, la que fue empleada en el rastreo de la genoteca de ADNc de espermatocitos paquiténicos mencionada anteriormente. Se obtuvieron dos clones positivos, y el análisis de secuencias de éstos mostró que si bien eran de tamaños mayores que el fragmento original, ninguno de los dos abarcó secuencia codificante

del gen, sino que, por el contrario, correspondían a la región 3' UTR, que resultó ser excepcionalmente larga en este transcripto (2118 pb).

Como hasta el momento no se había obtenido parte de la secuencia codificante mediante el rastreo de la genoteca, se prosiguió con el análisis *in silico* del gen, basándose en la secuencia disponible del transcripto conceptual de ratón generado por el Genbank (como se mencionó, la secuencia predicha del transcripto de rata no se encuentra disponible en el Genbank). A partir del gen *CCDC14* y el ARNm predicho de ratón, se pudo realizar un ensamblaje del ARNm de *CCDC14* de la rata, el cual consistiría en una secuencia de 4006 nucleótidos formada por 13 exones. Esta codificaría para una proteína putativa de 930 aminoácidos donde se pudo encontrar la región *coiled coil*, mientras que no se observó ningún otro dominio predicho conocido.



**Fig. 4. RT-PCR semicuantitativo del gen *CCDC14* en células provenientes de distintos tejidos.** EP: espermatoцитos paquiténicos; ER: espermátidas redondas; TA: testículo adulto; TN: testículo neonatal; E: epidídimo; O: ovario; CE: cerebro; H: hígado; R: riñón; B: bazo; P: pulmón; CO: corazón; ID: intestino delgado; M: marcador de peso molecular ("Gene Ruler 100 pb DNA ladder plus" -Fermentas-). Las reacciones de amplificación consistieron en 25 ciclos con temperatura de anillado = 55 °C. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, corridos en carriles adyacentes. La amplificación (aunque menor) en testículo adulto podría explicarse por la presencia de espermatoцитos, que se encuentran diluídos entre los otros tipos celulares del testículo.

## **2- OBJETIVOS**

### **I- Objetivo general**

Contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la profase meiótica durante la espermatogénesis de los mamíferos, a través de la colaboración en la caracterización de un gen identificado en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE que se expresa diferencialmente en la profase meiótica masculina de la rata.

### **II- Objetivos específicos**

-Obtención de la secuencia codificante completa de *CCDC14*, mediante retro-Amplificación y secuenciación del transcrito usando juegos de iniciadores que flanqueen intrones y abarquen a toda la secuencia teórica del ADNc. Los fragmentos amplificados serán posteriormente secuenciados, de modo de confirmar empíricamente la secuencia del transcrito armado *in silico*.

-Clonación de la secuencia codificante para un fragmento de la proteína CCDC14 en un vector de expresión, expresión de dicho fragmento peptídico ligado a la proteína glutatión-S-transferasa (GST), y purificación de la proteína de fusión para su posterior uso en la producción de anticuerpos “anti-CCDC14” en conejo.

### 3- MATERIALES Y MÉTODOS

#### I- RT-PCR del ADNc de *CCDC14*

##### IA- RT

A partir de una mezcla total de ARNs provenientes de una población aislada de espermatoцитos paquiténicos, se realizó la síntesis de ADNc usando iniciadores complementarios a las colas poli-A de los ARNs (oligómeros “oligo dT”). Los reactivos utilizados para realizar la RT se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1:** Mezcla de reacción de RT.

<b>Tubo 1</b>	<b>Vol. (μL)</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Vol. (μL)</b>
Oligo-dT (0,5 μg/μL)	1	Sol. tampón RT (5X)	4
ARN total (1 μg/μL)	1	dNTPs (2,5 mM)	2
H <sub>2</sub> O DMPC*	9	Inhibidor de ARNasas (Fermentas; 40 U/μL)	0,25
Volumen Parcial	11	H <sub>2</sub> O DMPC*	1,75
		Transcriptasa inversa (Fermentas; 200 U/μL)	1
		Volumen Parcial	9
<b>Volumen Total</b>			<b>20</b>

\*H<sub>2</sub>O DMPC: H<sub>2</sub>O tratada durante toda la noche con dimetil-pirocarbonato (DMPC) al 0,1% y luego esterilizada mediante autoclave.

Previo a la mezcla de los dos tubos, el tubo 1 fue incubado durante 5 min. a 72 °C. Luego se realizó la mezcla de los tubos 1 y 2 en frío y posteriormente se incubó en termociclador “GeneAmp 2400” (Perkin-Elmer), durante 5 min. a 37 °C, 1 hora a 42 °C y 10 min. a 70 °C. El producto obtenido se alicuotó y almacenó en alícuotas de 2 μL a -80 °C.

##### IB- PCR

Para la obtención de la secuencia codificante completa de *CCDC14*, se amplificaron por PCR 4 fragmentos solapantes entre sí mediante el uso de 4 juegos de iniciadores complementarios a zonas flanqueantes de los intrones (ver “Resultados y Discusión”, figura 6,

pág. 36). Los iniciadores empleados habían sido diseñados previamente en el laboratorio (Tabla 2) y fueron incluidos en las mezclas de las distintas reacciones de PCR (Tabla 3).

**Tabla 2:** Juegos de iniciadores diseñados para la amplificación de fragmentos solapantes correspondientes a la secuencia codificante de *CCDC14*.

	<b>Iniciadores</b>	<b>Tamaño de amplicón esperado (pb)</b>	<b>Temperatura de anillado (°C)</b>
<b>Juego 1</b>	<b>CCDC14 Fw1:</b> 5'- CCCGACCCGAAGGAAAAAC -3'	775	55
	<b>CCDC14 Rv1:</b> 5'- GACCAGCCAAAACCAGAATG -3'		
<b>Juego 2</b>	<b>CCDC14 Fw2:</b> 5'- AATATACCAAGCCCTCTGTG-3'	850	53
	<b>CCDC14 Rv2:</b> 5'- AGCGTTCTCACTTCTCAAC-3'		
<b>Juego 3</b>	<b>CCDC14 Fw3:</b> 5'- CTCAGAAGTTCAGAGATTG -3'	809	51
	<b>CCDC14 Rv3:</b> 5'- GCAGCACATTTTCACAGAG -3'		
<b>Juego 4</b>	<b>CCDC14 Fw4:</b> 5'- AGCCCTCCTCATCTCC -3'	1506	53
	<b>CCDC14 Rv4:</b> 5'- ACTCCATCATTTCCAAAGAC-3'		

Fw: iniciador directo; Rv: iniciador inverso; pb: pares de base.

**Tabla 3:** Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del ADNc del gen *CCDC14*.

<b>Reactivos</b>	<b>Vol. (µL)</b>
Sol. tampón Taq 10X	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
dNTPs (25 mM)	0,2
Iniciador Fw (25 µM)	0,8
Iniciador Rv (25 µM)	0,8
Polimerasa Taq (Fermentas; 5 U/µl)	0,2
H <sub>2</sub> O ultrapura	37
ADNc (producto RT)	2
Volumen total	50

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador arriba indicado, y el programa empleado fue: 2 min. a 92 °C, 30 ciclos de 30 seg. a 92 °C, 30 seg. a la temperatura de anillado

correspondiente a cada juego de iniciadores y 1 min. a 72 °C, y 1 ciclo correspondiente a la extensión final de 5 min. a 72 °C.

## **II- Clonado de la secuencia codificante para un fragmento de la proteína CCDC14 en el vector de expresión pGEX-5x-3**

### **II.A- Amplificación y purificación del fragmento a clonar**

Mediante el análisis *in silico* de la secuencia correspondiente al gen *CCDC14*, fue seleccionado un fragmento dentro de la misma para clonarlo y expresarlo en un vector de expresión (ver “Resultados y Discusión”, figura 7, pág. 38).

Se obtuvo el ADNc mediante RT de la misma manera que en I.A., y a partir del mismo se realizó la reacción de PCR empleando el juego de iniciadores indicados en la tabla 4.

**Tabla 4:** Juego de iniciadores diseñado para la amplificación de un fragmento de la región codificante del gen *CCDC14*.

	<b>Iniciadores</b>	<b>Tamaño amplificado (pb)</b>	<b>Temperatura de anillado (°C)</b>
<b>CCDC14 A <i>Bam</i>HI Fw</b>	5'-CCTTAAGGATCCCTGCCTGTCCTGCTTATTC-3' bases extra BamHI Secuencia CCDC14-específica	854	65
<b>CCDC14 A <i>Xho</i>I Rv</b>	5'-CATGAACTCGAGACTTGGGTGTGCCTGACTG-3' bases extra XhoI Secuencia CCDC14-específica		

Fw: iniciador directo, Rv: iniciador inverso. En ambos iniciadores se presentan secuencias del fragmento a amplificar (rosa), secuencias correspondientes a los sitios donde cortan las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I en Fw y Rv, respectivamente (negro) y 6 bases extra en cada uno (verde).

El iniciador Fw posee una longitud de 31 bases. Contiene 20 bases con complementariedad específica del gen y una cola extra de 11 bases que incluye una secuencia de corte para la enzima de restricción *Bam*HI y 6 bases flanqueantes para facilitar el corte de la enzima en el extremo del fragmento.

El iniciador Rv posee también una longitud de 31 bases y contiene 19 bases con complementariedad específica del gen y una cola extra de 12 bases que incluyen el sitio de corte de la enzima *Xho*I y 6 bases flanqueantes con el mismo objetivo que en el iniciador Fw.

Se realizó la amplificación por PCR del fragmento *CCDC14* usando la mezcla de reactivos detallada en la tabla 5.

**Tabla 5.** Mezcla de reacción de PCR para la amplificación del fragmento codificante de *CCDC14*

<b>Reactivos</b>	<b>Vol. (<math>\mu</math>L)</b>
Sol. tampón Taq 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
dNTPs (25 mM)	0,2
Primer Fw (25 $\mu$ M)	0,4
Primer Rv (25 $\mu$ M)	0,4
Polimerasa Taq (Fermentas; 5 U/ $\mu$ l)	0,3
H <sub>2</sub> O ultrapura	17,2
ADNc (producto RT)	2
Volumen total	25

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador indicado anteriormente, y el programa empleado fue: 2 min. a 94 °C, 5 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 60 °C y 1 min. a 72 °C, seguidos de 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 65 °C y 1 min. a 72 °C, y 1 ciclo de extensión final de 5 min. a 72 °C.

### **II.B Pasaje por “vector T”**

Previo a la clonación del producto de PCR en el vector de expresión, se realizó una ligación de dicho producto al vector pGEM-T Easy (Promega).

La relación molar inserto:vector utilizada para la ligación fue de 3 : 1. En base a esta relación, 50 ng de vector y 42,5 ng de producto de PCR purificado se hicieron reaccionar con 5 U de ligasa T4 (Fermentas) en la solución (sol.) tampón correspondiente a la enzima, y se adicionó H<sub>2</sub>O ultrapura estéril para llegar a un volumen final de 10  $\mu$ L. Finalmente la reacción se dejó transcurrir a 4 °C durante la noche (o.n.).

Los 10  $\mu$ L del producto de ligación se transformaron en 100  $\mu$ L de células competentes *E. coli* DH10B, las cuales se encontraban almacenadas en 20% de glicerol a -80 °C. El procedimiento de transformación química consistió en una incubación del tubo con la mezcla por 30 min. en hielo, seguido de choque térmico durante 90 seg. a 42 °C y finalizado con una incubación durante 2 min. en hielo. Luego se adicionaron 600  $\mu$ L de medio de cultivo LB líquido [10 g Bactotripton, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, H<sub>2</sub>O cantidad suficiente para

(c.s.p.) 1 litro, pH 7,0] y se incubó durante 1 hora a 37 °C para reforzar las membranas celulares que habían sido debilitadas en el procedimiento de generación de células competentes y permitir la expresión del gen de resistencia antibiótica.

El vector pGEM-T Easy presenta ciertas propiedades que permiten a las células transformadas crecer en medios selectivos y diferenciales. Es decir, por un lado le brinda a la célula el gen de resistencia al antibiótico ampicilina (amp) y por otro le brinda la parte N-terminal de la proteína  $\beta$ -Galactosidasa, la cual se complementa con la porción C-terminal expresada por la misma célula, dando lugar a la formación de la enzima activa. Es posible inducir la síntesis de dicha proteína por parte de la célula transformada mediante la adición del inductor IPTG (isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido) e identificar las colonias que expresan a la misma mediante el agregado del sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil- $\beta$ -D galactósido), el cual genera colonias de color azul cuando reacciona con  $\beta$ -galactosidasa. La región del vector donde se ligan los insertos es dentro del gen que codifica para la parte N-terminal de la enzima; por lo tanto, si la ligación funciona correctamente, el inserto interrumpirá el gen y dará lugar a la generación de colonias de color blanco.

En una placa de petri con LB agar (medio LB con 5 g de agar por litro) conteniendo amp. 50  $\mu$ g/ml, se agregaron 30  $\mu$ L de XGal (20 mg/ml) y 9  $\mu$ L de IPTG (200 mg/ml) y se sembraron 200  $\mu$ L de la mezcla de transformación. Se incubó o.n. en estufa a 37 °C.

De las colonias crecidas, se seleccionaron las de color blanco y se re-estriaron en placas con LB agar/amp. A partir de las estrías, colonias aisladas se incubaron en 2 ml de LB líquido conteniendo 50  $\mu$ g/ml de amp. o.n. a 37 °C. A continuación se procedió a la extracción de los ADN plasmídicos de cada colonia, seguido de digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I y corrida electroforética en gel de agarosa para control de insertos, según lo detallado en las secciones **IV.A**, **IV.E** y **IV.B** (“Materiales y Métodos”, pág. 31) respectivamente.

## **II.C- Clonado en el vector de expresión**

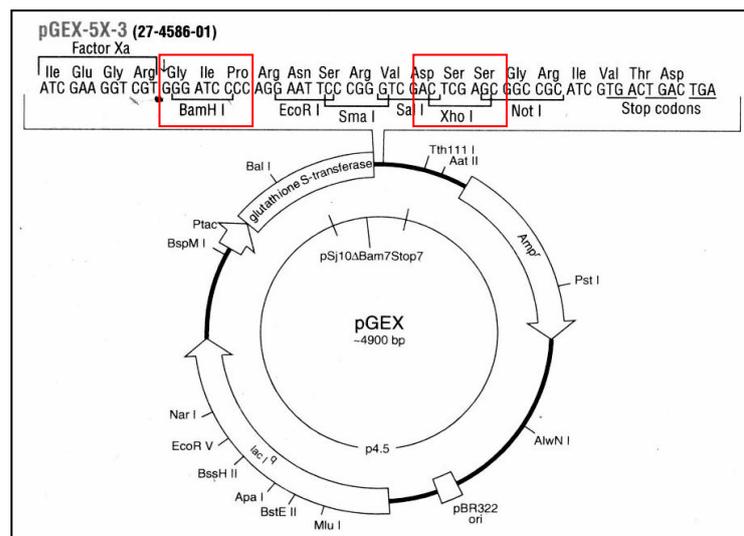
### **II. C.1- El vector pGEX-5x-3**

La estrategia de clonado en el sistema pGEX-5x-3 (Amersham/GE) se basa en la inserción de una secuencia de interés en el sitio múltiple de clonado (*polylinker*) ubicado a continuación del gen codificante para la enzima GST, para expresarla en *E. coli* como proteína de fusión a GST (Harper & Speicher, 2008). La GST se expresa naturalmente en *E. coli* como proteína soluble, lo que favorece la obtención de un buen rendimiento de la proteína de fusión

en la fracción soluble de la célula. Esta estrategia ha sido de una gran utilidad para la expresión de proteínas recombinantes de manera soluble en *E.coli*, y se han diseñado hasta el momento varios sistemas de expresión que usan distintas proteínas del huésped como marcadores (*tags*) (Ho Yoon *et al.* 2010).

La expresión del gen de fusión está bajo el control del promotor *tac*, el cual es inducido por IPTG. El vector pGEX-5x-3 tiene además el gen *lacIq*, cuyo producto es una proteína represora del promotor del gen *tac*, lo que permite que el gen de fusión no se exprese hasta que sea inducido con IPTG. Además presenta el gen de resistencia a amp. permitiendo a las células crecer en un medio de cultivo selectivo, con antibiótico (Figura 5) (Harper & Speicher, 2008).

Las proteínas de fusión a GST presentan un modo sencillo de purificación, el cual se basa en afinidad de la GST por el glutatión (ver III.B) (Harper & Speicher, 2008).



**Fig. 5. Mapa del vector pGEX-5x-3.** Se muestra la secuencia del sitio múltiple de clonación, y dentro de los recuadros rojos se destacan los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*, entre los cuales fue clonado el fragmento *CCDC14*. Dentro del vector se muestra la secuencia codificante para la GST (“glutathione S-transferase”), flanqueado por el promotor *tac* (*Ptac*), el gen de resistencia a ampicilina (*Amp<sup>r</sup>*) y el gen de la proteína represora del promotor *tac* (*lacIq*) (Harper & Speicher, 2008).

### **II.C.2- Obtención del vector pGEX-5x-3, en condiciones para ser ligado al fragmento CCDC14**

El vector de expresión pGEX-5x-3 se encontraba a disposición en nuestro laboratorio, clonado en células *E. coli* XL1-Blue conservadas a -80 °C. En una placa conteniendo LB agar/amp se estrió una cantidad de dichas células y se dejó creciendo las mismas o.n. a 37 °C.

Al día siguiente se picaron algunas de las colonias crecidas y se incubaron en 25 ml de LB líquido/amp a 37 °C. Luego de crecer el cultivo o.n., se utilizó el “Qiagen plasmid midi Kit” (Qiagen) y se siguió las instrucciones del mismo para realizar una midipreparación de ADN plasmídico y así obtener una buena cantidad del vector pGEX-5x-3. Se resuspendió en un volumen final de 200 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril, y se guardó a -20 °C.

Se determinó la cantidad de ADN del vector obtenida mediante la medida de Absorbancia (Abs) a 260 nm en “Nanodrop 1000”, y se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (ver “Materiales y Métodos”, IV.E, pág. 32) para su posterior ligación al fragmento *CCDC14*.

### **II.C.3- Ligación del fragmento CCDC14 al vector pGEX-5x-3 y clonado en células BL21 Star**

Se realizó la ligación del fragmento *CCDC14* al vector pGEX-5x-3 manteniendo una relación molar inserto:vector de 10:1. Teniendo en cuenta que el inserto presenta un tamaño de 831 pb y que el tamaño del vector digerido es de 4949 pb, 100 ng de vector pGEX-5x-3 fueron incubados con 167 ng de inserto, en una mezcla que contenía 5 U de la enzima ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas), 2 µl de sol. tampón 10X de la enzima y H<sub>2</sub>O ultrapura c.s.p. 20 µL. Se incubó la reacción durante 1 hora a 22 °C y o.n. a 16 °C (en termociclador). Finalmente se inactivó la enzima calentando a 65 °C durante 15 min.

Se realizó un control negativo de la misma manera, pero sin el agregado del inserto. Esto es de gran utilidad para observar si ambas enzimas de restricción funcionaron correctamente en la digestión del vector. Es decir, luego de una transformación del vector control en células competentes, no deberían crecer colonias siempre y cuando el vector presentase dos extremos cohesivos no complementarios entre sí (generados por ambas enzimas de restricción). De lo contrario, si una de las dos enzimas no hubiera funcionado, el vector religaría y generaría colonias conteniendo vector carente de inserto (en este sentido, señalamos

que el vector pGEX-5x-3 no posee el sistema de selección blanco/azul que se encuentra presente en el pGEM-T Easy, y por lo tanto es importante estimar el número aproximado de posibles falsos positivos).

La clonación y posterior expresión proteica mediante la inducción con IPTG se realizó en células *E. coli* BL21 Star debido a ciertas características que presentan con respecto a otras células. Esta cepa es deficiente en la producción de Rnasa E y la proteasa OmpA, y por lo tanto los ARNs y sus proteínas resultantes presentan una mayor estabilidad que los producidos en otras cepas [manual de uso de Invitrogene “One Shot BL21 Star (DE3) and One Shot BL21 Star (DE3) pLysS Competent Cells”].

Previo a la transformación en células BL21 Star, se realizó una transformación del producto de ligación en células *E. coli* DH-10B de alta eficiencia (para garantizar la obtención de recombinantes), siguiendo el mismo protocolo que en la transformación descrita en **II.B** (“Materiales y Métodos”, pag 23). Posteriormente, a partir de clones obtenidos en las placas de LB agar/amp se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico, y una alícuota de cada una fue sometida a digestión con las enzimas *XhoI* y *BamHI* y corrida en gel de agarosa para verificar la presencia del inserto.

De los clones positivos, uno fue secuenciado para verificar la identidad del inserto, y que el fragmento se encontrara en su correcto marco de lectura.

A continuación, ADN plasmídico del clon cuya secuencia se había confirmado se utilizó para una posterior transformación en células BL21 Star competentes, siguiendo el mismo protocolo que en las transformaciones anteriores.

### **III- Obtención de la proteína recombinante GST-CCDC14**

#### **III.A- Optimización de la expresión proteica**

##### **III.A.1- Ensayos de expresión de la proteína recombinante**

Para realizar un control de expresión de nuestra proteína de interés se analizaron las colonias aisladas, a las cuales se les indujo la expresión proteica y se analizaron los productos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

A partir de dos colonias aisladas positivas y una colonia con vector pGEX-5x-3 sin inserto como control negativo, se iniciaron cultivos líquidos de 3 ml en LB/amp, los que fueron incubados a 37 °C o.n. Al día siguiente se tomaron alícuotas de 150 µL de cada uno de los 3 cultivos y se diluyeron en 10 ml de LB/amp. Se dejaron crecer a 37 °C hasta alcanzar una

densidad óptica medida a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) entre 0,5-0,6, momento en el cual se tomó 1 ml de cada cultivo como control sin inducir. A los restantes 9 ml se les indujo la expresión mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 0,3 mM, y se continuó con una incubación a 37 °C durante 4 horas.

Alícuotas de 2 ml de cada cultivo inducido y las alícuotas de los cultivos sin inducir (1 ml), fueron centrifugadas por 1 min. a velocidad máxima. Los precipitados (conteniendo las células) fueron resuspendidos en 40  $\mu$ l y 20  $\mu$ l de sol. tampón de Laemmli (0,12 M Tris, 10% dodesilsulfato sódico –SDS-, 20% glicerol, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,02% Azul de Bromofenol), respectivamente para mantener la proporcionalidad, analizados mediante corridas electroforéticas SDS-PAGE (Laemmli, 1970), y los geles de poliacrilamida fueron posteriormente teñidos con Azul de Coomasie, según se detalla en la sección **IV.H** (“Materiales y Métodos”, pág. 34).

### **III.A.2- Análisis con distintas concentraciones de IPTG**

El ensayo de expresión de proteínas fue repetido, pero en este caso se cambiaron las concentraciones de IPTG agregadas para determinar cuál era la óptima y si ocurrían cambios significativos con respecto a la concentración 0,3 mM, usada previamente. Las cantidades administradas de IPTG fueron 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM y 1 mM, y los resultados fueron analizados mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomasie según **IV.H** (“Materiales y Métodos”, pág. 34).

### **III.A.3- Análisis de la proteína de fusión en las fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares**

Con el objeto de evaluar la cantidad de proteína obtenida en la fracción soluble con respecto a la insoluble y en relación a la cantidad de proteína total, los restantes 7 ml de los cultivos inducidos fueron centrifugados durante 1 min. a máxima velocidad. Las células obtenidas se sometieron a un protocolo de lisis celular necesaria y suficiente para obtener las proteínas y otros compuestos solubles en una fracción, y proteínas insolubles formadoras de cuerpos de inclusión en otra. Así, el precipitado obtenido fue resuspendido en PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g  $Na_2HPO_4$ , 0,24 g  $KH_2PO_4$  por litro de  $H_2O$  ultrapura, pH 7,4.) con Tritón 2%, y se colocó en agitador rotatorio 20 min. a temperatura ambiente. A continuación, la solución fue sonicada con un “Ultrasonic homogenizer 4719 series” (Cole Parmer instruments) en hielo

dando 3 pulsos de 1 seg. a nivel de potencia 4, y se colocó nuevamente en el agitador por otros 20 min. a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó la solución a 10000 g durante 10 min., se pasó el sobrenadante (fracción soluble) a otro tubo y el precipitado (fracción insoluble) se resuspendió en 50 µl de sol. tampón de Laemmli. El sobrenadante fue precipitado en solución con 400 µl de etanol y 100 µl de cloroformo a 4 °C durante 30 min. Pasado este tiempo, la solución fue centrifugada a 12000 g durante 5 min. provocándose la formación de 3 fases. La fase superior (fase acuosa) que contenía el ADN fue descartada, y la fase inferior (fase orgánica) y la intermedia fueron transferidas a otro tubo donde se agregaron 300 µl de metanol para lograr una precipitación del contenido. Por último, la solución fue centrifugada a 12000 g durante 2 min. y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 µl de sol. tampón de Laemmli.

Las fracciones correspondientes a ambos clones positivos y al control negativo fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie.

### **III.B- Expresión y purificación de la proteína recombinante**

Cuatro cultivos de 5 ml de LB/amp cada uno, inoculados con la cepa BL21 Star conteniendo el producto de ligación, fueron crecidos a 37 °C o.n. Al día siguiente, se iniciaron 4 cultivos de 500 ml en LB/amp inoculados con los 4 cultivos iniciadores (*starter*) del día anterior. Se dejó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0,5-0,6$ . En ese momento se adicionó IPTG a una concentración final de 0,3 mM, y se continuó la incubación a 37 °C. Al cabo de 4 horas, se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm durante 10 min.

A partir de cada precipitado se prosiguió con la purificación de la proteína GST-CCDC14 empleando el equipo (*kit*) comercial “B-PER GST Spin Purification Kit” (Pierce), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este *kit* permite la purificación de proteínas de fusión a GST, mediante la unión por afinidad de las mismas a glutatión. El precipitado obtenido se resuspende en sol. tampón de lisis celular B-PER™, seguido de una centrifugación a máxima velocidad. Al sobrenadante (que corresponde a la fracción soluble) se le agrega glutatión unido covalentemente a agarosa, y se deja transcurrir la reacción de afinidad durante 10 min. Se realiza una nueva centrifugación a 1200 g durante 5 min., y el precipitado obtenido, consistente en un gel conformado por la agarosa, es resuspendido en sol. tampón de lavado y transferido a una columna. Luego de una centrifugación a 1200 g por 2 min., la agarosa y la proteína de

interés unida a las moléculas de glutatión son retenidas en la columna y purificadas del resto de las proteínas. Finalmente la proteína fusionada a GST es eluída y liberada de la agarosa mediante la adición de glutatión reducido, en un proceso que se repite 4 veces, obteniéndose por lo tanto 4 fracciones (por cultivo de 500 ml) que posiblemente contengan la proteína de interés.

Para disminuir la proteólisis durante la purificación, al momento de la lisis con B-PER se agregó inhibidor de proteasas “Protease Inhibitor Cocktail” (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/g de cultivo.

### **III.C- Análisis de la proteína purificada**

#### **III.C.1- Medidas de concentración y visualización de los productos mediante SDS-PAGE**

Una vez eluída la proteína GST-CCDC14, se evaluó la cantidad de proteína obtenida midiendo su Abs. a 280 nm, teniendo en cuenta la relación 1 D.O. = 0,5 mg/ml como referencia (como aproximación “grosera”, dado que la medida de Abs. dependerá del contenido de aminoácidos aromáticos de la proteína) .

Alícuotas de 10 µl de las distintas fracciones de proteína eluída fueron diluídas en 10 µL de sol. tampón de Laemmli, y corridas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, los que fueron posteriormente teñidos con azul de Coomassie según el detalle en **IV.H** (“Materiales y Métodos”, pág. 34).

#### **III.C.2- Western blot con anticuerpo anti-GST**

Para verificar que la proteína obtenida a partir de la purificación correspondía a una proteína fusionada a GST, se realizaron ensayos de *Western blot* usando un suero policlonal anti-GST de conejo, producido previamente de forma casera y disponible en el laboratorio (Capoano, 2008).

A partir de electroforesis SDS-PAGE en geles sin teñir, las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa PROTRAN (Schleicher & Schuell). Esta transferencia fue realizada mediante el uso del equipo Mini Trans-Blot cell II (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se efectuó empleando sol. tampón CAPS [25mM de 3-Ciclohexilamino 1-Propano Sulfónico (CAPS), 10% metanol, 0,0025% SDS y 0,5mM de mercaptopropionico, pH=10]. Se dejó transfiriendo durante 1 hora a 90 V y una corriente de 0,6 A. Luego, la membrana transferida se sometió a un

bloqueo o.n. a 4 °C en solución TBST 1X (100 mM Tris, 1,5 M NaCl y 1% de Tween, pH=7,4) conteniendo 5% de leche en polvo descremada. A continuación, la membrana se dejó por 30 min. más en solución de bloqueo a temperatura ambiente, se lavó con TBST 1X, se depositó en un recipiente conteniendo el anticuerpo primario anti-GST diluido 1/1000 en TBST 1X, y se dejó durante 2 horas en agitación. Al cabo de este tiempo se realizaron dos lavados de 15 min. con TBST 1X, y se sometió la membrana al anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Pierce) diluido 1/150.000 en TBST 1X durante 1 hora.

Luego, se realizaron 2 lavados de 15 min., cada uno con TBST 1X, y se procedió con el desarrollo de color fluorescente empleando las soluciones de peróxido de hidrógeno y luminol del *kit* “Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit” (Pierce), dejando reaccionar durante 5 min. Las membranas se expusieron a placas de autorradiografía por tiempos variables (1-5 min.), y posteriormente las placas fueron reveladas y fijadas, de acuerdo con la práctica habitual.

## **IV- Protocolos generales**

### **IV.A- Minipreparaciones de ADN plasmídico**

Se iniciaron cultivos de 2 ml de las células que contenían el vector (con o sin insertos) a purificar en LB/amp, y se dejaron creciendo o.n. a 37 °C. Al día siguiente las células fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 0,2 ml de solución I (50 mM Tris-HCl a pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg de Rnasa A por ml de solución). Luego se agregaron 0,2 ml de solución II (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión para lograr una lisis celular alcalina, y se incubó por 5 min. a temperatura ambiente. A continuación se precipitó el ADN genómico mediante el agregado de 0,2 ml de la solución III (3,0 M acetato de potasio, pH 5,5), se incubó 5 min. en hielo y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio, y se mezcló con 0,7 volúmenes de isopropanol invirtiendo varias veces para lograr la completa precipitación del ADN plasmídico. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó nuevamente durante 5 min. Finalmente se descartó el etanol, el precipitado se secó en centrífuga con bomba de vacío (Savant) durante 10 min., se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril y se conservó a -20 °C.

#### **IV.B- Electroforesis en gel de agarosa**

Las corridas electroforéticas en gel de agarosa se realizaron a concentración 1% con bromuro de etidio (EtBr) 0,3 µg/ml en sol. tampón TAE 1X, y se corrieron durante 1 hora a 80 V en la misma solución tampón. Posteriormente se visualizaron las bandas mediante la exposición del gel a luz ultravioleta (UV) en transiluminador, y el gel se fotografió con cámara digital “Kodak EDAS 290”. Como marcadores de peso molecular se emplearon el “Gene Ruler 100 pb DNA ladder plus” (Fermentas), ó 0,5 µg de ADN del bacteriófago λ (Fermentas) digerido con *Hind*III (Promega, 10 U/µL).

Para las corridas electroforéticas del vector plasmídico linealizado, los geles se hicieron al 0,8%.

Para la electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa preparativo, se procedió a correr una gran cantidad del fragmento para su posterior purificación. Con el fin de obtener una banda lo más nítida posible, se corrió un gel de agarosa en TAE 1X al 2%, durante 1 hora 30 min., y a 50 V.

#### **IV.C- Elución y purificación de bandas de geles de agarosa**

La elución de bandas de ácido nucleico de los geles de agarosa se llevó a cabo empleando el *kit* “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen) o el *kit* “Wizard SV Gel and PCR clean-up sistem” (Promega), y siguiendo en ambos casos el protocolo del respectivo fabricante. Se obtuvo el producto en un volumen final de 50 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril, y el mismo se conservó a -20 °C.

#### **IV.D- Cuantificación de ácidos nucleicos**

La concentración de ácidos nucleicos, ya sea de bandas eluidas de agarosa, minipreparaciones para secuenciación, u otros, se midió en espectrofotómetro UV “Nanodrop 1000” (Thermo Scientific) realizando medidas de Abs. a 260 nm y 280 nm. La concentración de ácidos nucleicos está dada por las medidas de Abs. a 260 nm, y el índice de pureza de la muestra está dada por la relación Abs. 260 nm/Abs. 280 nm.

#### **IV.E- Digestión con enzimas de restricción**

Las digestiones se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante (Fermentas). Los vectores (ya sea previa o posteriormente al clonado) fueron digeridos en un primer paso por la

enzima de restricción *BamHI* (10 U/ $\mu$ l) utilizando una relación de 10 U de enzima por  $\mu$ g de vector, en sol. tampón Tango (10X) a concentración final 1X y H<sub>2</sub>O ultrapura para completar el volumen final elegido. La reacción se dejó transcurrir durante 1 hora a 37 °C. A continuación, como segundo paso, el producto de la primera digestión fue sometido a la enzima de restricción *XhoI* (10 U/ $\mu$ l), utilizando una relación de 10 U de enzima por  $\mu$ g de vector, en sol. tampón Tango (10X) a concentración final 2X y H<sub>2</sub>O ultrapura para completar el volumen final definitivo. Nuevamente la reacción se dejó transcurrir durante 1 hora a 37 °C.

Para las digestiones de minipreparaciones con el objeto de visualizar insertos, se digirieron 10  $\mu$ l de cada minipreparación. En el caso de las digestiones preparativas del producto *CCDC14* para purificar el fragmento, 30  $\mu$ l de miniprep se sometieron a digestión con las enzimas de restricción, en tanto que para la digestión del vector pGEX-5x-3, se emplearon 5  $\mu$ g de ADN del vector.

#### **IV.F- Reacciones de secuenciación y análisis de secuencias**

Los ADNs a ser secuenciados fueron enviados al Servicio de Secuenciación Automática del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon), tanto para el caso de minipreparaciones plasmídicas como para el secuenciado directo de productos de PCR.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa “BioEdit Sequence Alignment Editor”, mediante el cual fue posible la reconstrucción de la secuencia codificante completa.

#### **IV.G- Generación de células competentes *E. coli* BL21 Star**

Para la generación de células competentes, se crecieron células BL21 Star en un cultivo de 2 ml de LB líquido a 37 °C o.n. Al día siguiente, se tomó una alícuota del cultivo crecido para realizar una dilución 1/100 en 100 ml de LB fresco y se dejó crecer hasta una DO<sub>600nm</sub> de 0,2-0,3 (aproximadamente 3 horas). Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, las células presentes en el precipitado se resuspendieron en 40 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío, y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 5 min., el precipitado fue resuspendido en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> y se dejó o.n. a 4 °C. Al día siguiente se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de células, se mezclaron con glicerol a concentración final 20%, y finalmente se congelaron en freezer a -80 °C.

#### **IV.H- Electroforesis de proteínas SDS-PAGE**

Para realizar una separación de proteínas se realizaron electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida, conocidos como SDS-PAGE. Se utilizó una cuba de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad), y el montaje del gel se efectuó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un gel de poliacrilamida separador 12% (30% Acrilamida/0,8% Bisacrilamida, 1 M Tris pH 8,7, 10% SDS, 10% persulfato de amonio, TEMED y H<sub>2</sub>O). Luego de 20 minutos el gel polimerizó y por encima de éste se realizó un gel de poliacrilamida concentrador 5% (a diferencia del 12% contiene 1 M Tris pH 6,8), y la reacción de polimerización transcurrió por 20 minutos más.

Por otro lado, las muestras que fueron sembradas en estos geles se trataron previamente con sol. tampón de Laemmli y fueron calentadas durante 5 min. a 100 °C para lograr la completa desnaturización de las proteínas. Las muestras se cargaron inmediatamente luego de calentadas y se efectuaron las corridas en sol. tampón de corrida (25 mM Tris pH 8,5, 0,112 M glicina y 0,1% SDS) a 100 V mientras que la muestra estaba en el gel concentrador, y a 140 V en todo el trayecto del gel separador. En todos los casos, en uno de los carriles fue sembrado el marcador de peso molecular “PageRuler Unstained Protein Ladder” (Fermentas).

Para la visualización de las bandas de proteína se realizó la tinción del gel con solución de azul de Coomasie (0,125% Azul de Coomasie, 40% metanol 10% ácido acético), y luego de obtener la completa tinción del gel, éste se incubó en solución de desteñido (25% etanol, 10% ácido acético) hasta observar un contraste entre las bandas y el gel para la distinción de las mismas.

## **4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

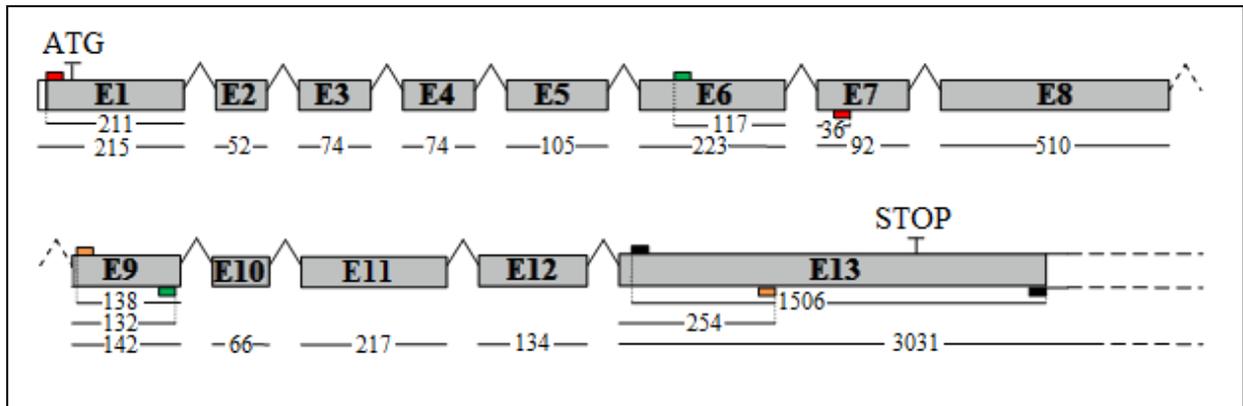
### **I-RT-PCR y secuenciación del ADNc de *CCDC14***

Una parte muy importante en la caracterización del gen *CCDC14* de la rata (*Rattus norvegicus*) antes de realizar estudios a nivel proteico, era obtener empíricamente la información de la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína respectiva, y compararla con la secuencia teórica, ensamblada *in silico*. Es importante destacar que la secuencia *in silico* había sido deducida en nuestro laboratorio, en base a la secuencia teórica ensamblada a partir del genoma/transcriptoma de ratón.

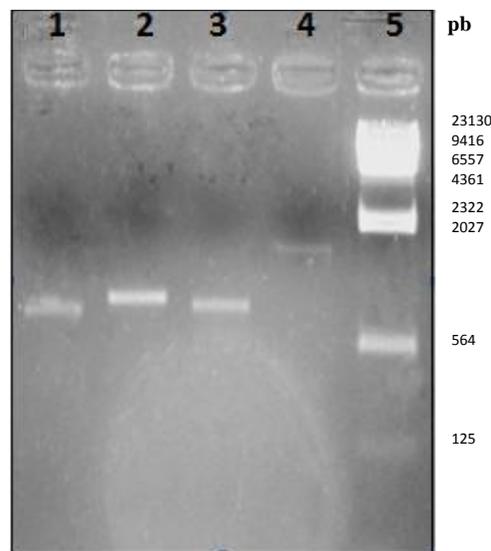
La confirmación de la secuencia resultaba fundamental, dado que la intención era producir un suero policlonal contra la proteína y, por lo tanto, debíamos poseer información confiable acerca de su secuencia así como del marco de lectura en que la proteína se expresaba. Con ese objetivo, se utilizaron 4 pares de iniciadores diseñados flanqueando intrones, de modo de ver si se lograban amplificar bandas del tamaño esperado según la secuencia teórica, y si para cada juego de iniciadores se amplificaba una banda única o más de una. Los distintos juegos de iniciadores debían permitir la amplificación de la secuencia codificante completa correspondiente a un tamaño teórico de 3914 pb, dividida en 4 fragmentos solapantes de 775, 850, 809 y 1506 pb respectivamente (Figura 6.A.). A partir de estos juegos de iniciadores, detallados en la tabla 2 (“Materiales y métodos”, pág. 21), se realizaron los ensayos de RT-PCR y una posterior secuenciación de los productos amplificados.

Las 4 amplificaciones dieron como resultado una banda única cada una. Visualizadas en una corrida en gel de agarosa se pudo estimar los tamaños de cada una, observando que los resultados eran concordantes con lo estimado previamente a partir de la secuencia ensamblada en forma teórica (Figura 6.B).

A



B



**Fig. 6. Amplificación de los 4 fragmentos solapantes de *CCDC14*.** A- Esquema que representa el gen *CCDC14*, donde se muestran los 13 exones (E1-E13) separados por sus respectivos intrones (ángulos). Los cuadros en color gris representan la región amplificada por los 4 juegos de iniciadores. Todos los iniciadores se muestran como recuadros de color pegados en los respectivos exones; los correspondientes a los iniciadores directos se ubican por encima de los exones y los correspondientes a los inversos se ubican por debajo. Juego de iniciadores 1: recuadro rojo; juego de iniciadores 2: recuadro verde; juego de iniciadores 3: recuadro naranja; juego de iniciadores 4: recuadro negro. Al pie de cada exón se indica el número de nucleótidos que contiene cada uno, y donde hay iniciadores también se indica el número de nucleótidos que van desde el iniciador hasta el principio/fin de ese exón. Se señalan los sitios de iniciación (ATG) y finalización (STOP) de la traducción. B- Gel de agarosa al 1% de los productos amplificados. Carriles 1, 2, 3 y 4- Productos amplificados con los juegos de iniciadores 1, 2, 3 y 4 respectivamente, 5- Marcador de peso molecular (ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con HindIII). Los tamaños de bandas del marcador de peso molecular (pb) se señalan a la derecha de la figura.

Las bandas de PCR obtenidas fueron eluidas del gel, y enviadas a secuenciar. La secuenciación de los distintos fragmentos y el ensamblado de las secuencias obtenidas, nos permitió determinar con certeza la secuencia codificante del gen *CCDC14* (Figura 7). Aunque no se pudo secuenciar todo el ARNm, el fragmento codificante (desde AUG hasta TGA) fue secuenciado correctamente, quedando sólo un segmento de 256 pb correspondiente a parte de la región 3' UTR sin secuenciar (ver fig. 7). La secuencia obtenida empíricamente fue muy similar a la secuencia teórica predicha previamente, observándose únicamente unos pocos cambios de nucleótidos de mínima importancia ya que no modificaron ni el marco de lectura ni los sitios de iniciación y terminación pre-identificados.

A partir de la secuencia confirmada, se pudo seleccionar un fragmento dentro de *CCDC14* para su posterior clonado y expresión como proteína recombinante en células de *E. coli* (ver a continuación).

**38** **ATG** AGG CGG GGC GTT CCG CAG TCT CCT TCC CGG AAG CGG AAG CTC GGG GGG CGG GAC AAG GGA GGT CGG GAC **109**  
**1** Met Arg Arg Gly Val Pro Gln Ser Pro Ser Arg Lys Arg Lys Leu Gly Gly Arg Asp Lys Gly Gly Arg Asp **24**

**110** GTC TCG GCG GTT AAT TCT TTT TTT CTC AAG TAT TCG TTT CCC TAC GTC TGG GCT CTT CTG AGG CTG AGA GAA **181**  
**25** Val Ser Ala Val Asn Ser Phe Phe Leu Lys Tyr Ser Phe Pro Tyr Val Trp Ala Leu Leu Arg Leu Arg Glu **48**

**182** ATG GTC AGG TCT GGA TCT CGA CCG GGC CAG GTG ATA CCT TCA GGA AGG CAA CCC GGA TCG AAG TTA CCA AAT **253**  
**49** Met Val Arg Ser Gly Ser Arg Pro Gly Gln Val Ile Pro Ser Gly Arg Gln Pro Gly Ser Lys Leu Pro Asn **72**

**254** GGA AAG AAA GGG ACC CAC GTG AGA AAA GTA GCA CAT TTT AAC GTA GAT **CCT GCC TGT CCT GCT TAT TCT GAT** **325**  
**73** Gly Lys Lys Gly Thr His Val Arg Lys Val Ala His Phe Asn Val Thr Asp Thr Val Gln Gly Leu Asp Ser **96**

**326** **TCA** GAA AGT CAG ACG GAC ACT GTT CAG GGA CTT GAC AGT TGT GCT TCT TTG CTG CGG GAC ATT TTG AAA AAT **397**  
**97** Asp Pro Ala Cys Pro Ala Tyr Ser Asp Ser Glu Ser Gln Cys Ala Ser Leu Leu Arg Asp Ile Leu Lys Asn **120**

**398** GAA GAT TCA GGT TCA GAA GTA GTA TAT TCA GAA AAT AGA TCC AAT TCT AAA CCT TTA GAA GGC AGA AAG AAC **469**  
**121** Glu Asp Ser Gly Ser Glu Val Val Tyr Ser Glu Asn Arg Ser Asn Ser Lys Pro Leu Glu Gly Arg Lys Asn **144**

**470** AGA TCT AAA AAG AAA GGA CCT GAA AAA CAT GTT CCT ACA GTG GTC CGG **AAG GAA ATA TTA** TCA TCA GAA AAT **541**  
**145** Arg Ser Lys Lys Lys Gly Pro Glu Lys His Val Pro Thr Val Val Arg Lys Glu Ile Leu Ser Ser Glu Asn **168**

**542** AAG AGA TGG ATG CCT AAT GAA ACT TCT ACT GGA AGT GAC ATA GCG CAG CAT TGG TCA GTA CAA GAT CAT TAC **613**  
**169** Lys Arg Trp Met Pro Asn Glu Thr Ser Thr Gly Ser Asp Ile Ala Gln His Trp Ser Val Gln Asp His Tyr **192**

**614** AGA ATG TAC TCA CCG ATA ATA TAC CAA GCC CTC TGT GAG CAT GTG CAG ACT CAA ATG TCA CTG ATG AAT AGC **685**  
**193** Arg Met Tyr Ser Pro Ile Ile Tyr Gln Ala Leu Cys Glu His Val Gln Thr Gln Met Ser Leu Met Asn Ser **216**

**686** TTC GCT TCA AAA CAT GGC CCC AAT GGA AGG CCT GCT GTG TGC CAT ACT GGG TCT AAT TCA GAC TCT CAG GCA **757**  
**217** Phe Ala Ser Lys His Gly Pro Asn Gly Arg Pro Ala Val Cys His Thr Gly Ser Asn Ser Asp Ser Gln Ala **240**

**758** ATG TCA CAT TCT GGT TTT GGC TGG TCT TCC GCT TCG GTC TGG CCC CCT CAG CAG CCA TCC TGC CAT CTA ACA **829**  
**241** Met Ser His Ser Gly Phe Gly Trp Ser Ser Ala Ser Val Trp Pro Pro Gln Gln Pro Ser Cys His Leu Thr **264**

**830** GTC CAC TCT GAA GTT CAG ACT GAT GAT GAT AAC CAG TTT GAC TCA CAG GGT CAG ACA ACC CCT GTG CGG CAC **901**  
**265** Val His Ser Glu Val Gln Thr Asp Asp Asp Asn Gln Phe Asp Ser Gln Gly Gln Thr Thr Pro Val Arg His **288**

**902** CGT GAT GCT CCC AGG ACT TTA TCC AGC **GTC** CAT CCT GGA GTT GCA CAT GGC CCT CCC CAC TCT GAT GGT GCC **973**  
**289** Arg Asp Ala Pro Arg Thr Leu Ser Ser Val His Pro Gly Val Ala His Gly Pro Pro His Ser Asp Gly Ala **312**

**974** GCT GCT TCA AAG ATT CAG CAG CTG AAT CTT GGG AGT TGG GTT CTG CCA CAA CAG AGA GCT CCT AAG GAA GCA **1045**  
**313** Ala Ala Ser Lys Ile Gln Gln Leu Asn Leu Gly Ser Trp Val Leu Pro Gln Gln Arg Ala Pro Lys Glu Ala **336**

**1046** GAG CTA CCG AAG CGT TTC CAA ACA CAC GTG TCT CTG TTT CCA GCT CAT GGA AAA GAC GCT CTC TCG GAC **AGT** **1117**  
**337** Glu Leu Pro Lys Arg Phe Gln Thr His Val Ser Leu Phe Pro Ala His Gly Lys Asp Ala Leu Ser Asp Ser **360**

**1118** **CAG GCA CAC CCA AGT** CCC TCT CAC TTA **CAG CTA GCC** TTC TTG GCC ACT AAT GAA GAG AAA TGT GCC AGA GAA **1189**  
**361** Gln Ala His Pro Ser Pro Ser His Leu Gln Leu Ala Phe Leu Ala Thr Asn Glu Glu Lys Cys Ala Arg Glu **384**

**1190** CAA ATT GGA GAG GCC ACA AAT GAA GGA AAG TAT TTA AGC ATC CAT GAG CAA GAT GCA AAG CTC GCC AAG AAT **1261**  
**385** Gln Ile Gly Glu Ala Thr Asn Glu Gly Lys Tyr Leu Ser Ile His Glu Gln Asp Ala Lys Leu Ala Lys Asn **408**

**1262** GTG CAG CAG GCA GAA AAC GTG AGC CAG ACT GCT GAG AAA GTC AGA ATT GCC AAG TGC TTG CTG GGA GAG CTC **1333**  
**409** Val Gln Gln Ala Glu Asn Val Ser Gln Thr Ala Glu Lys Val Arg Ile Ala Lys Cys Leu Leu Gly Glu Leu **432**

**1334** AAG GCC CTG ACC GAA GAA CAA GAG GAC TCA GAA GTT CAG AGA TTG CTA ACA GAA GTA GAG GCG TGC ATA TCT **1405**  
**433** Lys Ala Leu Thr Glu Glu Gln Glu Asp Ser Glu Val Gln Arg Leu Leu Thr Glu Val Glu Ala Cys Ile Ser **456**

**1406** GGA CTT TCA GCA GTG AGT GGC CAC ATA AAT GTG GAA GTT GAA ATA GCC CTG GCC CTG CAG CCG TTG AGA AGT **1477**  
**457** Gly Leu Ser Ala Val Ser Gly His Ile Asn Val Glu Val Glu Ile Ala Leu Ala Leu Gln Pro Leu Arg Ser **480**

**1478** GAG AAC GCT CAG TTG CGG AGG CAA CTG AGA ATT TTG AAT CAG CGC CTC CGA GAA CAA GAG AAG AGT ACA GAG **1549**  
**481** Glu Asn Ala Gln Leu Arg Arg Gln Leu Arg Ile Leu Asn Gln Arg Leu Arg Glu Gln Glu Lys Ser Thr Glu **504**

**1550** ACA CCT GCT AAC **CTC** AAA **TTG** TTT TCC CTT **CAG** TCG CTG TCA CTG CAG AAT CAG CTG CAG GAG TCG CTG AAG **1621**  
**505** Thr Pro Ala Asn Leu Lys Leu Phe Ser Leu Gln Ser Leu Ser Leu Gln Asn Gln Leu Gln Glu Ser Leu Lys **528**

**1622** AGC CAG GAG TTG CTA CAG AGT AAA AAC GAA GAG CTC CTA AAA GTG ATA GAA GAC CAG CGA GAG GAA AAC AGA **1693**  
**529** Ser Gln Glu Leu Leu Gln Ser Lys Asn Glu Glu Leu Leu Lys Val Ile Glu Asp Gln Arg Glu Glu Asn Arg **552**

**1694** AGG TTC TCC ACT TTG TTT AAA GAC GAA GAG CAA GCC CTG CTT CAC AGC AGA CAG CAG TTT GAC ATG GAG ATG **1765**  
**553** Arg Phe Ser Thr Leu Phe Lys Asp Glu Glu Gln Ala Leu Leu His Ser Arg Gln Gln Phe Asp Met Glu Met **576**

**1766** ACC AGG GTG AAG ATG GAG TTG GAG GAA GCC TTG GCC AAT GAG AAG AAC TCT CGG TTT AAG CTC GAG ACT GCA **1837**  
**577** Thr Arg Val Lys Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Ala Asn Glu Lys Asn Ser Arg Phe Lys Leu Glu Thr Ala **600**

**1838** GAA AAG GAA AAT CAG ATA CTG GGA ATA ACT CTC CGC CAG CGG GAT GCT GAG GTT GCC CGC CTT AGG GAA CTA **1909**  
**601** Glu Lys Glu Asn Gln Ile Leu Gly Ile Thr Leu Arg Gln Arg Asp Ala Glu Val Ala Arg Leu Arg Glu Leu **624**

**1910** ACC AGA ACT TTA CAG AAC AGC ATG AGG AAG CTG CTC TCA GAT CTC CAT GTG GAC ACT GCC CGC TGC AAG ATG **1981**  
**625** Thr Arg Thr Leu Gln Asn Ser Met Arg Lys Leu Leu Ser Asp Leu His Val Asp Thr Ala Arg Cys Lys Met **648**

**1982** GGG AAC AGC CTC ACC AGA TCA CTT CTG AAT GTC TAT GAT CAA CAA TTT CAA CGG GAC CCA GCC CCT CCT CAC **2053**  
**649** Gly Asn Ser Leu Thr Arg Ser Leu Leu Asn Val Tyr Asp Gln Gln Phe Gln Arg Asp Pro Ala Pro Pro His **672**

**2054** ATC TCC ATA ATG AGC TAC CTC AAT AAA TTA GAA ACA AAT CAG AGC TTT ATA CAG TCA GAA CTG CCT AAT AAT **2125**  
**673** Ile Ser Ile Met Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Glu Thr Asn Gln Ser Phe Ile Gln Ser Glu Leu Pro Asn Asn **696**

**2126** GAG GAA ACC CCC GAG TCA GAC AGT CTC TGT GAA AAT GTG CTG CCC TCA CAA AGA CCT CCT CAC AGT GAC GCT **2197**  
**697** Glu Glu Thr Pro Glu Ser Asp Ser Leu Cys Glu Asn Val Leu Pro Ser Gln Arg Pro Pro His Ser Asp Ala **720**

2198	AGG GCA GTG GAT GGG GGC CCT GCC CCT GGA ACT GTC TCT GCT GCT TTG GTG GAG GAT TCT GAC ACA GAC TGT	2269
721	Arg Ala Val Asp Gly Gly Pro Ala Pro Gly Thr Val Ser Ala Ala Leu Val Glu Asp Ser Asp Thr Asp Cys	744
2270	GAA GCC GTC ACT GTA GTA GAA GAT GGG TGT GAC GTG GAC AGT ACA TTT TAT ATT CCC TTT GCA AGA AGC ACT	2341
745	Glu Ala Val Thr Val Val Glu Asp Gly Cys Asp Val Asp Ser Thr Phe Tyr Ile Pro Phe Ala Arg Ser Thr	768
2342	TCT AAA AAG CAC TCG CCA CCT TCT AAG AGA CTG TCC CCC CAG GCG AAG GTG AGC GCT GCT GCC AGC GCC GGT	2413
769	Ser Lys Lys His Ser Pro Pro Ser Lys Arg Leu Ser Pro Gln Ala Lys Val Ser Ala Ala Ala Ser Ala Gly	792
2414	GCC TGT GCC TCC AAA AAA GAA AGT AAA CCG TGT GCA CCC GCA GTT TGT CCC TCA CGA GAC AAA GCG GAA GAT	2485
793	Ala Cys Ala Ser Lys Lys Glu Ser Lys Pro Cys Ala Pro Ala Val Cys Pro Ser Arg Asp Lys Ala Glu Asp	816
2486	GCA CCT GGA AAT CTT TCT GGC ACA TAC GAC ACA GAG GAC GTG CAG CTC CTC AGG AAA ATC AGA GAA GCA CTT	2557
817	Ala Pro Gly Asn Leu Ser Gly Thr Tyr Asp Thr Glu Asp Val Gln Leu Leu Arg Lys Ile Arg Glu Ala Leu	840
2558	GGT AAG ATC CCT GCT GCT GCT GGG CAC CCC AAG GAA CAG GCC ACC CAT CGT GGC CCA CCA GCT CCG CTC AGC	2629
841	Gly Lys Ile Pro Ala Ala Ala Gly His Pro Lys Glu Gln Ala Thr His Arg Gly Pro Pro Ala Pro Leu Ser	864
2630	CCT GGC GTT CCT GTG AAG GGC AAC ATT GTC GCT GAC AGC AGC TTT CTC CAT TCT GAC TTG ATG TCA GAC TGG	2701
865	Pro Gly Val Pro Val Lys Gly Asn Ile Val Ala Asp Ser Ser Phe Leu His Ser Asp Leu Met Ser Asp Trp	888
2702	AGC ATC TCC TCG TTT TCA ACA TTC ACG TCT CGT GAT GAG CAG GAC TTC AGA AAT GGC CTG GCA GCG TTA GAT	2773
889	Ser Ile Ser Ser Phe Ser Thr Phe Thr Ser Arg Asp Glu Gln Asp Phe Arg Asn Gly Leu Ala Ala Leu Asp	912
2774	GCC AAT ATT GCT CGG CTC CAG AAG TCC TTG AAG ACT GGC CTT CTG GAG AAA <b>TGA</b>	2827
913	Ala Asn Ile Ala Arg Leu Gln Lys Ser Leu Lys Thr Gly Leu Leu Glu Lys End	930
2828	TTCTGGGAGGAACTGATTGAGTCCTTTTTTTAAAGTACAGAACTTGACTACATTCATAGTATATTTTGGGTTTTCTTAGAGAGAACATTTTAT	2921
2922	ATTATTAATTATGTATGAAATAATAAATGGAGTAAATTTACTGTTAAGAATATTTTAAACCTGAAACTTACAAAAACAAATTTTCTTGAAACC	3015
3016	AACAGTCTGGGAGAAGAAAGCCGTGGATCAGAAAGTATTGATTTCAAGGCGCTTTACTTGACAGCTTCGGGCTTCACAGAGAATTCCTCAGTGTG	3109
3110	CAATGGCTGGGTCGGCGGTGCACGCCACCGAGCATCTCTGTCTGGAAGGAGAGTACGAAAGGATCAGTACTGTTTAAATGTTCCCTCTGCAGTG	3203
3204	GAATGTTGGTTTTTCATGGTAGTGTCTTGTGTATGGGAATACTCTGTGTTACGAGCTAGTCTGCCAATGACATGCGCTAACGTTTCAGAGAGAG	3297
3298	AGAAGAGGCAAGTGCACCCACCTCACACAAAGCATTGATTTGTCCAGAGAAATACCGATGATTGATTAATACATAGTTTTTAAACCTTGGGCAT	3391
3392	TTTATTTATATTTGTCTGAATGCATGTTTTAAGACCTTTAAAAATAAAGTCAGACTGATAAGGTAATGCTAAATAACCAAGTTTTACCTTAG	3485
3486	TAATTTTGTTTTTTAGTAAGAATTATGGGTTTTTCCTTAATGTCTTTGGAATGATGGAGTTTTGCAAATCTCAGCACTGGTGGTAATCTGCC	3579
3580	TTTCTGACCCAGTCTCCTCCATGGTTTAGCTGAGTGTGCTGCTGTGATTAAACATGAACCATGTTGCACCAGCAGTTCTACCCACCTGCTGA	3673
3674	TCACCTCTTTCTGTGTAAACACAAATTAAGTCTTAGACTCTAAGTCCCAGCATTAGTAACTTTTGGTACATGTTACCTGCCTGGCACAGTTG	3767
3768	ATTTGGTTCTTGAAAGCATCTGGCAATCGAGTAGTCTGCTGGTTTCAAATTTTCTCCTGCTTCTACAACCTCTGAAGACCCCTGCTGGACTAC	3861
3862	TTAACATATCCTGACTTTATGGGAGGGTTTTTTGTTGTTTGTCTTTTGTGTTGTTTGGTCTAAATGTAAATGAATTATAAATATT	3955

**Fig. 7. Secuencia del gen *CCDC14* y producto proteico predicho.** Se muestra la secuencia obtenida a partir de los productos de amplificación. La letra negra corresponde al fragmento que fue secuenciado a partir de los productos amplificados con los 4 juegos de iniciadores usados; debajo de la secuencia nucleotídica correspondiente a la región codificante, se detalla la secuencia de aminoácidos. La letra azul corresponde al fragmento 3' UTR que no pudo ser secuenciado (obtenido de la secuencia teórica), en tanto la letra roja corresponde al fragmento 3' UTR obtenido previamente a partir del rastreo de la genoteca de vectores  $\lambda$ /ZAP. Los codones de iniciación (ATG) y finalización (TGA) de la traducción se encuentran remarcados con negro y en cursiva; resaltado en amarillo se muestran las bases diferentes con respecto a la secuencia del genoma de rata presente en el GenBank. La secuencia subrayada corresponde al fragmento seleccionado para clonar y expresar como proteína recombinante, y resaltados en gris se muestran los extremos de dicho fragmento que fueron incluidos en el diseño de los iniciadores para la amplificación del mismo.

## **II - Clonado de la secuencia codificante para un fragmento de la proteína CCDC14 en el vector de expresión pGEX-5x-3**

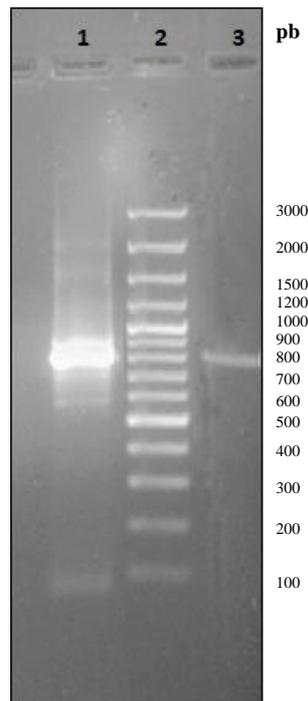
Previo a este trabajo, mediante el análisis *in silico* de la secuencia correspondiente al gen *CCDC14*, fue seleccionado un fragmento dentro de la misma para su posterior uso en la producción de anticuerpos “Anti-CCDC14”. La selección de la secuencia constó básicamente en abarcar un tamaño considerable del gen y excluir la región *coiled coil*, ya que esta podría presentar secuencias evolutivamente conservadas y en consecuencia sería de baja inmunogenicidad en el sistema inmunológico del conejo. En el marco de este trabajo, dicho fragmento, que consta de 831 pb y se encuentra cercano al extremo 5' del gen (ver fig. 7), se amplificó a partir de una reacción de RT-PCR. Posteriormente, como estrategia para la producción del fragmento como proteína recombinante, se escogió el clonado y expresión del mismo en el vector pGEX-5x-3.

### **II.A- Obtención de la secuencia codificante para su uso en una posterior ligación**

#### **II.A.1- RT-PCR y purificación del fragmento *CCDC14***

La secuencia codificante para el fragmento elegido fue amplificada mediante RT-PCR como se detalla en Materiales y Métodos, y el producto correspondiente fue visualizado en gel de agarosa (Figura 8). A partir de dicha amplificación se observaron dos bandas correspondientes a tamaños cercanos a los 800 pb y 900 pb, donde la banda cercana a 800 pb era muy mayoritaria. Se supuso que dicha banda podría ser la correspondiente al fragmento seleccionado (854 pb), mientras que la banda estimada en los 900 pb podría ser debida a una amplificación inespecífica.

El aislamiento y purificación de la banda de interés, de 800 pb, a partir de la discriminación con respecto a la banda de 900 pb, fue posible mediante la realización de un gel preparativo. Luego de la elución del producto se obtuvo una única banda, correspondiente al fragmento cercano a 800 pb (Figura 8).



**Fig. 8. Selección y amplificación del fragmento de *CCDC14* y purificación del producto obtenido.** Gel de agarosa al 1%. Se indican con números los carriles utilizados: 1- Producto de amplificación del fragmento *CCDC14*; 2- Marcador de peso molecular *100 pb ladder* (Gene Ruler 100 pb DNA ladder plus, Fermentas); 3- Producto de amplificación del fragmento *CCDC14*, aislado y purificado mediante gel preparativo y elución de banda. Los tamaños (pb) de las bandas del marcador de peso molecular se indican a la derecha de la figura.

### **II.A.2- Ligación del producto de PCR en vector pGEM-T Easy, selección de clones y secuenciación de los mismos**

Algunas veces la digestión en los extremos de un producto amplificado se puede tornar muy complicada debido a la insuficiente cantidad de nucleótidos extra, necesarios para que las enzimas de restricción puedan funcionar activamente. Una estrategia útil para evitar este problema es una ligación previa del producto amplificado a un vector auxiliar. Así, una vez dentro de éste, la digestión con las enzimas de restricción podría transcurrir normalmente. De esta manera, en nuestro caso se procedió a ligar el producto de PCR al vector pGEM-T Easy, el cual se presenta como un vector lineal con una timina (T) extra en sus extremos 3', complementaria a la base nitrogenada adenina (A) extra adicionada por la actividad desoxinucleotidil-transferasa de la ADN polimerasa Taq en los extremos 3' del fragmento. Se procedió a efectuar la ligación por apareamiento de sus extremos (apareamiento T-A), para luego digerir el fragmento con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* y posteriormente

eluirlo y clonarlo de modo sencillo en el vector de expresión por compatibilidad de extremos cohesivos.

Una vez realizada la ligación del fragmento purificado de 800 pb de *CCDC14* al vector pGEM-T Easy y la posterior transformación en células DH10B, se realizaron minipreparaciones correspondientes a dos colonias aisladas blancas, las que fueron sometidas a ensayos de digestión con ambas enzimas, con posterior corrida en gel de agarosa. Ambas presentaron una banda de 3000 pb correspondiente al vector, y una de 800 pb correspondiente al fragmento ligado. De esta manera, se pudo verificar que efectivamente dichas minipreparaciones contenían el inserto correspondiente, el cual era eficazmente liberado del vector luego de las digestiones y por lo tanto presentaría los correctos sitios de restricción en sus extremos (datos no mostrados).

La secuenciación de dichos insertos mostró dos secuencias exactamente idénticas entre sí, las cuales efectivamente contenían el fragmento *CCDC14* elegido previamente y flanqueado por los correctos sitios de restricción diseñados en los iniciadores (datos no presentados). Al analizar la secuencia del fragmento *CCDC14*, se observó que la misma había sido sintetizada correctamente al no encontrarse ningún cambio puntual de bases a lo largo de todo el fragmento.

### **II.A.3- Elución del fragmento *CCDC14* para su uso en ligaciones posteriores**

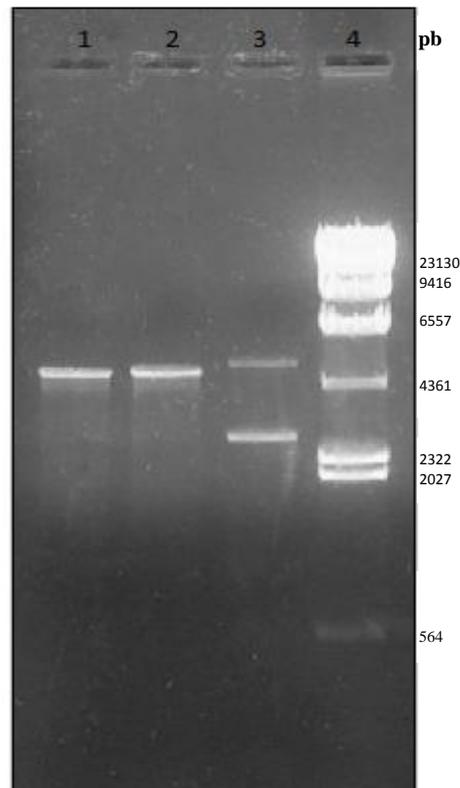
La evidencia anterior nos permitió continuar con una digestión a gran escala con ambas enzimas y una posterior purificación del inserto de la misma manera que se realizó la purificación del producto de PCR. Sin embargo, en este caso, al visualizar el fragmento liberado del vector pGEM-T Easy, se contó con la plena seguridad de que el mismo se encontraba con sus extremos cohesivos digeridos con las respectivas enzimas de restricción, y por lo tanto en las condiciones ideales para ser ligado en el vector de expresión (datos no presentados).

### **II.B- Obtención del vector pGEX-5x-3, en condiciones para ser ligado al fragmento *CCDC14***

A partir de una midipreparación de ADN plasmídico del vector pGEX-5x-3, una alícuota del ADN obtenido se digirió con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. Las digestiones fueron

visualizadas en gel de agarosa y comparadas con vector sin digerir, constatándose que el vector se encontraba en su forma lineal luego de ambas digestiones (Figura 9).

A continuación se obtuvo una gran cantidad de vector lineal, a partir de la purificación mediante gel preparativo y elución de la banda.



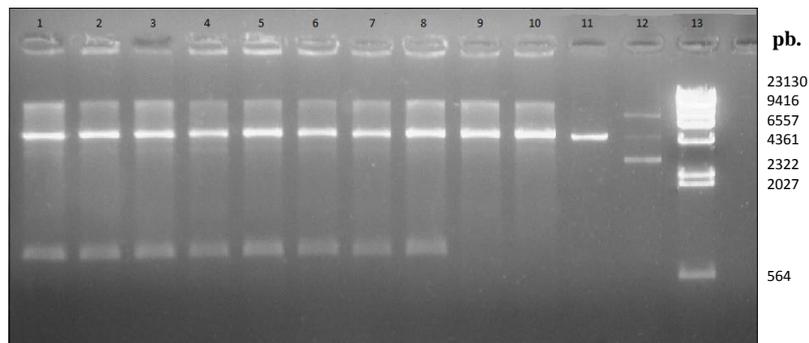
**Fig. 9. Digestiones del vector pGEX-5x-3.** Gel de agarosa al 0,8%. 1- pGEX-5x-3 digerido con *Bam*HI (se cargó una alícuota extraída luego de la digestión con la primera enzima, constatándose que una proporción de vector cercana al 100% aparece en forma lineal), 2- pGEX-5x-3 digerido con *Bam*HI y *Xho*I, 3- pGEX-5x-3 sin digerir, cargado como control; se observan las formas “nickeada” y superenrollada del vector, 4- Marcador de peso molecular (ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con *Hind*III). Los tamaños (pb) de las bandas del marcador de peso molecular se indican a la derecha de la figura. El pGEX-5X-3 posee aproximadamente 4900 pb (ver “Materiales y Métodos”, fig. 5, pág. 25).

### **II.C- Ligación del fragmento *CCDC14* al vector pGEX-5x-3 y clonación en células BL21 Star**

El hecho de haber digerido al vector y al inserto con dos enzimas de restricción que generan como resultado extremos cohesivos no compatibles, permitiría disminuir las religaciones del vector y principalmente beneficiaría las ligaciones entre inserto:vector en un

único sentido, donde los extremos cohesivos generados por *Bam*HI y *Xho*I en el inserto serían complementarios a los respectivos del vector.

El fragmento de *CCDC14* digerido y purificado se ligó al vector lineal, y el producto de ligación se utilizó para transformar células de la cepa BL21 Star. Dado que esta cepa presentó baja eficiencia de transformación, el producto de ligación se pasó en primer lugar por células de la cepa DH10B, de alta eficiencia de transformación. La transformación del producto de ligación en DH10B dio como resultado un buen número de colonias con respecto al control negativo. El análisis que implicó digestión y corrida en gel de agarosa de 10 minipreparaciones correspondientes a colonias aisladas, mostró que 8 presentaron el inserto de interés (Figura 10).

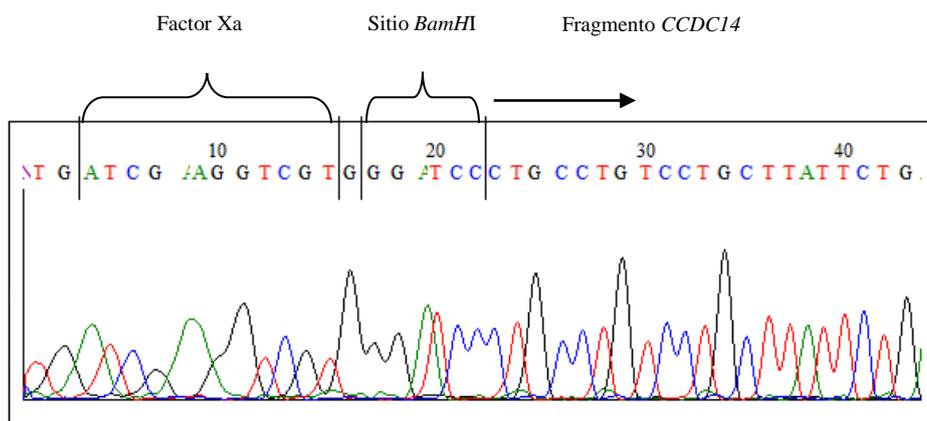


**Fig. 10. Identificación de vectores pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* ligado.** Gel de agarosa al 1%. Carriles 1 al 10- Productos de digestión *Bam*HI y *Xho*I a partir de minipreparaciones de las colonias aisladas 1-10 correspondientes a la transformación en células DH10B 11- pGEX-5x-3 digerido con *Pst*I, como control del tamaño del vector lineal; 12- pGEX-5x-3 sin digerir; 13- Marcador de peso molecular (ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con *Hind*III). Los tamaños (pb) de las bandas del marcador de peso molecular se indican a la derecha de la figura. La flecha de color negro señala el pGEX-5x-3 lineal, en tanto la flecha de color blanco señala el fragmento *CCDC14*.

La secuenciación de uno de los clones seleccionados puso en evidencia que contenía la secuencia esperada, y que la misma se encontraba en el marco de lectura correcto.

ADN purificado a partir del clon elegido se empleó para la transformación de células competentes BL21 Star que, como se señaló, presentan baja eficiencia de transformación.

La transformación en células BL21 Star dio como resultado el crecimiento de dos colonias, ambas conteniendo el vector pGEX-5x-3 con el fragmento *CCDC14* en su correcto marco de lectura (Figura 11).



**Fig. 11. Secuenciación de uno de los clones de pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14*.** Cromatograma que muestra secuencia parcial de la región codificante para la proteína de fusión GST-*CCDC14*. Se representan con colores las cuatro bases nitrogenadas: timina = rojo, adenina = verde, citosina = azul, guanina = negro. Se indican con llaves la secuencia donde cliva la proteasa “Factor Xa” y el sitio de restricción para la enzima *BamHI*; ambos sitios forman parte de la secuencia del pGEX-5x-3 y están ubicados entre la secuencia codificante para GST y *CCDC14*. Con una flecha se indica el comienzo del fragmento *CCDC14* (extremo 5’), el cual se encontró en su correcto marco de lectura.

### **III- Obtención de la proteína recombinante GST-*CCDC14***

#### **III.A- Optimización de la expresión proteica**

El protocolo de inmunización en conejos con la consecuente producción de anticuerpos contra la proteína en estudio demanda el empleo de entre 1 y 2 mg de proteína purificada (Capoano, 2008). Por lo tanto, para cumplir con el principal objetivo de este trabajo, era necesario encontrar las condiciones óptimas de expresión que brindaran las cantidades de proteína requerida. Con este objetivo se realizaron ensayos previos en el sistema de expresión usado, y se evaluaron las cantidades de proteína producida a partir de las condiciones establecidas (temperatura de inducción, tiempo de inducción,  $DO_{600nm}$  a la que se indujo y concentración de IPTG), los niveles de proteína obtenidos en las fracciones soluble e insoluble, y el nivel de proteólisis que existía durante la expresión y purificación.

#### **III.A.1- Ensayos de expresión de la proteína recombinante**

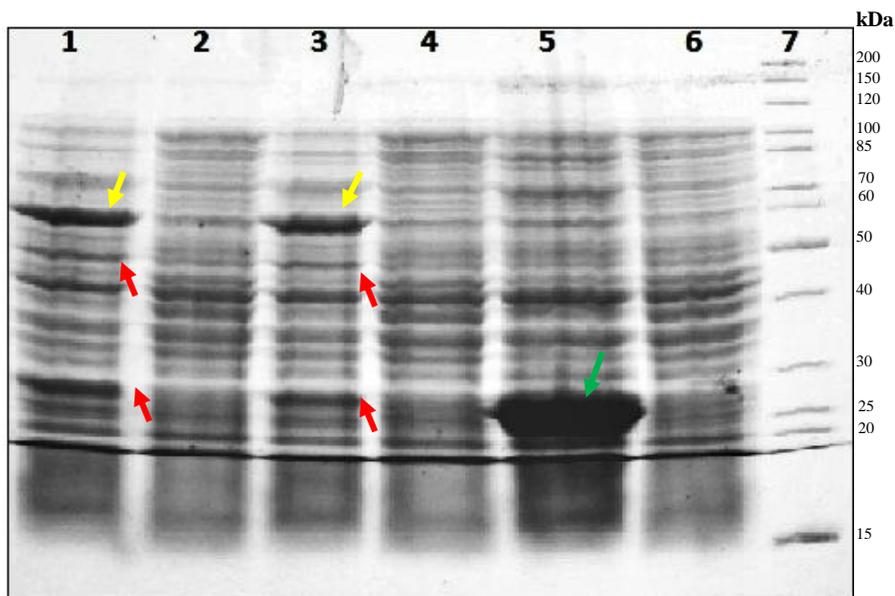
Los dos clones conteniendo el vector recombinante descritos anteriormente se utilizaron para la iniciación de cultivos líquidos, los que fueron inducidos mediante IPTG para la producción de la proteína de fusión. Se esperaba un buen nivel de expresión de la proteína

recombinante con un tamaño de aproximadamente 56,5 kDa (tamaños teóricos de 26 kDa correspondientes a GST y 30,5 kDa correspondientes al fragmento *CCDC14*). Los lisados proteicos de ambos clones inducidos se corrieron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, los que fueron teñidos con azul de Coomassie, y se compararon con controles correspondientes a los mismos clones sin inducir, y al lisado de una colonia inducida que contenía pGEX-5x-3 sin inserto clonado. Se pudo comprobar que las colonias inducidas presentaron una banda intensa a una altura cercana a 60 kDa, coincidente con el tamaño de la proteína de fusión. Sin embargo, también se distinguieron bandas a alturas cercanas a 50 y 30 kDa (esta última de tamaño levemente superior al de la proteína GST sin fragmento *CCDC14*) (Figura 12).

Al comparar estos carriles con los controles utilizados, se observó que estas bandas eran específicas de los dos clones inducidos, por lo cual se pudo deducir que la banda cercana a 60 kDa correspondía a la proteína GST fusionada al péptido, mientras que las de 50 y 30 kDa podrían deberse a eventuales proteólisis que hubiera sufrido la proteína de interés durante su exposición a proteasas en el medio citosólico.

Por su parte, el control de pGEX-5x-3 sin inserto mostró una única banda, muy intensa, a una altura levemente superior a los 25 kDa, coincidiendo con el tamaño esperado de la GST (Figura 12).

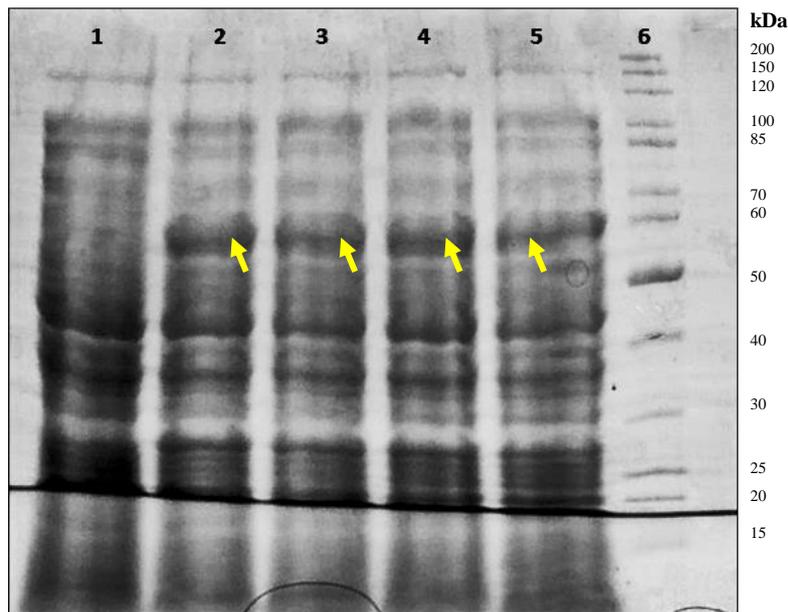
En consecuencia, pudimos concluir que hubo una expresión de la proteína GST-*CCDC14* bastante significativa en las colonias que contenían pGEX-5x-3 con el fragmento *CCDC14*.



**Fig. 12. Evaluación de la expresión proteica.** Gel de poliacrilamida SDS PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. 1- Clon I, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* inducido; 2- Clon I, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* sin inducir; 3- Clon II, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* inducido; 4- Clon II, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* sin inducir; 5- Clon pGEX-5x-3 sin inserto, inducido; 6- Clon pGEX-5x-3 sin inserto, sin inducir; 7- Marcador de peso molecular “PageRuler Unstained Protein Ladder” (Fermentas). Los tamaños (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular se indican a la derecha de la figura. En todos los casos en que se efectuó inducción, ésta se hizo con IPTG a concentración 0,3 mM. Las flechas amarillas señalan la ubicación de la proteína de fusión, en tanto las flechas rojas indican la ubicación de los presuntos productos de proteólisis de la proteína de fusión, y la flecha verde señala la ubicación de la GST.

### **III.A.2- Análisis de inducción con distintas concentraciones de IPTG**

Con el fin de optimizar el rendimiento en la producción de la proteína de fusión, se efectuaron ensayos de inducción con distintas concentraciones de IPTG. No obstante, dichos ensayos mostraron bandas de intensidad bastante similar en todas las variantes, demostrando que no había mayores diferencias en usar una concentración u otra, al menos dentro del rango de concentraciones estándar de IPTG ensayadas (Figura 13). Por lo tanto, y dado que la inducción con una concentración 0,3 mM de IPTG rendía una buena cantidad de producto de fusión, se continuó con el empleo de dicha concentración durante el resto de este trabajo.



**Fig. 13. Inducción con distintas concentraciones de IPTG.** Gel de poliacrilamida SDS PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. 1- Clon I, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* sin inducir; del 2 al 5- Clon I, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* inducido con 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM y 1 mM de IPTG, respectivamente; 6- Marcador de peso molecular “PageRuler Unstained Protein Ladder” (Fermentas). Los tamaños (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular se indican a la derecha de la figura. Las flechas amarillas señalan la ubicación de la proteína de fusión.

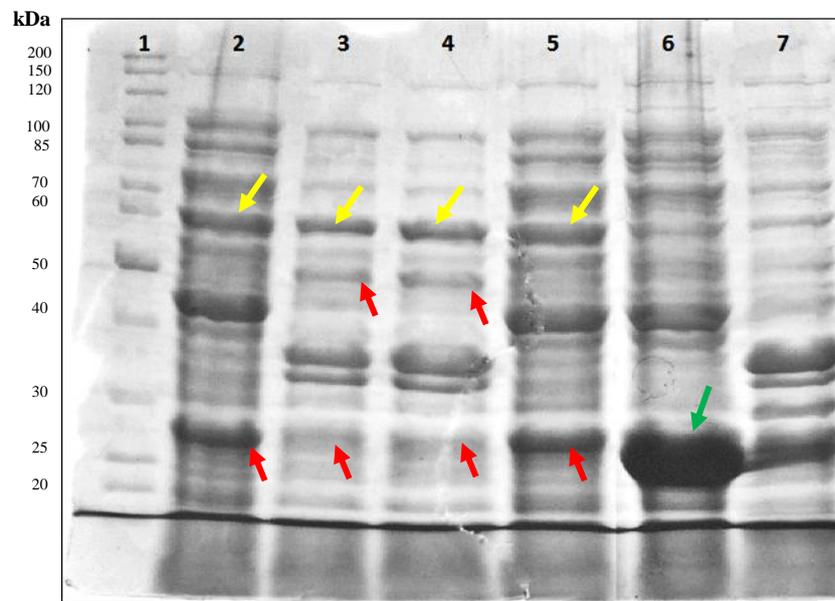
### **III.A.3- Análisis de localización de la proteína de fusión en las fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares**

La manera más práctica de obtener una proteína de interés es mediante la purificación de la misma a partir de la fracción soluble de los extractos celulares; en este caso, las proteínas se encuentran en su estado nativo generado en la síntesis proteica de la célula (Ho Yoon *et al.*, 2010). Por otra parte, para obtener una proteína que se encuentra en la fracción insoluble, se requieren pasos previos de desnaturalización para conseguir la completa solubilización de la misma. Consecuentemente, son necesarios pasos posteriores de renaturalización proteica, los cuales hacen al trabajo aún más complejo y no siempre provocan la estructura nativa deseada, siendo posible la pérdida de las propiedades de la proteína de interés (Tsumoto *et al.*, 2003).

Por esta razón, se procedió a separar las fracciones soluble e insoluble, y analizar si la proteína de fusión se encontraba en cantidad considerable en forma soluble en los extractos celulares al compararla con la proteína presente en los cuerpos de inclusión, y en consecuencia, evaluar la estrategia de purificación más conveniente para el caso.

El análisis de las dos fracciones en los dos clones seleccionados previamente, mostró que la banda cercana a 60 kDa se encontró en ambas fracciones y en cantidades muy similares. Con respecto a las bandas identificadas anteriormente como degradaciones proteolíticas de dicha proteína (50 y 30 kDa), se observó que la correspondiente a 30 kDa se presentó principalmente en la fracción soluble de los extractos celulares, mientras que la correspondiente a 50 kDa lo hizo en la fracción insoluble (Figura 14).

Al evaluar las cantidades de la proteína de fusión visualizada en el gel, se dedujo que valía la pena intentar producirla a una escala mayor trabajando únicamente con la fracción soluble de los extractos celulares.



**Fig. 14. Análisis de la proteína expresada en las fracciones celulares, soluble e insoluble.** Gel de poliacrilamida SDS PAGE al 12%, teñido con azul de Coomasie. 1- Marcador de peso molecular “PageRuler Unstained Protein Ladder” (Fermentas); 2- Fracción soluble del clon I; 3- Fracción insoluble del clon I; 4- Fracción insoluble del clon II; 5- Fracción soluble del clon II; 6- Fracción soluble del clon pGEX-5x-3 inserto; 7- Fracción insoluble del clon pGEX-5x-3 sin inserto. Tanto los clones I y II como el vector sin inserto fueron inducidos con 0,3 mM de IPTG. Los tamaños (kDa) de las bandas del marcador de peso molecular se indican a la izquierda de la figura. Las flechas amarillas señalan la ubicación de la proteína de fusión, en tanto las flechas rojas indican la ubicación de los presuntos productos de proteólisis de la misma, y la flecha verde señala la ubicación de la GST.

### **III.B- Purificación y análisis de la proteína recombinante**

#### **III.B.1-Medidas de concentración de las distintas fracciones obtenidas**

Para la obtención de la proteína de fusión en forma pura se recurrió a un *kit* basado en el uso de columnas de glutatión, según se detalla en “Materiales y Métodos” (III.B, pág. 29). Se llevaron a cabo 4 ensayos de purificación, partiendo de 500 ml de cultivo en cada uno. Se recogieron 4 fracciones de elución en cada uno de los ensayos. La purificación rindió un total de 2,16 mg de proteína, distribuida en las 16 fracciones obtenidas (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentraciones de las fracciones obtenidas en las purificaciones de la proteína recombinante

	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4	
	Conc. mg/ml	Cantidad total (µg)						
<b>Fracción 1</b>	0,675	317	0,550	258	0,360	169	1,475	693
<b>Fracción 2</b>	0,175	82	0,265	124	0,090	42	0,295	139
<b>Fracción 3</b>	0,370	174	0	0	0	0	0,100	47
<b>Fracción 4</b>	0,075	35	0	0	0	0	0,085	40

Se indica para cada fracción, los valores de la concentración proteica (Conc.) y la cantidad de proteína total.

De la tabla 6 se desprende que, más allá de las diferencias en rendimiento de los distintos ensayos de purificación, la mayor cantidad de proteína eluyó entre la primera y segunda fracción, excepto para el caso del primer ensayo en que, por alguna causa que se desconoce, se obtuvo una importante cantidad de proteína en la tercera fracción. Es posible que las diferencias en el modo de elución de la proteína en el primer experimento con respecto a los otros tres se deba a la existencia de una mayor cantidad de proteólisis durante el ensayo 1, razón por la cual se presentan patrones de bandas diferentes en las corridas SDS-PAGE (ver a continuación).

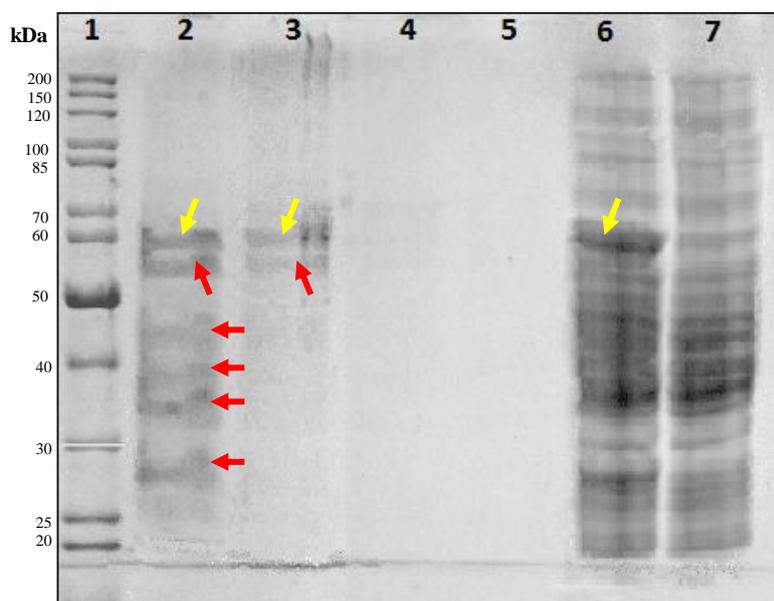
Como se ha mencionado, la cantidad de proteína necesaria para realizar una inmunización eficaz, y consecuentemente la producción de anticuerpos en conejo, sería de entre 1 y 2 mg. Una vez obtenida, la proteína se administraría en cuatro dosis, una de 500-800 µg para la primera inmunización y tres de 300-400 µg para realizar tres refuerzos (*booster*) a intervalos de 30 días (Capoano, 2008). Al parecer, si las cantidades obtenidas correspondieran únicamente a la proteína de fusión, y si los presuntos productos de proteólisis existentes también sirvieran para la inmunización, la proteína purificada a partir de 2 litros alcanzaría perfectamente para una posterior producción de anticuerpos.

Por otra parte, las cantidades de proteína obtenidas (1 mg/L de cultivo) caen dentro del rango esperado, ya que el sistema de expresión usado (pGEX-5x-3 GST) presenta rendimientos que varían entre 1 mg/L y 10 mg/L (Smith & Corcoran, 2001). Tal vez, si se hubieran explorado más condiciones como cambios en las temperaturas de inducción, tiempos de incubación o D.O. a la cual se agrega el IPTG, se podrían haber aumentado los rendimientos. Sin embargo, como ya se señaló anteriormente, esto no fue necesario debido a que las cantidades conseguidas parecían ser suficientes para cumplir con nuestros objetivos.

### **III.B.2-Visualización de los productos de purificación mediante SDS-PAGE**

Se realizó una corrida SDS-PAGE de alícuotas de las fracciones eluídas correspondientes a cada una de las purificaciones, y se compararon con carriles control sin inducir, e inducidos sin purificar.

Para los ensayos 2 a 4, se identificaron bandas bien definidas en las primeras dos fracciones de la purificación. Entre éstas, se observó que una presentaba el tamaño esperado para la proteína de fusión (aproximadamente 56 kDa), y que ésta aparecía a la misma altura que la observada en el carril control conteniendo el lisado del pGEX-5x-3 - *CCDC14* inducido sin purificar. Por otro lado, se observaron otras bandas de tamaño menor que el de la proteína fusión y que caían dentro de un rango que variaba desde un tamaño inferior a 35 kDa hasta unos 55 kDa. Dichas bandas, aparentemente, serían mayores que la proteína GST, la cual presenta un tamaño de 26 kDa (Figura 15).



**Fig. 15. Análisis del segundo ensayo de purificación proteica, a modo de ejemplo.** Gel de poliacrilamida SDS PAGE al 12%. 1- Marcador de peso molecular “PageRuler Unstained Protein Ladder” (Fermentas); del 2 al 5- Fracciones de elución 1 a 4 respectivamente; 5- Control: clon I, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* inducido con 0,3 mM de IPTG y sin purificar; 6- Control: clon I, pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14* sin inducir. Los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la figura. Las flechas amarillas señalan la banda de tamaño correspondiente al de la proteína de fusión, en tanto las flechas rojas indican la ubicación de los presuntos productos de proteólisis de la misma.

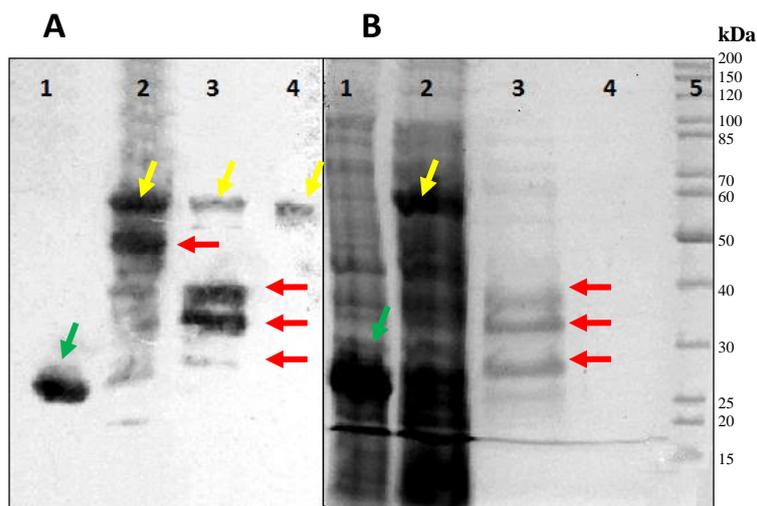
### **III.B.3- Confirmación mediante ensayos de *Western blot* con anticuerpo anti-GST**

Pese a que la proteína parecía haber sido purificada correctamente, la existencia de bandas no esperadas generaba cierta incógnita acerca del proceso de purificación. Para confirmar que las bandas de proteína observadas en las corridas electroforéticas de las distintas fracciones de purificación correspondían únicamente a la GST fusionada a fragmentos de *CCDC14* de distinto tamaño, se realizó un ensayo de *Western blot* con un suero policlonal anti-GST. En este ensayo fueron analizadas alícuotas de dos fracciones de la primera purificación y controles de inducción sin purificar. Como resultado de este experimento, se observó que todas las bandas observadas, incluyendo las resultantes de supuestas proteólisis y la banda cercana a 60 kDa, contenían efectivamente a la GST (Figura 16). Como puede observarse, si bien la banda correspondiente a la proteína de fusión intacta en la primera fracción se aprecia en los ensayos de *Western blot*, su presencia no resultó evidente en los geles teñidos con azul de Coomassie, en el cual son más evidentes los productos de proteólisis. Este patrón resultó ser

diferente al de los otros tres ensayos, permitiendo concluir que, por algún motivo desconocido, se presentó un mayor nivel de proteólisis durante el primer ensayo de purificación.

Comparando estos carriles con el lisado proteico de un clon inducido sin purificar, se pudo ver que las bandas cercanas a los 60 kDa fueron coincidentes, mientras que las bandas de menor tamaño surgieron específicamente luego del proceso de purificación, indicando que se trataba de productos de proteólisis (a pesar del uso de inhibidor de proteasas durante el mismo).

Por otra parte, comparando con el carril correspondiente al lisado de un clon sin inserto sin purificar, se pudo confirmar que efectivamente las bandas obtenidas en la primera fracción eran de mayor tamaño que la correspondiente a GST libre (ver figura 16 A). Por lo tanto, teniendo en cuenta esto y lo visto en la figura 15 se concluyó que, luego del proceso de purificación, dichos productos generados por proteólisis presentarían a la GST fusionada a fragmentos de la proteína CCDC14 de tamaños variables. Al menos los fragmentos mayoritarios poseerían más de 35 kDa, observándose incluso una cierta cantidad de la proteína intacta. Esto indica que una muy buena proporción del producto de purificación posee entre aproximadamente 80 (26 kDa de GST más al menos 9 kDa de CCDC14) y los 277 aminoácidos del fragmento CCDC14 completo. Dado que los tamaños de los péptidos correspondientes a CCDC14 eran en todos los casos apropiados como para ser empleados como antígeno, se decidió utilizar la totalidad del volumen eluído de las columnas, conteniendo tanto el péptido de 56 kDa entero, como los productos parciales, para la inmunización de conejos. Con ese objetivo, el remanente del producto de las 4 purificaciones se mezcló y congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para ser utilizado posteriormente en el protocolo de inmunización.



**Fig. 16. Experimento de *Western blot* de las fracciones de purificación de la proteína de fusión con anticuerpo anti-GST.** A: Placa de autorradiografía obtenida en el ensayo de *Western blot*. B: Gel de poliacrilamida corrido en paralelo y teñido con azul de Coomassie. En ambas imágenes los mismos números corresponden a las mismas muestras cargadas en ambos gels, con la salvedad de que en el gel que se corrió para transferir (fig. A) se cargó  $\frac{1}{4}$  del volumen de cada muestra cargada en el gel de la fig. B. 1- Lisado proteico de clon pGEX-5x-3 sin inserto, inducido con 0,3 mM de IPTG, y utilizado como control del tamaño relativo de la proteína GST; 2- Lisado proteico del clon I (pGEX-5x-3 con fragmento *CCDC14*) inducido con 0,3 mM de IPTG, como control del tamaño relativo de la proteína de fusión GST-*CCDC14*; 3- Fracción 1 de la primera purificación; 4- Fracción 4 de la primera purificación; 5- Marcador de peso molecular “PageRuler Unstained Protein Ladder” (Fermentas). Los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la derecha de la figura. Las flechas amarillas señalan la banda correspondiente al tamaño de la proteína de fusión, en tanto las flechas rojas señalan los productos de proteólisis de la misma, y las flechas verdes indican la ubicación de la GST.

## **5-CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Una vez finalizado este trabajo, se pudo concluir que los objetivos fueron cumplidos acorde a lo esperado:

- Se confirmó la secuencia codificante del gen *CCDC14*, que había sido seleccionado como un gen expresado diferencialmente en la profase meiótica de la rata. La secuencia obtenida resultó muy similar a la secuencia teórica previamente ensamblada *in silico* en nuestro laboratorio contrastando el gen de ratón con el genoma completo de rata. Sólo se observaron diferencias puntuales con la secuencia teórica, que incluyeron únicamente cambios de base.
- A partir de la secuencia obtenida se seleccionó un fragmento de *CCDC14*, el cual se clonó en el vector pGEX-5x-3 y se realizó la expresión de la proteína de fusión GST-CCDC14, obteniéndose resultados óptimos con las condiciones usadas.
- La purificación de la proteína expresada fue realizada eficazmente, y las cantidades obtenidas fueron suficientes para su posterior aplicación en la inmunización de un conejo y producción de anticuerpos “anti-CCDC14”.

Actuando como un nexo entre lo que refiere a estudios a nivel genético y a los estudios funcionales de las proteínas producto, en este trabajo se logró marcar el camino hacia la caracterización de la proteína CCDC14. Así, luego de la producción de los anticuerpos mencionados, sería posible *a posteriori* el empleo de técnicas como el inmunoblot e inmunohistoquímica, las cuales permitirían los análisis a nivel proteico y contribuirían en gran medida con los estudios de expresión diferencial en espacio y tiempo de dicha proteína.

La proteína de fusión purificada durante este trabajo ya ha sido empleada para la producción de un suero policlonal anti-CCDC14, el que está siendo utilizado en la caracterización de la proteína, como parte de una tesis de maestría del laboratorio.

## **6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Alzheimer, M.,** E. Fecher, R. Benavente. 1998. Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J. Cell. Sci.*, **111**: 2227-2234.

**Bachère, E.,** D. Chagot, H. Grizel. 1988. Cell separation by centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**: 549-559.

**Barrionuevo, F., G. Scherer.** 2010. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **42**: 433-436.

**Bellvé, A. R.,** J. C. Cavicchia, C. F. Millette, D. A. O'Brien, Y. M. Bhatnagar, M. Dym. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell. Biol.*, **74**: 68-85.

**Berne, R. M., N. L. Matthew.** 1998. Fisiología. Ediciones Harcourt: Madrid, 3ª Edición, pp. 680.

**Braun, R. E.,** R. R. Behringer, J. J. Peschon, R. L. Brinster, R. D. Palmiter. 1989. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*, **337**: 373-376.

**Burkhard P.,** Stetefeld J., Strelkov S.V. 2001. Coiled coils: A highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.*, **11**: 82-88.

**Capoano, C. A.** 2008. Caracterización de Srsp1, primera proteína con tramo de serinas específica de la rata. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, UdelaR, pp. 80

**Capoano, C. A.,** R. Wettstein, A. Kun, A. Geisinger. 2010. Spats 1 (Srsp1) is differentially expressed during testis development of the rat. *Gene Expr. Patterns*, **10**: 1-8.

**De Rooij, D. G.** 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, **121**: 347-354.

**Elliott, D.** 2003. Pathways of post-transcriptional gene regulation in mammalian germ cell development. *Cytogenet. Genome Res.*, **103**: 210-216.

- Fujii, T.,** K. Tamura, K. Masai, H. Tanaka, Y. Nishimune, H. Nojima. 2002. Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis. *EMBO Rep.*, **3**: 367-372.
- Geisinger, A.,** R. Wettstein, R. Benavente. 1996. Stage-specific gene expression during rat spermatogenesis: application of the mRNA differential display method. *Int. J. Dev. Biol.*, **40**: 385-388.
- Geisinger, A.,** A. Dos Santos, R. Benavente, R. Wettstein. 2002. Identification and characterization of SRSP1, a rat gene differentially expressed during spermatogenesis and coding for a serine stretch-containing protein. *Cytogenet. Genome Res.*, **98**: 249-254.
- Geisinger, A.** 2003. Expresión génica diferencial durante la espermatogénesis de la rata. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, UdelaR, **pp.** 148.
- Geisinger, A.,** M. Alsheimer, R. Wettstein, R. Benavente. 2005. The mammalian gene pecanex 1 is differentially expressed during spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1728**: 34-43.
- Geisinger, A.** 2008. Spermatogenesis in mammals: a very peculiar cell differentiation process. In Ivanova LB (ed): *Cell Differentiation Research Developments*. Nova Publishers, New York, **pp.** 97-123.
- Geisinger, A., R. Rodriguez-Casuriaga.** 2010. Flow cytometry for gene expression studies in Mammalian spermatogenesis. *Cytogenet. Genome. Res.*, **128**: 46-56.
- Gilbert, S., F.** 2006. *Developmental Biology*. Sinauer Associates: Sunderland (MA), 8<sup>th</sup> Edition, **pp.** 817.
- Goldberg, E.** 1996. Transcriptional regulatory strategies in male germ cells. *J. Androl.*, **17**: 628-632.
- Govin, J.,** C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux, S. Khochbin. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.*, **271**: 3459-3469.
- Harper S., D. W. Speicher.** 2008. Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **52**: 6.6.1-6.6.26.

- Hecht, N. B.** 1998. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, **20**: 555-561.
- Hess, R. A.** 1999. Spermatogenesis, overview. In E. Knobil and J. D. Neill (ed): *Encyclopedia of reproduction*. Academic press University of Illinois, Burlington (MA), Vol. 4, **pp.** 534-545.
- Ho Yoon, S., S. K. Kim, J. F. Kim.** 2010. Secretory Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Recent Pat. Biotechnol.*, **4**: 23-29.
- Iguchi, N., J. W. Tobias, N. B. Hecht.** 2006. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mRNAs that are translationally up- and down-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**: 7712-7717.
- Kierszenbaum, A. L., L. L. Tres.** 1975. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J. Cell. Biol.*, **65**: 258-270.
- Kleene, K. C.** 2001. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech. Dev.*, **106**: 3-23.
- Kleene, K. C.** 2003. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet. Genome Res.*, **103**: 217-224.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Leblond, C. P., Y. Clermont.** 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.*, **90**: 167-215.
- Lee, T. L., D. Alba, V. Baxendale, O. M. Rennert, W. Y. Chan.** 2006. Application of transcriptional and biological network analyses in mouse germ-cell transcriptomes. *Genomics*, **88**: 18-33.
- Liang, P., A. B. Pardee.** 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**: 967- 971.
- Malkov, M., Y. Fisher, J. Don.** 1998. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*, **59**: 84-92.

- Meng, X.,** M. Lindahl, M. E. Hyvönen, M. Parvinen, D. G. de Rooij, M. W. Hess, A. Raatikainen-Ahokas, K. Sainio, H. Rauvala, M. Lakso, J. G. Pichel, H. Westphal, M. Saarma, H. Sariola. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, **287**: 1489-1493.
- Meuwissen, R. L.,** H. H. Offenberg, A. J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, C. Heyting. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.*, **11**: 5091-5100.
- Oakberg, E. F.** 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.*, **99**: 391-413.
- Pelttari, J.,** M. R. Hoja, L. Yuan, J. G. Liu, E. Brundell, P. Moens, S. Santucci-Darmanin, R. Jessberger, J. L. Barbero, C. Heyting, C. Höög. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 5667-5677.
- Peschon, J. J.,** R. R. Behringer, R. L. Brinster, R. D. Palmiter. 1987. Sperm-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 5316-5319.
- Rodríguez-Casuriaga, R.,** A. Geisinger, B. Lopez-Carro, V. Porro, R. Wettstein, G. A. Folle. 2009. Ultra-fast and optimized method for the preparation of rodent testicular cells for flow cytometric analysis. *Biol. Proced. Online*, **11**: 184-195.
- Rodríguez-Casuriaga, R.,** A. Geisinger, F. F. Santiñaque, B. López-Carro, G. A. Folle. 2011. High-purity flow sorting of early meocytes based on DNA analysis of guinea pig spermatogenic cells. *Cytometry A*, **79**: 625-634.
- Romrell, L. J.,** R. A. Belvé, D. W. Fawcett. 1976. Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. *Dev. Biol.*, **49**: 119-131.
- Sekido, R.** 2010. SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **42**: 417-420.
- Shima, J. E.,** D. J. McLean, J. R. McCarrey, M. D. Griswold. 2004. The murine testicular transcriptome: Characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, **71**: 319-330.

- Smith, A., R. Benavente.** 1992. Meiosis-specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachytene spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 6938-6942.
- Smith, D. B.,** Corcoran, L. M. 2001. Expression and Purification of Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **28**: 16.7.1-16.7.7.
- Solomon, E. P.,** L. R. Berg, D. W. Martin, C. Vilee. 1996. *Biology*. Saunders College Publishing: Philadelphia, 4<sup>th</sup> Edition, **pp.** 1228.
- Sofikitis, N.,** E. Pappas, A. Kawatani, D. Baltogiannis, D. Loutradis, N. Kanakas, D. Giannakis, F. Dimitriadis, K. Tsoukanelis, I. Georgiou, G. Makrydimas, Y. Mio, V. Tarlatzis, M. Melekos, I. Miyagawa. 2005. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum. Reprod. Update*, **11**: 229-259.
- Strelkov, S. V.,** H. Herrmann. U. Aebi. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays*, **25**: 243-251.
- Tagu, D.,** C. Moussard. 2006. *Fundamentos de las técnicas de biología molecular*. Ed. Acribia, S.A.: Zaragoza, **pp.** 178.
- Tsumoto, K.,** D. Ejima, I. Kumagai, T. Arakawa. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, **28**: 1-8.
- Vester, B.,** A. Smith, G. Krohne, R. Benavente. 1993. Presence of a nuclear lamina in pachytene spermatocytes of the rat. *J. Cell. Sci.*, **104**: 557-563.
- Walker, H., J. Cheng.** 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, **130**: 15-28.
- Wrobel, G., M. Priming.** 2005. Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction. *Reproduction*, **129**: 1-17.
- Yu, Z.,** R. Guo, Y. Ge, J. Ma, J. Guan, S. Li, X. Sun, S. Xue, D. Han. 2003. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, **69**: 37-47.

