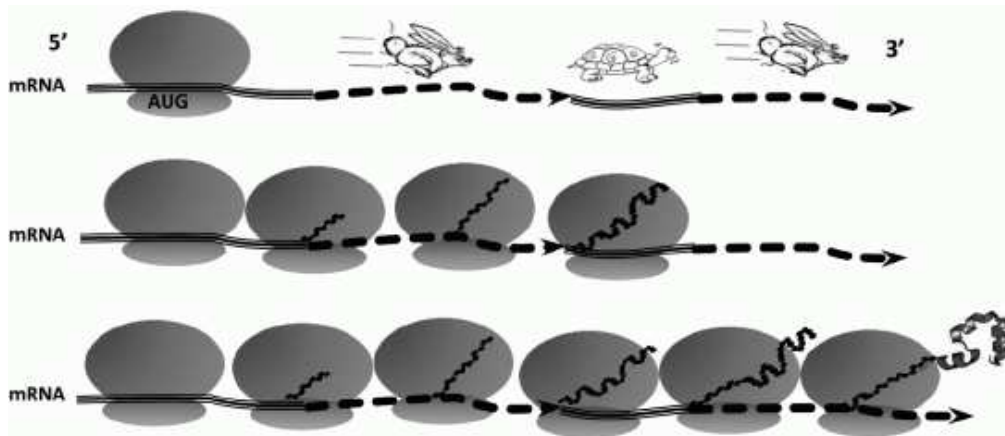


VALENTINA
VARELA

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE CODONES SINÓNIMOS EN EL PERFIL DE SOLUBILIDAD DE LA ENZIMA Cu/Zn SUPERÓXIDO DISMUTASA



Angov, E., *Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins*. Biotechnol J; 2011. 6(6): p. 650-9.

Tesina de Grado – Licenciatura en Bioquímica |
Orientador: Dra. Mónica Marín

Índice

1	Resumen	3
2	Introducción	4
2.1	Plegamiento de proteínas	4
2.2	Uso de codones y su implicancia en el plegamiento proteico	5
2.3	Enfermedades conformacionales	8
2.4	Esclerosis lateral amiotrófica	10
2.5	Cu/Zn Superóxido dismutasa (SOD)	11
3	Objetivos	14
4	Estrategia experimental	14
5	Materiales y métodos	15
5.1	Materiales	15
5.1.1	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	15
5.1.2	Medios de cultivo (ver anexo)	16
5.1.3	Vectores plasmídicos	16
5.1.4	Enzimas de restricción	16
5.1.5	Anticuerpos	17
5.2	Métodos	17
5.2.1	Preparación de células competentes	17
5.2.2	Transformación de bacterias	18
5.2.3	Minipreparación de ADN por lisis alcalina	18
5.2.4	Electroforesis en gel de agarosa	19
5.2.5	Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción EcoRI	19
5.2.6	Mutagénesis dirigida	19
5.2.7	Secuenciación	23

5.2.8	Expresión de las proteínas Cu/Zn SOD salvaje, Cu/Zn SOD mutante G93A, Cu/Zn SOD mutante 1 y Cu/Zn SOD mutante 2 humanas	23
5.2.9	Fraccionamiento soluble-insoluble.....	23
5.2.10	Electroforesis de Proteínas SDS-PAGE (15 %)	24
5.2.11	Western Blot	24
6	Resultados y Discusión.....	26
6.1	Análisis del uso de codones en la secuencia codificante de la hSOD.	26
6.2	Mutagénesis. Preparación del ADN molde	30
6.3	Mutagénesis dirigida.....	33
6.4	Expresión de los mutantes sinónimos de hSOD en <i>E. coli</i>	36
7	Conclusiones.....	42
8	Perspectivas	43
9	Anexo – Buffers y Medios de cultivo	44
10	Anexo – Tablas de datos	46
11	Referencias	48

1 Resumen

En un grupo de enfermedades denominadas enfermedades conformacionales (PCDs), el mal plegamiento de una o varias proteínas llevan a un funcionamiento celular defectuoso y en última instancia a la muerte de la célula. La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) pertenece al grupo de las PCDs. En un 20% de casos de ELA familiar (ELAf) se han identificado mutaciones en el gen *sod1* que codifica para la Cu/Zn superóxido dismutasa. En estos casos el mal plegamiento de esta proteína se ha asociado a la formación de agregados intracelulares insolubles y a una ganancia tóxica de función. Esto conduce a la muerte de las motoneuronas, a una parálisis progresiva y la muerte del individuo. Los mecanismos por los cuales se dan estas patologías no han sido completamente elucidados. Para comprender los fenómenos que conducen al mal plegamiento proteico en la célula, nos proponemos estudiar el efecto de la sustitución de codones sinónimos en la traducción y plegamiento de la proteína.

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en los mecanismos que llevan a la formación de agregados proteicos a través del estudio de la modificación de codones sinónimos. En particular nos proponemos estudiar el efecto de la sustitución de codones sinónimos en la secuencia codificante de la enzima Cu/Zn SOD cuando es expresada en *E. coli*. Para ello se aplicó el algoritmo MinMax% sobre dicha secuencia, permitiendo identificar un agrupamiento de cuatro codones raros que codifica para los aminoácidos S, N, G y P. Para estudiar el efecto de la sustitución de codones sinónimos se construyeron dos mutantes sinónimos dentro de este agrupamiento. Los resultados preliminares muestran que al expresar dichos mutantes en la cepa BL21 Star DE3 de *E. coli* a 30°C durante 2 horas y posterior análisis mediante SDS-PAGE y Western Blot que ambos mutantes, al igual que la enzima salvaje, se encontraban en la fracción soluble. En cambio, al realizar el mismo ensayo de expresión a 37°C, uno de los mutantes sinónimos se repartía entre las fracciones soluble e insoluble en una relación 3:1 respectivamente. Si bien es necesario repetir estos experimentos y verificar su reproducibilidad, los resultados sugieren que la sustitución de estos codones sinónimos en la Cu/Zn SOD podría afectar la solubilidad de la proteína.

2 Introducción

2.1 Plegamiento de proteínas

La comprensión de los mecanismos que establecen el plegamiento de una proteína es uno de los temas más intrigantes en Biología Molecular. Las proteínas deben alcanzar su conformación nativa para ser funcionales, por lo cual, el proceso debe ser preciso. Los primeros estudios sobre el plegamiento proteico consistieron en ensayos de desnaturalización/renaturalización *in vitro* como los realizados por Christian Anfinsen y colegas en las décadas de 1950-60 [2], que concluyeron que la información necesaria para el plegamiento de las proteínas está contenido en su secuencia aminoacídica [3]. De acuerdo con esto, las proteínas pueden plegarse de forma espontánea y, la estructura nativa sería la más estable termodinámicamente, fue desde entonces aceptado que el plegamiento *in vitro* ocurre al igual que *in vivo*. Este concepto se ha vuelto insuficiente a la hora de explicar el plegamiento proteico *in vivo* ya que proteínas con idéntica secuencia de aminoácidos adoptan distintas conformaciones al expresarse *in vivo* e *in vitro* [4]. Si bien se ha avanzado sobre el conocimiento del plegamiento proteico, aún no se conocen con certeza todos los factores que afectan el proceso por el cual las proteínas alcanzan su conformación nativa.

En la célula, las proteínas son sintetizadas en los ribosomas a partir de información genética contenida en el ARNm celular. El plegamiento *in vivo* puede darse de forma co-traducciona, lo cual significa que la proteína comienza a plegarse antes de que se complete el proceso de traducción [5]. Otras proteínas, sin embargo, adoptan la mayor parte de su conformación nativa luego de liberarse del ribosoma. Algunas proteínas culminan su plegamiento dentro de compartimientos intracelulares como mitocondria o RE (retículo endoplásmico) en ribosomas asociados a sus membranas. En este caso, el plegamiento puede ocurrir de forma co-traducciona o bien la proteína puede adoptar su conformación nativa luego de ser translocada a través de la membrana. En muchos casos, el plegamiento proteico es asistido por chaperonas moleculares, algunas de estas interactúan con la cadena

polipeptídica a medida que esta emerge del ribosoma, mientras que otras están implicadas en pasos posteriores del plegamiento [6].

Además de las chaperonas existen evidencias de que el ribosoma participa de forma activa en el plegamiento proteico. Éste proporciona el ambiente adecuado para la interacción de numerosos factores con el polipéptido nascente, pero también existen evidencias de que participa de forma activa en la formación de estructuras secundarias dentro del túnel de salida cuando todavía no ha terminado el proceso de traducción [7]. Más aún, tanto en procariotas como en eucariotas se ha mostrado que el dominio V del rRNA de la subunidad mayor del ribosoma posee actividad “chaperona”, específicamente denominada PFAR (protein-folding activity of the ribosome) [8]. El dominio V del rRNA de la subunidad mayor del ribosoma asiste el plegamiento de proteínas mal plegadas para que adopten su conformación nativa in vitro.

2.2 Uso de codones y su implicancia en el plegamiento proteico

Durante el proceso de traducción la secuencia de bases presente en el ARNm es leída en tripletes y traducida al lenguaje de los aminoácidos mediante el código genético. Dado que el ARN está formado por cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Guanina y Uracilo) existen 64 posibles tripletes para codificar los 20 aminoácidos. El código genético es degenerado, lo cual significa que un aminoácido puede estar codificado por más de un triplete o codón. Además, tres de estos 64 codones indican el final del proceso de elongación del polipéptido, por lo que se denominan “codones stop”.

Los codones que codifican para el mismo aminoácido se denominan “sinónimos”. No todos los codones sinónimos son utilizados de igual manera, sino que existe un uso diferencial de los mismos.

Algunos de los factores que influyen en el sesgo en el uso de codones son: selección para una alta velocidad y una mayor precisión en el proceso de traducción, tipo de función génica, tamaño del gen y contexto en el genoma,

sesgo GC, sesgo mutacional específico de hebra, conservación de aminoácidos, hidropatía proteica, selección transcripcional e incluso la estructura y estabilidad del ARN [9].

El sesgo en el uso de codones es diferente para cada organismo [10, 11], esto significa que cada organismo utiliza más frecuentemente un determinado codón para codificar un aminoácido. Estudios *in silico* sobre genes humanos sugieren que existe un sesgo en el uso de codones tejido específico [12], por lo que habría una preferencia en el uso de codones dependiendo del lugar de expresión dentro de un mismo organismo.

La frecuencia con la que es utilizado un codón dado en una célula u organismo puede ser estimado por la frecuencia en la que éste es utilizado en proteínas con alto nivel de expresión, como las proteínas ribosomales [13]. Debido a que las proteínas ribosomales poseen un alto nivel de expresión, la frecuencia con la que utilizan determinados codones refleja la frecuencia de uso de codones a nivel celular.

En algunos organismos se ha mostrado que existe una fuerte correlación entre el uso preferencial de codones y la frecuencia relativa de los ARN de transferencia correspondientes [14], lo cual significa que la mayor frecuencia de uso de un determinado codón se debe a una mayor concentración de su ARNt. Esta idea es hoy en día aceptada, a pesar de haber sido puesta en discusión la existencia de dicha correlación [15].

Mediante varios estudios se ha observado que el uso de codones sinónimos afecta la expresión proteica, ya que se ve afectada la solubilidad de la proteína expresada [16]. En estudios realizados con la enzima cloranfenicol acetiltransferasa expresada *in vitro*, se observó que al reemplazar codones sinónimos raros por frecuentes aumenta el nivel de expresión pero la actividad enzimática disminuye [17]. A su vez, mediante ensayos de expresión *in vitro* de las proteínas CAT y rodanasa se observó que la cinética de traducción no era constante y que existían pausas durante dicho proceso ya que se observan varias bandas con distinto peso molecular y un patrón determinado en el análisis por SDS-PAGE, un fenómeno que fue descrito por Hardesty y colaboradores [18]. Estudios realizados con la proteína EgFABP1 (Proteína de

unión a ácidos grasos de *Echinococcus granulosus*), donde se sustituyeron gradualmente codones sinónimos en un loop entre dos alfa hélices, mostraron que dichas mutaciones silentes afectan la solubilidad de la enzima al ser expresada en *E. coli*, y que este cambio es capaz de inducir el stress celular [19].

Estudios más recientes sobre la α -hemolisina expresada en *E. Coli* [20] evidenciaron que existen cinco codones que influyen de manera significativa sobre el nivel de exocitosis de dicha proteína. Cuando estos codones son sustituidos por codones más abundantes, aumenta la concentración intracelular de α -hemolisina, mientras que cuando éstos codones son cambiados por los menos frecuentes disminuyen en un 50%~ los niveles de α -hemolisina intracelular. A su vez, en ambos casos, la α -hemolisina intracelular se encuentra formando cuerpos de inclusión, lo que denota la importancia del cambio de codones sinónimos en este contexto. Por otro lado, en un intento por mejorar los niveles de expresión del Factor de necrosis tumoral (TNF α) se sustituyeron aproximadamente el 80% de sus codones raros por los más frecuentes resultando en una proteína tóxica al expresarla en *E. coli* [21].

Para investigar si la velocidad de traducción afecta la estructura proteica, es necesario medir dicha velocidad. Hay varios estudios *in sílico* que se pueden realizar para estimar teóricamente la velocidad relativa de traducción, como por ejemplo el algoritmo MinMax% [1]. A partir de la frecuencia de uso de codones, el algoritmo MinMax permite determinar la velocidad de traducción a lo largo de toda la secuencia codificante que se desea analizar, pudiéndose determinar zonas enriquecidas en codones raros y zonas con predominancia de codones frecuentes.

Otro método para estudiar agrupaciones de codones raros y frecuentes es el índice de adaptación de codones (CAI – Codon Adaptation Index). El CAI fue empleado para estudiar el uso de codones y la estructura de varias proteínas; en dicho estudio se analizó la distribución de los codones lentos dentro del ARNm y se observó que dichos codones se ubican preferentemente en los límites de los dominios proteicos [22]. Además se observó que hay una tendencia de los codones rápidos a codificar alfa hélices, mientras que de los

codones más lentos tienden a codificar regiones conectoras y extremos de segmentos [23].

2.3 Enfermedades conformacionales

Muchas proteínas biológicamente activas, por ejemplo la actina y la tubulina, se encuentran formando oligómeros [Figura 1], en donde éstas se ensamblan formando un sofisticado complejo supramolecular que puede cumplir roles importantes en la célula, pero la formación de éstas estructuras se encuentra sumamente controlada y regulada. Por otra parte, varios estudios muestran que durante el proceso de plegamiento, las estructuras secundarias y el grado de compactación del polipéptido varían enormemente, lo cual sugiere que existen varios estados intermedios desde el la cadena totalmente desplegada hasta la proteína nativa [24, 25]. Estos estados conformacionales de la cadena polipeptídica son los precursores de los agregados, que eventualmente llevan a la formación de fibras amiloides [26].

La acumulación de agregados proteicos es comúnmente asociada con una severa degeneración celular en los sitios de deposición, pero los mecanismos precisos que llevan a la agregación proteica aún no han sido elucidados. No está claro si la formación de agregados conduce a la degeneración celular, o si simplemente son producto de ésta en la patología. Sin embargo, se ha establecido que el mal plegamiento y la agregación junto con la degeneración celular son procesos acoplados [27].

En las últimas décadas, varias enfermedades humanas han sido asociadas al mal plegamiento proteico por lo que se las ha agrupado bajo el nombre de PCDs de *protein conformational disorders*. Dentro de este grupo se encuentran la enfermedad de Alzheimer, Encefalopatías espongiformes, la enfermedad de Huntington, fibrosis quística, diabetes de tipo 2, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) entre otras [28].

Las posibles causas de estas enfermedades no han sido establecidas completamente pero se ha propuesto que podrían deberse a mutaciones en la

estructura primaria de las proteínas involucradas, variaciones en las modificaciones post-traduccionales, entre otros, lo cual llevaría en muchos casos la formación de agregados insolubles en las células [29].

En general la formación de agregados proteicos insolubles en las enfermedades conformacionales no se producen en todos los tejidos donde se expresa dicha proteína, sino que la agregación ocurre en un tejido en particular [30]. A pesar de los grandes avances, aún no se conocen totalmente los mecanismos involucrados en la formación de estos agregados, ni como estos serían los causantes de las diferentes patologías [28].

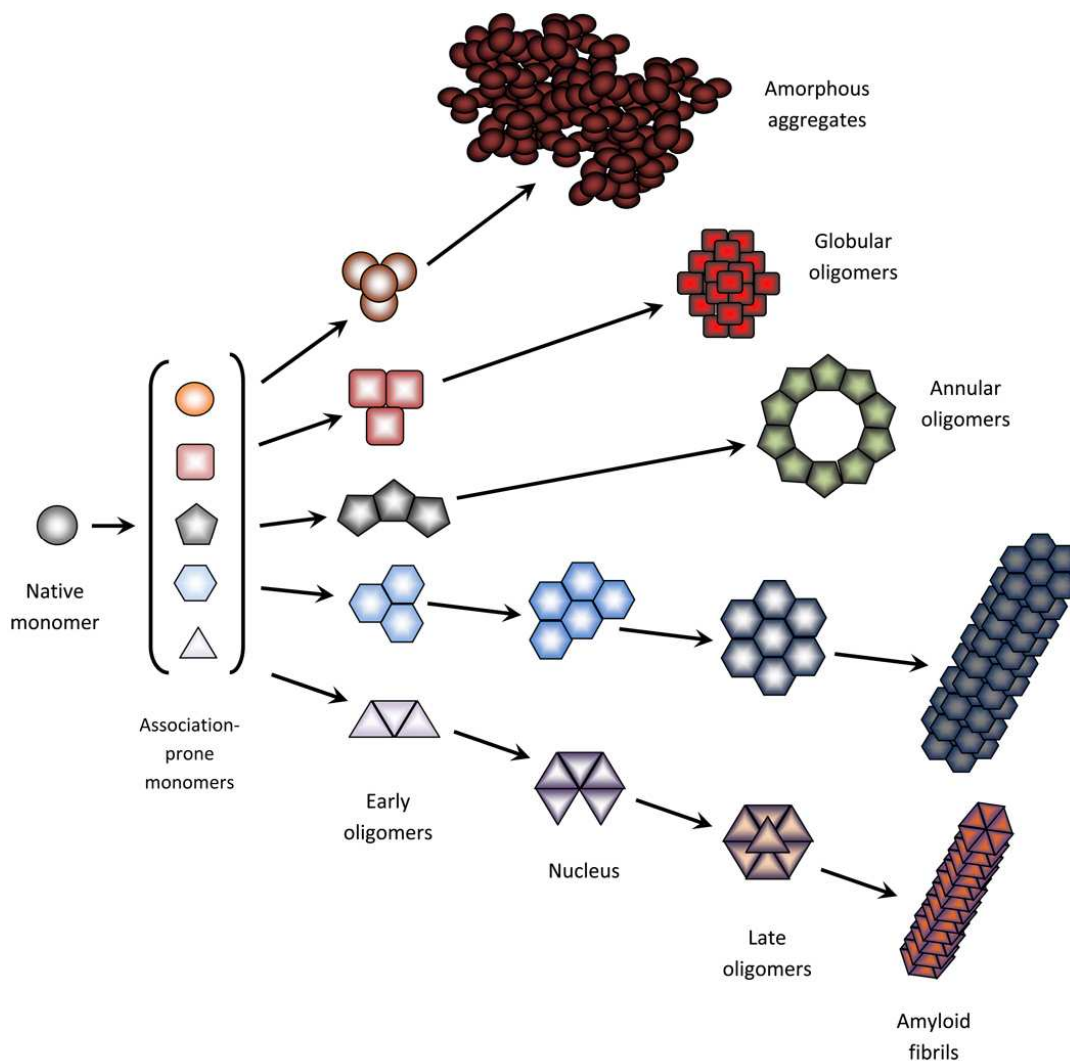


Figura 1. Representación esquemática del proceso de auto-agregación proteica. La asociación de proteínas propensas a la agregación puede llevar a la formación de distintos tipos de agregados, como los agregados amorfos, oligómeros globulares, oligómeros anulares y fibras amiloides [7].

2.4 Esclerosis lateral amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte selectiva de las motoneuronas, que provoca atrofia muscular, parálisis y eventualmente la muerte del individuo. Aproximadamente, un 10% de los casos de ELA son familiares (ELAf), de los cuales un 20% han sido asociados a mutaciones en el gen 1 de la superóxido dismutasa, que codifica para la enzima superóxido dismutasa citosólica [31]. Se han encontrado mas de 100 mutaciones en la región codificante del gen *sod1* [Figura 2], entre las cuales hay predominantemente mutaciones puntuales, pero también se han encontrado deleciones e inserciones [32]. Además, dicha enfermedad se ha asociado a un mal plegamiento y agregación del homodímero Cu/Zn SOD [33]. Sin embargo, aún no se ha dilucidado el o los mecanismos por los cuales se promueve la agregación de la enzima [34].

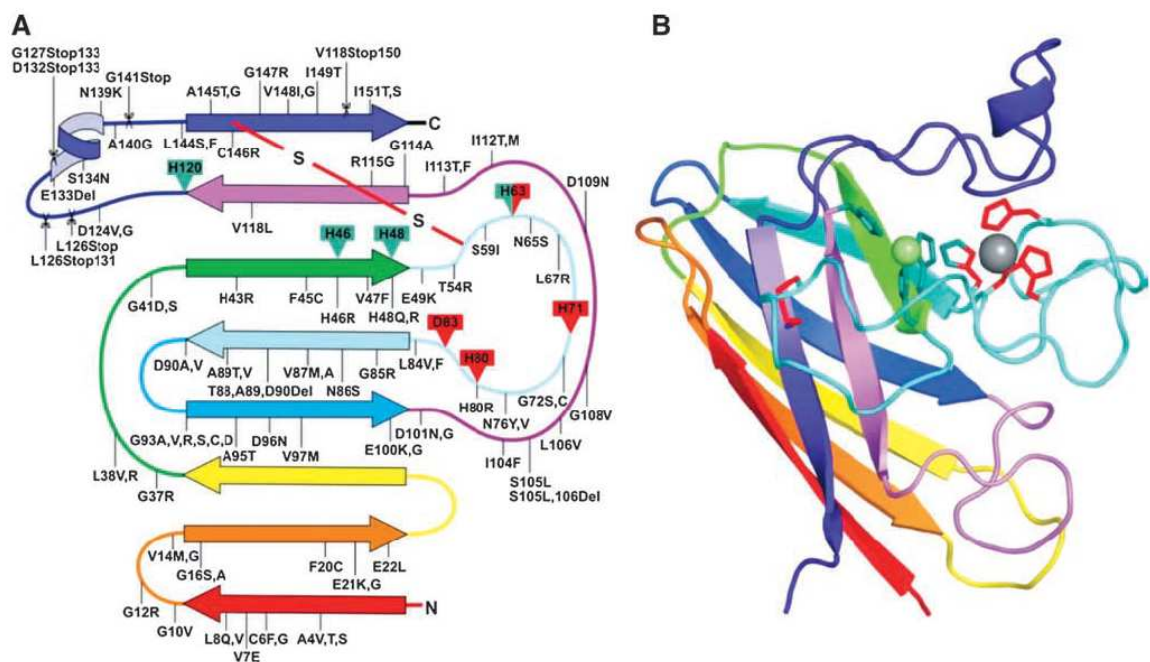


Figura 2. Representación de la estructura secundaria de la enzima SOD1 [13]. El diagrama muestra la ubicación de las mutaciones asociadas a casos de ELAf (A) y la estructura del monómero de SOD1 (B). Los iones de cobre y zinc se muestran como esferas verdes y grises respectivamente y los puentes disulfuro de muestran en rojo. Las mutaciones puntuales, deleciones e inserciones son indicadas con una línea, mientras que las mutaciones que causan extremos C-terminales truncos se esquematizan con una tijera.

Solamente un 2-3% de los pacientes con ELA poseen mutaciones en el gen *sod1* [35]. Aunque esta es una pequeña proporción del total de los casos de ELA, la evidencia sugiere que los casos más frecuentes de ELA, denominados esporádicos, podría ocurrir por un mecanismo similar que involucra a la proteína salvaje [35, 36], lo cual sugiere que el plegamiento de la hSOD salvaje se ve afectado por factores extrínsecos a su secuencia aminoacídica en pacientes con ELA esporádica.

La similitud entre los casos de ELA esporádicos y los casos de ELA familiar causados por mutaciones en el gen *sod1* han impulsado el diseño de modelos de ratas y ratones transgénicos para *sod1*-ELA^f. Estos animales desarrollan síntomas que se asemejan estrechamente a la enfermedad humana, es por ello que son una importante herramienta para estudiar la patología y así por establecer cuáles son los mecanismos moleculares que están implicados en dicha enfermedad [37].

2.5 Cu/Zn Superóxido dismutasa (SOD)

La Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD o SOD1) es la enzima antioxidante más importante presente en el citosol, peroxisomas, y el espacio intermembrana de la mitocondria en células eucarióticas. La Cu/Zn SOD humana es un homodímero de 32 kDa constituido por monómeros de 153 aminoácidos, cada uno con un ión Cu^{2+} y otro de Zn^{2+} , y un puente disulfuro intramolecular. El ión Cu^{2+} de cada subunidad se posiciona en el centro catalítico que es encargado de generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) a partir de anión superóxido (O_2^-). El zinc juega un rol importante en el mantenimiento de la actividad catalítica en un amplio rango de pH y en la estabilización de la estructura de la Cu/Zn SOD [32].

La cadena polipeptídica de la SOD1 se pliega en un motivo de barril de 8 cadenas beta intercaladas por loops de los cuales, dos son largos y tienen importancia funcional, el loop electrostático y el loop de Zinc. La estructura de barril beta es una propiedad fundamental del polipéptido y puede observarse aun en ausencia de los cofactores metálicos y del puente disulfuro [38]. La

formación del puente disulfuro y la unión de los metales incrementa la fuerza de las interacciones entre las subunidades del homodímero, y proporcionan la estructura de loops, especialmente del loop electrostático y el de zinc [39]. El loop de zinc contiene tres residuos de histidina y uno de aspartato que coordinan el ión zinc; una de estas histidinas también se une al ión cobre junto con otros tres residuos de histidina [32].

Importantes estudios bioquímicos realizados sobre SOD1 muestran la contribución de las modificaciones postraduccionales en su estabilidad. La maduración de este polipéptido implica los siguientes pasos luego de la traducción: acetilación del extremo N-terminal, inserción del cobre y del zinc y formación del puente disulfuro en cada subunidad, y dimerización [36].

La enorme estabilidad estructural que posee la enzima Cu/Zn SOD se debe fundamentalmente a la correcta coordinación de los iones Cu^{2+} y Zn^{2+} . La ausencia de estos cofactores parece ser clave en el desarrollo patológico en la ELA debido a que se produce un plegamiento incorrecto de la enzima [40].

Una de las mutaciones más ampliamente estudiadas en el gen *sod1* es la G93A, la cual implica la sustitución del aminoácido glicina en la posición 93 por el aminoácido alanina. Esta ha sido utilizada como modelo de ELA en ratones y ratas transgénicas que expresan la Cu/Zn SOD G93A humana [41]. Aunque los efectos de las mutaciones han sido ampliamente estudiados en modelos animales, poco se sabe sobre el mecanismo que lleva a la agregación de esta proteína en la enfermedad.

En el presente trabajo nos proponemos abordar este tema desde el punto de vista del uso de codones y la cinética local de traducción, debido a que el entorno celular podría estar jugando un rol importante en el mal plegamiento proteico de este enzima. Con este propósito se realizó un estudio *in silico* para determinar regiones enriquecidas en codones raros dentro de la secuencia codificante de la hSOD. Dentro de un agrupamiento de cuatro codones poco frecuentes se realizaron dos mutantes sinónimos en los cuales se sustituyeron los codones poco frecuentes por los más frecuentes para esos aminoácidos. Los mutantes sinónimos de hSOD fueron expresados en *E. coli* para evaluar si las modificaciones efectuadas afectan la solubilidad de dicha proteína. La

variación en la solubilidad de una proteína nos da un indicio de alguna modificación a nivel estructural.

3 Objetivos

En general, en este trabajo, se pretende profundizar en los mecanismos que llevan a la formación de agregados proteicos a través del estudio de la modificación de codones sinónimos. El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de los mecanismos que determinan el plegamiento de proteínas en la célula, y en particular nos proponemos determinar cuál es la contribución de la cinética traduccional en la conformación adoptada por esta proteína.

El objetivo específico de este proyecto es determinar si cambios de codones sinónimos en la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD humana expresada en *E.coli* pueden conducir a cambios de solubilidad de la proteína.

4 Estrategia experimental

Con el objetivo de determinar si alteraciones de la cinética traduccional en la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD humana pueden alterar su solubilidad, se analizará el uso de codones y la distribución de agrupamiento de codones raros en dicha secuencia. Una vez ubicadas las agrupaciones de codones raros, se realizarán mutantes sinónimas sustituyendo codones sinónimos raros por codones frecuentes. Se expresará la Cu/Zn SOD humana codificada por estos mutantes en la cepa BL21-star DE3 de *E. coli* y se analizará la solubilidad de la enzima mediante fraccionamiento soluble-insoluble de las proteínas y visualización por SDS-PAGE y Western Blot.

5 Materiales y métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Cepas de *Escherichia coli*

- XL1-Blue (Stratagene)

Genotipo:

*endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10proAB⁺lacI^q
Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)*

Las células XL1-Blue no contienen el gen de endonucleasa (*endA*), lo que mejora notablemente la calidad de la minipreparación. Tampoco pueden recombinar ya que son *recA* deficientes, aumentando la estabilidad del inserto. La mutación *hsdR* previene el clivaje del ADN clonado por la endonucleasa EcoK; y el gen *lacIqZΔM15* permite la detección de colonias con plásmido que incorporaron inserto por el método blanco-azul.

- DH5α

F⁻ Φ80/*lacZΔM15* Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*

El marcador Φ80/*lacZΔM15* ofrece α-complementación con el gen de β-galactosidasa de pUC o vectores similares y, por lo tanto, puede ser utilizado para la selección blanco/azul de colonias en placas que contengan X-gal. DH5α es capaz de ser transformada con grandes plásmidos

- BL21 (DE3) star (Invitrogen)

F⁻ *omp ThsdSB* (rB-mB) *gal dcm rne131* (DE3)

La designación DE3 indica que las células contienen lisógeno que porta el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Se requiere IPTG para inducir la expresión de la ARN polimerasa T7.

Esta cepa contiene una mutación en el gen *rne* (*rne131*) que codifica para la enzima RNasa E truncada, por lo que carece de la capacidad de degradar el ARNm, resultando en un aumento de la estabilidad del mismo.

Esta cepa no contiene la proteasa Lon y también es deficiente de la proteasa OmpT, lo que reduce la degradación de proteínas heterólogas.

5.1.2 Medios de cultivo (ver anexo)

5.1.3 Vectores plasmídicos

- pET-3D SOD

Este vector ya contiene la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD humana clonada. Este tiene una longitud de 4637 pb. La región de clonado/expresión es transcrita por la ARN polimerasa T7. El vector pET-3d confiere resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas con el. En el laboratorio hay un plásmido pET-3d clonado con la secuencia de la Cu/Zn SOD salvaje y otro clonado con la secuencia de la Cu/Zn SOD mutante G93A.

5.1.4 Enzimas de restricción

- EcoRI (Promega)

La endonucleasa EcoRI digiere la molécula de ADN en la secuencia específica G/AATTC. Esta enzima presenta 100% de actividad cuando es incubada a 37°C en buffer H de Promega, y en el buffer 3NEB que fue el utilizado en este trabajo. En condiciones de baja fuerza iónica (menor a 25mM), alta concentración enzimática, una concentración de glicerol mayor al 5%, o pH mayor a 8,0 pueden provocar *star activity*.

5.1.5 Anticuerpos

- *Anticuerpo primario*

Para el revelado del Western Blot se utilizó un anticuerpo primario policlonal: anti SOD elución glicina, específico para SOD humana, producido en nuestro laboratorio previamente [42]. Se realizó una dilución 1:500 en buffer de bloqueo para la solución de trabajo.

- *Anticuerpo secundario*

Se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP de SIGMA. Se realizó una dilución 1:5000 en buffer de bloqueo para la solución de trabajo.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de células competentes

Se inocula un tubo de precultivo de 3mL de LB con una colonia aislada de la cepa deseada, se crece overnight (o.n.) a 37°C. Se inocula un matraz de 1 litro, conteniendo 250 mL de medio LB, con el precultivo crecido o.n. con 2,5 mL del precultivo. Se crece a 37°C hasta que la DO_{600nm} sea 0,300. Luego se centrifuga durante 10 minutos a 3000 g a 4°C. A partir de este punto, las células y el material siempre deben estar a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se lava el sedimento con 100mL de $CaCl_2$ 0,1M. Se centrifuga nuevamente 10 minutos a 3000 g. Se descarta el sobrenadante, luego se resuspende el sedimento en 100mL de $CaCl_2$ y se incuba 1 hora. Finalmente se vuelve a centrifugar 10 minutos a 3000 g, se resuspende el pellet en 3 mL de $CaCl_2$ 0,1M con 20% de glicerol y se guarda a -80°C en alícuotas de 50-200 μ L en tubos de centrífuga de 1,5 mL pre-enfriados.

5.2.2 Transformación de bacterias

Se descongelan células competentes y se incuban en hielo 10 minutos. Posteriormente se agrega el ADN en un volumen igual o menos a 1/5 del volumen de las células competentes, en este caso 1 μL (50 ng/ μL), y se incuba en hielo 15 minutos. Se realiza un shock térmico de 90 segundos a 42°C o 120 segundos a 37°C y se incuba durante unos minutos en hielo. Luego se agregan 4 volúmenes de LB y se incuba a 37°C con agitación suave durante 50 minutos. Pasado este tiempo se plaquea en placas de LB Agar + ampicilina 100 μM .

5.2.3 Minipreparación de ADN por lisis alcalina

Se inocula un tubo de precultivo con 3 mL de LB con ampicilina con una colonia de una placa fresca. El precultivo se deja crecer o.n. a 37°C con agitación. Luego se centrifuga 30 segundos a 5000 g (en dos veces con el mismo tubo, para coleccionar todo el cultivo), se centrifuga unos segundos y se seca el sedimento con pipeta. El sedimento se resuspende en 200 μL Tris-HCl 50mM pH 8,0, EDTA 10 mM (Solución 1). Una vez resuspendido el sedimento se adicionan 5 μL de RNasa 10 mg/mL. Luego se agregan 200 μL de NaOH 200mM, SDS1% (Solución 2), se mezcla por inversión suavemente y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 200 μL de Acetato de potasio 3 M pH 4.8 fría (Solución 3: 60mL de acetato de potasio 5M, 11.5mL de ácido acético glacial y 28.5 mL H_2O), se mezcla y se deja 5 minutos en hielo. Luego se centrifuga 15 minutos a 13000 g, éste paso se repite una vez. Se recupera el sobrenadante, se le agregan 0.6 volúmenes de isopropanol y se deja 15 minutos en la mesada. Se centrifuga 20 minutos a 13000 g a 4°C, se descarta el sobrenadante y el pellet se lava con 1 mL de EtOH 70%; si no se ve el sedimento de plásmido, se vuelve a centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se descarta el sobrenadante y se seca con pipeta, después se seca bajo lámpara y se resuspende en 35 μL de H_2O miliQ.

5.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

Se calientan 0,5g de agarosa en 50 mL de buffer TAE en microondas hasta que se funde completamente. Luego se deja entibiar y se mezcla con Gel Red, 2,5 μ L cada 50 mL de solución TAE-Agarosa. Posteriormente se coloca la solución en la camilla con el peine adecuado hasta que gelifique. Una vez gelificado se coloca la camilla en la cuba, se siembra la muestra, y marcador de peso molecular. La corrida electroforética se realiza a 100 voltios. Cuando el frente de avance marcado por el azul de bromofenol ha migrado lo suficiente se revela el gel bajo luz ultravioleta.

5.2.5 Digestión de ADN plasmídico con la enzima de restricción EcoRI

En un tubo eppendorf de 1,5 mL se colocan 12 μ L de H₂O mili Q, 2 μ L de buffer 3 NEB, 5 μ L de ADN y 1 μ L de enzima EcoRI (Promega). Se incuba a 37°C durante 1 hora. Para cuantificar la reacción se realiza una electroforesis de agarosa 1%.

5.2.6 Mutagénesis dirigida

Se utilizó el Kit “QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene.

En esta reacción se utiliza el ADN molde sobre el cual se quiere realizar la mutación y los primers con la mutación deseada en el centro y regiones flanqueantes de igual tamaño hacia ambos extremos. En la reacción de mutagénesis estos primers se unen al ADN molde y se inicia la reacción de síntesis. Luego de varios ciclos de extensión, se digiere el ADN parental (salvaje) con la enzima DpnI y se transforman células super-competentes con el plásmido sintetizado a partir de los primers que contienen la mutación deseada.

❖ **Elección de primers**

Los oligonucleótidos necesarios deben ser diseñados de acuerdo a la mutación deseada, teniendo cuenta las siguientes consideraciones:

- Ambos cebadores deben contener la mutación deseada y ser complementarios a las hebras opuestas en el plásmido.
- Los cebadores debería tener un largo de 25 a 45 pares de bases, con una temperatura de melting $\geq 78^{\circ}\text{C}$.
- La siguiente fórmula es comúnmente usada para estimar la T_m de los cebadores:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$$

Para calcular la T_m :

- N es el largo de los cebadores en pares de bases.
- La mutación deseada debe estar en la mitad del cebador con 10-15 bases a ambos lados.
- Los cebadores óptimos deben tener un contenido mínimo de GC del 40% y deben terminar en C o G.
- Los cebadores deben ser purificados o por Fast Polynucleotide Liquid Chromatography (FPLC) o por Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE).

Los primers diseñados para la construcción de los mutantes fueron los siguientes:

Oligos Mutante 1:

5' TCGAGCAGAAGGAATCTAACGGTCCGGTGAAGGTGTGGGG 3'

3' AGCTCGTCTTCCTTAGATTGCCAGGCCACTTCCACACCCC 5'

Oligos Mutante 2:

5' CAGAAGGAAAGTAATGGTCCAGTGAAGGTGTGG 3'

3' GTCTTCCTTTCATTACCAGGTCCTTCCACACC 5'

❖ **Reacción de síntesis del ADN mutante**

El ADN molde debe ser aislado de una cepa de *E. coli dam*⁺.

Preparación de la mezcla de reacción:

Síntesis del Mutante 1:

- 5 µL buffer de reacción 10x
- 2 µL (49,8 ng) ds ADN molde
- 1 µL SOD mut 1F (10 µM)
- 1 µL SOD mut 1R (10 µM)
- 1 µL dNTP mix
- 40 µL ddH₂O

Síntesis del mutante 2:

- 5 µL buffer de reacción 10x
- 2 µL (49,8 ng) ds ADN molde
- 1 µL SOD mut 2F (10 µM)
- 1 µL SOD mut2R (10 µM)
- 1 µL dNTP mix
- 40 µL ddH₂O

Luego se agrega a ambos tubos 1 µL de *Pfu Ultra* HF ADN polimerasa.

Los parámetros del termociclador para la reacción se detallan en la tabla 1.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 segundos
2	12 a 18	95°C	30 segundos
		55°C	1 minuto
		68°C	1 minuto/kb del plásmido

Luego de la reacción incubar durante 2 minutos el tubo hasta que la temperatura del mismo descienda a $\leq 37^{\circ}\text{C}$.

❖ ***Digestión con Dpn I de los productos de amplificación***

Agregar 1 μL de Dpn I (10 U/ μL), mezclar suavemente con pipeta. Centrifugar durante 1 minuto en microcentrífuga e inmediatamente incubar cada reacción a 37°C por 1 hora para digerir el dsADN parental supe renrrollado.

❖ ***Transformación de células XL1-Blue supercompetentes***

Las células XL1-Blue son resistentes a tetraciclina. Si el plásmido mutagenizado contiene solo resistencia tet^R debe utilizarse una cepa alternativa sensible a tetraciclina.

En primer lugar se descongelan las células XL1-Blue y se hacen alícuotas de 50 μL en tubos Falcon de 15 mL. Se agrega 1 μL de cada muestra tratada con Dpn 1 a alícuotas separadas de células supercompetentes. Luego se mezcla suavemente y se deja en hielo por 30 minutos. Posteriormente se incuba a 42°C durante 45 segundos y luego se deja en hielo 2 minutos.

Luego del shock térmico se agregan 500 μL de medio LB precalentado (42°C) suplementado con 37,5 μL de MgCl_2 1M, 37,5 μL de MgSO_4 1M y 60 μL de Glucosa 20 %, y se incuba a 37°C y 200 rpm durante 1 hora. Se plaquean 250 μL de cada muestra en placas LB-ampi preparadas en el momento y se incuban o. n. a 37°C .

Se espera un número de colonias entre 10 y 1000, dependiendo de la composición de bases y el largo del ADN molde utilizado. El inserto de interés debe ser secuenciado para verificar que los clones seleccionados contienen la mutación deseada.

5.2.7 Secuenciación

La secuenciación de los productos de la Mutagénesis fue realizada en el Instituto Pasteur de Montevideo. Para la misma se utilizó el oligonucleótido T7 de pBluescript.

5.2.8 Expresión de las proteínas Cu/Zn SOD salvaje, Cu/Zn SOD mutante G93A, Cu/Zn SOD mutante 1 y Cu/Zn SOD mutante 2 humanas

Se inocula un tubo de precultivo de 3mL de medio LB + ampicilina 100 µg/mL con una colonia de una placa fresca que contenga el plásmido con la secuencia codificante de la proteína de interés. Se deja creciendo o. n. a 37°C y 200 rpm. Posteriormente se inocula un matraz con 50 mL de medio LB + 100 µg/mL de ampicilina con el precultivo crecido de manera que la DO_{600nm} del matraz sea 0,03. El cultivo se crece a 37°C y 200 rpm hasta que alcanza una DO_{600nm} entre 0,6 y 0,8. Una vez crecido el cultivo, se agrega $ZnCl_2$ y $CuSO_4$ quedando estos en una concentración 0,1 mM y 50 µM respectivamente, y se induce la expresión con IPTG 1 mM. La expresión se realiza durante 2 horas a 30°C. Cuando culmina el tiempo de expresión, se centrifuga el medio crecido en tubo falcon de 50 mL a 5000 rpm durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante, y si no se va a utilizar inmediatamente se guarda el precipitado a -80°C.

5.2.9 Fraccionamiento soluble-insoluble

Se transfieren 6 mL de cultivo con una DO_{600nm} de 1,5 (o el volumen equivalente a esa cantidad de células, y se centrifuga a 3500 rpm 10 minutos. Luego se seca el sedimento sobre papel y se resuspende en 0,45 mL de buffer (20mM de Tris-HCl pH 8,0) a 4°C. Alternativamente, se resuspende en 5 mL de buffer por gramo de sedimento. Se agregan 50 µL solución de lisozima 2 mg/mL fresca en 0,1 M EDTA pH 8,0. La muestra se sonica con microtip 60% 6 veces por 20 segundos con intervalos de 1 minuto. Cuando la muestra no contiene más precipitados, se centrifuga 30 minutos a 14000 g, se recupera el sobrenadante que constituye la fracción soluble. Se lava el precipitado, con

cuidado de no removerlo, con 0,45 mL de buffer y se centrifuga 20 minutos a 14000 g. Luego se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 0,45 mL de urea 8M, esto constituye la fracción insoluble.

5.2.10 Electroforesis de Proteínas SDS-PAGE (15 %)

Para la preparación del gel separador se mezclan, en un tubo falcon de 50 mL, 7,5 mL de acrilamida 30%/bis acrilamida 0,8%, 3,75 mL de Tris-Cl/SDS 4x y 3,75 mL de H₂O miliQ. Se agregan 100 µL de persulfato de amonio 10% y 20 µL de TEMED, se mezclan rápidamente y se coloca entre los vidrios que le dan forma al gel. Luego se cubre con Butanol saturado en agua. Se prepara el gel concentrador mezclando 0,65 mL de acrilamida 30%/bis acrilamida 0,8%, 1,25 mL de Tris-HCl 4x pH 6,8 y 3,05 mL de H₂O miliQ. Cuando el gel separador gelificó, se seca el butanol de la superficie, se agregan los catalizadores al gel concentrador y este se coloca encima del otro. Antes que gelifique, se coloca el peine.

Las muestras que se desean correr en el gel se mezclan con el buffer de muestra (Anexo) en una relación 3:1 respectivamente. Luego se hierven durante 5 minutos y se siembra el volumen deseado en cada pocillo. También se siembra el marcador de peso molecular. La corrida electroforética se realiza en cuba BioRad a 80 voltios, hasta que la muestra pase el gel concentrador y luego a 140 voltios hasta que el frente de avance llegue al final del gel.

5.2.11 Western Blot

Luego de la electroforesis, se transfiere la muestra del gel a la membrana Hybond-C (Amersham) en cuba de transferencia Bio-Rad a 200 mA durante 2 horas en buffer de transferencia. La membrana se coloca en solución de bloqueo durante 1 hora y se deja en buffer TBST hasta el momento del revelado.

Para el revelado, la membrana se cubre con el anticuerpo primario anti-SOD humana (elución glicina) 1/500 en buffer de bloqueo. Se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se hacen 6 lavados de 5 minutos con TBST a temperatura ambiente con agitación constante, para evitar interacciones inespecíficas. Se incuba con anticuerpo secundario anti-Ig anti-Rabbit (SIGMA) 1/5000 en buffer de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hacen 12 lavados de 5 minutos con buffer TBST a temperatura ambiente con agitación constante.

La solución de revelado SIGMA se prepara 30 minutos antes de colocarla sobre la membrana, mezclando partes iguales de las soluciones 1 y 2. La mezcla se coloca sobre la membrana y se deja actuar durante 5 minutos en cuarto oscuro. La membrana se coloca dentro de una bolsa transparente y se expone una placa para quimioluminiscencia SIGMA durante unos segundos. Posteriormente la placa se coloca en buffer de revelado (MediQ) hasta la aparición de las bandas. Se enjuaga la placa con agua, se sumerge en solución fijadora (MediQ) y se vuelve a lavar con agua.

6 Resultados y Discusión

6.1 Análisis del uso de codones en la secuencia codificante de la hSOD

Con el propósito de determinar las regiones enriquecidas en codones raros dentro de la secuencia codificante de la hSOD, se estudió la frecuencia de uso de codones aplicando el algoritmo %MinMax [1]. El algoritmo %MinMax define la relación entre una secuencia de ARNm dada y secuencias hipotéticas que codifican la misma proteína utilizando los codones menos frecuentes (mínimo) o los más frecuentes (máximo) como una función de la medida aritmética de todas la frecuencias posibles de uso de codones. El mismo se calcula como lo indica la Figura 3, utilizando ventanas deslizantes de 18 nucleótidos.

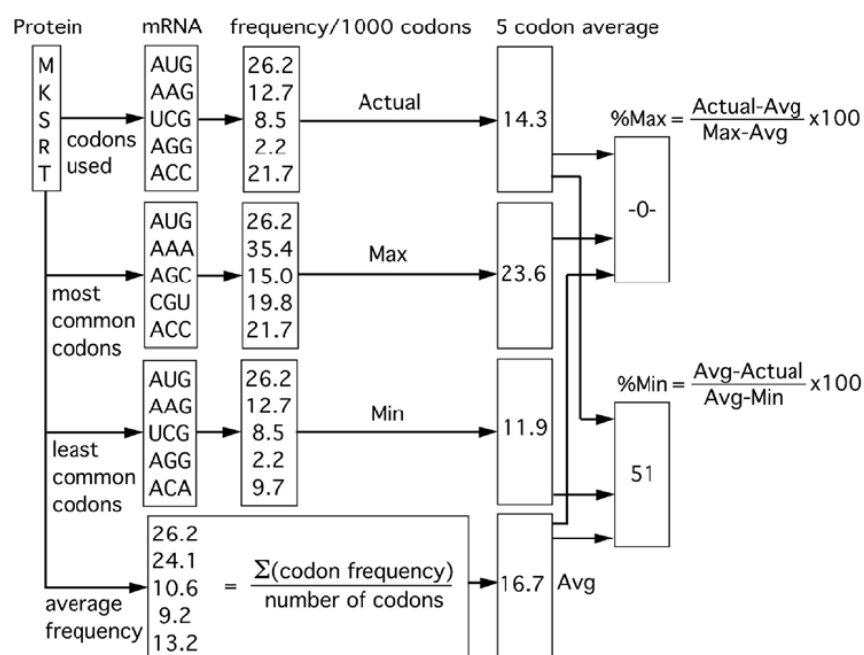


Figura 3. Análisis %MinMax para el pentapéptido MKSRT [1]. A partir de la frecuencia de uso para cada codón se calcula el %Min y el %Max para la ventana determinada. Se ilustra en la figura el cálculo para un pentapéptido. Para una proteína (polipéptido) se calcula el %Min y el %Max para ventanas deslizantes de 18 nucleótidos.

Luego de calcular el %Min y %Max se establece cuál de estos valores aparecerá en la gráfica; cuando %Max es mayor que %Min se grafica %Max; en cambio, cuando %Min es mayor que %Max se grafica $-1 * (\%Min)$. De esta forma, cuando prevalezcan los codones raros sobre los frecuentes dentro de la ventana, el valor en la gráfica será negativo, mientras que cuando prevalezcan los codones frecuentes, el valor en el gráfico será positivo.

Se aplicó el algoritmo %MinMax sobre la secuencia codificante de hSOD utilizando la frecuencia de uso de codones de *E. coli* y Humanos calculadas a partir de proteínas ribosomales, este estudio se realizó con la base de datos “Codon Usage Database” (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>); las tablas empleadas se encuentran en el anexo “Tablas de datos”. Es importante aplicar este algoritmo tanto con la frecuencia de uso de codones de *E. coli* como con la de Humanos ya que nos interesa comparar ambos sistemas para evaluar si se podría afectar la expresión de la enzima por el solo hecho de expresarse en un sistema heterólogo.

La figura 4 muestra los valores del algoritmo MinMax% en función de la posición media de la ventana deslizante de 18 nucleótidos, representada con la letra del aminoácido codificado en el punto medio de dicha ventana. Los valores del gráfico por debajo de cero corresponden a agrupaciones de codones raros, mientras que los valores del gráfico positivos corresponden a agrupaciones de codones frecuentes. Los valores del algoritmo %MinMax calculados con los datos de frecuencia de uso de codones de ARNm Humanos se muestran en rojo, mientras que los de *E. coli* en azul. Si bien ambos %MinMax tienen valores diferentes para varios puntos del gráfico, puede observarse una tendencia similar en cuanto al aumento y disminución de las frecuencias de uso de codones en distintas zonas del ARNm. Por ejemplo, en la parte superior del gráfico, que corresponde al primer tercio de la secuencia codificante, los valores de %MinMax para *E. coli* están mucho más cercanos al cero que los valores para Humanos, pero para ambos se observa un pequeño aumento al principio y luego un descenso bien marcado. La región media del gráfico muestra valores similares para ambos. Se puede observar que no hay grandes agrupaciones de codones raros en esta proteína.

El interés en comparar los valores de %MinMax de *E. coli* y de Humanos de la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD es para determinar similitudes entre ambos sistemas para la expresión de la hSOD. Nuestro sistema de expresión experimental es *E. coli*, y en particular nos interesa determinar regiones enriquecidas de codones raros cuando la enzima humana se expresa en dicho sistema.

Analizando en detalle codón por codón se identificó un agrupamiento de cuatro codones consecutivos que tienen una frecuencia de uso mas baja para los codones de *E. coli*; estos cuatro codones corresponden a la Serina 26, la Asparagina 27, la Glicina 28 y la Prolina 29.

Nos interesó analizar cual sería el efecto de sustituir codones sinónimos para estos aminoácidos, por varias razones:

1. Estos aminoácidos están ubicados en un loop entre dos alfa hélices. Se ha reportado en estas estructuras una mayor presencia de codones poco frecuentes [23].
2. Para estos cuatro codones el valor de %MinMax es más negativo cuando se considera las frecuencias de uso de codones de *E. coli*, por lo que la variación de codones raros por codones frecuentes puede ser importante en el sistema de expresión que será utilizado.
3. Entre estos residuos hay una prolina, aminoácido que posee características particulares interesantes en relación al plegamiento de proteínas. Al analizar la frecuencia de uso de codones a lo largo de la secuencia se observa que la mayoría de las glicinas están codificadas por su codón menos frecuente en *E. coli*, por lo que también es interesante sustituir éste codón por el más frecuente de *E. coli*.

%MinMax hSOD

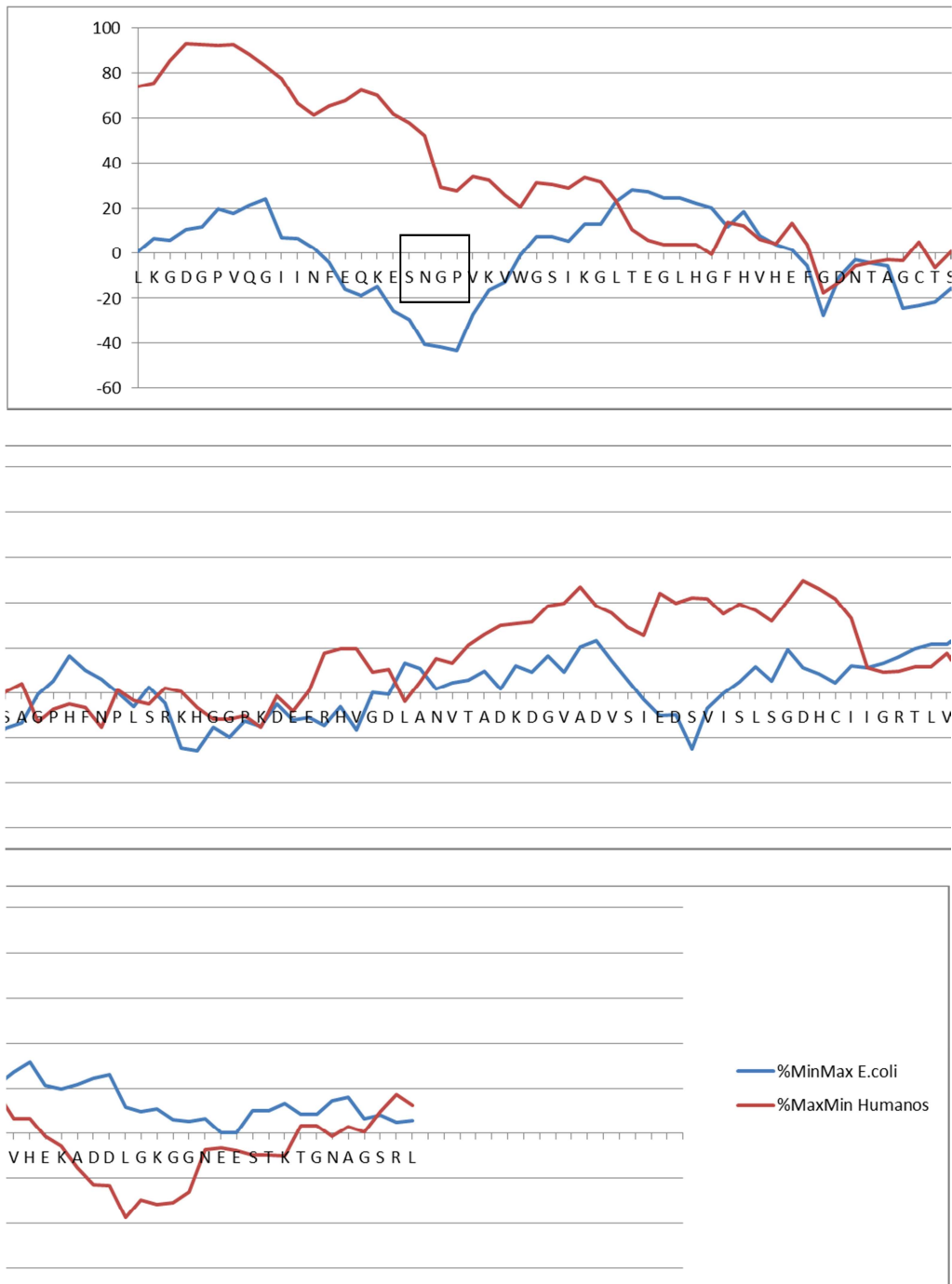


Figura 4. Algoritmo %MinMax aplicado a la secuencia codificante de la proteína hSOD. Se muestra el gráfico %MinMax realizado considerando el uso de codones de las proteínas ribosomales de *E. coli* (en azul) y las humanas (en rojo). El eje de las "x" representa los aminoácidos de la proteína mientras que el eje de las "y" representa los valores de %MinMax. El primer aminoácido representado en la gráfica corresponde a la novena posición del polipéptido, y corresponde al punto medio de la primera ventana deslizante. De la misma forma, el gráfico termina 9 aminoácidos antes del extremo Carboxilo terminal. La región seleccionada para estudiar y realizar la mutagénesis está indicada con un recuadro negro.

Para codificar el tetrapéptido seleccionado hay 192 posibilidades de acuerdo al código genético. Considerando el uso de codones de *E. coli*, como primera aproximación se decidió analizar dos mutaciones sinónimas. En el Mutante 1 se cambiaron los cuatro codones por los más frecuentes en *E.coli* de cada aminoácido, mientras que en el Mutante 2, se cambió solo el codón que codifica para el aminoácido Glicina por su codón más frecuente también en *E. coli* [Figura 5].

<i>Grupo de codones raros hSOD wt</i>			
S	N	G	P
AGT	AAT	GGA	CCA

<i>Mutante 1</i>			
S	N	G	P
TCT	AAC	GGT	CCG

<i>Mutante 2</i>			
S	N	G	P
AGT	AAT	GGT	CCA

Figura 5. En el panel superior se muestran los codones que codifican los aminoácidos Serina, Asparagina, Glicina y Prolina en la hSOD salvaje (wild type -wt-). En el panel del medio, se muestra la secuencia de cada codón en el Mutante 1, y en el panel inferior la secuencia de cada codón en el Mutante 2. Ambos mutantes se diseñaron considerando las frecuencias de uso de codones de *E. coli*.

6.2 Mutagénesis. Preparación del ADN molde

La secuencia codificante de la hSOD salvaje está clonada en el plásmido pET-3D, por lo que éste constituye el ADN molde para la mutagénesis dirigida. Para realizar la reacción de mutagénesis es importante tener una preparación de plásmido de buena calidad.

Se amplificó dicho plásmido en bacterias *E.coli* XL1-Blue. Se creció una colonia procedente de la transformación, en un precultivo de 3 mL de LB y ampicilina 100 µg/mL y se realizó una minipreparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina. La preparación de ADN plasmídico fue analizada por electroforesis de agarosa [Figura 6]. En paralelo a la transformación y amplificación del pET-3d + hSOD salvaje se realizó el mismo procedimiento para el plásmido pET-3d + hSOD G93A, ya que otro se utilizará como control de agregación de la SOD en los ensayos de expresión en *E coli*.

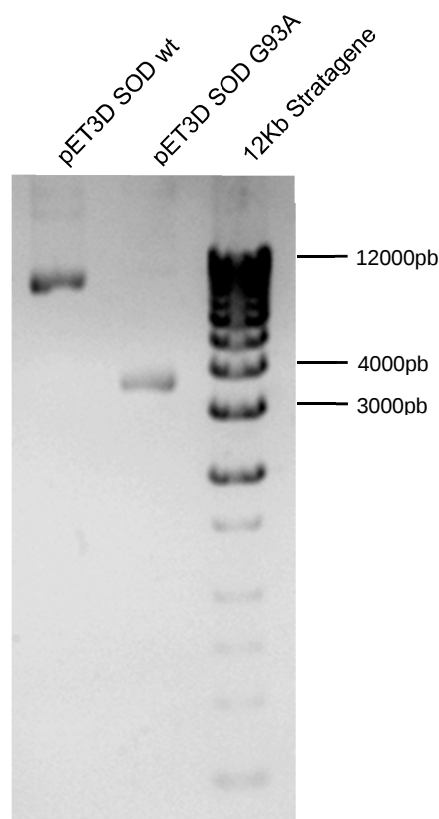


Figura 6. Análisis de la preparación plasmídica mediante electroforesis. Electroforesis de agarosa 1%. En el carril 1 se sembró el plásmido pET-3d+hSODwt y en el 2 el plásmido pET-3d+hSODG93A. En el carril 3 se sembró el marcador de peso molecular (12 kb, Stratagene).

Como se muestra en la figura 6, el plásmido pET-3d+hSODwt migró menos (a la altura de 11000 pb) que el pET-3d+hSODG93A (a la altura de 3500 pb) en la electroforesis. Sabiendo que los dos vectores tienen el mismo tamaño (4637 pb) lo esperable era que migraran a la misma velocidad.

Para corroborar la identidad y tamaño del plásmido y analizar la calidad de las preparaciones se realizó una digestión con la enzima de restricción EcoRI. Esta enzima corta una sola vez el plásmido y por lo tanto podremos saber si ambos poseen el mismo peso molecular [Figura 7]. La digestión con EcoRI se realizó en un volumen total de 20 uL (4uL miniprep, 2 uL Buffer 3 NEB, 1 uL EcoRI Promega y 13 uL H₂O mQ), se incubó 1 hora a 37°C.

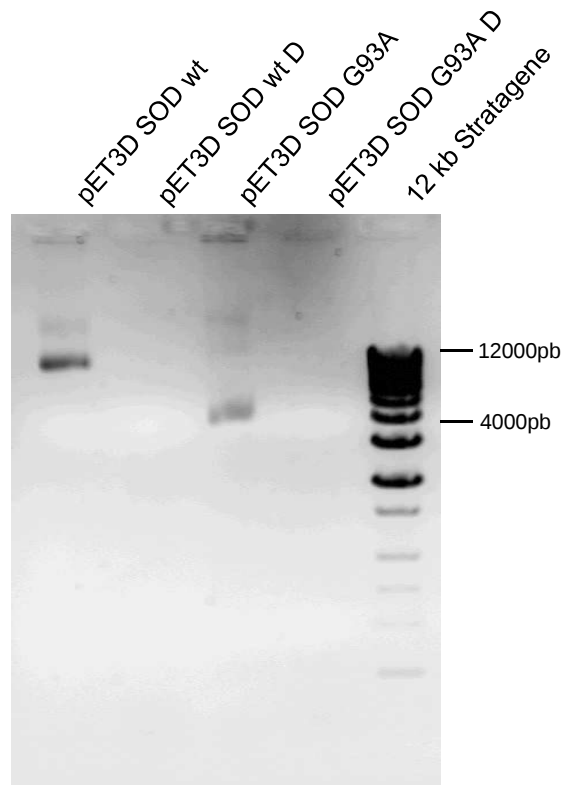


Figura 7. Análisis de la digestión del plásmido pET-3d + hSOD mediante electroforesis de agarosa 1%. Se sembraron 2 uL de cada miniprep sin digerir, 20 uL de cada digestión y 6 uL de marcador de peso molecular 12 kb Stratagene. Las muestras se sembraron en el siguiente orden: carril 1, pET-3d+hSODwt, carril 2, pET-3d+hSODwt digerido con EcoRI, carril 3, pET-3d+hSODG93A, carril 4, pET-3d+hSODG93A digerido con EcoRI, y carril 5, marcador de peso molecular. No se observan bandas de ADN en los carriles 2 y 4.

Durante la reacción de digestión se degradó el ADN plasmídico por lo que supusimos que la preparación de ADN estaba contaminada con alguna DNAsa. Por ello realizamos un control negativo de la digestión, para descartar que el buffer de la enzima fuese el que estaba causando problemas [Figura 8], pero el

ADN se degradó nuevamente. Se repitió varias veces la extracción del ADN plasmídico y siempre se obtuvieron los mismos resultados, por ello decidimos cambiar de cepa de amplificación, en vez de XL1-Blue transformamos bacterias de la cepa DH5 α y se volvió a realizar la preparación de ADN plasmídico.

Esta vez se tomó la precaución de realizar los controles negativos sin enzima [Figura 9]. A partir de estos resultados llegamos a la conclusión de que la cepa XL1 no estaba funcionando bien y seguimos trabajando con la DH5 α . Además se corroboró que tanto el plásmido que contiene la hSOD salvaje como el que contiene la hSOD G93A poseen el mismo peso molecular, por lo tanto la diferencia de migración puede deberse a diferencias en el empaquetamiento o a formación de estructuras de mayor peso molecular.

Como se mencionó anteriormente, es necesario tener bien cuantificado el plásmido para realizar la mutagénesis. Debido a que la muestra procede de una preparación de ADN plasmídico en la cual quedan restos de ARN, la cuantificación mediante determinación de la absorbancia por espectrofotometría a $\lambda = 260$ no daría un resultado fiable. Se realizó entonces una electroforesis de gel de agarosa con una dilución 1:4 del plásmido y se compararon con el estándar de peso molecular para estimar su concentración [Figura 9]. De acuerdo a la migración en el gel, para cuantificar la muestra se comparó con la intensidad de la banda con mayor peso molecular del marcador de peso molecular y se estimó que la muestra problema tiene una concentración de aproximadamente 150 ng/uL de plásmido. Para la reacción de mutagénesis se necesitan aproximadamente 50 – 100 ng de ADN molde, por lo que la concentración del plásmido resulta adecuada.

6.3 Mutagénesis dirigida

Con el propósito de sustituir los codones poco frecuentes seleccionados que codifican los aminoácidos S, N, G y P, se realizó una mutagénesis dirigida sobre la secuencia codificante de la hSODwt clonada en el plásmido pET-3d. Para ello se utilizó el kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis de Stratagene; el protocolo se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

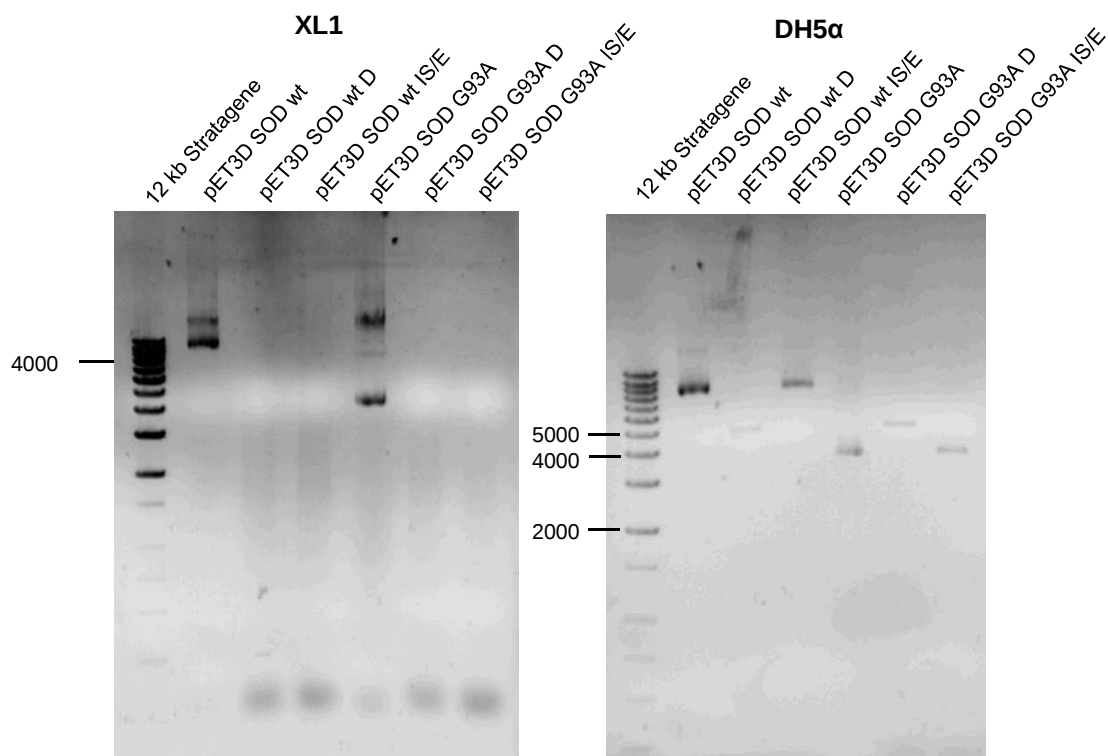


Figura 8. Análisis del rendimiento de la purificación de ADN plasmídico XL1-Blue vs. DH5α mediante electroforesis. Las muestras sembradas los geles de la izquierda y derecha corresponden a ADN aislado a partir de *E. coli* XL1-Blue y DH5α respectivamente. Se sembraron 2 uL de cada miniprep sin digerir, y los 20 uL de las digestiones y los controles negativos sin enzima de restricción. Las muestras se sembraron en el siguiente orden: 1, marcador de peso molecular (12kb Stratagene), 2, pET-3d+hSODwt sin digerir, 3, pET-3d+hSODwt digestión, 4, pET-3d+hSODwt incubación sin enzima. En los carriles 5, 6 y 7 se sembraron las muestras de pET-3d+hSODG93A en el mismo orden que para pET-3d+hSODwt.

Al transformar con el producto final de la reacción de mutagénesis tratada con DpnI se obtuvieron numerosas colonias por placa, aproximadamente 50 para el mutante 1 y más de 250 para el mutante 2.

Para analizar el producto obtenido se picaron 6 colonias aisladas de cada mutante, se crecieron en cultivos de 3 mL de LB y se extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina. Los plásmidos fueron analizados por Electroforesis en gel de agarosa [Figura 10].



Figura 9. Estimación de la cuantificación de la minipreparación de ADN plasmídico mediante electroforesis. Se sembraron 2 uL de cada dilución 1:4 de la minipreparación de ADN plasmídico a ser cuantificada, y 3 uL de marcador de peso molecular 12Kb Stratagene. Se sembró por duplicado la dilución 1:4 en los carriles 1 y 2, y en el carril 3 el marcador de peso molecular. Según la concentración de ADN de la banda superior del marcador de peso molecular (33,2 ng/uL), la concentración estimada de la muestra es 150 ng/uL.

Se eligieron al azar una preparación del Mutante 1 (1.3) y otra del Mutante 2 (2.3) para secuenciar. La secuenciación se realizó en el Instituto Pasteur de Montevideo con el primer T7 de pBluescript. Las secuencias obtenidas fueron de buena calidad, abarcando el total de la secuencia codificante de la hSOD.

Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Bioedit alineando la secuencia problema con la secuencia salvaje de la hSOD y con la secuencia de

los oligos. Como se muestra en la figura se comprobó que ambas tenían la mutación deseada [Figura 11].

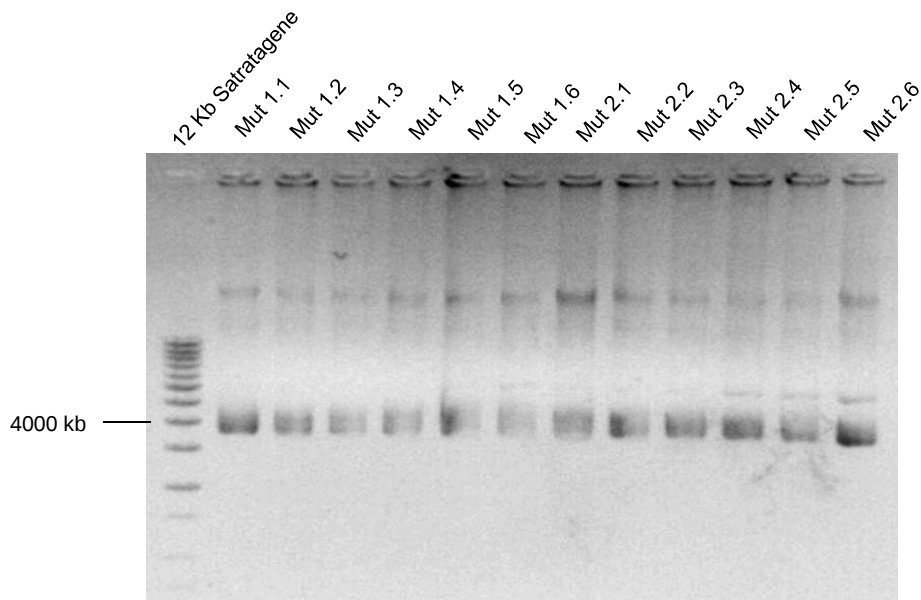


Figura 10. Análisis de los clones obtenidos en la mutagénesis dirigida mediante electroforesis. Se sembraron 2 uL de cada muestra y 6 uL de marcador de peso molecular 12Kb Stratagene. En el carril 1 se sembró el marcador de peso molecular; en los carriles 2-7 se sembraron las 6 minipreps del mutante 1, y en los carriles 8-13 se sembraron las 6 minipreps del mutante 2.

6.4 Expresión de los mutantes sinónimos de hSOD en *E. coli*

El sistema de expresión utilizado es la cepa BL21star DE3 de *E. coli*. Se transformaron estas bacterias con pET-3d+ hSODwt, hSODG93A, hSOD Mutante 1 y hSOD Mutante 2. Se transformaron alícuotas de 50 uL de BL21star DE3 quimiocompetentes con 1 uL de ADN plasmídico en cada caso. De cada

transformación se plaquearon 3 volúmenes distintos (50, 100 y 300 uL) en placas de LB + ampicilina.

A partir de las colonias obtenidas se siguió el protocolo de expresión detallado en materiales y métodos. La expresión de hSOD salvaje así como la de la hSODG93A fueron previamente puestas a punto. Anteriormente en nuestro laboratorio se ha visto que a 30°C la hSOD salvaje se expresa de forma soluble, mientras que la hSOD G93A lo hace de forma parcialmente soluble en una relación 1:1 soluble:insoluble, por tanto la expresión de la hSODwt y la G93A fue utilizada como control de solubilidad. Luego de las 2 horas de inducción, cuando la DO_{600nm} alcanzó aproximadamente un valor de 1,5, se centrifugaron las bacterias, se extrajeron las proteínas y se realizó el fraccionamiento soluble-insoluble, según el protocolo descrito en materiales y métodos.

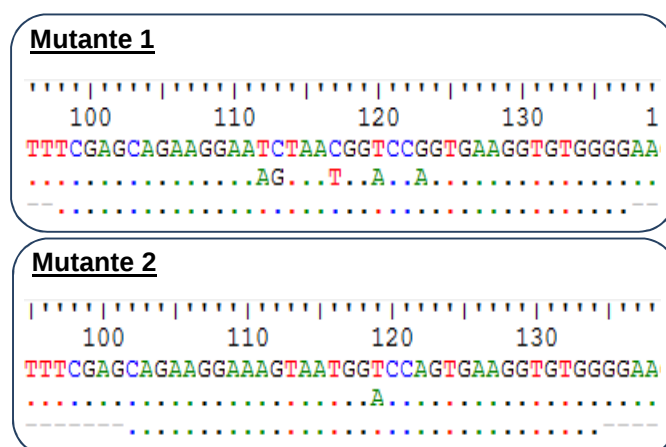


Figura 11. Alineamiento de la secuencia de los mutantes 1 (superior) y 2 (inferior) con la secuencia de la hSOD salvaje y el oligo utilizado en la mutagénesis. Dentro de cada uno de los dos paneles, la secuencia superior corresponde al mutante, la del medio a la hSOD salvaje y la inferior a la del oligo; en la secuencia del medio pueden verse las bases que fueron modificadas.

Para la normalización de las muestras proteicas, los sedimentos bacterianos fueron resuspendidos en un volumen equivalente a la cantidad de células (0,45 mL cada 9 DO_{600}). Luego se realizó el fraccionamiento a partir de volúmenes iguales 1 mL y la fracción insoluble fue resuspendida también en 1 mL. Se realizó dicha normalización debido a que nos interesa analizar las proteínas

con respecto al número de células y no con respecto a las proteínas totales. Las muestras fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE y Western Blot sembrando el mismo volumen de cada muestra [Figura 12].

Como se observa en la parte A de la figura 12, la hSOD salvaje se encuentra totalmente soluble, mientras que la hSOD G93A se reparte entre ambas fracciones. El mutante 1 de la hSOD se encuentra totalmente soluble, mientras que el mutante 2 también está presente en la fracción insoluble. Recordemos que el mutante 2 posee solo uno de los cuatro codones cambiados, y que el mutante 1 contiene la mutación presente en el mutante dos además de otras tres.

Al analizar el Western Blot (Figura 12, parte B) podemos ver los mismos resultados observados en la parte A, salvo por el mutante dos, que en este caso no aparece en la fracción insoluble. Podemos concluir entonces que la banda que se observa en el carril correspondiente a la fracción insoluble del mutante 2 no es hSOD sino que es otra proteína con un peso molecular similar, o bien ocurrió un error de manipulación.

Este resultado indica que las mutaciones sinónimas ensayadas no estarían afectando la solubilidad de la proteína en forma significativa, en las condiciones experimentales utilizadas.

Considerando que la temperatura es un factor relevante en la fisiología celular, y en la traducción en particular, se repitió el mismo estudio de expresión a 37°C [Figura 13]. En este caso se analizó solamente por SDS-PAGE.

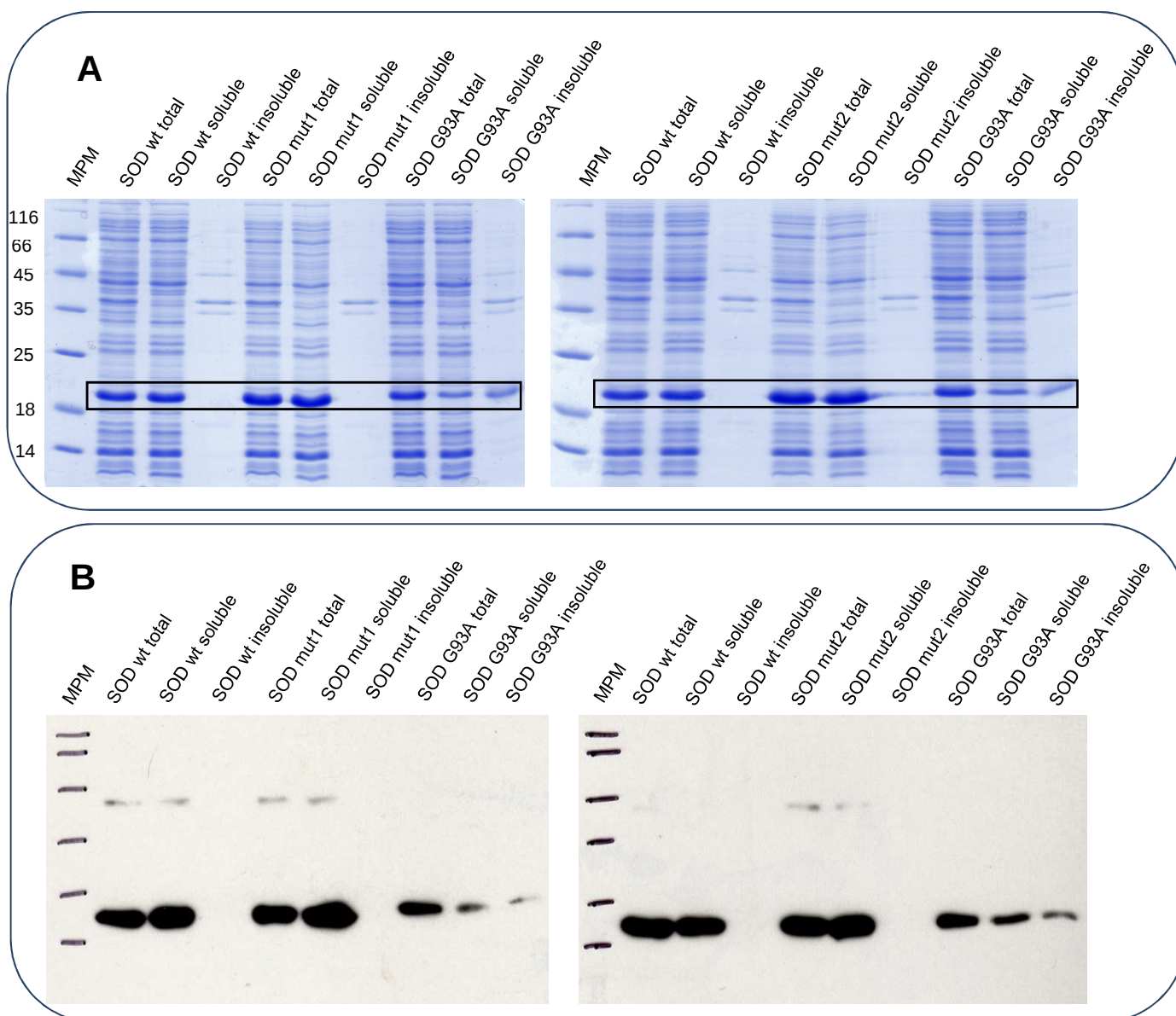


Figura 10. Análisis de las fracciones total, soluble e insoluble de las expresiones de hSOD en *E. coli* mediante SDS-PAGE y Western blot. En la parte A se muestra la SDS-PAGE revelada con coomassie y en la B el Western Blot. Las muestras fueron sembradas en el mismo orden en la SDS-PAGE y en el Western Blot. En el gel de la izquierda se sembró el mutante 1 y en el de la derecha el mutante 2. En cada experimento se sembró como control hSODwt y hSOD G93A. Las muestras se sembraron en el siguiente orden, 1: marcador de peso molecular pre-teñido (Promega), 2: hSOD salvaje fracción total, 3: hSOD salvaje fracción soluble, 4: hSOD salvaje fracción insoluble, 5: hSOD mutante sinónimo fracción total (izquierda: mutante 1, derecha: mutante 2), 6: mutante sinónimo fracción soluble, 7: mutante sinónimo fracción insoluble, 8: hSOD G93A fracción total, 9: hSOD G93A fracción soluble, 10: hSOD G93A fracción insoluble.

Al expresar los mutantes a 37°C se observaron diferencias de solubilidad con respecto a la expresión a 30°C. Si bien la hSOD aparece con menos intensidad se puede ver su distribución. En este caso, la hSOD salvaje aparece solamente en la fracción soluble y la hSOD G93A sigue apareciendo en ambas fracciones, pero el mutante 1, (el que posee los cuatro codones mutados), aparece en la fracción insoluble, mientras que el mutante 2 es mayormente soluble. Este resultado no se ve claramente en la figura.

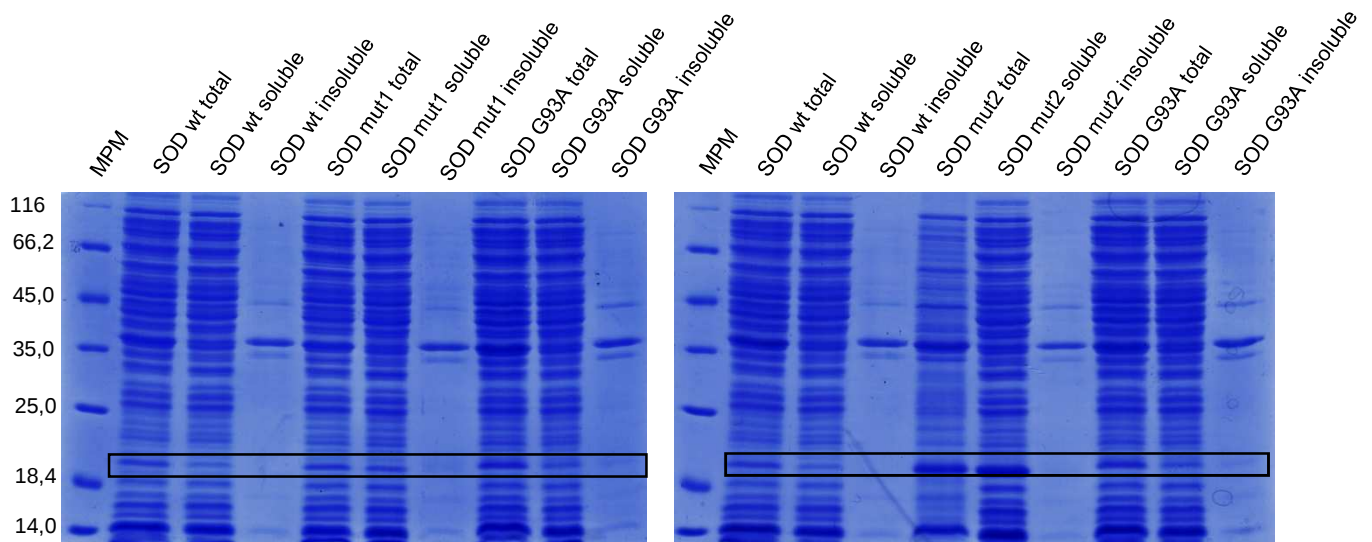


Figura 13. SDS-PAGE 15%. Las muestras analizadas corresponden al ensayo de expresión a 37°C. En el gel de la izquierda se sembró el mutante 1 y en el gel de la derecha el mutante dos, cada uno con los controles de hSOD salvaje y hSOD G93A. Las mismas se sembraron en el siguiente orden, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: hSOD salvaje fracción total, carril 3: hSOD salvaje fracción soluble, carril 4: hSOD salvaje fracción insoluble, carril 5: hSOD mutante sinónimo fracción total (izquierda: mutante 1, derecha: mutante 2), carril 6: mutante sinónimo fracción soluble, carril 7: mutante sinónimo fracción insoluble, carril 8: hSOD G93A fracción total, carril 9: hSOD G93A fracción soluble, carril 10: hSOD G93A fracción insoluble.

Esta observación podría no ser sorprendente ya que el mutante solamente posee una mutación sinónima, mientras que el mutante 1 posee los cuatro codones sustituidos. Estudios realizados por Cortazzo et al. [19] sobre la proteína EgFABP1 dónde se realizaron varias mutaciones sinónimas dentro de un loop entre dos alfa hélices, mostraron que el mutante que contenía los 3 codones internos del loop con mutaciones silentes aparecía en la fracción insoluble, mientras que un mutante que contenía además de estos tres, otros dos codones mutados, aparecía solamente en la fracción proteica soluble. Esto

es coherente con el hecho de que la modificación de un solo codón raro por su sinónimo más frecuente puede afectar la solubilidad de la proteína, mientras que la modificación de los cuatro codones del cluster no tenga un efecto tan notorio.

Si bien se observan diferencias de solubilidad en el mutante 1 al expresarlo a 37°C, no se sabe cuál es la modificación estructural que provoca dicho cambio. Para verificar que dicha variación se debe a un cambio estructural hay que realizar estudios bioquímicos y fisicoquímicos que nos permitan determinar de qué manera afectan estas mutaciones sinónimas a la estructura y actividad de la enzima Cu/Zn SOD.

Es importante tener en cuenta que estos resultados son preliminares, es necesario realizar el western blot de las muestras correspondientes a la expresión a 37°C y repetir todos los experimentos para confirmar estos resultados.

7 Conclusiones

Este trabajo se centró en el estudio del efecto de la sustitución de codones sinónimos en la solubilidad de la hSOD. Con este propósito se realizó un estudio in silico de la frecuencia de uso de codones con el algoritmo %MinMax que determina regiones enriquecidas en codones raros. Posteriormente se construyeron dos mutantes dentro de un agrupamiento de cuatro codones raros, en los cuales se modificaron dichos codones por los más frecuentes de cada aminoácido. Estos mutantes fueron expresados en *E. coli* y posteriormente se analizó su solubilidad mediante SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones proteicas obtenidas por fraccionamiento soluble-insoluble.

En relación a la solubilidad de esta enzima y sus mutantes sinónimos, en las condiciones experimentales ensayadas no se encontraron diferencias al expresarlos a 30°C, según el western blot, pero al expresarlas a 37°C se observaron diferencias en la solubilidad del mutante que posee los cuatro codones optimizados. Este mutante se distribuye entre las fracciones soluble e insoluble de forma similar al mutante hSOD G93A, mientras que el mutante que posee solamente el codón para glicina más frecuente en *E. coli* está presente en la fracción soluble, al igual que la hSOD salvaje. Es necesario realizar el western blot de las expresiones a 37°C para confirmar estos resultados, debido a que en el SDS-PAGE no se observa claramente. Además hay que repetir tanto las expresiones a 30°C como a 37°C y ver si los resultados son reproducibles.

Con este resultado preliminar no podemos afirmar que la diferencia de solubilidad se debe a un cambio estructural de la enzima. Para ello se deberían realizar estudios bioquímicos y fisicoquímicos que permitan contestar que es lo que causa la variación en la solubilidad. Por ejemplo, sería importante realizar ensayos de actividad enzimática para analizar los cambios que pudiera haber a este nivel. Estudios como dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca y extrínseca nos permitirían analizar las modificaciones estructurales en la estructura secundaria y terciaria que podrían estar provocando las mutaciones sinónimas.

8 Perspectivas

Los resultados preliminares obtenidos indican que una de las mutaciones sinónimas realizadas lleva a un cambio de solubilidad en la hSOD. Para confirmar estos resultados es necesario realizar el western blot de las muestras correspondientes a las expresiones a 37°C y repetir los experimentos.

Si se confirman los resultados obtenidos sería interesante estudiar en profundidad a que se debe el cambio de solubilidad y si el mismo afecta la actividad de la enzima, ya que muchas veces, en las enfermedades conformacionales se da una ganancia de función junto con la agregación. Además de realizar ensayos de actividad será necesario realizar estudios fisicoquímicos que permitan analizar la estructura de los mutantes.

Más adelante sería interesante expresar estos mutantes sinónimos en cultivos celulares de células humanas, como por ejemplo neuronas. En una primera instancia se puede analizar el perfil de solubilidad de la enzima; al tener un anticuerpo específico se podrían realizar estudios inmunológicos con las células en cultivo y así analizar la distribución de los mutantes sinónimos a nivel celular. Por otro lado, el fenotipo celular inducido por los mutantes es un estudio crucial para ver si el mecanismo patológico es análogo al observado en la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

9 Anexo – Buffers y Medios de cultivo

Medios de cultivo

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

LB-Agar: 15g de agar por litro de medio LB.

Soluciones

Ampicilina: Se realiza una solución de 100mg/ml

Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG): se realiza una solución de 100mM.

Buffer de muestra 6x para ADN: 0,25% Azul de bromofenol, 0,25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol.

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

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

Buffer de electroforesis SDS-PAGE 10x: 144g de glicina, 30,1g de Tris y 10g de SDS por litro.

Buffer de muestra para SDS-PAGE 4x: 200mM TrisHCl pH 6,8, 400mM DTT, 8% SDS, 0,4% de Azul de bromofenol y 40% de glicerol.

Buffer de transferencia para Western Blot: 100mL de Buffer de electroforesis SDS-PAGE 10x, 200mL de EtOH 95° en un litro de H₂O destilada.

Buffer TBST: 30mL NaCl 5M, 10mL Tris-HCl 1M pH 7,5 y 5 mL Tween 20 20% por litro de H₂O destilada.

Buffer de bloqueo: 5% leche descremada en polvo en TBST.

Solución decolorante: 30% EtOH y 70% ácido acético.

Solución I: Tris-HCl 25mM pH 8 y EDTA 10 mM pH 8.

Solución II: NaOH 0,2 M y SDS 1%.

Solución III: Ácido acético glacial (5,75mL), Acetato de potasio 5M pH 5,2 (30mL) y H₂O (14,25mL)

10 Anexo – Tablas de datos

❖ Tabla de frecuencia de uso de codones en proteínas ribosomales de E. coli

UUU 7,2 F	UCU 17,3 S	UAU 4,3 Y	UGU 1,3 C
UUC 22,3 F	UCC 11,8 S	UAC 13,4 Y	UGC 3,8 C
UUA 2,1 L	UCA 1,1 S	UAA 7 *	UGA 0,6 *
UUG 2,9 L	UCG 0,6 S	UAG 0 *	UGG 5,6 W
CUU 3,3 L	CCU 4,9 P	CAU 5,6 H	CGU 58,5 R
CUC 2,8 L	CCC 0,3 P	CAC 15,2 H	CGC 27 R
CUA 0,1 L	CCA 4,3 P	CAA 7,7 Q	CGA 0,3 R
CUG 58,2 L	CCG 22,3 P	CAG 24,8 Q	CGG 0,4 R
AUU 13,9 I	ACU 24,4 T	AAU 4,7 N	AGU 2,1 S
AUC 40,7 I	ACC 21,9 T	AAC 30,5 N	AGC 11,6 S
AUA 0,1 I	ACA 1,9 T	AAA 66,7 K	AGA 0,6 R
AUG 24,4 M	ACG 2,5 T	AAG 28 K	AGG 0 R
GUU 48,2 V	GCU 50,4 A	GAU 17 D	GGU 47,9 G
GUC 8,8 V	GCC 9,5 A	GAC 27,3 D	GGC 30,5 G
GUA 24,8 V	GCA 29,2 A	GAA 48,5 E	GGA 0,6 G
GUG 11,8 V	GCG 17,8 A	GAG 16,3 E	GGG 1 G

Tabla 1. Tabla de frecuencia de uso de codones de Escherichia col. En la tabla se muestran los 64 codones a la izquierda de cada cuadrado; en el medio se muestra la frecuencia por mil correspondiente a cada codón y finalmente el aminoácido que codifica. Los codones STOP están indicados con un asterisco. Esta tabla fue obtenida de la base de datos Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

❖ **Tabla de uso de frecuencia de uso de codones en proteínas ribosomales de Humanos**

UUU 12,1 F	UCU 11,4 S	UAU 11,7 Y	UGU 6,6 C
UUC 17,7 F	UCC 13,2 S	UAC 16,2 Y	UGC 7,3 C
UUA 2,6 L	UCA 4,4 S	UAA 3,9 *	UGA 1,2 *
UUG 9,8 L	UCG 2 S	UAG 0,7 *	UGG 7,7 W
CUU 12,6 L	CCU 16 P	CAU 7,7 H	CGU 12,1 R
CUC 14 L	CCC 15,2 P	CAC 16,3 H	CGC 22 R
CUA 3,9 L	CCA 10,4 P	CAA 6,6 Q	CGA 11,9 R
CUG 30,9 L	CCG 4,2 P	CAG 27,1 Q	CGG 16,1 R
AUU 21,7 I	ACU 14,7 T	AAU 14,9 N	AGU 5,5 S
AUC 29,9 I	ACC 19,5 T	AAC 21 N	AGC 8,8 S
AUA 3,3 I	ACA 10,2 T	AAA 39,8 K	AGA 15,8 R
AUG 24,1 M	ACG 4,3 T	AAG 82,5 K	AGG 14,3 R
GUU 15,5 V	GCU 28,2 A	GAU 19,6 D	GGU 19 G
GUC 19,1 V	GCC 32,2 A	GAC 18,5 D	GGC 27,9 G
GUA 7,7 V	GCA 14,2 A	GAA 21,4 E	GGA 14,4 G
GUG 31 V	GCG 4,8 A	GAG 30 E	GGG 10,5 G

Tabla 2. Tabla de frecuencia de uso de codones de Escherichia col. En la tabla se muestran los 64 codones a la izquierda de cada cuadrado; en el medio se muestra la frecuencia por mil correspondiente a cada codón y finalmente el aminoácido que codifica. Los codones STOP están indicados con un asterisco. Esta tabla fue obtenida de la base de datos Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

11 Referencias

1. Clarke, T.F.t. and P.L. Clark, *Rare codons cluster*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3412.
2. Angov, E., *Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins*. Biotechnol J. 2011; **6**(6): p. 650-9.
3. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
4. Choi, S.I., et al., *Macromolecule-Assisted de novo Protein Folding*. Int J Mol Sci. **13**(8): p. 10368-86.
5. Hardesty, B. and G. Kramer, *Folding of a nascent peptide on the ribosome*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **66**: p. 41-66.
6. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
7. Kramer, G., et al., *The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 589-97.
8. Voisset, C., S.J. Saupe, and M. Blondel, *The various facets of the protein-folding activity of the ribosome*. Biotechnol J. **6**(6): p. 668-73.
9. Marin, M., *Folding at the rhythm of the rare codon beat*. Biotechnol J, 2008. **3**(8): p. 1047-57.
10. Hershberg, R. and D.A. Petrov, *Selection on codon bias*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 287-99.
11. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain*. Microb Cell Fact, 2009. **8**: p. 41.

12. Plotkin, J.B., H. Robins, and A.J. Levine, *Tissue-specific codon usage and the expression of human genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12588-91.
13. Kanaya, S., et al., *Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of Bacillus subtilis tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis*. Gene, 1999. **238**(1): p. 143-55.
14. Ikemura, T., *Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system*. J Mol Biol, 1981. **151**(3): p. 389-409.
15. Bonekamp, F., et al., *Translation rates of individual codons are not correlated with tRNA abundances or with frequencies of utilization in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1989. **171**(11): p. 5812-6.
16. Angov, E., et al., *Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2189.
17. Komar, A.A., T. Lesnik, and C. Reiss, *Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation*. FEBS Lett, 1999. **462**(3): p. 387-91.
18. Tsalkova, T., G. Kramer, and B. Hardesty, *The effect of a hydrophobic N-terminal probe on translational pausing of chloramphenicol acetyl transferase and rhodanese*. J Mol Biol, 1999. **286**(1): p. 71-81.
19. Cortazzo, P., et al., *Silent mutations affect in vivo protein folding in Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(1): p. 537-41.
20. Gupta, P. and K.H. Lee, *Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates*. Biotechnol Bioeng, 2008. **101**(5): p. 967-74.

21. Binopal, G., R.K. Ranjan, and K. Rajagopal, *Expression of synthetic human tumor necrosis factor is toxic to Escherichia coli*. *Gene*. **493**(1): p. 155-60.
22. Thanaraj, T.A. and P. Argos, *Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization*. *Protein Sci*, 1996. **5**(8): p. 1594-612.
23. Thanaraj, T.A. and P. Argos, *Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA*. *Protein Sci*, 1996. **5**(10): p. 1973-83.
24. Matouschek, A., L. Serrano, and A.R. Fersht, *The folding of an enzyme. IV. Structure of an intermediate in the refolding of barnase analysed by a protein engineering procedure*. *J Mol Biol*, 1992. **224**(3): p. 819-35.
25. Naeem, A., K.A. Khan, and R.H. Khan, *Characterization of a partially folded intermediate of papain induced by fluorinated alcohols at low pH*. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **432**(1): p. 79-87.
26. Naeem, A. and N.A. Fazili, *Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: the darker aspect of proteins*. *Cell Biochem Biophys*. **61**(2): p. 237-50.
27. Bhak, G., Y.J. Choe, and S.R. Paik, *Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation*. *BMB Rep*, 2009. **42**(9): p. 541-51.
28. Soto, C., *Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy*. *FEBS Lett*, 2001. **498**(2-3): p. 204-7.
29. Ciechanover, A., *The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(2): p. 474-81.
30. Watanabe, M., et al., *Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues*. *Neurobiol Dis*, 2001. **8**(6): p. 933-41.

31. Valdmanis, P.N., et al., *Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2009. **9**(3): p. 198-205.
32. Chattopadhyay, M. and J.S. Valentine, *Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(7): p. 1603-14.
33. Nordlund, A. and M. Oliveberg, *SOD1-associated ALS: a promising system for elucidating the origin of protein-misfolding disease*. HFSP J, 2008. **2**(6): p. 354-64.
34. Furukawa, Y., et al., *Mutation-dependent polymorphism of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem. **285**(29): p. 22221-31.
35. Estevez, A.G., et al., *Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2498-500.
36. Lindberg, M.J., et al., *Folding of human superoxide dismutase: disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15893-8.
37. Cozzolino, M., A. Ferri, and M.T. Carri, *Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(3): p. 405-43.
38. Arnesano, F., et al., *The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47998-8003.
39. Strange, R.W., et al., *The structure of holo and metal-deficient wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Mol Biol, 2003. **328**(4): p. 877-91.
40. Nordlund, A., et al., *Functional features cause misfolding of the ALS-provoking enzyme SOD1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9667-72.

41. Gurney, M.E., et al., *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. Science, 1994. **264**(5166): p. 1772-5.
42. Palacios, F., et al., *An antibody-based affinity chromatography tool to assess Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) G93A structural complexity in vivo*. Biotechnol J. **5**(3): p. 328-34.