



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS



Modificación genómica de *Physcomitrella patens* para expresión de FSH, heterodímero compuesto por las subunidades alfa y beta

Tesis de Grado en Ciencias Biológicas
Orientación Biotecnología

Guillermo Reboledo
Tutor responsable: Mario Señorale
Cotutoría: Natalia Ruétalo
Sección Bioquímica
Agosto 2012

Índice

1- RESUMEN	1
2- INTRODUCCIÓN	2
2.1- Generalidades de la FSH	2
2.2- Expresión de FSH	4
2.3- Plantas como sistema de expresión alternativa	5
2.3.1- <i>Physcomitrella patens</i> como sistema de expresión.....	6
2.3.2- <i>Recombinación homóloga</i>	7
3- OBJETIVOS	9
3.1- Objetivo General	9
3.2- Objetivo Específico	9
4- ESTRATEGIA	10
4.1- Estrategia General	10
4.2- Estrategia Específica	11
5- MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1- Cepas de <i>Eschereichia coli</i>	14
5.2- Medios de cultivo	14
5.3- Cebadores	14
5.4- Soluciones y buffers	14
5.4.1- <i>Soluciones para preparación de ADN plasmídico</i>	15
5.4.2- <i>Buffers</i>	15
5.5- Técnicas utilizadas	15
5.5.1- <i>Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> ..	15
5.5.2- <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	16
5.5.3- <i>Purificación de ADN</i>	16
5.5.4- <i>Cuantificación de ADN</i>	16
5.5.5- <i>Transformación de células quimiocompetentes</i>	17
5.5.6- <i>Minipreparación de ADN plasmídico</i>	17
5.5.7- <i>Digestión de plásmidos</i>	18
5.5.8- <i>Desfosforilación del plásmido digerido</i>	19
5.5.9- <i>Fosforilación de la CDS</i>	20
5.5.10- <i>Construcción plásmido T</i>	21
5.5.11- <i>Adenilación del inserto</i>	21
5.5.12- <i>Ligación</i>	21
5.5.13- <i>Bacterias electrocompetentes</i>	22
5.5.14- <i>Electroporación</i>	22
5.5.15- <i>Cálculo de Eficiencia de Transformación</i>	22
5.5.16- <i>Purificación de plásmidos para secuenciación</i>	23

6- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1- Obtención de la CDS	24
6.2- Preparación del Vector	27
6.3- Ligación	28
6.4- Transformación y selección	29
6.5- Análisis de los clones	30
<i>6.5.1- Análisis por restricción</i>	30
<i>6.5.2- Análisis por secuenciación</i>	38
7- CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	40
8- BIBLIOGRAFÍA	41

1- RESUMEN

La posibilidad de expresar grandes cantidades de proteínas recombinantes, no solo para investigación sino también para su uso en tratamientos clínicos tanto en humanos como en animales, se ha acrecentado con el advenimiento de nuevas técnicas en el campo de la biotecnología. En un principio, el problema para producir algunas de estas proteínas era principalmente la necesidad de modificaciones post-traduccionales por las que éstas debían pasar durante su síntesis, como la glicosilación, y que no podían ser realizadas por los sistemas de expresión en bacterias. Nuevas tecnologías desarrolladas permitieron superar el problema antes descrito utilizando líneas celulares de mamíferos e insectos. Si bien estas líneas celulares realizan modificaciones post-traduccionales parecidas a las presentes en sistemas naturales de donde proviene la proteína, las mismas no siempre son iguales. A su vez, un inconveniente mayor a tener en cuenta al usar estas líneas celulares es el costo de producción alto en que se incurre. Debido a esto es que se empieza a usar plantas como sistema de expresión pues presentan mayor bioseguridad, mayor rendimiento y menores costos que sus contrapartes animales. En algunos casos en que las modificaciones post-traduccionales de plantas no resultan convenientes para la funcionalidad de una proteína en particular (por ejemplo, el tipo de glicosilación), se ha podido subsanar el problema mediante ingeniería genética de la planta en cuestión, ya sea por “knockouts” o por inserciones de genes, lo cual permite que ésta realice tales modificaciones de forma idéntica a las de mamíferos.

Uno de los modelos en plantas es *Physcomitrella patens*, la cual presenta un alto porcentaje de recombinación homóloga haciéndola buena candidata para ser modificada a nivel genómico, permitiendo los cambios antes mencionados. Es así que el presente trabajo se centró en la obtención de un vector de expresión para plantas que por medio de recombinación homóloga integraría la secuencia codificante de la proteína seleccionada en el genoma de *P. patens*. La proteína con la cual se trabajó es la hormona folículo estimulante humana (FSHh), heterodímero compuesto por las subunidades α y β . En el laboratorio se cuenta con una cepa de *P. patens* recombinante que presenta en su genoma el gen de la subunidad β humana de la FSH (β -FSHh). El objetivo concreto de este trabajo fue construir un vector portador del gen de la subunidad α de la FSH humana (α -FSHh) para luego transformar la cepa que expresa β -FSHh.

Con el vector logrado en el presente trabajo se espera cumplir a futuro el objetivo general de esta línea de investigación, es decir una cepa de *P. patens* capaz de coexpresar ambas subunidades que eventualmente permitirá formar el heterodímero in vivo. Adicionalmente, en caso de cumplirse las expectativas, podrían seguirse los estudios en cepas humanizadas de *P. patens*, y así obtener una proteína más próxima al tipo humano.

2- INTRODUCCIÓN

2.1- Generalidades de la FSH

La FSH es miembro de la familia de hormonas pituitarias glicoproteicas (GPH) y como tal es una proteína heterodimérica, con dos subunidades N-glicosiladas asociadas no covalentemente entre sí. Dentro de esta familia se encuentran la hormona luteinizante (LH), la tiroideoestimulante (TSH) y la gonadotrofina coriónica (CG). Las GPHs presentan una subunidad α común (92 aminoácidos y 5 enlaces disulfuros) y una subunidad β característica de cada una, que en el caso de la FSH humana (FSHh) está compuesta por 111 aminoácidos y 6 enlaces disulfuros. Cada subunidad en dicha FSH, contiene dos sitios de glicosilación: Asn52 y Asn78 en la subunidad α y en la subunidad β Asn7 y Asn24 (Figura 1). Las funciones reproductivas de mamíferos (incluidos los humanos) tanto en hembras como en machos son reguladas por la FSH. Esta hormona es de suma importancia para la fertilidad permitiendo la foliculogénesis ovárica en mujeres y la proliferación de las células de Sertoli y el mantenimiento de la calidad del espermatozoide en hombres. La importancia de la FSH para la función gonadal en el hombre fue demostrada cuando se describió un caso en el cual el individuo poseía la subunidad β de la FSH mutada provocando infertilidad (Simoni et al. 1999). Los estudios realizados con esta hormona resaltan la importancia de la glicosilación para el correcto funcionamiento de la misma, así como también infieren que la clase de glicosilación que presenta puede ser importante para el tipo de señal que se genera luego de unirse a su receptor, pudiendo influenciar en la regulación de la vía de activación según el tipo de glicosilación que presente. La importancia de la glicosilación en las GPH no radica únicamente en el funcionamiento de la misma o el tipo de señal que dan, sino que también tiene un papel crucial en su persistencia y eliminación del sistema circulatorio. (Simoni et al. 1999; Fox 2001; A. Ulloa-Aguirre et al. 2003; Contents 1998)

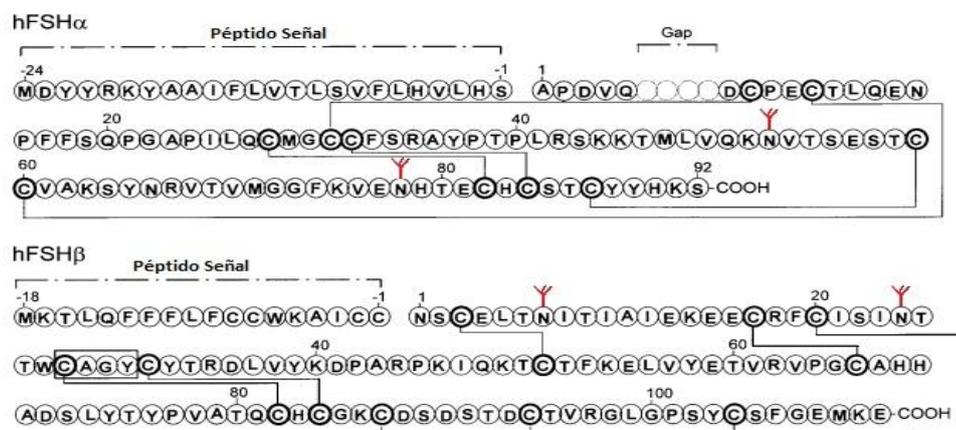


Figura 1. Secuencias aminoacídicas de la subunidad α -FSHh común a las GPH (hFSH α , panel superior) y la β -FSHh (hFSH β , panel inferior) humanas. Las barras sólidas representan la posición de los puentes disulfuros. Las estructuras en rama (rojo) indican los sitios de N-glicosilación. Figura modificada de (Ulloa-Aguirre & Timossi 1998)

Las hormonas glicoproteicas actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) en la superficie de células blanco. Estos receptores pertenecen a la subfamilia de GPCRs con repetidos ricos en leucina (LGRs), se caracterizan por tener un dominio extracelular rico en repetidos de leucina (LRRs) y un dominio del tipo rodopsina de 7 hélices transmembrana (7TM). El dominio extracelular es el responsable de la especificidad y alta afinidad de la unión a ligandos, mientras que el dominio transmembrana es responsable de la activación del receptor y de la transducción de la señal a través de proteínas G. Conforme la hormona se unen a su receptor se desencadenan diferentes cambios conformacionales en el dominio transmembrana. Esta información se propaga a través de la membrana plasmática logrando el intercambio del nucleótido guanina en la proteína G heterotrimérica. Esto lleva a la activación de la adenilato ciclasa produciéndose AMPc iniciando una señal en cascada que lleva a la síntesis de esteroides. (Fan & Hendrickson 2005) Como fue mencionado antes, las hormonas glicoproteicas poseen varias asparaginas unidas a oligosacáridos. Las cadenas carbohidratadas se adjuntan al “core” de la proteína por unión a nitrógeno (N). El proceso de glicosilación para esta hormona se da a través del proceso secretorio, desde su síntesis en el retículo endoplasmático rugoso a través del aparato de Golgi hacia varios destinos intra y extracelulares. Se cree que el grado de glicosilación depende del tipo de estímulo brindado. Las cadenas carbohidratadas de la FSH exhiben diferencias grandes en cuanto a tamaño y estructura, variando desde mono y disacáridos a oligosacáridos ramificados. Las isoformas se diferencian a nivel de los carbohidratos terminales de los cuales generalmente la mitad de los mismos se encuentran o bien sulfatados o con ácido siálico como se muestra en la figura 2 (Bousfield et al. 2008; Walton et al. 2001; Dahl & Stone 1992).

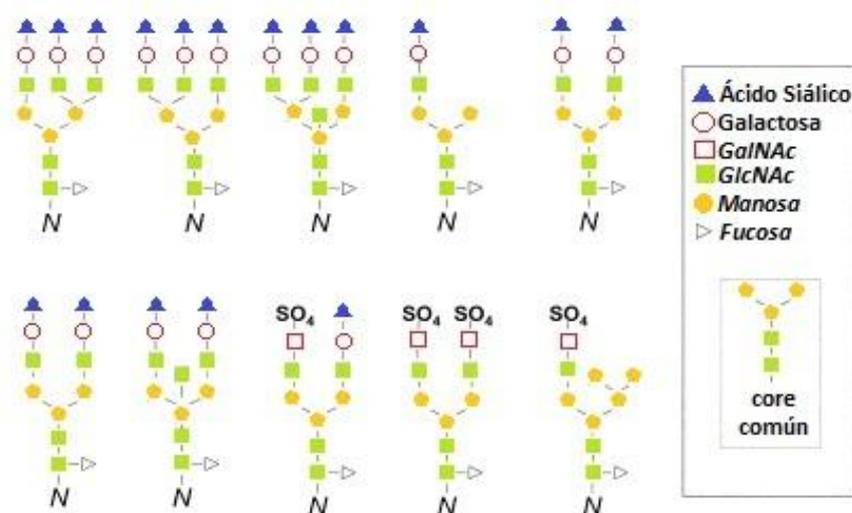


Figura 2. Algunas de las estructuras de los oligosacáridos del tipo unido a N, presentes en la FSH pituitaria de ovinos, bovinos y humanos. Se muestran las estructuras completas, sin embargo muchos otros glicanos pueden encontrarse debido a que las formas de producción (células CHO y Hi-5 de insectos) no presentan la batería enzimática necesaria para lograr estas estructuras produciendo formas parciales de las mismas. Modificada de (Ulloa-Aguirre, A. et al. 2003)

Los usos de la FSH pueden ser de índole terapéutico o de diagnóstico. Dentro de los primeros se incluyen tratamientos para mujeres con hipogonadismo hipogonadotrópico o síndrome de ovario poliquístico, otros pacientes beneficiados del tratamiento con FSH incluyen a aquellos con hiperprolactinemia. El uso de esta hormona en tecnología de reproducción asistida puede dividirse en tres categorías; inducción de la ovulación cuando un único ovocito saludable es requerido, inducción de superovulación para maximizar la eficiencia de la tecnologías de reproducción asistida y por último estimulación de la espermatogénesis. En la tabla 1 pueden verse causas comunes de infertilidad y tratamientos que requieren FSH. En cuanto a su uso como herramienta de diagnóstico mayoritariamente es empleada para verificar el funcionamiento gonadal a través de su concentración en sangre y de las vías de retroalimentación endócrinas clásicas (Grigorova et al. 2007; Messinis 2005; Rose et al. 2000; de Leeuw et al. 1996). El uso de la FSH no se restringe a humanos únicamente, sino que también al ganado siendo suministrada para la superovulación con el propósito de maximizar la eficiencia de la tecnología de reproducción asistida en ganado generando embriones viables (Braileanu et al. 1998; Anitza et al. 2003)

Tabla 1. Causas comunes de infertilidad y tratamientos que requieren de FSH. Abreviaciones: IVF, fertilización in vitro; GIFT, transferencia intrafalopiana de gameto; IUI, inseminación intrauterina; ICSI, inyección espermática intracitoplasmática; ZIFT, transferencia intrafalopiana de cigoto. Tabla modificada de (Rose et al. 2000)

Causa	Tratamiento
<i>Infertilidad Femenina</i>	
Falla ovulatoria	Superovulación seguida por IVF usando ovocitos donados
Disfunción ovárica primaria	Superovulación e IVF
Endometriosis	Superovulación e IVF, GIFT, IUI
Disfunciones o defectos en mucus cervical	Superovulación e IUI, GIFT, IVF, ZIFT
Anticuerpos anti espermatozoos	Superovulación e IVF, IUI
Infertilidad idiopática	Superovulación e IVF, GIFT, IUI
<i>Infertilidad Masculina</i>	
Disfunción espermática	IVF, ICSI
Azoospermia	Estimulación de espermatogénesis con FSH si se debe a hipogonadismo hipogonadotrófico o falla pituitaria

2.2- Expresión de FSH

La obtención de la FSH para investigación o tratamiento clínico se ha logrado básicamente por dos estrategias; de su extracción a partir de la orina de mujeres postmenopáusicas para conseguir las gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG o altamente purificada HP-hMG) o a partir de fuentes recombinantes (rFSH) para las cuales se usa como sistemas de expresión células de ovario de hámster chino (CHO) y células Hi-5 de insecto. Según ensayos realizados se vio que la diferencia en producción de isohormonas entre ambas estrategias radica en que las rFSH presentan más isohormonas básicas que la FSH urinaria. Sin embargo ambas preparaciones de FSH demuestran propiedades biológicas comparables según ensayos realizados “in-vitro” e “in-vivo” en ratas (Lehert et al. 2010; de Leeuw et al. 1996).

La elección de una u otra estrategia exige tener en cuenta los pro y contra de cada una. Las gonadotrofinas recombinantes presentan un avance tecnológico bastante evidente en comparación a la antigua forma de extracción a partir de orina de mujeres postmenopáusicas. Los más evidentes son; la relativa facilidad para su administración y la ausencia de contaminantes, los cuales en los productos provenientes de orina prevalecen y pueden causar problemas inmunogénicos. Pero aún así no hay evidencia para afirmar que la rFSH mejora el producto clínico tanto en la inducción de ovulación estándar como en la fertilización in vitro (IVF). Además de lo anterior, un factor importante a tener en cuenta, es el precio de producción, el cual con los bajos costos de adquisición de la u-FSH hacen que ésta sea elegida preferentemente ante la rFSH. A su vez la apenas mayor eficiencia de la rFSH se ve contrarrestada o compensada por el costo alto de producción de la misma. Es así que si bien ambos tipos de FSH pueden ser suministradas de forma segura y eficiente para inducir la ovulación con resultados parecidos, el costo de obtención de cada tipo de proteína es lo que suele sesgar la decisión por el uso de una u otra (Gleicher 2003; Revelli et al. 2006; van Wely et al. 2011)

2.3- Plantas como sistema de expresión alternativa

Debido al costo de producción de las proteínas recombinantes es que se pensó en las plantas como un posible sistema de expresión heterólogo para las mismas. El término cultivo molecular de plantas (PMF “plant molecular farming” por sus siglas en inglés) refiere a la producción de proteínas recombinantes y otros metabolitos secundarios en plantas. Este término involucra el crecimiento, la cosecha, el transporte, el almacenado y el procesamiento de la extracción y la purificación de la proteína. Las plantas ofrecen una alternativa a la fermentación microbiana y al cultivo de células animales para producción de proteínas recombinantes. Además de los costos menores presenta como ventaja la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales que otros sistemas, como las bacterias, no pueden. Hay tres acercamientos para expresar proteínas recombinantes en plantas; expresión a partir del genoma nuclear de la planta, expresión a partir del genoma de los plástidos y por último, expresión en tejidos que llevan secuencias recombinantes de virus de plantas. Ya que los costos de producción son un factor importante a la hora de decidir qué sistema utilizar es que se pretende lograr una relación costo-beneficio menor, potenciando la expresión de la proteína recombinante en la planta. Para este objetivo de mayor expresión se busca solucionar los problemas de degradación e inestabilidad de proteína foránea en plantas y en cultivos de tejidos vegetales. Dichos inconvenientes son frecuentes debido a los sistemas eficientes que poseen las plantas para hacer frente a agentes externos. Las proteasas son el factor principal responsable por los niveles bajos de acumulación de proteínas heterólogas. Estas proteínas heterólogas producidas por las plantas difieren de su contraparte animal en términos de plegamiento y mayor estructura ordenada lo cual las hace más

vulnerable a la degradación por proteasas. Las estrategias para evitar las proteasas incluyen la expresión específica en organelos o coexpresión ya sea con inhibidores de proteasas o de cofactores y subunidades de las proteínas heterólogas (Streatfield 2007; Doran 2006; Obembe et al. 2011; Desai et al. 2010)

2.3.1- *Physcomitrella patens* como sistema de expresión

P. patens es un musgo perteneciente a la clase briopsida, el cual se encuentra dentro de la división Briofitas y como tal posee un ciclo de vida heteromórfico. El mismo está dominado por la generación gametofítica haploide autotrófica que mantiene un esporofito diploide relativamente simple y principalmente heterotrófico. El gametofito haploide en sí mismo está caracterizado por dos etapas de desarrollo distintas. Una es el protonema, una red compuesta por dos tipos de filamentos, cloronema y caulonema, que pueden diferenciarse fácilmente por algunas características morfológicas de sus células (tamaño y cantidad de cloroplastos, y la posición de los tabiques respecto al eje del filamento). La otra etapa es el gametóforo el cual se diferencia por crecimiento caulinar a partir de un simple meristema apical (Schaefer & J.-pierre Zrýd 2001; Lang et al. 2008)

El utilizar *P. patens* como sistema de expresión presenta algunas ventajas destacándose la posibilidad de obtener modificaciones post-traduccionales similares a las de los mamíferos por ser un organismo eucariota. Además presenta un muy bajo costo en comparación con los cultivos celulares. Por último se sabe también que *P. patens* posee un alto porcentaje de recombinación homóloga, mecanismo que facilita la transformación permanente de la planta integrando en el genoma la secuencia codificante de interés dirigida a un sitio preestablecido. Sin embargo un sistema de expresión basado en plantas presenta sus inconvenientes. La N-glicosilación en células animales/ humanas es diferente a la realizada en plantas porque difieren en cuanto a la maquinaria necesaria para realizar dicho proceso. Las plantas adicionan al glicano azúcares específicos no presentes en glicoproteínas animales como xilosa y α -1,3-fucosa. Estas modificaciones pueden, en teoría, activar la respuesta inmunogénica del organismo y provocar graves complicaciones en el paciente o en el reconocimiento de la proteína por parte de su receptor específico interfiriendo en su actividad biológica. Asimismo, las plantas tampoco sintetizan azúcares específicos de animales como lo son el ácido siálico o como la unión β -1,4 de galactosa al glicano. Para poder sobrellevar estos inconvenientes existen trabajos de ingeniería genética en plantas que se focalizan en dichos problemas y proponen una respuesta novedosa para lograr una glicosilación del tipo humano en plantas. La solución consiste en crear plantas modificadas genéticamente desprovistas de las enzimas que llevan a cabo el agregado de los residuos de xilosa y α -1,3-fucosa, suprimiendo los

genes involucrados en las vías metabólicas de dichos azúcares. A su vez, deben ser capaces de glicosilar con residuos de β -1,4-galactosa mediante la integración en su genoma y expresión de la β -1,4-galactosiltransferasa humana (Bakker et al. 2006; Cox et al. 2006). Por lo anterior es que el modelo *P. patens* no es solo una herramienta para el estudio de la función de genes, sino que también para producción de proteínas recombinantes. Posee por lo tanto varias ventajas para el cultivo molecular de plantas como ser producción de proteínas en suspensiones celulares, la posibilidad de generar mutantes de “knockout” para glicoingeniería y por último optimización cuantitativa para la producción de proteínas (Liénard & Nogué 2009). No obstante para el objetivo general del presente trabajo se utilizará una cepa de *P. patens* sin las modificaciones recién mencionadas, ya que antes de avanzar hasta ese punto se pretende purificar, caracterizar y evaluar la actividad biológica que presenta la FSH producida por cepas de *P. patens* sin humanizar. Con el fin de conseguir lo anterior se clonará la secuencia codificante para la subunidad α -FSH humana en un vector de expresión para vegetales el cual posee varias características importantes detalladas en el punto 4.1 destacándose la presencia de secuencias de homología que permitirían la integración de la construcción génica en el genoma de la planta a través del mecanismo de recombinación homóloga.

2.3.2- Recombinación homóloga

El término “Gene targeting” (GT) hace referencia a la generación de mutaciones específicas en un genoma por integración de secuencias de ADN foráneo mediante recombinación homóloga (RH). Dicha técnica es la base para la generación de conocimiento genómico funcional en bacterias, levaduras y varios hongos filamentosos, debido a que la integración del ADN foráneo en sus genomas mediante RH es muy eficiente por ser dirigida a sitios específicos por secuencias de homología e integrado al mismo por RH. Sin embargo, no puede ser usada rutinariamente en animales y plantas debido a que la integración de secuencias foráneas mediante RH ocurre a magnitudes bastante inferiores a las deseadas, siendo el principal mecanismo la integración aleatoria por medio de un proceso de recombinación ilegítima. A pesar de ello y contrariamente a todas las demás plantas estudiadas hasta el momento la integración de secuencias de ADN en el genoma de *P. patens* ocurre predominantemente en sitios específicos por RH (Schaefer 2002). Esta planta es la única terrestre conocida con una eficiencia de recombinación homóloga tan alta en su ADN nuclear. Según trabajos anteriores y de forma informativa solamente, es posible identificar al menos cuatro modelos por los cuales se cree que actuaría el mecanismo de integración de ADN transformante (Figura 3) (Kamisugi et al. 2006; Hohe et al. 2004; Schaefer & J.-P. Zryd 1997; Kamisugi et al. 2005).

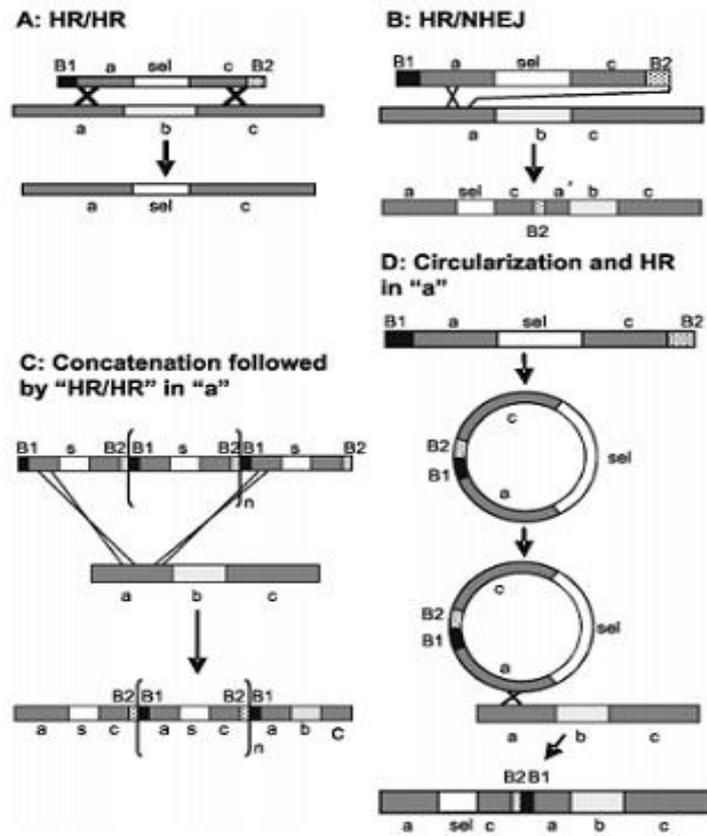


Figura 3. Posibles modelos de integración por ADN transformante. B1 y B2, son secuencias distintas no homólogas entre ellas, a, b y c son regiones de un gen, s es el casete del marcador de selección. **A)** El fragmento transformante se integra por RH en ambos brazos del vector y como resultado se tiene un reemplazo del gen blanco perfecto. **B)** En este caso uno de los brazos del vector se integra por RH y el otro por una unión de extremos no homólogos (NHEJ) **C)** Se producen concatémeros del vector, el cual mediante dos RHs que ocurren en regiones separadas "a" del mismo se integra en la región "a" del genoma. **D)** Circularización del fragmento por NHEJ y posterior RH en un solo punto en la región "a" genera un locus transgénico indistinguible con el producido en C. Figura extraída de (Kamisugi et al. 2006)

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo General

El objetivo general dentro de esta línea de investigación, que trasciende la presente tesis, es generar una cepa de *P. patens* que contenga en su genoma las dos CDSs pertenecientes a las subunidades α y β de la FSH humana, necesarias para la producción de la hormona heterodimérica funcional. Para ello en nuestro laboratorio se dispone actualmente de una cepa de *P. patens*, modificada, que presenta la CDS de la subunidad β -FSHh ya integrada a su genoma y que expresa dicha cadena polipeptídica. Por lo tanto, como primer paso, sería necesaria la construcción de un vector que permitiera integrar la CDS de la subunidad α -FSHh en un locus distinto al que se encuentra la CDS de la subunidad β -FSHh. Una vez logrado lo anterior, como segundo paso, debería transformarse la cepa de *P. patens* que contiene la CDS de β -FSHh con dicho vector y realizar el “screening” para detectar aquellas que posean ambas secuencias codificantes integradas en su genoma. Al lograrse lo anterior se le estaría proporcionando a la planta la capacidad de formar el heterodímero por coexpresión de ambas subunidades pudiéndose purificar y evaluar su actividad biológica.

3.2- Objetivo Específico

El mismo se centra en el primero de los pasos mencionados en el párrafo anterior para lograr el objetivo general y consiste en la producción de un vector de expresión en plantas, que permita la integración de la secuencia codificante de la subunidad α -FSHh en el genoma de *P. patens*. Para esto la construcción genómica deberá formarse a partir de un plásmido, que contenga secuencias reguladoras de plantas, y la CDS de la α -FSHh. Una vez lograda la misma será posible proseguir con la segunda parte de los objetivos, la obtención en sí, de una cepa de *P. patens* que posea ambas CDSs integradas en su genoma.

4- ESTRATEGIAS

4.1- Estrategia General

Con el presente trabajo se busca acercarse al objetivo final de construcción de una cepa de *P. patens* cuyo genoma contenga y sea capaz de coexpresar ambas subunidades de la FSHh para obtener dicho heterodímero. A su vez para lograr tanto una transformación exitosa de *P. patens* como un alto grado de expresión, es necesaria la correcta selección del vector de expresión que se utilizará para incorporar la secuencia deseada en su genoma. Este vector requiere la presencia de determinadas regiones que corresponden a: secuencias de homología en 5' y en 3' para dirigir la construcción génica al locus de interés, un marcador de selección, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. Asimismo, deberá presentar un sitio de restricción que permita incorporar el inserto en el vector y otro que logre linealizar la construcción génica para posteriormente realizar la transformación en la planta.

En el laboratorio se dispone de dos vectores que cumplen con las especificaciones antes mencionadas, un vector derivado de pTHAct, conteniendo la CDS de la subunidad alfa de la FSHh, y un vector derivado de pTHUbi que contiene la secuencia codificante de la subunidad beta de la FSHh. Ambos son vectores de expresión específicos para células vegetales ya que poseen promotores de Actina de arroz y Ubiquitina de maíz (vectores pTHAct-hFSH α y pTHUbi-hFSH β respectivamente). La desventaja para el objetivo particular de esta línea de investigación es que ambas construcciones tienen sus secuencias de homología que apuntan al mismo locus del genoma de *P. patens* ("locus 108"). Una cotransformación con estos vectores daría lugar a una cepa de *P. patens* portadora de una subunidad de la FSHh, ya sea la alfa o la beta, debido a que solo posee un único sitio en su genoma en el cual ambas secuencias pudieran recombinar e integrarse. Tanto los vectores anteriores como las cepas de *P. patens* logradas por transformación con los mismos fueron obtenidos de trabajos previos realizados en el laboratorio.

Teniendo en cuenta lo anterior sería posible plantear dos estrategias para lograr el mismo objetivo final. Una de ellas sería realizar una única construcción dirigida al "locus 108" que contuviese ambas CDSs de las subunidades de FSHh con promotores distintos para cada una (promotor de Actina para la α -FSHh y de Ubiquitina para β -FSHh). Adicionalmente para la eficiencia de la transformación se requiere que las mismas estén ubicadas una a continuación de la otra y que a su vez en los extremos de dicho constructo se encuentren las regiones de homología que dirigirán la recombinación homóloga en el sitio blanco. Una estrategia alternativa consiste en la construcción de un tercer vector que difiera de los antes mencionados en su región de homología, es decir que dirija la recombinación homóloga a un sitio diferente al "locus 108". En este caso se utilizaría una de las cepas de *P. patens*, que contenga la CDS de una de las

subunidades de FSH inserta en el “locus 108” para ser retransformada con el vector nuevo de forma tal que la inserción de la CDS de la otra subunidad vaya dirigida a un sitio diferente del “locus 108” y así poder expresarse el heterodímero funcional de la FSHh.

Debido a que la primera estrategia mencionada fue abordada en el trabajo de pasantía de la Lic. Milagros Mailhos, el presente trabajo se centró en la segunda estrategia planteada, con el fin de crear un vector que contenga la CDS de la subunidad α -FSHh y que dirija la inserción al locus Pphb7.

4.2- Estrategia Específica

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó un vector de expresión que cuenta con las características mencionadas en el punto 4.1, llamado pTFH15.3, el cual se muestra en la figura 4. El mismo fue cedido por el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (LBMV).

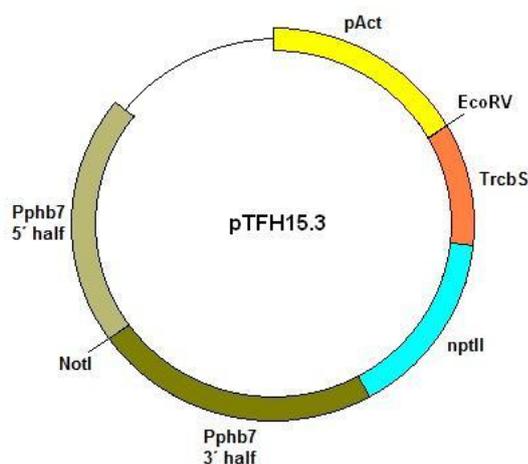


Figura 4. Vector pTFH15.3. Amarillo, promotor de actina de arroz. Naranja, terminador de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (TrcbS). Celeste, casete de resistencia a kanamicina. Verde oscuro, mitad de la secuencia en 3' homóloga al locus blanco y verde claro mitad de la secuencia en 5' homóloga al locus blanco. *NotI* y *EcoRV*, sitios de restricción para dichas enzimas que se utilizarán para linealizar y clonado respectivamente.

Debido a que en trabajos anteriores la cepa de *P. patens* transformada con pTHUbi-hFSH β fue la que dio mejores resultados a la hora de expresar la proteína recombinante, se decidió utilizar la misma para ser retransformada con un vector que contenga la CDS de la subunidad alfa de la FSHh. Por ello se concibió como estrategia específica seguir los pasos que se muestran en la figura 5, comenzando por amplificar la CDS de la subunidad α -FSHh humana a partir del plásmido 4 α -pENTR-2B Gateway, ya disponible en el laboratorio. Para la obtención de la CDS se

realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 320 y 321A (directo y reverso respectivamente). El cebador 320 hibrida en el extremo 5' de la CDS al inicio de la secuencia del péptido señal PpXTH1 y el 321A hibrida en el extremo 3' sentido opuesto al anterior y al final de la CDS. Para la amplificación se utilizó la polimerasa Pfu, debido a que no posee actividad transferasa terminal creando extremos romos, condición necesaria para la posterior ligación con el vector digerido previamente con *EcoRV* (ver más adelante). Además, debido a que los oligonucleótidos sintéticos que se usan como cebadores en la PCR tienen extremos 5'-OH, fue necesario fosforilar el fragmento de ADN que contiene la CDS α -FSHh obtenida por PCR para que pudiera tener lugar la reacción de ligación con el vector desfosforilado.

Para preparar el vector pTFH15.3 se realizó en primera instancia, una retransformación de células de *E. coli*. de las cuales mediante preparación de ADN plasmídico se obtuvo cantidad suficiente de ADN con el cual trabajar. El sitio del plásmido pTFH15.3 donde se decidió insertar la CDS es el sitio que reconoce la enzima *EcoRV*, una enzima que produce extremos romos, y que fue utilizada para linealizar el plásmido. Para evitar la religación del vector sobre sí mismo, fue necesario desfosforilarlo una vez linealizado. Dicho paso se realizó incubando el vector con fosfatasa alcalina la cual hidroliza el fosfato en 5' del ADN plasmídico lineal.

Una vez obtenidos el vector, linealizado y desfosforilado, y la CDS fosforilada se procedió a efectuar la reacción de ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster en moléculas de ADN doble cadena entre extremos 3'-hidróxilo y 5'-fosfato próximos entre sí.

Para realizar la transformación con la construcción génica que se obtendría siguiendo los pasos anteriores, se procedió a utilizar células competentes de *E. coli*, las cuales mediante "shock" térmico ingresarán los diferentes constructos obtenidos. Luego se sembraron en medio de cultivo LB-Agar-Kanamicina para seleccionar los clones transformantes que hayan ingresado el vector y expresen el casete de resistencia al antibiótico kanamicina. Una vez obtenidas las colonias transformantes y con el propósito de detectar cuáles de éstas poseen la molécula de interés, se procede al "screening" como se explica a continuación.

A partir de los clones crecidos en placas de LB-Agar-Kanamicina se inocularon medios de cultivo líquido LB-Kanamicina para realizar minipreparaciones de ADN plasmídico. Estas minipreparaciones de ADN plasmídico fueron analizadas con enzimas de restricción y electroforesis. Dicho análisis consiste en la digestión de las mismas con la enzima de restricción *XbaI*, la cual de acuerdo a lo esperado para el vector con inserto produciría tres fragmentos de 5183, 2353 y 296 pb (pares de bases). En caso contrario se apreciarían únicamente dos fragmentos de 7159 y 296 pb. El resultado de la digestión será visualizado en una electroforesis en gel de agarosa y una vez identificados los clones con el patrón de restricción deseado se continuará con un análisis por secuenciación.

Los clones con el patrón de restricción esperado fueron enviados a secuenciar al servicio de secuenciación de ADN del Institut Pasteur de Montevideo, como forma de corroborar que las secuencias obtenidas no se hayan visto modificadas durante el proceso de clonado. Adicionalmente y debido a que la clonación que se realizará no es direccional, la secuenciación también permitirá discriminar los vectores en los cuales el inserto se haya clonado en el sentido adecuado. El cebador que se utilizará para corroborar la correcta inserción de la CDS será el 311 (directo) el cual hibrida en el exón III de la CDS de α -FSHh. Si el sentido en que se integró el inserto fue el correcto se esperaría que a continuación de la CDS estuviese la secuencia de terminación de la rubisco (TrbcS). Una vez corroborado lo anterior se retransformaron bacterias competentes de *E. coli* con el vector, cuya secuencia fue corroborada por secuenciación, con la finalidad de obtener mayor cantidad del mismo.

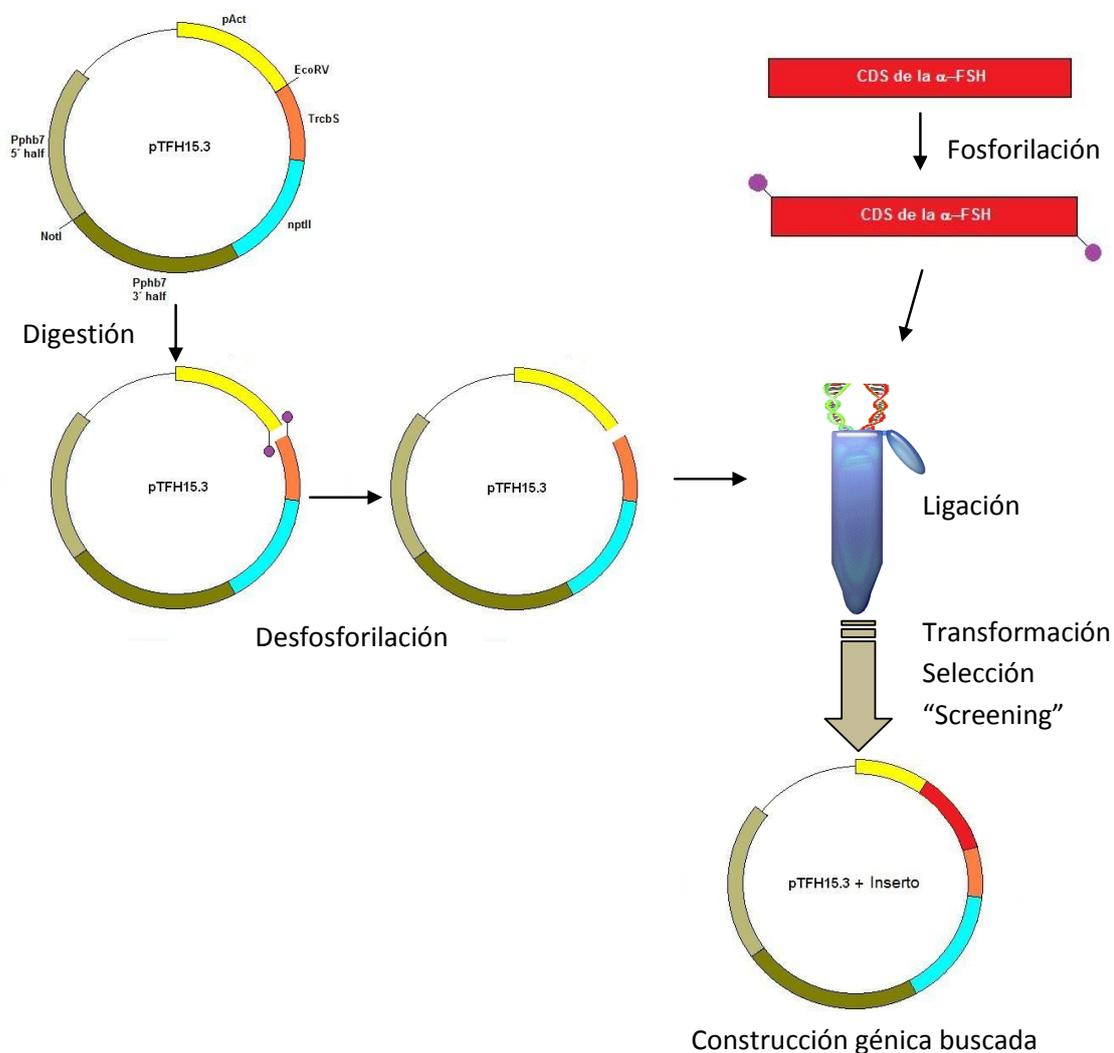


Figura 5. Representación esquemática de la estrategia específica a utilizar para lograr el objetivo concreto del trabajo. Se plantea la digestión y desfosforilación del plásmido pTFH15.3, así como también la fosforilación de la CDS obtenida por PCR. Posteriormente se realiza la reacción de ligación para seguir con la transformación, selección y "screening" pertinente para conseguir la construcción genética de interés. Círculos púrpuras representan extremos 5' fosforilados.

5- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1- Cepas de *Escherichia coli*

DH5 α : Ceba proporcionada por el laboratorio, en estado de competencia, para transformación. Genotipo; *F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(*r_k⁻ m_k⁺*), Γ .

TOP10F': Proporcionada por el laboratorio. Para preparar electrocompetentes se siguió el protocolo del punto 5.5.13 del presente índice. Genotipo; *F [lacI^d Tn10(Tet^r)] mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG*

5.2- Medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo líquido se utilizó LB (Sigma-Aldrich, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante a una concentración final de 20 gramos por litro. En los casos en que se necesitó preparar medio de cultivo sólido (LB-Agar) se agregaron 15 gramos de agar por litro de LB. La esterilización se realizó por autoclave programando el equipo a 120 °C por 20 minutos. Los antibióticos utilizados para preparar medios selectivos (LB-Kanamicina, LB-Agar-Kanamicina, LB-Ampicilina y LB-Agar-Ampicilina) fueron agregados mediante técnica aséptica, post esterilización de los medios, a una concentración final de 50 μ g/mL.

5.3- Cebadores

Los cebadores utilizados fueron proporcionados por el laboratorio y son los listados en la tabla 2.

Tabla 2: Cebadores utilizados durante la tesis, se especifican sus respectivas secuencias y Tms. Los cebadores 320 y 321A, se usaron para las reacciones de PCR. Los restantes (311, 318 y 319) fueron los empleados para el "screening" por análisis por secuenciación.

Cebador	Secuencia	Tm (°C)
311	5'-cctgatgtgcaggattgccagaatgcac-3'	64.8
318	5'-gctctgccgattttgctgctgctgtgttgccacgcatggtcg-3'	72.6
319	5'-tccatgggggttcaatagagggtgcaatgcgctctgccgattttgc-3'	70.5
320	5'-gtgggatccatgggggttcaatagagg-3'	60.7
321A	5'-attgaattcttaagatttggataataacaagtactgc-3'	53.7

5.4- Soluciones y buffers

Todas las soluciones y buffers se prepararon siguiendo sus respectivos protocolos,

proporcionados por el laboratorio.

5.4.1- Soluciones para preparación de ADN plasmídico

Solución I: Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 10 mM pH=8

Solución II: NaOH 0.2 M, SDS 1%

Solución III: 60 mL de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de H₂O miliQ.

5.4.2- Buffers

Preparación stock de Tris-acetato-EDTA (TAE 50X) como buffer de corrida electroforética:

Se disuelven 48.4 gramos de Tris-base (Sigma-Aldrich, USA) en 20 mL de EDTA 0.5M (Arnesco, USA), 11.42 mL de ácido acético glacial y H₂O miliQ c.s.p 200 mL.

Para preparar buffer TAE 0.5X

Se diluyen 10 mL de buffer TAE 50X en 990 mL de H₂O miliQ.

5.5- Técnicas utilizadas

5.5.1- Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR tuvo como propósito la obtención de la CDS de la subunidad α -FSHh. Para dicho fin se decidió utilizar el plásmido 4 α -pENTR-2B como molde para recuperarla. La reacción se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 2400.

Las alícuotas utilizadas para la amplificación por PCR fueron calculadas en base a un volumen final de reacción de 50 μ L. Según lo anterior es que fueron empleados 1 μ L del plásmido (equivalente a 1:30 del producto de una minipreparación de plásmido), 5 μ L de Pfu PCR buffer 10X (SBS, China), 1 μ L de dNTPs 10Mm, 2 μ L de cada cebador (320 y 321A), 0.5 μ L de enzima Pfu ADN Polimerasa 5 u/ μ L (SBS, China). Se utilizó agua miliQ para completar el volumen restante para cada reacción. La programación del termociclador fue la siguiente; para la fase de desnaturalización inicial se realizó un ciclo único a 94 °C durante 5 minutos, la segunda fase, en la cual se da la amplificación, es de 30 ciclos de tres etapas desnaturalización, hibridación y elongación con temperaturas y tiempos de 94 °C/30 segundos, 53 °C/30 segundos y 72 °C/40 segundos respectivamente. Por último se programó una etapa final a 72 °C por 10 minutos.

5.5.2- Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica fue utilizada para analizar los productos de digestión, de ligación, la correcta fosforilación o desfosforilación del inserto y el plásmido respectivamente, así como también para visualizar los productos de las minipreparaciones de ADN plasmídico, lo positivo o no de las reacciones de amplificación de ADN por PCR y las purificaciones de ADN. Para cualquiera de los casos anteriores los geles fueron preparados en buffer TAE 0.5X con una misma concentración de agarosa 0.8% (m/v) para la cual se usó un horno microondas para ser fundida. Con el propósito de visualizar las muestras de ADN en el transiluminador UV, se le adicionó 1 μ L de “Goldview Nucleic Acid Stain” (Beijing SBS, China) por cada 50 mL de gel preparado.

Para realizar la electroforesis se acondicionaron las muestras agregándole buffer de carga 6X (Fermentas, USA) conteniendo azul de bromofenol, xylene cyanol y glicerol. En cuanto al marcador de peso molecular se utilizó el mismo para todos los casos “GeneRuler™ DNA Ladder Mix” 100-10000 pb (Fermentas, Lituania). Para todos los casos el voltaje empleado fue de 100 V variando el tiempo de corrida en base al tamaño de los fragmentos de ADN analizados.

5.5.3- Purificación de ADN

Se realizaron dos tipos de purificaciones, una a partir de las bandas visualizadas en geles de agarosa y otra a partir de las reacciones de desfosforilación, fosforilación, amplificación por PCR y minipreparaciones de ADN plasmídico. Para todos los casos, menos minipreparaciones de ADN plasmídico, se siguieron las recomendaciones de los fabricantes del kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, K2100-12 50 preparaciones (Invitrogen). La purificación de minipreparaciones de ADN plasmídico para secuenciar se realizó según protocolo del kit Ron's Gel Extraction Kit (BioRon GmbH, Alemania)

Dependiendo del caso, el volumen final de elución para las columnas de purificación fue de 40-50 μ L. Para verificar el correcto proceder del protocolo de purificación se realizó para cada instancia electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 0.8% (v/m)

5.5.4- Cuantificación de ADN

Para el análisis cuantitativo y cualitativo del grado de pureza de las muestras purificadas obtenidas según el punto 5.5.3 del presente ítem, se realizaron medidas de absorbancia a $\lambda=260$ nm y 280 nm mediante un espectrofotómetro de microvolúmenes en gota (“nanodrop”, equipo ACTGene ASP-3700- New Jersey, USA).

Medidas estimativas en cuanto a concentración de ADN también fueron realizadas comparando las intensidades de fluorescencia entre las bandas del marcador del peso molecular y las muestras en gel.

5.5.5- Transformación de células quimiocompetentes

Las transformaciones y retransformaciones de células quimiocompetentes se realizaron en cepas de *E. coli* DH5 α . Se agregaron 1-5 μ L de mezcla de ligación o vector para retransformar (dilución 1/10 para retransformar) a cada eppendorf con 50 μ L de células competentes previamente descongeladas. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. El proceso de transformación en sí, se realizó por choque térmico en el paso siguiente colocando los eppendorfs en baño a 42 °C durante 90 segundos para luego incubarse en hielo por 2 minutos. A continuación se le agregaron 500 μ L de LB líquido y se dejó en agitación a 37 °C de 30 minutos a 1 hora. Finalmente se sembraron 50-200 μ L de la transformación en medio sólido LB-Agar-Kanamicina y se dejó incubando durante la noche a 37 °C.

5.5.6- Minipreparación de ADN plasmídico

Para lisar las células bacterianas y obtener el ADN plasmídico se utilizó el método de lisis alcalina. Para ello la noche anterior se tomó una colonia, crecida aisladamente de las demás en placas de LB-Agar-Kanamicina, y se colocó en un tubo conteniendo 3 mL de medio de cultivo LB-Kanamicina. Se dejó crecer durante la noche con agitación y a 37 °C. Al día siguiente, luego de corroborar crecimiento bacteriano por grado de turbidez en el tubo, se centrifugó en microcentrífuga (Beckman ETM) 1.5 mL de los 3 mL iniciales a 12000 rpm durante 2 minutos. Luego de descartar el sobrenadante se adicionaron los 1.5 mL restantes volviéndose a centrifugar de igual manera. A continuación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μ L de Solución I, luego se le agregaron 200 μ L de Solución II mezclándose suavemente por inversión. Seguidamente se le agregaron 200 μ L de Solución III, se mezcló agitando rápidamente y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos. Se recuperaron los 600 μ L del sobrenadante depositándose en otro eppendorf conteniendo 900 μ L de Isopropanol. Una vez más, se centrifugó por 30 minutos a 14000 rpm descartando el sobrenadante. Se agregaron 0.5 mL de etanol 70% se realizó una última centrifugación de 15 minutos a 13000 rpm descartando el sobrenadante y dejando secar el precipitado. Para eliminar la contaminación por fragmentos de ARN, una vez evaporado el etanol, se resuspendió el precipitado en 30 μ L de agua miliQ con ARNasa 50 μ g/ml.

Para corroborar la presencia de ADN plasmídico se realizaron electroforesis en geles de agarosa 0.8%. Las minipreparaciones de ADN plasmídico se guardaron en freezer a -20 °C.

5.5.7- Digestión de plásmidos

Los mapas de restricción fueron obtenidos con el programa *BioEdit* 7.0.5.3. En la tabla 3 se muestran las características de las digestiones realizadas en el vector y en el constructo (vector+inserto) que producen las enzimas utilizadas en el proyecto.

Tabla 3: Cuadro de enzimas de restricción y digestión utilizadas en la tesis. Se especifican nombres de enzimas, fragmentos en cantidad y tamaño que genera cada una tanto en el vector como en la construcción génica buscada.

ENZIMA	N° de fragmentos creados Tamaño fragmentos (pb)	
	Vector/Construcción génica (Vector+Inserto)	
<i>Bcl</i> I	2/2	4926, 2529/5303, 2529
<i>Dpn</i> I	Digiere ADN metilado	-----
<i>Eco</i> RV	1/1	7455/7832 circular oவில்lo
<i>Not</i> I	1/1	7455/7832
<i>Swa</i> I	1/1	7455/7832
<i>Xba</i> I	2/3	7159, 296/5183, 2353, 296

Digestión del vector pTFH15.3 con *Eco*RV:

Las digestiones realizadas en este vector con la enzima de restricción *Eco*RV tuvieron como propósito prepararle para la reacción de ligación con la CDS de la subunidad α -FSHh. El mismo posee un único sitio de restricción ubicado en el sitio de policlonado. Las digestiones fueron planeadas para efectuarse en un volumen total de 20 μ L, 2 μ L buffer NEB3 10X (New England Biolabs, USA), 0.2 μ L BSA, 1 μ L del plásmido pTFH15.3, 0.5 μ L de enzima *Eco*RV (10U) y 16.3 μ L de agua miliQ. La reacción transcurrió en estufa a 37 °C durante 2 horas. El producto de esta digestión es un plásmido linealizado con extremos romos. La presente reacción también se realizó para corroborar la inserción de la CDS en el vector ya que si esto ocurría se perdería el sitio de restricción para *Eco*RV visualizándose un plásmido no digerido y de un tamaño mayor al esperado para el plásmido sin inserto una vez realizada la corrida electroforética.

Digestiones para análisis de plásmidos:

Durante el “screening” una de las primeras estrategias abordadas para analizar los plásmidos con los que se trabajó y los obtenidos en los experimentos fue el análisis de restricción. El mismo infiere, pero no corrobora, la identidad del plásmido digerido mediante patrones de restricción.

NotI (Promega, USA): Produce un único corte en el plásmido, linealiza y prepara al mismo para la transformación en *P. patens*. La digestión fue planeada y realizada de igual manera que con *EcoRV* con la salvedad de que se agregaron 2 μL de la minipreparación de ADN plasmídico en vez de 1 μL .

SwaI (Fermentas, USA): Provoca un único corte en el plásmido linealizándolo. Digestión planificada de igual forma que para *NotI*, se incubó por 2 horas a 30 °C en Termoblock del laboratorio de Biología Molecular Vegetal.

BclI (Promega, USA): Produce dos fragmentos de ADN por poseer dos sitios de restricción en el plásmido a ser analizado. El protocolo de digestión es el mismo que para las enzimas anteriores, su incubación se realiza a 50 °C durante 2 horas.

XbaI (New England Biolabs, USA): Produce una variante según se esté digiriendo el vector con el inserto incorporado o el vector sin inserto, en el primer caso la enzima produce tres cortes creando tres tipos de fragmentos de ADN, en el segundo produce únicamente dos cortes y por lo tanto dos tipos de fragmentos. La reacción se planificó de igual manera que para los tres casos anteriores y la incubación de la mezcla de reacción fue a 37 °C durante 3 horas.

Digestión para descontaminar el inserto:

Para eliminar los problemas de contaminación, por ADN metilado que pudiese estar presente en la muestra, se realizó la digestión del mismo con la enzima *DpnI*.

DpnI (Fermentas, USA): La reacción fue planificada para un volumen total de 20 μL , 2 μL de buffer Tango 10X, 2 μL de inserto, 1 μL de *DpnI* y 15 μL de agua miliQ para completar el volumen final de reacción. Se mezcló suavemente y se dio un “spin” de unos segundos en la microcentrífuga para homogenizar la mezcla. Se incubó en termociclador Perkin Elmer modelo 2400 programando dos ciclos, uno a 37 °C durante 1 hora 30 minutos para la reacción de digestión y otro a 80 °C durante 20 minutos para inactivar la enzima.

Todos los productos de digestión fueron analizados en gel de agarosa 0.8% (m/v).

5.5.8- Desfosforilación del plásmido digerido

Una vez digerido el plásmido pTFH15.3 se prosiguió a la desfosforilación del mismo para evitar su recircularización al momento de la ligación dándole preferencia a la reacción plásmido-inserto. Para esta reacción se calculó la cantidad de enzima a usar, para los 49 μL (170 ng/ μL) de vector digerido, teniendo en cuenta que por pmol de extremos se necesitan 0.01 U de enzima. El volumen total en el que se dio la desfosforilación fue de 60 μL . De esta forma es que la mezcla de reacción de desfosforilación se compuso de 6 μL de CIAP buffer 10X, 0.5 μL de fosfatasa alcalina

CIAP (Promega, USA), 49 μL de vector digerido y 4.5 μL de agua miliQ. Se usaron 0.5 μL de enzima por no poder alicuotar lo calculado (0.033 μL) para la concentración de pmoles disponible en esta reacción. Se incubó en termociclador programando un ciclo de 15 minutos a 37 °C seguido de 15 minutos a 56 °C, una vez terminado el mismo se le agregó a la mezcla otros 0.5 μL de enzima y se volvió a repetir el ciclo una última vez.

La purificación de la reacción de desfosforilación se realizó por kit según punto 5.5.3 para muestras en solución.

Para corroborar que tuvo lugar la desfosforilación se planteó, con una alícuota del producto de la misma, una reacción de ligación como se especifica en el punto 5.5.13 y una posterior electroforesis en gel de agarosa 0.8% para ver si hubo o no ligación de los fragmentos de ADN.

5.5.9- Fosforilación de la CDS

Para la fosforilación de la CDS de la subunidad α -FSHh amplificada por PCR se realizaron dos acercamientos.

Fosforilación de la CDS ya amplificada por PCR:

Una vez realizada la PCR, se purifica por kit según punto 5.5.3. Se plantea la reacción para un volumen total de 10 μL siendo, 6 μL de inserto, 2 μL de agua miliQ, 1 μL de buffer T4 polinucleótido quinasa 10X y 1 μL de enzima T4 polinucleótido quinasa (10U). La mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos para que se diese la reacción, seguido se realizó una etapa de inactivación de la enzima que consistía en una incubación a 65 °C por 20 minutos.

Fosforilación de cebadores (320, 321A) pre amplificación por PCR:

Otra forma de lograr la CDS fosforilada es realizar la reacción de fosforilación con los cebadores antes de llevar a cabo la PCR. Los cebadores (100 mM) fueron proporcionados por el laboratorio, se necesitan en dilución 1/10 para un volumen final de 20 μL . Se toman 2 μL de cada cebador y se diluyen en 18 μL de agua miliQ cada uno. La reacción de fosforilación se planteó para un volumen final de 50 μL y 200 pmoles de extremos. 20 μL de cebador (320 o 321A), 5 μL buffer T4 polinucleótido quinasa 10X, 1 μL de enzima T4 polinucleótido quinasa (10U) y 24 μL de agua miliQ. Los pasos siguientes de incubación e inactivación de la enzima son los mismos descritos en el párrafo anterior.

5.5.10- Construcción plásmido T

Esta estrategia se piensa para evitar la recircularización del plásmido y dar especificidad a la reacción de ligación vector-inserto, crea extremos cohesivos. A partir de dTTP 100 mM proporcionado por el laboratorio se tomó 1 μL y se diluyó en 10 μL de agua miliQ para una concentración final 10 mM. Para un volumen total de 50 μL se colocaron 4 μL de plásmido pTFH15.3 digerido, 5 μL de buffer enzima Taq polimerasa 10X, 1 μL dTTP (10 mM), 0.5 μL de enzima Taq polimerasa (100 U) y 39.5 μL de agua miliQ. Se incubó 1 hora a 72 °C.

5.5.11- Adenilación del inserto

El inserto utilizado se obtuvo con cebadores fosforilados y fue tratado con *DpnI* según se especifica en el punto 5.5.7 para posteriormente ser purificado por kit eluyéndose en 20 μL . Para un volumen total de 50 μL se incorporaron 20 μL de inserto tratado, 5 μL de buffer enzima Taq polimerasa 10X, 1 μL dNTP (10 Mm), 0.5 μL de enzima Taq polimerasa (100 U) y 22.5 μL de agua miliQ. Se incubó 1 hora a 72 °C.

5.5.12- Ligación

Se realizaron dos tipos de ligación, una para extremos romos y otra para extremos cohesivos, la diferencia entre ambos es el agregado en el primer caso de polietilenglicol (PEG), el mismo incrementa la eficiencia de la reacción cuando la ligación es entre extremos romos. La mezcla de ligación se pensó para un volumen final de 10 μL , 5 μL de inserto fosforilado, 1 μL plásmido digerido y desfosforilado, 1 μL buffer de ligación 10X, 1 μL PEG, 1 μL de T4 DNA ligasa (New England BioLabs) y 1 μL agua miliQ. Para el segundo caso, ligación entre inserto adenilado y fosforilado con plásmido T, se utilizaron los mismos volúmenes de buffer, inserto, plásmido y enzima que para la reacción anterior, pero se prescindió de PEG utilizándose en cambio 2 μL de agua miliQ en vez de 1 μL .

En ambos casos los controles para las reacciones de ligación se realizan sustituyendo el volumen que corresponde al inserto por agua miliQ.

Cada mezcla de ligación y sus controles respectivos se realizaron por duplicado para efectuar métodos diferentes de incubación, uno a 4 °C durante la noche y otra a temperatura ambiente por 1 hora.

5.5.13- Bacterias electrocompetentes

Para preparar las bacterias electrocompetentes para transformación, el día anterior se sembraron en 5 mL de medio precultivo líquido LB un inóculo de bacterias TOP 10 F' en glicerol. Se le adicionó tetraciclina a una concentración final de 50 µg/mL y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C. El día siguiente se inóculó un matraz conteniendo 200 mL de LB con los 5 mL de precultivo y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica a $\lambda=600$ nm de 0.8. Manteniendo en hielo se realizaron 3 lavados consecutivos con agua miliQ estéril, centrifugando a 2000 g por 10 minutos. Se efectuó un último lavado con solución de glicerol 10 %. Por último se resuspendió en 500-800 µL de glicerol 10 % y se alicuotó de a 40 µL.

5.5.14- Electroporación

Para electroporar, las mezclas de ligación y controles debieron ser purificados por kit (según ítem 5.5.3) antes de agregárselos a las células electrocompetentes, de esta forma se eliminan las sales que podrían provocar la lisis celular una vez aplicada la descarga eléctrica.

Se usaron cubetas para electroporación de 0.2 cm y el "Bacterial protocol 2" de la electroporadora Gene Pulser Xcell de BioRad. Dicho protocolo realiza un pulso de 2500V por 8.0 milisegundos para 40 µL de bacterias electrocompetentes. Se utilizaron 4 µL de ADN para electroporar el cual podría provenir de la mezcla de ligación o del control de ésta. Inmediatamente luego de generado el pulso, se agregaron 500 µL de LB a la cubeta, se homogeneizó y se pasó el contenido de dicha cubeta a un eppendorf para incubar a 37 °C durante 1 hora 40 minutos en agitador. Una vez transcurrido este tiempo se sembró en LB-Agar-Kanamicina (o Ampicilina) 100-200 µL de suspensión bacteriana y se dejó crecer a 37 °C durante la noche en estufa.

Para retransformaciones se realizaron diluciones 1/10 del vector a retransformar, tomándose 1 µL para electroporar.

5.5.15- Cálculo de Eficiencia de Transformación

Utilizando las bacterias electrocompetentes preparadas, se realizó una transformación por electroporación con el plásmido estandarizado pUC 19 (10 pg/µL, Invitrogen) con la finalidad de medir la eficiencia de transformación de las mismas.

Se utilizaron tres tubos eppendorf conteniendo 40 µL de electrocompetentes cada uno, a dos de ellos se les adicionó 5 µL de plásmido estandarizado (T₁ y T₂) y al tercero 1 µL del plásmido pTFH 15.3 de stock obtenido mediante minipreparación de ADN plasmídico. Una vez

realizada la transformación, agregados los 500 μL de LB e incubado una hora cuarenta minutos se preparó una dilución 1:5 (10 μL $T_{1/2}$ + 40 μL LB) tanto para T_1 como T_2 , para sembrar en medio LB-Agar-Ampicilina, por último se incubó a 37 °C durante la noche. Cada placa se dividió en cuatro cuadrantes y el promedio de células transformantes por placa se realizó contando dos de ellos y promediándolos entre si, luego se multiplicó por cuatro para obtener el total de colonias estimadas por placa. Por último se promedió entre las dos placas dando de este modo la cantidad estimada de células transformantes para 10 μL de los 545 μL totales de la transformación (5 μL plásmido estandarizado + 40 μL de células electrocompetentes + 500 μL LB). De la relación anterior se obtiene la cantidad estimada de células transformantes totales por transformación. Dividiendo este valor entre μg de ADN usado en la transformación (50×10^{-6} μg), se obtuvo la eficiencia de transformación (resultados en punto 6.5.1).

5.5.16- Purificación de plásmidos para secuenciación

De las colonias crecidas en placas LB-Agar-Kanamicina, que hayan dado como resultado de digestión un patrón de restricción de interés, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico para secuenciar y obtener stock de esos plásmidos.

Para secuenciar se tomaron 60 μL , de los 510 μL obtenidos por miniprep, y se purificaron según recomendaciones del fabricante por kit Ron's Gel Extraction Kit (BioRon GmbH, Alemania), el volumen total en que se eluyó fue de 67 μL .

6- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1- Obtención de la CDS

La correcta amplificación de la CDS es crucial para asegurar la conservación de la secuencia nucleotídica y por lo tanto aminoacídica de la proteína, así como también para obtener concentración suficiente de la misma para los ensayos a realizar en instancias posteriores. Como fue referido en la sección 4.2, la CDS de α -FSH debe ser clonada en el vector pTFH15.3 linealizado con *EcoRV* y desfosforilado. Por lo tanto, el fragmento a clonar debe ser fosforilado, y para esto, existen dos posibilidades (1) Fosforilar el producto de PCR o (2) fosforilar los cebadores antes de hacer la amplificación.

Para la primera de las opciones se amplificó la CDS de la subunidad α de la FSH humana a partir del plásmido 4 α -pENTR-2B, utilizando la enzima Pfu ADN polimerasa (SBS, China) según se especifica en el punto 5.5.1. Se corroboró la amplificación por electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la figura 6.

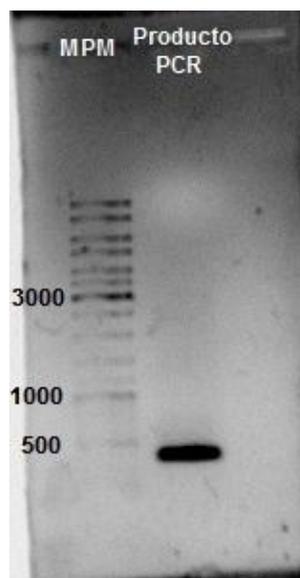


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento de ADN obtenido por PCR con cebadores 320 y 321A. MPM; marcador de peso molecular en pb.

Se puede observar que el producto de PCR presenta el tamaño esperado para la secuencia que se está buscando, aproximado de 400 pb como se muestra en la imagen. El fragmento amplificado de esta forma tiene como características el poseer extremos romos y desfosforilados. Para poder seguir con los ensayos de ligación se prosiguió con la fosforilación de este fragmento de ADN, según primera parte del punto 5.5.9. Para ello se purificó el producto de amplificación

realizando una electroforesis en gel de agarosa y cortando del gel la banda para luego extraer el ADN según punto 5.5.3. Se cuantificó el ADN extraído de la banda por medida de la absorbancia a $\lambda=260$ nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes (“nanodrop”). Este producto de PCR fue fosforilado con polinucleótido kinasa según lo descrito en el punto 5.5.9.

Paralelamente a lo anterior se realizó la segunda opción para obtener la CDS fosforiliada. Se fosforilaron los cebadores 320 y 321A antes de la amplificación por PCR de la CDS de la subunidad α de la FSHh. Ya realizada la PCR con dichos cebadores, se analizó la presencia del amplicón por electroforesis en gel de agarosa logrando además un estimativo de la concentración de la CDS lograda (Figura 7).

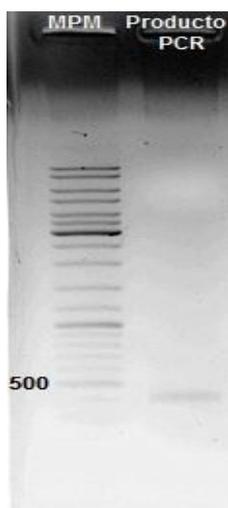


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR obtenido con cebadores 320 y 321A fosforilados pre amplificación. MPM; marcador de peso molecular en pb.

Según se observa en la figura 7 hubo amplificación de la CDS utilizándose cebadores fosforilados en la reacción. Sin embargo debido a que parece no haber una concentración suficiente para seguir con los ensayos de ligación se decide hacer otra PCR con cebadores fosforilados. Luego de analizada la presencia del amplicón por electroforesis en gel de agarosa de esta última PCR se unieron los productos de amplificación de ambas reacciones. Acto seguido se realizó otra electroforesis en gel de agarosa para observar si la nueva concentración de CDS, obtenida de esta forma, es suficiente para seguir con los ensayos (Figura 8A). Luego de verificar lo anterior se purifica por electroforesis en gel de agarosa utilizando el volumen restante de la mezcla. Las bandas de 400 pb fueron extraídas del gel y purificadas con un kit comercial (ver sección 5.5.3). Luego de la purificación se realizó otra electroforesis en gel de agarosa para analizar el producto amplificado (Figura 8B).

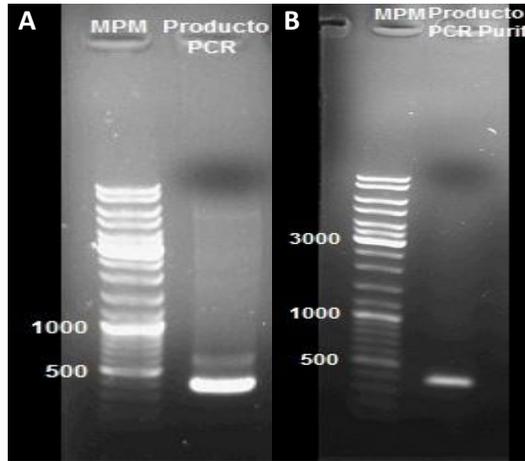


Figura 8. A. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR, obtenido con cebadores 320 y 321A fosforilados pre amplificación. B. Electroforesis en gel de agarosa de la CDS purificada por kit a partir de bandas en gel de un tamaño de 400 pb. Las bandas purificadas provienen de un gel realizado con la totalidad de muestra disponible de donde se extrajo para la corrida del gel A. MPM; marcador de peso molecular en pb.

Para verificar la fosforilación de los amplicones, obtenidos a partir de cebadores fosforilados, se realizó una reacción de ligación cuya mezcla contenía solamente estos fragmentos de ADN. Al analizar este producto de ligación por una electroforesis en gel de agarosa se esperaba obtener una “escalera” de bandas correspondientes a 1, 2, 3, etc. amplicones unidos entre sí, si los fragmentos estaban fosforilados, o una única banda si la fosforilación no había sido exitosa. Como puede verse en la figura 9, se verifica que los amplicones están fosforilados.

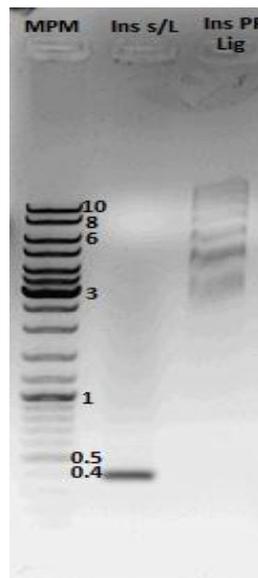


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del inserto sin ligar (Ins s/L) e inserto en mezcla de ligación consigo mismo (Ins PF Lig). MPM; marcador de peso molecular en kb.

La figura 9 muestra, de forma indirecta, que los cebadores fueron fosforilados correctamente antes de la amplificación por PCR, ya que en el carril correspondiente a la muestra de ligación (Ins PF Lig) se observan varias bandas a lo largo del mismo evidenciando distintos grupos de fragmentos cada uno formado por cantidades diferentes de CDS de la subunidad α de la FSHh unidas entre sí. Lo anterior es validado por el carril del control negativo (Ins s/L) en el cual se ve, como es de esperar para el inserto sin ligar, una única banda a 400 pb aproximadamente.

6.2- Preparación del Vector

Para conseguir concentración suficiente del vector pTFH15.3 con el cual trabajar se realizó una retransformación con este vector en células competentes de *E.coli* DH5 α . Luego se sembraron e incubaron en placa LB-Agar-Kanamicina, se utilizaron colonias crecidas para iniciar un cultivo en medio LB 50 mL. A partir de este cultivo se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico corroborando la presencia del vector en éstas, por electroforesis en gel de agarosa de concentraciones diluidas (1/10X), sin diluir (1X) y concentrada (5X), así como también por análisis por patrones de restricción usando *EcoRV* según muestra la figura 10.

De la figura 10 se puede corroborar que el vector obtenido luego de realizar las minipreparaciones de ADN plasmídico, no es el buscado. La figura 10A muestra dos bandas por carril lo cual podría deberse a diferentes conformaciones del mismo vector, adicionalmente éste presenta un tamaño aproximado de 3000 pb y no de 7500 pb como se esperaba para el vector pTFH15.3. La figura 10B, donde se observa el vector utilizado en la figura 10A tratado con *EcoRV*, verifica lo anterior al apreciarse dos bandas (carriles donde se sembraron 18 μ L y 6 μ L del vector) a 3000 pb y no a 7500 pb como es de esperar para el vector buscado.

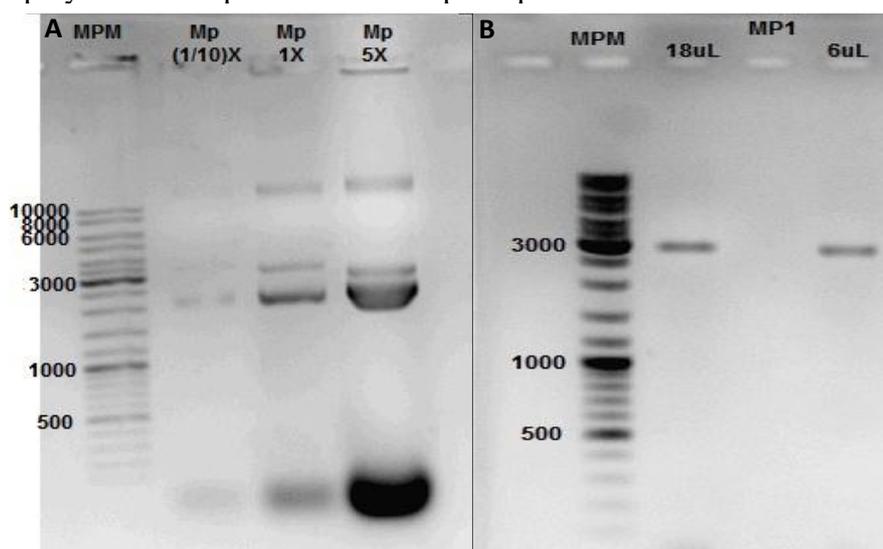


Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa 0.8%. **A.** Electroforesis en gel de agarosa de minipreparación de ADN plasmídico (Mp) en varias concentraciones, proveniente de retransformación para recuperar el vector pTFH15.3. **B.** Electroforesis de la digestión de Mp con *EcoRV* (MP1) para análisis por restricción del plásmido obtenido. MPM; marcador de peso molecular en pb.

Se decidió realizar nuevamente una electroforesis en gel de agarosa de la minipreparación de ADN plasmídico lograda en primera instancia (MP1) y el vector pTFH15.3 presente en “stock” luego de digestión con *EcoRV* según se ve en la figura 11.

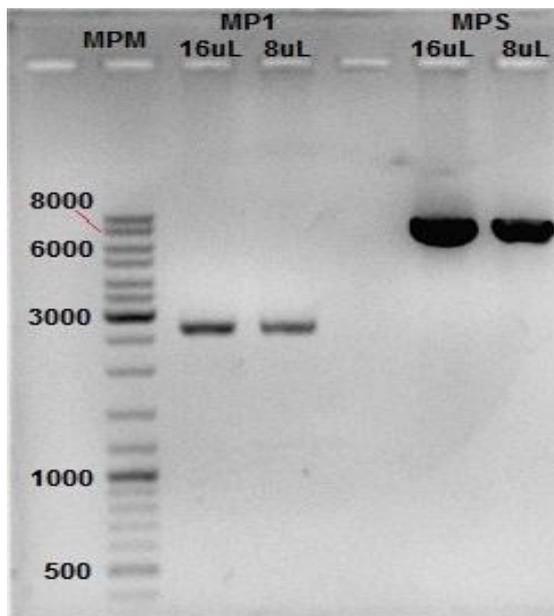


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de minipreparación de ADN plasmídico (MP1), obtenido de la retransformación, y el plásmido presente en “stock” (MPS) digeridos con *EcoRV*. MPM; marcador de peso molecular en pb.

En la figura 11 se observa que la digestión de MP1 presenta el mismo patrón de restricción que la vez anterior con bandas de un tamaño aproximado a 3000 pb, en cambio el vector “stock” (MPS) proporcionado por el laboratorio, tiene un patrón de restricción y tamaño adecuados al plásmido buscado (1 banda a 7500 pb aproximadamente). Por lo anterior y de ahora en más, se usará el vector MPS para los futuros ensayos en que se requiera el vector pTFH15.3.

Una vez obtenido el vector pTFH15.3, en el cual se insertará la CDS de la subunidad α -FSHh, se realizó su digestión con *EcoRV* para linealizarlo y así poder desfosforilarlo evitando la recircularización del mismo en la reacción de ligación del punto 6.3.

6.3- Ligación

Los ensayos de ligación se realizaron según lo expuesto en el punto 5.5.12. Para la reacción de ligación se utilizó la CDS de la subunidad α de la FSHh, fosforilada post amplificación por PCR, obtenida en el punto 6.1 y el vector linealizado y desfosforilado del punto 6.2. Los resultados de la ligación entre ambos se visualizan en la figura 12.

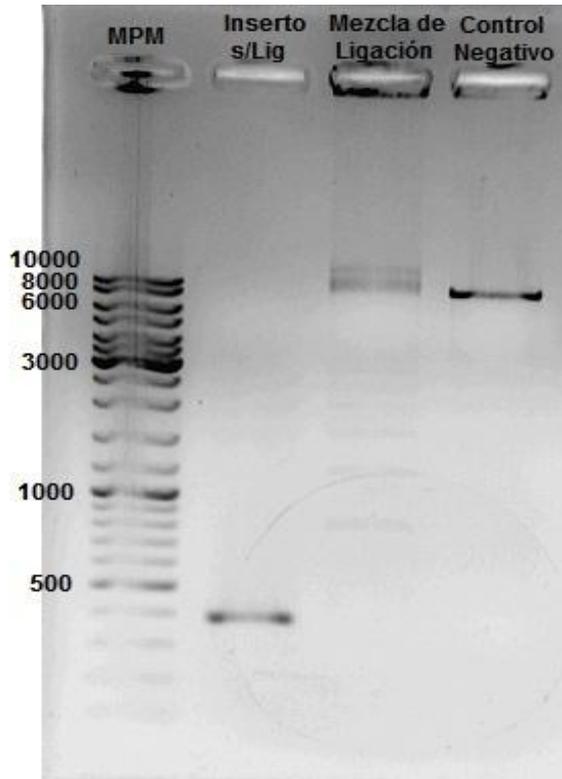


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la CDS sin ligar (Ins s/Lig), reacción de ligación sin CDS y con vector pTFH15.3 (Control negativo) y mezcla de ligación entre la CDS y el vector pTFH15.3 (Mezcla de Ligación). MPM; marcador de peso molecular en pb.

La figura 12 se logró cargando en los pocillos de los carriles las siguientes cantidades de mezclas; 4 μL de MPM (MPM), 2 μL de inserto sin ligar + 0.5 buffer de carga (BC) (Inserto s/Lig), 5 μL de mezcla de ligación + 1 μL de BC (Mezcla de Ligación) y 5 μL del control negativo de la ligación + 1 μL de BC (Control Negativo). La mezcla para el control negativo se obtuvo sustituyendo el volumen de la CDS por agua miliQ. La reacción de ligación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora con posterior inactivación de la enzima a 65 °C por 10 minutos. Según se ve en dicha figura, parece haber funcionado la ligación entre la CDS y el vector.

6.4- Transformación y selección

Se usaron células de *E.coli* quimiocompetentes proporcionadas por el laboratorio para ser transformadas mediante “shock” térmico.

La selección se realizó con el antibiótico kanamicina debido a que el vector pTFH15.3 porta un casete de resistencia al mismo. Por ello, aquellas bacterias capaces de crecer en un medio con kanamicina indicarán haber internalizado al vector y estar expresando el casete de resistencia a dicho antibiótico, de esta forma se estarán seleccionando las bacterias transformantes.

La transformación se realizó con la mezcla de ligación descrita en la sección anterior, de la cual se extrajo una alícuota con la que se realizó la electroforesis en gel de agarosa que se muestra en la figura 12. Luego de sembrar e incubar dicha transformación en medio LB-Agar-Kanamicina a 37 °C toda la noche no se vio crecimiento alguno en placa. Este hecho podría deberse a que si bien se aprecia ligación de fragmentos en la figura 12, la misma sea mayoritariamente entre las CDSs y muy poca entre ésta y el vector.

Se decidió volver a repetir la reacción de ligación de igual forma en que se realizó para obtener la mezcla de ligación utilizada en la figura 12. Luego de obtenida dicha mezcla se volvieron a transformar células quimiocompetentes de *E. coli* para luego sembrar e incubar en medio LB-Agar-Kanamicina. En esta ocasión se constató crecimiento de colonias en la placa donde se sembró esta transformación.

En total se obtuvieron 12 colonias transformantes. Para la identificación de colonias transformantes recombinantes de interés fue necesario seguir con los pasos de análisis por enzimas de restricción y secuenciación de los clones plasmídicos, de forma en que se expone a continuación.

6.5- Análisis de los clones

El “screening” de colonias crecidas en medio LB-Agar-Kanamicina se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en el análisis de las colonias por patrón de restricción utilizando las enzimas de la tabla 3 (punto 5.5.7). La segunda etapa, una vez identificadas las colonias que cumplen con el patrón de restricción que se busca, se basó en el secuenciado del vector presente en ellas. Debido a que el clonado realizado no se hizo de forma direccional, está dentro de las posibilidades que la CDS se encuentre inserta en el vector de dos formas posibles, siendo solo una de estas la correcta.

Para la totalidad de colonias crecidas en las placas de selección con el antibiótico kanamicina, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico para seguir con los análisis por restricción y secuenciación.

6.5.1- Análisis por restricción

A partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico, de las 12 colonias logradas por transformación mediante “shock” térmico en el punto 6.4, se realizaron electroforesis en gel de agarosa para analizar el plásmido contenido en cada clon (Figura 13).

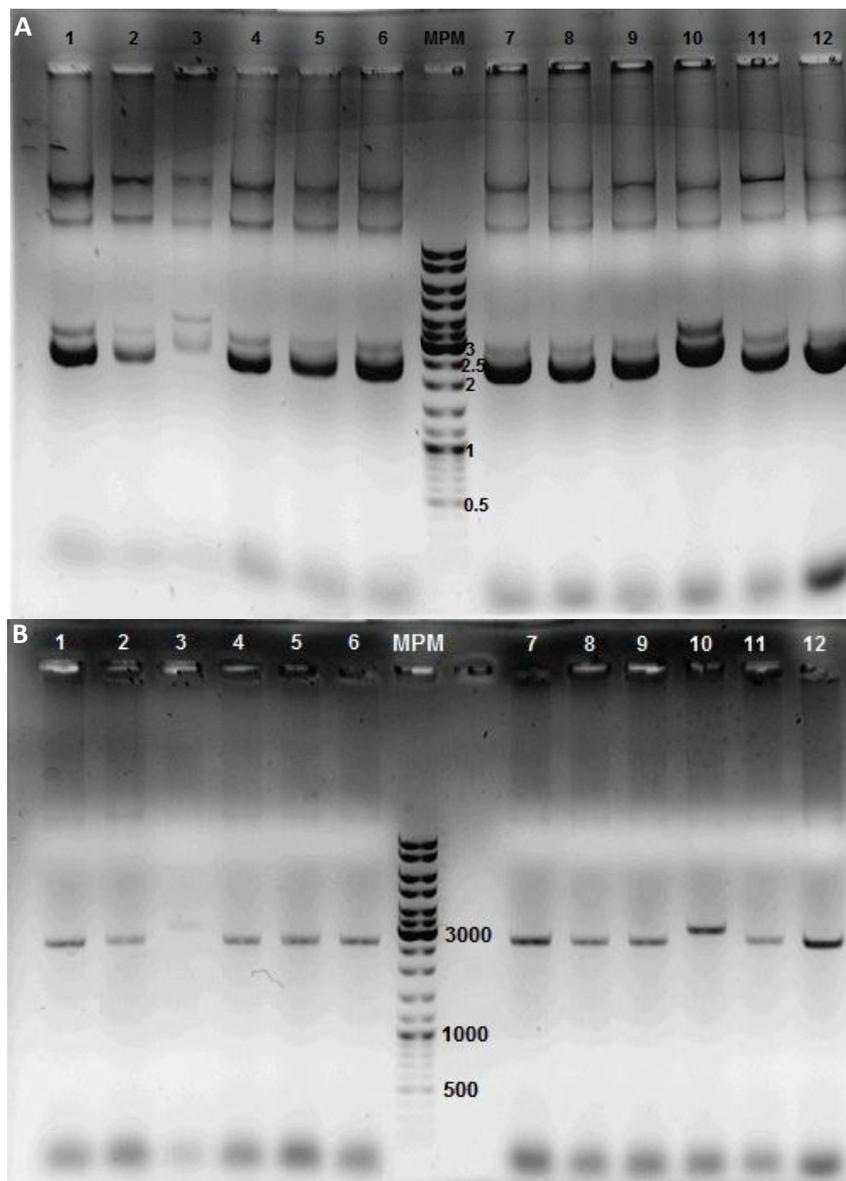


Figura 13. A. Electroforesis en gel de agarosa de las minipreparaciones de ADN plasmídico proveniente de las 12 colonias crecidas en placas LB-Agar-Kanamicina y mediante transformación por “shock” térmico. MPM, marcador de peso molecular en kb. B. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *NotI* a partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico utilizadas para A. MPM, marcador de peso molecular en pb.

La figura 13A muestra dos bandas por carril, las mismas podrían explicarse cómo distintas conformaciones del mismo plásmido, dichas bandas se encuentran entre 2000 y 3000 pb. Estos tamaños no corresponden con lo esperado para la construcción génica que se pretende de 7900 pb aproximadamente. Es posible que lo sucedido haya sido consecuencia de una contaminación con otro plásmido, presumiblemente el 4 α -pENTR-2B, utilizado como molde en la PCR ya que coincide en tamaño con el mismo y posee un casete de resistencia a kanamicina. Para verificar lo anterior se digirieron las 12 minipreparaciones con la enzima *NotI* la cual es capaz de linealizar al vector 4 α -pENTR-2B por poseer éste un sitio de restricción para dicha enzima (Figura 13B). El resultado de la anterior digestión se visualizó por electroforesis en gel de agarosa. Este último ensayo confirmó lo pensado al producirse la digestión con *NotI* y crear un único fragmento que

ronda las 3000 pb. Estos datos infieren que la contaminación podría encontrarse en el stock de CDS generado por PCR. Para corroborar esto, se realizó otra transformación con la salvedad de que en la mezcla de ligación no se encontrara el plásmido pTFH15.3, sustituyéndose el volumen correspondiente al mismo por agua miliQ. Una vez realizada la transformación se sembró en placas LB-Agar-Kanamicina dejándose a 37 °C durante la noche. El resultado verificó la contaminación de la CDS al encontrarse nuevamente colonias crecidas en dichas placas cuando no debería verse ninguna, ya que a la mezcla de ligación no se le había agregado ningún vector.

Se decide realizar una PCR, pero con cebadores fosforilados y cambiar el método de transformación por “shock” térmico a electroporación (puntos 5.5.5 y 5.5.14 respectivamente). Para ello se hizo una preparación de células electrocompetentes según se especifica en el punto 5.5.13. Como resultado se obtuvieron células electrocompetentes con una eficiencia de transformación de $1,5 \times 10^9$ células transformantes/ μg de ADN superenrollado.

Luego de amplificar nuevamente la CDS utilizando cebadores fosforilados, se procedió a su ligación con el vector pTFH15.3 logrado en el punto 6.3 y transformación por electroporación de las células electrocompetentes. Como resultado se obtuvo crecimiento de colonias de las cuales se seleccionaron 12 al azar para realizar minipreparaciones de ADN plasmídico y ser analizadas. Para analizar estos clones se realizaron dos digestiones de cada minipreparación lograda, una con *EcoRV* y otra con *SwaI* (Figuras 14A y 14B respectivamente).

Una vez más puede corroborarse que el vector obtenido de esta última transformación no es el esperado, denotando nuevamente contaminación con el mismo plásmido que en minipreparaciones anteriores (4 α -pENTR-2B). Este plásmido no es digerido por *SwaI*, pero sí por *EcoRV* y *NotI* dando, junto con su tamaño y características fenotípicas aportadas a la bacteria, una confirmación parcial del plásmido contaminante. En la figura 14A puede verse que hubo digestión con *EcoRV* de los clones analizados, corroborado por el carril 1 correspondiente a la colonia 1 sin digerir. En el mismo, al igual que en los carriles correspondientes a las 12 colonias de la figura 14B, se ven dos bandas por carril, nuevamente debido a diferentes conformaciones de un mismo plásmido por no haber digestión con *SwaI*. De lo anterior se puede concluir que ninguna de las colonias analizadas por digestión y electroforesis en gel de agarosa presenta el vector de interés. Asimismo, el hecho de encontrarse este plásmido contaminante en las minipreparaciones provenientes de ambas transformaciones donde se usaron distintas mezclas de ligación (las obtenidas a partir de la CDS fosforilada post amplificación, y de cebadores fosforilados) corrobora la presencia de trazas del plásmido contaminante en el “stock” de ambas CDSs aún luego de purificados los productos de PCR.

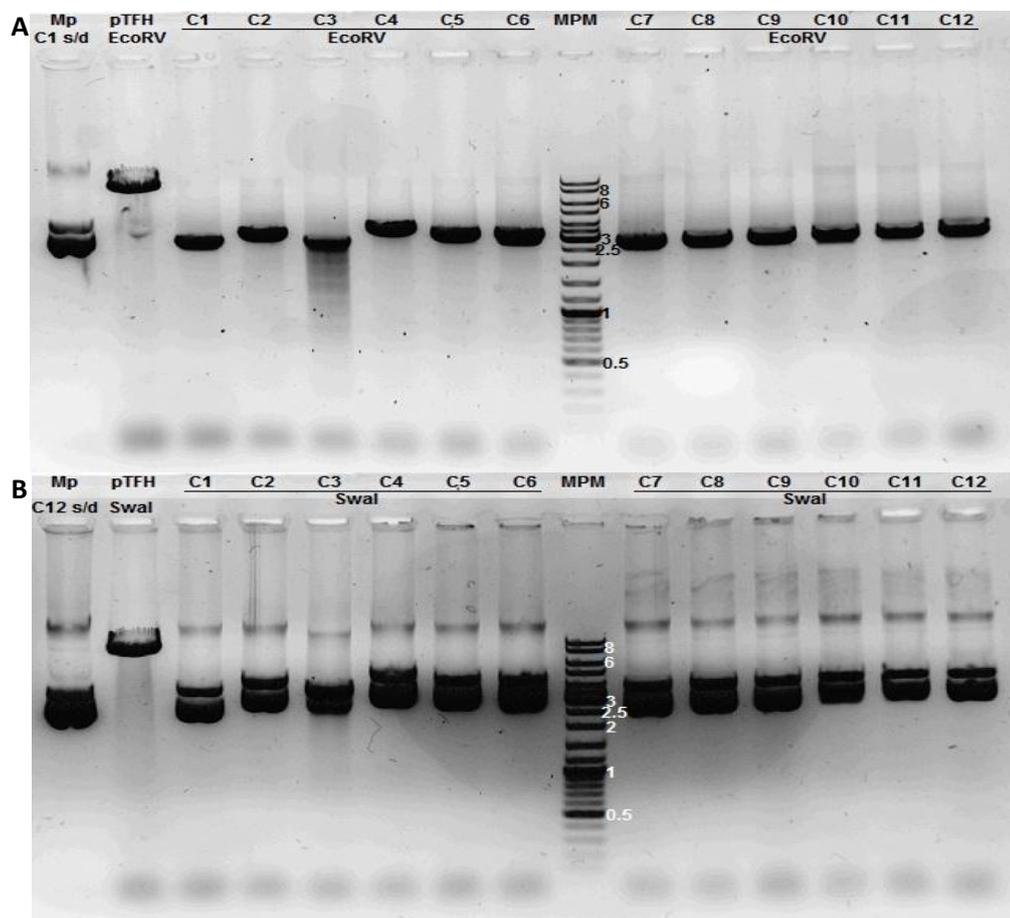


Figura 14. A. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *EcoRV* a partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico de las 12 colonias seleccionadas. B. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *SwaI* a partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico de las 12 colonias seleccionadas MPM, marcador de peso molecular en kb. Mp C s/d. Minipreparaciones de colonias 1 o 12 sin digerir. pTFH *EcoRV/SwaI*. Plásmido pTFH15.3 digerido con *EcoRV* o *SwaI*.

Para solucionar el problema de contaminación con otros plásmidos se incubó la CDS proveniente de cebadores fosforilados con *DpnI*, una enzima de restricción que digiere el ADN en los sitios GATC solamente cuando la Adenina está metilada. A diferencia del ADN plasmídico que se extrae de *E. coli* y del cual procedería el agente contaminante, el ADN obtenido por amplificación por PCR (in vitro) no se encuentra metilado por lo que no se degradaría al ser incubado con *DpnI*. Este ensayo fue realizado según punto 5.5.7 y una vez desactivada la enzima se prosiguió a la purificación por kit (punto 5.5.3) de la mezcla de digestión. Paso seguido se realizó una electroforesis en gel de agarosa para corroborar la presencia de la CDS luego del tratamiento con la enzima (Figura 15).

En la figura 15 puede verse que la digestión de ADN metilado no afectó la CDS al corroborarse la presencia de la misma por una banda de aproximadamente 400 pb. Para verificar la ausencia de ADN plasmídico luego de la digestión se realizaron dos transformaciones, una a partir de la mezcla de digestión purificada y otra con el inserto sin tratar. Ambas transformaciones fueron sembradas en medio LB-Agar-Kanamicina. Luego de incubadas a 37 °C durante la noche,

se observó ausencia de colonias en la placa que había sido tratada con *DpnI* y presencia de colonias en la otra, indicando por lo tanto éxito en la digestión del plásmido contaminante.

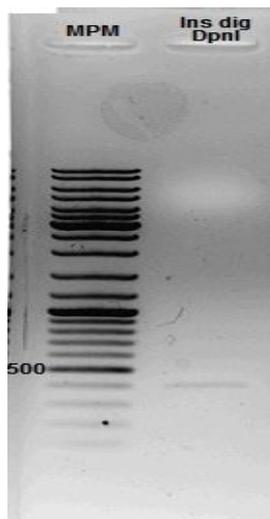


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de la CDS fosforilada, tratada con *DpnI* (Ins dig *DpnI*) y purificada por kit, para eliminar ADN metilado de la muestra. MPM; marcador de peso molecular en pb.

Aun tomando los recaudos anteriores, las transformaciones de las reacciones de ligación pTFH15.3 con las CDS de α -FSH fueron infructuosas. Debido a esto se modificó la estrategia inicial para la ligación de la CDS con el vector pTFH15.3. Se buscó aumentar la eficiencia de la reacción de ligación adicionándole a los pasos anteriores de fosforilación de cebadores, amplificación de CDS y digestión con *DpnI* de ADN metilado, uno de adenilación de la CDS (punto 5.5.11). Una vez realizado esto fue necesario modificar de igual forma la estrategia para obtener el vector pTFH15.3 haciendo de éste un vector-T según se especifica en el punto 5.5.10. De esta forma se pasa de un clonado entre extremos romos a un clonado entre extremos cohesivos, aumentando la especificidad de la reacción inserto-vector y evitando la recircularización del vector.

Cabe mencionar que de las transformaciones realizadas, una vez implementados estos cambios, se esperaba crecimiento de colonias tanto en los controles negativos como en los positivos, aunque en menor medida en los primeros que en los segundos. Esto se debe a que tanto en el control negativo (mezcla de ligación sin CDS) como en la mezcla de ligación con CDS se encontrarían plásmidos que no hubiesen agregado timidina cuando se preparó el plásmido T. Como consecuencia de lo anterior los mismos podrían recircularizarse y por lo tanto, ser aptos para ingresar a la célula y estabilizarse, produciendo colonias con dichos plásmidos en vez del buscado.

Efectivamente, una vez realizadas las transformaciones luego de implementados los arreglos mencionados, se encontró crecimiento en las placas de control negativo y en las que se

usó la mezcla de ligación con CDS. Como se realizaron dos modos de ligación, una a 4 °C durante la noche y otra a temperatura ambiente durante una hora, se diferenciaron las colonias de la siguiente manera. Las colonias crecidas según una u otra modalidad se identifican con los números 1 o 2 (4 °C durante la noche o temperatura ambiente por una hora respectivamente) luego del número de colonia.

Se tomaron 8 colonias provenientes de la transformación con ligación a 4 °C toda la noche y 6 de las de temperatura ambiente por una hora. Se realizaron las minipreparaciones y se prosiguió a la digestión de las mismas con *SwaI* y *BclI* visualizando el resultado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 16).

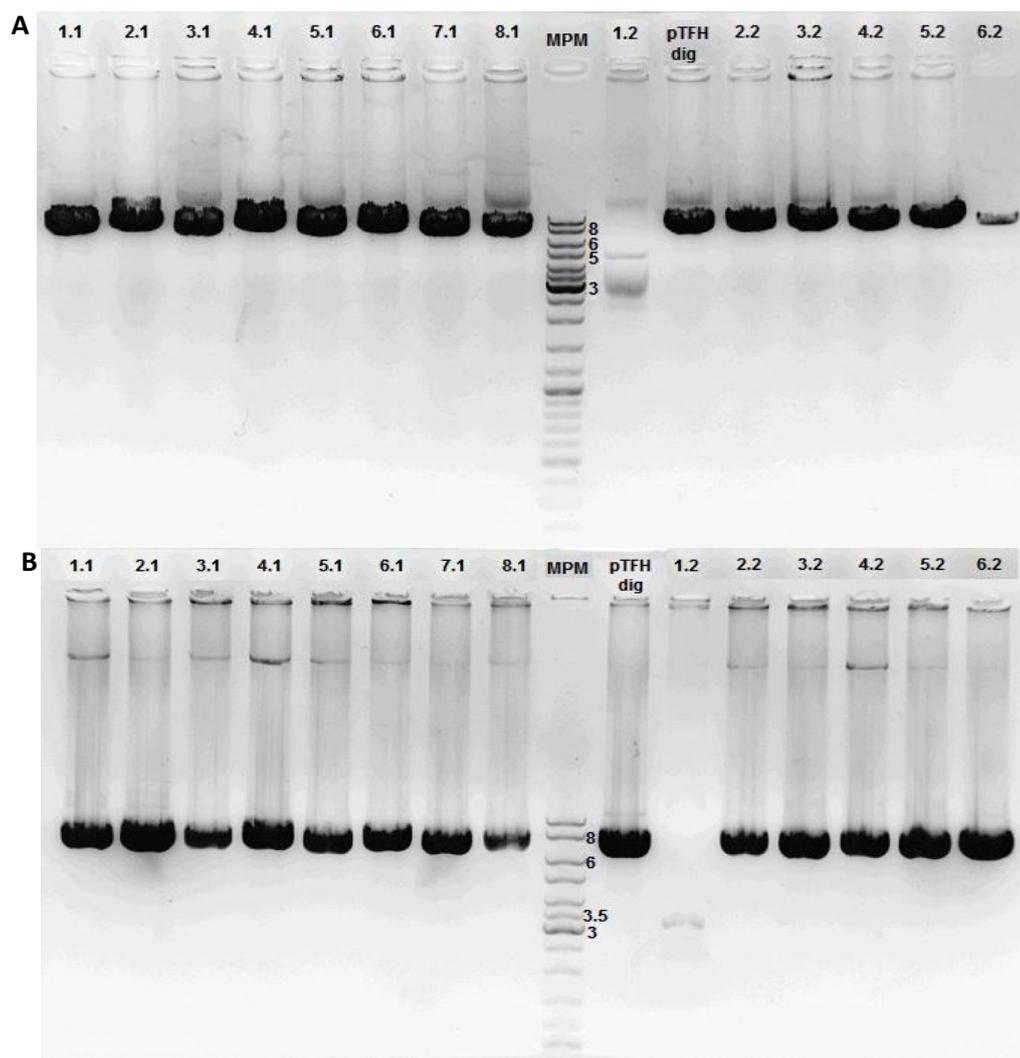


Figura 16. A. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *SwaI* a partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico. B. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *BclI* a partir de las minipreparaciones de ADN. 1.1 – 8.1 Colonias transformadas con ligación a 4 °C toda la noche. 1.2-6.2 Colonias transformadas con ligación a temperatura ambiente durante una hora. MPM, marcador de peso molecular en kb. pTFH dig. Plásmido pTFH15.3 digerido con *SwaI* o *BclI* (A y B respectivamente).

La figura 16A muestra la digestión de las minipreparaciones con la enzima *SwaI* la cual según tabla 3 linealiza al vector al producir un único corte en el mismo. Debido a la alta concentración de ADN plasmídico en las minipreparaciones, no es clara la diferencia entre

distintas colonias con respecto al grado de migración en gel. Sin embargo, las colonias 2.1, 4.1 y 6.1 presentan una movilidad electroforética ligeramente menor a las demás, evidenciando un vector de mayor tamaño, aproximadamente 8000 pb, y por lo tanto coincidiendo con la construcción génica buscada. En la figura 16B, digestión con *BclI*, en caso de ser exitosa la misma deberían observarse dos bandas por carril tanto para el plásmido pTFH15.3 como para la construcción génica buscada. La identidad de los vectores no pudo ser constatada de esta forma ya que la digestión con esta enzima no funcionó. La colonia 1.2, con diferentes conformaciones del mismo plásmido en la figura 16A, presenta características de migración en gel diferentes a las demás, con un tamaño que ronda los 3000 pb. Es así que podemos concluir que sigue existiendo contaminación con el plásmido 4 α -pENTR-2B, siendo explicado por una digestión no completa del ADN metilado cuando la CDS fue tratada con *DpnI*. Pese a lo anterior fue posible disminuir su concentración en gran medida en comparación a los casos ya descritos, favoreciendo las transformaciones buscadas.

Para tener un mejor patrón de restricción, que permitiese discernir sin duda alguna entre el plásmido pTFH15.3 y el constructo CDS-pTFH15.3, se decidió utilizar la enzima *XbaI*. Esta enzima produce 2 fragmentos a partir de la digestión del vector pTFH15.3 y tres fragmentos en la construcción génica. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa luego de realizada la digestión de los plásmidos extraídos de cada colonia (Figura 17).

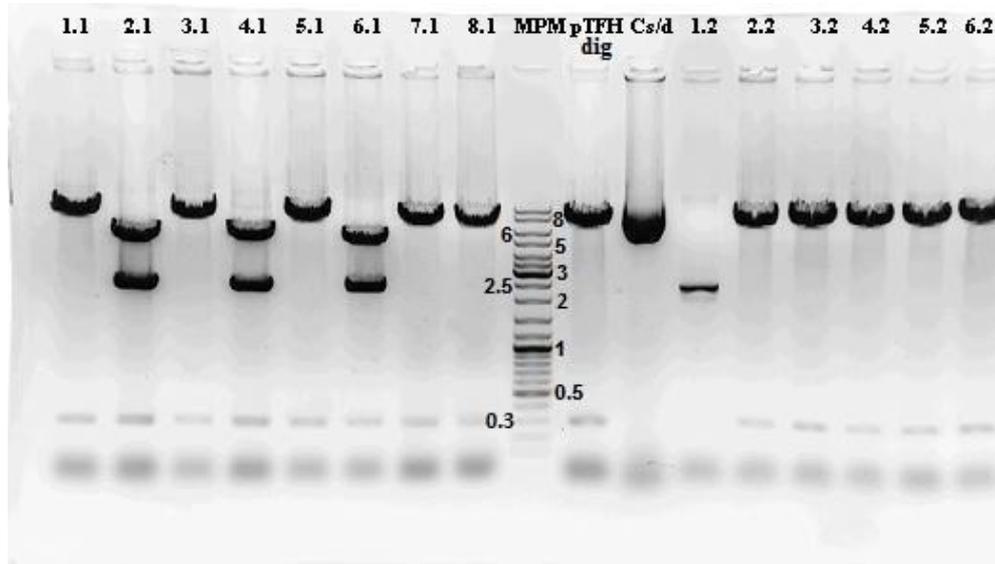


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *XbaI* a partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico. 1.1 – 8.1 Colonias transformadas con ligación a 4 °C durante la noche. 1.2-6.2 Colonias transformadas con ligación a temperatura ambiente durante una hora. MPM, marcador de peso molecular en kb. pTFH dig. Plásmido pTFH15.3 digerido con *XbaI*. Cs/d. Clon 1 sin digerir.

La figura 17 muestra 3 clones (2.1, 4.1 y 6.1) logrados por transformación con ligación a 4 °C que presentan un patrón de restricción coincidente con el esperado para el constructo que se busca. Este dato estaría corroborando lo anteriormente discutido para dichos clones en la figura

16A. Cada plásmido digerido con *Xba*I presenta tres bandas de 300, 2300 y 5200 pb aproximadamente. Estos tamaños de fragmentos se corresponden con los calculados a partir de los mapas de restricción realizados con el programa *BioEdit 7.0.5.3* para la construcción génica buscada. Los clones restantes, con excepción del 1.2, fueron identificados como portadoras del vector pTFH15.3 sin inserto, por producir dos bandas de 300 y 7200 pb aproximadamente.

Debido al bajo número de moléculas recombinantes encontradas y a la posibilidad de que las mismas no sean de utilidad por poder encontrarse insertas en sentido opuesto al de interés, se decidió hacer minipreparaciones para digestión, de las colonias restantes logradas a partir de la ligación a 4 °C. Una vez realizadas las minipreparaciones se digirieron con *Xba*I y su resultado fue visualizado en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 18)

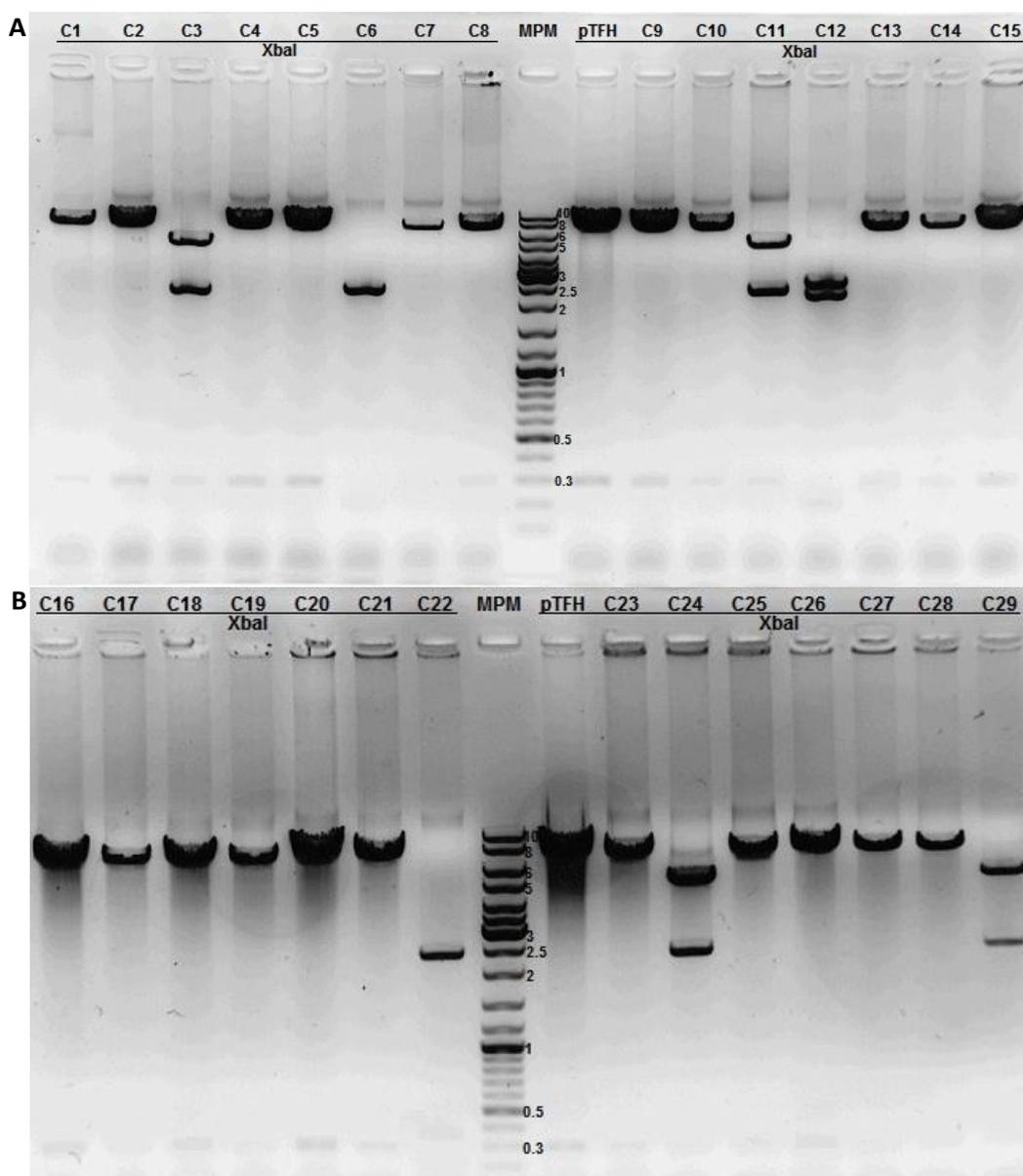


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones realizadas con *Xba*I a partir de las minipreparaciones de ADN plasmídico. **A.** Clones C1-C15. **B.** Clones C16-C29. Todas las colonias provienen de la transformación con ligación a 4 °C durante la noche. MPM, marcador de peso molecular en kb. pTFH. Plásmido pTFH15.3 digerido con *Xba*I.

De los 29 clones analizadas por digestión con *Xba*I (C1-C29) la C-3, C-11, C-24 y C-29 fueron las que dieron un patrón de restricción acorde al buscado y con las mismas características que los clones 2.1, 4.1 y 6.1 de la figura anterior. Con excepción de los clones C-6, C-12 y C-22, que fueron identificadas como portadoras del vector 4 α -pENTR-2B, las demás, en su gran mayoría, presentan el vector pTFH15.3 sin la CDS integrada al mismo.

6.5.2- Análisis por secuenciación

Ya identificadas las colonias portadoras del constructo de interés se avanzó al análisis por secuenciación de los mismos. Para este ensayo se debieron purificar las minipreparaciones de ADN plasmídico de dichas colonias según se especifica en el punto 5.5.16. Una vez purificadas se enviaron al servicio de secuenciación de ADN del Institut Pasteur de Montevideo. Este último paso de análisis es necesario por dos motivos, primero para cerciorarse que la CDS se haya amplificado correctamente y sin errores. Segundo, debido a que la clonación realizada no fue direccional, este paso es crucial para verificar que el sentido en el cual se encuentra inserta la CDS en el vector sea el deseado.

Para analizar las secuencias enviadas por el Institut Pasteur de Montevideo se utilizó la herramienta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool” por sus siglas en inglés) disponible en el sitio web del banco de genes online “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=BLASTHome>)

El cebador que se utilizó para asegurar la correcta inserción en sentido de la CDS es el 311 (directo) el cual hibrida en el exón III de la CDS para la α -FSHh. Si el sentido en que se integró el inserto fue el correcto se esperaría que a continuación de la CDS estuviese la secuencia de terminación de la rubisco (TrbcS). Con este cebador se puede corroborar además del sentido de la CDS, su secuencia desde el exón III en adelante. Sin embargo para verificar la secuencia del péptido señal y del exón II debe secuenciarse con otros cebadores que hibriden antes en la CDS, pues estas se encuentran al comienzo de la misma. Los utilizados para este propósito fueron los cebadores 319 y 318 (ambos directos) que hibridan al inicio y al final de la secuencia del péptido señal respectivamente. De esta forma uniendo los datos obtenidos a partir del uso de los tres cebadores fue posible analizar la totalidad de la secuencia de CDS.

Como resultado se obtuvo que de los 7 clones que dieron positivo en cuanto al patrón de restricción buscado con la enzima *Xba*I solo uno de ellos cumple con ambas condiciones de sentido y secuencia correctas. El clon seleccionado de esta forma es el 4.1 (4.1- α FSHh-pTFH15.3). Como último paso se realizó una retransformación con

4.1_αFSHh_pTFH15.3 según punto 5.5.14 para posteriormente iniciar un cultivo y realizar minipreparaciones de ADN plasmídico para obtener “stock” de dicho vector.

7- CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

La estrategia específica inicial presentada no resultó apropiada para lograr el objetivo planteado en este trabajo, sin embargo fue posible superar este obstáculo mediante una serie de modificaciones a la misma. Los cambios más significativos fueron; la fosforilación de los cebadores pre PCR, la adenilación del inserto y la modificación a plásmido T del vector pTFH15.3. Estos cambios mayores junto con otros menores, como ser digestión de ADN metilado contaminante y cambio en el método de transformación, aseguraron un aumento en la eficiencia de los ensayos. Como consecuencia se logró el objetivo específico que consistía en la construcción de un vector de expresión en plantas, que llevase la secuencia codificante para la subunidad α de la FSHh (4.1_ α FSHh_pTFH15.3).

A futuro se espera usar esta nueva construcción génica para transformar una cepa de *P. patens* modificada que expresa la subunidad β de la FSHh. Se lograría la inserción de la secuencia perteneciente a la CDS de la subunidad α de la FSHh en un locus distinto al cual se encuentra inserta la CDS de la subunidad beta. Como resultado se espera la coexpresión de ambas subunidades para formar, en este caso, el heterodímero funcional de la FSHh y así proseguir el análisis cuantitativo y cualitativo de dicho producto. Adicionalmente, en caso de cumplirse las expectativas, podrían seguirse los estudios en cepas humanizadas de *P. patens*, y así obtener una proteína más próxima al tipo humano. Como ventaja a esto último, ya comentado en la introducción, estaría la disminución en los costos de producción, teniendo repercusiones importantes tanto en la investigación como en su aplicación clínica. Asimismo, de lograrse la integración y la coexpresión de ambas subunidades de la FSHh, se abriría el campo para producción de otros heterodímeros.

8- BIBLIOGRAFÍA

- Anitza, W.K. et al., 2003. Superovulation in cattle : practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development*, 42(2002), pp.587-599.
- Bakker, H. et al., 2006. An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), pp.7577-7582.
- Bousfield, G.R. et al., 2008. Chromatofocusing fails to separate hFSH isoforms on the basis of glycan structure. *Biochemistry*, 47(6), pp.1708-1720.
- Braileanu, G.T. et al., 1998. FSH Bioactivity in Commercial Preparations of Gonadotropins. *Theriogenology*, 49(98), pp.1031-1037.
- Contents, T.O.F., 1998. Recombinant follicle stimulating hormone : development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 4(6), pp.862-881.
- Cox, K.M. et al., 2006. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature biotechnology*, 24(12), pp.1591-1597.
- Dahl, D. & Stone, P., 1992. FSH Isoforms, Significance. *Journal of Andrology*, 13(1), pp.11-22.
- Desai, P.N., Shrivastava, N. & Padh, H., 2010. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology advances*, 28(4), pp.427-435.
- Doran, P.M., 2006. Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in biotechnology*, 24(9), pp.426-432.
- Fan, Q.R. & Hendrickson, W. a, 2005. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, 433(7023), pp.269-277.
- Fox, K.M., 2001. Three-Dimensional Structure of Human Follicle-Stimulating Hormone. *Molecular Endocrinology*, 15(3), pp.378-389.
- Gleicher, N., 2003. Bye-bye urinary gonadotrophins?: Recombinant FSH: A real progress in ovulation induction and IVF? *Human Reproduction*, 18(3), pp.476-482.
- Grigorova, M., Rull, K. & Laan, M., 2007. Haplotype structure of FSHB, the beta-subunit gene for fertility-associated follicle-stimulating hormone: possible influence of balancing selection. *Annals of human genetics*, 71(Pt 1), pp.18-28.
- Hohe, A. et al., 2004. An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. *Current genetics*, 44(6), pp.339-347.
- Kamisugi, Y. et al., 2006. The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic acids research*, 34(21), pp.6205-6214.

- Kamisugi, Y., Cuming, A.C. & Cove, D.J., 2005. Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic acids research*, 33(19), p.e173.
- Lang, D. et al., 2008. Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in plant science*, 13(10), pp.542-549.
- de Leeuw, R. et al., 1996. Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Molecular human reproduction*, 2(5), pp.361-369.
- Lehert, P., Schertz, J.C. & Ezcurra, D., 2010. Recombinant human follicle-stimulating hormone produces more oocytes with a lower total dose per cycle in assisted reproductive technologies compared with highly purified human menopausal gonadotrophin: a meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology*. 8, p.112.
- Liénard, D. & Nogué, F., 2009. *Physcomitrella patens*: A Non-Vascular Plant for Recombinant Protein Production. In L. Faye & V. Gomord, eds. *Methods in Molecular Biology, Recombinant Proteins From Plants*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 135-144.
- Messinis, I.E., 2005. Ovulation induction: a mini review. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(10), pp.2688-2697.
- Obembe, O.O. et al., 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology advances*, 29(2), pp.210-222.
- Revelli, A. et al., 2006. Recombinant versus highly-purified, urinary follicle-stimulating hormone (r-FSH vs. HP-uFSH) in ovulation induction: a prospective, randomized study with cost-minimization analysis. *Reproductive biology and endocrinology*, 4, p.38.
- Rose, M.P. et al., 2000. Definition and Measurement of Stimulating Hormone. *The Endocrine Society*, 21(1), pp.5-22.
- Schaefer, D.G., 2002. A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual review of plant biology*, 53, pp.477-501.
- Schaefer, D.G. & Zryd, J.-P., 1997. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 11(6), pp.1195-1206.
- Schaefer, D.G. & Zryd, J.-pierre, 2001. The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. *Plant physiology*, 127(December), pp.1430-1438.
- Simoni, M. et al., 1999. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(2), pp.751-755.
- Streatfield, S.J., 2007. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant biotechnology journal*, 5(1), pp.2-15.
- Ulloa-Aguirre, A & Timossi, C., 1998. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human reproduction update*, 4(3), pp.260-283.
- Ulloa-Aguirre, A. et al., 2003. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biology of reproduction*, 69(2), pp.379-389.

- Walton, W.J. et al., 2001. Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated beta-subunit in addition to the conventional glycosylated beta-subunit. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(8), pp.3675-3685.
- van Wely, M. et al., 2011. Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. A Cochrane review. *Human reproduction update*, 18(2), pp.1-159.