



**INFORME PERIODO. 2012/2013.**

**1. APELLIDO Rodríguez**

Nombre(s) Silvia Susana

Título(s) Bioquímica

Dirección Electrónica silsrodriguez@yahoo.com.ar

**2. OTROS DATOS**

INGRESO: Categoría. Asistente Mes Mayo Año 2012

ACTUAL: Categoría. . Asistente Mes Agosto Año 2013

**3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA**

a) Optimización de protocolos de biología molecular para el estudio de la regulación de canales de calcio activados por voltaje a través de receptores acoplados a proteína G.

b) Estudio de la farmacología y la regulación de subtipos de canales de calcio tipo L neuronales (CaV1.2 y CaV1.3) PICT 2010-1589

c) Rol de los canales de calcio operados por voltaje neuronales en la acción de Ghrelina sobre la producción y liberación de NPY. PICT 2011-1816.

**4. DIRECTOR**

Apellido y Nombre (s) Raingo Jesica

Cargo Institución Investigador Adjunto- CONICET

Dirección: Calle 526 y Camino General Belgrano (entre 10 y 11) Ciudad La Plata

C. P B1900BTE Prov. Buenos Aires Tel. (0221) 421-0112

Dirección Electrónica jraingo@imbice.org.ar

**5. LUGAR DE TRABAJO**

Institución .Instituto.Multidisciplinario.de.Biología.Celular. (IMBICE)

Dependencia CIC - CONICET

Dirección: Calle 526 y Camino General Belgrano (entre 10 y 11) Ciudad La Plata

C. P B1900BTE Prov. Buenos Aires Tel. (0221) 421-0112

**6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS**

Nombre Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Dependencia Cátedra de Genética

Dirección: Calle 60 y 120

Ciudad La Plata C. P 1900 Prov. Buenos Aires Tel

Cargo que ocupa....Ayudante diplomado rentado con dedicación simple.....

# INDICE

INDICE.....	- 1 -
7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO .....	- 2 -
7.1. - ACTIVIDAD DESARROLLADA.....	- 2 -
7.2. TÉCNICAS EMPLEADAS. ....	- 2 -
7.2.1 CULTIVOS CELULARES.....	- 2 -
7.2.2 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	- 2 -
7.2.3 DIGESTIÓN DE ADN PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER).....	- 3 -
7.2.4 ELECTROFORESIS SUMERGIDA EN GELES DE AGAROSA. ....	- 3 -
7.2.5 ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GELES DE AGAROSA. ....	- 3 -
7.2.6 EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLVENTES ORGÁNICOS A PARTIR DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN.....	- 3 -
7.2.7 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	- 3 -
7.2.8 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	- 3 -
7.2.9 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	- 3 -
7.2.10 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CON ADN PLASMÍDICO.....	- 4 -
7.2.11 FIJACIÓN DE CÉLULAS. ....	- 4 -
7.2.12 MICROSCOPIA Y CAPTURA DIGITAL.....	- 4 -
8. OTRAS ACTIVIDADES .....	- 4 -
8.1. PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. ....	- 4 -
8.2. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. ....	- 4 -
8.3. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. ...	- 4 -
9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.....	- 5 -
10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. ....	- 5 -
ANEXO SOLUCIONES .....	- 6 -
ANEXO IMÁGENES.....	- 7 -
ANEXO CERTIFICADOS .....	- 9 -
ANEXO ABSTRACTS .....	10

## **7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO**

### **7.1. - ACTIVIDAD DESARROLLADA**

En el periodo que corresponde a este informe he llevado a cabo en el Laboratorio de Electrofisiología del IMBICE, con la dirección de la Dra. Jesica Raingo las tareas que se detallan a continuación:

- Cultivo de las líneas celulares HEK293 y HEK293T, utilizadas en experimentos de co-transfección con plásmidos que expresan diferentes canales de Calcio operados por voltaje (CaV) y receptores acoplados a proteína G, en los que se miden las corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ), con la finalidad de estudiar la modulación de estos canales por los receptores.
- Optimización del protocolo de preparación de bacterias competentes.
- Extracción de ADN plasmídico a partir de papel de filtro y posterior transformación de bacterias competentes con el mismo para su posterior amplificación.
- Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico.
- Extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas, medición de la concentración y pureza de los mismos mediante la lectura de absorbancia a diferentes longitudes de onda en un espectrofotómetro.
- Chequeo de la identidad de los plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción y corridas electroforéticas en geles de agarosa.
- Verificación de la expresión de las proteínas codificadas por los plásmidos amplificados mediante transfección en líneas celulares, observación de las mismas en el microscopio de fluorescencia para aquellos que poseen un gen reportero.
- Puesta a punto de protocolos de clonación de fragmentos de ADN.
- Subclonación del receptor de ghrelina fusionado a la proteína fluorescente amarilla (GHSRIaYFP) y de un mutante del mismo (GHSRIaA204EYFP) dentro de un plásmido de transferencia lentiviral (FUGW), amplificación, purificación y verificación de la expresión (Anexo Imágenes Figura 1).
- Elaboración de un proyecto para la implementación de la generación de vectores lentivirales, incluyendo el dictado de una conferencia a toda la comunidad del IMBICE
- Capacitación en el trabajo de laboratorio de los estudiantes, pasantes y tesisistas que ingresan al laboratorio, incluyendo la guía en la preparación de planes de trabajo, redacción de informes y confección de posters científicos
- Manejo de toda la documentación relacionada a compras de insumos y organización del laboratorio (almacenamiento de drogas, organización de clones, carpetas de protocolos, etc).

### **7.2. TÉCNICAS EMPLEADAS.**

#### **7.2.1 CULTIVOS CELULARES.**

Las células son cultivadas rutinariamente en botellas de 25 cm<sup>2</sup> de superficie en Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Las botellas se mantienen en una estufa de cultivo a 37°C, en atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Los subcultivos se realizan en placas de 9,2 cm<sup>2</sup> de superficie. Para ello se retira el medio de cultivo de las botellas, se agregara 3 ml de solución cítrico salina y se procede a observar las células en un microscopio invertido. Una vez despegadas, se disgregan mecánicamente por pipeteo y se transfieren 0,5 ml de la suspensión celular a cada placa que contiene 1,5 ml de medio completo. Las placas son incubadas en iguales condiciones a las descriptas para las botellas.

#### **7.2.2 PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES.**

Con un anza estéril se hace una estría con E. coli JM109 o DH5α en un placa de medio Luria-Bertani (LB)-agar (1,5%) sin antibiótico. Se incuba durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente se pica una colonia que esté bien aislada de 2 a 3 mm de diámetro en 10 ml de medio LB, en un tubo estéril de 50ml, sin antibiótico. Se incuba a 37°C con agitación, hasta la tarde (≈ 18hs). Se inoculan 3 elermeyer que contienen 100 ml de LB con 4; 1,6 y 0,8 ml del cultivo. Se incuba a 18-22°C (temperatura ambiente en invierno). A la mañana siguiente se mide la DO<sub>600</sub> de los tres frascos y se sigue incubando hasta que alguno llegue a DO<sub>600</sub> ≈ 0,55. El frasco que llega primero a esta DO se incuba en hielo durante 10 min.

Se centrifuga el cultivo en tubos estériles de 50 ml, a 4.000 rpm por 10 min. Se descarta el sobrenadante, se invierte el tubo sobre un papel durante 2 min o hasta que el medio drene completamente. Las bacterias cosechadas se re-suspenden en 32 ml de solución de competencia pre-enfriada en hielo. Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descarta y se invierte el tubo sobre un papel durante 2 min o hasta que el medio drene completamente. Las bacterias se re-suspenden en 8ml de solución de competencia enfriada en hielo y se adicionan 0,64 ml de dimetilsulfoxido, se mezcla y se deja en hielo por 10 min. La suspensión de bacterias se alcuota de a 200 µl en tubos de 1,5 ml estériles previamente enfriados en hielo, inmediatamente se colocan en una gradilla y se congelan a -70°C.

Las bacterias son transformadas con 100 ng de un plásmido circular, se plaquean 2 cajas de Petri con medio LB-agar y con el antibiótico correspondiente al plásmido utilizado, con 20 y 200 µl respectivamente de la suspensión de bacterias. Se incuban durante la noche a 37°C, se cuentan la cantidad de colonias que aparecen y se calcula la eficiencia de transformación como unidades formadoras de colonias (UFC) por µg de ADN. Se realiza un control de esterilidad con placas sin el agregado de plásmido.

#### **7.2.3 DISEÑO DE ESTRATEGIAS DE CLONACIÓN.**

Para diseñar las estrategias de clonación se utiliza el programa Clone Manager Professional Suite, versión 8-2005 (Sci-Ed Software. Cary, NC, EEUU). En el periodo informado se realizó la subclonación de GHSR1aYFP salvaje y mutado desde un plásmido de expresión eucariota a un plásmido de transferencia lentiviral.

#### **7.2.4 DIGESTIÓN DE ADN PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER).**

El ADN plasmídico se digiere con las ER correspondientes para su identificación siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega o Fermentas) la reacción enzimática se lleva a cabo en un tubo de 0,5 ml conteniendo típicamente: 0,2 µg de ADN plasmídico, 1 µl del buffer de reacción (10X) adecuado, 1 a 2 unidades (U) de la ER y agua miliQ (c.s.p 10 µl). La mezcla de reacción se incuba a la temperatura óptima de la ER utilizada durante una hora. Se corrobora la digestión realizando una corrida electroforética en un gel de agarosa sembrado con la mezcla del ADN plasmídico digerido.

#### **7.2.5 ELECTROFORESIS SUMERGIDA EN GELES DE AGAROSA.**

La separación de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con ER se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8-1%) al que se le adiciona el volumen correspondiente de GelRed 10.000X (Biotium, 3159 Corporate Place Hayward, CA 94545) para visualizar el ADN. A las muestras se les adiciona la cantidad correspondiente de buffer de siembra para ADN 6X y se siembran en paralelo con estándares de peso molecular de ADN comerciales. En todos los casos el buffer de corrida fue TAE 1X. La corrida electroforética se realizó en cubas de electroforesis sumergidas, a aproximadamente 10 V/cm durante el tiempo requerido para la correcta separación de los fragmentos. Las bandas de ADN se observa a través de un transiluminador UV, se fotografiaron utilizando una cámara digital (Gel Doc™ XR, BioRad).

#### **7.2.6 ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GELES DE AGAROSA.**

Para utilizar los fragmentos obtenidos por digestión con ER en una reacción de ligación, el gel se prepara utilizando una agarosa de bajo punto de fusión (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU), la corrida electroforética se realiza bajo las mismas condiciones detalladas en el punto anterior, pero manteniendo la temperatura de la cuba electroforética por debajo de los 10 °C para evitar deformaciones debidas a la generación de calor por el paso de la corriente eléctrica.

Una vez individualizadas, las bandas de interés se cortan y se transfieren a tubos cónicos de 1,5 ml para la posterior extracción con solventes orgánicos.

#### **7.2.7 EXTRACCIÓN DE ADN CON SOLVENTES ORGÁNICOS A PARTIR DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN.**

A las porciones de agarosa que contienen los fragmentos de ADN de interés se les adicionan 3 volúmenes de buffer TE y el tubo se calienta a 65 °C durante 10 min. Una vez que el gel de agarosa se funde se le agrega un volumen de fenol equilibrado con 10 mM Tris HCl, pH 8 y, luego de una agitación vigorosa, se centrifuga a 10.000 x g durante 10 min. a 4 °C. La fase acuosa se transfiere a otro tubo limpio repitiendo la operación anterior con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) equilibrado con 10 mM Tris HCl, pH 8 y luego con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). El ADN de la última fase acuosa se precipita por medio del agregado de 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol al 95% (v/v). Se incuba a -20°C durante una hora y se centrifuga a 15.000 x g durante 15 min. a 4 °C. El pellet de ADN se lava con etanol 70 % (v/v), se seca y se re-suspende en un volumen adecuado de buffer TE.

#### **7.2.8 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.**

El ADN extraído del gel de agarosa se liga con T4 DNA ligasa. La reacción enzimática se lleva a cabo en un tubo de 0,2 ml conteniendo típicamente: 200 ng de ADN, con una relación inserto/vector 3:1 (mol: mol), 2 µl buffer ligasa (10X), 1 U de enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) y agua libre de nucleasas (c.s.p 20 µl.). La incubación se realiza a 22 °C durante 10 min. o durante una hora dependiendo del tipo de extremo que presente el ADN que se desea ligar.

#### **7.2.9 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.**

Se adicionan aproximadamente 100 ng del ADN transformante o 10 µl de la reacción de ligación a 200 µl del stock de bacterias competentes, manteniéndolos en hielo durante 30 minutos. El tubo se transfiere a un baño de agua a 42 °C para realizar un shock térmico de 45 segundos de duración, rápidamente se lo coloca en hielo, se incuba durante 10 minutos y luego se agregan 800 µl de LB y se incuba 1 h a 37 °C. Posteriormente, las bacterias se siembran en placas con LB agar, suplementado con el antibiótico (ATB) de selección a la concentración correspondiente y se incuban a 37 °C durante toda la noche.

#### **7.2.10 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.**

Se toma una colonia y se inoculan 5 ml de LB suplementado con el ATB de selección que posea el plásmido. Se incuba a 37°C por 8 hs aproximadamente con agitación vigorosa (300 rpm aprox.). A 200 ml de LB con ATB se agregan 0,5 ml del cultivo y se incuba a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa. Las bacterias se cosechan por centrifugación a 6000 g, 4 °C durante 15 min. El sedimento bacteriano se re-suspende en 6 ml de buffer P1 y luego se añaden 6 ml de buffer P2, se mezcla bien por inversión (4-6 veces). Posteriormente se adicionan 6 ml de buffer P3 frío y se mezcla inmediatamente por inversión (4-6 veces), se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. y filtra. El filtrado que contiene el ADN plasmídico se siembra en una columna QIAGEN-tip 100 previamente equilibrada con 4 ml de buffer QBT. Se deja fluir por acción de la gravedad (el ADN se fija a la resina). Se lava la columna dos veces con 10 ml de buffer QC y posteriormente el ADN se eluye con 5 ml de buffer QF. El ADN eluido se precipita mediante la adición de 3,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcla y se centrifuga a 15.000 g durante 30 min. a 4 °C, el sobrenadante

se descarta cuidadosamente para no perturbar el ADN precipitado y se lava con 2 ml de etanol 70%, se centrifuga a 15.000 g durante 10 min. El sobrenadante se descarta y el precipitado se deja secar durante 5-10 min., y finalmente se re-suspende en la cantidad adecuada agua miliQ (200 µl aproximadamente).

#### **7.2.11 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CON ADN PLASMÍDICO.**

Para la transfección transitoria de las distintas construcciones se utilizan liposomas catiónicos comerciales (Lipofectamine 2000, Invitrogen), el ADN de interés y células HEK293 o HEK293T (dependiendo del promotor que controla la expresión del gen de interés) crecidas al ~80-90% de confluencia en placas de cultivo de 9,2 mm<sup>2</sup> de superficie. Se utiliza una mezcla de transfección con una relación 3,5 µg de ADN: 7 µl de lipofectamina2000, preparada de la siguiente manera:

Tubo 1: 3,5 µg de ADN + 100 µl de DMEM sin FBS ni antibiótico/antimicótico.

Tubo 2: 7 µl de lipofectamina2000+ 97 µl de DMEM sin SFB ni antibiótico/antimicótico.

Cada tubo se incuba por separado a temperatura ambiente durante 5 min.

Luego, se mezcla el contenido de ambos tubos, y se incuba a temperatura ambiente por 20 min. Durante ese tiempo se lavan las monocapas de células tres veces con 1 ml DMEM sin FBS ni antibiótico/antimicótico cada vez, para asegurar la eliminación completa de suero y/o antibiótico/antimicótico. Luego de los 20 minutos, se agrega la totalidad de la mezcla de transfección a la placa de células, se adiciona 2,3 ml de DMEM y se incuba a 37°C durante 4 hs. Pasadas ese tiempo se descarta el medio con la mezcla de transfección, se lo reemplaza por 2,5 ml de DMEM 10% FBS y se incuban las células durante 24 hs.

Si las células son utilizadas para evaluación de la expresión mediante microscopía de fluorescencia, estas son crecidas sobre un vidrio que se coloca dentro de la placa, luego de todo el proceso las células son fijadas, el vidrio se retira de la caja y se monta sobre un portaobjetos para su posterior observación.

#### **7.2.12 FIJACIÓN DE CÉLULAS.**

El medio se descarta y se procede a realizar tres lavados con 2 ml de PBS 1X de 5 min., se descarta el líquido de lavado, se agregan 2 ml de paraformaldehído (PFA) 4% por 20 min., se retira el PFA y se realizan tres lavados con 2 ml de PBS 1X de 5 min. Sobre el porta se coloca una gota de solución de montaje (SM) y sobre la misma se coloca el vidrio con las células fijadas haciendo contacto con la SM, se sella con esmalte, se deja secar.

#### **7.2.13 MICROSCOPIA Y CAPTURA DIGITAL.**

Los vidrios fijados se observan en un microscopio Nikon (Nikon Corporation Japan) con lentes múltiples neofluar-PH y óptica de campo claro, las imágenes se capturaron con una cámara fotográfica digital Nikon Digital Sight D5-U3 y software NIS-Elements, Versión 3.22.

### **8. OTRAS ACTIVIDADES**

#### **8.1. PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.**

*Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.*

#### **8.2. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.**

##### **8.2.1.** Curso: " Modelo cinético en el estudio de canales iónicos"

Curso de Postgrado. Grupo de Investigación en Fisiología Vascul ar (GINFIV). Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata.

Institución de Acreditación: Facultad de Ciencia Exactas, UNLP.

Carga horaria: 16 hs

Lugar y fecha: La Plata, 6 y 7 de diciembre de 2012

##### **8.2.2.** Curso: "Sculpting the Architecture and Physiology of the Brain: Hormones have a lot to Say!"

Curso de Postgrado.

Carga horaria: 25 hs

Institución de Acreditación: Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias.

Lugar y fecha: Huerta Grande, Córdoba, 1 y 2 de Octubre de 2012

#### **8.3. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES.**

**8.3.1.** Perello M, Cabral A, Valdivia S, Reynaldo M, Patrone A, Castrogiovanni D, Lopez Soto EJ, Agosti F, **Rodríguez SS**, Raingo J. STUDY OF MECHANISMS MEDIATING GHRELIN-INDUCED ACTIVATION OF HYPOPHYSIOTROPIC CRF NEURONS. Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight. Fairmont Banff Springs - Banff, Alberta, Canada, 17 – 22 de Marzo de 2013. Abstract publicado en el libro de resúmenes de Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight.; Pág. 75. No asistí, el primer autor presento el poster.

**8.3.2.** Lopez Soto EJ, Agosti F, Isassa MF, **Rodríguez SS**, Perello M, Raingo J. PRESYNAPTIC CALCIUM CHANNELS REGULATION BY THE GHRELIN RECEPTOR (GHSR1a) ACTIVITY. I F.A.L.A.N. Congress National Congress of Physiological Sciences and Neuroscience and Neurobiology of Mexico, Cancún, Quintana Roo, Mexico. No asistí, el primer autor presento el poster.

**8.3.3.** Lopez Soto EJ, Agosti F, Isassa MF, **Rodríguez SS**, Perello M, Raingo J. PRESYNAPTIC

CALCIUM CHANNELS REGULATION BY THE GHRELIN RECEPTOR, GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE RECEPTOR TYPE 1a (GHSR1a) ACTIVITY. XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia. Huerta Grande, Córdoba, 1-5 de Octubre de 2012. Abstract publicado en el libro de resúmenes de la SAN; Pág. 68. Asistente.

**8.3.4.** Agosti F, López Soto EJ, **Rodríguez SS**, Perello M, Raingo J. MELANOCORTIN RECEPTOR TYPE 4 (MC4) DIFFERENTIALLY MODULATES NEURONAL VOLTAGE OPERATED CALCIUM CHANNELS (VOCCs) SUBTYPES". XXVII Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia. Huerta Grande, Córdoba, 1-5 de Octubre de 2012. Abstract publicado en el libro de resúmenes de la SAN; Pág. 43. Asistente.

**8.3.5.** Lopez Soto EJ, Agosti F, **Rodríguez SS**, Perello M, Raingo J. PRESYNAPTIC CALCIUM CHANNELS REGULATION BY THE GHRELIN RECEPTOR (GHSR1a) ACTIVITY V Special Conference of the International Society for Neurochemistry Special: "Synapses and dendritic spines in health and disease" International Society for Neurochemistry, Buenos Aires. Abstract publicado en Journal of Neurochemistry; Vol 122 (Supl. I); Pág. 7. No asistí, el primer autor presento el poster.

**8.3.6.** Agosti F, Lopez Soto E J, **Rodríguez SS**, Perello M, Raingo J. MODULATION OF NEURONAL VOLTAGE-OPERATED CALCIUM CHANNELS BY MELANOCORTIN RECEPTOR TYPE 4 (MC4R) V Special Conference of the International Society for Neurochemistry Special: "Synapses and dendritic spines in health and disease" International Society for Neurochemistry, Buenos Aires. Abstract publicado en Journal of Neurochemistry; Vol 122 (Supl. I); Pág. 32. No asistí, el primer autor presento el poster.

#### **9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.**

Durante el periodo informado he cumplido las tareas correspondientes al cargo de Ayudante diplomado rentado con dedicación simple en la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

#### **10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.**

**10.1.** Charla informativa al personal del IMBICE. "**Incorporación de nueva técnica en el sector de Cultivos del IMBICE: Generación de vectores lentivirales**" 4 de julio de 2013 Aula de Seminarios del IMBICE.

**10.2.** Codirectora de tesina de grado de la estudiante de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, Valentina Martinez Damonte.

## ANEXO SOLUCIONES

### Cítrico salina

10 g/l de KCl, 4,4 g/l de citrato de sodio

### Luria-Bertani (LB)

10 g/l Triptona; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl; pH 7

### LB agar

10 g/l Triptona; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl; 15 g/l agar agar; pH 7

### Buffer P1

50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa A

### Buffer P2

200 mM NaOH; 1% SDS (% p/v)

### Buffer P3

3 M Acetato de Potasio, pH 5.5

### Buffer QBT

750mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (% v/v); 0,15 % Triton® X-100 (%v/v)

### Buffer QC

1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (%v/v)

### Buffer QF

1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (%v/v)

### TAE 1X

40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA

### Buffer de siembra para ADN 6X

0,25% p/v azul de bromofenol; 0,25% p/v xileno cianol; 30% glicerol

### PBS 1X

8 g/l NaCl; 0.2 g/l KCl; 1.44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4.

### PFA 4%

40g/l paraformaldehido en PBS

### SM

10 mg/ml DABCO™; 5 µg/ml Hoechst 33342; 50 % glicerol (% v/v); 50% PBS 1X (% v/v)

### Tris-Cl 2M

Disolver 242,2 g de Tris base en 800 ml de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH con HCl concentrado.

pH	HCl
8.0	42 ml

Llevar a 1l de volume final con H<sub>2</sub>O.

### EDTA (0,5 M, pH 8.0)

Agregar 186,1 g de disodio EDTA.2H<sub>2</sub>O a 800 ml de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH (20 g de NaOH pellets). El disodio EDTA.2H<sub>2</sub>O no se disolvera hasta que el pH de la solución llegue a 8.0.

### Tris EDTA (TE) pH8.0:

10 mM Tris-Cl (pH 8.0); 0,1 mM EDTA (pH 8.0).

### 0,5 M PIPES (pH 6,7)

Disolver 15,1g de PIPES en 80 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril, ajustar el pH a 6,7 con 5M de KOH y llevar a un volumen final de 100ml. Alicuotar y guardar a -20C.

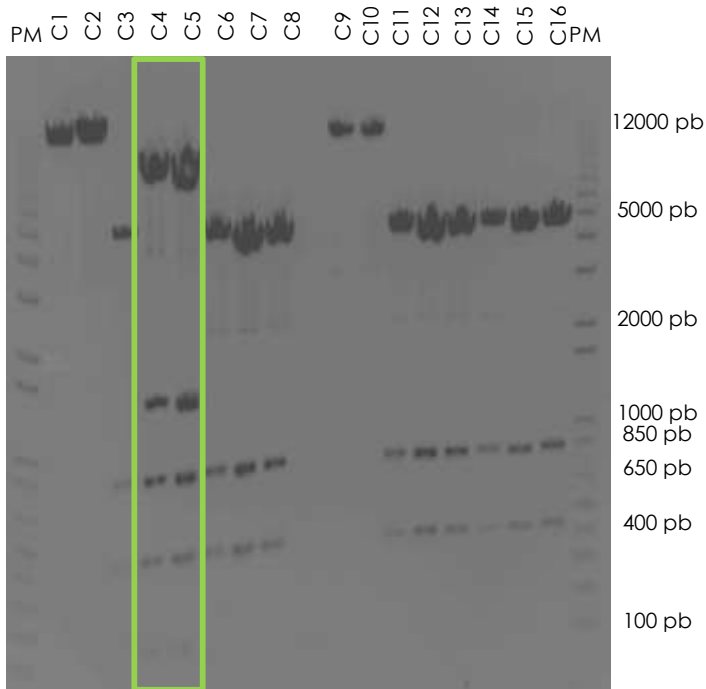
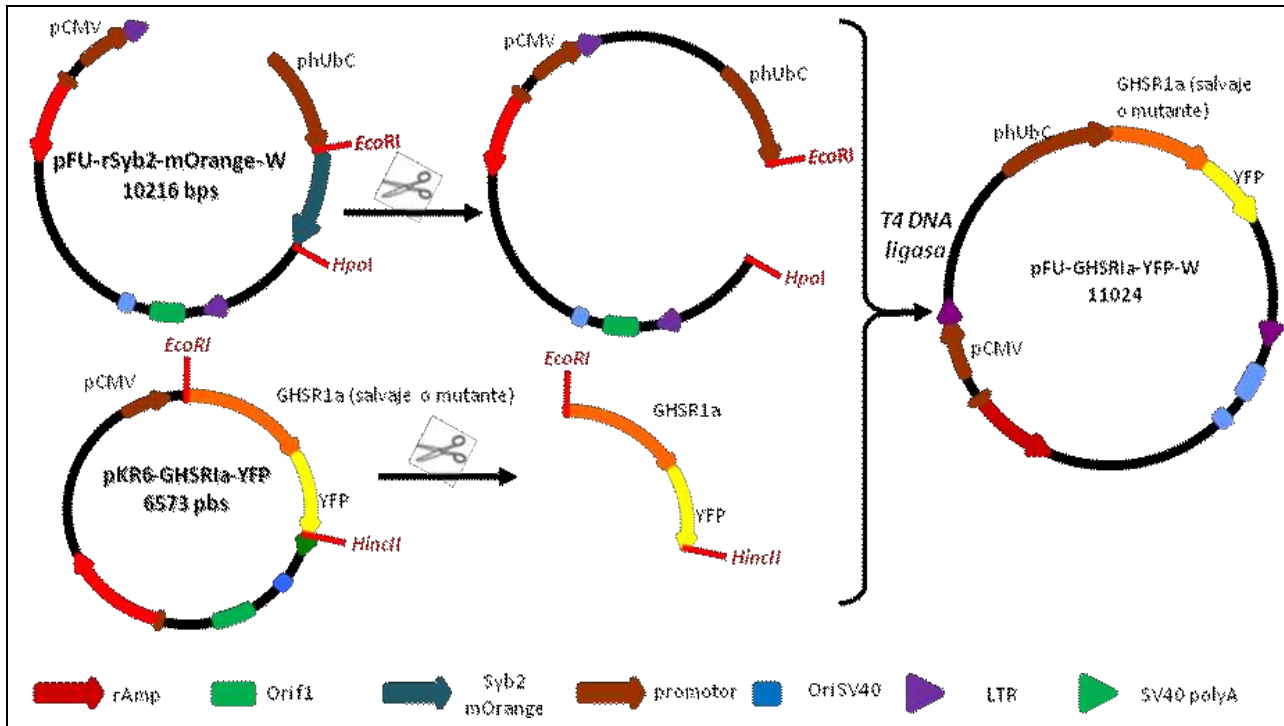
### Solución de competencia

55 mM MnCl<sub>2</sub>. 4 H<sub>2</sub>O; 15 mM CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O; 250 mM KCl ; 10 mM PIPES pH 6,7.

Esterilizar por filtración a través de filtro 0,45 0 0,22 µm. Dividir en 2 alícuotas de 50 ml en tubo estéril y guardar a -20C.

## ANEXO IMÁGENES

**Figura 1: Estrategia de clonado.** En la figura se muestra la estrategia de subclonado del GHSR1a (salvaje y mutante)

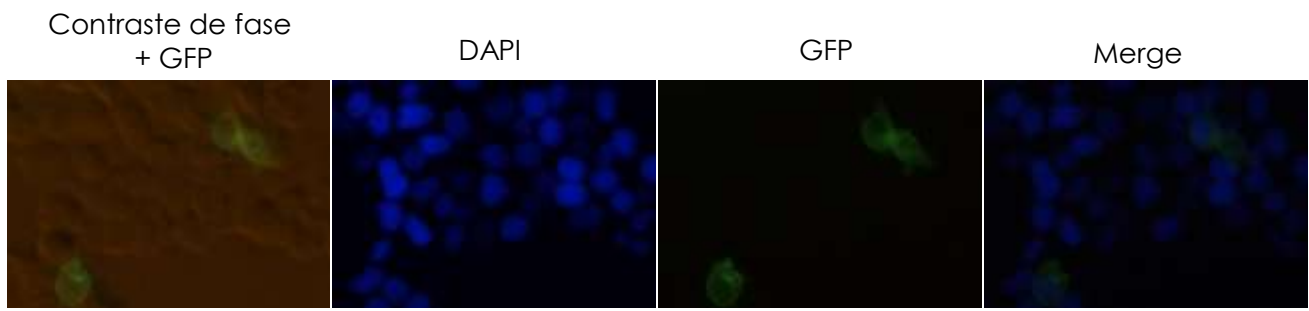


Tamaños de fragmentos esperados (pb) para la construcción del pFU-GHSR1a-YFP cortando con PstI

8237
1374
816
413
134

**Figura 2: Gel de chequeo para confirmar la obtención de los clones.** El ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias transformadas con los productos de ligación se cortó con la enzima de restricción PstI y se realizó una corrida electroforética. Las colonias 4 y 5 presentaron los fragmentos esperados para la construcción del pFU-GHSR1a-YFP salvaje y mutante respectivamente. C: colonia. PM: marcador de peso molecular





**Figura 3: Expresión de FU-GHSRIa-YPF-W en cultivos de células HEK 293T.** Las células fueron transfectadas con el plásmido FU-GHSRIa-YPF-W, posteriormente fijadas y observadas al microscopio de fluorescencia para corroborar la expresión del gen reportero. Objetivo X40