Tesina de Grado

Licenciatura en Bioquímica

“Expresión del polipéptido α de la Hormona Folículo Estimulante en *Escherichia coli*”

Gabriela Gulla

Tutor responsable: Mario Señorale

Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias

Marzo, 2012

INDICE

INDICE 0

1. RESUMEN 3

2. INTRODUCCIÓN 3

2.1 Estructura de la FSH 4

2.2 Función de la FSH 5

2.3 Producciones comerciales de FSH 6

2.3.1 Preparaciones de FSH derivada de la orina de mujeres post-menopáusicas: 6

2.3.2Preparaciones de FSH recombinante (rFSH) 8

2.3.3 Ventajas y desventajas de ambos métodos. 9

2.4 Vectores de Expresión 10

2.4.1 Características de los vectores de expresión: 11

2.4.2 Direccionamiento de la síntesis proteica (Protein Targeting) 13

2.4.3 Proteínas de Fusión 15

2.5 Vector pGEX-3X 16

3.Estrategia General 17

4.Materiales y Métodos 18

4.1 Oligodesoxinucléotidos 19

4.2 Medios de cultivo 19

4.3 Transformación de células competentes 19

4.4 Cultivos líquidos 20

4.5 Mini preparación de ADN plasmídico 20

4.6 Digestión con enzimas de restricción 20

4.7 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 21

4.8 Purificación de productos de PCR 22

4.9 Purificación de las digestiones 22

4.10 Electroforesis en gel de agarosa 23
4.11 Reacciones de ligación 23
4.12 Secuenciación 23
4.13 Ensayos de Expresión 24
4.14 Obtención de fracción soluble e insoluble 24
4.15 Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE) y Western Blot 24
4.16 Preparación de la muestra: 25
4.17 Corrida Electroforética 26
4.18 Western Blot: 26
5. Resultados 27
5.1 Amplificación de la secuencia codificante (CDS) de hFSH alfa 27
5.2 Digestión de la CDS de α-FSH y de pGEX con EcoRI y BamHI 28
5.3 Ligación y transformación 31
5.4 Análisis de colonias transformantes 31
5.5 Verificación por secuenciación del plásmido recombinante 33
5.6 Ensayos de Expresión 34
5.7 Western Blot 35
6. Conclusiones y perspectivas 37
7. Bibliografía 38
8. ANEXO I 41

1. RESUMEN

En el marco del proyecto actualmente en marcha en nuestro laboratorio para expresar hormona folículo estimulante humana (hFSH) recombinante en la planta *Physcomitrella patens*, es de interés disponer de las contrapartes no glicosiladas de esta proteína, así como también tener la posibilidad de desarrollar anticuerpos contra la fracción peptídica de la hormona. Para ello nos hemos propuesto expresar las subunidades alfa (α) y beta (β) en *Escherichia coli* como proteínas fusionadas al extremo C-terminal de la glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* utilizando el vector pGEX-3X. Las proteínas de fusión resultantes serán utilizadas para producir anticuerpos específicos contra cada una de las subunidades de hFSH y como controles para los experimentos de expresión en *Physcomitrella*.

En este contexto, el objetivo específico de este trabajo es la expresión de la subunidad alfa de hFSH. Los resultado obtenidos muestran que esta proteína es expresada eficientemente en E. c*oli* aunque la mayor parte del producto de expresión se encuentra en forma insoluble.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Estructura de la FSH

La hormona folículo estimulante humana (hFSH) es una hormona glicoproteica, secretada por la glándula pituitaria anterior, que juega un rol importante en la regulación de la reproducción tanto masculina como femenina (Lal, 1997).

Al igual que otras hormonas glicoproteicas (LH, TSH y CG), la hFSH está formada por dos subunidades, alfa y beta, codificadas por genes diferentes y asociadas de forma no covalente. Cada subunidad tiene un péptido señal, que para α es de 24 aminoácidos y para β es de 18 aminoácidos (Fox, 2009). La subunidad α madura, común al resto de las hormonas glicoproteicas, tiene 92 aminoácidos mientras que la subunidad β madura tiene 111 y es la que determina la especificidad de la hormona. A su vez, cada subunidad presenta una estructura característica formada por enlaces disulfuro llamada nudo de cistinas (ver figura 1).

Cada subunidad posee dos sitios de N-glicosilación, para la subunidad α estos sitios están en los residuos de Asn 52 y Asn 78, mientras que para la subunidad β están en Asn 7 y Asn 24, y son fundamentales para la bioactividad de la proteína (Rose, 2000). Debido a estas modificaciones postraduccionales, la masa molecular de α es de 14 kDa y la de β es de 17 kDa (Howles, 1996).

La molécula de FSH existe en muchas isoformas diferentes dependiendo de la composición de los carbohidratos que componen los N-glicanos. Éstos pueden existir en muchas ramificaciones diferentes las cuales pueden tener residuos de ácido siálico terminales (Vegetti, 2006).

Estas formas variadas de FSH difieren en su vida media plasmática y por lo tanto en su actividad biológica. La hormona es removida de la circulación cuando se une a su receptor en el hígado y en los riñones. Aquellas isoformas que tienen mayor contenido de ácido siálico escapan a la unión al receptor y por lo tanto permanecen por mayor tiempo en la circulación teniendo de esa forma una vida media mayor y una mayor

bioactividad. Lo opuesto ocurre en las isoformas con menos residuos de ácido siálico las cuales son rápidamente capturadas por el receptor (Howles, 1996).

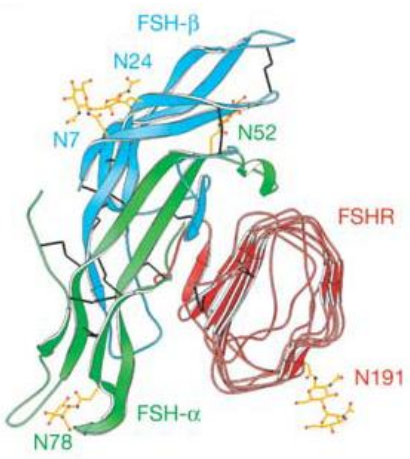


***Figura 1**: Estrucutra terciaria de la FSH, se observa en verde la cadena α y en azul la cadena β. Se marcan también en azul y verde los residuos que se encuentran glicosilados. La estructura en rojo es el receptor.*

2.2 Función de la FSH

La hormona FSH juega un rol clave en la fertilidad humana. En las mujeres está involucrada en el crecimiento y la maduración de los folículos mientras que en el hombre está implicada en la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis (Lal, 1997).

La hormona FSH producida por la glándula pituitaria anterior es producida por un tipo de células denominadas gonadotropas. Las células blanco de esta hormona se encuentran en las gónadas, específicamente en las células de la granulosa (en los ovarios) y en las células de Sértoli (en los testículos) las cuales son las únicas que expresan el receptor (Ulloa-Aguirre, 1998).

El receptor de la hormona es una glicoproteína que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. El mismo es un único polipétido que atraviesa la bicapa lipídica 7 veces formando estructura de α-hélices conectadas entre si por loops

orientados tanto intracelular como extracelularmente (Simoni, 1997). Este receptor está acoplado a una proteína G_s la cual, luego de que se produjo la unión del receptor a la FSH, activa el sistema adenilato ciclasa, el cual a su vez produce una serie de eventos en las células diana, entre los que se incluye la estimulación de la transcripción de la aromatasa, enzima clave en la síntesis de estrógenos (Fauser, 1996).

En el ovario, la hFSH regula la función de las células de la granulosa, incluyendo el desarrollo y la selección de los folículos, maduración de los oocitos y en conjunto con la hormona LH, el proceso ovulatorio (Ulloa-Aguirre, 1998). En los testículos, estimula la función de las células de Sértoli las cuales proveen soporte físico y bioquímico para el correcto desarrollo y maduración de las células germinales (Simoni, 1997).

2.3 Producciones comerciales de FSH

Dado su función es que esta hormona se utiliza como parte de los tratamientos de fertilización asistida y de algunos casos de infertilidad, tanto femenina como masculina. Las preparaciones de FSH han estado comercialmente disponibles desde 1960. El primer uso que se le dio fue en mujeres con desórdenes ovulatorios. Luego, en 1978 comenzó a ser usada en reproducción asistida (Zwart- van Rijkom, 2002).

Existen actualmente dos tipos de producciones comerciales de FSH, aquellas derivadas de la orina de mujeres post-menopáusicas y aquellas producidas a partir de células CHO (Chinese Hamster Ovary) genéticamente modificadas (Lispi, 2006).

2.3.1 Preparaciones de FSH derivada de la orina de mujeres post-menopáusicas:

Dentro de este tipo de preparaciones existen 3 subtipos: 1) Gonadotropinas derivadas de la orina que tienen FSH y LH, son llamadas hMG (human menopausal gonadotrophin), estas fueron las primeras en aparecer en el año 1960, 2) FSH urinaria

(uFSH) que sólo contiene FSH y 3) FSH urinaria altamente purificada (uFSH-HP) (Zwart-Van Rijkom, 2002).

- ***Producción de hMG:***

En los primeros procesos de purificación de hMG, el material de partida (orina de mujeres postmenopáusicas) se mezclaba con caolinita activada, sobre la cual se adsorbía la FSH (y otras moléculas). El material adsorbido se eluía con NH4OH 1M, y luego se precipitaba por acidificación del medio a pH 5,5 y adición de acetona. El precipitado, luego de lavado y solubilizado, era sometido a dos etapas de cromatografía, una con dietilaminoetil (DEAE) celulosa y otra con permutita (Katzman, 1943).

En 1950 fue registrada en Italia la primera preparación de hMG para uso clínico ("Pergonal 25 Serono").La pureza de esta preparación era solo del 5% y contenía tanto FSH como LH .

- ***Producción de uFSH***

A principios de 1970 la comunidad médica planteó la posibilidad de que diferentes grupos de pacientes e individuos necesitaban diferentes proporciones de FSH y LH. Por esta razón se buscaron métodos para separar la FSH de la LH. Para ello se utilizó una matriz de cromatografía que estaba recubierta con anticuerpos policlonales anti-LH. La preparación de hMG era filtrada através de dicha columna. La FSH que eluía era purificada y liofilizada. A pesar de esto la pureza de la FSH seguía siendo menor al 5% (Lunenfeld, 2004).

- ***Producción de uFSH-HP***

Este método es más directo que el anterior ya que la columna que se utiliza tiene anticuerpos monoclonales específicos de FSH, por lo que todas las proteínas urinarias así como la LH atraviesan la columna y son removidas. Como resultado de ello esta preparación tiene una pureza del 95% (Ravelli, 2006).

2.3.2Preparaciones de FSH recombinante (rFSH)

La producción de rFSH involucra dos etapas: 1) proceso de cultivo celular en donde se produce rFSH en crudo en un sobrenadante líquido. 2) Proceso de purificación del extracto crudo (Casper, 2005).

En la primera etapa, las células CHO transfectadas con los genes que codifican para las subunidades α y β son crecidas en un bioreactor equipado para controlar los parámetros del cultivo (temperatura, pH, oxígeno disuelto, etc.) y la composición del medio. Esta primera etapa es la de expansión del cultivo, luego se pasan las células a otro bioreactor para que crezcan y produzcan la rFSH. Finalmente se purifica en 6 etapas, una de ultrafiltración y 5 cromatografías de inmunoafinidad (similar a la que se realiza para la uFSH-HP). (figura 2 y 3) (Howles, 1996).

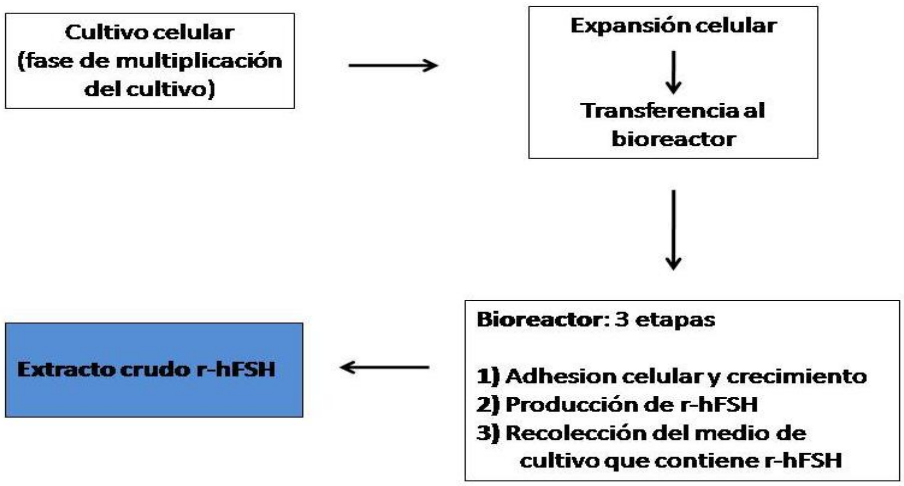


***Figura 2**: Etapa 1: producción del cultivo celular y producción de r-hFSH en crudo*

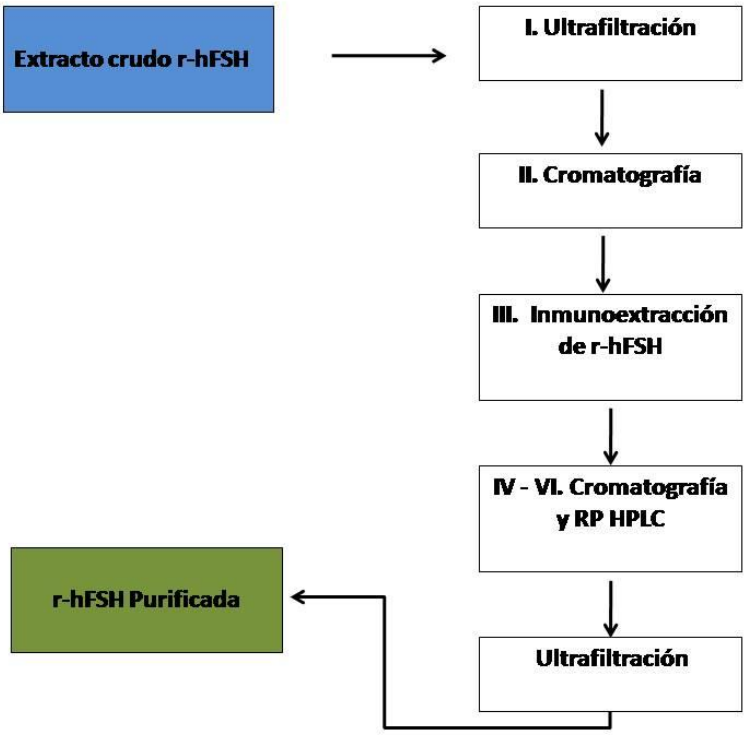


Figura 3: *Etapa 2: Purificación del extracto crudo*

2.3.3 Ventajas y desventajas de ambos métodos.

Las uFSH no son seguras porque son extraídas de orina que puede estar contaminada con virus, bacterias y priones. Sin embargo, no existen evidencias claras de que priones estén presentes en la orina humana (Lispi et al, 2006), y en lo que concierne a los virus, en el proceso de producción se realiza un paso de inactivación viral (Casper, 2005).

En el proceso de amplificación de rFSH en células CHO existe la posibilidad de mutagénesis y cambios en el producto final. Además en el proceso de producción a gran escala se utiliza un medio de cultivo que contiene proteínas de origen animal como el suero fetal bovino (la mayoría de la compañías tratan de obtenerlo de países que no tengan historia de encefalopatía espongiforme bovina) por lo que existe también riesgo de contaminación con priones, y otros virus animales. Es por esta razón que el producto recombinante final es purificado por un método cromatográfico

similar al usado en el proceso de producción de uFSH y analizado en búsqueda de proteínas contaminantes y virus (Balen, 2002).

Si bien las preparaciones de uFSH tienen un grado de pureza del 95% contienen LH así como también proteínas urinarias (Lispi, 2006). Por otro lado, las preparaciones recombinantes tienen una gran consistencia entre un batch y otro, están libres de proteínas urinarias contaminantes y tienen el potencial de ser producidas en cantidades ilimitadas (Zwart-van Rijkom, 2002).

La demanda de uFSH ha sufrido un aumento importante hacia el fin del siglo pasado, a tal punto que en muchos países desarrollados más del 1% de los nacimientos son atribuídos al tratamiento con uFSH. Esta gran demanda de un recurso limitado (orina de mujeres post-menopáusica) ha contribuído al desarrollo de la rFSH. Esta nueva preparación presenta la ventaja de poder ser producida en cantidades ilimitadas y además de tener una mayor pureza(> 99% con una actividad de más de 10000 UI FSH/mg) (Dyer, 2002).

Debido a todos los pasos y controles que son necesarios en la elaboración tanto de uFSH como rFSH estos métodos son muy costosos.

Finalmente, se ha visto que ambos productos son equivalentes tanto en su eficacia clínica como en su seguridad (Revelli, 2006).

2.4 Vectores de Expresión

Un vector de expresión es generalmente un plásmido al cual se le introduce un gen específico para ser expresado en una célula viva. Un vector de expresión típico contiene un promotor que dirige la síntesis de grandes cantidades de mARN correspondiente al gen. También pueden incluir secuencias que permitan una replicación autónoma y secuencias que codifiquen determinadas características que luego permitan seleccionar las células que contengan el vector. (Ausubel, 2003).

La elección de un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes depende de muchos factores. Algunos de ellos son: características del crecimiento celular, niveles de expresión, expresión intra o extracelular, modificaciones postraduccionales, actividad de la proteína de interés, etc (Cabrita, 2006).

Los sistemas bacterianos son los más utilizados debido a su bajo costo, alta productividad y fácil uso. Dentro de estos sistemas, *Escherichia coli* es uno de los más utilizados para la expresión de proteínas recombinantes (Terpe, 2006). Sin embargo, no todos los genes pueden ser expresados eficientemente por este organismo, esto es debido a la incapacidad de realizar las modificaciones postraduccionales que se encuentran en proteínas eucarióticas, la falta de un mecanismo de secreción para la liberación eficiente de la proteína al medio de cultivo y la capacidad limitada de formar enlaces disulfuro. Por otro lado muchas porteínas eucarióticas pueden retener su actividad biológica en su forma no glicosilada y por lo tanto ser producidas en *E. coli* (Fuh, 1990).

2.4.1 Características de los vectores de expresión:

Un vector de expresión requiere de varios elementos para asegurar los mayores niveles de expresión de proteínas. En primer lugar debe tener un promotor. A grandes rasgos, en *E. coli* los promotores contienen un hexanucleótido localizado a -35pb upstream del inicio de la transcripción y otro hexanucléotido a -10pb. Un promotor eficiente es aquel que es fuerte, tiene un bajo nivel de expresión basal y su inducción es simple y económica. Existen numerosos promotores con tales características, como por ejemplo el de operón lactosa (*lac*) o del operón triptófano, (*trp*), o un híbrido artificial de ambos (*tac*) entre otros (Makrides, 1996).

También debe tener un terminador de la transcripción, en bacterias existen dos tipos de mecanismos: los dependientes del factor Rho (que es una proteína hexamérica la cual libera el transcripto de ARN del molde) y las independientes de Rho, en las cuales se forma una estructura de horquilla en el ARN naciente que hace que se produzca la terminación de la transcripción.

El transcripto que se produzca debe contar con un sitio de unión al ribosoma (RBS), el cual se encuentra downstream del promotor. El sitio RBS consiste de la secuencia Shine Dalgarno (SD) seguida de un espaciador rico en A+T. La secuencia SD interacciona con el extremo 3´del ARN ribosomal 16S de la subunidad menor 30S, en la iniciación de la traducción (Sambrook, 1989).

Seguido al RBS se encuentra el codón de inicio . El que tiene mayor frecuencia de uso en *E. coli* es el AUG (91%), la región situada entre el codón de inicio y el RBS (que tiene entre 5 a 13pb) no debe formar ningún tipo de estructura secundaria ya que esto puede reducir la eficiencia en el inico de la traducción (Gold, 1990).

En tercer lugar, debe tener un terminador de la traducción el cual está localizado a continuación del sitio donde se insertará la secuencia codificante que se desea expresar. Existen 3 codones de terminación UAA, UGA y UAG. En *E.coli* existe una preferencia por el codón UAA y además la eficiencia de la terminación de la traducción está determinada por el nucléotido que se encuentra inmediatamente después. Se ha observado que la secuencia UAAU es la más eficiente para la terminación en esta bacteria (Makrides, 1996).

Además de estos elementos, es necesario que el vector contenga una secuencia que codifique un marcador seleccionable (por ejemplo resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o teraciclina) que ayude en la selección y propagación del plásmido. También tiene que contener un origen de replicación que es el que determinará el número de copias del plásmido y un sitio de clonado múltiple o polylinker para simplificar la inserción del gen en la orientación correcta dentro del vector (Sorensen,2005) .(Figura 4)

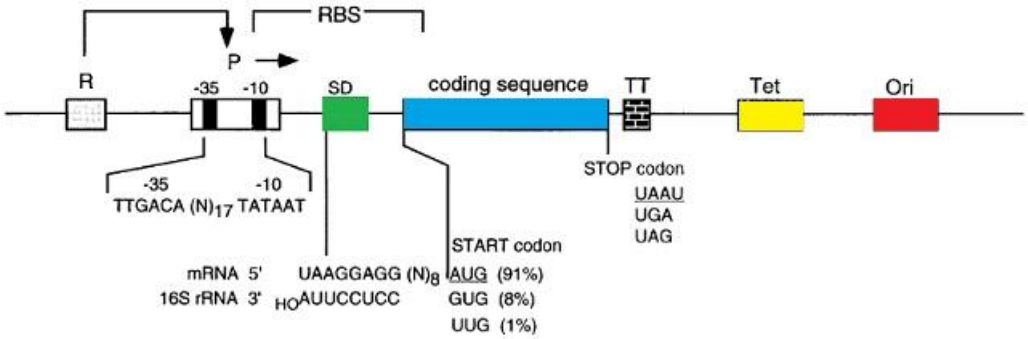


Figura 4: *Representación esquemática de las características principales de un vector de expresión. Se muestra como ejemplo el promotor tac (P) que tiene las regiones -35 y -10 separadas por un espaciador de 17pb. La flecha indica el sentido de la transcripción. El RBS compuesto por la región Shine Dalgarno (SD) y el espaciador rico en A+T. La secuencia de 8pb del SD interactúa con la región 3 ´ del ARN 16S de la subunidad menor del ribosoma . Se muestran los 3 codones de inicio de la traducción. Con STOP se representa el sitio de finalización de traducción. Se observa el terminador de la transcripción (TT), el origen de replicación del plásmido (Ori), el gen de resistencia a antibiótico, en este caso tetracicilina (Tet) y la secuencia represora (R).*

2.4.2 Direccionamiento de la síntesis proteica (Protein Targeting)

Dependiendo del vector de expresión es posible lograr que la síntesis de la proteína sea dirigida al espacio citoplasmático, periplásmico o extracelular.

- ***Expresión citoplasmática***

Este es el lugar de expresión preferido ya que da un mayor rendimiento en la expresión de proteínas heterólogas. Sin embargo, la sobreexpresión de proteínas foráneas usualmente produce la formación de cuerpos de inclusión, que son agregados proteicos insolubles intracelulares. Estos agregados están compuestos en su mayoría por la proteína foránea en forma desnaturalizada y su solubilización puede ser difícil. (Sambrook, 1989).

Para minimizar la formación de cuerpos de inclusión y mejorar el plegamiento de la proteínas se pueden utilizar numerosas aproximaciones algunas de ellas son: 1) crecer los cultivos bacterianos a menor temperatura para así mejorar la cantidad de proteína soluble. Los aminoácidos son codificados por mas de un codón y cada

organismo tiene un uso de codones diferente, esto se ve reflejado también en la población de tRNA. Si el ARNm heterólogo a ser expresado en *E. coli* tiene diferencias en el uso de codones se puede ver impedida la traducción debido a la demanda de uno o más tRNA que puedan ser minoritarios en dicho organismo.Un número insuficiente de tRNA puede llevar a que se frene la traducción, se termine prematuramente, que se de un corrimiento del marco de lectura o que se incorpore un aminoácido incorrecto. Se ha observado que crecer los cultivos a baja temperatura puede cambiar el uso de codones y atenuar los problemas de expresión (Terpe,2006). 2) Co-expresar chaperonas para asegurar el correcto plegamiento de la proteína por ejemplo DnaK o GroEL. Estas chaperonas previenen la formación de cuerpos de inclusión reduciendo los agregados y promoviendo la proteólisis de los mismos (Sorensen, 2005) 3) El uso de tioredoxina (producto del gen *TrxA* de *E. coli*) como proteína de fusión. Se ha visto que las proteínas son correctamente plegadas y retienen su actividad biológica cuando son expresadas como proteínas de fusión junto con la tioredoxina (LaVallie, 1993). 4) Utilizar cepas de *E. coli* que tenga inactivado el gen *trxB*. Las proteínas que poseen una estructura terciaria compleja la cual depende de la formación de puentes disulfuro pueden no ser producidas correctamente en el citoplasma bacteriano, debido a que este es muy reductor. Además, no existe un sistema que catalice la formación de estos enlaces (a diferencia de lo que ocurre en el periplasma donde existe el sistema Dsb que cataliza este tipo de reacción). Se han encontrado mutantes que tienen inactivado el gen *trxB,* este gen codifica para la tioredoxina reductasa. Esta enzima cataliza la redución de la tioredoxina la cual a su vez reduce las cisteínas en el citoplasma, impidiendo así la formación de enlaces disulfuro.Por esta razón es que en estos mutantes se producen cantidades mayores de proteínas citoplasmáticas con enlaces disulfuro. (Stewart, 1998; Makrides, 1996).

- ***Expresión Periplásmica***

El periplasma ofrece muchas ventajas ya que contiene solo el 4% de las proteínas celulares totales producidas por E. *coli* . Por esta razón, la proteína es concentrada más eficientemente y su purificación es más sencilla. Además, el ambiente oxidante del periplasma facilita el correcto plegamiento de las proteínas y la formación de enlces disulfuro. El transporte de la proteína al periplasma requiere una secuencia señal, las más utilizadas son las de las proteínas bacterianas Lpp, OmpA, OmpC, etc (Joly, 1994) . Las proteínas en el periplasma pueden ser liberadas en el medio con un shock osmótico (Terpes, 2006).

- ***Secreción extracelular***

Muy pocas proteínas son secretadas al espacio extracelular en *E.coli* y la manipulación de las vías de transporte extracelular es una tarea muy compleja. Las metodologías empleadas se dividen en dos categorías: 1) utilizar las vías existentes para aquellas proteínas que son secretadas o 2) utilizar secuencias señal, proteínas permeabilizantes u otros agentes que favorezcan la secreción de proteína como resultado de la permeabilización de la membrana externa. Ambas metodologías no dan resultados muy eficientes (Makrides, 1996).

2.4.3 Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión han sido desarrolladas para simplificar la purificación y expresión de las proteínas recombinantes. Estas están formadas por la proteína de interés ligada a una secuencia "*carrier"* la cual estabiliza la proteína de interés contra la degradación celular, aumenta la solubilidad (previniendo la formación de cuerpos de inclusión), y provee un sitio de unión a un ligando para facilitar la purificación por afinidad (Sorensen, 2005).

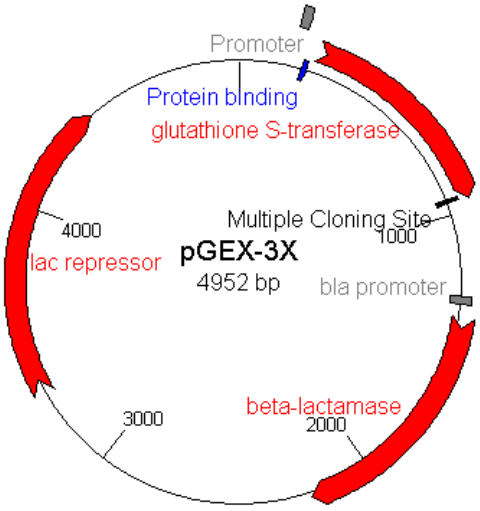
Para separar la proteína de interés de la proteína "*carrier*" se incluye un sitio de corte proteolítico, por ejemplo en el vector pGEX-3X utilizado en este trabajo se incluye una secuencia de cuatro aminoácidos (Ile-Asp/Glu-Gly-Arg) que son el sitio de reconocimiento para el factor de coagulación sanguínea Xa . El factor Xa corta el enlace

peptídico en el extremo carboxi-terminal del residuo de arginina en el sitio de reconocimiento separando de esa manera ambas proteínas(Ausubel, 2003; Cornelis, 2000).

2.5 Vector pGEX-3X

El vector de expresión pGEX-3X es comúnmente utilizado por sus altos niveles de expresión de proteínas recombinantes. Este permite la expresión de la proteína de interés fusionada a una proteína "*carrier*", en este caso la glutatión S-transferasa (GST) del parásito *Schistosoma japonicum*. Esta enzima de 26 kDa facilita el proceso de purificación ya que se une reversiblemente con alta afinidad al glutatión inmovilizado en una columna. Como se mencionó anteriormente, la proteína de fusión puede ser procesada proteolíticamente mediante el factor de coagulación Xa, y la GST puede así separarse de la proteína de interés (Pharmacia Biotechnology, Vol 19 N°3).

En la figura 4 se puede visualizar el plásmido pGEX el cual tiene un peso molecular de 4952 pb, posee además un gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del plásmido pBR322, el gen de la GST y el promotor *tac*. También posee un sitio de clonado múltiple donde se inserta el gen de interés (Frangoni, 1993).



- ***Figura 5:*** *Estructura del vector de expresión pGEX-3X. Tomado de Pharmacia LKB Biotechnology. GST gene fusion system chimeric proteins-vesatile tools im molecular biology research. Molecular and cell biology Research. Vol 19 N° 3.*

3.Estrategia General

En el laboratorio de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias se disponía de la secuencia codificante de la subunidad α clonada en el vector pGEM T-Easy (Ruétalo 2012). Ésta fue modificada para eliminar la región correspondiente al péptido señal. Además, para el clonado direccional y en fase con la GST en el vector de expresión, se agregaron adaptadores para sitios de restricción adecuados.

La deleción del péptido señal se hizo por amplificación de la secuencia codificante de hFSH α con el cebador "forward" hibridando a partir del inicio del péptido maduro. También se le agregó a los extremos de los cebadores sitios de corte para *Eco*RI y para *Bam*HI, respectivamente. Para mantener la fase de lectura de la GST fue necesario agregar 2 nucleótidos en el cebador "forward". El fragmento resultante se ligó en el vector pGEX-3X digerido con *Eco*RI y *Bam*HI, y se transformaron células competentes de *E. coli*. Se seleccionaron los transformantes correctos y se realizaron ensayos de expresión de la proteína de fusión resultante (Ver figura 6).

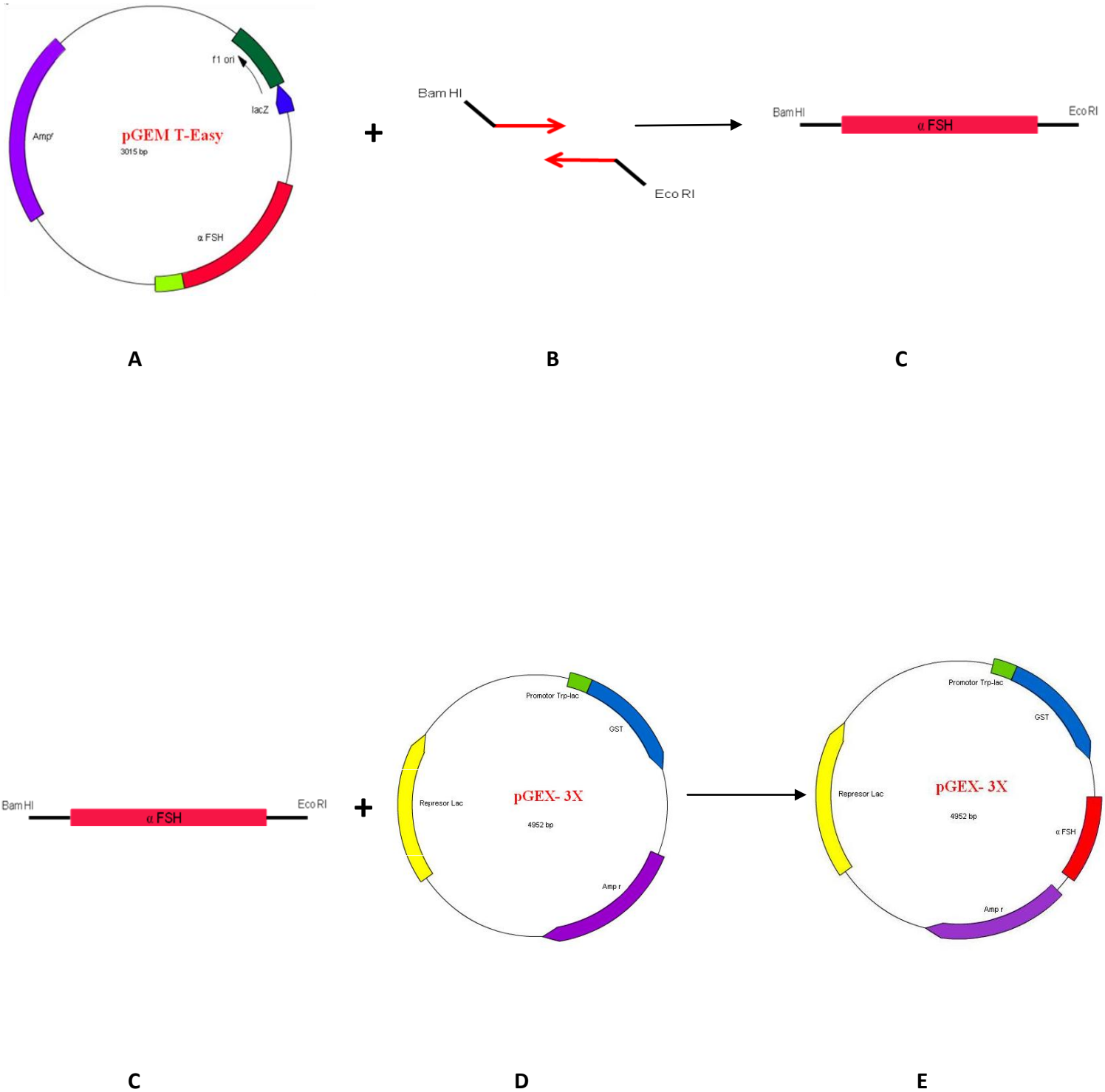


Figura 6: Esquema de la estrategia general. La secuencia codificante de α que se encontraba en el vcector pGEM (A) fue amplificada utilizando los cebadores que tenían los adaptadores para Eco y Bam (B) dando como producto final el fragmento de α sin el péptido señal (C). Luego este fragmento fue ligado al vector pGEX-3X (D) dando como resultado el producto de ligación E.

4.Materiales y Métodos

4.1 Oligodesoxinucléotidos

Los oligodesoxinucléotidos utilizados fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies Inc (IDT). Los mismos se encontraban liofilizados por lo que fue necesario resuspenderlos en agua milliQ para obtener una solución stock de 100 µM. Luego a partir de la solución stock se preparó una solución de trabajo 10µM.

Las temperaturas de fusión (T_M) de los mismos fueron calculadas ultilizando el programa de diseño y análisis de cebadores OligoAnalyzer 3.1.

Nombre	Secuencia	T_M (°C)
390	5´ TGTTC**GGATCC**CCGCTCCTGATGTGCAGGATTGC 3´	69.4
391	5´ GAT**GAATTC**TTAAGATTTGTGATAATAACAAGTACTGCAGTGG 3´	60.0

Tabla 1: *Secuencia de los cebadores utilizados. Los cebadores 390 y 391 son los "forward" y "reverse" de α respectivamente. Se marca en negrita el sitio de corte para las enzimas de restricción.*

4.2 Medios de cultivo

Para los cultivos líquidos se utilizó el medio líquido LB (Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y cloruro de sodio 10 g/L). Para preparar el medio sólido LB-agar se agregaron 15g de agar por litro de LB (Sambrook et al., 1989).

4.3 Transformación de células competentes

Se usaron células competentes *E. coli* XL-1 Blue preparadas según el método de Inoue et al., 1990, que se mantenían congeladas a -70 °C. Se descongelaron en hielo 50 µl de bacterias competentes y se le agregaron 2 µl de ADN (plasmídico o de una reacción de ligación, según corresponda). Se incubó en hielo por 30 minutos, luego se colocó a 42 °C por 90 segundos y luego en hielo nuevamente durante 2 minutos. Se agregaron 500µl de medio líquido LB y se sembraron alícuotas de 100µl en medio sólido LB-agar con ampicilina (100µg/mL). Las placas se incubaron en estufa a 37°C toda la noche.

4.4 Cultivos líquidos

A partir de colonias bacterianas aisladas se inocularon 4 mL de LB líquido con ampicilina a una concentración final de 100 μg/mL. Se dejaron crecer los cultivos en una incubadora con agitación orbital a 200 rpm y a 37 °C toda la noche.

4.5 Mini preparación de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se hicieron mediante el método de lisis alcalina, con algunas modificaciones en la composición de las soluciones (Sambrook, 1989). A partir de un cultivo líquido, crecido a 37 °C durante toda la noche, se tomaron 1.5mL y se centrifugó durante 30 segundos a máxima velocidad en una minicentrífuga de mesa (aproximadamente 5000 x *g*). Se descartó el sobrenadante. Se agregaron otros 1.5 mL de cultivo y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad. El sedimento bacteriano se resuspendió con ayuda del vórtex en 150 µl de solución I (Tris.HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM). Luego se agregaron 150 µl de solución II (NaOH 0.2M, SDS 1%), se mezcló suavemente hasta lisar las bacterias (la solución se vuelve transparente) y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 150 µl de solución III (Acetato de potasio 3M pH 4.5), se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad. Se recogió el sobrenandante en un nuevo tubo eppendorf y se precipitó el plásmido con dos volúmenes de etanol 95% (aproximadamente 900 µl). Se centrifugó durante 20 minutos a máxima velocidad (12000 rpm, en Beckman Microfuge E) y se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 1ml de etanol 70 %, luego se descartó el etanol y se dejó secar el sedimento. El precipitado se resuspendió en 100 µl de agua milliQ a la cual se le agregó 1 µl de ARNasa A 10 mg/mL (concentración final 100 μg/mL) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos.

4.6 Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión del ADN plasmídico se realizaron en un volumen final de 20 µl y se prepararon de la siguiente forma:

- 0.5 µl de enzima
- 2 µl de buffer de reacción 10X
- 0.5 µL de BSA 10 mg/mL
- 10 µl de plásmido
- Agua milliQ c.s.p 20 µl

Las digestiones de los plásmidos se realizaron en estufa durante toda la noche o baño de agua a 37°C una hora.

Para la digestión del plásmido pGEX-3X con *Eco*RI y *Bam*HI se variaron estas proporciones, las mismas se detallarán en el capítulo de resultados.

4.7 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN del plásmido pGEM T-Easy se amplificó las secuencia codificante de α-FSH sin el péptido señal. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl de la siguiente forma:

- 0.2 µl de ADN molde
- 1 µl de oligo forward (a una concentración de 10 µM)
- 1 µl de oligo reverse (a una concentración de 10 µM)
- 0.5 µl del mix de dNTPs (conteniendo 10 µM de cada dNTP)
- 2.5 µl de buffer de reacción (con $MgSO_4$ 20 mM)
- 0.2 µl de s-Pfu DNA polimerasa (SBS, China) 5 U/ µl
- Agua milliQ c.s.p 25 µl

Se realizó una mezcla que correspondía a 7 reacciones (175 µl) que luego se repartió en 7 tubos. La amplificación se realizó con el siguiente programa:

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1 (Desnaturalización inicial)	94	5 min
30	94	15s
	55	30s
	68	30s
1 (Extensión final)	68	5 min
	25	∞

4.8 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron usando el Ron´s Gel Extraction Kit Bioron (Alemania) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La elución se realizó en 2 veces, primero con 45 µl del buffer de elución y luego con 45 µl de agua milliQ. Este paso de purificación es necesario para así eliminar la enzima *Pfu* DNA polimerasa que se usó en la reacción de PCR. De lo contrario, la misma podía interferir en las digestiones que se realizarán posteriormente.

4.9 Purificación de las digestiones

Luego de las digestiones con *Eco*RI y *Bam*HI, ya sea de productos de PCR o de plásmidos, las mismas fueron purificadas usando el Ron´s Gel Extraction Kit (Bioron, Alemania). Las muestras de amplificación de la secuencia codificante de FSH α fueron eluídas de la columna del kit en 2 veces, primero con 40 µl de buffer de elución y luego con 40 µl de agua. Para el pGEX-3X se eluyó con 30 µl de agua milliQ.

4.10 Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar el resultado de la amplificación por PCR, la purificación y ligación de los fragmentos y las digestiones con enzimas de restricción se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en TAE 0.5 X (Tris-acetato 40Mm, EDTA 1mM, pH 8.3). Para visualizar el ADN se adicionó 1 µl de Goldview (SBS, China) por cada 50 ml de gel. A las muestras se les agregó buffer de carga 6X (glicerol 40 %, azul de bromofenol 0,01 %) para sembrarlas en el gel. Se usó marcador de peso molecular GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix (Fermentas) de 10Kb. Las corridas electroforéticas se realizaron a 100V. La detección se hizo con un transiluminador de luz ultravioleta y se registró fotográficamente el resultado.

4.11 Reacciones de ligación

La reacción de ligación se dejó transcurrir toda la noche a 4 °C y se preparó de la siguiente manera:

- 1 µl (5 U) de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas)
- 1 µl de buffer de ligación 10X (Fermentas)
- 3 µl de plásmido pGEX-3X purificado según descrito más arriba
- 5 µl de fragmento amplificado de FSH α purificado según descrito más arriba

Se dejó trasncurrir la reacción a 4 °C durante toda la noche.

4.12 Secuenciación

Para verificar la secuencia del plásmido recombinante, asegurar la ausencia de mutaciones y la integridad de la misma se lo envió al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. La reacción se llevó a cabo a partir del plásmido pGEX-3X recombinante y utilizando el cebador 391, en secuenciadores ABI3130. El

análisis de las secuencias obtenidas fue realizado utilizando el software BioEdit versión 7.0 (Hall, T.A. 1999).

4.13 Ensayos de Expresión

Para los ensayos de expresión se partió de un precultivo de 3 ml de una colonia recombinante, se tomó un inóculo de 30 µl y se lo colocó en un matraz con 30 mL de LB líquido con ampicilina. El cultivo se dejó crecer por varias horas hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 a longitud de onda de 600nm. Luego se realizó la inducción con 30 µl de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 1M (concentración final 1 mM) durante 2 horas. También se hizo un control en simultáneo con células que tenían solo el pGEX-3X.

4.14 Obtención de fracción soluble e insoluble

Pasadas las dos horas se centrifugó el cultivo a 2000 x *g* por 20 minutos para hacer sedimentar las células. Luego se sacó el sobrenadante y se congeló el pellet a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se dejó descongelar y se lo resuspendió en 1.5 ml de PBS + Tritón 100X 1%. Se disgregó el extracto con sonicador del Instituto Pasteur, sometiéndolo a 5 pulsos de 10 segundos a una amplitud del 30%. Se tomó como criterio de fin de sonicación la desaparición de la viscosidad del extracto, hasta que no se formara un hilo al tomar muestras con una pipeta.

El lisado de células se repartió en 2 tubos eppendorf con 750 µl cada uno, esto corresponde a la fracción total. Uno de estos tubos se lo centrifugó durante 15 minutos a máxima velocidad en minicentrífuga de mesa y se separó la fracción soluble de la insoluble. Con la fracción insoluble se hizo una suspensión en 200 µl de PBS, agitando con vortex.

4.15 Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE) y Western Blot

Para analizar el resultado de los ensayos de expresión se realizó una electroforesis de proteínas seguida de un western blot.

Para la electroforesis de proteínas se siguió el método de Laemli (Ausubel, 2003). Se prepararon 6 mL de gel separador 12% de acrilamida de la siguiente forma:

- 2.85 mL de agua milli Q
- 2.4 mL de 30% acrilamida/ 0.8% bis acrilamida
- 0.75 mL de Tris.HCl 1.5 M 4x pH 8.8
- 6 µl de TEMED (N,N,N´,N´- tetrametiletilendiamina)
- 60 µl de APS 10 % (Persulfato de amonio)

Gel concentrador o stacking:

- 1.52mL de agua milli Q
- 0.32mL acrilamida-bisacrilamida 30%
- 0.62mL 4X Tris.HCl pH 6.8
- 2.5 µl de TEMED
- 12.5 µl de APS 10 %

Se armó el gel colocando primero el gel separador y dejando unos dos centímetros del molde sin llenar, una vez que este polimerizó se le colocó por encima el stacking.

Luego se armó la cuba y se le colocó el buffer de corrida que se preparó de la siguiente forma:30,2 g Tris base, 144 g Glicina, 10 g SDS y c.s.p 1L de agua milli Q.

4.16 Preparación de la muestra:

Se tomaron 11.25 µl de muestra, se le agregaron 3.75 µl de buffer de corrida 4 X y 1.5 µl de TCEP (Tris-2-carboxietil fosfina) 0,5 M. Se calentaron a 100 °C en un baño de agua por 5 minutos. Todo el volumen de muestra fue cargado en el gel. Como control se utilizó Metropine (hormona FSH humana extraída de la orina de mujeres

postmenopáusicas) que se preparó: 1 µl de Metropine (1mg/ml), 9 µl de agua y 2 µl de buffer de corrida 4x. Como marcador de peso molecular se cargaron 4 µL de PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

4.17 Corrida Electroforética

Se corrieron las muestras en electroforesis SDS PAGE, con un gel 12% primero a 70V hasta que el frente de corrida pasó el stacking y luego a 120V hasta que el frente de corrida llegó la final del gel. Se utilizó como control 1 µl de Metropine (1mg/ml).

4.18 Western Blot:

Las proteínas del gel de electroforesis fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa Protean BA 83 (Sigma-Aldrich, Alemania). El buffer de transferencia utilizado fue: Tris 3 g/L, Glicina 14.4 g/L y Etanol 100 ml/L. Se realizó la transferencia primero a 100 mA por 15 minutos y luego 200 mA por 2 horas. Una vez finalizada la misma se sacó la membrana y se la dejó bloqueando toda la noche en TBST (NaCl 5 M, Tris.HCl pH 7.5 1 M, Tween 20 %) con 5 % de leche en polvo descremada a 4 °C.

Al día siguiente se realizó la incubación por una hora, con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal anti subunidad α de conejo, ABCam USA), en una dilución de 1/1000 en TBST + 5% de leche descremada. Luego se realizaron 3 lavados alternando TBST durante 10 minutos y agua milli Q por 10 segundos. Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo, DakoCytomation, Dinamarca) acoplado a peroxidasa en una dilución de 1/2000 y los lavados se realizaron de igual manera que para el anticuerpo primario.

Finalmente se colocó la membrana sobre un casette, se utilizó para el revelado el reactivo “Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3” (Sigma), y se le colocó por encima la película de revelado (Kodak). Se realizó la exposición durante 1 minuto y luego se procedió al revelado de la película.

5. Resultados

5.1 Amplificación de la secuencia codificante (CDS) de hFSH alfa

Los cebadores utilizados fueron diseñados de forma tal que amplifican la región de α sin el péptido señal. En el caso del cebador *forward*, este contiene una región que codifica el sitio de reconocimiento de la enzima *Bam*HI mientras que el *reverse* contiene un sitio para *Eco*RI.

Como primer paso se realizó una reacción de PCR para amplificar la CDS de hFSHα que había sido clonada en trabajos previos en el vector pGEM T-easy (Ruétalo, N., 2012). Los cebadores se diseñaron para amplificar la CDS de hFSHα sin los primeros 24 aminoácidos, ya que estos corresponden al péptido señal de secreción, y por lo tanto, no están presentes en la proteína madura secretada por la hipófisis.

La reacción se llevó en un volumen de 25 µl (se realizaron 6 reacciones simultáneas) y se usó la *Pfu* DNA polimerasa (SBS, China) la cual tiene una actividad exonuclesa 3´ a 5´ (*proofreading*) que, a diferencia de la *Taq* DNA polimerasa, da como resultado una mayor fidelidad en la amplificación. Esto es importante ya que muchos de los errores de incorporación de nucleótidos pueden afectar la correcta expresión de la proteína, principalmente en lo que tiene que ver con la identidad de la misma.

Luego de la reacción de amplificación se corrió una electroforesis en gel de agarosa de cada una de las reacciones, el resultado de la misma se muestra en la figura 8.

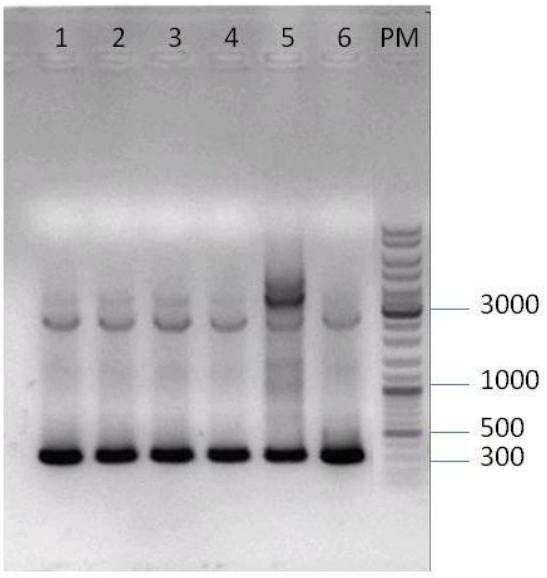


Figura 8: Productos de amplificación de la CDS de hFSH alfa. *Electroforesis en gel de agarosa 0.7% en buffer TAE 1X. En los carriles 1-6 se cargó 20 % del volumen total de la reacción de amplificación de la CDS de la cadena α. Carril PM) GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).*

Los resultados obtenidos en la electroforesis muestran que se logró la amplificación del fragmento correspondiente a la CDS de hFSHα sin la región del péptido señal. Se observa una banda intensa a la altura del marcador de 300 pb, la cual se corresponde con el tamaño esperado de 301 pb. También se observan bandas de menor intensidad con pesos moleculares más altos que se corresponderían con el ADN molde usado ya que éste era un plásmido circular, y es esperable encontrar, además de las formas normales del plásmido (circular cerrado, relajado, lineal) otras que se formaron al desnaturalizarse el plásmido durante los ciclos de amplificación. A los efectos de este trabajo, esas bandas no interferirían, pues el producto de interés tiene mucho mayor concentración que éstas, y además, en caso de necesidad, se podrían separar bien por electroforesis.

5.2 Digestión de la CDS de α-FSH y de pGEX con Eco*RI y* Bam*HI*

Previo a la digestión del fragmento α con las enzimas de restricción se juntaron todos los productos de reacción de PCR en un tubo y se realizó una purificación con el Ron´s DNA/RNA Extraction Kit de Bioron (Alemania) para remover la *Pfu* DNA polimerasa y evitar así que haya algún tipo de interferencia en las reacciones de digestión. Se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN se eluyó en 2 veces, primero con 45µl de buffer de elución provisto por el kit y luego con 45µl de agua. La digestión se realizó de la siguiente manera:

- 90µl de reacción de amplificación de CDS α
- 10µl de buffer NEB 2
- 2µl *EcoRI* (10 u/µl)
- 2µl *BamHI* (10 u/µl)

Paralelamente, para controlar la actividad de ambas enzimas en simultáneo, se hizo un control con ADN del fago lambda (48502 pb). Para ello se tomaron 4 µl de la mezcla anterior y se le adicionaron 5 µl de una mezcla preparada con ADN de fago lambda: 1 µl fago lambda (0,5 µg), 0.5 µl de buffer NEB2 y 3.5 µl de agua. Se incubaron las

digestiones a 37 °C durante toda la noche. Luego se analizaron por electroforesis (figura 9).

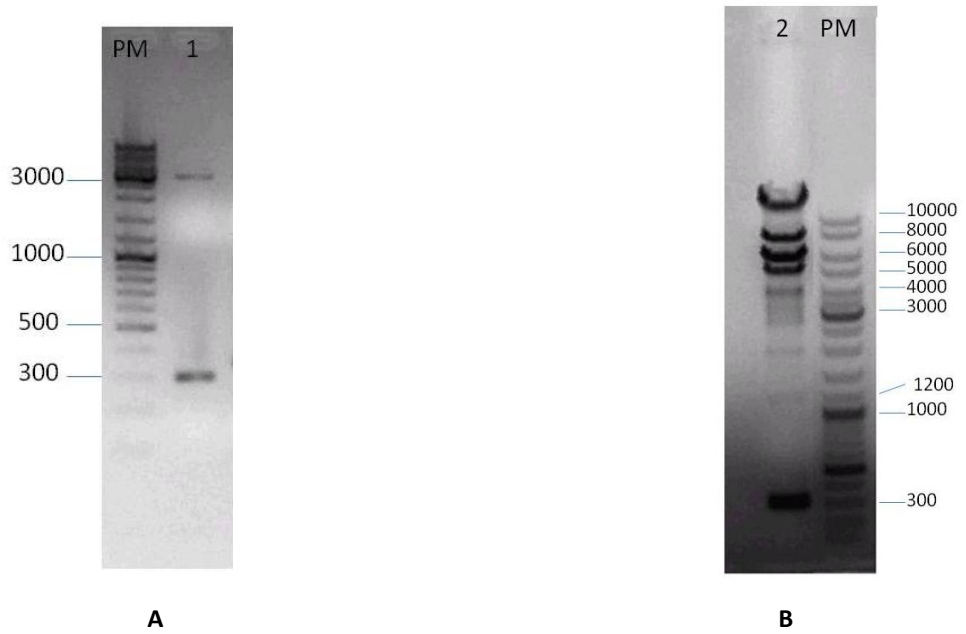


Figura 9*: A) Análisis de la digestión del producto de amplificación de la CDS de hFSH alfa.** *Electroforesis en gel agarosa 1% en buffer TAE 1x. La corrida se realizó a 100V. Carril PM) Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). 1) Alícuota (10 % del volumen) de la reacción de digestión del producto de amplificación de α-FSH con* Eco*RI y* Bam*HI.* ***B) Verificación de las condiciones de doble digestión con* Eco*RI y* Bam*HI. *Electroforesis en gel de agarosa 1.2% en buffer TAE 1X. La corrida se realizó a 100V.Carril 1) Reacción de digestión de una mezcla de ADN del fago lambda con producto de amplificación de hFSHα. PM) Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).*

Los fragmentos esperados de la digestión con *EcoRI/BamHI* del ADN del fago lambda de 15721, 9035, 4669, 3775, 3758, 3240, 2752, 2564, 1868 y 1120pb. Se observa que los tamaños de los fragmentos obtenidos están un poco por encima de los esperados. Esto quizás pueda deberse a la presencia de sales en la muestra correspondiente a la digestión con enzimas de restricción. De todas formas, el patrón de bandas está de acuerdo a lo que se espera para una doble digestión del ADN de lambda, lo cual indica que ambas enzimas cortaron. El fragmento que se observa a 300 pb corresponde con el de la CDS de α-FSH.

Luego de la digestión se purificó la CDS de α-FSH usando el Ron´s DNA/RNA gel extraction kit de Bioron para remover las enzimas de restricción y evitar así interferencias en la etapa de ligación. Se eluyó en un volumen final de 80 µl. Para la digestión de pGEX-3X se realizaron varias digestiones según el esquema que se presenta en la Figura 10:

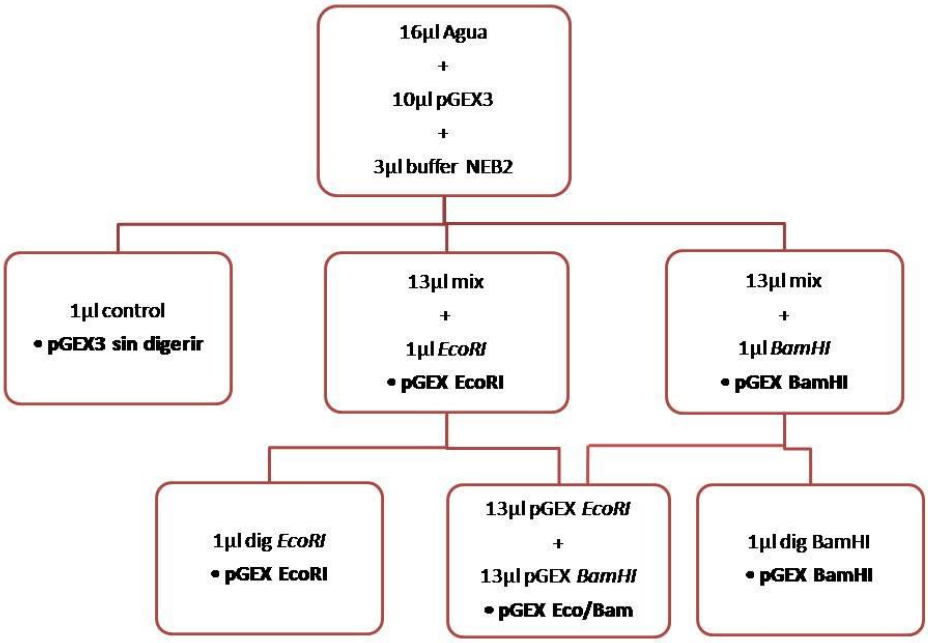


***Figura 10**: Cuadro para realizar la digestión del plásmido pGEX-3X con las enzimas EcoRI y BamHI.*

Las digestiones fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa (figura 11).

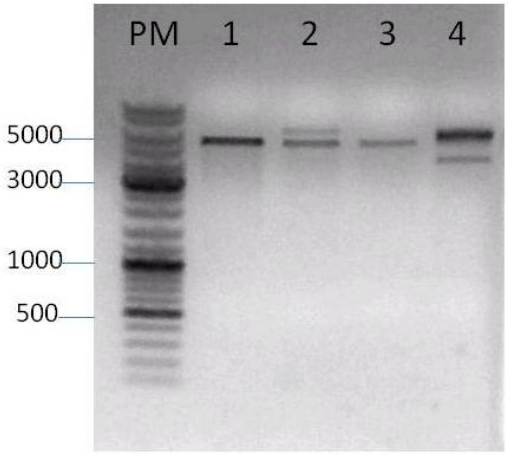


Figura 11: Digestión del vector pGEX-3X con* Eco*RI y* Bam*HI. Electroforesis en *gel de agarosa 0.7% en buffer TAE. La corrida se realizó a 100V. Carril PM) Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). Carril 1) pGEX-3X digerido con* Eco*RI. Carril 2) pGEX-3X digerido con* Bam*HI. Carril 3) pGEX-3X digerido con* Eco*RI/*Bam*HI. Carril 4) pGEX-3X sin digerir.*

En el carril 1 de la Figura 11 (digestión con *Eco*RI) y en el 3 (digestión con *Eco*RI + *Bam*HI) se puede ver una banda a la altura del marcador de 5000 pb que corresponde

al plásmido lineal (4952 pb). Para el caso de la digestión con *Bam*HI (carril 2) se observa que no fue completa ya que se ve una banda a 5000 pb y otra por encima que correspondería a la forma circular. En el último carril (pGEX-3X sin digerir) vemos la forma circular relajada y superenrollada del plásmido. Si bien estos resultados muestran que la digestión con BamHI no fue total, se estimó que la cantidad de ADN no digerido por esta enzima podría no interferir sensiblemente en el procedimiento posterior.

Se purificó el producto de digestión BamHI + EcoRI de pGEX-3X con el Ron´s DNA/RNA Purification Systems Plasmid miniprep Kit Bioron (Alemania). Se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y se eluyó en un volumen final de 30 µl.

5.3 Ligación y transformación

Como continuación del proceso de clonado, se procedió a ligar el fragmento de CDS de α FSH que se había preparado como se acaba de describir, con el vector pGEX-3X digerido con *Eco*RI y *Bam*HI. Las condiciones de la ligación fueron según el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos. Como cepa receptora, a priori este sistema no requiere características especiales más allá de las que tienen las cepas utilizadas corrientemente para propagar plásmidos recombinantes. Se optó por la cepa *E. coli* XL1 Blue que estaba disponible en el laboratorio. Se transformaron células competentes *E. coli* XL1 de acuerdo a lo que se detalla en materiales y métodos.

5.4 Análisis de colonias transformantes

Luego de la transformación se sembraron las células en un medio sólido LB-agar con el antibiótico de selección, que en este caso fue ampicilina. Se obtuvieron pocas colonias transformantes, se seleccionaron 4 y se realizó una minipreparación de ADN plásmídico de acuerdo al protocolo de la sección Materiales y Métodos. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el resultado de la minipreparación de ADN plasmídico, figura 12.

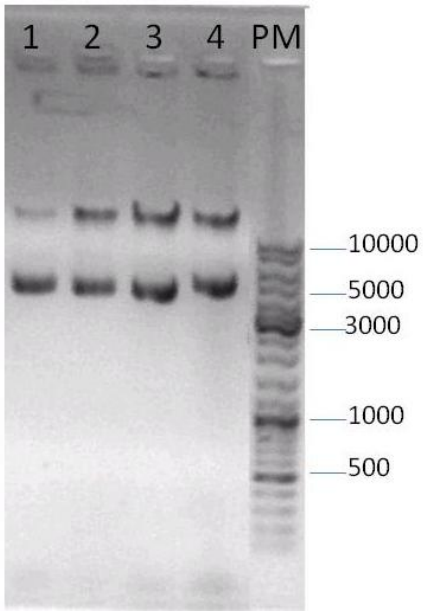


Figura 12: *Gel 0.7% agarosa en buffer TAE 1X. La corrida se realizó a 100V.Carril 1-4)10µl de minipreps. Carril PM) Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).*

Se observan dos bandas en todos los carriles, la banda de alto peso molecular correspondería a la forma circular relajada y la banda de menor peso molecular a la forma superenrollada.

Al intentar realizar las digestiones con *Eco*RI y *Bam*HI para determinar si alguno de los plásmidos incorporó el inserto se encontraron dificultades ya que la digestión con *Bam*HI no era total en muchos casos y en otros directamente no había digestión, esto probablemente se debía a impurezas que estaban presentes en la preparación de ADN plasmídico o a la calidad de la enzima. Por este motivo se eligió otra enzima de restricción, la enzima *PstI*, la cual corta el plásmido una sola vez si no tiene inserto, y si está el inserto da dos fragmentos, uno de 988 pb y otro de 4241 pb. Para ello se preparó el mix de digestión de la siguiente manera:

- 10.5 µl de agua milliQ
- 2 µl de buffer NEB 3
- 0.5 µl de *Pst*I (5 U)
- 7 µl de ADN

Se dejó en estufa a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el resultado de la digestión (figura 13):

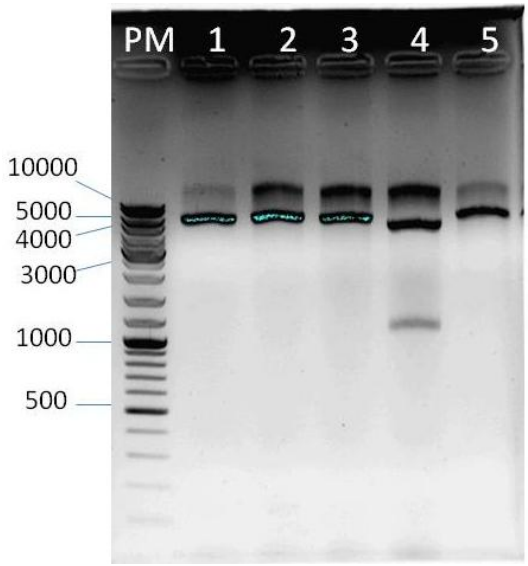


Figura 13: Análisis de transformantes con ligación pGEX-3X + CDS hFSHα. *Electroforesis en gel 0.7% de agarosa en buffer TAE 1x. La corrida se realizó a 100V. Carril PM) Gene Ruler DNA ladder mix (Fermentas). Carril 1-4) Digestiones de las preparaciones de ADN plasmídico de los transformantes 1, 2 ,3 y 4 con* PstI*. Carril 5) Control, plásmido pGEX-3X sin inserto.*

En todos los carriles se observa una banda que migra por encima del marcador de 10.000 pb que correspondería a la forma circular relajada (digestión parcial). Para el plásmido 4 se observa una banda que migró un poco por encima del marcador de 1000 pb y otra por encima de 4000 pb, pero por debajo del plásmido lineal sin inserto (carril 5). El resultado obtenido con el clon 4 correspondería al patrón de digestión esperado para un clon en el que se haya insertado la CDS de hFSHα.

5.5 Verificación por secuenciación del plásmido recombinante

Para verificar que el clon del carril 4 tenía la CDS de α FSH y que la secuencia no sufrió modificación alguna durante el proceso, se encargó la secuenciación al Instituto Pasteur de Montevideo. Se usó como cebador al oligo 391 que se encuentra en la región 3' (en sentido reverso) de la CDS de hFSHα. Se analizó el electroferograma y se comparó la secuencia para asegurarse que no hubiese habido mutaciones, también se verificó que la inserción del fragmento fué en el sitio esperado y que no hubo un

corrimiento en la fase de lectura. En adelante, este clon será referido como pGEX-FSHα4 (Ver Anexo I).

5.6 Ensayos de Expresión

Para los ensayos de expresión se sembró la noche anterior un precultivo de 3 ml de LB con ampicilina de células XL1 Blue portadoras del plásmido pGEX-3X (control negativo) y células que tenían el clon pGEX-FSHα4.

Se tomaron 300 µl de precultivo y se agregaron en un matraz que contenía 30 ml de LB con ampicilina. Se dejó crecer a 37 °C con agitación y se fue midiendo la DO a λ = 600 nm hasta que llegó a 0.6. Luego de ese punto se realizó la inducción con IPTG 1 mM durante dos horas y se midió la DO.

Abs 600nm pGEX-3X	**Abs 600nm pGEX α**	**Tiempo (Hs)**
0.578	0.599	0
0.943	1.087	1
1.085	1.385	2

Tabla 2: Absorbancia a 600nm de los cultivos inducidos con IPTG de clon pGEX-3X sin inserto y clon pGEX α.

Luego de 2 horas se retiraron los cultivos, se centrifugó a 2000g y se retiró el sobrenadante, el pellet se guardó a -20 °C hasta el día siguiente.

Posteriormente se descongeló y resuspendió en 1.5 ml de PBS con Tritón X100 al 1%. Luego se sonicó la muestra con 5 pulsos de 10 segundos a una amplitud de 30%. Las muestras de pGEX-FSHα4 se separaron en 2 tubos eppendorf con 750 µl cada uno. A uno de los tubos se lo centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos y se separó la fracción soluble de la insoluble. Al pellet insoluble se lo resuspendió en 200 µl de PBS. De esta forma se obtuvieron 4 muestras: proteínas totales de pGEX-3X sin inserto, proteínas totales de pGEX-FSHα4 y las fracciones soluble e insoluble de pGEX-FSHα4.

Se corrieron las muestras en electroforesis SDS PAGE, luego las proteínas del gel de electroforesis fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa Protean BA 83 (Sigma-Aldrich, Alemania). Al finalizar la transferencia se dejó bloqueando toda la noche con TBST con 5% de leche descremada en polvo a 4 °C.

5.7 Western Blot

Para visualizar la expresión proteica de hFSHα se realizó un western blot de las fracciones soluble, insolube y proteínas totales del clon pGEX-FSHα4. Como control negativo se utilizó la fracción de proteínas totales de un clon que contenía solamente pGEX-3X sin inserto y como control positivo se utilizó Metropine (1 μg) la cual es una preparación comercial de hFSH purificada de la orina de mujeres post-menopáusicas. Las proteínas se resolvieron por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección, se utilizó un anticuerpo comercial de conejo dirigido contra la subunidad alfa de las gonadotrofinas humanas. El revelado se hizo con un anticuerpo de cerdo anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa. La membrana se expuso a una película fotográfica (Kodak, EEUU) durante 1 minuto y se procedió al revelado. La foto se muestra en la figura 15.

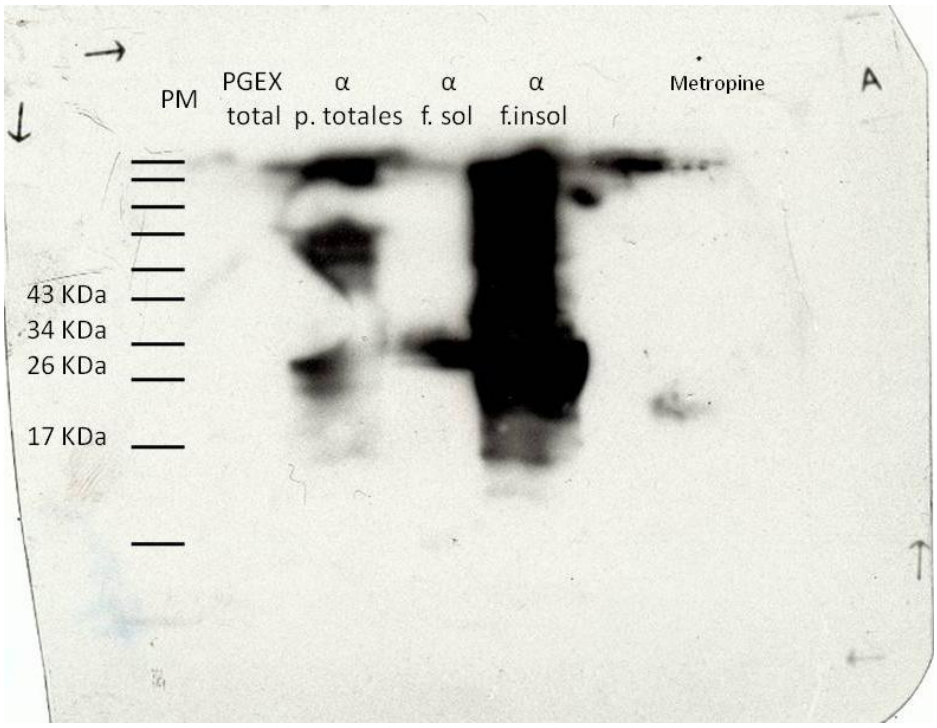


Figura 15: *Western blot: PM) Marcador Page Ruler Prestained Protein ladder (Fermentas). Carril 1) pGEX-3X fracción total. Carril 2) proteínas totales del clon pGEX-FSHα4. Carril 3) fracción proteica soluble del clon pGEX-FSHα4. Carril 4) fracción insoluble del clon pGEX-FSHα4. Carril 6) Control Metropine 1 µl (1mg/ml).*

En el western no se observa señal en el control negativo (pGEX-3X sin inserto, carril 1), lo cual está de acuerdo a lo esperado. En el extracto proteico total del clon pGEX-FSHα4 (carril 2) se observa una señal constituida por varias bandas, de las cuales una parece haber quedado al inicio del gel, lo cual sugiere la presencia de material insoluble. En la fracción soluble del clon pGEX-FSHα4 (carril 3) se observa una banda que se ubica entre las bandas de 34 y 43 kDa del marcador de peso molecular. Esta banda correspondería a la proteína de fusión GST-hFSHα la cual tendría un peso molecular de 37.6 kDa. La señal obtenida en la muestra correspondiente a la fracción insoluble de pGEX-FSHα4 (carril 4) es de muy alta intensidad y no permite distinguir claramente un perfil de bandas, aunque parecería que la región donde hay una señal más fuerte coincidiría con la altura de la banda del carril 3, es decir, a la altura de entre

34 y 43 kDa del marcador de peso molecular. Se observa además que el tratamiento al que se sometió esta muestra no fue suficiente para una solubilización total de la misma, pues hay fuerte señal todo a lo largo del carril. Finalmente el control positivo de Metropine comercial (carril 6) muestra una banda de peso molecular aparente cercano a 20 kD, lo cual coincide con lo esperado para la forma reducida de la subunidad α de la FSH humana.

6. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se clonó la secuencia codificante de la subunidad alfa de la FSH humana en un vector de expresión que permite obtener una fusión de la proteína de interés con la glutatión-S-transferasa (vector pGEX-3X). La identidad de la construcción fue confirmada por secuenciación.

Se hicieron ensayos de expresión de la proteína recombinante GST-hFSHa. Se pudo determinar que dicha proteína es expresada eficientemente en E. *coli*, aunque la mayor parte del producto se encontraría en forma insoluble. La formación de agregados podría deberse a varios factores no excluyentes, principalmente aquellos que tienen que ver con el plegamiento de la proteína. En particular, la subunidad α de la FSH nativa presenta 5 puentes disulfuro. El ambiente reductor del citoplasma bacteriano impediría la formación de estos enlaces, y por ende, el plegamiento correcto.

Existen métodos que se podrían utilizar para intentar solubilizar la proteína, que incluyen el uso de urea, detergentes iónicos y no iónicos, así como agentes reductores (2-mercaptoetanol, DTT, etc.). Estos métodos llevan a la desnaturalización de la proteína. Sin embargo, en numerosos casos, la renaturalización es posible cuando se retiran gradualmente los agentes desnaturalizantes (por ejemplo, por diálisis).

Dado que el sistema parece ser un buen productor en cuanto a cantidad, resulta una perspectiva interesante ensayar alguno de estos métodos de solubilización para poder luego purificar la proteína de fusión por cromatografía de afinidad con glutatión inmovilizado.

7. Bibliografía

- Ausubel, F.M, Brent, R., Kingston, R.E., Moore D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. **Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 2003.**

- Balen, A. **Is there a risk of prion disease after the administration of urinary-derived gonadotrophins?. *Human Reproduction,* 17(7), 1675-1683, (2002).**

- Cabrita, L.D., Dai, W., Bottomley, S.P. **A family of *E.Coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnology*, 6(12), 1-8 (2005).**

- Casper, R.F**. Are recombinant gonadotropins safer, purer and more effective than urinary gonadotrophins?. *Reproductive Biomedicne Online,* 11(5), 539-540 (2005).**

- Cornelis, P. **Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current opinion in Biotechnology*, 11, 450-454, (2000).**

- Fauser, B.C.J.M. **Interference with follicle stimulating hormone regulation of human ovarian function. *Molecular Human Reproduction*, 2(5), 327-334, (1996).**

- Fox, K.**M., Dias, J.A, Van Roey, P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecular Endocrinology,* 15(3), 378-389, (2001).**

- Frangioni, J.V., Neel, B.G. **Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry,*210, 179-187, (1993).**

- Fuh, G., Mulkerrin, G., Bass, S., McFarland, N., Brochier, J., Bourell, J.H., Light, D.R., Wells, J.A. **The human growth hormone receptor, secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. The *Journal of Biological Chemistry,* 265, 3111-3115, (1990).**

- Gold, L., Stormo, G.D. **High-level translation initiation. *Methods Enzymology,* 185, 89-93, (1990).**

- Hall, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98, (1999).**

- Howles, C.M. **Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Human Reproduction Update,* 2(2), 172-191, (1996).**

- Katzman, P.A., Godfrid, M., Cain, C.K., Doisy, E.A. **The preparation of chorionic gonadotropin by chromatographic adsorption. 501-507, (1943)**

- Lal, D., Mahale, S.D., Nandedkar, T.D., Iyer, K.S. **Identification of bioneutralization epitopes of human follicle stimulating hormone in the regions 31-52 and 66-75 of its β- subunit. *Reproductive Immunology*, 33, 1-14, (1997).**

- Lispi, M. **Comparative assessment of the consistency and quality of a highly purified FSH extracted from human urine (urofollitropin) and a recombinant human FSH (follitropin Comparative assessment of the consistency and quality of a highly purified FSH extracted from human urine (urofollitropin) and a recombinant human FSH (follitropin α). *Reproductive BioMedicine Online*, 13(2), 179-193, (2006).**

- Lunenfeld, B. **Historical Perspectives in gonadotrophin therapy. *Human Resporduction Update,* 10(6), 453-467, (2004).**

- Makrides, S.**C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 512-538, (1996).**

- N. Ruétalo (2012). **Expresión de la glicoproteína Hormona Folículo Estimulante humana en *Physcomitrella patens*.**

- Pharmacia LKB Biotechnology. **GST gene fusion system chimeric proteins-vesatile tools im molecular biology research. *Molecular and cell biology Research*. Vol 19 N° 3.**

- Revelli, A., Poso, F., Gianluca, G., Moffa, F., Giuseppina, G., Massobrio, M. **Recombinant versus highly-purified, urinary follicle-stimulating hormone (rFSH vs HP-uFSH) in ovulation induction: a prospective, randomized study with cost-minimization analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology,* 4(38), 1-7, (2006).**

- Rose, M.P., Rose, G.D., Balen, A.H**. Definition and Measurement of follicle stimulating hormone. *Endocrine Reviews,* 21(1), 5-22, (2000).**

- Ryan, R. J., Charlesworth **,Milius, R.P., Keutmenn, H.T., C., McCormick, D.J.The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *FJ Reviews*, 2, 2661-2669 (1988).**

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. **Molecular Cloning a Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.**

- Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E. **The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews,* 18(6), 739-773, (1997).**

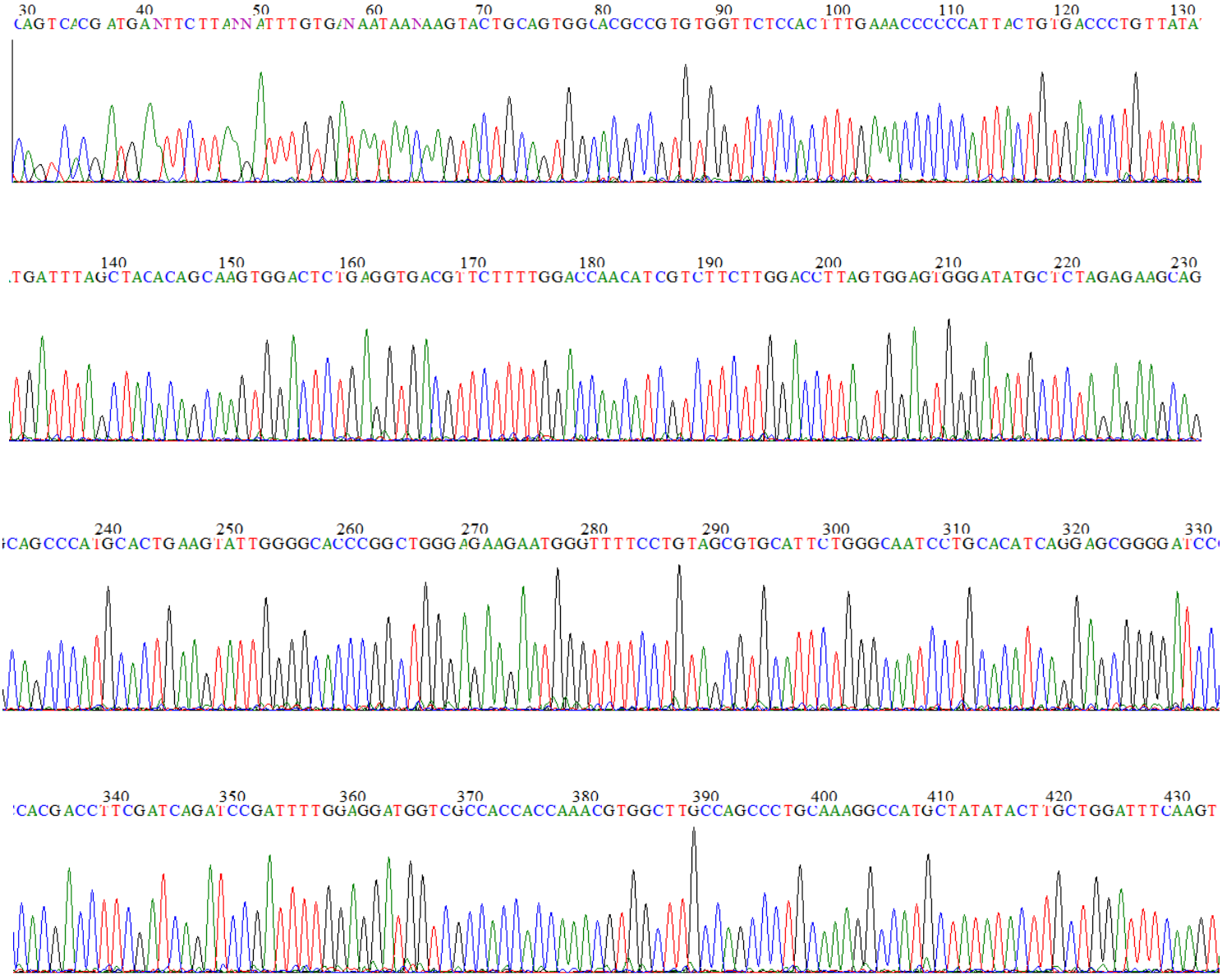
- **Smith, D.B., Johnson, K.S. GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Gene* 67, 31 (1988).**

- Terpe, K. **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiol Biotechnol,* 72, 211-222, (2006).**

- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C. **Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor.** ***Human Reproduction Update*****, 4(3), 260-283, (1998).**

- Vegetti, W. **FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation.** ***RBM Online, 12(6), 684-694, (2006).***

- Zwart-van Rijkom, J.E.F, Broekmans, F.J., Leufkens, H.G.M. **From HMG through purified urinary FSH preparation to recombinant FSH: a substitution study.** ***Human Reproduction*****, 17(4), 857-865, (2002).**

8. ANEXO I

Electroferograma obtenido por secuenciación del clon 4 pGEX-FSHα4 con el cebador oligo 391. La secuencia que se obtiene con este cebador es la de la cadena complementaria leída desde el 3' de la CDS de hFSHα.