

**Informe de Pasantía de Grado
Licenciatura en Bioquímica
Sección Bioquímica – Biología Molecular
Facultad de Ciencias – UDELAR**



**Subclonado y Expresión
de la secuencia codificante para
Cu/Zn Superóxido Dismutasa Humana 1
*en Escherichia coli***



**Fabiana Piriz Fucci
Orientación: Dra. Mónica Marín**

*“En el enfrentamiento entre el arroyo y la roca, el arroyo siempre gana.
No por fuerza sino por persistencia”
Buddha*

1 RESUMEN:

La enzima **Cu/Zn superóxido dismutasa humana 1 (SODh1)** es una enzima citosólica de defensa celular oxidativa, donde numerosas mutaciones puntuales (como la G93A) identificadas en la secuencia codificante fueron asociadas a casos de *Esclerosis lateral Amiotrófica Familiar*. Las mutaciones de SODh1 relacionadas con la enfermedad desestabilizarían la estructura de la enzima, favoreciendo el mal plegamiento y la formación de agregados proteicos principalmente estructuras fibrilares conocidas como amiloides.

La expresión en sistemas procariotas de muchas proteínas heterólogas llevan igualmente al mal plegado y acumulación en depósitos insolubles denominados cuerpos de inclusión. La formación de estos cuerpos de inclusión se considera un proceso inespecífico a causa de contactos hidrofóbicos. Sin embargo, la evidencia sugiere que los cuerpos de inclusión bacterianos comparten un número de características comunes con las fibras amiloides altamente ordenadas y patogénicas relacionadas con las enfermedades humanas.

El objetivo de este trabajo es el subclonado de la secuencia codificante de la SODh1 de tipo salvaje y la mutante G93A en el vector pQE30 para su posterior expresión, con el fin de estudiar posteriormente la dinámica traduccional de la enzima y la formación de los agregados.

El vector pQE30 pertenece al sistema *The QIAexpressionist™* para la expresión, purificación, detección y ensayo de proteínas recombinantes fusionadas a seis residuos de histidina consecutivos en el extremo 5'. Se parte del plásmido de propagación pGEM con las secuencias de SODh1 clonadas y flanqueadas por los sitios de restricción para las endonucleasas Bcl I y Sac I, se pretendía liberar el inserto; para luego ser subclonado en el plásmido pQE30®, previamente digerido con las enzimas BamHI y Sac I.

Por otra parte, se llevó a cabo la puesta a punto de la expresión de la SOD a partir del vector pET-3d que contenía las secuencias de SODh1 wt y G93A subclonadas, y transformando la cepa de *E.coli* BL21(DE3). La inducción se realizó con IPTG. El análisis de la expresión se realizó por SDS-PAGE.

2 ÍNDICE:

1. RESUMEN	página 1
2. ÍNDICE	página 2
3. INTRODUCCIÓN.....	página 3
3.1. <u>Modelo de Estudio</u>	página 3
3.1.1. Plegamiento de la Cu/Zn Superóxido dismutasa humana 1.....	página 4
3.1.2. Formación de agregados de Cu/Zn Superóxido dismutasa humana 1	página 5
3.2. <u>Expresión heteróloga de proteínas</u>	página 7
3.2.1. Sistema de Expresión: E.coli	página 7
3.2.2. Promotores empleados en E.coli y ARN polimerasas	página 10
3.2.3. Sistema con proteína de fusión	página 12
3.3. <u>Antecedentes</u>	página 12
4. OBJETIVO	página 14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	página 14
5.1. <u>Materiales</u>	página 14
5.1.1. Cepas bacterianas	página 14
5.1.2. Plásmidos	página 15
5.1.3. Endonucleasas de Restricción	página 17
5.2. <u>Métodos</u>	página 18
5.2.1. Esterilización de materiales	página 18
5.2.2. Preparación de bacterias	página 18
5.2.3. Amplificación y análisis de ADN	página 19
5.2.4. Expresión y análisis de proteínas	página 22
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	página 24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	página 26
7.1. Preparación del vector pQE30®	página 26
7.2. Preparación del inserto conteniendo las secuencias codificantes de SODh1 de tipo salvaje y mutante G93A	página 28
7.3. Expresión de prueba en el sistema BL21 – pET	página 39
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	página 42
9. ANEXO	página 44
10. BIBLIOGRAFÍA	página 46

3 INTRODUCCION:

3.1 MODELO de ESTUDIO:

La enzima Cu/Zn superóxido dismutasa humana 1 (SODh1)

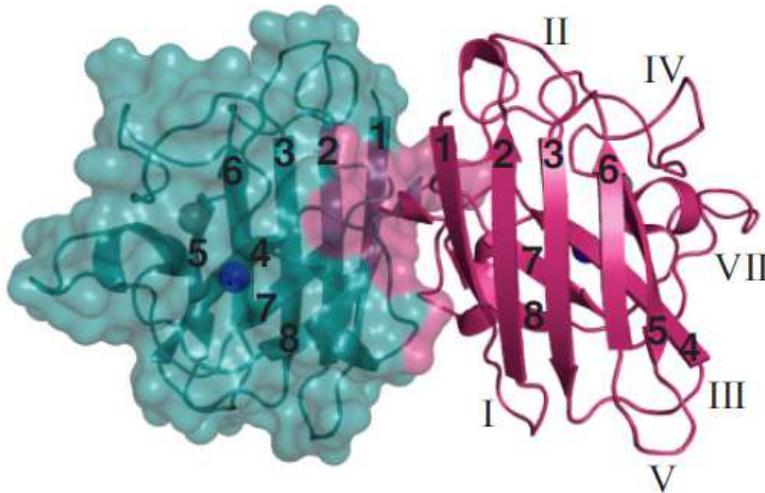


Figura 1- Modelo de estructura nativa del dímero Cu/Zn superóxido dismutasa 1. Las cintas verde y magenta representan los dos monómeros. La superficie de acceso al solvente está delineada de verde y la interfase del dímero está coloreada en magenta. El ión Cu y Zn están indicados como una esfera azul. Las hojas β de los monómeros están numeradas del 1 al 8 y los loops del I al VII [5].

La enzima **Cu/Zn superóxido dismutasa humana 1 (SODh1)** (Figura 1), es una enzima citosólica de defensa celular oxidativa. Es una proteína homodimérica de 32 kDa, donde cada monómero de 153 aminoácidos contiene iones cobre y zinc [1-2]. El gen de esta enzima mapea en el cromosoma 21, y mutaciones de ella (como la G93A) fueron descubiertas como las causantes del 5-20% de los casos de **Esclerosis lateral Amiotrófica Familiar** en 1993 [2-3] (actualmente se conocen más de 140 mutaciones puntuales [4]-<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/Als/index.a.spx>).

La elucidación de la estructura de la Cu,ZnSOD humana (*HsCu,ZnSOD*, PDB code 1SOS) en 1992, reveló que el plegado de la enzima y la organización de sus dominios se encuentran altamente conservados entre los eucariotas [9].

Las dos subunidades monoméricas se encuentran estabilizadas por fuertes interacciones hidrofóbicas entre las hojas β , y un puente disulfuro intramolecular entre la cisteína 57 y la 146, que une covalentemente el *loop* de unión a Zn con el C-terminal de la hoja β 8 [4]. Conforman un dímero extremadamente estable[10].

La **esclerosis lateral amiotrófica - ELA** (cuya sigla en inglés es ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*), también conocida como Enfermedad de las Motoneuronas, Enfermedad de Charcot o Enfermedad de Lou Gehring[6]. Es una afección fatal caracterizada por una pérdida motriz, que resulta en una parálisis progresiva[7], acompañada de otros síntomas [6]. La causa, es la pérdida selectiva de las motoneuronas del tronco cerebral, medula espinal y la corteza motora[8]. Finalmente, en un periodo de 3 a 5 años, esta enfermedad evoluciona fatalmente como consecuencia de fallas del sistema respiratorio[7].

Las mutaciones de la SODh1 que fueron relacionadas con la enfermedad podrían favorecer el mal plegamiento y la formación de agregados[3].

3.1.1 Plegamiento de la Cu/Zn superóxido dismutasa humana 1

La función biológica de la mayoría de las proteínas celulares se encuentra comprometida con su estructura tridimensional; que adquiere a través del plegado de la cadena polipeptídica codificada en el genoma celular. Cambios en la cadena polipeptídica, como resultado de un cambio heredado, adquirido a nivel genómico (errores en la transcripción (mutaciones) y procesamiento del ARNm) o una modificación anormal (por causa de errores a nivel traduccional y post-traduccional); podría cambiar el proceso de plegado y llevar al mal plegamiento de la proteína. Dependiendo de cuál sea la naturaleza de la proteína, es decir, del compartimento subcelular en que se encuentre; dependerá el contacto que tenga con la maquinaria de plegamiento y de degradación. Así, como los factores genéticos y ambientales (como estrés oxidativo, térmico u osmótico) con los que interactúe. Las consecuencias del mal plegamiento proteico pueden ser diferentes. Debido a esto, un amplio número de distintas enfermedades pueden ser vistas como *enfermedades de mal plegamiento proteico*, generalmente denominadas *enfermedades conformacionales* que resultan de proteínas que son degradadas, acumuladas o agregadas por las células [11-12].

Las *proteínas mal plegadas* suelen exponer residuos hidrofóbicos, habitualmente enterrados en el interior de la proteína, que favorecen su agregación. Por ello, las células contienen *sistemas de control de calidad* (Figura 2) constituidos por chaperonas moleculares y proteasas intracelulares que supervisan el plegamiento y estado de las estructuras proteicas. Degradando aquellas mal plegadas y reciclando o removiendo las proteínas dañadas o aberrantes; minimizan el mal plegamiento proteico y previenen la agregación [11].

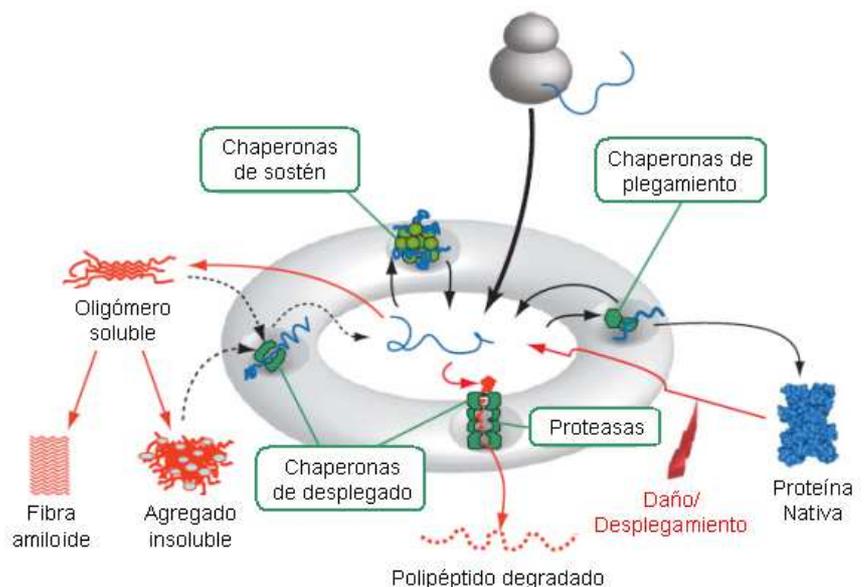


Figura 2-. *Sistemas de control de calidad proteico.* Estos sistemas de control de calidad manejan el *pool* de proteínas no plegadas y parcialmente plegadas (aquellas que se encuentran en el centro). Las chaperonas de plegamiento promueven el plegamiento, las chaperonas de sostén los mantiene en solución y las chaperonas de desplegado disgregan los agregados o despliegan las proteínas mal plegadas y las inyectan en *chambers* proteolíticas de proteasas de los sistemas de calidad [12].

Factores adicionales relacionados con el plegado y la maquinaria de degradación, ayudan a sintonizar a los sistemas de control de calidad a las diversas demandas[12].

Chaperonas moleculares como las proteínas de shock térmico (*Heat Shock Proteins - Hsp*) se unen a las cadenas polipeptídicas para estabilizar los residuos hidrofóbicos que han quedado descubiertos, reduciendo la probabilidad de agregación de las proteínas.

Las proteínas mal plegadas son generalmente marcadas para ser degradadas por el sistema proteosomal ubiquitina dependiente [11].

Fallas en estos sistemas de calidad hacen que las proteínas difíciles de desplegar y/o degradar, agreguen; y son asociados a enfermedades degenerativas [11].

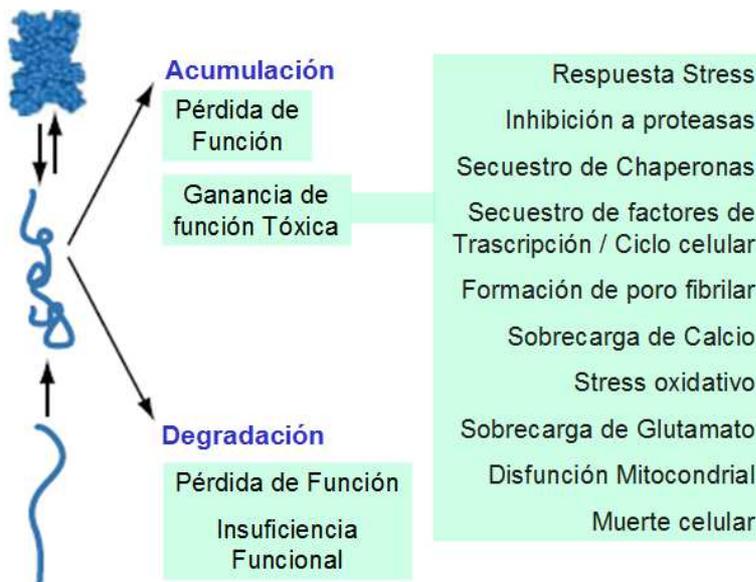


Figura 3- Esquema del destino de una proteína mal plegada y algunas de las importantes consecuencias celulares de la acumulación de proteínas [12].

El comportamiento de ganancia de función tóxica descrito en la *Figura 3* es consistente con el patrón general que posee ELA asociada a mutaciones de SODh1 de herencia dominante [13].

La SODh1 posee un complejo proceso de maduración post-traducciona, que incluye la formación del puente disulfuro intramolecular, la unión del ión Zn^{2+} , la inserción del ión Cu^{2+} (a través de un proceso chaperona dependiente – *copper chaperone for SOD1 - CCS*) y la posterior dimerización [5].

La SODh1 en su estado monomérico, sin iones metálicos unidos (apoSODh1) es un punto pertinente en el comienzo de los eventos posteriores de oligomerización aberrante [5].

Una mirada detallada al mal plegado y a las vías de oligomerización de SODh1 echarían luz a las bases moleculares de la ELA [5], y del mismo modo, al mecanismo que subyace la formación de agregados; vital para el desarrollo de una amplia variedad de áreas que requieren de la producción de proteínas recombinantes solubles.

3.1.2 Formación de agregados de Cu/Zn superóxido dismutasa humana 1

In vitro e *in vivo*, la desestabilización estructural en la SODh1 resulta en depósitos de proteínas, principalmente estructuras fibrilares conocidas como amiloides, con una organización supramolecular común de entrecruzado β (*In vitro*, *Figura 2 y 4*). Se parece a aquellos que se encuentran en las enfermedades de Alzheimer, Huntington, Parkinson y priónica [5, 9, 14]. La agregación de proteínas solubles en fibras amiloides resulta en un aumento de su contenido en hojas β .

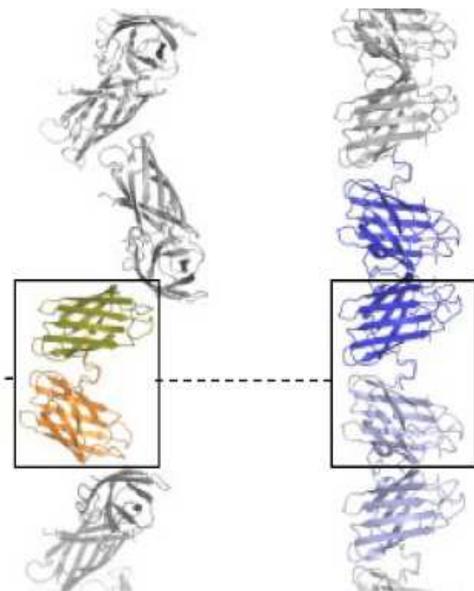


Figura 4- El loop VII hace interacciones de tipo filamentos amiloides con moléculas vecinas en cristales de 4 mutantes diferentes de SODh1. La figura muestra el arreglo de tipo fibrilar visto en cristales de dímeros de mutantes de SODh1 deficientes en Zn (*derecha*) y en cristales de monómeros de SODh1 que no han podido unir ión Zn (*izquierda*) [16].

No necesariamente toda la cadena polipeptídica tiene que estar involucrada en la red de contacto que constituye el núcleo β de un agregado, sino contactos específicos entre ciertas regiones “agregables” son las que mantienen a la estructura estable y compacta [14].

Una única mutación en donde SODh1 tiene un core de hojas β , parece ser susceptible a la agregación y formación de fibras, y es suficiente para causar ELA. El hecho de que algunas poseen una mayor tendencia a la agregación se relaciona directamente con la disminución en la supervivencia del paciente. Por lo tanto, es probable que las diferentes mutantes de SODh1 resulten en un mecanismo general de desestabilización que promueve la agregación en una mayor o menor extensión [9].

También se señala que la SODh1 mal plegada podría asociarse con otras proteínas e incluso ARN [15] y estos agregados podrían co-precipitar e inactivar otros factores celulares o bien activar procesos normales de degradación proteosomal [3].

La formación de amiloides puede ser acelerada solo por fibras homólogas, pero no por fibras de polipéptidos que no están relacionadas. Esto es, porque es la secuencia aminoacídica la que dicta la conformación fibrilar y es de hecho la estructura fibrilar la que hace de “semilla” [14, 17].

Los agregados proteicos amiloides pueden ser extremadamente estables, incluso más que la proteína nativa; lo que sugiere que el estado de agregación es una trampa, en sentido termodinámico. El plegado a un estado agregado o nativo es una batalla entre conformaciones estabilizadas por interacciones inter o intra moleculares, respectivamente [12].

La agregación de la proteína mutante en cultivo celular produce ensamblados que son bioquímica y biofísicamente similares a los agregados formados en los tejidos afectados [18]. No obstante, la expresión en sistemas procariontes de muchas proteínas heterólogas lleva igualmente al mal plegado y acumulación en depósitos insolubles de proteínas (*cuerpos de inclusión*). La formación de estos cuerpos de inclusión se considera un proceso inespecífico a causa de contactos hidrofóbicos. Sin embargo, la evidencia sugiere que los cuerpos de inclusión bacterianos comparten un número de características comunes con las fibras amiloides altamente ordenadas y patogénicas relacionadas con las enfermedades humanas. Tanto la formación de los cuerpos de inclusión como de amiloides son conducidos por un proceso de nucleación, secuencia específica y liderado por la formación de estructuras enriquecidas en hojas β [14]. Yoon EJ, *et.al*, mostraron que los amiloides β interactúan directamente con SODh1 y es esta interacción la que

deterioraría la actividad enzimática de SODh1. Además mostraron que los amiloides β se unen con mayor afinidad al mutante SOD G93A que a la SODh1 de tipo salvaje [26].

3.2 EXPRESIÓN HETERÓLOGA de PROTEÍNAS:

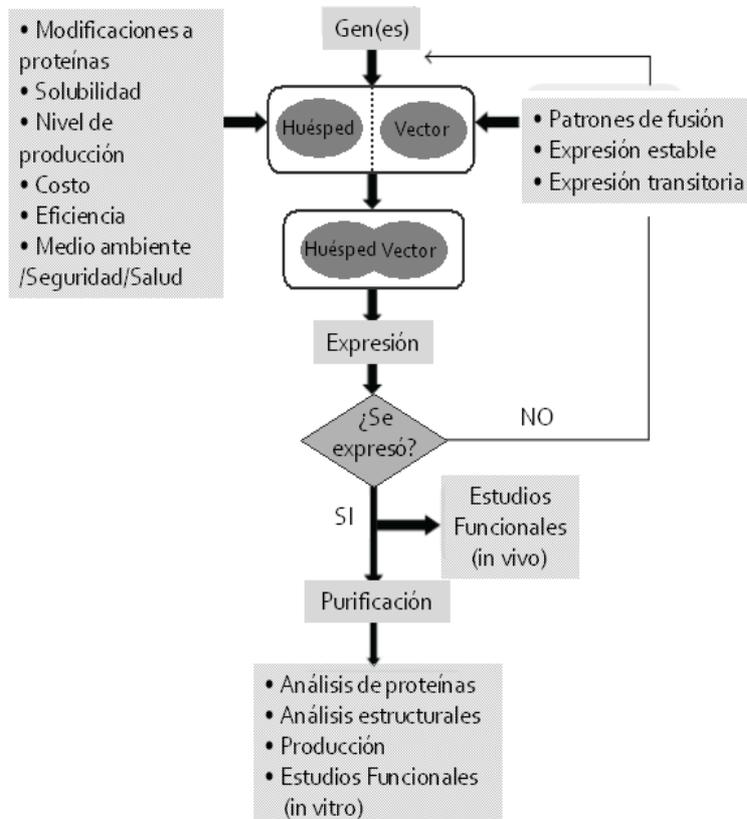


Figura 6- Diagrama de flujo de la expresión heteróloga de proteínas [20].

La expresión heteróloga de una proteína involucra la identificación del gen correspondiente y su inserción en el huésped para la síntesis de la proteína codificada (Figura 6) [19].

La elección del sistema de expresión y el vector es un paso crítico en este proceso y las ventajas y desventajas de varios factores deben ser considerados. La elección se realiza en base al propósito de estudio, es decir, la producción de grandes cantidades de proteína o la investigación de las propiedades funcionales de la proteína clonada. Las propiedades fisicoquímicas de la proteína a investigar deben tenerse en cuenta ya que también juegan un rol en esta elección [20].

La expresión heteróloga de proteínas es una herramienta poderosa para el análisis bioquímico y funcional de genes y familia de genes, aislada de varios organismos [27]. Esta herramienta es utilizada con fines preparativos para: cristalizaciones, estudios estructurales, preparación de vacunas recombinantes, *screening* de drogas, preparación de antígenos, estudios enzimáticos y funcionales *in vitro*; etc. Cada proteína debe ser analizada en bases individuales diferentes, y no hay un procedimiento universal para la expresión heteróloga de proteínas. La expresión en el sistema procariota es la primera opción debido a todas sus practicidades, y a que continuamente distintos métodos son desarrollados para superar los múltiples desafíos que presenta esta técnica [22].

A pesar de la creciente literatura describiendo expresiones proteicas satisfactorias, cada nuevo gen presenta sus problemas particulares de expresión. No se puede establecer el conjunto de métodos que garanticen una producción satisfactoria para cada proteína y que sea biológicamente activa [27].

3.2.1 Sistema de expresión *E.coli*

El sistema de expresión bacteriano para la producción de proteínas recombinantes es un sistema atractivo porque crece rápidamente y en alta densidad sobre un sustrato de bajo costo. El traslocón bacteriano es incapaz de procesar los residuos cargados mediante interacciones con la cadena polipeptídica naciente durante la traslocación,

como lo hace su contraparte eucariota [21]; y muchos sistemas bacterianos no pueden modificar de forma post-traducciona a las proteínas. No obstante, algunas proteínas eucariotas producidas en *E.coli* han mantenido una total funcionalidad, como es el caso de la hormona del crecimiento humana [20]. *E.coli* no es apropiada para la expresión de proteínas que contienen muchos puentes disulfuro, que requieren varias glicosilación o isomerización *cis/trans* de prolina, isomerización de disulfuros, lipidación, sulfatación o fosforilación [20]. Por ello, si la modificación post-traducciona es esencial para la bioactividad, entonces el sistema bacteriano de expresión no debería ser usado para la producción de la proteína heteróloga. Huéspedes alternativos se encuentran disponibles para ello [19]. De hecho, las conclusiones sobre la función biológica necesitan ser verificadas en huéspedes alternativos [20].

La popularidad de la bacteria gram negativa *E.coli* como organismo preferencial para la proteómica yace en su genética muy bien caracterizada y la posibilidad de contar con una gran variedad de cepas mutantes y vectores de clonado para distintos propósitos [21].

Las cepas de *E.coli* BL21 y K12 y sus derivados son las más frecuentemente utilizadas en las expresiones de rutina (*Tabla 1*) [19].

Tabla 1- Algunas de las cepas de *E.coli* más frecuentemente utilizadas para la producción de proteínas heterólogas y sus características claves [19].

cepa <i>E.coli</i>	Deriva	Principales características
ADA94	K-12	mutante <i>trxB</i> , facilita la formación citoplasmática de puentes disulfuro
BL21	B834	Deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
BL21 <i>trxB</i>	BL21	mutante <i>trxB</i> , facilita la formación citoplasmática de puentes disulfuro, deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
BL21 CodonPlus-RIL	BL21	Aumenta la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raros usados en <i>E.coli</i> : AGG,AGA,AUA,CUA; deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>
BL21 CodonPlus-RL	BL21	Aumenta la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raros usados en <i>E.coli</i> : AGG,AGA,CCC; deficiente en proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>

A diferencia de las K12, las cepas derivadas de BL son deficientes en la proteasa *lon* y *ompT* [31], con el fin de minimizar la degradación del producto. Generalmente los problemas en la expresión de proteínas heterólogas en los sistemas bacterianos son causados por características únicas estructurales de la secuencia génica, la estabilidad y eficiencia traduccional del ARNm, la facilidad de plegado de la proteína, la degradación de la proteína por proteasas de la célula huésped, el uso de codones o por la toxicidad de la proteína heteróloga para la célula huésped [30]. La sobreexpresión de un gen heterólogo frecuentemente presenta dificultades (*Tabla 2*) [19].

La mayoría de esos problemas derivan de la diferencia en el uso de codones entre *E.coli* y la proteína sobreexpresada. Los codones raros podrían ser especialmente un problema. La traducción del ARNm heterólogo puede ser retardado o impedido por la demanda de uno o más de los ARNt raros o faltantes en la cepa huésped. La insuficiencia en los *pools* de ARNt lleva a la detención de la traducción, terminación prematura de la traducción, corrimiento en el marco de lectura en la traducción o incorporación incorrecta de aminoácidos [19]. Hay evidencias que señalan que la estructura secundaria proteica podría estar relacionada con la frecuencia de uso de los ARNt. En *E.coli* así como en eucariotas, la proteína naciente se pliega co-traduccionalmente dentro del túnel ribosomal, que resulta un ambiente protector donde la estructura secundaria en hélice alfa comienza a plegarse, y un ambiente dinámico que influye en la estructura de la proteína naciente [24].

En el túnel ribosomal, un pequeño cambio en la tasa de traducción del ARNm podría jugar un papel clave en el desarrollo de la estructura secundaria de la proteína naciente. Estos cambios en la tasa de traducción dependen de los niveles relativos de ARNt [24].

Tabla 2-. Algunos problemas de la producción de proteínas heterólogas en *E. coli* y posibles soluciones [19].

Síntoma	Problema posible	Soluciones varias
Muerte celular o ausencia de colonias	Proteína tóxica, alta expresión basal	Controles mas estrictos sobre la expresión basal Sistema promotor finamente controlado Promotor mas débil Disminuir la temperatura Disminuir la concentración de inductor
Proteína con puente disulfuro insoluble (cuerpos de inclusión)	Reducción de los puentes disulfuros	Minimizar la reducción en el citoplasma Acumulación en el periplasma
Proteína insoluble (cuerpos de inclusión)	Muy alta expresión	Atenuar la expresión: con un promotor mas débil, disminuyendo la temperatura, disminuyendo la concentración de inductor, disminuyendo el numero de copias del plásmido, adicionando un <i>tag</i> de afinidad hidrofóbico
Ausencia de actividad	Mal plegamiento proteico, los <i>tags</i> de afinidad pueden disminuir la actividad	Minimizar la reducción en el citoplasma Acumulación en el periplasma Expresión atenuada Cambiar el <i>tag</i> de afinidad
Ausencia de proteína, proteína truncada	Uso de codones por <i>E.coli</i> (tendencia de codones)	Suplementar con tRNAs raros Promotor mas fuerte Aumentar el numero de copias del plásmido Disminuir la temperatura Sistema promotor finamente controlado

Tener en cuenta que cambiar de cepa bacteriana, fuera de *E.coli*, puede también solucionar el problema

Técnicas para optimizar la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E.coli* han sido exploradas y significativamente han aumentado el nivel de producción de proteínas eucariotas foráneas. Algunas “reglas” empíricas para la selección de la cepa huésped como ser, número de copias del plásmido, selección del plásmido, estabilidad del ARNm y uso de codones; han sido tomadas de optimizaciones y que pueden ser utilizadas como guía para el diseño del sistema de expresión y para limitar la imprevisibilidad de la expresión de proteínas en *E.coli* [27,30]. Un paso importante en la optimización son las condiciones de crecimiento de las células y el medio para la producción de cada proteína. Teóricamente, modificando las condiciones de crecimiento (variando la temperatura, cambiando la composición del medio) se podría sobrellevar la diferencia del uso de codones. Incluso, si un aminoácido se encuentra muy representado en la secuencia génica, se puede suplementar el medio de cultivo con el mismo o existen varias cepas de *E.coli* que suministran ARNt adicionales bajo el control de su promotor nativo. Reducir la concentración de inductor también podría resultar, pero la mayoría de las veces no tiene éxito [19].

Estrategias para eludir el mal plegamiento de la proteína recombinante incluyen: la expresión de la proteína en el espacio periplásmico, la expresión con un *tag*, utilización de diferentes huéspedes, etc [20].

Frecuentemente, el citoplasma es la primera opción para la producción de proteínas heterólogas porque el rendimiento parece ser más atractivo [19].

La formación de cuerpos de inclusión a causa de la sobreexpresión se suele enfrentar con estrategias para reducirla, como: bajar la temperatura de cultivo, sustitución de aminoácidos, co-expresión de chaperonas, expresarla en fusión de un segmento hidrofílico, adicionar sorbitol, glicilbetaina, sucrosa o raffinosa al medio de cultivo, cambiar

las condiciones de cultivo en pH o cambiar de cepa bacteriana. Alternativamente, los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados y replegados para volver activo y funcional al producto [19].

El método básico usado en la expresión de genes foráneos en *E.coli* comienza con la inserción del gen en un vector de expresión. Usualmente un vector contiene varios elementos:

a) Una secuencia que codifica para un marcador de selección que asegura el mantenimiento del vector en la célula. Generalmente, el marcador de selección es la resistencia a algún antibiótico.

b) Un promotor de transcripción controlable (por ejemplo, *lac*, *trp* o *tac*) que, una vez ocurrida la inducción, puede producir grandes cantidades de ARNm del gen clonado.

c) Una secuencia de control traduccional, como un sitio de unión a ribosoma e iniciador ATG apropiadamente posicionados.

d) Un sitio múltiple de clonado (*poly-linker*), que simplifica la inserción del gen foráneo en una correcta orientación en el vector.

Independientemente del sistema de cepa huésped y promotor (Tabla 3); plásmidos de bajo, intermedio y alta copia podrían ser usados para reducir los problemas de expresión producto de un inadecuado nivel de expresión [19].

Una vez construido el vector de expresión con el gen foráneo, éste es introducido en la cepa apropiada de *E.coli* por el método de transformación [27].

3.2.2 Promotores empleados en *E.coli* y ARN polimerasas

La secuencia codificante de la proteína heteróloga que se quiere expresar debe ser clonado bajo el control de un promotor bien caracterizado [19]. Si bien muchos sistemas promotores de *E.coli* se han descrito, solo unos pocos son comúnmente utilizados. Un promotor útil debe ser fuerte, con un bajo nivel de expresión basal (que sea fuertemente regulado), debe ser fácil de transferir a otra cepa de *E. coli* y la inducción debe ser simple, de costo efectivo e independiente de los ingredientes comúnmente utilizados para el medio [19].

Tabla 3- Algunos sistemas promotores de *E. coli* que son usados para la producción de proteínas heterólogas y sus características [19].

Sistema de expresión basado en	Inducción (concentración de inductor)	Niveles de expresión	Principales características	Referencia Original
Promotor <i>lac</i>	Adición de IPTG 0,2mM (0,05- 2,0mM)	Desde bajo nivel hasta medio	Baja, regulada, apropiada para productos génicos a niveles intracelulares muy bajos Comparativamente, inducción costosa	Gronenborn (1976)
Promotor <i>trc</i> y <i>tac</i>	Adición de IPTG 0,2mM (0,05- 2,0mM)	Moderadamente alto	Nivel muy alto, pero mas baja que los sistemas T7 Expresión regulada a posible Comparativamente, inducción costosa Expresión basal alta	Brosius et al. (1985)
RNA polimerasa de T7	Adición de IPTG 0,2mM (0,05- 2,0mM)	Muy alto	Utiliza la RNA polimerasa de T7 Nivel alto de inducción ante la expresión del sistema T7/ <i>lac</i> debido a la necesidad de un fino control de la inducción para clones mas tóxicos Inducción relativamente costosa Los niveles basales dependen de la cepa utilizada (pLys)	Studier y Moffatt (1986)

El promotor *lac* como tal, es bastante débil y raramente es usado para producción a gran escala. Pero esa “falta de retención” del promotor *lac* puede ser una ventaja para la expresión de proteínas de membrana o de aquellas que resultan tóxicas para la célula. Muchos promotores fueron construidos a partir de elementos regulatorios derivados de *lac*. La inducción de todos estos promotores se puede llevar a cabo con la adición de un análogo de lactosa no hidrolizable: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) [19]. A su vez son regulados por la represión por catabolito y el estado metabólico (representado por el nivel de AMP cíclico). Para reducir estos problemas se desarrolló el sistema de RNA polimerasa T7, uno de los sistemas más ampliamente utilizados [28].

La RNA polimerasa de bacteriófago T7 elonga las cadenas cinco veces más rápido que la RNA polimerasa de *E.coli* y finaliza con la transcripción con menor frecuencia; lo que provoca que en ocasiones resulten ARN cuyo tamaño es varias veces el del plásmido. Dado a que la polimerasa celular y la del bacteriófago T7 reconocen promotores diferentes, los mismos pueden ser utilizadas selectivamente. La cepa BL21 (DE3) posee una copia cromosomal del gen de la polimerasa T7 bajo el control de un promotor derivado de *lac*, L8-UV5 *lac*. El promotor L8-UV5 *lac* contiene mutaciones puntuales que lo distinguen del promotor *lac* de tipo salvaje. Dos mutaciones puntuales se encuentran en la región -10, que aumenta la fuerza del promotor y disminuye su dependencia a AMP cíclico y su proteína receptor CAP. Una tercera mutación crea un promotor fuerte que es menos sensible a la glucosa. Esto permite una fuerte inducción de RNA polimerasa de T7 con IPTG, incluso en presencia de glucosa [28].

Sin embargo, hay una expresión basal de T7 por inducción, que puede llevar a problemas si la proteína expresada es tóxica para la célula huésped. Una forma de disminuir el nivel de expresión basal es trabajar con una cepa que contenga los vectores pLysS o pLysE. Estos vectores expresan la lisosima T7, un inhibidor natural de la RNA polimerasa T7, que estabiliza los recombinantes que codifican la proteína heterólogas que podría afectar el crecimiento de las células y su viabilidad [28,29]. Sin embargo, la tasa total de proteína recombinante es generalmente mayor en las células BL21 Star™(DE3) que en las células BL21 Star™(DE3)pLysS [28].

Esto podría explicarse por el hecho de que la lisosima T7 es una proteína bifuncional. Ésta corta un enlace específico en la pared de peptidoglicano, haciendo que las células crezcan en una menor densidad. Otro aspecto es que la lisosima T7 puede reducir la expresión seguida a la inducción, resultando en niveles marcadamente menores. La reducción del nivel basal de RNA polimerasa T7 puede también alcanzarse adicionando 0,5 a 1,0% de glucosa al medio de cultivo. Este efecto de represión por catabolito es más fuerte en la BL21 (DE3) que en la cepa BL21(DE3)pLys [19].

3.2.3 Sistema con proteína de fusión

Comúnmente los vectores utilizados adicionan a la secuencia de la proteína heteróloga clonada una secuencia aminoacídica denominada *tag*. Incluso algunos incluyen una secuencia de corte de una proteasa específica. Los *tag*, en general, consisten en una secuencia peptídica corta o en una proteína entera que en ocasiones puede ser clivada de la proteína heteróloga cuando sea conveniente. La presencia de secuencias *tags* mejora la solubilidad, facilita la localización, purificación, cuantificación e identificación proteica. Características que sirven en los ensayos de expresión de la proteína [20].

Se utilizan diferentes *tags*, como: glutatión-S-transferasa (GSH), *tags* de poli histidinas (His-tag), proteína de unión a maltosa (MBP), tioredoxina (TrxA), *tag* de epítipo FLAG, *tag* de epítipo c-Myc, isomerasa de disulfuro I (DsbA), *tag* de poliargininas (Arg-tag), péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, *tag* de unión a polihistidinas (HAT-tag), utilización N de sustancia A (Nus A), S-tag, péptido de unión a estreptavidina (SBP-tag), strep-tag, proteínas fluorescentes como *green fluorescent protein* (GFP) y ubiquitina [20, 25].

La mayor desventaja de los sistemas con proteína de fusión es la necesidad de proteasas de elevado costo para el clivado de la proteína recombinante y el bajo rendimiento de la reacción de clivado [20].

El sistema de expresión, donde el organismo huésped es *E.coli*, puede ser optimizado asegurando la estabilidad del plásmido de expresión, eliminando proteasas naturales dañinas y el provecho de elementos genéticos relevantes. La combinación más popular de vector/cepa es la de vectores pET con la cepa BL21 (DE3) *E.coli*, siendo utilizada por consorcios de genómica estructural en la expresión y purificación de más de cien mil proteínas [22, 30].

3.3 ANTECEDENTES:

Expresión en sistema procariota de mutantes de superóxido dismutasa humana 1

La expresión de mutantes de SODh1 en *E.coli* en ausencia de chaperonas y limitada disponibilidad de cofactores metálicos sugiere que, la deficiencia de metales para mutantes de SODh1 hace que la misma pueda plegarse por dos vías o rutas diferentes. Cuando se expresa lentamente a baja temperatura, la mutante principalmente se pliega en dímeros proteicos capaces de unirse a metales y formar SODh1 activa [26].

Esta apoSODh1 es relativamente estable porque sobrevive a la lisis bacteriana, sonicación, precipitación por sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico sin agregación. Cuando la mutante se expresa a temperaturas más elevadas, donde la síntesis de la proteína naciente es mucho más rápida, esta se agrega en complejos multiméricos insolubles, que se mantienen a través de interacciones hidrofóbicas (cuerpos de inclusión). En estas condiciones, al comienzo de la expresión un pequeño porcentaje de SODh1 se pliega correctamente y toda la proteína expresada seguidamente es atrapada en cuerpos de inclusión. Una vez formados estos agregados, podrían acumularse adicionalmente otras proteínas hidrofóbicas. Estos agregados parecen ser trampas cinéticamente favorables que atrapan las proteínas SODh1 nacientes y otras proteínas [26].

La expresión de SODh1 de tipo salvaje también forma cantidades significativa de cuerpos de inclusión cuando se lleva a cabo a 37°C, tal como sucede con otras proteínas eucariotas expresadas en *E.coli* [26]. A pesar de ser posible solubilizar los cuerpos de inclusión con urea, los puentes disulfuro aberrantes contribuyen a mantener atrapada a la SODh1 en los cuerpos de inclusión [31].

Si bien el sistema de expresión en *E.coli* carece de la CCS humana, el seguimiento de los mutantes de SODh1 que forman cuerpos de inclusión podría ser un acercamiento al proceso de agregación de ELA [26]. La expresión de SODh1 recombinante en *E.coli* debería principalmente producir una proteína relacionada con la de las células eucariotas, puesto que la SOD de eucariota posee solo dos modificaciones post-traduccionales finales, el clivado de la metionina N-terminal y la acetilación de la alanina adyacente. De hecho, usando espectroscopía de masa se ha encontrado que la N-formilmetionina es removida, pero la proteína no es N-acetilada [26].

Vale la pena explorar varias condiciones de expresión (como menor tiempo de incubación y enriquecer el medio) para promover la expresión de proteínas recombinantes solubles [22].

Optimizaciones en vectores de expresión diseñados, dosificación de genes, fuerza del promotor (regulación de la transcripción), estabilidad del ARNm, iniciación de la traducción y terminación, cepas de *E.coli* huéspedes diseñadas y uso de codones; han sido desarrolladas y en continuo ascenso para la producción de proteínas recombinantes.

4 OBJETIVO:

Generar construcciones plasmídicas y poner a punto la expresión de la SODh wt y de la mutante G93A en *E.coli*.

Específicamente el objetivo es:

1) Subclonar la secuencia codificante de la SODh silvestre (wt) y de la enzima portadora de la mutación G93A en el vector pQE30.

2) Poner a punto la expresión y producción de esta enzima en *E.coli* y la determinación de la solubilidad en este sistema de expresión.

5 MATERIALES y METODOS

5.1 MATERIALES:

5.1.1 CEPAS BATERIANAS:

Escherichia coli GM2163 (New England Biolabs)

Esta cepa utilizada con el fin de propagar plásmidos o vectores λ que deban ser digeridos con enzimas de restricción sensibles a las metilasas: Dam o Dcm. El genotipo de la misma es F^- *dam-13::Tn9* (Cam^r) *dcm-6 hsdR2* ($r_k^- m_k^+$) *leuB6 hisG4 thi-1 araC14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136* (Str^r) *fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1*

Esta cepa es por lo tanto deficiente en las metilasas Dam y Dcm (Mec metilasa). La primera de ellas transfiere un grupo metil desde el S-adenosilmetionina a la posición N⁶ de la adenina en las secuencias GATC. La segunda, metila la citosina interna de las secuencias CCAGG y CCTGG en la posición C³.

Suprime la terminación prematura de las cadenas polipeptídicas cuando la glutamina está disponible pero no la mutaciones de λ S₁₀₀ o S₇. Es resistente al cloranfenicol [32].

Escherichia coli XL1 Blue (Stratagene)

Esta cepa se utiliza para la propagación de plásmidos o vectores λ para el clonado de rutina. Permite el screening a través del sistema azul-blanco. El genotipo es *endA1 gyrA96*(nal^R) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'* [*::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15*] *hsdR17*($r_k^- m_k^+$). Estas células son deficientes en endonucleasa A (*endA*), lo que aumenta considerablemente la calidad de las mini-preparaciones de ADN. Además es deficiente en recombinación, a raíz de una mutación *recA*, lo que mejora la estabilidad del inserto clonado. Por su parte la mutación *hsdR* evita el clivado del ADN mutado por el sistema de endonucleasa *EcoK*. El gen *lacI^qΔM15* en el episoma F' permite el *screening* azul-blanco, cuando esta cepa se transforma con un plásmido que permite la α -complementación. El gen Tn10 confiere resistencia a tetraciclina [33].

Escherichia coli BL21 Star™(DE3) (Invitrogen)

Esta cepa fue diseñada para la expresión elevada de proteínas recombinantes. Su genotipo es F⁻ *ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm rne131* (DE3). La designación DE3 indica que la cepa posee el plásmido lisógeno DE3 que porta el gen para la ARN polimerasa T7, bajo el control del promotor *lacUV5*. Se requiere de IPTG para inducir la expresión de la ARN polimerasa T7. Asimismo porta una mutación en el gen *rne* (*rne131*) que codifica para la enzima ARNasa E troncada, que no posee la habilidad de degradar ARNm, lo que resulta en una mayor estabilidad en el ARNm. No contiene la proteasa *lon*, ni la *OmpT* en la membrana externa. Esto le permite reducir la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en la cepa. No posee resistencia a ningún antibiótico. Se recomienda su uso para expresar genes heterólogos de un plásmido de bajo número de copias, basado en T7 [34].

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen)

Cepa de *E. coli* diseñada con el fin de propagar vectores; cuyo genotipo es el siguiente F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(*strr*), *endA1*, *nupG*. La mutación *deoR*, permite la expresión constitutiva de genes de la síntesis de deoxyribosas, y facilita la propagación de plásmidos grandes. La mutación *recA1* minimiza la recombinación del ADN de la célula, aumentando la estabilidad del inserto. La mutación *endA1* permite obtener un alto nivel de plásmido en su purificación dado a que inactiva una nucleasa que suele copurificar con él, degradándolo. La mutación *rpsL*(*strr*) confiere resistente a estreptomycin [35].

5.1.2 PLÁSMIDOS:

pGEM T Easy® (Promega)

Es un vector de clonado de productos de PCR que originados a partir de enzimas que adicionen una adenina al final de cada ciclo de secuenciación. Linealmente posee timidinas 3'-terminales en cada extremo, lo que lo vuelve apropiado para la inserción y ligación con gran eficiencia de productos de PCR generados por polimerasas termoestables con actividad transferasa terminal, evitando que recircularice. Es un vector de alto número de copias con los promotores T7 y SP6 para ARNpolimerasa *flankeando* un sitio de múltiple de clonado (sitio *poly-linker*).

Esto permite que el vector sea secuenciado utilizando los primers T7 y SP6. Además, esa región múltiple de clonado posee región que codifica para el péptido α de la enzima β galactosidasa. Una inserción satisfactoria a dicho sitio permite discriminar a los recombinantes a través del *screening* azul-blanco [36].

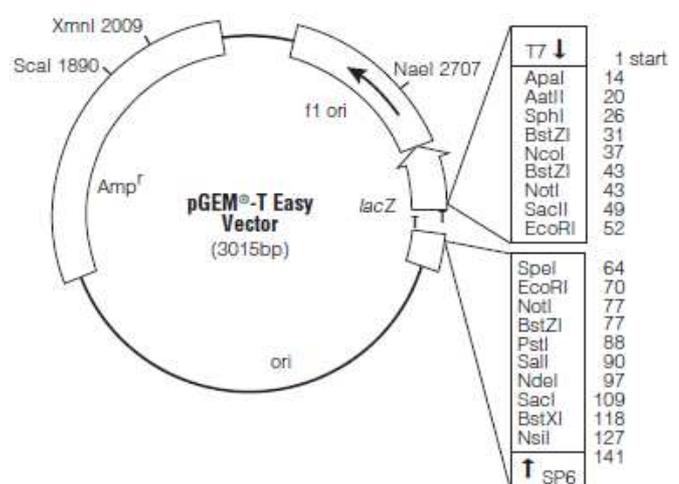


Figura7 -. Mapa con puntos de referencia en la secuencia del vector pGEM®-T Easy

pET-3d (Novagen)

Este vector de expresión pertenece al sistema de vectores pET, utilizados para el clonado y expresión de proteínas recombinantes en *E.coli*. Bajo el control del promotor fuerte de T7, la expresión es inducida en una cepa que posea la ARN polimerasa T7. Es posible moderar la expresión, disminuyendo la cantidad de inductor, y así aumentar la cantidad de proteínas solubles. Este sistema además mantiene la expresión de la proteína recombinante silenciada en estado de no inducción. La inducción es iniciada por la adición de IPTG, lactosa o usando un medio autoinductor.

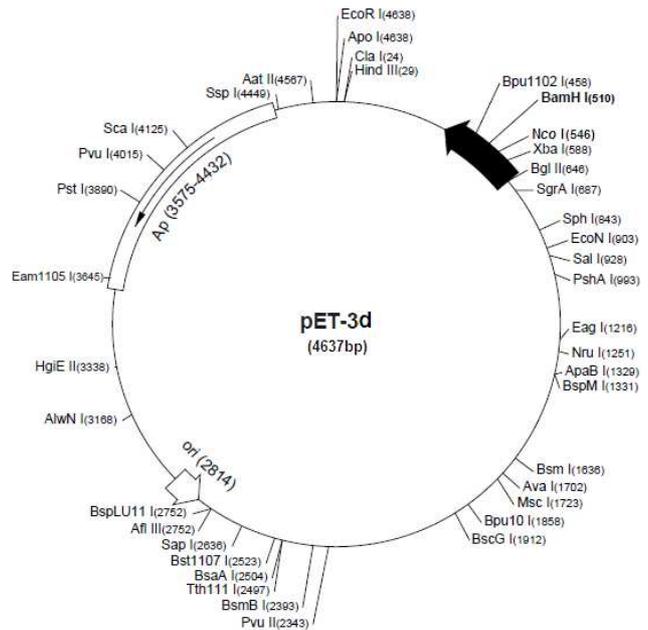


Figura 8-. Mapa del vector pET-3d. Modificado del manual de pET-3a-d (Novagen).

El vector pET-3d permite la expresión génica por acción de la ARNpolimerasa T7, ya que tiene promotor de T7. Éste, junto con el terminador T7, que *flanquean* el sitio de inserción permite que el vector pueda ser secuenciado con los primers T7 y T7 terminator. Además, el vector confiere resistencia a ampicilina a las células transformadas con él, lleva la secuencia de un *tag* N-terminal T7-Tag® y un sitio de clonado BamHI. Los vectores pET-3a-d son los precursores de muchos de los vectores de la familia pET. El T7-Tag® se trata los 11 aminoácidos iniciales del gen de la proteína 10 de T7, útil para la detección de la proteína en un *Wester-Blot*, además de ser útil para la purificación de la proteína en una resina de inmunoafinidad [37]

pET-22b(+) (Novagen)

El vector Pet-22b(+) posee la secuencia de una señal pelB en el extremo N-terminal para una localización potencial periplásmica, mas la secuencia opcional de un *tag* de histidinas C-terminal. Sitio únicos de restricción se muestran en la figura 9. La región de clonado y expresión de la hebra codificante se transcribe también a través de la ARN polimerasa T7. De la misma forma que pET-3d, el vector pET-22b(+) puede ser secuenciado con los primers T7 y T7 terminator.

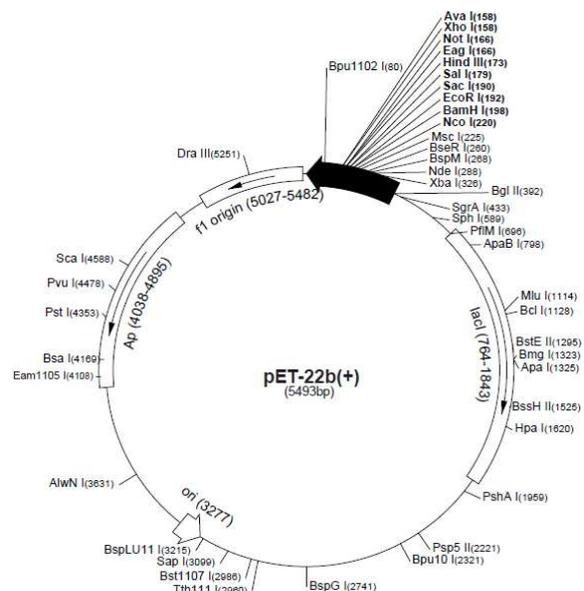


Figura 9-. Mapa del vector pET-22B(+)(Novagen).

El origen de replicación f1 permite la producción de plásmido monohebra de ADN, para mutagénesis y secuenciado.

Es particularmente útil para la expresión de genes tóxicos. Este vector confiere resistencia a ampicilina [37].

pQE-30 (QIAgen)

Este vector pertenece al sistema *The QIAexpressionist™* para la expresión, purificación, detección y ensayo de proteínas recombinantes fusionadas a seis residuos de histidina consecutivos. Los vectores pQE de *The QIAexpress* son vectores de alto nivel de expresión y bajo número de copias. Basado en el sistema transcripción promotor T5-traducción, los plásmidos pQE pertenecen a la familia de plásmidos pDS. Posee el promotor del fago T5 que es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* y dos operadores *lac* que aumenta la represión por unión de *lac*, lo que asegura una eficiente represión. Además cuenta con el sitio sintético de unión del ribosoma (RBSII), para una alta tasa de traducción.

El *tag* de seis histidinas se encuentra en el extremo 5' de la región de clonado y permite que la proteína fusionada al *tag* pueda ser purificada mediante una cromatografía de afinidad con la resina Ni-NTA (ácido níquel-nitrilotriacético patentado por QIAGEN)

Cuenta con sitio múltiple de clonado y codones de stop traducionales en todos los marcos abiertos de lectura para la preparación de construcciones de expresión apropiadas. Dos terminadores transcripcionales fuertes t_0 (del fago λ) y T1 del *rrnB* del operón de *E. coli*, evita el *read-through* en la transcripción y asegura la estabilidad de la construcción de expresión. El gen de β -lactamasa (*bla*) le confiere resistencia a ampicilina 100 μ g/mL [38].

5.1.3 ENDONUCLEASAS de RESTRICCION

Se utilizaron las enzimas Sac I y Pst I de *New England Biolabs*, además del isoesquisómero de Sac I (Sst I) de la marca *SBS*. También las enzimas Bcl I y Sal I de la marca *Fermentas* y Bcl I de la marca *Promega*.

Los buffer utilizados fueron, buffer TANGO 10X y buffer G 10X de la marca *Fermentas*; buffer NEB 1 10X, NEB 3 10X y NEB 4 10X de la marca *New England Biolabs* y buffer L (Sst I) 10X de la marca *SBS Genetech*.

Las características de cada una de las enzimas y de los buffers se encuentran disponibles en los catálogos correspondientes a cada uno de los fabricantes.

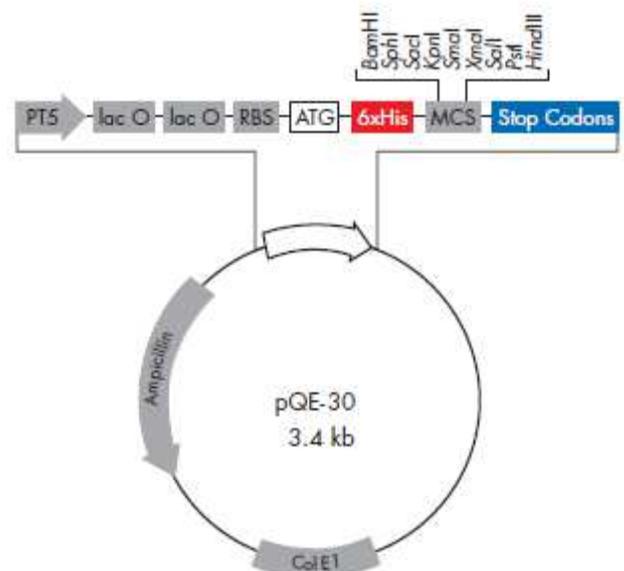


Figura 10- Mapa del vector pQE-30 con *tag* de histidinas en el extremo N-terminal. **PT5**: promotor T5, **lac O**: operador *lac*, **RBS**: sitio de unión al ribosoma, **ATG**: codón de inicio, **6xHis**: secuencia de *tag* con 6 histidinas, **MCS**: sitio múltiple de clonado con sitios de restricción indicados, **Stop Codons**: codones stop en los tres marcos abiertos de lectura, **Col E1**: origen de replicación Col E1, **Ampicilina**: gen de resistencia a ampicilina, **lacI^q**: gen represor lacI^q.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 ESTERILIZACIÓN de MATERIALES

Autoclavado

La esterilización de los materiales se llevó a cabo a través del método de autoclavado, a 1atm de presión durante 20min.

5.2.2 PREPARACIÓN de BACTERIAS

Preparación de células competentes

En primer lugar se hace un precultivo de las células que se desean volver competentes, inoculando un tubo de medio LB junto con el antibiótico de selección correspondiente en la concentración que corresponda. Este precultivo se incuba a 37°C con agitación por no más de 16hs (*over night* - o.n). A partir de dicho precultivo se diluye el cultivo 1/100 agregando 2,5mL de precultivo en 250mL de medio LB. Se incuba a 37°C con agitación hasta que su densidad óptica a 600nm ($O.D_{600nm}$) alcance un valor próximo a 0,3. A dicha $O.D_{600nm}$, se centrifuga a 5000rpm durante 10min a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación se descarta el sobrenadante (lo máximo posible) y manipulando en hielo desde este momento hasta terminar el procedimiento; se lava el precipitado con 100mL de $CaCl_2$ 0,1M, agregando primero 20mL, resuspendiendo agitando sobre agua-hielo y después agregando el resto. Nuevamente se centrifuga 10min a 5000rpm a 4°C. Se descarta el sobrenadante (lo máximo posible) y una vez más se lava con 100mL de $CaCl_2$ 0,1M, como se hizo anteriormente. Se incuba 1h a 4°C y cumplido este tiempo se centrifuga una vez más a 5000rpm durante 10min a 4°C. El precipitado se resuspende con 3mL de $CaCl_2$ 1M + 20% de glicerol. Se fracciona en alícuotas en *ependorffs* pre-enfriados en volúmenes de 50µL.

Transformación de células competentes

A partir de células competentes conservadas a -80°C, se toma una alícuota de 50µL. La misma se coloca en hielo durante 5min junto con aproximadamente 2µL de plásmido. Transcurrido este tiempo se coloca en un baño a 42°C durante 90s y posteriormente nuevamente 5min en hielo. A continuación se agrega 1mL de medio LB y se incuba con agitación durante 1h. Finalmente se plaquea con rastrillo en medio selectivo (en todos los casos medio LB agar con ampicilina en concentración 100µg/mL) una alícuota de entre 100 a 200µL.

Transformación rápida de células

Se realiza un precultivo de las células que se desean transformar conservadas a -80°C, inoculando de forma aséptica un tubo de precultivo de 3mL de medio LB e incubándolo a 37°C con agitación por no más de 16hs (o.n) A partir de este precultivo o.n se inocula con 100µL del mismo 10mL de medio LB, y se incuba con agitación a 37°C durante 3hs. Cumplido este tiempo se centrifuga 1mL del cultivo durante 2min a 5000rpm. El precipitado

se lava con 500µL de CaCl₂ 0,1M a baja temperatura y estéril. Posteriormente se resuspende el precipitado en 100µL del CaCl₂ 0,1M y se adiciona entre 2 a 4µL del plásmido con el que se desea transformar. Se incuba durante 1h en hielo y seguido se lleva primero por 90s a un baño a 42°C y luego por 90s más en hielo. Se agrega 500µL de medio LB y se incuba con agitación a 37°C durante 1h.

Una alícuota de no más de 200µL es plaqueada en placas selectivas de medio LB agar y ampicilina en concentración final de 100µg/mL.

5.2.3 AMPLIFICACIÓN y ANÁLISIS de ADN

Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala: Lisis alcalina

A partir de un precultivo o.n de las células transformadas con el plásmido que se desea extraer, se precipitan las células de 3mL en un *ependorff*, centrifugando 2min a 10.000rpm. Se descarta sobrenadante, quitando resto con pipeta. En todo momento manipulando en hielo; dicho precipitado se resuspende en 300µL de Solución I (ver Anexo) y se le agrega 3µL de ARNasa 10mg/mL. Posteriormente se adiciona 300µL de Solución II (ver Anexo) y se mezcla por inversión no más de 5 veces. Finalmente se agrega 300µL de Solución III (ver Anexo) y se invierte varias veces hasta detectar precipitado blanco. Se centrifuga a 12.000g durante 10min a temperatura ambiente y una vez finalizada ésta se recupera el sobrenadante y se añade 0,8 volúmenes de isopropanol ppa. Nuevamente se centrifuga a 12.000g si es posible a 4°C si no a temperatura ambiente, durante 30min. El sobrenadante es eliminado (quitando restos con pipeta) y el pellet se lava con aproximadamente 600µL de etanol 70% centrifugando 5min a 10.000rpm. Finalizado esto se descarta el etanol, se lleva a cabo un pequeño *spin*, eliminando resto de etanol con pipeta y se deja secar el precipitado, entre 10 y 15min. Una vez no se detecta rastros de etanol, el precipitado se resuspende en un volumen de 30µL de agua miliQ.

Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala: Kit Comercial

Dicha extracción se basa en el método de extracción mediante lisis alcalina, utilizando el *QIAGEN Plasmid Mini Kit (25)* cat # 12123; siguiendo el protocolo que lo acompaña.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa 0,8%

Se pesa la cantidad de agarosa (0,4g), se agrega el buffer TAE1X (50mL) correspondientes y se funden a baño maría o en microondas hasta la homogeneidad. Luego se adiciona 3µL de bromuro de etidio (BrEt) 10mg/mL, en 50mL. Se deja gelificar en molde correspondiente. Las muestras se cargan con buffer de carga 6X y el marcador utilizado fue el *12kB DNA Ladder*. cat #201115, *Stratagene*. Todas las muestras se corrieron a 100mV. La visualización se realiza en un transiluminador de luz UV.

Precipitación con acetato de sodio

A un volumen de solución de ácidos nucleicos se adiciona 0,3M final de acetato de sodio pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incuba 15min en hielo, y se centrifuga durante 20min a máxima velocidad (si el volumen supera los 0,5mL la centrifugación se efectúa por 30min). Se descarta el sobrenadante y el precipitado se lava con aproximadamente 600µL de etanol 70% frío, centrifugando 5min a 10.000rpm. Nuevamente se descarta el sobrenadante, retirando resto con pipeta. Se deja secar y se resuspende en agua miliQ.

Digestión con enzimas de restricción

Digestión simple en pQE30®

Protocolo (A)

Se coloca aproximadamente 200ng de plásmido, 2µL de Buffer Tango 10X (*Fermentas*), según corresponda 2 unidades de Bam HI (*Biolabs*) o 3 unidades de Sac I (*Biolabs*), y agua calidad miliQ, hasta alcanzar un volumen final de 20µL. Se incuba durante 1h a 37°C.

Protocolo (B)

Se coloca a digerir aproximadamente 100ng de plásmido, 2µL de Buffer Tango 10X *Fermentas*, según corresponda 1 unidad de la enzima de restricción Bam HI (*Biolabs*) o 2 unidades de la enzima de restricción Sac I (*Biolabs*) y agua miliQ hasta alcanzar el volumen final de 20 µL. Se incuba 1h a 37°C.

Digestión doble en pQE30®

La digestión doble se lleva a cabo en un primer momento como dos digestiones simples (*Protocolo-(B)*) de volumen final 20µL. Cada digestión simple se realiza colocan en un *epENDORF* aproximadamente 200ng de plásmido con 2µL de Buffer Tango 10X *Fermentas*, según corresponda se adiciona 2 unidades de enzima de restricción Bam HI (*Biolabs*) o 4 unidades de la enzima de restricción Sac I (*Biolabs*) y agua calidad miliQ hasta alcanzar el volumen final. Transcurridos 30min de iniciadas las reacciones a 37°C se toman una alícuota de 4µL de reacción, que constituirán el control de digestión, y se corren en un gel de agarosa al 0,8% a 100mV.

Al resto de la mezclas de reacción se agregan en un único *epENDORFF* y se deja reaccionar 30min más a 37°C.

Digestión simple en pGEM-SODh1-wild type y pGEM-SODh1-G93A

Protocolo-(A)

En un volumen final de 20µL se coloca aproximadamente 100ng de ADN plasmídico, 2 unidades de la enzima correspondiente (Bcl I (*Fermentas*) o Sac I (*Biolabs*)), 2µL de buffer Tango 10X y agua calidad miliQ, hasta completar volumen. Las digestiones son llevadas a cabo durante 1h a 37°C las digestiones correspondientes a Sac I, mientras que las digestiones con Bcl I son llevadas a cabo a 55°C.

Protocolo-(B´)

En un volumen final de 20µL se coloca aproximadamente 100ng de ADN plasmídico, 1 unidad de la enzima Bcl I (*Fermentas* - Promega), 4 µL de buffer Tango 10X si la enzima que se utiliza es *Fermentas* o 2µL de buffer Tango 10X si la que se utiliza es *Promega* y agua calidad miliQ, hasta completar el volumen. Las digestiones son llevadas a cabo durante 1h a 55°C.

Protocolo-(C´)

En un volumen final de 20µL se coloca aproximadamente 200ng de ADN plasmídico, 1 unidad Bcl I (*Fermentas*), 2 µL Buffer G 10X (*Fermentas*) o 4 µL buffer Tango 10X. Las digestiones son llevadas a cabo durante 1h a 55°C.

Protocolo-(D´)

En un volumen final de 20µL se coloca aproximadamente 100-200ng de ADN plasmídico, 2 unidades de Sst I (*SBS*), o 1 unidad de endonucleasa Bcl I (según corresponda), 2µL de buffer L (*SBS*) , se adiciona únicamente a las digestiones simples con Bcl I 50mM de NaCl y agua calidad miliQ hasta completar volumen. Las dos digestiones toman 1h, a 37°C en el caso de Sac I (Sst I) o 55°C para digestiones con Bcl I.

Digestión doble en pGEM-SODh1-wild type y pGEM-SODh1-G93A

La digestión doble se lleva a cabo en un primer momento como una digestión simple de volumen final 20µL. Se coloca a reacción aproximadamente 500ng de ADN plasmídico. En la digestión con Sst I se adiciona 3 unidades (isoesquisómero de la endonucleasa Sac I, de marca *SBS*) con 2µL de Buffer Tango 10X *Fermentas*, y agua calidad miliQ hasta completar el volumen. Se incubó 1h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se guardó una alícuota de 5µL (constituirá el control acerca de la digestión por Sst I), y a los 15µL restante se le adicionó 2 unidades de Bcl I (*Fermentas*), 4 µL de buffer Tango 10X y agua miliQ hasta un volumen final de 30µL. Esta preparación final permaneció 1,5 hs a 50°C.

Digestión simple en pET-22b(+)

En un volumen final 20µL se coloca aproximadamente 100-200ng de ADN plasmídico, 2 unidades de la enzima de restricción a utilizar (Sal I, Pst I o Sst I), 2µL de Buffer NEB 3 10X o 2µL de Buffer NEB 1 10X (según el que se vaya a utilizar) y agua miliQ hasta completar volumen. Las digestiones tuvieron lugar durante 1h a 37°C.

Secuenciación

Para la secuenciación del ADN se utiliza el servicio que ofrece la unidad de Biología Molecular del *Institut Pasteur de Montevideo*. A partir de los primers T7 se obtuvo el cromatograma del plasmido pET3d. La depuración de los cromatogramas y los distintos alineamientos fueron realizados empleando herramientas informáticas y el programa *Bioedit*.

5.2.4 EXPRESIÓN y ANÁLISIS de PROTEÍNA

Expresión de proteínas (protocolo basado en Crow-Beckman)

Se prepara un precultivo inoculando un tubo de 3mL de medio LB y ampicilina en concentración final de 100µg/mL con una colonia de las células que se desean expresar. El tubo es incubado a 37°C con agitación por no más de 16hs (o.n). A un matraz de 50mL de medio LB se agrega 50µL de ampicilina 100mg/mL y 50µL del precultivo o.n y se incuba a 37°C con agitación durante 3hs. Transcurrido este tiempo se determina su densidad óptica a 600nm (O.D_{600nm}). Cuando la O.D_{600nm} alcanza un valor aproximado de 0,6 se toma una alícuota de 1mL de cultivo y precipitan las células centrifugando a 10.000rpm durante 3min y se conservan las células a -20°C. Al resto de cultivo se adiciona 50µL de IPTG 1M, 50µL de ZnCl₂ 0,1M y 50µL de CuSO₄ 0,05M para la inducción, y se incuba a la temperatura deseada de inducción de la expresión, con agitación. Pasadas las horas deseadas desde la inducción se precipitan las células de 1mL de cultivo de inducción (igual que en el paso anterior), mientras que el resto de cultivo se centrifuga 3min a 10.000rpm y se conserva el precipitado a -20°C.

Fraccionamiento celular, obtención de fracción soluble e insoluble (según J. M. Betton)

Se transfieren 6mL de precultivo celular de DO_{600nm}= 1,5 (o alternativamente el volumen equivalente a dicha cantidad de células) a un tubo de centrifuga para centrifugar durante 10min a 4°C a una velocidad de 3500 rpm. El precipitado resultante se seca sobre papel y este, se resuspende a 4°C en 0,45mL de Tris-HCl pH 8,0 20mM (es decir, en una equivalencia de 5mL de solución Tris-HCl pH 8,0 20 mM por gramo de sedimento). Se adiciona 50µL de lisozima fresca 2mg/mL en EDTA 0,1M pH 8,0. Se sonica con *microtip* con 60% de amplitud 5 o 6 veces durante 20s, realizando descansos de 1min, entre cada sonicado.

Una vez finalizado El sonicado se centrifuga a 14000rpm, en tanto el sobrenadante resultante es la *fracción soluble*.

Por otra parte, el precipitado se lava, cuidadosamente, en 0,45mL de Tris-HCl pH 8,0 20mM. El mismo se centrifuga a 14000rpm durante 20min. El precipitado resultante se resuspende en 500µL de urea 8M, constituyendo la *fracción insoluble*.

En cada caso 15µL de muestra, junto con 5µL de buffer de muestra SB 4X son llevados a 100°C durante 5min. Luego se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15% (SDS-PAGE) preparado según indica el protocolo en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et.al*, 1987), corriendo a 60mV el gel concentrador y a 100mV el gel separador. El marcador de peso molecular utilizado en estos es el *Unstained Protein Ladder*. #SMO431, Fermentas.

El teñido se llevó a cabo con el método rápido, siguiendo el protocolo en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et.al*, 1987), con *Azul brillante R de Coomassie*.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en una dimensión

La electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) se realiza según el protocolo descrito en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et.al*, 1987). Para las células BL21 Star™(DE3), cada precipitado correspondiente a 1mL de cultivo se resuspende en 50µL de buffer de muestra SB 4X y posteriormente se colocan a 100°C por 5min.

Se siembran 20µL de muestra. La corrida se realiza a corriente constante. Se corrió con un voltaje de 60mV las muestras a través del gel concentrador y con un voltaje de 100mV a través del gel separador. El marcador de peso molecular utilizado en la corrida es el *Prestained Protein Ladder*. #SMO441, *Fermentas*.

Una vez más el teñido del mismo se realizó siguiendo el método rápido, de acuerdo al protocolo descrito en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et.al*, 1987), con *Azul brillante R de Coomassie*.

Dot-Blot

Los precipitados restantes de las células inducidas durante 3h, se resuspenden en 2mL de buffer de lisis. En una membrana Hybond™-C Extra Amersham, *Bioscience* se sembró entre 1 y 3µL de lisado. Luego se bloqueó con buffer de bloqueo (TBS-T + BSA al 3%). El anticuerpo primario utilizado fue policlonal de conejo anti SOD humana, en una dilución 1/200. El anticuerpo secundario fue anti-rabbit-Fosfatasa alcalina (*Santa Cruz*), utilizado en una dilución 1/5000. Todas las diluciones se realizan adicionando solución de bloqueo.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario por 1h y se realizó 3 lavados de 5min cada uno con buffer de lavado TBS-T. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario, que igualmente se incubó por 1h y se lavó 3 veces de 5min cada uno.

Se lleva a cabo un revelado cromogénico adicionando 33µL del sustrato NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) junto con 16,5µL de BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) en 5mL de buffer fosfato alcalino. La combinación origina un precipitado negro púrpura muy intenso con mucha mayor sensibilidad que cualquiera de ambos sustratos por separado.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

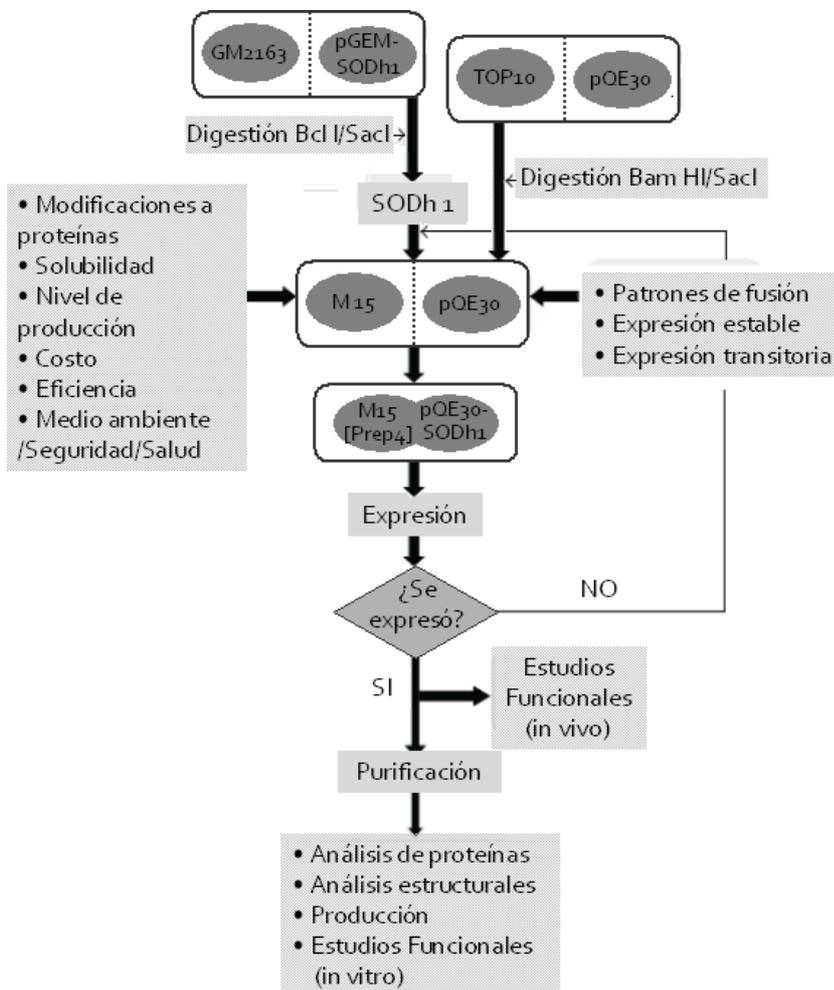


Figura 11- Diagrama de flujo que indica diseño estratégico. Modificado de Figura 6 [20].

El objetivo de este trabajo es el subclonado de la secuencia codificante de la superóxido dismutasa humana 1, la puesta a punto de su expresión y análisis de solubilidad. La estrategia experimental, se muestra de forma esquemática en la *Figura 11*.

Como punto de partida, se encontraba la secuencia codificante de SODh1 inserta tanto en el vector pGEM-T Easy como en el vector pET-3d. La misma se encontraba flanqueada por los sitios de restricción de las enzimas Bcl I y Sac I en el extremo 5' y 3' respectivamente, en los dos vectores. El vector pGEM-T, como se indica en la *sección Materiales y Métodos*, es un plásmido de clonado de productos de PCR, que permite su selección confiriendo resistencia a

ampicilina a la cepa transformada. El segundo es un plásmido de expresión, bajo control del promotor fuerte de T7, que permite la selección en un medio con ampicilina y adicionalmente por las características del plásmido añade el T7-tag al extremo N-terminal del inserto (el cual no se hace uso del mismo en este trabajo).

A partir del plásmido de propagación pGEM-SODh1, se prete liberar el inserto a partir de una doble digestión con Bcl I y Sac I; para luego subclonarlo en el plásmido de expresión pQE30®, previamente digerido con las enzimas BamHI y Sac I (*Figura 12*).

El interés en el subclonado en este plásmido de expresión radica en que el tag de histidinas que proporciona al extremo N-terminal de la proteína recombinante resulta muy útil a la hora de su purificación, ya que pueden hacerse bajo condiciones fuertemente desnaturizantes; hecho que resulta beneficioso cuando la proteína se acumula en cuerpos de inclusión. Muchas veces, la proteína puede luego “renaturalizarse” removiendo el agente desnaturizante [46].

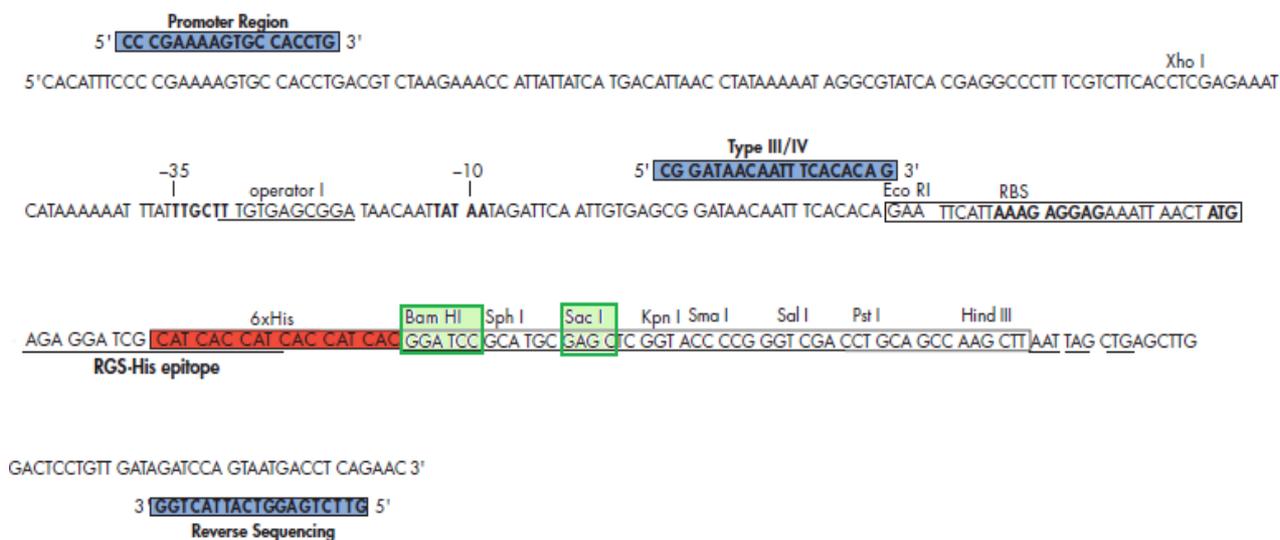


Figura 12- Región de clonado y sitios de unión de primers de secuenciación de los vectores de expresión pQE® del sistema *The QIAexpressionist™*.

El tag 6XHis a pH fisiológico no se encuentra cargado, por lo que varios trabajos publicados proponen que este tag no interfiere con la actividad de la proteína, ni en su secreción y es poco inmunogénico, por tanto, permite el uso de la proteína de fusión sin necesidad de remover este tag [45,47,48].

La construcción con el 6XHis-tag en el extremo N-terminal de la proteína obliga a ligar el inserto en el correcto marco abierto de lectura en el extremo 5' (ver *Figura 12*). El vector pQE30® se debe digerir con la enzima de restricción BamHI la que genera un corte compatible con el corte generado por la enzima de restricción Bcl I, y con Sac I.

Una vez purificados el inserto y el plásmido apropiadamente digeridos con las enzimas, se procederá al clonado direccional ligando la secuencia codificante de SODh1 w-t y SODh1 G93A al vector pQE30® (lineal). El subclonado será verificado por digestión con enzimas de restricción, y aquellos clones que presenten el patrón adecuado de digestión serán secuenciados.

Luego de transformar la cepa de *E coli* de expresión con el plásmido recombinante, se continuará con la expresión. La misma se realizará basándose en lo recomendado por el manual *The QIAexpressionist™* y luego procediendo con el correspondiente análisis en SDS-PAGE.

El paso final será la purificación a través del 6XHis-tag de la SODh1 de tipo salvaje y SODh1 G93A, según el protocolo administrado por dicho manual.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Preparación del vector pQE30®

Se transformó *E.coli* la cepa TOP10 según el protocolo de *Materiales y Métodos* con el vector pQE30® para lograr su propagación. La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de un precultivo de 3mL o.n, mediante el método de *Lisis Alcalina*. El ADN obtenido en la preparación se resuspendió en 30mL de agua miliQ. La estimación de la concentración de cada minipreparación se realizó comparando la intensidad de su banda electroforética de corrida con la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular.

En las *Figuras 13 - (A), 14 - (A) y 15 - (A)* se muestran las corridas electroforéticas de alícuotas de dichas preparaciones. En las mismas se visualizan básicamente dos bandas, una banda a la altura de 4000pb que trata del plásmido relajado y otra a la altura de 2000pb que corresponde al plásmido superenrollado. En algunas de estas corridas también se puede observar la presencia de bandas de tamaño superior, que corresponde a estructuras de mayor peso molecular, probablemente multímeros ya que se observan como bandas discretas, y ADN crómico el cual no penetra en el gel y se observa en el pocillo. Estas últimas son impurezas de las preparaciones plasmídicas. Se descarta la presencia de ARN ya que a la hora de llevarse a cabo las preparaciones se adicionó RNAsa A.

Para la linearización del vector de expresión pQE30®, en una primera instancia se ensayaron digestiones simples con las enzimas Bam HI y Sac I, siguiendo el *Protocolo-(A)*, donde se utiliza ADN plasmídico pQE30® extraído por lisis alcalina (*Figura 13 - (A)*).

Las *Figuras 13 – (B)(C)*, muestran dichas digestiones simples, realizadas a 37°C como se recomienda para ambas enzimas.

En ambas digestiones con SacI se observa una banda del tamaño esperado (el tamaño del plásmido pQE30® es de 3400pb) y la desaparición de las bandas que corresponden a la conformación superenrollada, relajada y multímeros. Pero también se observa en el perfil una zona más tenue y difusa en todo el carril hacia el frente de corrida que seguramente corresponde a una degradación parcial del plásmido. En tanto en la digestión con Bam HI se degrada completamente el ADN plasmídico. La enzima Bam HI en condiciones de: baja fuerza iónica, en buffer Tango (*Fermentas*) 1X, alta concentración de enzima, alta concentración de glicerol o en soluciones de pH > 8.0, presenta *Star activity*. La misma, se trata de una alteración en la actividad de la enzima de restricción, donde ésta corta el ADN inespecíficamente. Esto permitió observar que el exceso de enzima de restricción no favorece necesariamente la digestión.

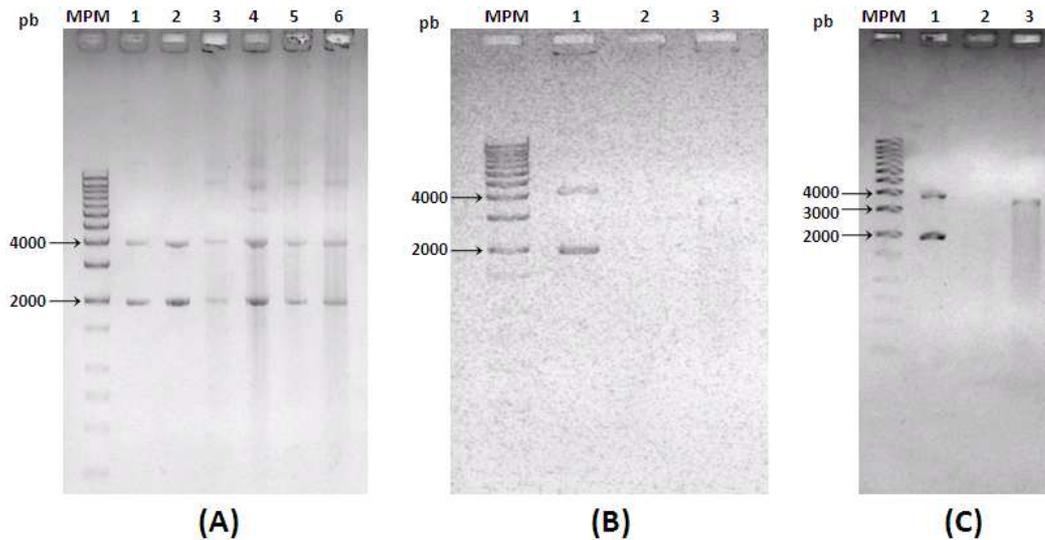


Figura 13- Análisis de la extracción de pQE30® por lisis alcalina y digestión con Bam HI y Sac I (*Protocolo-(A)*), en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de ADN plasmídico. En *carriles 1 y 2*: plásmido pGEM con la secuencia de SODh1 de tipo salvaje (*wild type*; w-t: pGEM-SODh1-wt). En *3 y 4*: plásmido pGEM con la secuencia de SODh1 con la mutación G93A (pGEM-SODh1-G93A). En *5 y 6*: pQE30®. **(B)** Digestiones simples con *Protocolo-(A)* del ADN plasmídico correspondiente a la extracción corrida en el *carril 5* *Figuras 13 – (A)*. En *carril 1*: pQE30® sin digerir. En *2*: digestión de pQE30® con Bam HI. En *3*: digestión pQE30® con Sac I. **(C)** Digestiones simples con *Protocolo-(A)* del ADN plasmídico correspondiente a la extracción corrida en el *carril 6* *Figuras 13 – (A)*. En *carril 1*: vector pQE30® sin digerir. En *2*: digestión de pQE30® con Bam HI. En *3*: digestión de pQE30® con Sac I. **MPM**: Marcador de peso molecular 12kb DNA Ladder. Stratagene.

Por tal razón se repitió la reacción de digestión del ADN en condiciones similares, pero reduciendo la cantidad de Bam HI a 1 unidad de la enzima; en tanto de Sac I se adicionó 2 unidades (*Protocolo-(B)*).

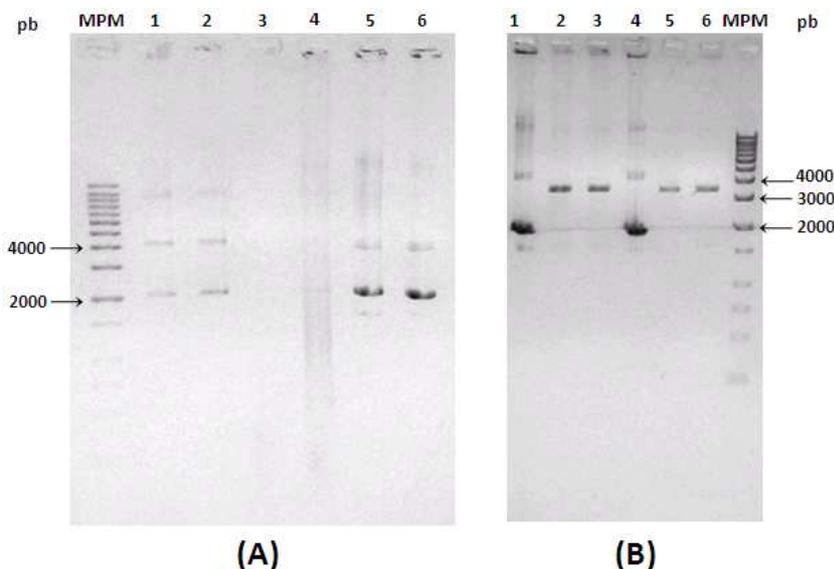


Figura 14- Análisis de la extracción de pQE30® por lisis alcalina y su digestión con Bam HI y Sac I utilizando el *Protocolo-(B)*, en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de ADN plasmídico. *1 y 2*: pGEM-SODh1-wt. *3 y 4*: pGEM-SODh1-G93A. *5 y 6*: pQE30®. **(B)** Control de digestión. *1*: pQE30® sin digerir. *2*: digestión de pQE30® con Sac I, *Protocolo-(B)*. *3*: digestión pQE30® con BamHI, *Protocolo-(B)*. *4*: pQE30® sin digerir. *5*: digestión de pQE30® con Sac I, *Protocolo-(B)*. *6*: digestión de pQE30® con Bam HI, *Protocolo-(B)*. **MPM**: Marcador de peso molecular 12 kb DNA Ladder, Stratagene.

A partir del ADN plasmídico purificado por lisis alcalina, que se visualiza en la *Figura 14 - (A) carril 5 y carril 6* (en tal orden), se realizaron los controles de digestión con BamHI y SacI,

El resultado se muestra en la *Figura 14 - (B)*, donde se observa tanto para la digestión con Sac I y Bam HI la banda de tamaño esperado (aproximadamente 3500pb), sin la degradación parcial que se observaba en la *Figura 13 - (C)*.

Este mismo protocolo de digestión simple es el que se empleará en la doble digestión del pQE30®.

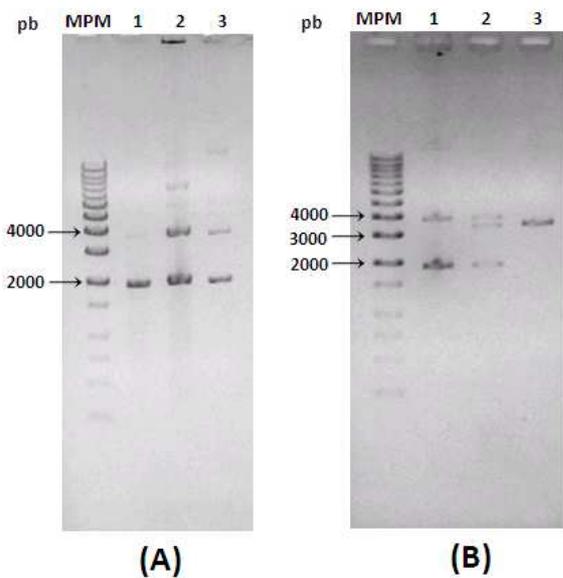


Figura 15- Análisis de la extracción de pQE30® a través de *QIAGEN Plasmid Mini Kit* comercial y su digestión de con Bam HI y Sac I, visualizadas en gels de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de ADN plasmídico . En *carril 1*: pGEM-SODh1-wt. En *2*: pGEM-SODh1-G93A. En *3*: pQE30®. **(B)** Control a los 30 minutos de iniciadas las digestiones simples. En *carril 1*: pQE30® sin digerir. En *2*: digestión simple de pQE30® con Bam HI a los 30 minutos. En *3*: digestión simple de pQE30® con Sac I a los 30 minutos.
MPM: Marcador de peso molecular 12kb DNA Ladder. Stratagene.

A partir del ADN plasmídico purificado utilizando el kit *QIAGEN Plasmid Mini Kit*, (*Figura 15 - (A) carril 3*), se realizó la doble digestión de pQE30®.

Para ello, primero se hicieron digestiones simples. A los 30min de iniciadas las reacciones, se tomaron alícuotas para analizarlas por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y que se muestra en la *Figura 15 - (B)*.

La digestión simple con la endonucleasa Sac I, parece ser completa, ya que se ve una única banda de tamaño esperado. El perfil electroforético aparece sin degradación parcial del ADN.

En tanto la digestión simple de pQE30® con BamHI es incompleta, ya que se observa la banda de plásmido lineal y las bandas de plásmido sin digerir. Cuando se mezclen ambas reacciones es de esperar que las digestiones con Bam HI y Sac I se completen y se obtenga como resultado el plásmido pQE30® digerido con ambas

enzimas de restricción, ya que ambas reacciones tienen lugar en el mismo buffer.

Finalizados los 30min restantes de doble digestión, se procede a purificar el plásmido digerido con ambas enzimas, a través de la precipitación con acetato de sodio y etanol. Éste procedimiento evita la precipitación de fragmentos pequeños de ADN. Luego se lavó el precipitado con etanol frío y resuspendió en agua miliQ

El hecho que se utilizara acetato de sodio no influiría en la posterior etapa de ligación.

7.2 Preparación del inserto conteniendo las secuencias codificante de SODh1 de tipo salvaje y mutante G93A

Para la preparación de los insertos codificantes de SODh1 de tipo salvaje y con la mutación G93A, se realizaron las digestiones simples con las enzimas de restricción Bcl I (*Fermentas*) y Sac I (*Biolabs*) de los plásmidos de propagación pGEM-SODh1-wt y el pGEM-SODh1-G93A. Para ello, en primera instancia se transformó *E.coli* GM2163 con

dichos plásmidos, y se recuperaron a través del método *Lisis Alcalina*. Esto se muestra en la Figura 14 - (A) y la Figura 16 - (A). El pGEM-T Easy™ es un vector de propagación de 3015pb. El inserto tiene 500pb. En las figuras se observan las bandas de plásmido superenrollado y relajado a la altura de las bandas de 2000pb y 4000pb (respectivamente) según el marcador de peso molecular de *12kB DNA Ladder*. El cálculo de la concentración de cada una de las preparaciones se realizó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular.

Se comenzó por el *Protocolo-(A´)* de digestión simple. Se llevaron a cabo paralelamente las reacciones correspondientes al: ADN plasmídico de pGEM-SODh1-wt de la Figura 14 - (A) y el ADN plasmídico de pGEM-SODh1-G93A de la Figura 16 - (A).

Las digestiones con Sac I se sucedieron durante 1 hora a 37°C, mientras que las digestiones con Bcl I tuvieron lugar el mismo periodo de tiempo pero a 55°C, que es la temperatura óptima de digestión de la enzima. Los resultados se muestran en la Figura 16-(B).

Se puede observar que en las tres digestiones de los vectores con Sac I se obtiene una banda de tamaño esperado, aunque también se observa que tuvo lugar una pequeña degradación parcial (un poco más pronunciada para la digestión correspondiente al vector pGEM-SODh1-wt de la Figura 14 - (A) carril 1). En el caso de las digestiones con Bcl I la degradación es total.

La enzima Bcl I que presenta ciertas características, es bloqueada por la metilación *dam* (de allí el uso de la cepa *E.coli* GM2163), muestra *star activity* cuando se encuentra en alta concentración y en reacciones con buffer Tango 1X. Por ello, y dadas estas particularidades, es posible que haya tenido lugar *star activity*.

Así es que, en una segunda instancia (*Protocolo-(B´)*) se realizaron nuevamente digestiones con Bcl I del ADN plasmídico adicionando 1 unidad de la enzima, en lugar de las 2 unidades que se habían adicionado en el *Protocolo-(A´)*.

Asimismo, se probaron dos enzimas de distinta marca, *Promega* en buffer Tango 2X, y *Fermentas* en buffer Tango 1X. Todas las reacciones se realizaron durante 1 hora a 55°C. Los resultados se muestran en la Figura 16 - (C).

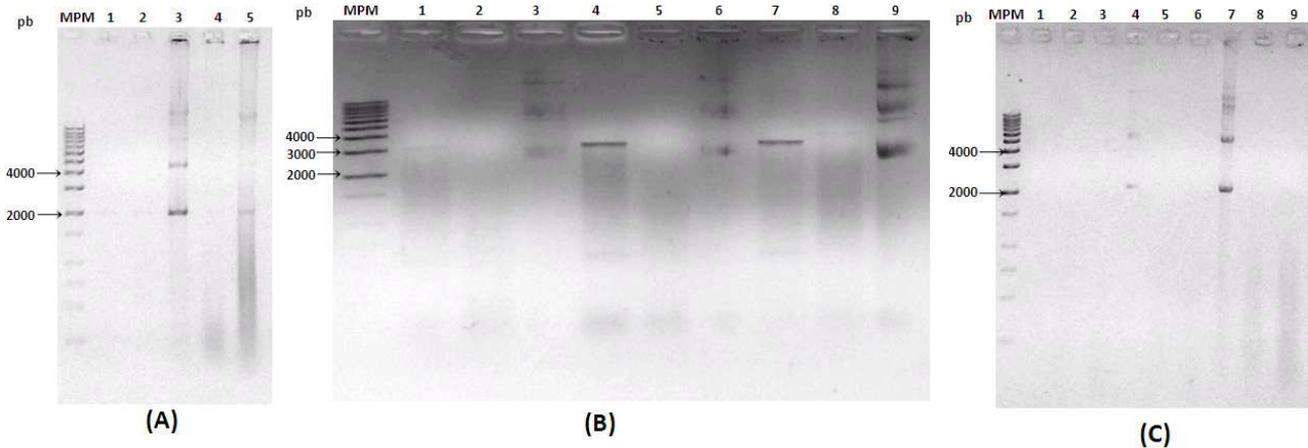


Figura 16- Análisis de la extracción de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A por lisis alcalina y digestión con Bcl I y Sac I a través utilizando el *Protocolo-(A)* y *(B)*, mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de pGEM-SODh1-G93A, en todos los carriles. **(B)** Digestiones simples con Bcl I y Sac I *Protocolo-(A)* de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A. En carril 1: pGEM-SODh1-wt con Sac I. En 2: pGEM-SODh1-wt con Bcl I. En 3: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 4: pGEM-SODh1-wt con Sac I. En 5: pGEM-SODh1-wt con Bcl I. En 6: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 7: pGEM-SODh1-G93A con Sac I. En 8: pGEM-SODh1-G93A con Bcl I. En 9: pGEM-SODh1-G93A sin digerir. **(C)** Digestión con Bcl I de las marcas *Promega* y *Fermentas* de los vectores pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A, con *Protocolo-(B)*. En los carriles 1 y 4: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 7: pGEM-SODh1-G93A sin digerir. En 2,5 y 8: digestiones con Bcl I (*Promega*) en buffer Tango 2X, de los vectores en el orden en que fueron expuestos previamente. En 3, 6 y 9: digestiones con Bcl I (*Fermentas*) en buffer Tango 1X, en el orden antedicho.

MPPM: Marcador de peso molecular 12kB DNA Ladder. *Stratagene*.

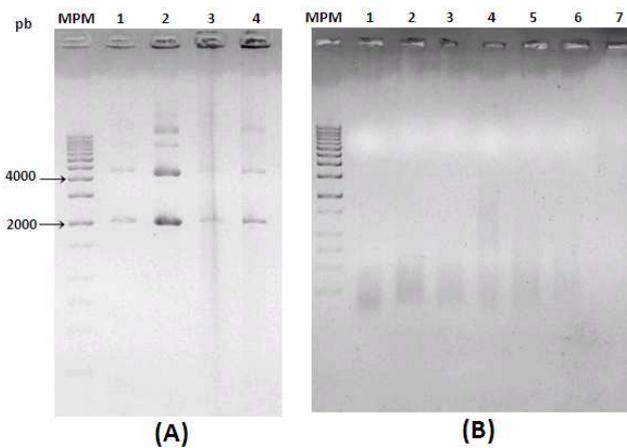


Figura 17- Análisis de la extracción de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A y su digestión con Bcl I a través del *Protocolo-(C)*, visualizadas en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A. En los carriles 1 y 2: pGEM-SODh1-wt. En 3 y 4: pGEM-SODh1-G93A. **(B)** Digestión con Bcl I (*Protocolo-(C)*) en buffer G y buffer Tango. En los carriles 1 y 4: pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A (respectivamente) digeridos en buffer G 1X. En 2 y 5: pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A (respectivamente) digeridos en buffer Tango 2X. En 3 y 6: controles de digestión de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A (respectivamente).

MPPM: Marcador de peso molecular 12kB DNA Ladder. *Stratagene*.

En ninguno de los casos se obtuvo una digestión satisfactoria. Por lo que se puede concluir que la falla en la digestión no está en la enzima utilizada, sino en las condiciones de reacción.

Por ello, se llevó adelante el *Protocolo-(C)*, donde las reacciones de los plásmidos pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A (*Figura 17 - (A)* carriles 2 y 4 purificados por lisis alcalina) se digirieron en Buffer G 1X (*Fermentas*) que es el buffer recomendado para la enzima, y en buffer Tango 2X, en ambos casos junto con 1 unidad Bcl I (*Fermentas*). Además se llevó a cabo un control de igual características, pero en ausencia de enzima. Todo se incubó 1 hora a 55°C. Los resultados, que se exhiben en la *Figura 17 - (B)*, mostraron una degradación total tanto en las digestiones en buffer G 1X, como en el buffer Tango 2X y en los controles.

Contrario a lo que se esperaba el ADN plasmídico fue degradado incluso en el control, que contaba únicamente de buffer Tango 2X, ADN plasmídico y agua miliQ. Esto indicaba claramente que el ADN no se degrada a causa de la enzima sino de algún elemento contaminante que se estaba co-purificando con el vector o que estaba presente en el agua o el buffer.

Con el propósito de identificar el origen de la degradación de los plásmidos se comprobó si en la solución de RNAsa utilizada en la purificación de los plásmidos había rastros de DNAsa. Esto había sido comprobado anteriormente, por lo que se descarta esta posibilidad.

Es sabido que la eficiencia de la reacción de la endonucleasa depende de la pureza del ADN. Algunas impurezas que puedan quedar presentes en las preparaciones de ADN disminuyen la eficiencia de reacción, debido a la presencia de DNAsas contaminantes que pueden producir una degradación inespecífica del ADN, o de otros contaminantes que pueden inhibir la reacción específica de las enzimas de restricción.

Considerando que el problema de la digestión ineficiente con la enzima de restricción podría ser debido a la insuficiente pureza del ADN, se procedió a la purificación del ADN plasmídico utilizando el kit comercial de purificación *QIAGEN Plasmid Mini Kit*, que se basa en el método de Lisis Alcalina tradicional, adicionando un paso de purificación por columna.

Se llevó a cabo dicho procedimiento de purificación del ADN y una alícuota se analizó por electroforesis en un gel de agarosa 0,8% (*Figura 18 - (A)*). Se puede observar que se obtienen preparaciones de mayor rendimiento. Su calidad se podrá analizar a partir de los controles que se realizaron con las siguientes digestiones, donde no se observó digestión inespecífica.

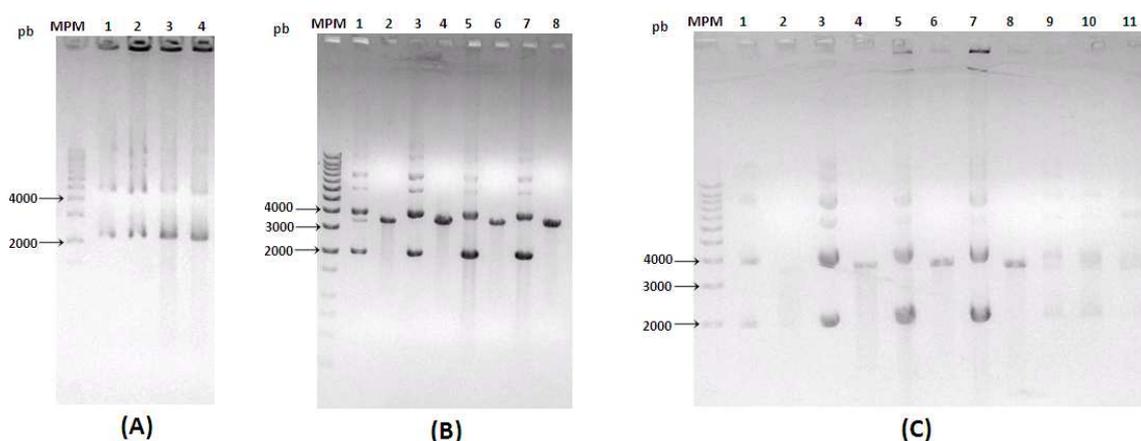


Figura 18-. Análisis de la preparación de plásmidos pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A extraídos por *QIAGEN Plasmid Mini Kit* comercial y su digestión con Bcl I, a través del *Protocolo-(C)*, visualizados en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Preparación pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A. En los carriles 1 y 2: pGEM-SODh1-wt. En 3 y 4: pGEM-SODh1-G93A. **(B)** Digestión con Bcl I (*Fermentas*) en buffer G 1X *Protocolo-(C)*. En los carriles 1 y 2: pGEM-SODh1-wt sin digerir y digerido, respectivamente. En 3 y 4: pGEM-SODh1-wt sin digerir y digerido, respectivamente. En 5 y 6: pGEM-SODh1-G93A sin digerir y digerido, respectivamente. En 7 y 8: pGEM-SODh1-G93A sin digerir y digerido, respectivamente. **(C)** Digestión con Bcl I en buffer Tango 2X *Protocolo-(C)*. En los carriles 1 y 2: pGEM-SODh1-wt sin digerir y digerido, respectivamente. En 3 y 4: pGEM-SODh1-wt sin digerir y digerido, respectivamente. En 5 y 6: pGEM-SODh1-G93A sin digerir y digerido, respectivamente. En 7 y 8: pGEM-SODh1-G93A sin digerir y digerido, respectivamente. En 9: control a 50°C de pGEM-SODh1-wt. En 10: a 50°C de pGEM-SODh1-G93A. En 11: control a t_{amb} de pGEM-SODh1-wt.

MPM: Marcador de peso molecular 12kb DNA Ladder, *Stratagene*.

Así es que con este ADN plasmídico se volvieron a repetir las digestiones simples en buffer G 1X y en buffer Tango 2X siguiendo el Protocolo-(C').

Las digestiones fueron realizadas durante 1 hora a 50°C, debido a que, a diferencia del resto de los fabricantes, *Fermentas* establece que la temperatura óptima es a 50°C. También se realizaron controles de iguales características, con buffer Tango 2X a la temperatura de reacción y a temperatura ambiente (t_{amb}). Los resultados de las digestiones con buffer G 1X se muestran en la *Figura 18 - (B)*.

Es posible advertir que en las digestiones con Bcl I de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A purificados con el *Kit QIAGEN*, en buffer G 1X se obtuvo una única banda de tamaño esperado (aproximadamente 3500pb). También se puede observar una muy pequeña degradación que también se encuentra en el plásmido sin digerir, por esta razón es probable que la misma no sea producto de la digestión enzimática sino que del proceso de preparación. En lo que concierne al perfil de bandas que se observa en el *carril 1*, correspondiente a pGEM-SODh1-wt sin digerir, es posible que corresponda mayoritariamente a las formas superenrollada y circular del plásmido, y a formas multiméricas, que al digerirse con la enzima de restricción dan una banda única del tamaño esperado (*carril 2*).

Así mismo en las digestiones con Bcl I de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A purificados con el *Kit QIAGEN*, en buffer Tango 2X (*Figura 18 - (C)*), si bien también se obtiene una banda de tamaño esperado, se puede notar que el rendimiento es claramente menor que las digestiones en buffer G 1X; junto con degradación parcial. En cuanto a los controles, si bien se pueden observar levemente las bandas correspondientes a los plásmidos relajado y superenrollado (a aproximadamente 4000pb y 2000pb, respectivamente) se puede apreciar que la intensidad de las bandas es mucho menor, si las comparamos con las bandas de los plásmidos sin digerir donde se ha sembrado la misma cantidad de ADN; tanto en los controles a 50°C como en aquellos a temperatura ambiente. Puede que haya sido un error de manipulación.

A fin de evaluar ambas digestiones se puede acordar que aquella llevada a cabo en buffer G 1X demostró una mayor eficiencia que aquella en buffer Tango 2X. El buffer G 1X cuenta con 10mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl y 0,1 mg/mL de BSA (seroalbúmina bovina); mientras que la composición del buffer Tango 1X es de 33mM Tris-acetato (pH 7,5 a 37°C), 10mM Mg-acetato, 66mM K-acetato y 0,1 mg/mL de BSA.

Se sabe que algunas endonucleasas son muy sensibles a la concentración de ion sodio o potasio; mientras prácticamente los dos buffers poseen el mismo pH, la diferencia radica en las concentraciones y en la naturaleza de las sales que poseen.

A partir de las preparaciones de ADN purificados con el kit *QIAGEN* mostrado en la *Figura 19 - (A)*, se intentó una doble digestión de prueba (*Protocolo digestión doble pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A*).

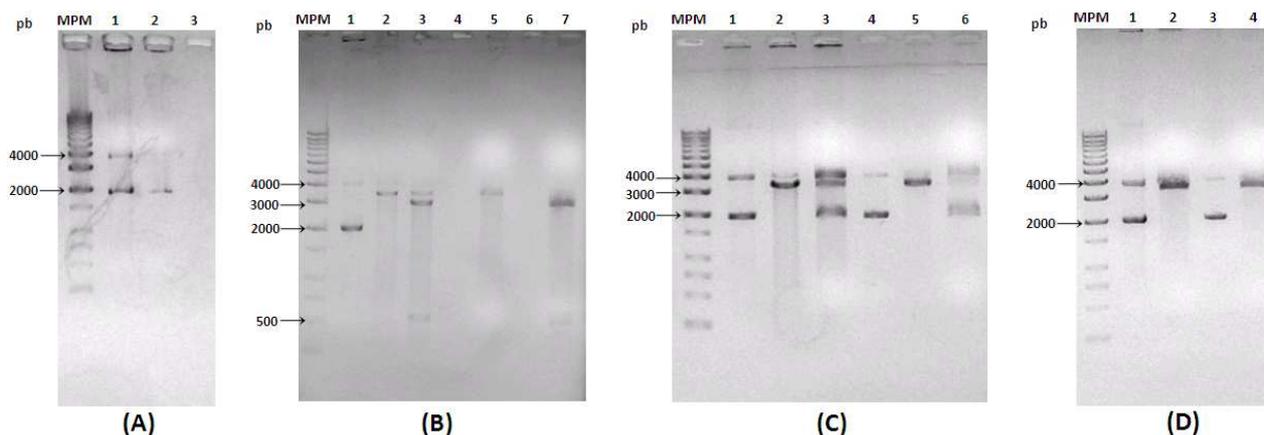


Figura 19.- Análisis de la extracción por *QIAGEN Plasmid Mini Kit* comercial de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A y su digestión con *Bcl I* y *Sst I*, visualizadas en geles de agarosa al 0,8%. (A) Minipreparación de ADN plasmídico. En *carril 1*: pGEM-SODh1-wt. En 2: pGEM-SODh1-G93A. **(B)** Digestiones simples con *Sst I* y dobles con *Sst I* y *Bcl I*. En *carril 1*: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 2: pGEM-SODh1-wt con *Sst I*. En 3: doble digestión de pGEM-SODh1-wt. En 5: pGEM-SODh1-G93A con *Sst I*. En 7: doble digestión de pGEM-SODh1-G93A. 4 y 6 vacíos. **(C)** Digestiones simples con *Sst I* y *Bcl I* en buffer Tango 1X y 2X, respectivamente. En *carril 1*: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 2: pGEM-SODh1-wt con *Sst I*. En 3: pGEM-SODh1-wt con *Bcl I*. En 4: pGEM-SODh1-G93A sin digerir. En 5: pGEM-SODh1-G93A con *Sst I*. En 6: pGEM-SODh1-G93A con *Bcl I*. **(D)** Dobles digestiones con *Sst I* y *Bcl I*. En *carril 1*: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 2: doble digestión pGEM-SODh1-wt. En 3: pGEM-SODh1-G93A sin digerir. En 4: doble digestión pGEM-SODh1-G93A.

MPM: Marcador de peso molecular 12kB DNA Ladder. Stratagene.

Los resultados se muestran en la *Figura 19 - (B)*. Es posible observar tanto para pGEM-SODh1-wt como para pGEM-SODh1-G93A *Sst I* logró digerir el ADN plasmídico, aunque con degradación parcial. En lo que respecta a las dobles digestiones de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A en ambos casos es posible notar que han sufrido degradación ya que poseen cuatro veces la cantidad de ADN sembrado en las digestiones simples y no se observa dicha diferencia.

No obstante, para los dos vectores se observa una banda clara de aproximadamente 4000pb, que concordaría con la banda de plásmido relajado; una banda a la altura de 3000pb que coincidiría con el tamaño del pGEM sin el inserto de SODh1. A la altura de las 500pb se visualiza una banda muy tenue, en ambas dobles digestiones (peso que tendría el inserto). Este resultado indicaría que durante la digestión parcial, se liberó el inserto de parte de las moléculas de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A.

En base a lo anterior se procedió a repetir el procedimiento y a realizar adicionalmente una digestión simple con 1 unidad de *Bcl I* en Buffer Tango 2X, en condiciones similares. Los resultados que se exponen en la *Figura 19 - (C)* son los de las digestiones simples, mientras en la *Figura 19 - (D)* los de las digestiones dobles. Si bien es posible observar que en ambas digestiones simples con *Bcl I* hay una leve banda de tamaño aproximado al del plásmido relajado (3015pb), en las digestiones dobles únicamente se observa dicha banda.

Por ello, y en la búsqueda de lograr una apropiada digestión con *Bcl I* se siguió mediante otro procedimiento. Como se señalara anteriormente, el buffer recomendado para la digestión con *Bcl I*, buffer G 1X (Fermentas) posee la composición antedicha; en tanto el buffer recomendado para la digestión con *Sst I* es el buffer L (*SBS*) cuya composición es la siguiente: 10mM Tris-HCl (pH 7,9), 10mM MgCl₂, 1mM de DTT

(ditiotreitolo) y 100µg/mL de BSA. Este análisis permite señalar que la diferencia entre ambos buffers es la adición de 50mM de NaCl. Así, se llevaron a cabo las nuevas digestiones simples (*Protocolo-(D')*) y dobles, utilizando el mismo protocolo de digestión doble pero utilizando el buffer L 1X para la digestión con Sst I, y el mismo adicionando 50mM de NaCl para las digestiones con Bcl I. Previamente se estimó la concentración de las preparaciones de ADN plasmídico en el *Nanodrop ACTgene ASP-3700*, los resultados se muestran en la *Figura 20 - (A)*. Mientras que en la *Figura 20 - (B)* se muestra las digestiones adicionando 5mM de NaCl para las digestiones en que participa la endonucleasa Bcl I; en la *Figura 20 - (C)* se muestra las digestiones adicionando 50mM.

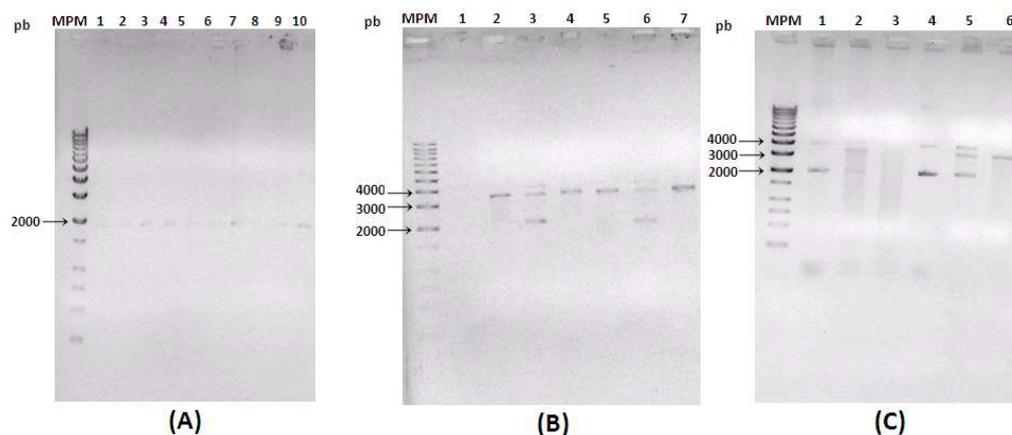


Figura 20- Análisis de la extracción de pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A por *QIAGEN Plasmid Mini Kit* comercial y su digestión simple (*Protocolo-(D')*) y doble con Bcl I y Sst I en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de ADN plasmídico. Del carril 1 al 2 y del 6 al 8 corresponde a pGEM-SODh1-wt. Del 3 al 5 y del 9 al 10 corresponden a pGEM-SODh1-G93A. **(B)** Digestiones simples *Protocolo-(D')* y dobles en buffer L 1X y buffer L + 5mM NaCl, respectivamente. En carril 1: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 2: pGEM-SODh1-wt Sst I en buffer L. En 3: pGEM-SODh1-wt con Bcl I en buffer L + 5mM NaCl. En 4: doble digestión de pGEM-SODh1-wt (buffer L y I (+5mM NaCl)). En 5: pGEM-SODh1-G93A con Sst I en buffer L. En 6: pGEM-SODh1-G93A con Bcl I en buffer L + 5mM NaCl. En 7: doble digestión de pGEM-SODh1-G93A en buffer L y (+ 5mM NaCl). **(C)** Digestiones simples con Bcl I y dobles con Sst I (*SBS*) y Bcl I en buffer L 1X y buffer L + 50mM NaCl, respectivamente *Protocolo-(D')* y de *Digestión doble*. En carril 1: pGEM-SODh1-wt sin digerir. En 2: pGEM-SODh1-wt con Bcl I en buffer L + 50mM NaCl. En 3: doble digestión de pGEM-SODh1-wt en buffer L y (+50mM NaCl). En 4: pGEM-SODh1-G93A sin digerir. En 5: pGEM-SODh1-G93A con Bcl I en buffer L + 50mM NaCl. En 6: doble digestión de pGEM-SODh1-G93A en buffer L y +50mM NaCl.

MPM: Marcador de peso molecular *12kb DNA Ladder.*, *Stratagene*.

Se puede observar para ambos casos que, si bien las digestiones con Sac I se dan en forma completa, las digestiones con Bcl I son parciales tanto para aquellas que se le adicionó 5mM como 50mM de NaCl. No obstante, en ninguna de las dobles digestiones se logra digerir visiblemente el plásmido con ambas endonucleasas, ya que en ninguna doble digestión se observa la banda de aproximadamente 3000pb perteneciente al plásmido libre de inserto. Así, menos se espera ver la banda de inserto que cuenta únicamente con 1/6 del tamaño del plásmido libre.

Particularmente para aquellas digestiones que se adicionó 50mM de NaCl se observa una fuerte degradación que es total para la doble digestión de pGEM-SODh1-wt en primer lugar con Sst I en buffer L (Sst) y sucesivamente con Bcl I (donde se adicionaron

los 50mM NaCl), algo menor para la doble digestión de pGEM-SODh1-G93A y las digestiones simples de ambos plásmidos.

Esto llevó a dudar acerca de la viabilidad del plásmido para ser digerido particularmente con Bcl I. Por lo que se impulsó a la búsqueda de un tercer vector capaz de ser digerido con Sac I y Bcl I. El pET-22b(+) perteneciente a la familia de plásmidos pET de *Invitrogen*, consta de 5493pb donde el sitio de corte para Sac I es a 190pb y el sitio de corte de Bcl I es a 1128pb. Así, la digestión con ambas enzimas de digestión generarán un fragmento de 938pb y otro de 4555pb. Se comenzó transformando células de *E.coli* GM2163 con el plásmido pET-22b(+) y realizando preparaciones a través del método de Lisis Alcalina. Se estimó la concentración comparando la intensidad relativa en un gel de agarosa respecto a un marcador de peso molecular de concentración conocida.

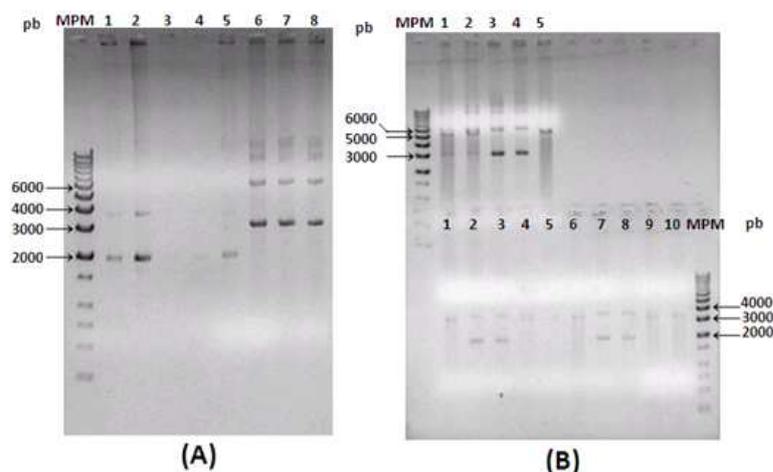


Figura 21-. Análisis de la extracción por lisis alcalina de pGEM-SODh1-wt, pGEM-SODh1-G93A y pET-22b(+) y sus controles en geles de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de ADN plasmídico. Del carril 1 al 3: pGEM-SODh1-wt. En 4 y 5: pGEM-SODh1-G93A. Del 6 al 8: pET-22b(+). **(B)** Controles de estabilidad plasmídica. ARRIBA: En carril 1: pET-22b(+) en buffer L + 50mM NaCl y agua miliQ, a 55°C. En 2: pET-22b(+) en buffer L + 50mM NaCl y agua miliQ, a t_{amb} . En 3: pET-22b(+) en 50mM NaCl y agua miliQ, a 55°C. En 4: pET-22b(+) en 50mM NaCl y agua miliQ, a t_{amb} . En 5: pET-22b(+) digerido con Sst I (1 U) en buffer L y agua miliQ, a 37°C. ABAJO: En carril 1: pGEM-SODh1-G93A digerido con Sst I (1 U) en buffer L y agua miliQ, a 37°C. En 2: pGEM-SODh1-G93A en 50mM NaCl y agua miliQ, a t_{amb} . En 3: pGEM-SODh1-G93A en 50mM NaCl y agua miliQ, a 55°C. En 4: pGEM-SODh1-G93A en buffer L + 50mM NaCl y agua miliQ, a t_{amb} . En 5: pGEM-SODh1-G93A en buffer L + 50mM NaCl y agua miliQ, a 55°C. En 6: pGEM-SODh1-wt digerido con Sst I (1 U) en buffer L y agua miliQ, a 37°C. En 7: pGEM-SODh1-wt en 50mM NaCl y agua miliQ, a t_{amb} . En 8: pGEM-SODh1-wt en 50mM de NaCl y agua miliQ, a 55°C. En 9: pGEM-SODh1-wt en buffer L + 50mM NaCl y agua miliQ, a t_{amb} . En 10: pGEM-SODh1-wt en buffer L + 50mM NaCl y agua miliQ, a 55°C.

MPM: Marcador de peso molecular 12kB DNA Ladder Stratagene.

Una alícuota de cada una se corrió en un gel de *Figura 21 - (A)*, donde se observan las bandas de ADN relajado y superenrollado esperadas. Con este se planteó realizar unos controles de digestión junto con pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A.

Siguiendo las mismas proporciones que en las digestiones anteriores *Protocolo-(D)*, llevadas a cabo durante 1 hora.

Los controles se basaron en probar la estabilidad del plásmido incubado 1 hora con: el buffer L + 50mM NaCl, a 55°C y a temperatura ambiente; incubado con 50mM de NaCl a 55°C y a temperatura ambiente y finalmente la digestión del ADN plasmídico con la enzima Sst I (en ausencia de 50mM de NaCl) a 37°C. Los cinco casos se prepararon a partir de pET-22b(+), pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A, *Figura 21 - (A)*.

Todos los controles y digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% que se muestra en la *Figura 21 - (B)*.

En lo que concierne a los controles de pET-22b(+) (*Figura 21- (B) ARRIBA*) es posible observar que para aquellos controles de ADN plasmídico en buffer L + 50mM NaCl, tanto incubado a 55°C como a temperatura ambiente, es posible observar que parte del ADN se ha degradado parcialmente, y otro se ha linearizado (banda de tamaño aproximado a las 5500pb).

Si bien sería posible interpretar que dicha linearización podría ser a causa de una ruptura mecánica muy poco probable, esto no es consistente con los controles de ADN plasmídico incubado con 50mM de NaCl, tanto a temperatura ambiente como a 55°C, donde no se observa ADN linearizado y la degradación parcial es casi ausente. Esto, nos remite a lo ya expuesto para la *Figura 17*, que señalaba la necesidad de un paso adicional de purificación de las preparaciones de ADN plasmídico por Lisis Alcalina.

La digestión simple de pET-22b(+) con Sst I en buffer L a 37°C si bien tiene lugar completamente, cierta cantidad del ADN plasmídico se ha degradado. Estos resultados son consistentes con los resultados para pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A que se observan en la *Figura 21-(B) ABAJO*; aunque la linearización para estos plásmidos en buffer L + 50mM NaCl (55°C y temperatura ambiente) y 50mM NaCl (55°C y temperatura ambiente) parece haber sido mas extensiva que para pET-22b(+).

Así es que se plantearon, utilizando pGEM-SODh1-wt *Figura 21 - (A)*, nuevos controles en otros buffers de digestión. A fin de descartar que los casos de ADN linearizado sean a causa de una contaminación del buffer L, se utilizaron dos buffers.

Si se analiza la composición del buffer NEB 1 (*Biolabs*) posee: 10mM de Bis-Tris-Propano-HCl, 10mM de MgCl₂, 1mM de DTT (pH 7). Esto, lo vuelve equivalente al buffer L (Sst), utilizado hasta entonces. Además se intentó probar que no sea, a causa de la composición particular del buffer L, que se este linearizando el plásmido. Por esta razón se planteó la digestión de pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 4 (*Biolabs*). Para el caso de este último, la enzima de restricción Sst I (Sac I) expone 100% de actividad, en tanto Bcl I un 75%.

Los controles contaron con la incubación (como hasta ahora de 1 hora) de ADN plasmídico en: agua miliQ, buffer NEB 4 1X en agua miliQ y buffer NEB 1 1X junto con 50mM de NaCl en agua miliQ. Estos tres controles se llevaron a cabo a 55°C. Adicionalmente se llevaron a cabo las digestiones del ADN plasmídico con la enzima Bcl I, a 55°C, en: buffer NEB 4 1X, buffer NEB 1 1X junto con 50mM de NaCl y en buffer NEB 1 1X. En tanto las digestiones con Sst I, a 37°C, en: buffer NEB 4 1X y buffer NEB 1 1X. Los resultados son los que se muestran en la *Figura 22*.

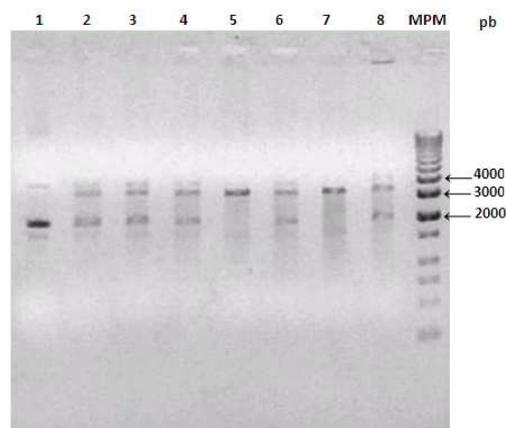


Figura 22.- Análisis de controles de estabilidad plasmídica de pGEM-SODh1-wt en gel de agarosa al 0,8%. En carril 1: pGEM-SODh1-wt en agua miliQ a 55°C. En 2: pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 4 1x, a 55°C. En 3: pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 1 1X + 50mM de NaCl en agua miliQ, a 55°C. En 4: digestión con Bcl I de pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 4 1X, a 55°C. En 5: digestión con Sst I de pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 4 1X, a 37°C. En 6: digestión con Bcl I de pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 1 1X + 50mM de NaCl, a 55°C. En 7: digestión con Sst I de pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 1 1X, a 37°C. En 8: digestión con Bcl I de pGEM-SODh1-wt en buffer NEB 1 1X, a 55°C.

MPM: Marcador de peso molecular 12kB DNA Ladder. Stratagene.

Comenzando con la incubación del ADN plasmídico en agua miliQ se observa que el mismo ha mantenido su integridad, en tanto se observa la ausencia de la banda electroforética de tamaño del ADN linearizado (aproximadamente 3500pb). No así, cuando se analizan los controles en buffer NEB 4 1X y buffer NEB 1 1X junto con 50mM de NaCl, si bien se conservan las bandas electroforéticas correspondientes a el ADN plasmídico relajado y superenrollado (algo más tenue la primera de ellas), para los dos controles se percibe que parte del ADN se ha linearizado. Es posible descartar que la causa sea, por contaminación del agua miliQ por el primer de los controles y por la contaminación del buffer L que se utilizó ya que incubando con los buffers NEB 1 y 4 dicho fenómeno se sigue sucediendo.

A lo que digestiones se refiere; las digestiones con Bcl I, en todos los casos, parece haber sido parcial o con mayor seguridad las bandas de ADN linearizado que se observan en los tres casos correspondan a la linearización por causa de la incubación con los buffer; tal como se explicó antes.

Si bien esta ausencia de digestión era de esperar en el caso de la digestión en buffer NEB 1 1X por su actividad teórica en 50% y principalmente por como se había comportado hasta el momento, no obstante, se esperaba la obtención de algo más de digestión en buffer NEB 4 1X (75%) y una digestión completa en buffer NEB 1 1X + 50mM de NaCl. Sin embargo, y en concordancia con la actividad teórica del 100% y las experiencias previas, las digestiones con Sst I se lograron, aunque con cierta degradación parcial que se hace más intensa en el caso de la digestión en buffer NEB 1 1X. Todo esto hace pensar que la falta de digestión por parte de la endonucleasa Bcl I sea una sumatoria de dificultades que particularmente esta enzima no puede superar y que, se sospecha, otra enzima si pueda.

Por ello, finalmente se intentó comprobar que particularmente Bcl I es una enzima mucha más estricta en condiciones de reacción que otras para digerir. Los laboratorios *Biolabs* manifiestan que el buffer de reacción recomendado para esta endonucleasa es el buffer NEB 3.

De esta manera, se buscó otra enzima capaz de digerir en este mismo buffer. Esta enzima fue la endonucleasa Sal I. A partir de la preparación de ADN plasmídico por Lisis Alcalina que se muestra en la *Figura 23 - (A)*, y en las mismas proporciones que las digestiones anteriores se procedió a diseñar los controles. Otra enzima, capaz de digerir en el buffer en cuestión y tener sitio de restricción en el vector pET-22b(+), es la endonucleasa Pst I. Digiriendo durante 1 hora en buffer NEB 3 1X a 37°C con ambas enzimas se espera obtener un fragmento de 4174pb y otro de 1319pb.

Los resultados de estos controles se muestran en la *Figura 23 - (B)*. En esta figura se observa que, cuando el plásmido se incuba con el buffer NEB3 1X a 37°C y a temperatura ambiente, cierta cantidad del mismo se lineariza, ya que se observa una leve banda a la altura de aproximadamente 5500pb. En ambos casos, y como se había registrado anteriormente, entre estas dos condiciones no se advierten grandes diferencias y se sospecha se debe a lo descrito anteriormente en este trabajo.

Cuando el plásmido se incubaba con agua miliQ, no se produce la linearización, que se destacara cuando el plásmido se incubaba en ausencia de enzima pero con Buffer NEB 3 1x. Por otra parte, en las digestiones simples con ambas enzimas (Pst I (*Biolabs*) y Sal I (*Fermentas*)) parecen haber tenido lugar en forma completa en ausencia de degradación inespecífica, observándose una única banda a la altura de aproximadamente 5500pb.

Finalmente en la doble digestión, tal como se esperaba, se obtuvo una banda por encima de la de 4000pb y otra entre las 1500 y 1000pb.

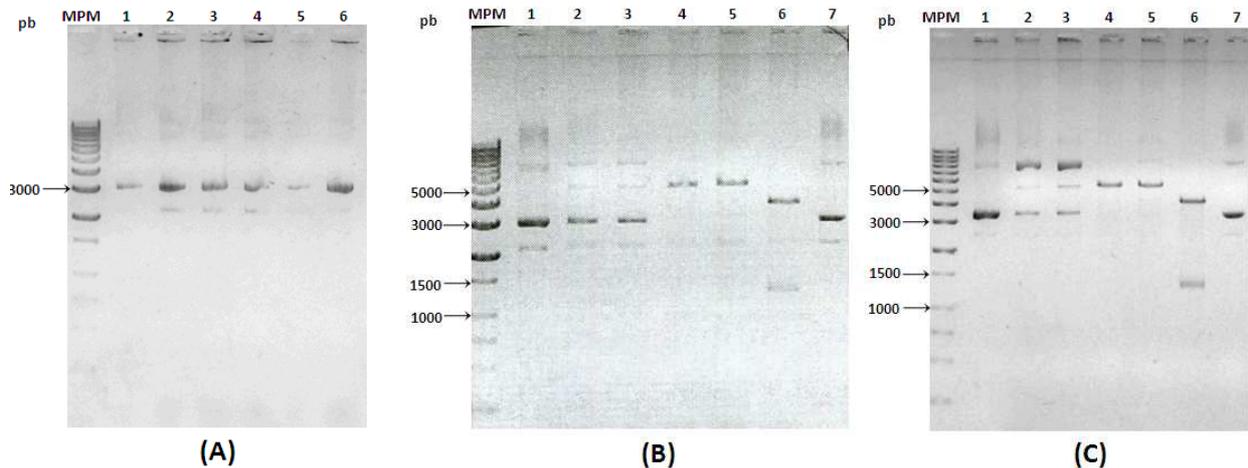


Figura 23.- Análisis de controles de digestión de pET-22b(+) con las endonucleasas Pst I (*Biolabs*), Sal I (*Fermentas*) y Sst I (*SBS*) en gel de agarosa al 0,8%. **(A)** Minipreparación de ADN plasmídico pET-22b(+) por Lisis Alcalina. Del carril 1 al 6: pET-22b(+). **(B)** Controles de digestión del vector pET-22b(+) con Pst I y Sal I en buffer NEB 3 1X. En carril 1: pET-22b(+) sin digerir. En carril 2: pET-22b(+) temperatura ambiente en buffer NEB 3 1X y agua miliQ. En carril 3: pET-22b(+) a 37°C, en buffer NEB 3 1X y agua miliQ. En carril 4: digestión simple de pET-22b(+) con Pst I, en buffer NEB 3 1X, agua miliQ a 37°C. En carril 5: digestión simple de pET-22b(+) con Sal I, en buffer NEB 3 1X, agua miliQ a 37°C. En carril 6: doble digestión de pET-22b(+) con Pst I y Sal I, en buffer NEB 3 1X, agua miliQ a 37°C. En carril 7: pET-22b(+) a 37°C, en agua miliQ. **(C)** Controles de digestión del vector pET-22b(+) con Pst I y Sst I en buffer NEB 1 1X. En carril 1: pET-22b(+) sin digerir. En carril 2: pET-22b(+) a temperatura ambiente, 1 hora en buffer NEB 1 1X y agua miliQ. En carril 3: pET-22b(+) a 37°C, en buffer NEB 1 1X y agua miliQ. En carril 4: digestión simple de pET-22b(+) con Pst I, en buffer NEB 1 1X, agua miliQ a 37°C. En carril 5: digestión simple de pET-22b(+) con Sst I, en buffer NEB 1 1X, agua miliQ a 37°C. En carril 6: doble digestión de pET-22b(+) con Pst I y Sst I, en buffer NEB 1 1X, agua miliQ a 37°C. En carril 7: pET-22b(+) incubado a 37°C durante con agua miliQ.

MPM: Marcador de peso molecular 12kB DNA Ladder., *Stratagene*.

Análogamente, a partir de un análisis semejante se verificó que la endonucleasa Pst I es capaz de digerir al 100% en el buffer NEB1 1X, tal como lo hace la enzima Sst I. Digeriendo con ambas enzimas es de esperar un segmento de 4163pb y otro de 1330pb.

En la Figura 23 - (C), que muestra este análisis, los resultados obtenidos en todos los casos son similares que para el par Pst I – Sal I y la doble digestión fue igualmente eficiente.

Este análisis permitiría derivar en que, a diferencia de Bcl I; la enzima Sal I, es menos susceptible al grado de pureza plasmídica para digerir. En tanto la endonucleasa Sac I (o su isoesquisómero Sst I) es mucho más plástica y con menor requisito de pureza.

Por todo lo anterior es de esperar que para lograr un subclonado satisfactorio, en primer lugar para liberar el segmento codificante de SODh1 de tipo salvaje y la mutante G93A, la digestión con Bcl I y Sac I deban realizarse en etapas diferentes, debiendo

particularmente extraer el plásmido (cuya pureza haya alcanzado un grado adecuado) linearizado con Bcl I; para luego ser digerido con Sac I. Este procedimiento tiene un rendimiento muchísimo menor y por eso es que se ha evitado hacerlo así hasta entonces.

7.3 Expresión de prueba en el sistema *BL21 Star - pET*.

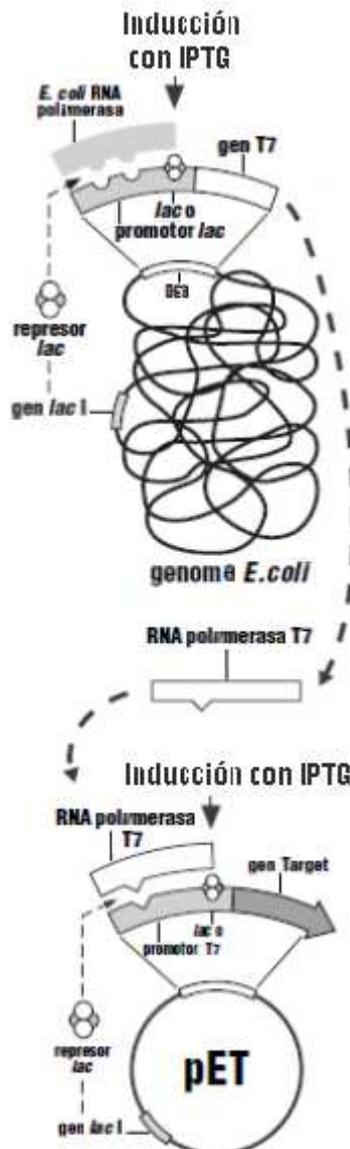


Figura 24.- Esquema del control del promotor p_{lac} T7. Extraído del *pET System Manual – 11th Edition*.

En el laboratorio se contaba con el vector pET-3d con la secuencia codificante de SODh1 de tipo salvaje (pET-3d-SODh1-wt) y con la secuencia de SODh1 con la mutación G93A (pET-3d-SODh1-G93A).

Este vector que pertenece al *Sistema pET* es una poderosa herramienta de expresión porque se puede controlar estrictamente. Posee el promotor de T7 (p_{T7}), transcripto por la ARN polimerasa de T7, que en la cepa BL21(DE3) se encuentra inserto en el ADN genómico bacteriano, bajo control del promotor *lac* (*lacUV5*).

Esto hace que su expresión sea inducida por IPTG (ver Figura 24) o reprimida adicionando glucosa al medio, según las características de la proteína a expresar. Particularmente la ARN polimerasa de T7 es una enzima muy activa: sintetiza ARN en un tasa mucho mayor que la ARN polimerasa de *E. coli*, y termina de manera menos frecuente que esta última. Incluso la transcripción puede circunvalar negativamente un plásmido, resultando en un ARN varias veces el tamaño del plásmido.

De igual forma, la ARN polimerasa de T7 es muy selectiva para la iniciación en la secuencia de su promotor y no comienza la transcripción desde cualquier secuencia del ADN bacteriano.

La cepa juega un role en determinar el nivel de la expresión génica.

Todas estas características que posee lo convierten en un sistema muy utilizado para propósitos generales de expresión.

No obstante, la estabilidad del producto es, sin embargo, un factor determinante que ha sido caracterizado. La falta de proteasas no es el único factor determinante para ello.

Para verificar las condiciones de pET-3d-SODh1-wt y pET-3d-SODh1-G93A se secuenciaron a partir del servicio de secuenciación del *Institut Pasteur de Montevideo*, a partir de los primers T7. Esto permitió confirmar que ambos vectores fueron clonados satisfactoriamente.

Se llevó a cabo el protocolo de *expresión (Crow-Beckman)*, tal como se indica en la *sección Materiales y Métodos*. La inducción tomó 90 minutos a 26°C. Los resultados se muestran en la *Figura 25*. Es de esperar en el perfil electroforético la observación de una banda en la fracción de las células inducidas a la altura aproximada de 20KDa (*Figura 25 - IZQUIERDA*).

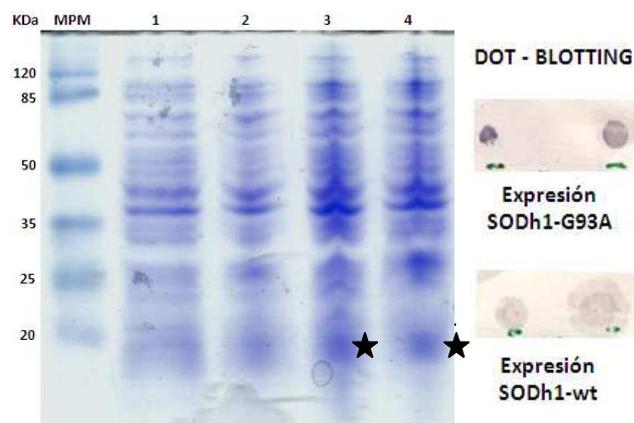


Figura 25- Perfil electroforético y *Dot-Blotting* de la expresión de SODh1-wt y SODh1-G93A en gel de poliacrilamida desnaturalizante 12%.

(IZQUIERDA): En *carril 1*: fracción total antes de inducir de SODh1-G93A. En *carril 2*: fracción total antes de inducir de SODh1-wt. En *carril 3*: fracción total de SODh1-G93A inducido por 1,5 horas a 26°C. En *carril 4*: fracción total de SODh1-wt inducido por 1,5 horas a 26°C.

Las banda esperada de SODh1-wt y SODh1-G93A se señala con (★). **(DERECHA):** Dot-Blotting de las fracciones totales inducidas de SODh1-wt y SODh1-G93A

MPM: Marcador de peso molecular *Prestained Protein Ladder*. Fermentas

Como se puede ver en la figura, la banda de la expresión no puede visualizarse, por ello es que se llevó a cabo un *Dot-Blotting* que se muestra en *Figura 25 - DERECHA* para asegurarse de que efectivamente había tenido lugar la expresión. Los resultados fueron positivos.

Cuando una expresión es llevada a cabo, la misma debiera ser claramente visible en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, si no lo es, podría estar habiendo un problema en el vector, la célula o las condiciones de expresión.

Como las condiciones del vector ya se comprobaron y la cepa es una cepa general de expresión, seguramente deba ser un problema de condiciones de inducción y expresión.

De hecho, la forma en que se obtenga la proteína (cantidad, forma soluble y/o insoluble) va a depender de las condiciones: medio, temperatura, cepa, etc.

Variando la temperatura de inducción y el nivel de expresión se puede variar la proporción entre soluble e insoluble.

El siguiente ensayo entonces se indujo, siguiendo el protocolo que se señalara en la *sección Materiales y Métodos* a 20°C durante 2 horas. A partir de estos se recuperó la fracción soluble e insoluble (siguiendo el protocolo según *J. Betton*). Esta vez, las fracciones totales, solubles e insolubles se corrieron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15%; a fin de lograr una mayor separación se las proteínas. Los resultados se muestran en la *Figura 26*.

Mientras que en las células sin transformar no se observa un aumento en la presencia de proteínas de aproximadamente 20kDa, pero en el caso de las células BL21(DE3) que si fueron transformadas con los vectores pET-3d-SODh1-wt y pET-3d-SODh1-G93A es

particularmente notorio en las fracciones totales la presencia de una amplia banda en el entorno de los 20kDa que atribuimos a la expresión exitosa de SODh1-wt y SODh1-G93A. Para su confirmación es preciso llevar a cabo un *Western-Blot*, el cual no se realizó.

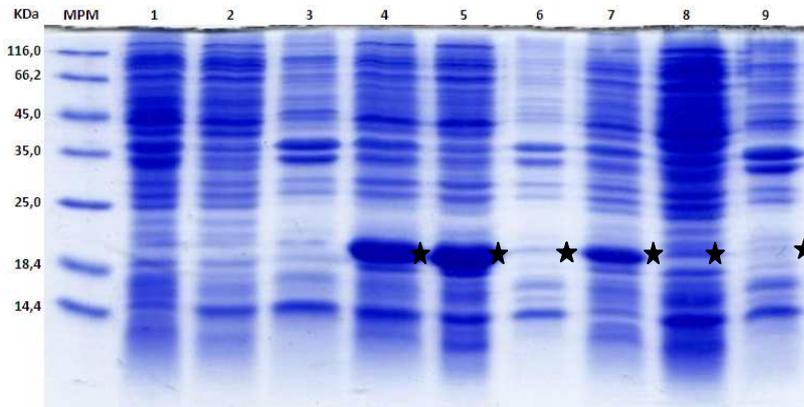


Figura 26.- Perfil electroforético de la expresión de SODh1-wt y SODh1-G93A en gel de poliacrilamida desnaturalizante 15%. En carril 1: fracción total de BL21(DE3) sin transformar inducidas 2hs. En carril 2: fracción soluble de BL21(DE3) sin transformar inducidas 2hs. En carril 3: la fracción insoluble de BL21(DE3) sin transformar inducidas 2hs. En carril 4: fracción total de BL21(DE3) transformadas con SODh1-wt inducido 2hs. En carril 5: fracción soluble de BL21(DE3) transformadas con SODh1-wt inducido 2hs. En carril 6: fracción insoluble de BL21(DE3) transformadas con SODh1-wt inducido 2hs. En carril 7: fracción total de BL21(DE3) transformadas con SODh1-G93A inducido 2hs. En carril 8: fracción soluble de BL21(DE3) transformadas con SODh1-G93A inducido 2hs. En carril 9: fracción insoluble de BL21(DE3) transformadas con SODh1-G93A inducido 2hs.

Las banda esperada de SODh1-wt y se señala con (★).

MPM: Marcador de peso molecular *Unstained Protein Ladder.*, Fermentas

Como se observa en la figura tanto para SODh1-wt como para SODh1-G93A la fracción soluble de la enzima es más abundante que la fracción insoluble; siendo más claro para SODh1-wt. También es posible notar que, en una cierta cantidad de células, la expresión de SODh1-wt es más abundante que la de SODh1-G93A y que proporcionalmente más SODh1-wt es retenida en la fracción soluble que para SODh1-G93A.

Si la inducción fuese llevada a cabo a mayor temperatura, es de esperar que más enzima culmine en la fracción insoluble.

Este fenómeno se debe al hecho de que a mayor temperatura la proteína naciente no logra plegarse, y como resultado la proteína mal plegada precipita. Que una mayor proporción de la SODh1-G93A culmine en la fracción insoluble que para SODh1-wt, concuerda igualmente con lo esperado,

ya que aquellas SODh1 que poseen ciertas mutaciones, entre las que encontramos a la G93A provocan la precipitación de la misma; fenómeno que se estudia por su carácter patológico.

8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Ciertamente el desarrollo de este trabajo planteó desafíos que derivaron en la incursión por distintas técnicas y procedimientos. Si bien el objetivo específico del subclonado y expresión del fragmento codificante de SODh1-wt y SODh1-G93A fuera esquivo, se logró la doble digestión del vector pQE30®; aunque sin alcanzarse la doble digestión de los vectores pGEM-SODh1-wt y pGEM-SODh1-G93A, particularmente con la enzima de restricción Bcl I.

Se probaron distintas marcas, distintos buffers y condiciones. En ninguna se logró una digestión adecuada.

Planteándose una nueva estrategia, tomando en cuenta los ya vistos requerimientos que en especial exige la endonucleasa Bcl I, o bien cambiando el sitio de restricción para Bcl I por otro para una endonucleasa que requiera condiciones de restricción similares a Sac I, se podría alcanzar con éxito el subclonado al vector pQE30.

Logrado esto, se esperaría que el ligado de los fragmentos de ADN y la transformación de las M15[pREP4] no presentase mayores dificultades, para que finalmente con las construcciones se alcance la expresión de SODh1-wt y SODh1-G93A.

Es necesario optimizar cada uno de los pasos: digestiones, ligación y expresión. Incluso, sería posible expresar las proteínas en distintas cepas de *E.coli*, para así poder definir la mejor combinación posible para obtener las proteínas en sus diferentes formas y en la proporción deseada.

Una adecuada expresión de SODh1-wt y SODh1-G93A permitiría, su análisis a través del perfil electroforético, una posterior verificación a través de la realización de Western Blot, y finalmente su purificación a través de la cola de histidinas que se adicionaría.

Su utilización sería amplia, desde ensayos fisicoquímicos varios, a ensayos de interacción molecular, estructurales y en especial ensayos de cinética de traducción y plegamiento; una de las líneas de investigación del laboratorio.

La magnitud y alcance de estos ensayos permitirían un acercamiento a la comprensión del fenómeno de precipitación de la enzima superóxido dismutasa en condiciones fisiológicas, concretamente de aquella mutada.

El clonado y expresión heteróloga de proteínas son herramientas ampliamente utilizadas en la Biología Molecular en investigación básica o aplicada con fines industriales.

El alto nivel de expresión de varias proteínas que lleva a la formación de cuerpos de inclusión, algunas veces puede funcionar como una ventaja, ya que al ser insolubles y

densos, pueden ser relativamente fáciles de purificar por centrifugación.

Adicionalmente, algunas proteínas que son degradadas cuando se expresan de forma soluble resultan más estables como cuerpo de inclusión. Una vez purificadas, las proteínas en el cuerpo de inclusión puede ser solubilizadas por desnaturalización con guanidina-HCl o urea, y luego algunos casos pueden ser replegadas por diálisis, retirando el agente desnaturalizante.

Un problema, sin embargo con el proceso de desnaturalización/renaturalización es que el rendimiento de de proteínas replegadas de una forma correcta es variable y a veces bastante baja.

Mayormente algunas proteínas, sobre todo las de mayor tamaño no pueden replegarse in vitro de ninguna manera; de allí la búsqueda de condiciones de expresión mas suaves para intentar aumentar la producción de proteína en forma soluble.

Varias empresas ofrecen una amplia gama de atractivos sistemas para llevar a cabo distintos subclonados, no obstante, no están libres de las dificultades que puedan surgir.

9 ANEXO

Medios de cultivo

Luria-Bertoni (LB): 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl por litro.

LB-Agar: 1L de medio LB, 15g de agar.

Suplementos

Ampicilina: Su utiliza a partir de solución stock 100mg/mL.

Bromuro de etidio (BrEt): Se utiliza a partir de solución stock 10mg/mL.

Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG): Se utiliza a partir de solución stock 100mM.

Soluciones

Buffer de carga 6X para ADN: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de azul de xilencianol, 30% de glicerol.

Azul de Coomassie: 0,05% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% de etanol ppa, 10% de ácido acético.

Solución decolorante: 30% etanol, 70% ácido acético.

Buffer Tris-acetato (TAE) de corrida para electroforesis en geles de agarosa, solución stock 50X: 242g de Tris base, 57,1mL de ácido acético glacial, 10mL de EDTA 0,5M pH8, por litro de solución.

Buffer de corrida para electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante, solución 5X: 15,1g de Tris base, 94g de glicina pH 8,3 , 50mL de SDS 1%, por litro de solución.

Buffer de muestra para electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (4X): 125mM de Tris-HCl pH 6-8, 4% (w/v) de SDS, 1,43M de β -mercaptoetanol , 23,2% (v/v) de glicerol, 0,02% (w/v) de bromofenol, agua MRO cantidad necesaria.

Solución I de Lisis Alcalina: 25mM de Tris-HCl pH 8, 10mM de EDTA pH 8.

Solución II de Lisis Alcalina: 0,2N de NaOH, 1% SDS.

Solución III de Lisis Alcalina: 5M de acetato de potasio pH 5,2.

RNAasa: Se utiliza a partir de solución stock 10mg/mL

Marcadores de Peso Molecular:

ADN: 12kB DNA Ladder. cat #201115, Stratagene

Band Sizes and Quantities
(per 500ng marker)

Size (bp)	Quantity (ng)
12,000	33.2
10,000	33.2
9,000	33.2
8,000	33.2
7,000	33.2
6,000	55.2
5,000	55.2
4,000	55.2
3,000	55.1
2,000	61.3
1,500	13.8
1,000	11.1
750	10.4
500	9.2
250	7.7

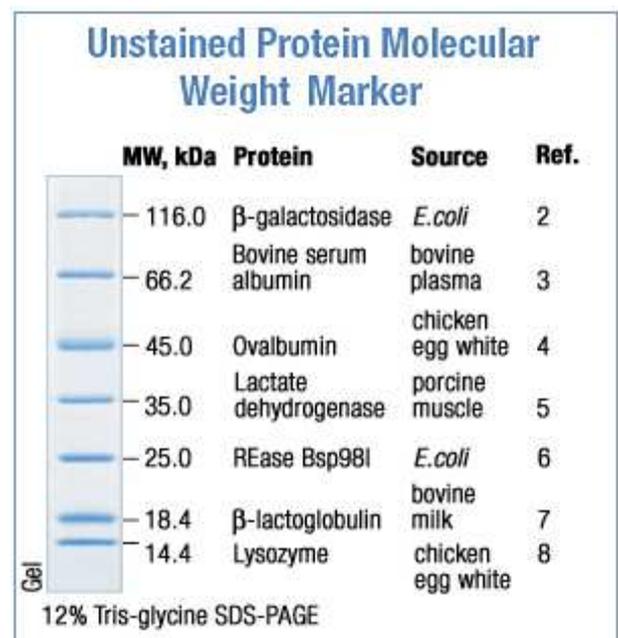
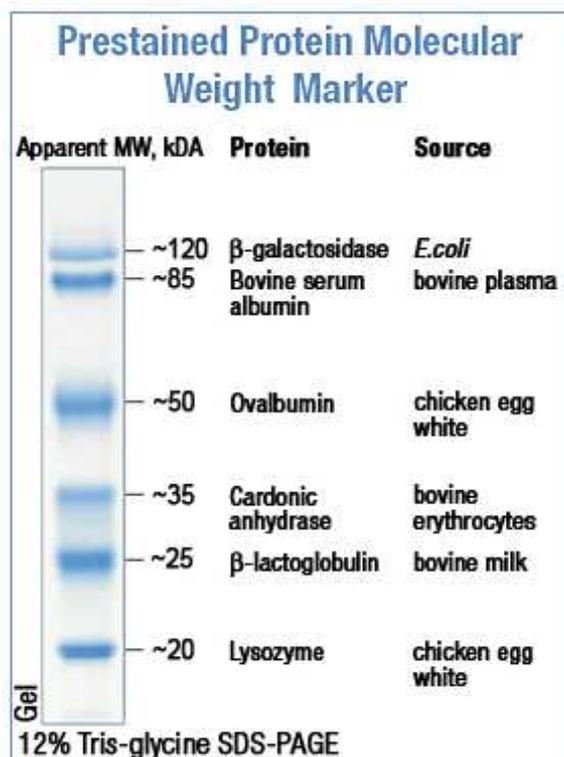
Proteína:

Prestained Protein Ladder

#SMO441, Fermentas

Unstained Protein Ladder

#SMO431, Fermentas



10 BIBLIOGRAFÍA:

1. Witan, H., et al., *Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation*. Hum Mol Genet, 2008. 17(10): p. 1373-85.
2. Yoon, E.J., et al., *Intracellular amyloid beta interacts with SOD1 and impairs the enzymatic activity of SOD1: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Mol Med, 2009. 41(9): p. 611-7.
3. Li, X., et al., *Mutant copper-zinc superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis binds to adenine/uridine-rich stability elements in the vascular endothelial growth factor 3'-untranslated region*. J Neurochem, 2009. 108(4): p. 1032-44.
4. Svensson, A.K., et al., *Metal-free ALS variants of dimeric human Cu,Zn-superoxide dismutase have enhanced populations of monomeric species*. PLoS One, 2010. 5(4): p. e10064.
5. Teilum, K., et al., *Transient structural distortion of metal-free Cu/Zn superoxide dismutase triggers aberrant oligomerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(43): p. 18273-8.
6. Wijesekera, L.C. and P.N. Leigh, *Amyotrophic lateral sclerosis*. Orphanet J Rare Dis, 2009. 4: p. 3.
7. Takazawa, T., et al., *Familial amyotrophic lateral sclerosis with a novel G85S mutation of superoxide dismutase 1 gene: clinical features of lower motor neuron disease*. Intern Med, 2010. 49(2): p. 183-6.
8. Jaiswal, M.K., et al., *Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease*. BMC Neurosci, 2009. 10: p. 64.
9. Perry, J.J., et al., *The structural biochemistry of the superoxide dismutases*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1804(2): p. 245-62.
10. Kuzma-Kozakiewicz, M. and H. Kwiecinski, *The genetics of amyotrophic lateral sclerosis*. Neurol Neurochir Pol, 2009. 43(6): p. 538-49.
11. Moran, D.M., H. Shen, and C.G. Maki, *Puromycin-based vectors promote a ROS-dependent recruitment of PML to nuclear inclusions enriched with HSP70 and Proteasomes*. BMC Cell Biol, 2009. 10: p. 32.
12. Gregersen, N., et al., *Protein misfolding and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. 7: p. 103-24.
13. Wang, J., et al., *Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(5): p. 1392-7.
14. Sabate, R., et al., *Characterization of the amyloid bacterial inclusion bodies of the HET-s fungal prion*. Microb Cell Fact, 2009. 8: p. 56.
15. Roberts, B.R., et al., *Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS*. J Mol Biol, 2007. 373(4): p. 877-90.
16. Nordlund, A., et al., *Functional features cause misfolding of the ALS-provoking enzyme SOD1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(24): p. 9667-72.
17. Nordlund, A. and M. Oliveberg, *Folding of Cu/Zn superoxide dismutase suggests structural hotspots for gain of neurotoxic function in ALS: parallels to precursors in amyloid disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(27): p. 10218-23.
18. Seetharaman, S.V., et al., *Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. 234(10): p. 1140-54.
19. Terpe, K., *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. 72(2): p. 211-22.
20. Yesilirmak, F. and Z. Sayers, *Heterologous expression of plant genes*. Int J Plant Genomics, 2009. 2009: p. 296482.

21. Freigassner, M., H. Pichler, and A. Glieder, *Tuning microbial hosts for membrane protein production*. *Microb Cell Fact*, 2009. 8: p. 69.
22. Birkholtz, L.M., et al., *Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation*. *Malar J*, 2008. 7: p. 197.
23. Sivashanmugam, A., et al., *Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli*. *Protein Sci*, 2009. 18(5): p. 936-48.
24. Angov, E., et al., *Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host*. *PLoS One*, 2008. 3(5): p. e2189.
25. Leviatan, S., et al., *Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2010. 285(31): p. 23548-56.
26. Leinweber, B., et al., *Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med*, 2004. 36(7): p. 911-8.
27. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et.al(2003)*Current Protocol in Molecular Biology*, Jhon Wiley & Sons Inc; ringbou edition.
28. Ramos, C.R.R.; Abreu, P.A.E.; Nascimento, A.L.T.O. and HO, P.L.. *A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide*. *Braz J Med Biol Res*, 2004, vol.37, n.8, pp. 1103-1109. ISSN 1678-4510.
29. Klose J, Wendt N, Kubald S, Krause E, Fechner K, Beyermann E, Bienert M, Rudolph R, Rothmund S (2004) Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotrophin-releasing factor receptor type 2a, *Protein Science*, 13, 2470-2475.
30. Pessela B, Vian A, Mateo C, Fernandez-lafuente R, Garcia J, Guisan J M, Carrascola A (2003) Everproduction of Thermus sp. Strain T2 β -Galactosidase in *Escherichia coli* and Preparation by Using Tailor-Made metal Chelate Supports, *Appli. Env. Microbiol*, vol 69, 1967-1072.
31. McKeith I. G , *Dementia with Lewy bodies*, *The British Journal of Psychiatry*, 2002; 180: 144 - 147.
32. *E.coli Strains Supplied by NEB*, disponible desde: [<http://homepages.uwp.edu/pham/bios453/07strains.pdf>].
33. Manual: XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells, *Stratagene*.
34. Manual BL21 Star™(DE3) One Shot®, BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells *Invitrogen*.
35. Manual: One Shot® TOP10 Competent Cells, *Invitrogen*.
36. Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, *Promega*.
37. Manual: pET System Manual 11th Edition, *Novagen*.
38. Manual: The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6XHis-tagged proteins, 5th Edition, June 2003, *QIAgen*.