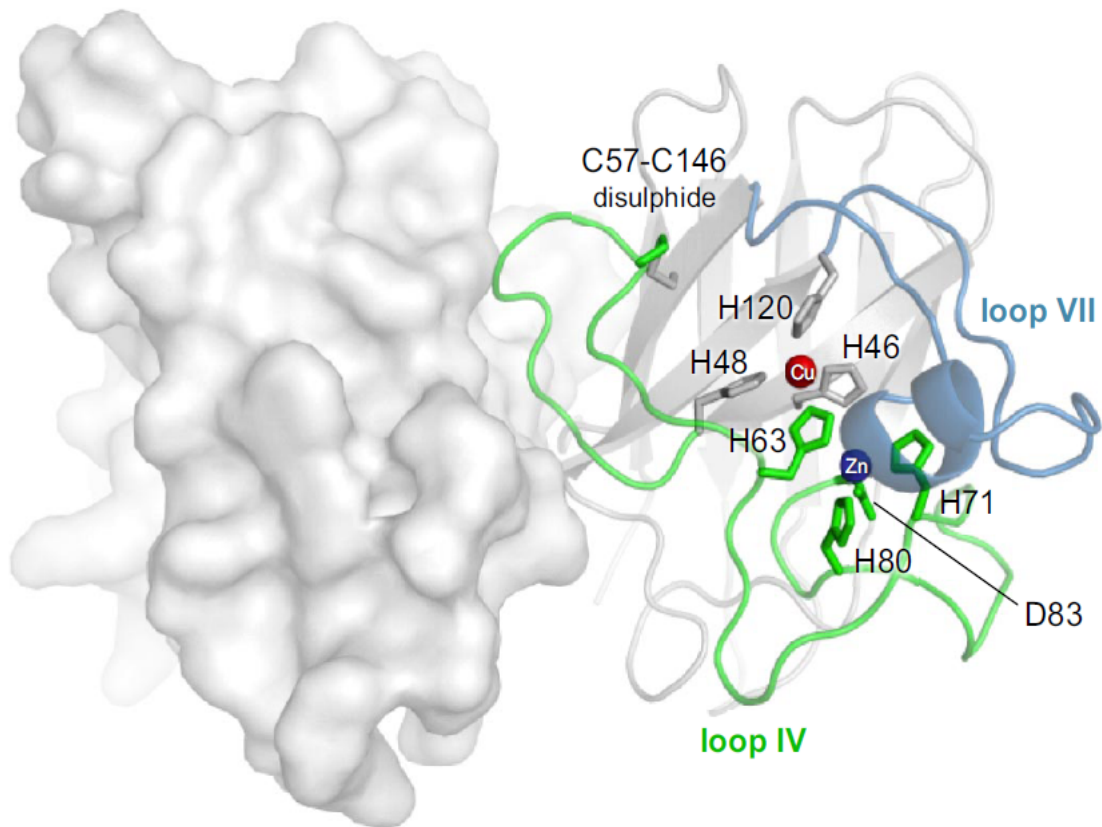


Subclonado, expresión y estudio de solubilidad de la Cu/Zn superóxido dismutasa humana en *Escherichia coli*.



Carlos Damián Estrada
Orientadora: Dra. Mónica Marín

1 Agradecimientos

En primer lugar le quiero agradecer a mis padres y hermanos: Carlos, Martha, Leti y Juanchi, que siempre me apoyaron. Así como a mi abuelo, tías, tío y primos: Felix, Mimi, Rita, Leo, Santi, Vicky, Fer, Fede, Belu, Vane.

A Mónica por permitirme realizar mi pasantía de grado en su laboratorio y por contribuir a mi formación como futuro científico.

A toda la 305 que empezaron siendo mis compañeros y hoy forman parte de mis amigos: Fabi P., Kiki, Vale, Nacho, Tam, Sofi, Lea, Lucilla, Flo, Andrea, Ann Marie, Mariana.

A toda la sección Bioquímica: Uriel, Manu, Fer, Alicia, German, Lucía, Estela, Ana, Fabi S., Ceci, Natalia R., Natalia F, Milagros, Cristina, Gabriela, Mario, Susana, Joe, Maylen, Claudio, Cora, Gabriela, Adriana, Fabiana R.

A mis amigos que compartieron estos años de estudios: Fiore, Fio, Leti, Laura, Manu, Bocha, Agustín, Abuelo, Mosko.

A los mismos de siempre: Lore, July, Ula.

2 Resumen.

Se han reportado diferentes mutaciones en la Cu/Zn Superóxido dismutasa (SOD) asociadas a la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) del tipo familiar. La ALS es una enfermedad neurodegenerativa fatal, definida por la muerte selectiva de motoneuronas, de la medula espinal, cerebro y córtex. La misma genera debilidad, atrofia muscular y muerte.

Algunas de estas mutaciones implican un plegamiento incorrecto y la agregación de dicha proteína. Por tal motivo nos planteamos comprender como la cinética traduccional influye en el plegamiento *in vivo* de la Cu/Zn SOD humana.

Para ello, se realizó la expresión de la proteína Cu/Zn SOD humana salvaje y de la mutación G93A en la cepa *E.coli* BL21(DE3)Star, y se estudió la distribución de las mismas entre las fracciones proteicas soluble e insoluble.

Este trabajo muestra que los niveles de expresión de la proteína salvaje son mayores respecto a la mutación G93A, para un mismo número de células. Ambas proteínas son expresadas en igualdad de condiciones a 30 °C. Cuando las proteínas totales se fraccionan de acuerdo a su solubilidad por centrifugación a 14.000g durante 30 minutos a 4 °C, se observó a la Cu/Zn SOD salvaje en la fracción soluble. Mientras que la mutación G93A se encontró repartida entre ambas fracciones, soluble e insoluble.

Por otro lado, se diseñaron cebadores con el fin de insertar un *tag* de histidinas (6xHis-Tag) en el extremo N-terminal de la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD humana salvaje y la mutación G93A por medio de mutagénesis dirigida. Esto permitirá aislar la proteína entera y fragmentos discretos intermedios generados durante la biosíntesis de la Cu/Zn SOD en *E.coli*.

3 Índice.

1	AGRADECIMIENTOS	2
2	RESUMEN.	3
3	ÍNDICE.	4
4	INTRODUCCIÓN.	5
4.1	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. COLI</i>	5
4.2	CARACTERÍSTICAS DE LA ENZIMA Cu/Zn SUPERÓXIDO DISMUTASA Y LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.	11
5	OBJETIVOS.	16
6	MATERIALES Y MÉTODOS.	17
6.1	MATERIALES.	17
6.2	MÉTODOS.	21
7	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	27
7.1	ELECCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN.	29
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
8.1	CLONADO DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE LA Cu/Zn SOD SALVAJE Y G93A EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pQE-30.	32
8.2	SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pET-3dSODWT Y pET-3dSODG93A	43
8.3	DISEÑO DE CEBADORES PARA MUTAGÉNESIS.	45
8.4	EXPRESIÓN Y FRACCIONAMIENTO SOLUBLE E INSOLUBLES DE LA Cu/Zn SOD HUMANA RECOMBINANTE (SALVAJE Y G93A).....	47
9	CONCLUSIONES.....	50
10	ANEXOS.	52
11	BIBLIOGRAFÍA.	53

4 Introducción.

4.1 Expresión de Proteínas recombinantes en *E.coli*.

En la actualidad la expresión de proteínas heterólogas en células hospederas tanto procariotas como eucariotas representa un área en continuo desarrollo de la biotecnología. Es posible producir grandes cantidades de proteína recombinante con fines específicos para la industria como de interés en biomedicina, con un costo relativamente bajo. Los sistemas celulares hospederos actualmente utilizados presentan ventajas y desventajas en la producción de proteínas recombinantes (Yin, Li et al. 2007).

El organismo procariota *Escherichia coli* (*E.coli*) es por excelencia uno de los sistemas celulares hospederos más ampliamente utilizados para la expresión de proteínas heterólogas. Esto es debido a su rápida tasa de crecimiento, la capacidad de fermentación continua, costo relativamente bajo y a un proceso de escalado simple (Yin, Li et al. 2007; Sahdev, Khattar et al. 2008). Es decir, proporciona una rápida y económica producción de proteínas recombinantes. Además de estas ventajas cabe destacar el vasto conocimiento acerca de su bioquímica y genética, así como también el gran número de herramientas compatibles disponibles para aplicaciones biotecnológicas (Jana and Deb 2005; Sorensen and Mortensen 2005).

Sin embargo el mayor inconveniente que presenta *E.coli* como sistema de expresión es la carencia de la maquinaria necesaria para realizar modificaciones postraduccionales, como N- y O-glicosilaciones, acilaciones de ácidos grasos, fosforilación y una baja eficiencia para la formación de puentes disulfuros. Estas modificaciones son muchas veces necesarias para el correcto plegamiento y funcionamiento de la proteína heteróloga. La falta de estas modificaciones pueden afectar distintos aspectos de la proteína como: actividad, función, estructura, solubilidad, estabilidad, vida media, resistencia a proteasas y compartimentalización de la proteína funcional (Jana and Deb 2005; Yin, Li et al. 2007). Las proteínas expresadas en *E.coli* tienden a retener

el residuo de formil-metionina N-terminal, el cual podría llegar a afectar la estabilidad de la proteína. Además algunas proteínas no son capaces de plegarse correctamente y suelen acumularse en forma insoluble formando cuerpos de inclusión (Yin, Li et al. 2007).

Pese a estas limitaciones *E.coli* sigue siendo un sistema de referencia para la expresión de proteínas heterólogas por las ventajas antes mencionadas así como por la gran variedad de vectores de expresión y de cepas mutantes disponibles.

En la actualidad se han desarrollado una amplia variedad de estrategias con el fin de lograr altos niveles de expresión de proteínas recombinantes. Algunos aspectos están particularmente involucrados con el diseño de vectores de expresión, los cuales poseen un promotor fuerte que regula la transcripción, así como iniciadores y terminadores de la traducción para regular la misma. Otros aspectos están relacionados con el diseño del hospedero, uso de codones, factores de fermentación disponibles para manipular las condiciones de expresión, etc.. La correcta elección del vector de expresión y la cepa mutante muchas veces permiten facilitar la purificación de la proteína recombinante y contribuir al correcto plegamiento de la misma. El diseño de estas estrategias tiene como objetivo final obtener un alto rendimiento de proteínas a un bajo costo (Jana and Deb 2005; Sorensen and Mortensen 2005).

La expresión de una proteína mediante el uso de un vector de expresión requiere una presión selectiva, por ejemplo a través de un antibiótico. Los vectores de expresión poseen una arquitectura esencial que consta de un promotor posicionado aproximadamente de 10 a 100 pb corriente arriba del sitio de unión del ribosoma (RBS). Este último abarca una región de aproximadamente 54 nucleótidos. También se requiere la secuencia Shine-Dalgarno (SD) se encuentra a una distancia de 5-13 bases del codón de inicio e interacciona con los 39 nucleótidos finales del ARN ribosomal 16S (Jana and Deb 2005).

Usualmente el promotor exhibe ciertas características. Se destacan entre otras, que sea fuerte, con baja expresión basal, con inducción simple y costo-efectiva

y fácil de transferir a otra cepa de *E.coli*. Esto es útil para poder testear fácilmente el rendimiento diferencial de la proteína en un gran número de cepas., (Jana and Deb 2005).

Las proteasas propias del organismo hospedero son perjudiciales para la expresión de proteínas heterólogas en altos niveles. Por lo tanto uno de los hospederos más comúnmente usados es *E.coli* BL21(DE3). Esta cepa es deficiente en las proteasas ompT y lon, las cuales interfieren en el aislamiento de la proteína recombinante intacta. Además dicha cepa es compatible con sistemas promotores T7 lacO. Algunas proteínas recombinantes producidas en el mencionado sistema de expresión son capaces de alcanzar rendimientos en la escala de gramos/litro (Sorensen and Mortensen 2005; Yin, Li et al. 2007; Graslund, Nordlund et al. 2008).

La expresión de proteínas heterólogas en *E.coli* se ve fuertemente afectada por la diferencia en el uso de codones entre el hospedero y el ARNm de la proteína de interés (Makrides 1996; Rosano and Ceccarelli 2009).

4.1.1 Uso preferencial de codones.

Los codones sinónimos no son utilizados con la misma frecuencia. El uso preferencial de codones es diverso en diferentes especies y explica parte de la dificultad de la producción de proteínas eucariotas en bacterias. Se han postulado diferentes hipótesis acerca de los posibles factores que podrían estar influenciando el uso preferencial de codones. Algunos de estos factores incluyen: selección para una alta velocidad de traducción, función y tamaño del gen, composición GC, sesgo mutacional, conservación de amino ácidos, hidropatía de la proteína, selección transcripcional, estructura y estabilidad del ARN (Marin 2008).

El uso preferencial de codones sinónimos puede ser determinado por la relativa frecuencia en la cual los codones son encontrados en proteínas con alto nivel de expresión. Esto ocurre particularmente en bacterias, en las cuales hay un fuerte sesgo en el uso de codones de proteínas altamente expresadas, como las proteínas ribosomales (Kanaya, Yamada et al. 1999). La abundancia de los

diferentes ARN de transferencia (ARNt) en *E.coli* fue determinada a diferentes tasas de crecimiento. Se mostró una fuerte correlación entre la frecuencia de uso de los codones y la abundancia de los correspondientes ARNt isoaceptores (Dong, Nilsson et al. 1996).

En eucariotas la abundancia de los ARNts ha sido determinada en pocos casos, debido a dificultades técnicas en la determinación de la relativa abundancia de los mismos. En general ésta es estimada según el número de copias de genes que codifican para dichos ARNts. El uso de codones sinónimos es determinado relativo al uso de codones en proteínas altamente expresadas (Marin 2008).

Por ello se han desarrollado principalmente dos estrategias para solucionar las dificultades de la expresión de proteínas eucariotas en bacterias. Estas son:

1- La optimización de la secuencia codificante de la proteína heteróloga; es decir el cambio de codones infrecuentes presentes en la secuencia codificante de la proteína heteróloga por codones frecuentes en *E.coli* que codifiquen el mismo aminoácido (por mutagénesis silenciosa).

2- Mediante el incremento de la disponibilidad de los ARNt escasamente representados, a través de la coexpresión de los genes de ARNt “raros” (Marin 2008; Rosano and Ceccarelli 2009).

En la actualidad, se pueden adquirir cepas de *E.coli* derivadas de *BL21* las cuales coexpresan los ARNt limitantes facilitando la expresión de las mencionadas proteínas heterólogas, un ejemplo de ellas es la cepa *Rosetta*TM (Yin, Li et al. 2007; Graslund, Nordlund et al. 2008). Mientras la optimización de la secuencia implica un proceso engorroso y requiere una mayor inversión de tiempo (Rosano and Ceccarelli 2009).

Sin embargo, hay antecedentes en los cuales la sustitución de codones “raros” originó la reducción de la actividad biológica, insolubilidad de la proteína recombinante, eliminación de ciertas pausas traduccionales y modificaciones en el plegamiento de la misma (Angov, Hillier et al. 2008; Marin 2008; Rosano

and Ceccarelli 2009). Esto indicaría que dichos codones “raros” estarían facilitando el plegamiento mediante un enlentecimiento sitio específico de la traducción, y la eliminación de las mencionadas pausas produciría la agregación de la proteína heteróloga (Marin 2008; Rosano and Ceccarelli 2009).

Las pausas sitio específica en la traducción pueden producir efectos de diversa índole sobre la misma. En algunos casos el ribosoma es capaz de reanudar la traducción después de la pausa sitio específica. En otros casos el ARNt se disocia del ARNm en el sitio aceptor del ribosoma produciendo una proteína truncada, un corrimiento del marco de lectura, o la reunión de un ARNt en otro sitio del ARNm originando un polipéptido diferente (Marin 2008; Rosano and Ceccarelli 2009).

Existen antecedentes en los cuales se ha encontrado una relación entre el uso de codones y la estructura secundaria. Es así que las α -helices son codificadas por codones frecuentes, mientras que regiones “link” o conectoras y los extremos de segmentos han sido correlacionadas a *clusters* de codones “raros” (Angov, Hillier et al. 2008; Marin 2008).

Teniendo en cuenta lo antes discutido la mejor estrategia para optimizar la expresión de proteínas heterólogas sería la denominada “armonización de los codones”, en donde se reproduce la modulación de la tasa traduccional local. Es decir, remplazar los codones sinónimos teniendo en cuenta las frecuencias utilizadas en la expresión heteróloga del hospedero, de manera tal que sean menores o equivalentes a las frecuencias de los codones nativos utilizadas en la expresión del hospedero nativo (Angov, Hillier et al. 2008).

4.1.2 Estrategias de expresión en *E.coli*.

Se encuentran disponibles diferentes protocolos para la obtención de proteínas recombinantes en su forma activa y soluble. Estos pueden ser subdivididos en tres grupos principales (Sorensen and Mortensen 2005; Yin, Li et al. 2007):

1-Expresarla como una proteína de fusión, fusionando el gen de interés a una secuencia *tag* o etiqueta. Dentro de estos podemos encontrar el poli-histidina *tag*, epítipo FLAG *tag*, una proteína fluorescente, etc. Esto puede facilitar el enriquecimiento de la proteína (ej: por inmunoprecipitación), la purificación, o el monitoreo y a menudo provee protección contra la degradación por proteasas intracelulares. Dichas proteínas de fusión suelen tener un sitio específico para una proteasa entre la proteína heteróloga y el mencionado *tag* (Sorensen and Mortensen 2005; Yin, Li et al. 2007).

2- Expresarla como proteína secretada que puede acumularse en el periplasma de *E.coli* o en el medio extracelular (Sorensen and Mortensen 2005; Yin, Li et al. 2007).

3- Recuperar la proteína como cuerpos de inclusión, que son en gran parte protegidos de la degradación proteolítica por enzimas de la célula hospedera, y luego solubilizarla (Sorensen and Mortensen 2005; Yin, Li et al. 2007).

La agregación en sistemas recombinantes puede ser minimizada a través del control de parámetros como la temperatura, la tasa de expresión, metabolismo del hospedero, y por la coexpresión de chaperonas. Los agregados purificados pueden ser solubilizados usando detergentes, por ejemplo urea. La proteína nativa puede ser plegada nuevamente desde los cuerpos de inclusión solubilizados por dilución, diálisis, o métodos de replegamiento en columna. Sin embargo dicho procedimiento consume tiempo y no siempre resulta en un buen rendimiento de recuperación de la proteína nativa (Sorensen and Mortensen 2005).

4.2 Características de la enzima Cu/Zn Superóxido dismutasa y la esclerosis lateral amiotrófica.

4.2.1 Estructura de la Cu/Zn SOD humana.

La enzima Cu/Zn SOD es una metaloenzima que protege al organismo del daño oxidativo, catalizando la conversión del anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) (Yamakura and Suzuki 1980).

Dicha enzima es un homodímero de 32 kDa que se encuentra en el citosol y espacio intermembrana de las mitocondrias de células eucariotas, así como en el espacio periplasmático de algunas bacterias (Rosen 1993). La secuencia aminoacídica de la misma se encuentra conservada a través de la evolución, sugiriendo que la Cu/Zn SOD juega un rol crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular (Andersen 2006).

Cada monómero de Cu/Zn SOD está compuesto por 153 aminoácidos en una estructura o motivo del tipo barril- β formado por ocho hojas β antiparalelas unidas por siete *loops* (Tainer, Getzoff et al. 1982). La estructura barril- β es estabilizada por un átomo de zinc y posee un átomo de cobre catalítico (Andersen 2006), unido a cuatro residuos de histidina. Uno de estos residuos también se encarga de coordinar el átomo de Zn^{2+} , junto con dos histidinas más y un residuo de aspartato (Rosen, Siddique et al. 1993).

La estructura nativa de la Cu/Zn SOD posee ciertas características que contribuyen a su estabilidad, dentro de las que cabe destacar el puente disulfuro intramolecular, formado por las cisteínas C57-C146 que estabiliza el barril β y el sitio activo, la fuerza de la interfase dimérica y el efecto estabilizador de los iones de Cu^{2+} y Zn^{2+} funcionalmente coordinados (Nordlund and Oliveberg 2008).

Además de las cisteínas que están formando el puente disulfuro intramolecular, en la interfase del dímero, también posee dos cisteínas libres C6 y C111. La cisteína C6 se encuentra en el interior hidrofóbico de la proteína, mientras que

C111 se ubica en la interfase dimérica y puede unir al átomo de Cu^{2+} (Liu, Zhu et al. 2000).

4.2.2 Esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Más de 100 mutaciones de la Cu/Zn SOD han sido asociadas a la esclerosis amiotrófica lateral del tipo familiar (fALS) (Furukawa, Kaneko et al. 2010).

La ALS es una enfermedad neurodegenerativa fatal, definida por la muerte selectiva de motoneuronas, de la medula espinal, cerebro y córtex (Ince, Lowe et al. 1998; Dion, Daoud et al. 2009). La misma genera debilidad, atrofia muscular y muerte (Bruijn, Miller et al. 2004).

Todas las mutaciones en la Cu/Zn SOD asociadas a ALS exhiben un patrón dominante de herencia. Dichas mutaciones suelen ser tóxicas para cultivos de neuronas e inducen la enfermedad cuando se expresa en motoneuronas de ratones y ratas transgénicas, aunque estos animales expresan niveles normales de la Cu/Zn SOD salvaje endógena. Las hipótesis propuestas plantean que dicha enfermedad podría ser debida a dos alternativas, como el aumento del estrés oxidativo y el aumento de la agregación de proteína (Cleveland and Liu 2000).

La mencionada enfermedad se ha encontrado asociada a un plegamiento incorrecto y agregación del homodímero Cu/Zn SOD (Nordlund and Oliveberg 2008). Estos agregados están constituidos por asociaciones borde-borde de 5-6 hojas β , con lo que impiden la formación de dos *loops* fundamentales en la formación del sitio activo (Elam, Taylor et al. 2003). No obstante aun no se ha logrado dilucidar el mecanismo por el cual disminuye la estabilidad de la enzima con su posterior agregación (Furukawa, Kaneko et al. 2010).

Las mutaciones de la Cu/Zn SOD humana citosólica son responsables del 2-3 % de los casos de ALS (Estevez, Crow et al. 1999). Aunque esto corresponde a una pequeña fracción y pese a no conocerse aun el mecanismo que conlleva a dicha enfermedad, la evidencia acumulada sugiere que el tipo de ALS más frecuente, denominada esporádica, podría ser causada por un mecanismo

análogo que involucra a la proteína salvaje (Estevez, Crow et al. 1999; Lindberg, Normark et al. 2004; Banci, Bertini et al. 2007).

La integridad estructural de la Cu/Zn SOD se basa críticamente en la correcta coordinación de los iones Cu^{2+} y Zn^{2+} . La pérdida de estos cofactores no solamente promueve la agregación de la Cu/Zn SOD in vitro, sino que también parece ser clave para el plegamiento incorrecto patogénico en la enfermedad neurodegenerativa ALS (Nordlund, Leinartaite et al. 2009).

Se ha encontrado un punto crítico para el rol del sitio Zn nativo en el control del plegamiento incorrecto. Se mostró que aún un cambio sutil de la secuencia que carga el metal puede conferir a la proteína salvaje las mismas propiedades estructurales que poseen las mutaciones asociadas a ALS (Nordlund, Leinartaite et al. 2009). Finalmente la remoción selectiva del Zn de la proteína salvaje indujo la apoptosis en el cultivo celular (Estevez, Crow et al. 1999).

4.2.3 Cu/Zn SOD G93A.

Una de las mutaciones más ampliamente utilizada como modelo para el estudio de la ALS, es la mutación G93A de la Cu/Zn SOD citosólica humana. Esta mutación implica la sustitución de la glicina del codón 93 por una alanina. Los modelos animales de ALS más comúnmente utilizados son ratones o ratas transgénicas que expresan la Cu/Zn SOD G93A humana (Gurney, Pu et al. 1994; Ripps, Huntley et al. 1995)

Ratas transgénicas SOD1-G93A fueron aceptadas como modelo animal para el estudios de la ALS debido a las similitudes con los síntomas ALS humanos, incluyendo debilidad muscular, pérdida de peso, reflejo de masticación, parálisis y dificultades respiratorias (Jackson, Ganel et al. 2002).

Se ha visto en ratones SOD1-G93A signos patológicos tempranos a los 30-37 días de edad, como la agregación de la proteína SOD1 mutante y la formación de vacuolas en motoneuronas y en sus axones (Chiu, Zhai et al. 1995; Johnston, Dalton et al. 2000).

A los 90 días de edad aproximadamente desarrollan temblores y debilidad en las extremidades posteriores, seguido de una severa parálisis de las mismas a los 120 días de edad (Gurney, Pu et al. 1994).

4.2.4 Antecedentes.

Hay antecedentes bibliográficos que reportan la obtención de la proteína recombinante Cu/Zn SOD de diversos orígenes utilizando como organismo hospedero *E.coli*. Entre ellos cabe destacar la expresión de la proteína Cu/Zn SOD de *Saccharomyces cerevisiae* en el periplasma de *E.coli*. Dicha proteína recombinante mostro ser activa protegiendo las células *E.coli* en condiciones de estrés generadas por el tratamiento con el radical superóxido (Yu 2007).

Se ha reportado la expresión de la Cu/Zn SOD humana en *E.coli* con una actividad comparable a la de la enzima de eritrocito humano.(Hartman, Geller et al. 1986).La expresión de la Cu/Zn SOD humana salvaje también se llevó a cabo utilizando una cepa de *E.coli* BL21(DE3)pLysS. Dicha expresión fue inducida con IPTG y se adiciono $ZnCl_2$ y $CuSO_4$. La proteína recombinante fue purificada, cuantificada y se comprobó que era funcionalmente activa (Alvarez, Demicheli et al. 2004).

Aunque grandes cantidades de la proteína recombinante Cu/Zn SOD humana salvaje son fácilmente producidas en *E.coli*, los mutantes asociados a ALS son fuertemente propensos a formar cuerpos de inclusión La mutación de la Cu/Zn SOD humana A4V, que implica la sustitución del residuo de alanina (A) en la posición 4 por un residuo de valina (V), es responsable de una rápida progresión de la enfermedad y es particularmente propensa a formar cuerpos de inclusión cuando se expresa en *E.coli*. Sin embargo se ha encontrado que la Cu/Zn SOD A4V se mantiene soluble cuando se expresa a 18 °C durante las primeras 6 horas. No obstante cuando es expresada a 23 °C o a temperaturas mayores más del 95% de la proteína recombinante se encuentra formando cuerpos de inclusión Éstos fueron solubilizados mediante la adición de urea 4M, sugiriendo que interacciones hidrofóbicas intermoleculares son responsables de la agregación de la Cu/Zn SOD.

Se logró obtener la Cu/Zn SOD A4V funcionalmente activa, mediante su diálisis con urea en presencia de β -mercaptoetanol y la posterior adición de Cu^{2+} y Zn^{2+} , lo cual proporciona un método rápido para la purificación de cientos de miligramos de proteína (Leinweber, Barofsky et al. 2004).

E.coli carece de las usuales proteínas chaperonas de eucariotas, incluyendo la chaperona de cobre humana que asiste en el plegamiento e inserción del cobre de la SOD (Valentine 2002). Sin embargo dicha enzima puede ser plegada en una conformación apoSOD la cual es capaz de reintroducir sus cofactores metálicos Cu^{2+} y Zn^{2+} , a pH ácido. Entonces los mutantes SOD asociados a ALS son capaces de plegarse en un estado conformacional apoSOD estable, el cual es capaz de unir los iones metálicos (Leinweber, Barofsky et al. 2004).

Otra estrategia utilizada fue la coexpresión de mutantes Cu/Zn SOD humana asociados a ALS, como la mutación G93A, con la chaperona de cobre de levadura (yCCS) durante el crecimiento en un medio suplementado con iones Cu^{2+} y Zn^{2+} . A través de esta estrategia se obtuvo la enzima Cu/Zn SOD recombinante (salvaje y G93A) en el citosol de *E.coli* representando el 30-50 % de las proteínas, cuando fueron expresadas a 23 °C. La coexpresión con yCCS aumento considerablemente la metalización, rindiendo proteína Cu/Zn SOD con 87-98% de saturación con Cu^{2+} (Ahl, Lindberg et al. 2004).

5 Objetivos.

Este trabajo se enmarca en una línea de investigación de la Sección Bioquímica, en la cual se busca comprender de qué manera influye la cinética de traducción en el plegamiento *in vivo* de proteínas.

En este proyecto, el objetivo es expresar la proteína recombinante Cu/Zn superóxido dismutasa humana (salvaje y la mutación G93A) utilizando como organismo hospedero la cepa de *E.coli* BL21(DE3)Star. Además, realizar un estudio de solubilidad para determinar la distribución de la proteína salvaje y de la mutación G93A entre la fracción protéica soluble e insoluble.

Otro objetivo planteado es insertar un *tag* de histidinas (6xHis-Tag) en el extremo amino terminal de la Cu/Zn SOD, con el propósito de aislar la proteína entera y péptidos intermedios discretos generados durante la traducción *in vivo* de la Cu/Zn SOD en *E.coli*.

6 Materiales y métodos.

6.1 Materiales.

6.1.1 Cepas de *Escherichia coli* (*E.coli*) utilizadas:

6.1.1.1 *XL1-Blue* (Stratagene).

Genotipo:

endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

Estas células son deficientes en endonucleasa (*endA1*) y recombinación (*recA*). La mutación *hsdR* previene el clivaje del ADN clonado por el sistema endonucleasa *EcoK* (*hsdR*) y la mutación en *recA* ayuda a asegurar la estabilidad del inserto, ya que reduce la recombinación no querida en el ADN clonado. La mutación *endA1* aumenta enormemente la calidad del plásmido en las minipreps. Dicha cepa contiene el gen *lacI^q ZΔM15* sobre el episoma F', la parcial delección del gen *lacZ* permite realizar un *screening* blanco/azul de los plásmidos recombinantes, por α complementación de la β-galactosidasa. Además presenta resistencia a ácido nalidixico y tetraciclina, esta última es debida al plásmido F.

6.1.1.2 *GM2163* (Fermentas).

Genotipo:

F-ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2.

Esta cepa *E.coli K12* es adecuada para la propagación de plásmidos o ADN clonado que será cortado con enzimas de restricción sensibles a metilación por Dam o Dcm metilasa, ya que la misma es *Dam⁻* y *Dcm⁻*. Dicha cepa posee

resistencia a cloranfenicol y no es apropiada para realizar un *screening* blanco/azul.

6.1.1.3 *TOP10 (Invitrogen)*.

Genotipo:

F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galk16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

Las células *Top10* contienen en su genoma las secuencias de *gale*, *galk*, *galU*⁺. También poseen resistencia a la streptomycin.

6.1.1.4 *BL21 (DE3) Star (Invitrogen)*.

Genotipo:

F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)

La cepa *BL21(DE3)Star* es derivada de la cepa *BL21(DE3)*. La designación *DE3* significa que la cepa contiene el lisogen λ *DE3*, el cual lleva el gen de la T7 ARN polimerasa bajo control del promotor *lacUV5*. La expresión de la T7 ARN polimerasa requiere la inducción con IPTG. La mutación en el gen *rne* (*rne131*) codifica una ARNasa E que carece de la habilidad de degradar el ARNm, resultando en un aumento de la estabilidad del ARNm. Dicha cepa es deficiente en la proteasa *ompT*, lo que repercute en una reducción de la degradación de la proteína heteróloga expresada en esta cepa.

6.1.2 Medios de cultivo (ver anexo).

6.1.3 Vectores.

6.1.3.1 *pGEM-T Cu/Zn SOD*:

Dicho vector contiene las secuencias codificante de las proteínas recombinantes SOD salvaje (Wt) así como la mutación G93A, inmersas entre los sitios de restricción para las endonucleasas *SacI* y *BclI*.

El vector de clonado pGEM-T Easy, es un vector pGEM que se comercializa en forma lineal y posee una timina (T) desapareada en ambos extremos 3'. Las T que sobresalen en el sitio de inserción aumentan enormemente la eficiencia de la ligación de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que previene la recircularización del vector y las T desapareadas son compatibles con los productos de PCR generados por la polimerasa termoestable.

Este vector cuya longitud es de 3015 pb, contiene promotores de RNA polimerasa T7 y SP6, flanqueando una región de múltiple clonado en la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa. La inactivación insercional del péptido α permite la identificación de los recombinantes por *screening* blanco/azul sobre placas conteniendo ampicilina/IPTG/X-Gal. Otra característica importante a destacar es que posee una región que codifica la enzima β -lactamasa, confiriéndole así resistencia a las células transformadas a la ampicilina.

6.1.3.2 pQE-30 (QIAGEN):

El vector de expresión pQE-30 de 3400pb, permite obtener la expresión de proteínas fusionadas a un *tag* de 6 histidinas (6xHis-*Tag*) en *E.coli*. Dicho plásmido es derivado de la familia de plásmidos pDS. Dentro de sus características podemos destacar: promotor T5 de fago (reconocido por la ARN polimerasa de *E.coli*) y dos secuencias del operador *lac*, con lo cual aumenta la unión de represor *lac* y asegura una eficiente represión del promotor T5. Además posee sitios de unión al ribosoma (RBSII), la secuencia codificante de 6xHis-*Tag* en 5' de la región de clonado, múltiples sitios de clonado, codones stop en todos los marcos de lectura, el gen de la β -lactamasa (*bla*).

6.1.3.3 pET-3d SOD:

El vector de expresión pET-3d presenta sitios únicos de corte. El mismo posee una longitud de 4637 pb. La región de clonado/expresión de la hebra codificante es transcrita por la T7 RNA polimerasa. El vector pET-3d confiere resistencia a ampicilina a las células transformadas con el mismo. Este vector pET-3d posee clonada la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD humana

salvaje y la mutación G93A. Además a diferencia del pQE-30 no posee el 6xHis-Tag, por lo tanto las proteínas expresadas con dicho vector presentan la desventaja de no poder ser purificadas por una cromatografía de afinidad, en una matriz de ácido níquel-nitriloacético (Ni-NTA). Por ello la purificación de las mismas requerirá numerosos pasos de purificación, posteriores a la expresión, para la obtención de dicha proteína recombinante purificada.

6.1.4 Enzimas de restricción.

La endonucleasa de restricción *BclI* (Fermentas) presenta 100% de actividad cuando es incubada a 55 °C durante una hora en buffer G 1x, así como en buffer Tango 1x o 2x, con la salvedad de que en buffer Tango 1x puede presentar *star activity* (para 5 unidades de enzima por 1 hora). Una característica importante a tener en cuenta es que *BclI* es bloqueada por Dam metilación por lo que se debe utilizar una cepa *Dam⁻*, *Dcm⁻* como lo es la cepa de *E.coli* GM2163.

La enzima de restricción *SacI* (SBS geneteck) debe ser incubada a 37 °C en buffer L 1x, donde presenta 100% de actividad. Dicha enzima es sensible a la metilación de citosinas en GAGmCTC pero no en GAGCTmC e insensible a la metilación de adeninas en GmAGCTC.

La endonucleasa *BamHI* (NEB) presenta una actividad de 100% (en los NEBuffer 2, 3 y 4) cuando es incubada 37 °C durante una hora. En dichas condiciones de reacción con NEBuffer, se debe adicionar 100 µg/mL de seroalbumina bovina (BSA). Dicha endonucleasa no es sensible a la metilación por *Dam* y *Dcm* metilasa así como tampoco a metilaciones CpG. En condiciones de baja fuerza iónica, alta concentración de enzima (más de 5 unidad x 1 hora), concentraciones de glicerol > 5%, o pH > 8.0 pueden dar como resultado la aparición de *star activity*. La digestión con *BamHI* proporciona extremos cohesivos compatibles con los extremos resultantes de una digestión con *BclI*.

6.2 Métodos.

6.2.1 Métodos relacionados a la preparación de *E.coli*.

6.2.1.1 Preparación de células competentes:

Se inocula una colonia aislada de una placa fresca en un tubo de precultivo que contenga 3 mL de LB. Se incuba a 37 °C durante 6-8 horas con agitación. Se utilizan 2,5 mL de este precultivo para inocular un matraz de 1L, el cual contiene 250 mL de LB. Luego se incuba a 37 °C en *shaker*, cuando el cultivo alcanza DO_{600nm} de 0.3, se centrifuga a 3.000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y se descarta el medio de cultivo. El resto del procedimiento para la obtención de células competentes se realiza en hielo. Luego el precipitado se resuspende en 100 mL de $CaCl_2$ de concentración 0,1 M. Es conveniente agregar un primer volumen de 20 mL de $CaCl_2$ para resuspender las células, agitando en H_2O -hielo, y después agregar el resto del volumen. Una vez resuspendidas las células se centrifuga a 3000 g durante 10 minutos, nuevamente a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y el precipitado es resuspendido suavemente con 100 mL de $CaCl_2$ 0,1 M (como se describió antes). Las células se incuban a 4 °C durante 1 hora. Luego son nuevamente centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante. El precipitado resultante de esta última centrifugación se resuspende en 3 mL de $CaCl_2$ 0,1 M y 20% de glicerol. A continuación es alicuotado de a 50 μ L en eppendorf pre-enfriados y conservadas a -80 °C hasta su utilización.

6.2.1.2 Transformación de células competentes:

Se parte de 50 μ L de células competentes las cuales se descongelan en hielo. Se agrega 10 ng del ADN plasmídico con el que se desea transformar dichas células. Se incuba en hielo durante 5 minutos y luego a 42 °C durante 1,5 minutos. Luego se agrega 1 mL de medio LB a dicho eppendorf y se incuba en shaker a 37 °C durante una hora. Finalmente se plaquean 5 μ L del cultivo en un medio selectivo de LB-agar-ampicilina (100 ng/ μ L).

6.2.2 Métodos relacionados al análisis del ADN.

6.2.2.1 Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina:

Se inocula una colonia aislada de una placa fresca en un tubo de precultivo conteniendo 3 mL de LB-ampicilina (100 ng/ μ L) y se incuba a 37° C overnight. Se centrifuga a 6.000 g por 3 minutos y se descarta el medio de cultivo. El precipitado se resuspende en 300 μ L de solución 1 (ver anexo) utilizando vortex, y se agregan 1 μ L de ARNasa (10mg/mL). Luego se agregan 300 μ L de la solución 2 (ver anexo) y se invierte el eppendorf 5 veces. Posteriormente se adicionan 300 μ L de la solución 3 (ver anexo) y se invierte varias veces hasta observar un precipitado blanco. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos. Se recupera el sobrenadante resultante (aproximadamente de 800 μ L) y se agregan 0.8 volúmenes de isopropanol (aproximadamente 600 μ L). Nuevamente, se centrifuga a 12.000 g por 30 minutos. Se elimina el sobrenadante y el precipitado (ADN plasmídico) se lava con 600 μ L de etanol (EtOH) 70% a 12000 g por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se deja secar al aire. Posteriormente este se resuspende en el volumen deseado de H₂O MilliQ y se conserva a -20 °C hasta su utilización.

(Nota: las centrifugaciones fueron realizadas a temperatura ambiente).

6.2.2.2 Electroforesis en gel de Agarosa.

La agarosa (Bioron, rango de 50 pb a 50 Kpb) se funde en buffer TAE 1x, calentando en el microondas hasta su completa disolución. Luego se deja enfriar un instante a temperatura ambiente y se adicionan 3 μ L de bromuro de etidio 10 mg/mL por cada 50 mL.

Las electroforesis en geles de agarosa se realizaron a un voltaje de 100 V en una cuba de electroforesis horizontal Kodak Biomax QS710 de dimensiones 7x10 cm.

6.2.2.3 Precipitación con acetato de sodio.

En la precipitación se agregan 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3,0 M, pH 5.2 al volumen que contiene el ADN a precipitar. Luego de homogenizar

agregar 2 volúmenes de EtOH 100% frío e incubar 15 minutos en hielo. A continuación se centrifuga a 12.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se descarta, mientras que el precipitado se lava con EtOH 70% y nuevamente se centrifuga. El sobrenadante se descarta y el precipitado se seca al aire. Luego se resuspende en el volumen adecuado de H₂O MilliQ.

6.2.2.4 Digestión con enzimas de restricción:

6.2.2.4.1 Preparación del vector de expresión pQE-30.

Digestión con *Bam*HI: 1 µL de pQE-30 (0.5-1 µg/µl) se incuban con 0,5-2 µL de *Bam*HI en buffer Tango 1x y H₂O MilliQ c.s.p. 20 µL a 37°C por 1-16 horas.

Digestión con *Sac*I: 1 µL de pQE-30 (0.5-1 µg/µl) se incuban con 0,5-2 µL de *Sac*I en buffer Tango 1x y H₂O MilliQ c.s.p. 20 µL a 37°C durante 1-16 horas.

6.2.2.4.2 Preparación de los insertos codificantes de Cu/Zn SOD salvaje y G93A.

Digestión con *Sac*I: 1 µL de pGEM-T SOD (0.5-1 µg/µl) se incuban con 0,5-2 µL de *Sac*I en buffer Tango 1x (o buffer L 1x) y H₂O MilliQ c.s.p. 20 µL a 37°C durante 1-16 horas.

Digestión con *Bcl*I: 1 µL de pGEM-T SOD (0.5-1 µg/µl) se incuban con 0,5-2 µL de *Bcl*I en buffer G 1x y H₂O MilliQ c.s.p. 20 µL a 55 °C durante 1-16 horas. También 1 µL de pGEM-T SOD (0.5-1 µg/µl) previamente digeridos con *Sac*I se incuban con 0,5-2 µL de *Bcl*I en buffer Tango 2x (o buffer L 1x + NaCl 50 mM) y H₂O MilliQ c.s.p. 30 µL a 55 °C durante 1-16 horas.

6.2.2.5 Secuenciación de los plásmidos recombinantes pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A.

La secuenciación de los plásmidos recombinantes se realiza por parte de la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Institut Pasteur de Montevideo. Dicha unidad cuenta con un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystem). La secuenciación se realiza por el método de Sanger,

para el cual es necesario disponer de un cebador. En la secuenciación de los plásmidos pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A se utiliza el primer T7.

6.2.2.6 Diseño de cebadores para mutagénesis dirigida.

El diseño de los mismo se realizo teniendo en cuenta lo descrito por el “Manual: QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit”. Las principales recomendaciones son:

- 1) Ambos cebadores deben tener la mutación deseada y alinear en la misma secuencia en cadenas opuestas del plásmido.
- 2) Los cebadores deben tener entre 25 y 45 pb de longitud con una T_m (temperatura de *melting*) mayor o igual a 78 °C.
- 3) La T_m de los cebadores se estima como $T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N$, siendo N la longitud del cebador sin incluir las bases que serán insertadas. La inserción debe estar en el medio del cebador con aproximadamente 10-15 pb de la secuencia correcta en ambos extremos.
- 4) Los cebadores deben poseer un contenido en GC mínimo de 40% y terminar en una o más bases G o C.

6.2.3 Métodos relacionados a la expresión y análisis de proteínas.

6.2.3.1 Expresión de las proteínas Cu/Zn SOD salvaje y G93A humanas en *E.coli*:

Se inocula una colonia aislada de una placa fresca en un tubo de precultivo conteniendo 3 mL de LB–ampicilina (100 ng/μL) y se incuba a 37 °C overnight. Luego en condiciones de esterilidad se toma una alícuota del cultivo para medir su DO_{600nm} . Se inocula un nuevo tubo de precultivo de 3 mL de LB-ampicilina de forma tal que su DO_{600nm} sea 0.03 y se incuba nuevamente a 37 °C. Teniendo en cuenta las condiciones mencionadas anteriormente para la toma de alícuotas, se mide la DO_{600nm} cada una hora aproximadamente, hasta que la misma alcance el valor de 0.6-0.8. Luego se inocula un matraz de 250 mL

conteniendo 50 mL de medio de cultivo LB-ampicilina con el cultivo antes mencionado de forma tal que su DO_{600nm} sea 0.03. Se toman alícuotas cada una hora para medir su DO_{600nm} , hasta que alcance un valor de 0.6-0.8 aproximadamente. Antes de realizar la inducción de la expresión se toma una alícuota de 1mL de cultivo y se procesa. La inducción se realiza con 1mM de IPTG, simultáneamente se agregan 0,1 mM de $ZnCl_2$ y 0,05 mM de $CuSO_4$. La expresión se realiza a 30 °C durante 2 horas. Se colectan dos alícuotas de 1 mL cada 1 hora y se mide la DO_{600nm} (es decir a las 0hs, 1h y 2hs). Una vez finalizado el tiempo de incubación y realizadas las medida de DO_{600nm} , las alícuotas colectadas y el medio de cultivo restante se centrifugan a 3.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Luego son guardados a -20° C hasta el momento de su fraccionamiento soluble e insoluble.

6.2.3.2 Obtención de fracción soluble e insoluble

Se transfieren 6 mL de un cultivo de *E.coli* con una DO_{600nm} de 1,5 (o el volumen equivalente a esa cantidad de células). Dichas células se centrifugan a 3.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descarta y el precipitado se deja secar sobre papel. A partir de este punto las muestras deben ser mantenidas siempre en hielo durante la realización del protocolo. Luego se resuspende el precipitado en 0,45 mL de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, a 4 °C (alternativamente, resuspender en 5 mL de buffer por gramo de sedimento). Una vez que el precipitado se encuentra completamente resuspendido se adicionan 50 µL de *lisozima* fresca 2 mg/mL en EDTA 0,1 M, pH 8.0. A continuación las muestras son sonicadas a una amplitud de 60%, 5 o 6 veces durante 20 segundos con intervalos de 1 minuto entre sonicados. Después las muestras se centrifugan a 14.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante resultante de la mencionada centrifugación se corresponde con la fracción soluble, por lo tanto se debe recuperar. El precipitado se lava con 0,45 mL del buffer Tris-HCl 20 mM de pH 8.0 y se centrifuga a 14.000 g durante 20 minutos. Luego el sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0, en igual volumen que la fracción soluble equivalente. Finalmente este último se corresponde con la fracción insoluble.

6.2.3.3 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

Los geles de acrilamida se preparan al 12 y 15% como se describe en el libro “*Current Protocols in Molecular Biology*” (Ausubel et al, 1987). Las muestras se preparan con buffer de carga 4x y luego se incuban a 100° C durante 5 minutos. La cuba de electroforesis utilizada fue Mini-Protean Tetra Cell (BIO-RAD).

Los voltajes utilizados son 90 V mientras las muestras atraviesan en gel concentrador y 120 V cuando pasan a través del gel separador.

7 Estrategia experimental.

Con el propósito de llevar a cabo los objetivos de este proyecto: subclonado, expresión y estudio de solubilidad de la proteína Cu/Zn SOD humana, nos planteamos la estrategia esquematizada en la **figura 1**.

Se partirá de vectores recombinantes (pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A) que poseen las secuencias codificante de la Cu/Zn SOD humana salvaje y la mutación G93A. Se tratará dicho vector con enzimas de restricción a modo de liberar el inserto correspondiente al gen de la superóxido dismutasa. El vector de expresión de destino se linearizará con enzimas de restricción que permitirán el clonado en fase del gen.

Se ligará el inserto con el vector de expresión y se transformaran células de la cepa *E.coli XL-1blue* con la mezcla de ligación. A partir de estos clones se rastrearán los que contengan el plásmido con inserto. Se confirmará la presencia del mismo en el correcto marco de lectura así como la ausencia de mutaciones deletéreas mediante: PCR, digestiones con enzimas de restricción y secuenciación. Se procederá a transformar bacterias competentes adecuadas para la expresión de los plásmido verificados.

Se realizará el fraccionamiento proteico para ambas proteínas de acuerdo a la solubilidad diferencial por centrifugación a 14.000g durante 30 minutos a 4 °C.

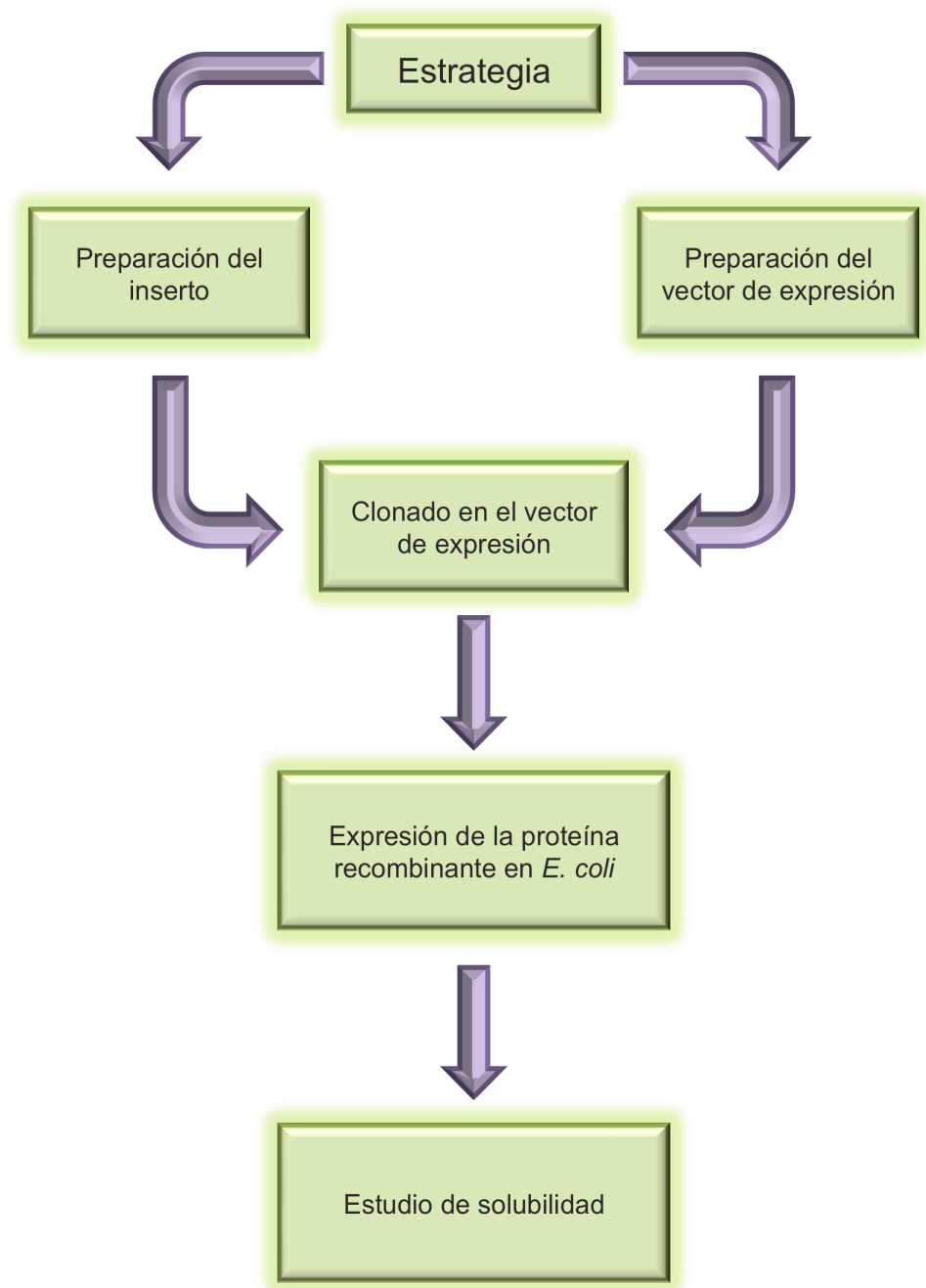


Figura 1. Esquema de la estrategia experimental para la expresión y estudio de solubilidad de la superóxido dismutasa humana.

7.1 Elección del vector de expresión.

Varios sistemas de expresión de proteínas recombinantes han sido desarrollados. Sin embargo generalmente se requieren numerosos pasos de purificación, posteriores a la expresión, para la obtención de dicha proteína recombinante purificada.

Las técnicas clásicas de purificación de proteínas implican una gran inversión de tiempo. Una alternativa es diseñar mediante técnicas de biología molecular una proteína de fusión recombinante, la cual posea un *tag* o etiqueta específico que permita simplificar su purificación por medio de una cromatografía de afinidad.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado fue elegido el vector de expresión pQE-30. Este permitirá expresar la proteína recombinante SOD (salvaje y G93A) fusionada en fase con una etiqueta de seis residuos de histidina (6xHis-*Tag*), permitiendo la purificación de la misma por medio de una cromatografía de afinidad, en una matriz de ácido níquel-nitriloacético (Ni-NTA). La interacción entre el 6xHis-*Tag* y la matriz de Ni-NTA es independiente de la conformación, por lo tanto permite llevar a cabo la purificación de la proteína recombinante en condiciones nativas o desnaturalizantes. El 6xHis-*Tag* es de tamaño mucho menor que otras etiquetas utilizadas frecuentemente, y generalmente no interfiere con la función y estructura de la proteína recombinante.

A pH fisiológico la pequeña etiqueta 6xHis-*Tag* se encuentra descargada, por lo que generalmente no afecta la compartimentalización o el plegamiento de la proteína recombinante dentro de la célula.

La posición N-terminal de dicha etiqueta permitirá purificar intermediarios de síntesis de la Cu/Zn SOD, los cuales serán de gran utilidad para estudios posteriores de cinética traduccional y plegamiento *in vivo*.

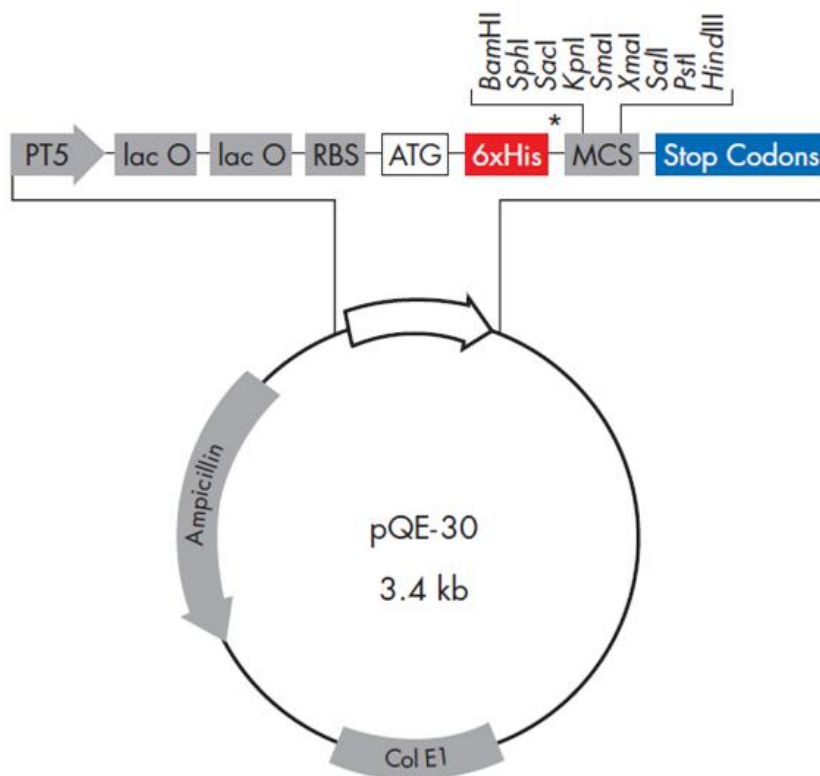


Figura 2. Mapa del vector pQE-30. PT5: promotor T5, lac O: operador lac, RBS: sitio de unión del ribosoma, ATG: codon de inicio, 6xHis: secuencia del 6xHis *tag*, MCS: sitio de multiplie de clonado, Stop Codons: codones *stop* en los tres marcos de lectura, Col E1: origen de replicación Col E1, Ampicillin: gen de resistencia a la ampicilina.

8 Resultados y Discusión.

Con el propósito de llevar a cabo el objetivo de insertar un 6xHis-*Tag* en el extremo N-terminal de la Cu/Zn SOD, nos proponemos realizar la preparación del vector de expresión pQE-30 y de la secuencia codificante de las proteínas recombinantes Cu/Zn SOD salvaje y la mutación G93A, para su posterior ligación dentro del vector de expresión.

La posición N-terminal del 6xHis-*Tag* permitirá aislar los intermediarios generados durante la traducción de la proteína en cuestión. Si dicha etiqueta se encontrase en el extremo C-terminal solamente nos permitiría purificar la proteína recombinante en su longitud completa. Es por ello que realizamos la digestión del plásmido pQE-30 con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI*. En simultáneo utilizando diferentes condiciones intentamos obtener los fragmentos de interés digeridos con las enzimas de restricción *SacI* y *BclI*, de manera tal que pudiésemos obtener extremos cohesivos compatibles con los extremos cohesivos presentes en el plásmido pQE-30 digerido.

Como alternativa al subclonado, nos planteamos realizar la inserción del 6xHis-*Tag* en el extremo N-terminal de la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD (salvaje y la mutación G93A) que se encuentran dentro de los vectores de expresión pET-3d SOD, por medio de mutagénesis dirigida.

Para cumplir con el otro objetivo planteado en este trabajo se realizó la expresión de la Cu/Zn SOD (salvaje y la mutación G93A) en la cepa *E.coli* BL21(DE3)*Star*. A continuación se realizó el estudio de solubilidad de dichas proteínas.

8.1 Clonado de las secuencias codificantes de la Cu/Zn SOD salvaje y G93A en el vector de expresión pQE-30.

8.1.1 Preparación del vector para el clonado.

8.1.1.1 Purificación del plásmido pQE-30

Se transformaron células *Top10* con el vector de expresión pQE-30 para la propagación del mismo y se seleccionaron en medio sólido LB-Agar-Ampicilina. A partir de un precultivo de 3 mL de LB-Ampicilina inoculado con una colonia aislada de dichas células se realizó la purificación del ADN plasmídico por el método de lisis alcalina. Una vez precipitado el ADN plasmídico obtenido de dicha purificación fue resuspendido en 30 μ L de H₂O MiliQ.

El plásmido obtenido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa, como se muestran a continuación en la **figura 3**, en la cual se sembraron 5 μ L el plásmido pQE-30. Este se presenta en su conformación superenrollada y circular o relajada.

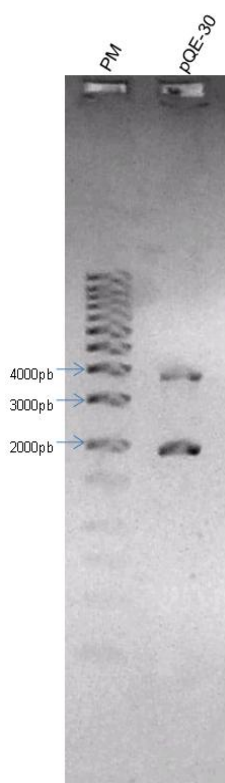


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la preparación del ADN plasmídico del vector pQE-30 por el método de lisis alcalina. PM: marcador de peso molecular (Stratagene).

La concentración del plásmido pQE-30 fue estimada en aproximadamente 25 ng/ μ L, tomando en cuenta la intensidad de las bandas del plásmido con respecto a las del marcador de peso molecular. Por lo tanto a partir de 3 mL de precultivo se obtuvieron aproximadamente 750 ng de ADN plasmídico (pQE-30), es decir un rendimiento aproximado de 250 ng de ADN plasmídico/mL de cultivo. El rendimiento de dicha purificación fue menor al esperado, ya que según el libro “*Current protocols in Molecular Biology*”, sería de 3 μ g de ADN partiendo de un cultivo de *E.coli* de 1,5 mL (para plásmidos derivados de pBR322).

Sin embargo, dicha purificación fue eficiente con respecto a los posibles ácidos nucleicos contaminantes ya que no se visualiza la presencia de ADN genómico, el cual migraría una distancia menor, correspondiente a un mayor tamaño en pares de bases. Tampoco se observó ARN en el gel de agarosa mostrado en la **figura 3**.

Teniendo en cuenta la posible contaminación con proteínas, se debería haber determinado la pureza a través del cálculo del cociente [ADN]/[Proteínas]. La cuantificación del ADN puede calcularse mediante espectroscopia en el rango de luz UV, a la longitud de onda (λ) de 260 nm donde presenta un máximo de absorbancia. Por otra parte las proteínas presentan un máximo de absorbancia a 280 nm. Aunque los máximos en los espectros de absorbancia son característicos de los compuestos, ambos absorben parcialmente en cierta medida en las dos longitudes de onda. Es por ello que se define a un ADN puro como aquel cuyo cociente A_{260nm}/A_{280nm} oscila entre 1.7 a 2.0.

8.1.1.2 Digestión de pQE-30.

Se diseñó la estrategia de clonado seleccionando las enzimas de restricción de manera tal que se libere el fragmento codificante de la Cu/Zn SOD salvaje y G93A sin cortar dentro de dichas secuencias, y que permitan la ligación de los mismos dentro del vector pQE-30. Por ello, fueron seleccionadas las enzimas de restricción *SacI* y *BclI* para liberar los fragmentos de interés desde los vectores pGEM-T SOD y las enzimas *SacI* y *BamHI* para linearizar el vector pQE-30. Esta última enzima genera extremos compatibles a los generados por

BclI. También fue tenido en cuenta durante el diseño experimental que las proteínas Cu/Zn SOD (salvaje y G93A) sean traducidas como proteínas de fusión junto al 6xHis-Tag N-terminal en el correcto marco de lectura.

Se realizó la digestión de dicho plásmido con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* a 37 °C durante una hora y media. Se realizó una incubación a 37 °C durante 30 minutos de aproximadamente 125 ng de pQE-30 con 2,5 µL de *SacI* y otros 125 ng de pQE-30 con 1,25 µL de *BamHI*, ambas en buffer Tango 1x y volumen final 20 µL. Luego se toman 4 µL de cada una de las incubaciones para comprobar la correcta digestión simple del plásmido con ambas enzimas de restricción. Los restantes 16 µL de cada una de las digestiones simples se transfieren ambas a un mismo eppendorf, se agregan nuevamente las mismas cantidades de las dos enzimas y se incubaba a 37 °C durante una hora.

La digestión doble y los controles de las digestiones simples fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa (0.8%). El resultado de la misma se muestra en la **figura 4**.

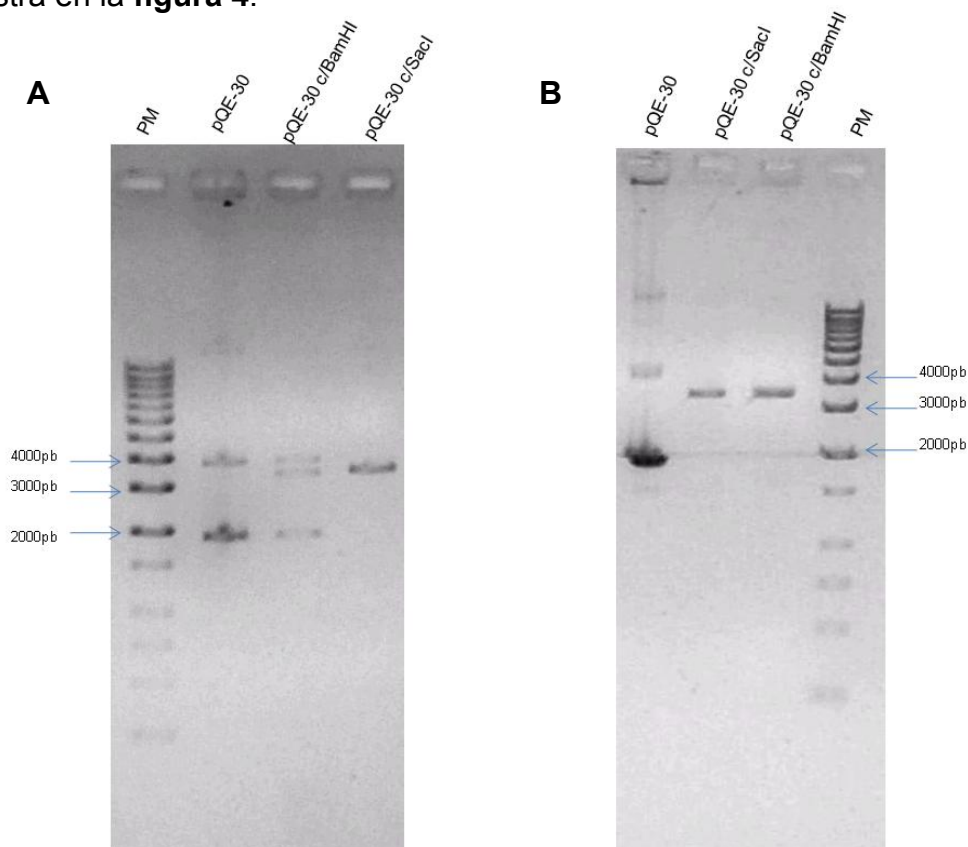


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 0.8%, de las digestiones simples del vector pQE-30 con las endonucleasas *BamHI* y *SacI* en buffer Tango (1x). PM: marcador de peso molecular (Stratagene) A. Digestión de pQE-30 incubada por 30 minutos B. Digestión de pQE-30 incubada por 1 hora.

La **figura 4-A** muestra que la digestión con *SacI* fue completa a los 30 minutos de incubación, dando como resultado una única banda de longitud entre 3.000 y 4.000 pb lo que es concordante con la longitud del plásmido pQE-30 en su conformación lineal (3.400 pb). Sin embargo la digestión realizada con *BamHI* no es completa a los 30 minutos de incubación.

Cuando se repitió la digestión del vector pQE-30 con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* incubadas a 37 °C durante una hora se verificó la digestión completa de dicho plásmido, como se aprecia en la figura 4-B.

Considerando que la digestión simple de pQE-30 con las enzimas *SacI* y *BamHI* incubadas a 37 °C durante una hora es completa, se procedió a realizar la digestión doble del vector pQE-30. Se transfirieron ambas digestiones simples a un mismo eppendorf, al cual se agrega las mismas cantidades de enzima utilizadas en las digestiones simples y se incubó durante una hora.

Se asumió que la digestión doble fue completa y se procedió a realizar la precipitación del plásmido lineal con acetato de sodio. La precipitación permitirá enriquecer el plásmido en cuestión, eliminando los pequeños fragmentos que son liberados como resultado de la doble digestión. La diferencia de tamaños entre el pequeño fragmento liberado (aproximadamente 50 pb) y el vector de expresión preparado para la ligación (aproximadamente 3350 pb) permite precipitar fácilmente con acetato de sodio (como fue descrito en materiales y métodos) el ADN de mayor tamaño, es decir el plásmido digerido, mientras los pequeños fragmentos liberados en la digestión permanecerán en el sobrenadante.

Alternativamente se podría purificar el vector a partir de un gel de agarosa. Este procedimiento puede resultar en un rendimiento menor de la cantidad de ADN plasmídico purificado. Sin embargo nos permitiría confirmar que únicamente estamos purificando el plásmido linearizado.

8.1.2 Preparación de los insertos para el clonado.

En paralelo a la preparación del vector de expresión pQE-30, se intentó liberar los fragmentos codificante de la Cu/Zn SOD salvaje y la mutación G93A. Las enzimas de restricción escogidas para liberar los insertos codificante de la

Cu/Zn SOD salvaje y G93A de los plásmido recombinante pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A fueron *BclI* y *SacI*, como se mencionó en materiales y métodos.

8.1.2.1 Purificación de los plásmidos pGEM SOD.

El primer paso para la purificación del inserto fue la transformación de células competentes *GM2163* con los plásmidos pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A. Las células transformadas fueron seleccionadas en medio LB-Agar-Ampicilina.

La particularidad de la cepa de *E.coli GM2163* es la deficiencia en metilasas, ya que la misma presenta las mutaciones *dcm⁻* y *dam⁻*. Dichas mutaciones son necesarias para la propagación de los plásmidos recombinantes de manera tal que puedan ser cortados por la enzima de restricción *BclI*, ya que la misma es sensible a la metilación del ADN por la Dam metilasa.

La purificación de los plásmidos pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A se realizó por el método de lisis alcalina. La **figura 5** muestra el resultado de dicha purificación. El perfil de la electroforesis muestra dos bandas correspondientes al plásmido en sus conformaciones superenrollado y relajado.

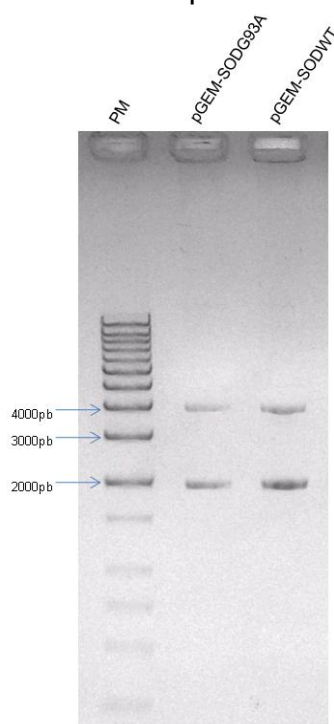


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la purificación de los plásmidos recombinantes pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A por lisis alcalina. PM: marcador de peso molecular (Stratagene).

Se sembraron 2 μL de cada uno de los plásmidos, para los cuales su concentración fue estimada en aproximadamente 38,9 ng/ μL y 35,2 ng/ μL para pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A respectivamente. Estos valores fueron estimados tomando en cuenta la intensidad de las bandas de plásmido con respecto a las intensidades del marcador de peso molecular.

A partir de 3 mL de precultivo LB-Ampicilina se obtuvieron aproximadamente 1167 ng de pGEM-SODWT y 1056 ng de pGEM-SODG93A. Es decir, se obtuvo un rendimiento aproximado de 389 ng pGEM-SODWT/mL de cultivo y 352 ng pGEM-SODG93A/mL de cultivo, superando el rendimiento obtenido para el plásmido pQE-30.

No se observa la presencia de ADN genómico, ni tampoco se detecta la presencia de ARN. Por ello, se puede concluir que dicha purificación fue eficiente con respecto a los posibles ácidos nucleicos contaminantes.

Teniendo en cuenta la posible contaminación con proteínas, se debería haber determinado la pureza a través del cálculo del cociente $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

8.1.2.2 Digestión de los plásmidos pGEM-SOD

Primero se realizaron las digestiones simples de aproximadamente 270 ng del plásmido pGEM-SODWT y 250 ng del pGEM-SODG93A con 1,5 μL de la endonucleasa *SacI* incubada en buffer Tango 1x con H_2O MilliQ c.s.p. 20 μL durante una hora a 37 °C. Luego se tomó 5 μL de dichas digestiones como control de las digestiones simples con *SacI*. Los restantes 15 μL fueron digeridos con 1 μL de *BclI* en buffer Tango de concentración final 2x y H_2O MilliQ c.s.p. 30 μL , durante una hora a 55° C. En paralelo a esta segunda digestión se realizaron las digestiones simples de aproximadamente 125 ng de cada uno de los plásmidos recombinantes con 0,5 μL de *BclI* en buffer Tango 2x y H_2O MilliQ c.s.p. 20 μL .

Las **figuras 6 A y B**, mostradas a continuación corresponden a las digestiones realizadas con las endonucleasa *SacI* y *BclI* en buffer Tango.

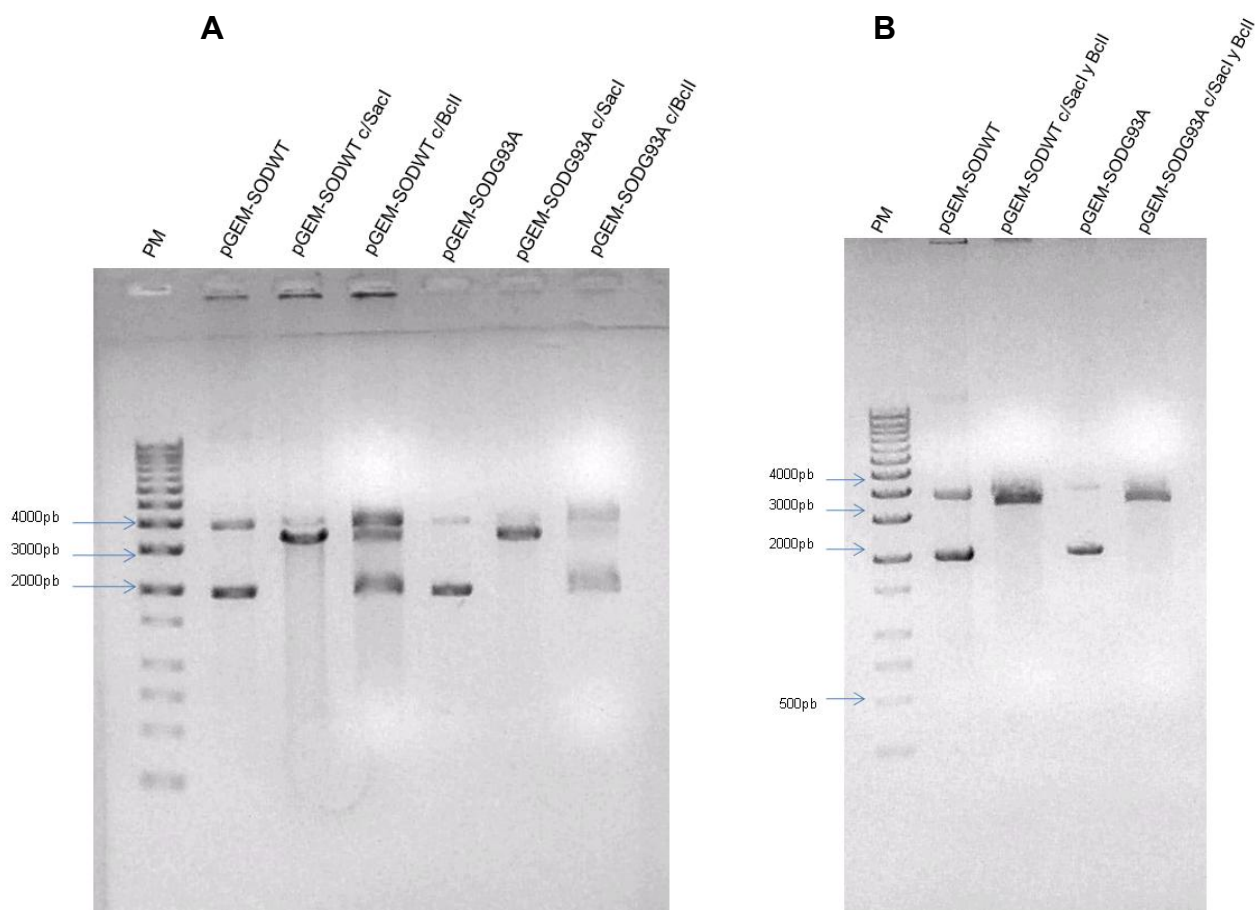


Figura 6. A) Digestiones simples de los plásmidos recombinantes pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A con las endonucleasas *SacI* y *BclI* en buffer Tango (1x y 2x respectivamente). **B)** Digestiones dobles de los plásmidos pGEM-SOD WT y pGEM-SODG93A con las enzimas *BclI* y *SacI* en buffer Tango. PM: marcador de peso molecular (Stratagene).

La **figura 6A** muestra una correcta digestión con *SacI* de los plásmidos ya que presentan una migración en el gel de agarosa concordante con la longitud de dichos plásmidos linearizados (3.485pb). Por otra parte las digestiones con *BclI* fueron sólo parciales, mostrando pequeñas cantidades de plásmido lineal además de una degradación parcial de los mismos.

En la **figura 6B** se pueden observar las digestiones con ambas enzimas de restricción en buffer Tango, en las cuales no se detecta la liberación de los fragmentos esperados de aproximadamente 462 pb. Los resultados de la **figura 6B** son concordantes con los de la **figura 6A**, ya que como no fue eficiente la digestión con *BclI* en el control realizado en simultaneo, no es esperable que se produzca la liberación de los fragmentos de interés. Podemos concluir que las condiciones utilizadas no son adecuadas para la digestión completa con *BclI*.

8.1.2.3 Purificación de los plásmidos pGEM-SOD mediante kit de Qiagen.

Se consideró la posibilidad de que los plásmidos no fuesen lo suficientemente puros para la adecuada actividad de la endonucleasa *BclI*. Por ello se realizó la purificación de los plásmidos recombinantes utilizando un kit de purificación Qiagen. A través de este logramos obtener los plásmidos pGEM-SOD de concentraciones estimadas a partir del marcador de peso molecular del orden de 39-50 ng/μL y de 61 ng/μL para pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A respectivamente.

El perfil electroforético de dichas purificaciones no mostro presencia de ADN genómico, ni de ARN. Por lo tanto podemos concluir que ADN plasmídico fue purificado correctamente.

El rendimiento obtenido en dichas purificaciones fue del orden de 390-500 ng de ADN/mL de cultivo para pGEM-SODWT y de 610 ng de ADN/mL de cultivo para pGEM-SODG93A. Mientras que los rendimientos obtenidos mediante la utilización del protocolo descrito en materiales y métodos fue de 389 ng de ADN/mL de cultivo y 352 ng de ADN/mL de cultivo para pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A respectivamente. Por lo tanto no observamos una diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos para cada uno métodos de purificación de ADN plasmídico.

8.1.2.4 Digestión de los plásmidos pGEM-SOD purificados mediante kit de Qiagen.

Se repitieron las digestiones con ambas enzimas de restricción utilizando los plásmidos purificados mediante el Kit-Qiagen. Sin embargo los resultados obtenidos no fueron distintos de los descritos previamente. Entonces podemos concluir que la dificultad de llevar a cabo la digestión con *BclI* no es debida a la presencia de impurezas en la purificación de ADN plasmídico.

8.1.2.5 Control de la enzima de restricción *BclI*.

Para verificar el correcto funcionamiento de *BclI*, se procedió a realizar las digestiones simples de los plásmidos recombinantes en buffer G 1x (buffer recomendado). Entonces se realizó la digestión simple de 128,0 y 125,0 ng de dos purificaciones del plásmido pGEM-SODWT, cuyas concentraciones estimadas a partir de la intensidad de bandas en un gel de agarosa fueron 38,8 y 50,0 ng/μL respectivamente. También se realizó la digestión simple de 122,2 ng (cada una) de dos purificaciones del plásmido pGEM-SODG93A, ambas de concentración estimada en 61,1 ng/ μL. Las cuatro digestiones se realizaron mediante la adición de 0,5 μL de *BclI* en buffer G 1x y H₂O MilliQ c.s.p. 20 μL.

El resultado de dichas digestiones se observa en la **figura 7**, la cual muestra los plásmidos recombinantes linearizados de longitud esperada (3.485 pb), ya que el mismo migran una distancia acotada entre 3.000 y 4.000 pb.

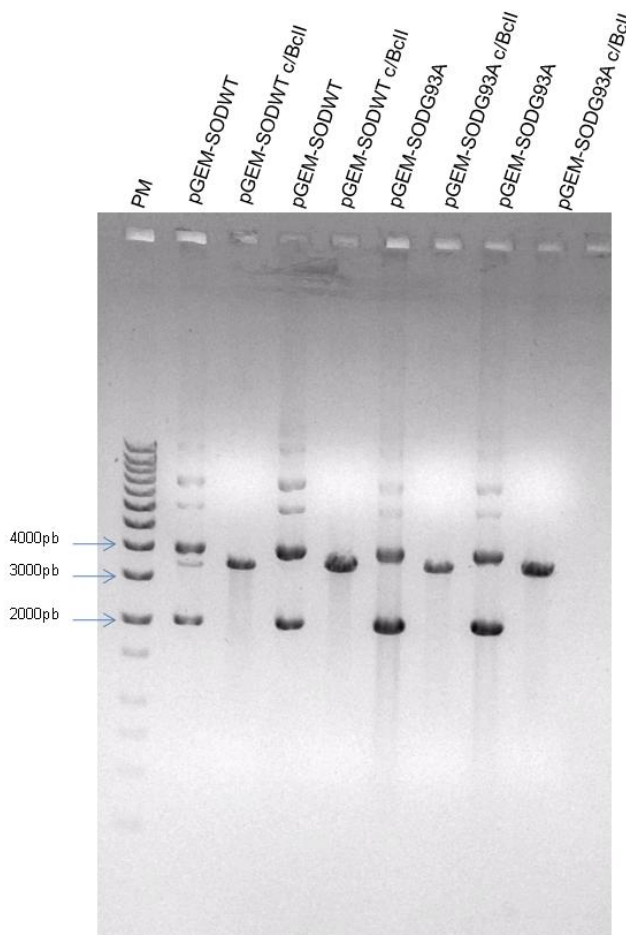


Figura 7. Digestiones simples de los plásmidos pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A con la endonucleasa *BclI* en buffer G 1x. PM: marcador de peso molecular (Stratagene).

Por lo tanto podemos atribuir el bajo rendimiento y degradación parcial antes visto, a que el buffer Tango no es adecuado para la actividad de la enzima *BclI*.

8.1.2.6 Estrategia alternativa para la digestión de los plásmidos pGEM-SOD.

Como alternativa a las digestiones en buffer Tango, se procedió a realizar en primer lugar la digestión con *SacI* en buffer L 1x (recomendado para *SacI*) seguido de una segunda digestión con *BclI* en el mismo buffer con la adición de NaCl 50 mM. El NaCl es agregado después de la primera digestión, debido a que *SacI* es inactiva para dicha concentración de sal y por el contrario es necesaria para que la enzima *BclI* sea activa. Entonces se realizó la digestión de 4 µL de pGEM-SODWT de concentración estimada en 6,9 ng/µL y 4 µL de pGEM-SODG93A de concentración estimada en 13,8 ng/µL, ambas con 1 µL de *SacI* en buffer L 1x y H₂O MilliQ c.s.p 20 µL incubadas a 37 °C durante una hora. Luego se realizó una segunda digestión con 1 µL de *BclI* en buffer L con la adición de 50 mM de NaCl y H₂O MilliQ c.s.p. 25 µL, las cuales fueron incubadas a 55 °C durante una hora. También se hicieron controles de las digestiones simples con *BclI* en las mismas condiciones.

Sin embargo el resultado obtenido para dichas digestiones fue idéntico a los observados en buffer Tango, como se muestra en la **figura 8**.

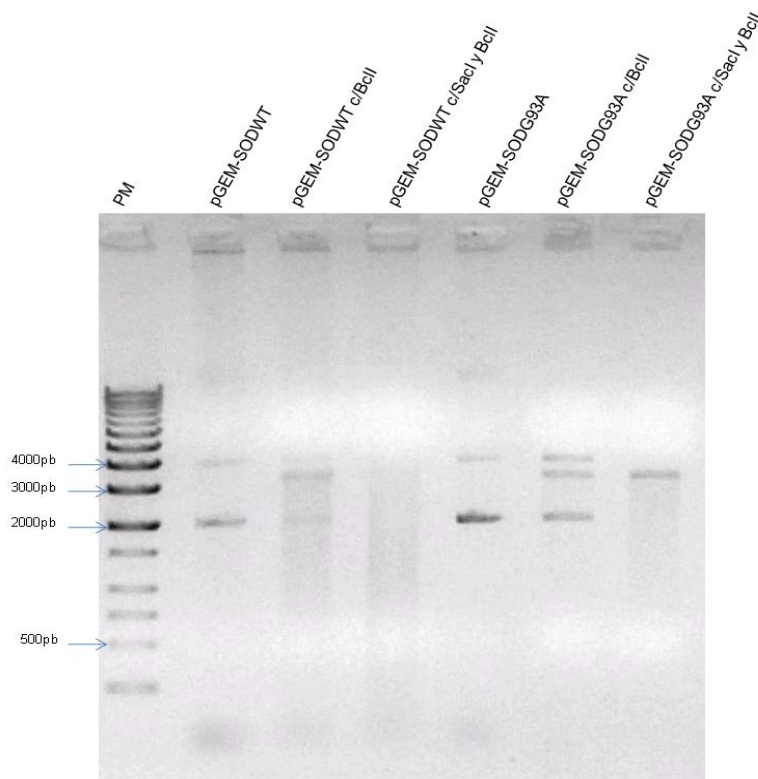


Figura 8. Digestiones simples de los plásmidos recombinantes pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A con las endonucleasas *SacI* en buffer L y *BclI* en buffer L con 50mM de NaCl. PM: marcador de peso molecular (Stratagene).

Pese a que se utilizó una cepa adecuada para la amplificación de los plásmidos, no fue posible liberar los fragmentos de interés de los plásmidos recombinantes. Dentro de las diferencias de incompatibilidad prácticas que presentan las enzimas *BclI* y *SacI* está la temperatura a la cual son activas, sin embargo dicho problema podría ser resuelto mediante la realización de una primera digestión con *SacI* a 37 °C seguido de una segunda digestión con *BclI* a 55 °C, como se describió en materiales y métodos. Por otra parte un problema mayor de incompatibilidad es la concentración de sal, ya que como antes mencionamos *SacI* es inhibido por concentraciones de NaCl mayores a 10 mM mientras que *BclI* requiere la presencia de NaCl 50mM para ser activa.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en las **figuras 6A y 7**, donde los plásmidos recombinantes muestran una migración en el gel de agarosa concordante con la longitud de dichos plásmidos linearizados se puede inferir que las enzimas fueron funcionalmente activas en distintos buffer (G 1x para *BclI* y tango1x o L 1x para *SacI*). Por lo tanto podemos adjudicar la ineficiencia de la digestión doble con las enzimas *SacI* y *BclI* a una incompatibilidad de buffer para el óptimo funcionamiento de las mismas.

Este problema podría ser solucionado mediante la digestión simple con *BclI* en buffer G, seguida de la precipitación del plásmido por ejemplo con acetato de sodio y finalmente realizar la digestión con *SacI* en su buffer correspondiente (L). Sin embargo para ello se necesitarían grandes cantidades de ADN plasmídico.

8.2 Secuenciación de los plásmidos recombinantes pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A

Considerando las dificultades encontradas para realizar el subclonado se decidió expresar la Cu/Zn SOD salvaje y G93A utilizando vectores pET-3d, ya que en nuestro laboratorio contamos con los vectores recombinantes pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A. El vector pET-3dSODWT fue cortésmente cedido por la Dra. Beatriz Álvarez. Mientras que el vector pET-3dSODG93A es producto de una mutación dirigida, la cual fue realizada en el marco de la maestría de la Mag. Florencia Palacios.

8.2.1 Purificación de los plásmidos pET-3dSOD.

Se procedió a secuenciar dichos vectores para confirmar que sus secuencias codificantes sean las correctas. Previamente células *XL1 blue* fueron transformadas con los plásmidos pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A con el fin de propagar los mismos, para su posterior secuenciación. La purificación de dichos plásmidos recombinantes se observa en la **figura 9**, en la cual se muestran los plásmidos pET-3dSODWT en su conformación relajada y los pET-3dSODG93A en sus conformaciones súperenrollada y relajada.

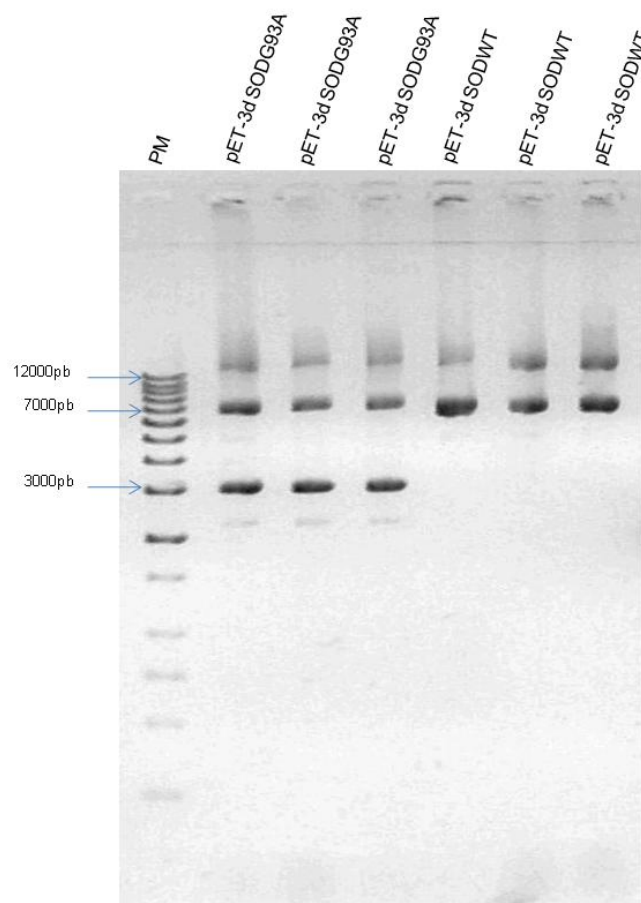


Figura 9. Purificación de los plásmidos recombinantes pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A por el método de lisis alcalina. PM: marcador de peso molecular (Stratagene).

No se aprecia la presencia de ADN genómico, así como tampoco ARN. Por lo tanto podemos concluir que la purificación del plásmido fue eficiente.

8.2.2 Secuencias de los plásmidos pET-3dSOD.

En la **figura 10 A y B** se muestran los cromatogramas correspondientes a la secuenciación de los plásmidos recombinantes pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A. En dichas figuras se muestra la mutación puntual la cual reemplaza una guanina (G) por una citosina (C). Entonces el codón GGT que codifica para un residuo de glicina (**G**) es reemplazado por el codón GCT codificante de un residuo de alanina (**A**), resultando en la mutación denominada **G93A**.

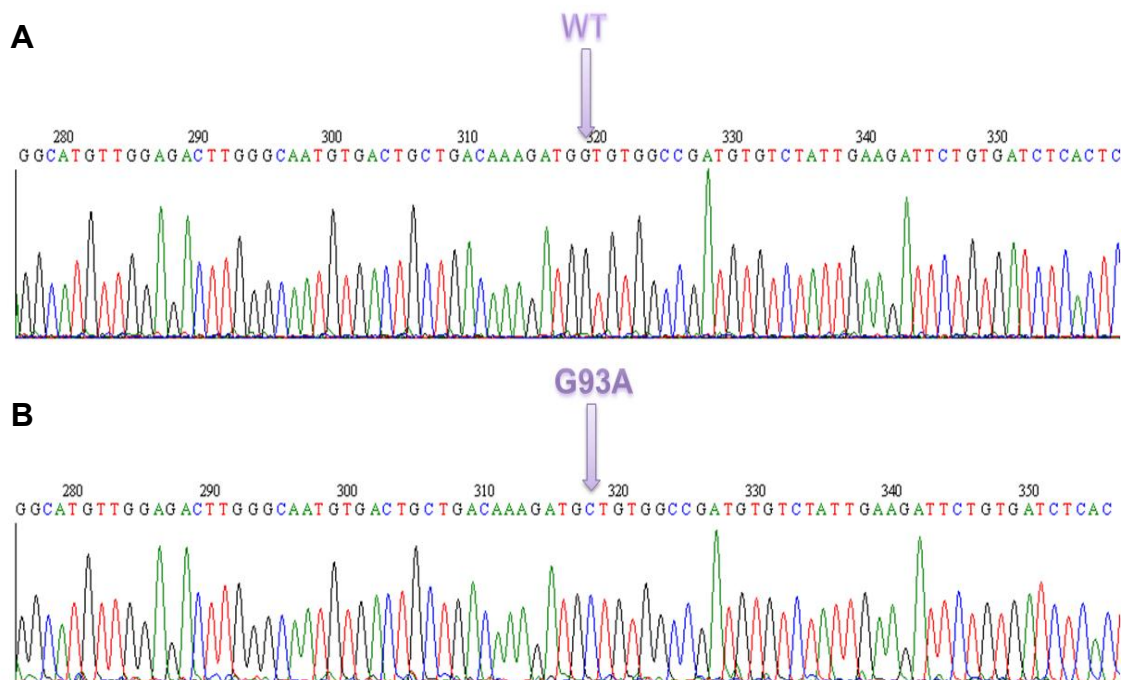


Figura 10. A) Cromatograma de la secuencia codificante de la enzima Cu/Zn SOD humana clonada dentro del vector recombinante pET-3dSODWT. B) Cromatograma de la secuencia codificante de la mutación G93A Cu/Zn SOD humana clonada dentro del vector recombinante pET-3dSODG93A.

8.3 Diseño de cebadores para mutagénesis.

Con el fin de lograr expresar las proteínas Cu/Zn SOD salvaje y G93A fusionadas a un 6xHis-Tag, se decidió insertar dicho *tag* dentro de los vectores pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A mediante mutagénesis, como alternativa al subclonado dentro del vector pQE-30.

Se diseñaron cebadores para mutagénesis de tal manera que sean adicionados seis residuos de histidina (6xHis) en el extremo N-terminal de las secuencias codificantes de las proteínas Cu/Zn SOD salvaje y G93A.

Puesto el interés en que el 6xHis-Tag sea adicionado en el extremo N-terminal de las proteínas recombinantes Cu/Zn SOD salvaje y G93A, se diseñó el cebador *forward* de manera que los seis codones CAC correspondientes a los seis residuos de histidina se encuentren contiguos al codón de inicio de la traducción (ATG), como se muestra en la **figura 11**.



Figura 11. Alineamiento del cebador de mutagénesis y los plásmidos recombinantes pET-3dSOD humana salvaje y G93A.

Para el diseño de los mismos fueron consideradas las características recomendadas por el manual de instrucciones de *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), las cuales están descritas en materiales y métodos.

Es así que las secuencias de los cebadores resultantes son las siguientes:

- *Forward:*

5'GGAGATATACCATGCACCACCACCACCACGCGACGAAGGCCG 3'

- *Reverse:*

5'CGGCCTTCGTGCGGTGGTGGTGGTGGTGCATGGTATATCTCC 3'

Se puede observar que dichos cebadores poseen una longitud de 45 pb y un %GC de 62.2, con lo cual obtenemos una T_m teórica de 82°C.

Por lo tanto podemos concluir que el diseño de los cebadores es correcto ya que los mismos cumplen con las características recomendadas por el proveedor.

8.4 Expresión y fraccionamiento soluble e insolubles de la Cu/Zn SOD humana recombinante (salvaje y G93A).

Una vez confirmada la presencia de la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD salvaje y G93A dentro de los vectores pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A respectivamente, se transformaron células *E.coli BL21 (DE3) Star* para llevar a cabo la expresión de las mismas.

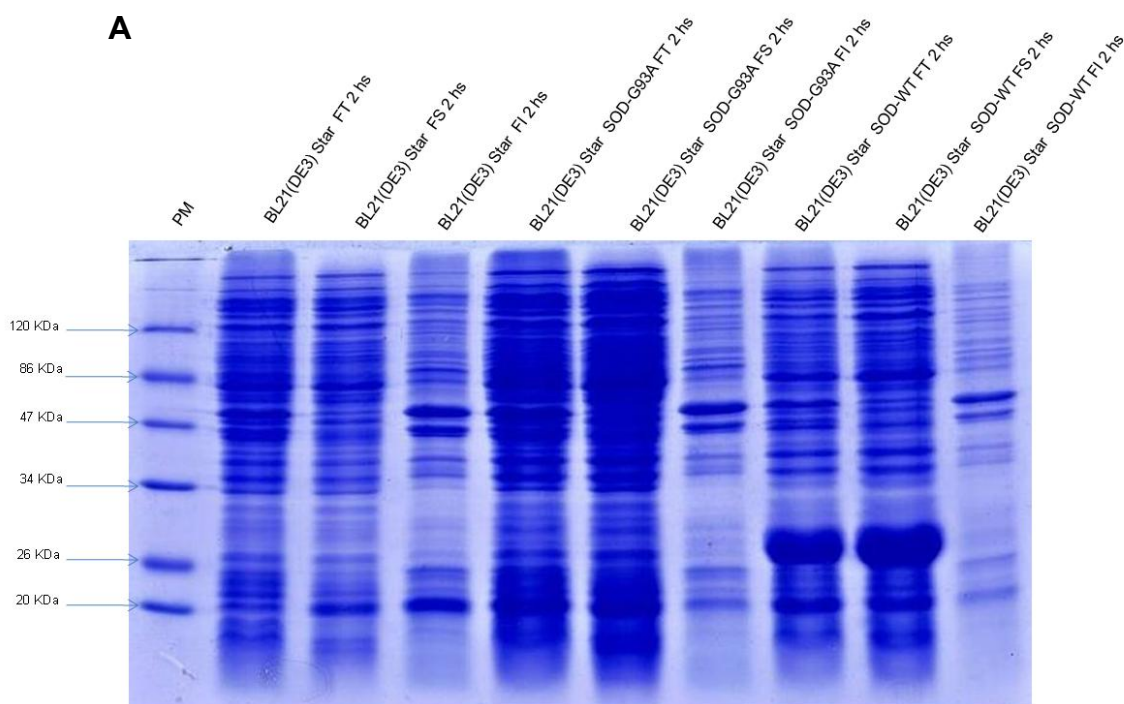
Dichas expresiones se realizaron con el objetivo de ver la distribución entre la fracción proteica soluble e insoluble de la Cu/Zn SOD salvaje y de la mutación G93A.

La expresión se realizó como fue descrita en materiales y métodos. Los matraces de 50 mL de LB-Ampicilina fueron inoculados con un precultivo de dichas células y una vez que alcanzaron una DO_{600nm} de 06-08 se indujo la expresión de Cu/Zn SOD salvaje y G93A con 1mM de IPTG. Se colectaron muestras antes de la inducción de la expresión (tiempo cero), así como después de una hora y dos horas de comenzada la inducción. Luego las muestras tomadas fueron separadas en fracción soluble e insoluble. Para ello se partió de un volumen de medio de cultivo con una cantidad de células equivalente a una $DO_{600nm} = 9$ y se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos. Una vez separada la fracción soluble, la fracción insoluble fue resuspendida en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0, en un volumen equivalente al recuperado en la fracción soluble.

Los resultados de dichas expresiones y fraccionamientos se muestran en la **figura 12**. La enzima Cu/Zn SOD humana tiene un peso molecular de 16 kDa en su forma monomérica. Sin embargo como se muestra en la figura 10, dicha proteína migra en un SDS-PAGE como si tuviese un peso molecular aparente de 26 kDa aproximadamente. En trabajos previos ya se ha descrito que la Cu/Zn SOD migra como si tuviese un peso molecular aparente de 20 kDa. Esto

se ha adjudicado a la reducción del puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas C57 y C146 (Jonsson, Graffmo et al. 2006).

En las **figuras 12 A-B**, la comparación de las fracciones totales de Cu/Zn SOD humana salvaje y G93A muestra que la expresión de Cu/Zn SOD humana salvaje es mayor con respecto a la mutación G93A. Además dichas figuras muestran que la Cu/Zn SOD humana salvaje se encuentra en la fracción soluble, mientras que la G93A se encuentra repartida entre las fracciones soluble e insoluble. Por lo tanto podemos justificar la mayor cantidad de proteína recombinante salvaje mostrada en la **figura 12 A-B** de dos maneras. Una opción es que la expresión de la mutación G93A resulta toxica para *E.coli*. La otra opción es que las condiciones desnaturalizantes del SDS-PAGE no fueron lo suficientemente rigurosas como para destruir las interacciones hidrofóbicas de los cuerpos de inclusión formados por agregados de Cu/Zn SOD G93A humana, por lo cual estarían migrando distancias menores correspondientes a un peso molecular mayor. Para comprobar esta última hipótesis deberíamos realizar un nuevo SDS-PAGE con condiciones desnaturalizantes más rigurosas, otra alternativa es la realización de western blot.



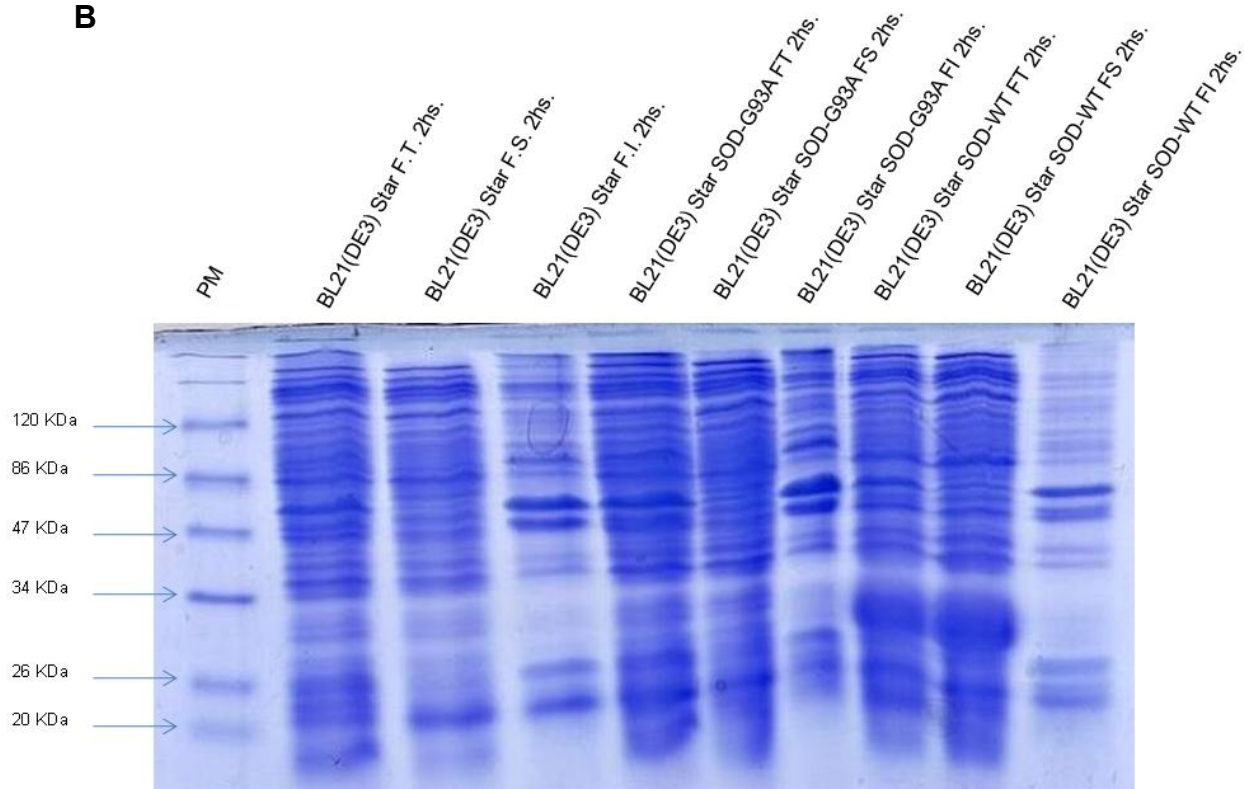
B

Figura12. SDS-PAGE (**A** 15% y **B** 12%) del fraccionamiento soluble e insoluble de la expresión a 30° C de la enzima Cu/Zn SOD salvaje y la mutación G93A en la cepa *E.coli* BL21 (DE3) Star. PM: marcador de peso molecular proteínas sin teñir (Fermentas).

9 Conclusiones.

Uno de los objetivos específicos definido para este trabajo fue insertar un *tag* de histidinas (6xHis-*Tag*) en el extremo N-terminal de la secuencia codificante de la enzima Cu/Zn SOD humana salvaje y G93A, con el fin de poder aislar la proteína entera y péptidos intermedios discretos generados durante la biosíntesis de dichas proteínas en la cepa de *E.coli BL21(DE3)Star*.

Por ello en un primer abordaje, se decidió subclonar la secuencia codificante de la Cu/Zn SOD salvaje y G93A dentro del vector de expresión pQE-30, lo cual permitiría adicionar el 6xHis-*Tag* en la posición deseada.

Pese a realizar eficientemente las digestiones simples de los plásmidos recombinantes pGEM-SODWT y pGEM-SODG93A con las enzimas escogidas en distintos buffer, no se consiguió realizar la doble digestión completa.

Debido a las dificultades encontradas para llevar a cabo el subclonado en un tiempo razonable, como alternativa nos planteamos la inserción del 6xHis-*Tag*, dentro de los vectores de expresión pET-3dSOD, en el extremo N-terminal de ambas proteínas por medio de una mutagénesis dirigida. Para ello diseñamos *primers* de mutagénesis teniendo en cuenta las características recomendadas por el proveedor del Kit (*QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*, Stratagene).

También se obtuvieron resultados que serán de utilidad para la realización de futuros estudios. Dentro de estos cabe destacar el nivel de expresión de proteína Cu/Zn SOD salvaje mayor con respecto a los niveles obtenidos para la mutación G93A. Además se logró obtener una estimación de la distribución de ambas proteínas entre las fracciones solubles e insolubles. Se mostró que la proteína Cu/Zn SOD salvaje permanece en la fracción soluble después de dos horas de expresión a 30 °C, mientras que la mutación Cu/Zn SOD G93A se encuentra repartida entre ambas fracciones, soluble e insoluble, para las mismas condiciones de expresión y fraccionamiento proteico.

Esto será tenido en cuenta para el diseño futuro de experimentos que apunten a la optimización de la expresión de la proteína recombinante Cu/Zn SOD G93A de forma tal que la misma sea recuperada en la fracción soluble. Una posible alternativa para lograr esto, es realizar la expresión a temperaturas menores a la utilizada hasta lograr optimizar las condiciones de manera tal que la proteína recombinante sea soluble.

Por otro lado queda pendiente realizar la mutagénesis dirigida sobre los plásmidos recombinantes pET-3dSODWT y pET-3dSODG93A, de la cual esperamos obtener como resultado la inserción de un 6xHis-*Tag* en el extremo N-terminal de la secuencia codificante de las proteínas Cu/Zn SOD salvaje y G93A que se encuentran en los mencionados plásmidos recombinantes. Esto permitirá cumplir con las perspectivas a corto plazo de optimizar la expresión y la purificación de las proteínas recombinantes Cu/Zn SOD salvaje y G93A, así como sus correspondientes intermediarios de traducción.

Una vez optimizadas las condiciones de expresión y purificación podremos aislar para su estudio péptidos intermedios generados durante la biosíntesis, y evaluar la relación de los mismos con respecto al uso de codones. Esto permitirá realizar estudios enfocados a dilucidar como influye la cinética traduccional en el plegamiento *in vivo* de la enzima Cu/Zn SOD humana.

10 Anexos.

Medios de cultivo

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

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

Suplementos

Ampicilina: Se prepara una solución inicial 100 mg/mL.

Bromuro de etidio (EtBr): Se prepara una solución inicial 10 mg/mL.

Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG): Se prepara una solución inicial de 100mM.

Soluciones

Azul de carga 6x para ADN: 0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol.

Azul de Coomasie: 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% EtOH, 10% ácido acético.

Buffer Tris-acetato (TAE) 50x para corrida en geles de agarosa: 242g de Tris base, 57.1mL de ácido acético glacial y 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8 por litro.

Buffer de corrida SDS-PAGE 5x: 15.1g de Tris base, 94g de glicina pH 8.3 y 50ml de SDS 1% por litro.

Buffer de muestra para SDS-PAGE 4x: 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 400mM DTT, 8% SDS, 0.4% de azul de bromofenol y 40% de glicerol.

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

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

Solución II: NaOH 0,2 M y SDS 1%.

Solución III: Ácido acético glacial (5,75 mL), Acetato de potasio 5M pH5.2 (30mL) y H₂O (14,25mL).

11 Bibliografía.

- Ahl, I. M., M. J. Lindberg, et al. (2004). "Coexpression of yeast copper chaperone (yCCS) and CuZn-superoxide dismutases in *Escherichia coli* yields protein with high copper contents." *Protein Expr Purif* **37**(2): 311-319.
- Alvarez, B., V. Demicheli, et al. (2004). "Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical." *Free Radic Biol Med* **37**(6): 813-822.
- Andersen, P. M. (2006). "Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene." *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**(1): 37-46.
- Angov, E., C. J. Hillier, et al. (2008). "Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host." *PLoS One* **3**(5): e2189.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (2007). "Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: a possible general mechanism for familial ALS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(27): 11263-11267.
- Bruijn, L. I., T. M. Miller, et al. (2004). "Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS." *Annu Rev Neurosci* **27**: 723-749.
- Cleveland, D. W. and J. Liu (2000). "Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS?" *Nat Med* **6**(12): 1320-1321.
- Chiu, A. Y., P. Zhai, et al. (1995). "Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *Mol Cell Neurosci* **6**(4): 349-362.
- Dion, P. A., H. Daoud, et al. (2009). "Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms." *Nat Rev Genet* **10**(11): 769-782.
- Dong, H., L. Nilsson, et al. (1996). "Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates." *J Mol Biol* **260**(5): 649-663.
- Elam, J. S., A. B. Taylor, et al. (2003). "Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS." *Nat Struct Biol* **10**(6): 461-467.
- Estevez, A. G., J. P. Crow, et al. (1999). "Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase." *Science* **286**(5449): 2498-2500.
- Furukawa, Y., K. Kaneko, et al. (2010). "Mutation-dependent polymorphism of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis." *J Biol Chem* **285**(29): 22221-22231.
- Graslund, S., P. Nordlund, et al. (2008). "Protein production and purification." *Nat Methods* **5**(2): 135-146.
- Gurney, M. E., H. Pu, et al. (1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." *Science* **264**(5166): 1772-1775.
- Hartman, J. R., T. Geller, et al. (1986). "High-level expression of enzymatically active human Cu/Zn superoxide dismutase in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(19): 7142-7146.

- Ince, P. G., J. Lowe, et al. (1998). "Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology." Neuropathol Appl Neurobiol **24**(2): 104-117.
- Jackson, M., R. Ganel, et al. (2002). "Models of amyotrophic lateral sclerosis." Curr Protoc Neurosci **Chapter 9**: Unit 9 13.
- Jana, S. and J. K. Deb (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli." Appl Microbiol Biotechnol **67**(3): 289-298.
- Johnston, J. A., M. J. Dalton, et al. (2000). "Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12571-12576.
- Jonsson, P. A., K. S. Graffmo, et al. (2006). "Disulphide-reduced superoxide dismutase-1 in CNS of transgenic amyotrophic lateral sclerosis models." Brain **129**(Pt 2): 451-464.
- Kanaya, S., Y. Yamada, et al. (1999). "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 **238**(1): 143-155.
- Leinweber, B., E. Barofsky, et al. (2004). "Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in Escherichia coli." Free Radic Biol Med **36**(7): 911-918.
- Lindberg, M. J., J. Normark, et al. (2004). "Folding of human superoxide dismutase: disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(45): 15893-15898.
- Liu, H., H. Zhu, et al. (2000). "Copper(2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant." Biochemistry **39**(28): 8125-8132.
- Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli." Microbiol Rev **60**(3): 512-538.
- Marin, M. (2008). "Folding at the rhythm of the rare codon beat." Biotechnol J **3**(8): 1047-1057.
- Nordlund, A., L. Leinartaitė, et al. (2009). "Functional features cause misfolding of the ALS-provoking enzyme SOD1." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(24): 9667-9672.
- Nordlund, A. and M. Oliveberg (2008). "SOD1-associated ALS: a promising system for elucidating the origin of protein-misfolding disease." HFSP J **2**(6): 354-364.
- Ripps, M. E., G. W. Huntley, et al. (1995). "Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 689-693.
- Rosano, G. L. and E. A. Ceccarelli (2009). "Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain." Microb Cell Fact **8**: 41.
- Rosen, D. R. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **364**(6435): 362.
- Rosen, D. R., T. Siddique, et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." Nature **362**(6415): 59-62.

- Sahdev, S., S. K. Khattar, et al. (2008). "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies." Mol Cell Biochem **307**(1-2): 249-264.
- Sorensen, H. P. and K. K. Mortensen (2005). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*." J Biotechnol **115**(2): 113-128.
- Tainer, J. A., E. D. Getzoff, et al. (1982). "Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase." J Mol Biol **160**(2): 181-217.
- Valentine, J. S. (2002). "Do oxidatively modified proteins cause ALS?" Free Radic Biol Med **33**(10): 1314-1320.
- Yamakura, F. and K. Suzuki (1980). "Cadmium, chromium, and manganese replacement for iron in iron-superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*." J Biochem **88**(1): 191-196.
- Yin, J., G. Li, et al. (2007). "Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes." J Biotechnol **127**(3): 335-347.
- Yu, P. (2007). "Enhancing survival of *Escherichia coli* by increasing the periplasmic expression of Cu,Zn superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*." Appl Microbiol Biotechnol **76**(4): 867-871.