



Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

Creació, producció i purificació de noves variants de prolina de l'H₆-ΔProΔLeuApoptina

Estudiant: Mireia Benito Pellicer

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: mbenitopellicer@gmail.com

Tutor: Dr. Antoni Benito Mundet

Empresa/Institució: Universitat de Girona

Vistiplau del tutor (i cotutor*):

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 18/7/2018

LLISTAT D'ABREVIACIONS.....	4
RESUM.....	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓ	8
I. El càncer.....	8
II. L'Apoptina.....	8
III. Mecanisme d'acció de l'Apoptina.....	9
IV. Variant H ₆ -ΔProΔLeuApoptina	12
OBJECTIVES	13
MATERIALS I MÈTODES	14
I. Soques d'E.coli	14
II. Vectors procariotes.....	15
III. Disseny d'oligonucleòtids	16
IV. Mutagènesi dirigida de lloc	16
V. Medi de cultiu.....	17
VI. Transformació de cèl·lules competents.....	17
VII. Obtenció de l'ADN.....	17
VIII. Seqüenciació	17
IX. Producció de les proteïnes recombinants	18
X. Gel d'electroforesi SDS-PAGE	18
XI. Purificació de les proteïnes.....	19
XII. Anàlisi de les fraccions obtingudes de la purificació d'H ₆ -ΔProΔLeuApoptina.....	20
XIII. Assaig d'interacció de les variants d'H ₆ -ΔProΔLeuApoptina i GST-Ppil3	20
RESULTATS I DISCUSSIÓ	21
I. Creació de les diferents variants.....	21
II. Selecció de la colònia productora de la proteïna d'interès	21
III. Comprovació de la fase on s'acumula la proteïna expressada	22
IV. Purificació de les proteïnes	23
V. Anàlisi de la composició de les fraccions M1 i M2	27
VI. Rendiments	30
VII. Interacció entre GST-Ppil3 - H ₆ -ΔProΔLeuApoptina	31
CONCLUSIONS	34
BIBLIOGRAFIA.....	35

LLISTAT D'ABREVIACIONS

1. **Apop:** Apoptina / *Apoptin*
2. **CAV:** Virus de l'anèmia del pollastre / *Chicken anemia virus*
3. **IDP:** Proteïna intrínsecament desplegada / *Intrinsically disordered proteins*
4. **PKC β :** Proteïna quinasa C / *Protein Kinase C*
5. **CDK2:** Quinasa depenent de ciclina 2 / *Cyclin dependent kinase 2*
6. **Bca3:** Gen 3 associat a càncer de mama / *Breast cancer associated gene 3*
7. **Akt:** Gen que constitueix la família de la proteïna quinasa B (serina/treonina quinasa) / *protein kinase B (serine/threonine-specific protein kinase) gene*
8. **BCR-ABL:** Fusió dels gens BCR i ABL relacionats amb la leucèmia / *BCR and ABL gene fusion related with leukemia*
9. **PI-3K:** Fosfoinositol 3-quinasa / *Phosphoinositide 3-kinase*
10. **Ppil3:** Peptidil-prolil cis-trans isomerasa 3 / *Peptidyl-prolyl isomerase-like 3*
11. **FADD:** Domini de mort associat al receptor Fas / *Fas-associated death domain*
12. **Bcl10:** Proteïna de cèl·lules B limfoma/leucèmia 10 / *B-cell lymphoma/leukemia 10 protein*
13. **PKG-I:** Proteïna quinasa G / *Protein Kinase G*
14. **Hsc70:** Proteïna de xoc tèrmic de 70 kDa / *Heat shock cognate protein 70*
15. **Nmi:** Proteïna que interacciona amb N-myc / *N-myc interacting protein*
16. **PML:** Proteïna de la leucèmia promielocítica / *Promyelocytic leukemia protein*
17. **APC1:** Complex 1 promotor d'anafase / *Anaphase promoting complex 1*
18. **Hippi:** Interactor proteic Hip-1 / *Hip-1 protein interactor*
19. **DEDAF:** factor associat a dominis efectors de mort cel·lular / *Death effector domain-associated factor*
20. **GST:** Glutatió S-transferasa / *Glutathione S-transferase*
21. **Rpm:** Revolucions per minut
22. **NLS:** Seqüència de localització cel·lular / *Nuclear localization sequence*
23. **NTA:** Àcid nitrilotriacètic / *Nitrilotriacetic acid*
24. **EDTA:** Àcid etilendiaminotetracètic / *Ethylenediaminetetraacetic acid*
25. **SDS-PAGE:** Gel d'electroforesi de poliacrilamida de sodi dodecil sulfat / *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
26. **LB:** Luria-Bertani
27. **His:** Histidina / *Histidine*
28. **IPTG:** Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosid / *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
29. **PCR:** Reacció polimerasa en cadena / *Polymerase Chain Reaction*
30. **Aigua mQ:** Aigua milli-Q
31. **HPLC:** Cromatografia líquida d'alta resolució / *High-performance liquid chromatography*
32. **TCEP:** tris (2-carboxietil)fosfina / *Tris(2-carboxyethyl)phosphine*
33. **H₆- Δ Pro Δ LeuApoptina WT:** H₆- Δ Pro Δ LeuApoptina salvatge / *H₆- Δ Pro Δ LeuApoptina wild type*

RESUM

El càncer és un conjunt de malalties degudes a la proliferació descontrolada de cèl·lules anormals que presenten la capacitat d'envair altres teixits en un procés anomenat metàstasi. La metàstasi es dona quan determinades cèl·lules genèticament inestables, s'adapten al microambient d'un nou teixit distanciat del tumor del qual provenen. Actualment, el càncer és una causa de mortalitat elevada a nivell mundial fet que resulta ser de gran preocupació per la comunitat científica.

Les teràpies existents, en la majoria de casos, no han presentat la selectivitat ni l'eficàcia esperada de manera que, la recerca en fàrmacs antitumorals s'està dirigint a noves estratègies. Una d'aquestes estratègies és l'ús de proteïnes virals antitumorals, com l'Apoptina, que és una proteïna intrínsecament desplegada provinent del virus de l'anèmia del pollastre. Aquesta proteïna pot provocar la mort de les cèl·lules tumorals de manera específica deixant les cèl·lules no tumorals il·leses.

Aquest treball és una contribució al projecte iniciat fa uns anys pel grup d'Enginyeria de Proteïnes del departament de Biologia de la Universitat de Girona, que té com a objectiu l'estudi del mecanisme pel qual l'Apoptina afecta específicament les cèl·lules tumorals. En concret, estudia el paper de la interacció d'altres proteïnes, com la ciclofilina Ppil3.

Per tal d'eliminar possibles dianes d'interacció amb la proteïna Ppil3, s'han creat, produït i purificat diferents variants d'Apoptina (H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina) en cada una de les quals s'ha substituït un residu de prolina per alanina. Analitzant els canvis detectats en aquesta interacció, es podria determinar quins són els aminoàcids clau que li confereixen l'efecte citotòxic. La introducció d'aquestes mutacions ha canviat el comportament de les proteïnes recombinants en el moment de la seva purificació per tant, ha sigut necessari modificar el protocol inicial per obtenir quantitats suficients de moltes d'aquestes. La principal variació ha estat l'ús d'un mètode de replegament per diàlisi amb el qual s'ha aconseguit augmentar notablement el rendiment de la proteïna. Finalment, un cop obtingudes amb èxit les diferents proteïnes, s'ha intentat realitzar un anàlisi de la interacció entre les diferents variants de H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina generades i Ppil3 per experiments de *pull-down*.

Paraules clau: càncer, Apoptina, selectivitat, apoptosi, Ppil3, proteïna intrínsecament desplegada, citotoxicitat, optimització.

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que implican la proliferación descontrolada de células anormales que presentan la capacidad de invadir otros tejidos en un proceso llamado metástasis. La metástasis se manifiesta cuando determinadas células genéticamente inestables, se adaptan al microambiente de un nuevo tejido distanciado del tumor del cual provienen. Actualmente, el cáncer provoca una elevada mortalidad a nivel mundial y es un tema de gran preocupación para la comunidad científica.

Las terapias existentes, en la mayoría de los casos, no han presentado ni la selectividad ni la eficiencia esperada de manera que la investigación de fármacos antitumorales se dirige a nuevas estrategias. Una de estas estrategias es el uso de proteínas virales antitumorales como la Apoptina, que es una proteína intrínsecamente desplegada que proviene del virus de la anemia infecciosa del pollo. Esta proteína, tiene la capacidad de promover la muerte de las células tumorales de manera específica dejando las no tumorales ilesas.

Este trabajo es una contribución iniciado hace unos años por el grupo de Ingeniería de Proteínas del departamento de Biología de la Universitat de Girona cuyo objetivo es el estudio del mecanismo a través del cual esta proteína afecta específicamente las células tumorales. En concreto, el papel de la interacción de otras proteínas como la ciclofilina Ppil3.

Con el fin de eliminar posibles dianas de interacción con la proteína Ppil3, se han creado, producido y purificado diferentes variantes de Apoptina (H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina) en cada una de las cuales se ha sustituido un residuo de prolina por alanina. Los cambios detectados en esta interacción podrían determinar los aminoácidos clave que le confieren el efecto citotóxico. La introducción de las mutaciones ha modificado el comportamiento de las proteínas recombinantes en el momento de su purificación de modo que, ha sido necesaria una variación del protocolo inicial para obtener cantidades suficientes de muchas de ellas. La modificación principal ha sido el uso de un método de replegamiento por diálisis que ha conseguido aumentar notablemente el rendimiento de la proteína. Finalmente, una vez obtenidas con éxito las diferentes proteínas, se ha intentado realizar un análisis de la interacción entre las diferentes variantes de H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina generadas y Ppil3 mediante experimentos de *pull-down*.

Palabras clave: cáncer, Apoptina, selectividad, apoptosis, Ppil3, proteína intrínsecamente desplegada, citotoxicidad, optimización.

ABSTRACT

Cancer is a heterogeneous group of diseases that occur for the appearance of an uncontrolled proliferation of abnormal cells with the ability to invade other tissues in a process called metastasis. Metastasis occurs when genetically unstable cancer cells adapt to a tissue microenvironment that is distant from the primary tumor in a selection process. Currently, cancer causes high mortality worldwide and it has become an issue of concern for the scientific community.

Current therapies, in most cases, have not presented the expected selectivity nor efficacy, so the research of anti-tumor drugs is based on new strategies. One of these strategies is the use of antitumor viral proteins, such as Apoptin, which is an intrinsically disordered protein from chicken anaemia virus (CAV) that has the ability to cause the death of tumor cells leaving the non-tumorous cells undamaged.

This work is a contribution to the project initiated some years ago by the group of Protein Engineering of the Department of Biology of the University of Girona whose objective is the study of the mechanism that uses this protein to affect specifically the tumor cells. In particular, the role of the interaction of other proteins such as the cyclophilin Ppil3.

Different variants of Apoptin (H₆-ProLeuApoptina) have been created, produced and purified. In each variant, every residue of proline has been substituted by alanine to eliminate possible interaction targets for the protein Ppil3. The detected changes in this interaction could determine the key aminoacids that confers to Apoptin its cytotoxic effect. The introduction of these mutations has changed the behaviour of recombinant proteins during their purification and the initial protocol has been modified in order to obtain enough quantities to use them in further experiments. The main modification has been the use of the refolding by dialysis method which has demonstrated a significantly increasing of protein yield. Finally, when the different proteins have been successfully obtained, the interaction between the different variants of H₆-ProLeuApoptina and Ppil3 was tried to be analysed by pull-down experiments.

Keywords: cancer, Apoptin, selectivity, apoptosis, Ppil3, intrinsically disordered protein, cytotoxicity, optimization.

INTRODUCCIÓ

I. El càncer

Durant el desenvolupament normal d'un individu, les cèl·lules del cos reben ordres molt específiques per a realitzar les seves funcions com, per exemple, senyals que indueixen la seva divisió o mort cel·lular. A vegades, alguns d'aquests senyals fallen o no es produeixen, donant lloc a una divisió cel·lular descontrolada d'aquestes cèl·lules i desencadenant la formació d'una massa cel·lular anomenada tumor (Alberts et al., 2008).

Aquests tumors, es poden diferenciar en dos grans tipus: tumors benignes i malignes. Els tumors benignes es desenvolupen de manera localitzada en un òrgan o teixit determinat, mentre que les cèl·lules dels tumors malignes, perden la capacitat d'adhesió cel·lular, augmenten la seva motilitat i capacitat d'invasió, entren i sobreviuen al corrent sanguini i finalment, envaeixen i s'adapten al microambient d'un nou teixit o òrgan en un procés anomenat metàstasi (Gupta i Massagué, 2006). Diferents estudis han confirmat l'existència de dos patrons principals d'invasió de cèl·lules cancerígenes cap a nous teixits; la migració col·lectiva d'un conjunt de cèl·lules i la migració individual, on les cèl·lules tumorals superen les barreres de la matriu extracel·lular i es disseminen en teixits circumstants. Cada patró de migració cel·lular presenta característiques morfològiques i mecanismes específics que dificulten l'estudi d'aquest procés (Krakhmal et al., 2015). En el desenvolupament del càncer, es produeixen canvis genètics i epigenètics que proporcionen a les cèl·lules canceroses una avantatge selectiva respecte a les normals. En aquesta última dècada, la investigació de la genètica del càncer s'ha centrat en les mutacions presents en regions codificants, però ha estat descrit que moltes de les mutacions claus en el desenvolupament del càncer es troben en regions no codificants (Cuykendall, Rubin i Khurana, 2017). Gràcies a la seqüenciació dels exomes de milers de càncers, s'ha vist que les mutacions en els gens que controlen l'epigenoma són sorprenentment comuns en càncers humans, fet que ha resultat ser un punt de mira per a moltes investigacions (You i Jones, 2012). També s'ha descrit que la resposta inflamatòria desenvolupada davant de lesions o infeccions, és proveïdora de senyals de supervivència i proliferació cel·lular que poden conduir la formació d'un nou tumor (Rakoff-Nahoum, 2006).

Tot i ser un dels camps de recerca científica més grans, el càncer segueix sent un procés encara molt desconegut pel qual no s'ha trobat cura. Un dels principals problemes a l'hora de proposar nous tractaments anti-tumorals és la manca de selectivitat dels agents terapèutics, és a dir, aquests, en la majoria dels casos, afecten indistintament a cèl·lules canceroses i no canceroses. En els últims anys, diferents grups han centrat la seva recerca en el disseny de proteïnes antitumorals ja que, l'especificitat de la seva interacció, permet predir que poden ser molt més selectives. Per altra banda, hi ha molt d'interès en el desenvolupament de virus amb activitat antitumoral. Existeixen molts virus diferents que tenen la capacitat de regular el cicle cel·lular ja sigui induïnt l'apoptosi o inhibint-la i, per tant, els factors que regulen aquesta activitat poden ser d'especial interès per tractar cèl·lules tumorals de manera específica (Roulston et al., 1999). Algunes teràpies antitumorals que s'estan desenvolupant, estan basades en proteïnes virals que afectin les funcions essencials de la cèl·lula cancerosa provocant la mort cel·lular a través d'apoptosi, catàstrofe mitòtica o mort autofàgica de la cèl·lula (Castro et al., 2018). Una d'aquestes proteïnes virals és l'Apoptina.

II. L'Apoptina

El virus d'anèmia del pollastre (CAV) infecta principalment les cèl·lules hematopoètiques de la medul·la òssia i les cèl·lules precursoras de limfòcits T del timus del pollastre. Aquesta destrucció de cèl·lules produeix anèmia i trombocitopènia que dona lloc a hemorràgies que poden provocar la mort de l'animal (Adair, 2000). Tal i com es veu a la **figura 1**, el genoma del CAV conté 3 marcs de lectura superposats que produeixen un ARN policistroní que codifica per 3 proteïnes diferents; una proteïna de la càpsida (VP1) de 51 kDa, una fosfatasa necessària per la replicació del virus (VP2) de 24 kDa i, finalment, una proteïna de 14 kDa de la qual encara no se'n coneix la funció però que s'ha vist relacionada amb la inducció de l'apoptosi (VP3), que també s'anomena

Apoptina. Aquesta proteïna, indueix l'apoptosi de manera selectiva a les cèl·lules transformades i canceroses sense afectar les cèl·lules normals (Los et al., 2009).

Un dels principals interessos de l'Apoptina és que actua de manera independent a la proteïna p53 i de l'estat de Bcl2. La importància d'això radica en el fet que la proteïna p53, que és una proteïna indispensable en la majoria de casos per desencadenar l'apoptosi i que actua com una xarxa supressora de tumors, en molts càncers es troba mutada (Bertram, 2000). Per altra banda, Bcl2 és un proto-oncogen que també està implicat en la regulació del desencadenament de l'apoptosi i, normalment, està sobreexpressat en el procés de formació de tumors. Aquest fet dificulta el tractament del tumor per quimioteràpia o radioteràpia (Danen-Van Oorschot et al., 1999; Roulston et al., 1999).

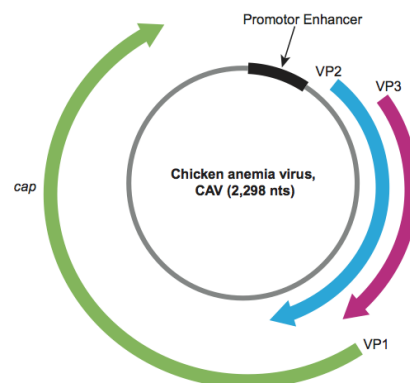


Figura 1. Esquema del genoma del virus d'anèmia del pollastre (CAV). Es mostren els tres marcs de lectura superposats que codifiquen per les proteïnes VP1, VP2 i VP3. Figura obtinguda de <https://veteriankey.com/circoviridae-and-anelloviridae/>.

Recentment, s'ha descrit que l'Apoptina és una proteïna intrínsecament desplegada (IDP) que pot adoptar diferents conformacions en funció de la proteïna amb la que interacciona (Ruiz-Martínez et al., 2017). Està formada per 121 residus d'entre els quals destaca la presència d'un gran nombre de residus de serina, prolina, treonina i residus bàsics. Aquesta proteïna, presenta dos dominis clarament marcats. Al domini C-terminal hi ha una seqüència de localització nuclear (NLS) bipartida (entre els aminoàcids 82-88 i 111-121), que permet la importació de la proteïna a l'interior del nucli cel·lular. La seqüència NLS bipartida, es troba separada per una seqüència d'exportació nuclear (NES), localitzada entre els aminoàcids 97 i 105, que produeix la sortida de la proteïna des de l'interior del nucli cap al citoplasma. Al domini N-terminal hi ha una regió rica en prolines i una regió rica en leucines i isoleucines que li confereix la tendència a la formació d'agregats (Ruiz-Martínez, 2016). Tot i que els dos dominis són importants per a la citotoxicitat, s'han aconseguit separar i aïllar demostrant que el domini C-terminal presenta més efectivitat per desencadenar el procés d'apoptosi que el domini N-terminal (Danen-Van Oorschot et al., 2003).

Actualment, s'estan estudiant dues possibles vies d'utilització de l'Apoptina. Per una banda, s'estudia la introducció de segments que permetin als agregats d'Apoptina travessar la membrana (amb dominis de transducció de membrana). Aquest mètode però, no ha demostrat ser adient ja que els agregats estan molt poc caracteritzats. Per altra banda, s'està intentant utilitzar l'ADN que codifica per aquesta proteïna com a fàrmac introduint-lo dins les cèl·lules on s'expressarà. Aquest últim mètode sembla efectiu tot i que, cal valorar les diferents problemàtiques associades a l'ús del material genètic com a fàrmac (una possible integració al genoma de la cèl·lula, la utilització de vectors poc adients, etc).

III. Mecanisme d'acció de l'Apoptina

La seqüència del NLS bipartit de l'Apoptina és reconeguda per la β -importina, una proteïna d'importació nuclear present a la membrana nuclear de les cèl·lules, i permet l'entrada de l'Apoptina dins del nucli de la cèl·lula. Tot i això, l'Apoptina també presenta una seqüència d'exportació nuclear (NES) que és reconeguda

per proteïnes d'exportació nuclear com la proteïna CRM1 que retornen l'Apoptina de nou al citoplasma (Kuusisto et al., 2008).

En cèl·lules tumorals hi ha un conjunt de quinases sobreexpressades (PKC β i CDK2 d'entre altres) que reconeixen la treonina localitzada al costat del NES de l'Apoptina (treonina 108). La treonina 108, quan és fosforilada, introdueix una càrrega negativa impedit la interacció de CRM1 amb la seqüència d'exportació (NES). D'aquesta manera, l'Apoptina no pot ser expulsada i s'acumula al nucli on pot formar agregats i provocar la mort cel·lular (Poon et al., 2005). La manera com l'Apoptina induïx la mort cel·lular no és clara però es coneix que es desencadena mitjançant la interacció amb múltiples proteïnes cel·lulars. Moltes d'aquestes proteïnes es resumeixen a la **taula 1**, on es mostra també la funció que realitzen cadascuna d'elles. Es pot veure que moltes de les proteïnes formen part de la família de quinases, que són proteïnes involucrades en la regulació del cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals.

Taula 1. Proteïnes que interaccionen amb l'Apoptina i modulen la seva funció (adaptat de Bullenkamp i Tavassoli, 2014).

PROTEÏNA	FUNCIÓ
PKCβ	Permet l'entrada de l'Apoptina a l'interior del nucli i la fosforila evitant la seva exportació al citosol.
CDK2	És una quinasa depenent de ciclines, implicada en el cicle cel·lular, que fosforila l'Apoptina evitant la seva sortida del nucli. Aquesta fosforilació, es dona en presència del complex d'Apoptina-Akt. Aquesta proteïna també pot formar un complex amb la ciclina A i fosforilar la treonina 108 de l'Apoptina, encarregada de regular la seva localització cel·lular.
Bca3	És una proteïna que es troba sobreexpressada en el càncer de mama. Actua incrementant la fosforilació de l'Apoptina i, conseqüentment, la seva citotoxicitat.
Akt	És una quinasa que s'activa quan interacciona amb l'Apoptina i permet la seva entrada al nucli. Akt-Apoptina, formen un complex reconegut per la quinasa CDK2 que fosforila l'Apoptina. Per altra banda, Akt també pot ser activada a través del complex entre Apoptina i la subunitat P85 de la PI-3K.
BCR-ABL	És una quinasa provinent de la fusió gènica dels gens BCR i ABL. Es troba sempre activada i sobreexpressada en determinades cèl·lules tumorals induïnt la proliferació cel·lular. BCR-ABL perd la seva activitat quan interacciona amb l'Apoptina, inhibint la proliferació cel·lular descontrolada.
PI-3K	És una quinasa que interacciona amb l'Apoptina a través de la subunitat P85 (subunitat que també activa Akt). Conseqüentment, promou la fosforilació de CDK2 i de l'Apoptina, impedit la seva expulsió al citoplasma.
Ppil3	És una peptidil-prolil cis-trans isomerasa, de la família de les ciclofilines que interacciona amb l'Apoptina facilitant la seva localització al citoplasma.
FADD	És una proteïna associada a Fas que, quan es troba juntament amb l'Apoptina al citoplasma, interfereix en la senyalització de mort cel·lular.
Bcl10	És una proteïna relacionada amb els limfomes, tot i que pot interaccionar amb l'Apoptina. La funció de la seva interacció amb l'Apoptina encara no s'ha pogut determinar.
PKG-I	És una serina/treonina quinasa relacionada amb l'activació de l'Apoptina de la qual se'n desconeix el mecanisme d'interacció.
Hsc70	És una xaperona amb diverses funcions cel·lulars d'entre les quals hi ha l'activació de la proteïna Akt induïda per Apoptina.
Nmi	És una proteïna que interactua amb els oncogens de la família Myc i amb l'Apoptina. Encara se'n desconeix la funcionalitat.
PML	En cèl·lules tumorals, l'Apoptina forma agregats similars als cossos formats per la proteïna de la leucèmia promielocítica (PML). Es desconeix l'efecte seva funció.
APC1	És una proteïna implicada en la regulació del cicle cel·lular que, quan s'uneix a l'Apoptina, pot aturar el cicle en el punt G2/M causant la seva mort per apoptosi.
Hippi	És una proteïna implicada en el procés d'apoptosi. En cèl·lules normals la unió de Hippi amb l'Apoptina evita l'acumulació d'aquesta al nucli. Tot i això, quan es troba sobreexpressada en cèl·lules canceroses, no pot retenir l'Apoptina al citoplasma i permet la formació d'agregats al nucli.
DEDAF	És un factor associat a dominis efectors de mort cel·lular. Quan interacciona amb l'Apoptina incrementa la taxa de mort per apoptosi de les cèl·lules canceroses.

Aquest projecte es centra, principalment, en la interacció entre l'Apoptina i la proteïna Ppil3, que pertany a la família de les ciclofilines. Aquesta proteïna, catalitza la reacció d'isomerització cis-trans dels enllaços peptídics dels residus de prolina. Tot i això, també està implicada en la regulació del cicle cel·lular i en processos d'apoptosi. La proteïna Ppil3, actua sobre l'enllaç entre la treonina 108 i la prolina 109 de l'Apoptina i, desenvolupa un paper clau en la localització citoplasmàtica de l'Apoptina (Los et al., 2009). En diferents experiments s'ha demostrat que la modificació de la prolina 109 per una alanina a la seqüència de l'Apoptina, afecta significativament la funció de Ppil3. Aquest fet determina que la prolina 109 és una de les dianes més importants per al manteniment de l'Apoptina al citoplasma (Huo, Yi i Yang, 2008). La unió de Ppil3 a aquest enllaç altera la conformació de l'Apoptina modificant també l'activitat de les seqüències NES i/o NLS (Ferrer, 2017).

Actualment, encara no es coneix exactament el mecanisme d'acció de l'Apoptina. Malgrat això, diversos científics han proposat possibles estratègies d'actuació, tenint en compte les proteïnes amb les quals pot interaccionar l'Apoptina. Una d'aquestes estratègies proposades és la que es mostra a la **figura 2**.

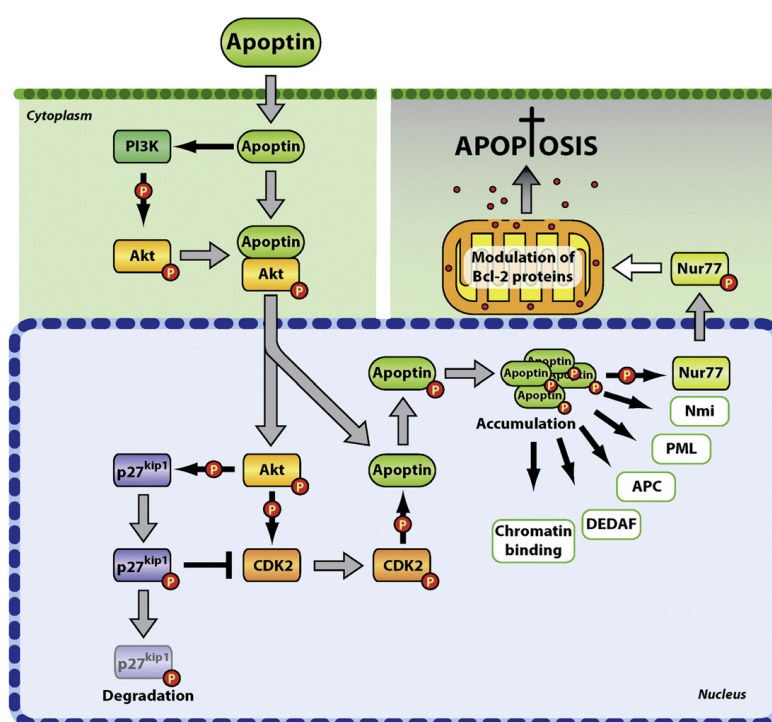


Figura 2. Esquema de la proposta realitzada pels investigadors Los et al. (2009), del mecanisme d'acció de l'Apoptina en cèl·lules tumorals. Extret de (Los et al., 2009).

En aquesta imatge es representa una de les propostes del mecanisme d'acció de l'Apoptina. El procés s'inicia amb l'entrada de l'Apoptina a l'interior de la cèl·lula. Un cop es troba al citoplasma, s'associa amb la subunitat reguladora de PI3K i l'activa de manera constitutiva provocant la translocació nuclear d'Akt. La proteïna Akt del nucli activa la proteïna CDK2 mitjançant la seva fosforilació, a través de mecanismes directes o indirectes (que impliquen altres proteïnes). L'activació de CDK2, dona lloc a la fosforilació la treonina 108 de l'Apoptina i, desencadena a la seva acumulació a nucli en les cèl·lules canceroses. Quan es troba a nucli, l'Apoptina es pot associar amb diferents proteïnes comentades anteriorment com DEDAF, Nmi, APC1 i PML. A través d'un procés encara desconegut, l'Apoptina també pot fosforilar també la proteïna Nur77. Aquesta interacció, desencadena la seva exportació a citoplasma i interacciona amb la proteïna Bcl2 induint la conversió de la proteïna Bcl2 anti-apoptòtica a Bcl2 pro-apoptòtica (Los et al., 2009).

Per altra banda, també s'ha vist que l'Apoptina un cop és activa pot interaccionar amb moltes proteïnes, amb la cromatina i amb l'ADN possiblement degut al fet de ser una IDP. Es creu també, que pot alterar l'expressió gènica en la cèl·lula (Leliveld et al, 2004).

Així doncs, cada cop hi ha més fets que indiquen que l'Apoptina no presenta un únic mecanisme per causar la mort per apoptosi en cèl·lules tumorals i que la selectivitat que presenta ve donada per l'estat d'expressió i activació/desactivació de les diferents proteïnes comentades anteriorment.

IV. Variant H₆-ΔProΔLeuApoptina

L'Apoptina s'expressa en forma d'agregats, per tant, per poder-la caracteritzar i entendre el seu funcionament cal aconseguir-la de manera aïllada. Per aquesta raó, el grup d'Enginyeria de Proteïnes va crear una variant d'Apoptina que es plega com un monòmer. Això es va aconseguir eliminant els residus de l'1 al 46 (PRS i LRS) on hi havia la zona implicada en la formació d'agregats i se li va adicionar una etiqueta de 6 histidines per tal de facilitar la seva purificació (**figura 3**). Aquesta variant es va anomenar H₆-ΔProΔLeuApoptina (Ruiz-Martínez, 2016).

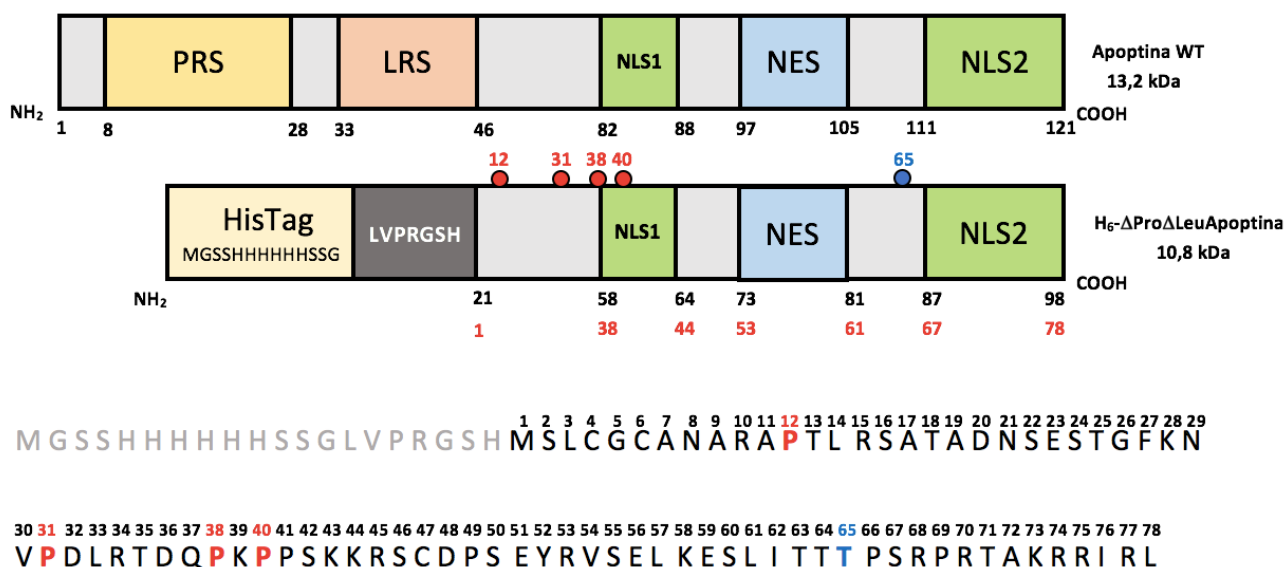


Figura 3. A la part superior de la imatge es pot veure una comparació entre l'Apoptina WT (salvatge) i la variant H₆-ΔProΔLeuApoptina. S'indiquen en vermell les prolines modificades en aquest projecte per crear les noves variants i, la treonina 108, es troba de color blau. A la part inferior es mostra la seqüència aminoacídica de la variant H₆-ΔProΔLeuApoptina i les prolines assenyalades en vermell són les que s'han substituït per alanines en la creació de les variants (12,31,38,40). Adaptat de (Ruiz-Martínez, 2016).

La treonina 108 (posició 65 en la construcció d' H₆-ΔProΔLeuApoptina), marcada de color blau, és un aminoàcid clau. La fosforilació d'aquesta treonina, evita el reconeixement de la seqüència NES per part de la proteïna d'exportació nuclear 1 (XPO1), també anomenada proteïna del manteniment cromosomal 1 (CRM1). La fosforilació d'aquest aminoàcid, es dona en cèl·lules tumorals inhibint el reconeixement de la seqüència d'exportació nuclear (NES) i permet la formació d'agregats a l'interior del nucli de la cèl·lula tumoral provocant-li mort. En canvi, en cèl·lules no tumorals, la treonina 108 no es troba fosforilada de manera que, es permet el reconeixement de la seqüència NES per part de CRM1 i permet l'expulsió de l'Apoptina cap al citoplasma evitant la seva mort apoptòtica (Poon et al., 2005).

OBJECTIVES

Apoptin has been investigated as a target for new cancer treatments because of its selectivity to induce apoptosis in cancer cells. However, the specific mechanism that uses apoptin to trigger apoptosis in tumour cells remains unclear. The fact that apoptin belongs to the intrinsically disordered proteins (IDPs) family confers a huge plasticity to it and, consequently allows the protein to adopt a lot of different conformations to interact with other proteins or to form aggregates. The knowledge of the apoptin structure would lead to a better understanding of its biological action.

This Final Grade Project is a contribution to a project carried out in the Protein Engineering Laboratory of the University of Girona whose main objective is the characterization of apoptin's structure and the molecular determinants of its cytotoxicity. Specifically, we are interested in the fixation of apoptin in a precise by allowing its interaction with other proteins, in this case the cyclophilin Ppil3, and also in the characterization of the Apoptin's residues responsible of this binding. In my project, I have mutated a monomeric apoptin's variant (H₆-ΔproΔLeuApoptina) by replacing different proline residues by alanine by site directed mutagenesis. The purpose of the proline replacing was to remove target residues for Ppil3 interaction.

The specific objectives of this project were:

- To design and create the different gene variants carrying the replacement of a proline residue by an alanine residue.
- To produce and purify the recombinant proteins used in this project (GST-Ppil3, H₆-ΔProΔLeuApoptina and the created H₆-ΔProΔLeuApoptina variants).
- To assay, through a pull-down assay, the interaction of some of these H₆-ΔProΔLeuApoptina variants with GST-Ppil3.

MATERIALS I MÈTODES

I. Soques d'*E. coli*

Durant el procés de clonatge es van utilitzar indistintament les soques DH5 α i XL10-Gold mentre que per a la producció de proteïnes recombinants es va usar la soca BL21(DE3) o bé la soca Rosetta(DE3). L'elecció es va fer en funció dels nivells de producció que s'obtenien per a cada una de les variants. A continuació es descriu cada una d'aquestes soques.

- a) ***E. coli* DH5 α** : és una soca que presenta un conjunt de mutacions que la fan molt adequada per processos de clonació. Permet una elevada eficiència de transformació ja que una de les mutacions disminueix la degradació per endonucleases i, permet augmentar la taxa de transferència del plasmidi. Aquesta soca s'ha utilitzat per realitzar les transformacions amb els diferents plasmidis creats a partir de mutagènesi dirigida de les variants de l'H₆- Δ Pro Δ LeuApoptina.

Genotip: F⁻, Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rK⁻, mK⁺), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

- b) ***E. coli* BL21(DE3)**: és una soca derivada de la soca B d'*E. coli* molt utilitzada en la producció de proteïnes recombinants clonades sota el control del promotor de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7. Presenta el lisogen del fag lambda DE3 amb el gen de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7 sota el control del promotor *lacUV5*. L'expressió de la proteïna d'interès es dona mitjançant la inducció del promotor de l'operó *lac* d'*E. coli* en presència d'isopropil β -D-1-tiogalactopiranosid (IPTG), que actua com a anàleg no hidrolitzable de l'al·lactosa (metabòlit de la lactosa que desencadena la transcripció de l'operó *lac*). La soca BL21(DE3) també presenta deleccions dels gens que codifiquen per algunes proteases (OmpT i La), produeix menys acetat a altes concentracions de glucosa i presenta més permeabilitat d'entrada i sortida de molècules a l'exterior probablement degut a què presenta una superfície cel·lular més senzilla.

Genotip: F⁻, *ompT*, *hsdS*(*r_B⁻m_B⁻*), *dcm*⁺, *gal*, λ (DE3), *lon*⁻

- c) ***E. coli* Rosetta (DE3)**: és una soca derivada de BL21(DE3) preparada per millorar l'expressió de proteïnes eucariotes que presenten codons que no acostumen a ser presents en soques d'*E. coli*. Així doncs, aquesta soca conté tRNA addicionals pels codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA en un plasmidi que confereix resistència a la soca a l'antibiòtic cloramfenicol. També presenta el lisogen del fag lambda DE3 per poder expressar gens sota el control del promotor de la RNA polimerasa de T7.

Genotip: F⁻, *ompT*, *hsdS*(*r_B⁻m_B⁻*), *gal*, *dcm* (DE3), *pRARE* (*Cam*^R)

- d) **XL10-Gold®**: és una soca d'*E. coli* adquirida amb el kit de mutagènesi dirigida QuikChange™ kit (Agilent Technologies, USA) que es caracteritza per la seva elevada eficiència de transformació. Aquesta soca és deficient en endonucleases, fet que augmenta la qualitat de l'ADN que s'obté mitjançant els protocols d'extracció d'ADN.

Genotip: *Tet*^r Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, Hte [*F'* *proAB lacI^q lacZ* Δ M15 *Tn10* (*Tet*^r) *Amy Cam*^r]

II. Vectors procariotes

- a) **pET28a- Δ Pro Δ LeuAoptina:** en aquest projecte s'ha utilitzat el plasmidi pET28a- Δ Pro Δ LeuAoptina com a vector d'expressió de l' Δ Pro Δ LeuAoptina i les seves variants. Aquest vector (**figura 4**) és un derivat de pET28a(+) (Novagen, USA) que presenta el gen d'interès sota el control del promotor de la RNA polimerasa del fag T7. També conté el gen de resistència a l'antibiòtic kanamicina per facilitar la selecció de les cèl·lules que han incorporat el plasmidi i la seqüència codificant per 6 histidines per tal d'expressar l' Δ Pro Δ LeuAoptina juntament amb aquesta etiqueta per permetre la purificació de la proteïna (formant la variant H₆- Δ Pro Δ LeuAoptina).

El promotor de T7 contingut en aquest vector, permet el control de l'inici de l'expressió de la proteïna d'interès ja que només podrà ser actiu sota condicions d'inducció amb IPTG. Una vegada induït, serà reconegut per part de la RNA polimerasa de T7 continguda en el genoma de les cèl·lules.

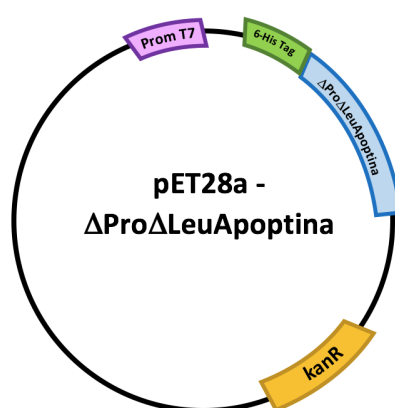


Figura 4. Esquema dels elements d'interès del vector d'expressió pET28a- Δ Pro Δ LeuAoptina.

- b) **pGEX-Ppil3:** aquest vector (**figura 5**) és un derivat del plasmidi pGEX-4T-1 creats pel grup de recerca (veure Vivet, 2016), que presenta el gen de la proteïna Ppil3 fusionat a l'extrem 3' del gen de la GST. La part codificada pel gen de la GST, dóna estabilitat a la proteïna final i facilita la seva purificació ja que es pot unir al glutatió en una cromatografia d'afinitat. Aquest vector confereix resistència a ampicil·lina a les cèl·lules que l'han incorporat. L'expressió del gen d'interès de Ppil3 es troba sota control del promotor *tac* que s'indueix mitjançant IPTG.

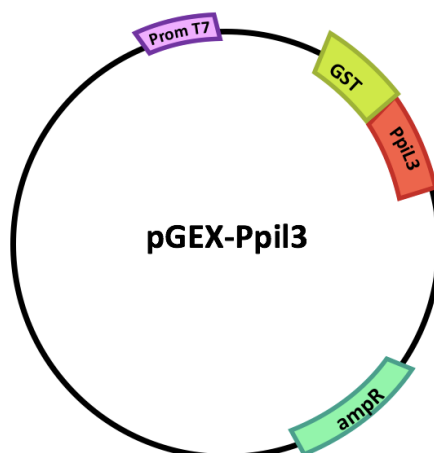


Figura 5. Esquema dels elements d'interès del vector d'expressió pGEX-Ppil3.

III. Disseny d'oligonucleòtids

Per tal d'assolir els objectius principals d'aquest projecte, es van crear les diferents variants esmentades a la **figura 3**, substituint els residus de prolina per residus d'alanina. La prolina és un residu de cadena alifàtica que dóna lloc a la formació d'una cadena rígida. Si es canvia aquest aminoàcid per una alanina, s'afegeix un residu lleugerament apolar que presenta molta més flexibilitat modificant la seva capacitat d'interacció amb altres proteïnes com GST-Ppil3.

Així doncs, per crear les diferents variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina es van dissenyar oligonucleòtids per substituir les prolines d'interès per alanines mitjançant el procés de mutagènesi dirigida de lloc. Amb aquests canvis es volia investigar l'efecte d'aquestes modificacions respecte la capacitat d'interacció amb GST-Ppil3 mitjançant un anàlisi de la seva constant de dissociació per experiments de *pull-down*.

Es van crear encebadors d'una llargada d'entre 25 i 28 bases amb una temperatura de fusió d'entre 73°C i 78°C. Les mutacions es van introduir a la part central de l'encebador per tal de permetre l'anellament amb la seqüència motlle. La temperatura de fusió esperada es va calcular mitjançant la següent fórmula:

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

Sent T_m la temperatura de fusió, N el número de nucleòtids que forma l'encebador, %GC el percentatge de guanines i citosines que hi ha a l'encebador respecte el total de nucleòtids i % "mismatch" el percentatge de bases en l'encebador que no s'aparellen amb el motlle no mutat.

Per decidir per quin codó d'alanina es substituïa el codó de la prolina, es va tenir en compte l'ús de codó en *E. coli*: GCU (11%), GCC (31%), GCA (21%) i GCG (38%). Es va prioritzar l'ús dels codons GCG i GCC (**taula 2**).

Taula 2. Encebadors utilitzats per la creació de les noves variants de H₆-ΔProΔLeuApoptina on es substituïen diferents prolines per alanines. En vermell, es destaquen els codons que s'han modificat i, les lletres ressaltades mostren concretament el canvi de nucleòtid que genera el canvi d'aminoàcid.

Nom de l'encebador	Seqüència de l'encebador (5' → 3')	Mida (nucleòtids)	T_m (°C)
ΔLeuP12_1	GAATGCTCGCGCT GCC ACGCTAAGATC	27	77,1
ΔLeuP12_2	GATCTTAGCGT GGC AGCGCGAGCATTC		
ΔLeuP31_1	GTTTCAAGAATGTG GCG ACTTGAGGAC	28	74,3
ΔLeuP31_2	GTCCTCAAGT CCG CCACATTCTTGAAAC		
ΔLeuP38_1	GGACCGATCA AGC CAAGCCTCCCTC	25	76,7
ΔLeuP38_2	GAGGGAGGCTT GGC TTGATCGGTCC		
ΔLeuP40_1	GATCAACCCA AGG CGCCCTCGAAGAAG	27	73,4
ΔLeuP40_2	CTTCTTCGAGGG CGC CTGGGTGATC		

IV. Mutagènesi dirigida de lloc

Per substituir els codons de prolina per alanina en el gen de H₆-ΔProΔLeuApoptina es va utilitzar el *kit* de mutagènesi dirigida QuikChange™ (Agilent Technologies, USA). Seguint les instruccions d'aquest protocol, primerament, es van barrejar els diferents reactius (tampó de reacció 10x, ADN de doble cadena motlle, encebador, barreja de nucleòtids, reactiu QuikSolution, aigua milli-Q i al final l'enzim QuikChange Lightning) amb les quantitats determinades al protocol. Els encebadors creats per introduir la mutació en el plasmidi pET28-ΔProΔLeuApoptina es descriuen a la **taula 2**.

La barreja es va introduir en un termociclador per iniciar la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per obtenir un gran nombre de còpies del plasmidi. D'entre totes les còpies, es van seleccionar les que presentaven la mutació correcta a les dues cadenes. Aquesta selecció es va realitzar mitjançant la digestió amb l'enzim de restricció *DpnI* durant 30 minuts a 37°C. Aquest enzim actua tallant les cadenes metilades o hemimetilades, de manera que, es van fragmentar totes les molècules parentals (incloses les de doble cadena d'ADN (dsDNA)) que no contenen les mutacions desitjades.

V. Medi de cultiu

El medi utilitzat per a la producció de les proteïnes és el medi Luria-Bertani (LB). Es tracta d'un medi ric àmpliament utilitzat en cultius bacterians, com les soques d'*E.coli* que s'utilitzen en aquest projecte.

Està compostat per 10g de clorur de sodi (NaCl), 10g de triptona i 5g d'extracte de llevat (YE) en 1L d'aigua milli-Q. Un cop dissolts els diferents compostos de la barreja, es va ajustar a pH 7,4 ja que l'activitat metabòlica de les cèl·lules produeix àcid que disminueix lleugerament el pH. Si el pH es trobés per sota de pH 7, el creixement del cultiu podria no ser l'òptim. Seguidament, es va distribuir el volum en els recipients on es va realitzar la producció (400 mL de medi en erlenmeyers de 1L) i es va autoclavar a 121°C durant 20 minuts per tal d'esterilitzar el medi. Als recipients amb medi autoclavats, se'ls va afegir una dilució 1/1000 de kanamicina, ampicil·lina 50 mg/mL o cloramfenicol 35 mg/mL, antibiòtics esterilitzats per filtració en funció de la soca i vectors procariotes utilitzats.

VI. Transformació de cèl·lules competents

Les cèl·lules competents que es van utilitzar van ser extreïdes del congelador de -80°C del grup de recerca i la transformació es va realitzar segons el protocol del "QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit" (Agilent Technologies, USA). Primerament, es van afegir 2 µL de β-mercaptoetanol a 45 µL de cèl·lules competents al·lquotats i després d'incubar en gel 2 minuts, es va afegir 2 µL de l'ADN d'interès tractat anteriorment amb *DpnI* i es va incubar en gel durant 30 minuts. Posteriorment, es va realitzar un xoc tèrmic de 90 segons a 42°C seguit d'una incubació de 2 minuts en gel. Es va afegir 480 µL de medi LB i es va incubar a 37°C durant 45 minuts amb agitació de 225-250 rpm per permetre la recuperació fenotípica. Passat aquest temps, les cèl·lules es van sembrar en plaques de LB suplementades amb l'antibiòtic ampicil·lina i cloramfenicol per la producció de GST-Ppil3 i, l'antibiòtic kanamicina per $H_6\text{-}\Delta\text{Pro}\Delta\text{LeuA}$ optina i les seves variants. Finalment, es van incubar les plaques a 37°C fins l'endemà.

VII. Obtenció de l'ADN

A partir de cultius de nit de colònies aïllades seleccionades, es va realitzar el procés d'extracció de l'ADN seguint el protocol del GeneJET® Plasmid Miniprep kit (Thermo Fisher Scientific) i es van emmagatzemar les mostres d'ADN a -20°C fins a la seva utilització.

VIII. Seqüenciació

Per assegurar que el procés de mutagènesi dirigida s'havia realitzat de manera correcta, es van seqüenciar les mostres d'ADN obtingudes. El mètode de seqüenciació utilitzat va ser el mètode de Sanger. Aquest mètode, consisteix en una reacció en cadena de la polimerasa on s'introdueixen nucleòtids estàndard (dNTP) i dideoxinucleòtids (ddNTP) marcats fluorescentment amb diferents fluoròfors. La reacció de seqüenciació es va fer usant el BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) seguint les indicacions del fabricant i, com a encebador, es va utilitzar oligonucleòtid T7 Term. Un cop realitzada la reacció en el termociclador, les mostres es van guardar a -20°C. L'endemà, es van precipitar les reaccions de seqüenciació

amb una barreja de 125 mM àcid etilendiamintetraacètic (EDTA) en etanol absolut i es va resuspendre amb 10 µL de formamida per distribuir les mostres a la placa de seqüenciació.

Les seqüències obtingudes, es van comparar amb la seqüència no mutada de l'H₆-ΔProΔLeuAoptina, amb la plataforma bioinformàtica de MultAlin (INRA), per assegurar que els canvis nucleotídics es trobaven en els llocs esperats (Corpet, 1988).

IX. Producció de les proteïnes recombinants

Per iniciar la producció de l'H₆-ΔProΔLeuAoptina i les seves variants, es va realitzar un cultiu de nit inoculant, amb el glicerinat de cèl·lules pertinent, 5 mL de medi LB suplementat amb una dilució 1/1000 d'antibiòtic i es va incubar durant 30 minuts a 37°C i 250 rpm. Seguidament, es van addicionar 500 µL d'aquest cultiu a 50 mL de medi LB amb antibiòtic i es va incubar a 37°C 250 rpm durant 16 hores.

L'endemà, es van transferir 4 mL del cultiu de nit en erlenmeyers que contenien 400 mL de medi LB amb l'antibiòtic i es van deixar creixent a 37°C, 250 rpm fins a obtenir una O.D₅₅₀ d'1. Es van extreure dues mostres de cultiu per a posteriors anàlisis i, es van centrifugar durant 2 minuts a 13.300 rpm. Es va descartar el sobrenedant i, a continuació, es va introduir 1 mL d'IPTG 1mM a cada erlenmeyer. Per la proteïna H₆-ΔProΔLeuAoptina i variants, es va realitzar la incubació de la mescla durant 4 hores a 37°C, a 250 rpm. En canvi, la proteïna GST-Ppil3, es va incubar a 18°C, 250 rpm durant 16 hores. Passades les 4 o 16 hores, es van extreure de nou dues mostres corresponents al cultiu induït i es van centrifugar 2 minuts a 13.300 rpm. Es va separar el sediment i el sobrenedant per poder detectar on hi havia presència de la proteïna GST-Ppil3. Seguidament, es va centrifugar el cultiu durant 7 minuts a 8.000 rpm i es va congelar el sediment a -20°C fins a seguir amb el procés.

El següent dia, es va resuspendre el sediment congelat amb 30 mL de solució 50 mM Tris HCl pH8, 100 mM NaCl a pH 7,4, i es van agrupar les mostres resuspeses en un sol recipient, on es va afegir 1 mM fluorur de fenilmetilsulfoni (PMSF).

Per tal de lisar les cèl·lules, es va utilitzar la premsa de French (SLM-Aminco, Spectronic Instruments, UK) tres vegades. Del cultiu lisat, se'n va extreure una mostra que es va centrifugar durant 2 minuts a 13.300 rpm. Es va guardar per separat la mostra de sobrenedant i sediment, per tal d'analitzar-les posteriorment en un gel d'electroforesi SDS-PAGE. El lisat obtingut, es va sotmetre a una centrifugació durant 30 minuts a 10.000 rpm i 4°C. Finalment, es va separar el sediment del sobrenedant i es van congelar ambdues fraccions a -20°C.

Per a la producció de la proteïna GST-Ppil3 es va realitzar el mateix procediment però en comptes d'afegir kanamicina, es va afegir l'antibiòtic ampicil·lina i cloramfenicol.

X. Gel d'electroforesi SDS-PAGE

Es va preparar un gel de poliacrilamida SDS-PAGE de 0,75 mm a un 15% poliacrilamida. Les mostres es van preparar per poder-les analitzar, afegint una dilució ¼ del tampó de càrrega 4x que contenia un 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,005% blau de bromofenol i 50 mM Tris/HCl a pH 6,8. Seguidament, es van bullir les mostres durant 5 minuts a 96°C. Es va utilitzar el marcador de pes molecular PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific per marcar els pesos moleculars de les diferents bandes. L'electroforesi, es va realitzar a 200 V durant aproximadament 1 hora i es va tenyir el gel amb la barreja de 0,1% (pes/volum) Coomassie Brilliant Blue, 50% metanol i 10% d'àcid acètic durant 15 minuts. Seguidament, es va destenyir afegint solució d'àcid acètic 7% durant 2 hores per tal de poder observar les bandes corresponents a les diferents proteïnes presents a la mostra.

XI. Purificació de les proteïnes

a. H₆-ΔProΔLeuApoptina i variants

La fracció insoluble, provinent de la lisi amb la premsa de French, es va solubilitzar amb 10 mL de tampó que contenia 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7 M Urea, es va afegir 100 mM de glutatió reduït 100 mM i es va ajustar a pH 7,4 amb àcid acètic. Seguidament, es va bombollejar nitrogen gas i, es va incubar durant 2 hores a temperatura ambient amb una agitació suau de 40 rpm, per tal de solubilitzar la proteïna. Passades les 2 hores d'agitació a temperatura ambient, es va centrifugar a 10.000 rpm durant 30 minuts a 4°C i es va incubar el sobrenedant amb 15 mL de reïna d'agarosa Ni-NTA (Qiagen, Netherlands), prèviament equilibrada amb el tampó de solubilització. Aquesta barreja, es va incubar tota la nit a 4°C en agitació suau.

L'endemà, es va distribuir la suspensió en 3 columnetes de purificació i es van rentar amb 15 mL de solució I1 (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7 M Urea pH 7,4), 15 mL de solució W2 (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7 M Urea i 20 mM imidazol pH 7,4) i, finalment, es va eluir la proteïna amb 15 mL de 5 mL en 5 mL amb tampó d'elució E1 (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7 M Urea i 500 mM imidazol pH 7,4). Es van recollir les 3 fraccions per separat i es van analitzar en un gel d'electroforesi SDS-PAGE. Les fraccions que contenien la proteïna, es van sotmetre al procés de replegament dipositant la mostra gota a gota en 1 L de tampó de replegament amb agitació (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 100 mM L-Argnina, 100 mM L-àcid glutàmic, 1 mM glutatió oxidat (GSSG), 1 mM glutatió reduït (GSH) i 1 mM EDTA ajustat a pH 8,1 amb àcid acètic) i es va deixar, sense agitació, a 4°C durant 48 hores. A continuació, es va ajustar la mostra a pH 5 i es va realitzar una concentració, amb el concentrador tangencial (Millipore, USA), fins a un volum de 150 mL. Un cop concentrada la proteïna, es va dialitzar a 4°C durant 72 hores amb agitació suau en aigua milli-Q i, posteriorment, es va liofilitzar.

La primera purificació mitjançant la reïna d'agarosa Ni-NTA (Qiagen, Netherlands), no va eliminar totes les impureses de manera que, es va realitzar una segona purificació a través de cromatografia d'exclusió molecular que separa les proteïnes segons la seva mida. Les mostres liofilitzades, van ser resuspeses en tampó de gel filtració (50 mM Tris, 150 mM NaCl i 1 mM EDTA a pH 7,4 amb àcid acètic), filtrades amb filtres Millex® - GV de 0,22µm Syringe Driven Filter unit (Durapore). Posteriorment, es van aplicar a la columna de cromatografia Superdex™ 75 10/300 GL (General Electric Healthcare, Sweden) sota una pressió màxima de 1,8 MPa i un flux de 0,5 mL/minut. Es van recollir els pics i es van analitzar posteriorment en un gel d'electroforesi SDS-PAGE. Finalment, es va dialitzar amb aigua milli-Q la mostra corresponent al monòmer d'Apoptina, es va liofilitzar i es va emmagatzemar a -20°C fins a la seva utilització.

b. GST-Ppil3

La proteïna GST-Ppil3 es va trobar principalment a la fracció soluble després de realitzar la lisi cel·lular amb la premsa de French de manera que, es va filtrar amb els filtres Millex 0,33 mm i, posteriorment, es va purificar en columnes de cromatografia GStap™ 4B, 1 mL (General Electric Healthcare, Sweden). Aquesta cromatografia es va realitzar amb una columna que conté Glutathione Sepharose® que interacciona amb la glutatió S-transferasa (GST) present a la proteïna GST-Ppil3. La pressió màxima es va establir a 0,5 MPa, es va equilibrar la columna amb tampó PBS a un flux de 1 mL/min, es va introduir la mostra amb un flux de 0,2 mL/min i es va realitzar l'elució de la proteïna passant per la columna el tampó d'elució (PBS i 4 mM de glutatió reduït a pH 7,5) a un flux de 0,5 mL/min. El glutatió reduït, va interaccionar amb la reïna permetent l'elució de la proteïna GST-Ppil3.

Es van recollir les diferents fraccions corresponents a l'eluït i, després d'analitzar-les mitjançant un gel d'electroforesi SDS-PAGE i confirmar la presència de GST-Ppil3 en grans quantitats, es va dialitzar amb PBS a pH 7,5. Finalment, es va realitzar la liofilització de la mostra i es va emmagatzemar a -20°C fins a la seva utilització.

XII. Anàlisi de les fraccions obtingudes de la purificació d'H₆-ΔProΔLeuApoptina

A la cromatografia d'exclusió es va veure que, durant l'exclusió del monòmer, hi havia un subtil pic que podia correspondre a mostra de monòmer d'Apoptina unit a glutatió. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, es va passar la mostra per una columna d'intercanvi catiònic mitjançant la columna Mono S™ 5/50 GL (General Electric Healthcare, Sweden) que té la capacitat de retenir ions carregats positivament. L'elució de la proteïna es va realitzar utilitzant tampó A (Tris 50 mM a pH 7,4) i, seguidament, es va aplicar un gradient de tampó B (Tris 50 mM, NaCl 1M a pH 7,4) en 20 minuts. Amb l'augment del tampó B, es va augmentar la presència de sals que permetien l'elució de les diferents formes monomèriques que havien interaccionat específicament amb la reïna. D'aquesta manera, les proteïnes van eluir en funció de la intensitat amb la qual s'unien a la reïna.

XIII. Assaig d'interacció de les variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina i GST-Ppil3

Un cop es van obtenir les diferents variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina purificades i liofilitzades, es va realitzar un assaig *pull-down* per tal de comparar la seva constant d'afinitat amb GST-Ppil3. Es va preparar una solució d'una de les variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina a 1 mg/mL en PBS i es va barrejar reïna d'agarosa Ni-NTA (Qiagen, Netherlands), prèviament equilibrada amb PBS durant 1h a temperatura ambient. Posteriorment, es va realitzar un rentat amb PBS centrifugant 30 segons a 2.000 rpm i es va distribuir la reïna en 4 eppendorf. En aquests eppendorf, es van afegir diferents quantitats de la proteïna GST-Ppil3 (20, 50, 120 i 200 µg). Com a control, es va afegir reïna d'agarosa Ni-NTA sense Apoptina i 200 µg de GST-Ppil3 per descartar interaccions inespecífiques. Es va incubar a 37°C durant 2:30h i finalment, es va centrifugar 30 segons a 2.000 rpm. Es van separar les dues fases obtingudes i es van analitzar en un gel d'electroforesi SDS-PAGE.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Aquest projecte ha consistit en la creació, producció i purificació de diferents variants de l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina, per tal d'identificar els determinants moleculars de la seva interacció amb la proteïna GST-Ppil3 (la qual també s'ha produït i purificat). Aquestes variants, s'han creat amb l'objectiu de substituir diferents residus de prolina, que són aminoàcids diana de la reacció d'isomerització cis-trans provocada per la proteïna GST-Ppil3, per alanina. Realitzant assajos d'interacció *pull-down* a diferents concentracions de les proteïnes (variants d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i GST-Ppil3), es volia calcular la constant de dissociació de les variants, per detectar possibles canvis en l'afinitat de la interacció en funció de la prolina substituïda.

I. Creació de les diferents variants

Primerament, es van reemplaçar per alanina els quatre primers residus de prolina de la seqüència. Per tal de crear aquestes variants, es van dissenyar oligonucleòtids portadors de la mutació d'interès i es va realitzar el procés de mutagènesi dirigida per Quikchange. Dues colònies de cada variant, es van sotmetre a un procediment d'extracció d'ADN, que es va analitzar mitjançant el mètode de seqüenciació de Sanger. Els resultats que es van obtenir, van ser alineats amb la seqüència de la variant parental de l'Apoptina (Apoptin a la **figura 6**). Les seqüències obtingudes es mostren a la **figura 6**, on es pot afirmar que, les mutacions que provocaven el canvi d'un residu de prolina per un d'alanina, es trobaven sobre els codons 12, 31, 38 i 40 en les posicions desitjades.

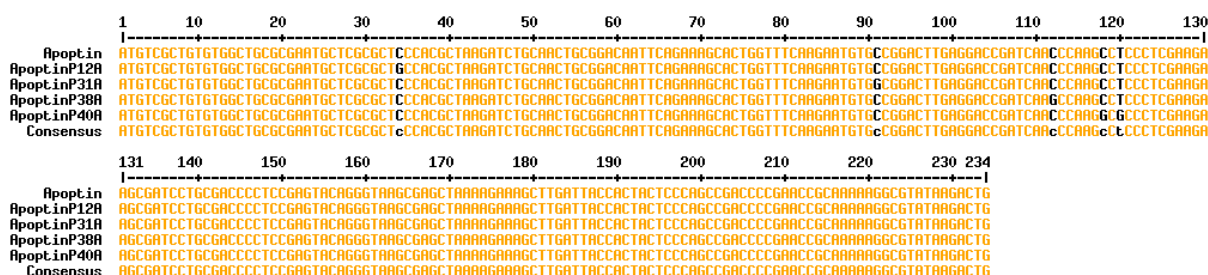


Figura 6. Alineament de les seqüències d'ADN extretes de les colònies mutades per les diferents variants.

II. Selecció de la colònia productora de la proteïna d'interès

Un cop confirmades les seqüències de les colònies seleccionades, es va realitzar la producció de les diferents proteïnes d'interès (GST-Ppil3, H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i les seves variants). Prenent com a referència treballs previs del grup de recerca (Ferrer, 2017), es va utilitzar la soca BL21 (DE3) per expressar l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i les seves variants, i la soca *E. coli Rosetta* (DE3) per expressar GST-Ppil3. Realitzant aquesta combinació, s'havien observat alts nivells d'expressió de les proteïnes. En base a aquests treballs (Ferrer, 2017), s'esperava que l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i les seves variants, es trobessin a la fracció insoluble en forma de cossos d'inclusió, on romandrien protegides de la degradació, fins a la seva solubilització i replegament. Per altra banda, la proteïna GST-Ppil3, es va produir en la soca *E. coli Rosetta* (DE3) ja que, a part de presentar els nivells d'expressió més alts, també permetia obtenir la proteïna a la fracció soluble, facilitant la seva purificació per cromatografia líquida d'alta eficiència d'afinitat.

Així doncs, per la producció d'aquestes proteïnes, es va realitzar una prova d'expressió de tres colònies d'*E. coli* BL21 (DE3) per l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i variants i, tres colònies d'*E. coli Rosetta* (DE3) per la GST-Ppil3. A la **figura 7**, es pot veure la prova d'inducció de la variant H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P38A en un gel d'electroforesi SDS-PAGE. A les mostres corresponents al cultiu induït amb IPTG, apareix una nova banda clarament marcada que correspon a la proteïna H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P38A. En aquest cas, es va seleccionar la colònia 2 ja que

presentava major expressió de la proteïna d'interès. Aquest procés es va realitzar de la mateixa manera per totes les proves d'expressió de les diferents variants de l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i de GST-Ppil3.

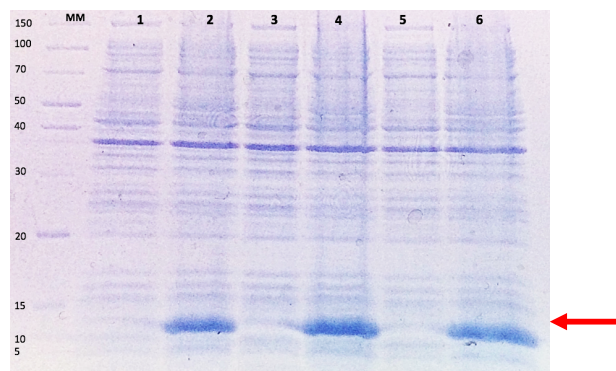


Figura 7. Gel d'electroforesi SDS-PAGE d'anàlisi de l'expressió de tres colònies d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P38A (10,18 kDa), banda indicada amb una fletxa. El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Colònia 1 abans de la inducció amb IPTG (2) Colònia 1 induïda amb IPTG (3) Colònia 2 abans de la inducció amb IPTG (4) Colònia 2 induïda amb IPTG (5) Colònia 3 abans de la inducció amb IPTG (6) Colònia 3 induïda amb IPTG.

III. Comprovació de la fase on s'acumula la proteïna expressada

- a. GST-Ppil3:** per la producció de la proteïna GST-Ppil3 es va inocular 2L de medi de cultiu amb la soca *E.coli* Rosetta (DE3) i, se'n va extreure una mostra un cop va assolir una $O.D_{550}$ d'1. Per tal d'obtenir la proteïna a la fracció soluble, es va realitzar l'expressió a 18°C i 250 rpm durant tota la nit, tal i com havia estat descrit (Ferrer, 2017; Schein, 1989). Mitjançant el sistema d'expressió del bacteriòfag T7, s'ha vist que les proteïnes expressades a 37°C tenen més tendència a formar agregats, en canvi, a temperatures inferiors tendeixen a trobar-se a la fase soluble (Gräslund et al., 2008). Aquest fet, es deu a què s'expressa més lentament i, com que les noves proteïnes es troben en un entorn menys concentrat, es poden plegar correctament més fàcilment (Gasser et al., 2008). A temperatures baixes, part de les proteases no es troben tan actives durant l'expressió de les proteïnes i aquest fet també incrementa el rendiment de les proteïnes expressades a temperatures inferiors a 37°C (Sørensen i Mortensen, 2005). Un cop expressada la proteïna es va extreure una altra mostra corresponent al cultiu induït. Seguidament, es va realitzar un lisat del cultiu mitjançant la premsa de French i es va separar la fase soluble (sobrenedant) i insoluble (sediment) per centrifugació. Sota aquestes condicions, tal i com es pot observar a la **figura 8**, es va obtenir aproximadament la meitat de la proteïna expressada a la fase insoluble i l'altre meitat a la fase soluble la qual es va sotmetre al procés de purificació.

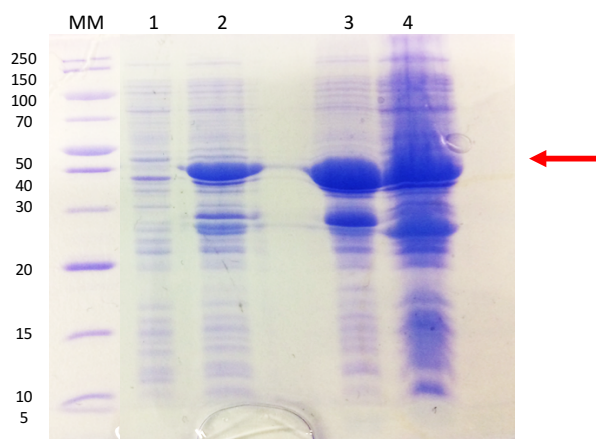


Figura 8. Gel SDS-PAGE d'anàlisi de l'expressió de GST-Ppil3 (46,11 kDa), banda indicada amb una fletxa. El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Mostra del cultiu abans de la inducció amb IPTG (2) Mostra del cultiu induït amb IPTG durant tota la nit a 18°C (3) Fracció soluble de la premsa de French (4) Fracció insoluble de la premsa de French.

- b. H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina:** l'Apoptina tendeix a formar cossos d'inclusió a partir dels quals existeix un protocol de purificació de l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i les seves variants. Per acumular aquestes proteïnes en cossos d'inclusió, es va inocular el cultiu amb la soca *E.coli* BL21 (DE3) i se'n va extreure una mostra quan va assolir una OD_{550} de 1. Seguidament, es va realitzar l'expressió de les proteïnes induint el cultiu amb IPTG i incubant a 37°C i 250 rpm durant aproximadament 4 hores, seguint el protocol dels treballs previs realitzats del grup de recerca amb aquesta proteïna. Passat el temps d'inducció, es va lissar el cultiu amb la premsa de French i, a partir d'una centrifugació de la mostra resultant, es va separar la fracció soluble (sobrenedant) de la fracció insoluble (sediment).

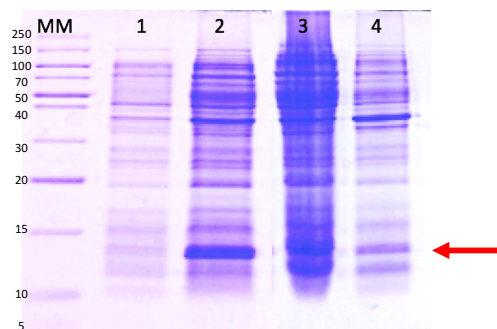


Figura 9. Anàlisi per gel d'electroforesi SDS-PAGE de l'expressió d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P38A (10,18 kDa), banda senyalada amb una fletxa. El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Marcador de pes molecular (2) Mostra del cultiu sense IPTG (3) Mostra del cultiu després d'induir amb IPTG durant 4 hores (4) Fracció soluble de la premsa de French (5) Fracció insoluble de la premsa de French

La **figura 9** correspon a l'expressió de la variant H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P38A, on hi va haver molt bona inducció, tot i això, la proteïna es troba principalment a la fracció soluble. Es van obtenir resultats similars en l' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i les altres variants (P12A, P31A i P40A). En tots els casos però, es va seguir el procés de purificació partint de la proteïna present a la fracció insoluble ja que, presentava major resistència a la degradació de proteases i es podia obtenir en forma monomèrica mitjançant protocols de solubilització amb urea ja coneguts.

IV. Purificació de les proteïnes

a. Purificació de la GST-Ppil3

La purificació de GST-Ppil3 es va realitzar a través d'una cromatografia d'afinitat GSTrap™ 4B, 1 mL (General Electric Healthcare, Sweden) gràcies al fet que aquesta proteïna estava fusionada a la glutatí S-transferasa (GST). Es va eluir la proteïna d'interès en diferents alíquotes mitjançant una solució de PBS, 4 mM de glutatí reduït. Seguidament, es van analitzar les diferents fraccions de l'elució en un gel d'electroforesi SDS-PAGE. Tal i com es pot observar a la **figura 10**, en totes les fraccions, es va obtenir la proteïna GST-Ppil3 pràcticament pura i en elevada quantitat.

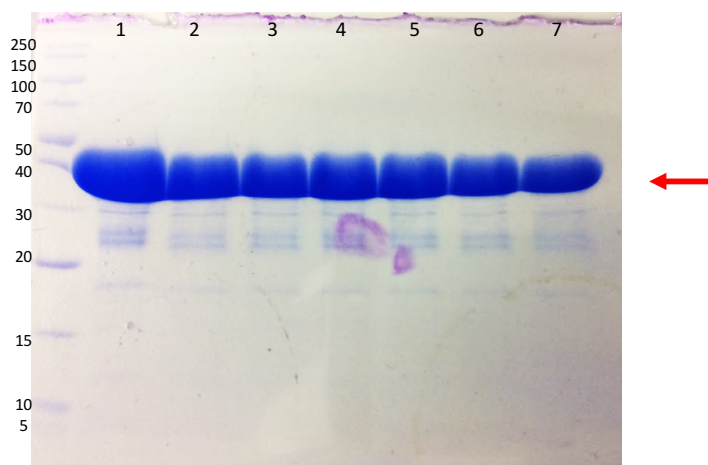


Figura 10. Anàlisi per SDS-PAGE 15% de la presència de proteïna GST-Ppil3 (46,11 kDa, banda indicada amb una fletxa) en les diferents fraccions recollides durant la cromatografia d'afinitat amb la columna GSTrap™ 4B. El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Fracció 1 (2) Fracció 2 (3) Fracció 3 (4) Fracció 4 (5) Fracció 5 (6) Fracció 6 (7) Fracció 7

b. Purificació de l'H₆-ΔProΔLeuApoptina i variants

Un cop es van obtenir els cossos d'inclusió de l'H₆-ΔProΔLeuApoptina i de les seves variants, es va realitzar la solubilització d'aquests amb urea. La proteïna desnaturalitzada, es va purificar mitjançant una cromatografia d'afinitat amb la reïna d'agarosa Ni-NTA (Qiagen, Netherlands) ja que, aquesta proteïna es troba etiquetada amb una cua d'histidines que pot interaccionar específicament amb la reïna de níquel. A la **figura 11** es mostra un gel SDS-PAGE on hi ha representat el procés de producció i purificació per cromatografia d'afinitat de la variant H₆-ΔProΔLeuApoptina P12A. El procés de purificació a través de la cromatografia d'afinitat, permet obtenir la proteïna gairebé pura però desnaturalitzada, ja que es realitza el procediment en presència d'urea que és un agent desnaturalitzant.

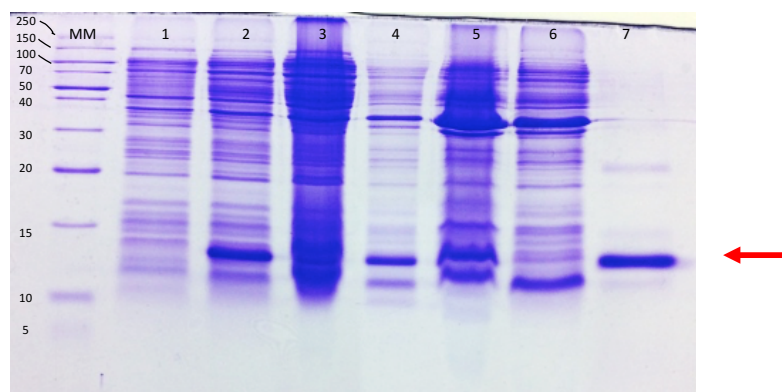


Figura 11. Anàlisi per SDS-PAGE del procés de producció i purificació de la variant H₆-ΔProΔLeuApoptina P12A (10,18 kDa), banda senyalada amb una fletxa, mitjançant reïna Ni-NTA (Qiagen, Netherlands). El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Cultiu abans de la inducció amb IPTG (2) Cultiu induït amb IPTG (3) Fracció soluble de la premsa de French (4) Fracció insoluble de la premsa de French (5) Mostra solubilitzada amb urea abans de realitzar la purificació per cromatografia Ni-NTA (6) Traves de l'elució amb tampó 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7 M Urea i 20 mM imidazol (7) Proteïna eluïda amb 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7 M Urea i 500 mM imidazol.

Després de la producció i purificació amb la reïna d'agarosa Ni-NTA, es va realitzar el replegament, la concentració de la mostra, la diàlisi amb aigua mQ i, posteriorment, es va liofilitzar la mostra. Finalment, es va passar a través d'una cromatografia líquida d'alta eficiència d'exclusió que va permetre separar el dímer (pic 1) del monòmer (pic 2), tal i com es veu representat a la **figura 12**.

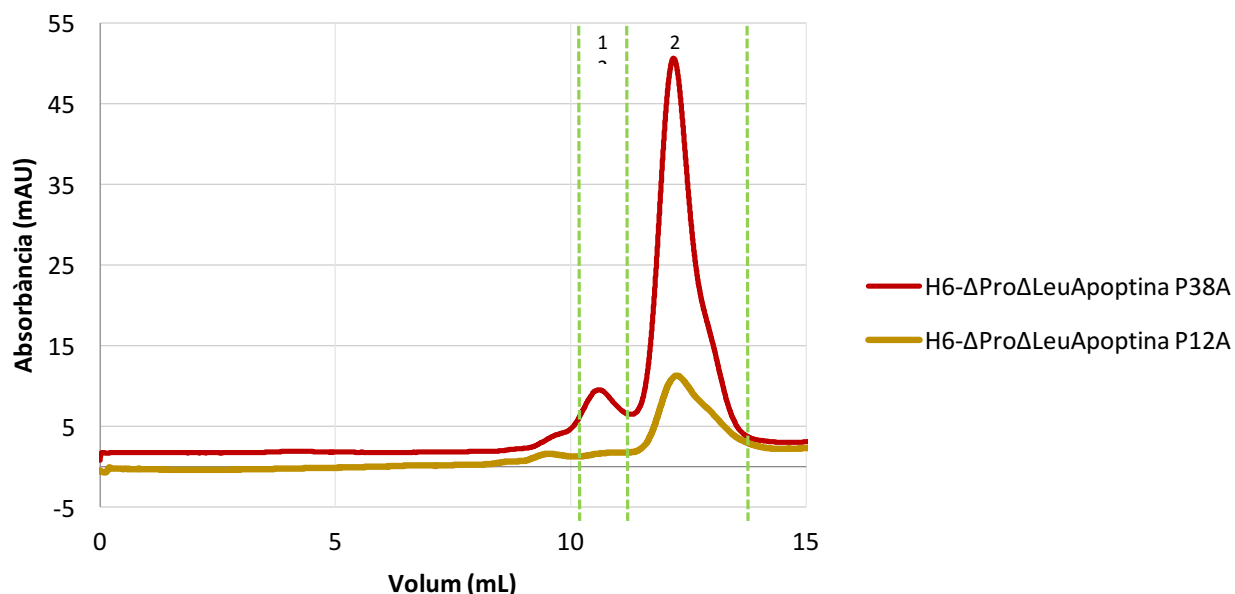


Figura 12. Cromatograma de la purificació per cromatografia d'exclusió molecular de les variants d'H₆-ΔProΔLeuAoptina produïdes i purificades amb el mètode convencional utilitzat en treballs del grup de recerca (Ferrer, 2017).

Es va observar que el rendiment de les diferents variants era molt baix (rendiments inferiors a 0,5 mg/L de cultiu per a la majoria de les variants) i, només es va aconseguir obtenir una quantitat superior a 1,4 mg/L de cultiu per a les variants H₆-ΔProΔLeuAoptina P38A i H₆-ΔProΔLeuAoptina. Es va observar que el problema es localitzava a partir del replegament de la proteïna ja que, en les etapes prèvies, hi havia quantitats correctes de proteïna i un cop s'havia concentrat i preparat la mostra per aplicar-la a la cromatografia d'exclusió molecular, el rendiment disminuïa dràsticament.

El problema es circumscrivia doncs, en les etapes de replegament i concentració de la mostra (veure **figura 13**, mètode A). Per aquesta raó, es va posar a punt un protocol alternatiu de purificació a partir d'aquesta etapa. Es va substituir el replegament de la proteïna per dilució per un procés en què la proteïna es dialitzava en front del tampó de replegament a 4°C durant 48 hores. D'aquesta manera, l'agent desnaturalitzant s'eliminava paulatinament i no bruscament, com en el protocol anterior (Santos et al., 2012). Aquesta modificació va permetre l'eliminació del pas de concentració tangencial.

A la **figura 13** es pot veure un esquema representatiu dels dos mètodes utilitzats amb els principals passos de purificació per a l'obtenció de les diferents variants d'H₆-ΔProΔLeuAoptina. Aquesta modificació, va permetre escurçar en 3 dies el procés de purificació.

En aquest nou mètode, també es va assajar l'efecte del procés de liofilització en el rendiment de la proteïna. És per això que, dins del mètode B, es van definir dos sub-mètodes (B.1 i B.2). En el mètode B.1, es va realitzar el replegament per diàlisi i, seguidament, es va separar la forma dimèrica i monomèrica a través del procés de la cromatografia d'exclusió molecular. En canvi, en el mètode B.2, es va liofilitzar la mostra un cop replegada i, posteriorment, es va sotmetre a la cromatografia d'exclusió molecular.

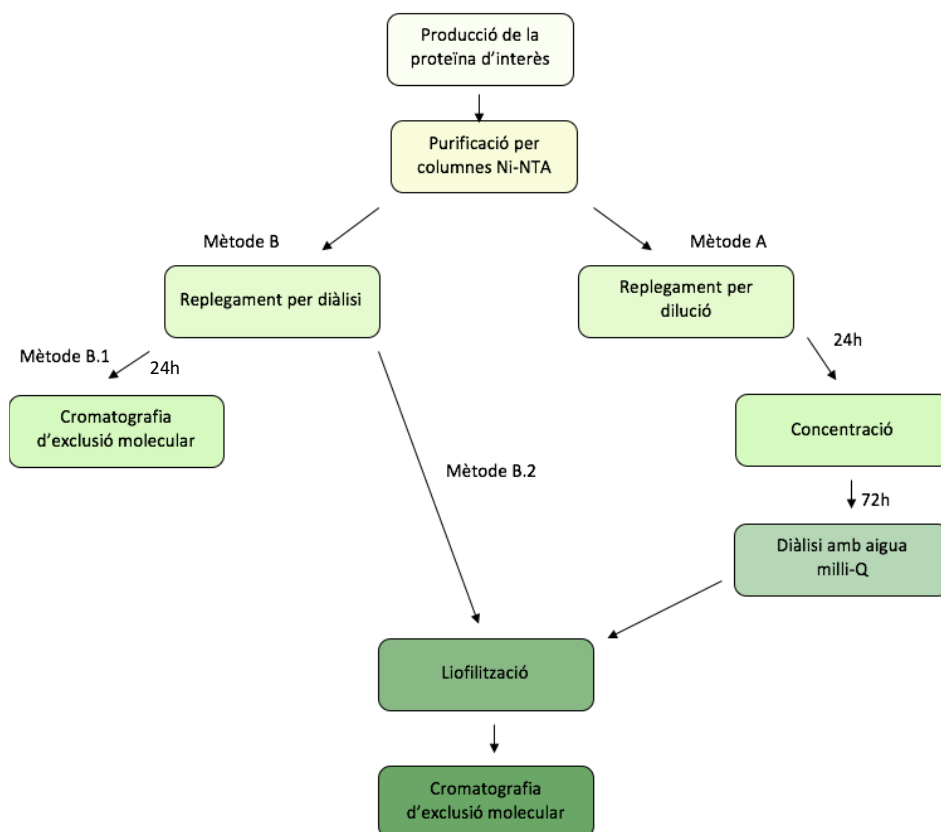


Figura 13. Esquema dels diferents mètodes de purificació de l'H₆-ΔProΔLeuAoptina i de les seves variants.

Quan es va sotmetre la mostra dialitzada en tampó de replegament a la cromatografia d'exclusió molecular amb la columna Superdex™ 75 10/300 GL (General Electric Healthcare, Sweden), es van obtenir pics compatibles amb la forma dimèrica (pic 1, **figura 14**) i amb la forma monomèrica (pics 2 i 3, **figura 14**).

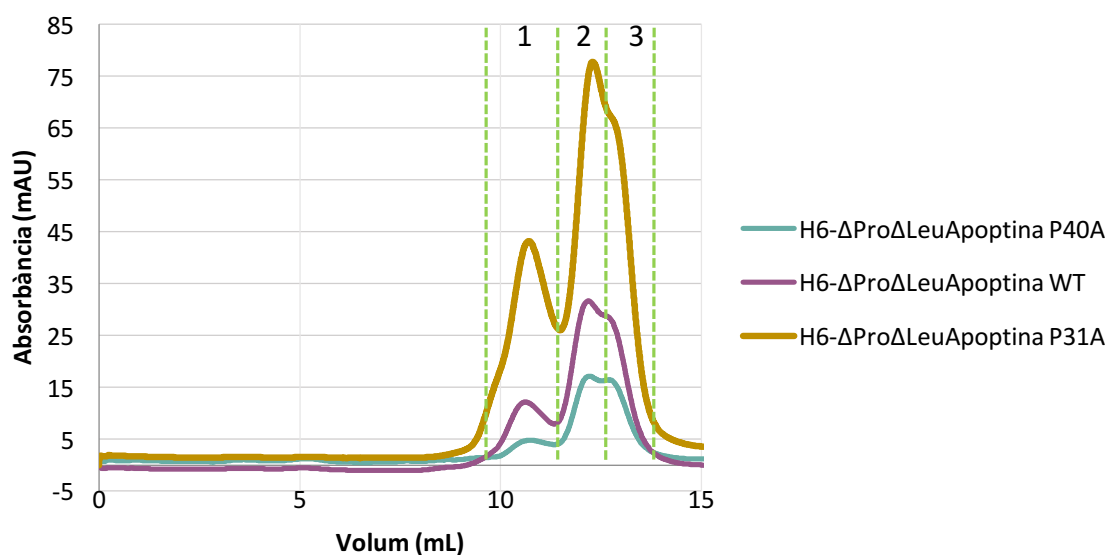


Figura 14. Cromatograma de la purificació per cromatografia d'exclusió molecular de les variants d'H₆-ΔProΔLeuAoptina produïdes i purificades amb el mètode B.1.

La comparació dels cromatogrames obtinguts mitjançant els dos mètodes de purificació (**figura 12** i **figura 14**) mostra que, el rendiment de la purificació depèn principalment de la variant que s'està purificant. Aquest fet

es pot confirmar ja que, dins d'un mateix mètode, observem molta variabilitat pel que fa al rendiment en funció de la proteïna. En tots dos mètodes apareixen els mateixos pics, de manera que, el nou protocol no varia les propietats de la proteïna present. Tot i això, de manera general, el mètode B, a més de requerir un temps per a la purificació molt menor, també permet obtenir un rendiment superior (**taula 3**).

Un cop la mostra es trobava replegada per diàlisi, es van assajar dos alternatives diferents: aplicar directament la mostra directament a la cromatografia d'exclusió molecular (mètode B.1) o bé, liofilitzar aquesta mostra prèviament a la cromatografia (mètode B.2). A partir de les proteïnes purificades mitjançant els mètodes B.1 i B.2, es va realitzar una cromatografia d'exclusió molecular d'ambdues mostres obtenint els resultats de la **figura 15**, on es pot veure que, el procés de liofilització no afectava la composició de la proteïna (ja que amb els dos mètodes apareixen els mateixos pics). Amb el procés de liofilització (mètode B.2) s'aconseguia la mostra en estat sòlid de manera que, es podia resuspendre en poc volum optimitzant el temps de purificació i sense afectar al rendiment de la proteïna.

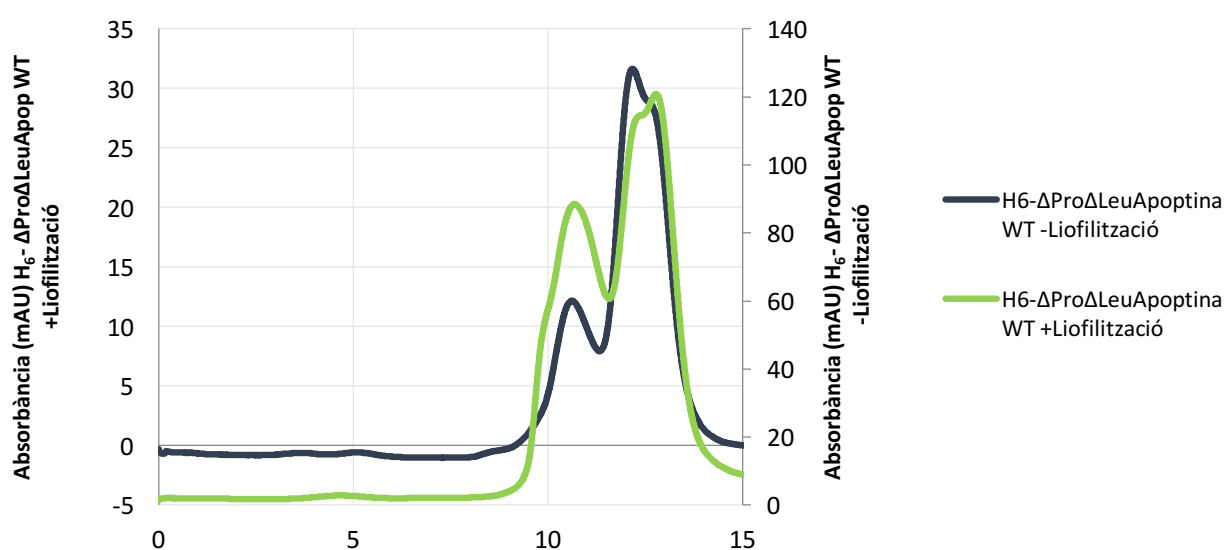


Figura 15. Cromatograma de la purificació per cromatografia d'exclusió molecular de les variants d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApop WT produïdes i purificades amb el mètode A.1 (H_6 - Δ Pro Δ LeuApop WT - liofilització) i amb el mètode A.2 (H_6 - Δ Pro Δ LeuApop WT + liofilització).

V. Anàlisi de la composició de les fraccions M1 i M2

Respecte als tres pics del cromatograma que van aparèixer després de la cromatografia d'exclusió molecular, es van carregar en un gel d'electroforesi SDS-PAGE per tal d'analitzar-ne el contingut (**figura 16**). El primer pic (corresponent al carril 1 del gel SDS-PAGE de la **figura 16**), que tenia una mobilitat com la del dímer de l'Apopina, estava en gran part format per la proteïna monomèrica degut les condicions desnaturalitzants (ebullició de la mostra en presència de SDS i β -mercaptoetanol) de la tècnica. Per tal de poder veure la presència del dímer en un gel SDS-PAGE caldria realitzar-lo en condicions no desnaturalitzants.

Tot i que la presència d'aquest dímer en el gel ha estat observada anteriorment (Ruiz-Martínez, 2016), no deixa de ser sorprenent i fa pensar que, probablement, hi ha diferents espècies de dímer a la mostra. Al carril 2 de la **figura 16**, també es pot veure una banda difusa corresponent a la forma dimèrica. Aquest fet es pot explicar ja que, durant l'elució de la proteïna, poden quedar petites fraccions de dímer barrejades amb la primera fracció de monòmer les quals són detectades amb el gel d'electroforesi SDS-PAGE.

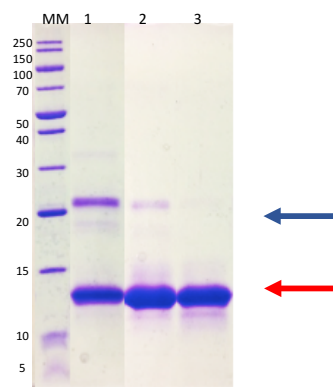


Figura 16. Gel d'electroforesi SDS-PAGE de les mostres obtingudes de la purificació per gel filtració de l'H₆-ΔProΔLeuAoptina P31A. La fletxa vermella assenyalava la banda corresponent al monòmer (10,18 kDa) mentre que la fletxa blava assenyalava la del dímer de la proteïna (21 kDa). El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Mostra corresponent a la primera fracció (dímer) (2) Mostra corresponent a la segona fracció (monòmer 1) (3) Mostra corresponent a la tercera fracció (monòmer 2)

Així doncs, el doble pic amb una mobilitat com la del monòmer d'H₆-ΔProΔLeuAoptina observat a les fraccions 2 i 3 del cromatograma obtingut amb el mètode B.1 (**figura 14**), semblava indicar que s'havien format dues espècies diferents de monòmer. Donat que la mostra havia patit un procés de replegament, vam pensar que aquest fet es podia explicar creient que, una de les dues espècies mantenia unides molècules de glutatió mitjançant enllaços disulfur amb alguna de les tres cisteïnes presents a la proteïna. El primer pic del monòmer podia estar format pel monòmer d'H₆-ΔProΔLeuAoptina unit a glutatió. Aquesta unió, augmentaria el pes molecular de la proteïna fent que eluís en forma d'un primer pic (M1) i, l'H₆-ΔProΔLeuAoptina sense glutatió (M2) eluiria en un segon pic. El glutatió, és un agent reductor que es troba de manera natural en la majoria de les cèl·lules i que ajuda a mantenir les proteïnes del citoplasma en estat reduït, d'entre altres funcions (Forman, Zhang, i Rinna, 2009). Aquest compost, permet la formació d'enllaços disulfur entre els residus de cisteïna de la proteïna. A la seqüència aminoacídica de l'Aoptina, es pot observar la presència de tres cisteïnes. Així doncs, el glutatió podria interaccionar a través dels grups tiol amb alguna d'aquestes cisteïnes fet que, augmentaria lleugerament el seu pes molecular, provocant l'aparició del doble pic present a la mostra del monòmer. Per tal de caracteritzar les diferències entre les dues espècies de monòmer, es va investigar el seu perfil d'elució en una cromatografia d'intercanvi catiónic mitjançant la columna Mono S™ 5/50 GL. Donat que el glutatió presenta una càrrega negativa per la presència d'un residu de glutàmic, aquesta cromatografia havia de separar les formes d'Aoptina amb glutatió de les que no en tenien. Els resultats obtinguts van ser els que es mostren a les **figures 17 i 18**.

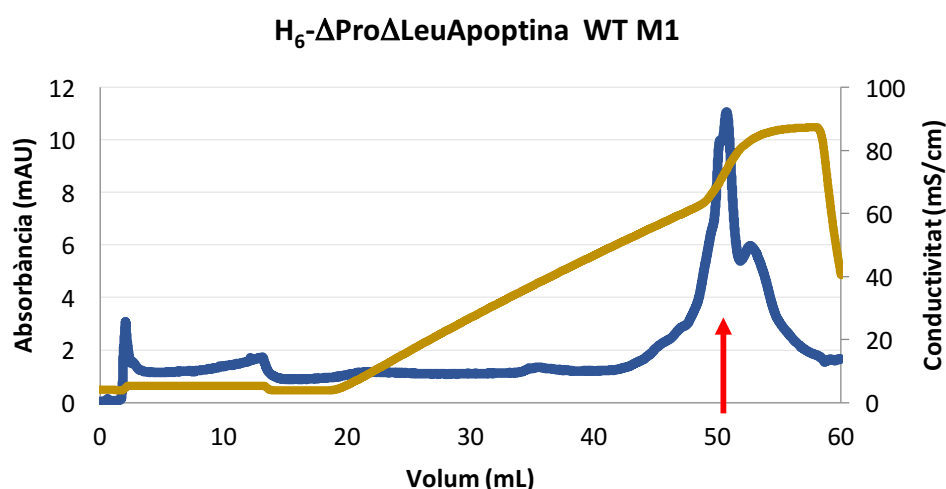


Figura 17. Cromatogrames de l'anàlisi per cromatografia d'intercanvi catiónic de la fracció M1 de l'H₆-ΔProΔLeuAoptina WT. La fletxa vermella indica el pic corresponent a l'elució de la proteïna H₆-ΔProΔLeuAoptina WT de la mostra M1.

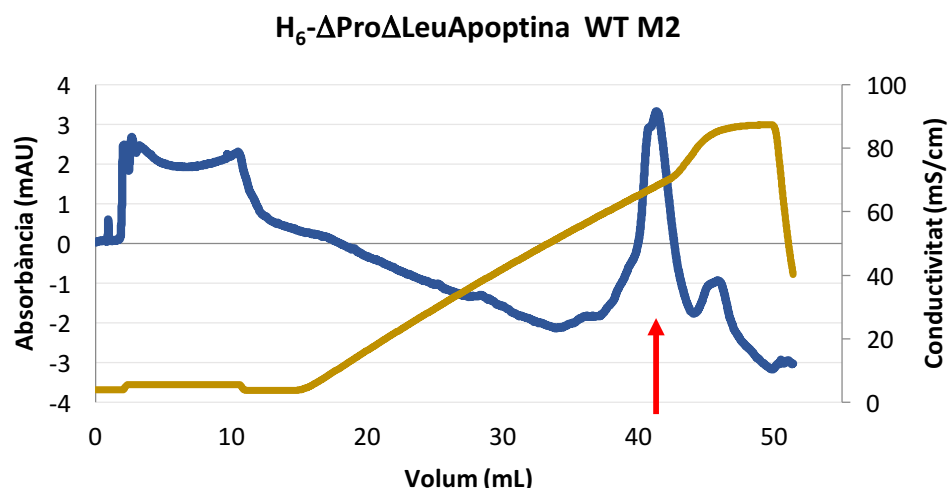


Figura 18. Cromatogrames de l'anàlisi per cromatografia d'intercanvi catiònic de la fracció M2 de l'H₆-ΔProΔLeuAptina WT. La fletxa vermella indica el pic corresponent a l'elució de la proteïna H₆-ΔProΔLeuAptina WT de la mostra M2.

La cromatografia d'intercanvi catiònic, presenta una reïna carregada negativament amb la qual interaccionen les proteïnes amb diferent força i, permet separar les molècules en funció de la seva càrrega. Partint d'aquesta base, s'esperava que la proteïna de la mostra M1 (que creïem que es trobava unida a glutatió) quedés retinuda amb menys força ja que, el glutatió addiciona càrrega negativa a la proteïna. Es preveia doncs, que la proteïna de la mostra M1, eluís a conductivitats menors que la proteïna de la mostra M2 (que creïem no unida a glutatió). A diferència dels resultats esperats, les dades obtingudes van revelar que a la mostra M1, l'H₆-ΔProΔLeuAptina WT eluïa a una conductivitat d'aproximadament 58,6 mS/cm, mentre que la mostra M2 l'H₆-ΔProΔLeuAptina WT eluïa a una conductivitat a 50,6 mS/cm. Aquest fet, va invalidar la primera hipòtesi plantejada. Es va decidir tractar una mostra de H₆-ΔProΔLeuAptina amb un agent reductor que alliberés el glutatió unit a la mostra per tal de detectar, mitjançant cromatografia d'exclusió molecular, quina de les dues fraccions es trobava realment unida a glutatió.

El TCEP és un agent reductor més fort que el glutatió que no presenta grups tiol de manera que, no ha de ser extret de la mostra. Té la capacitat de reduir els enllaços disulfur entre els residus de cisteïna de la proteïna o els de la proteïna amb el glutatió. D'aquesta manera, tractant la mostra amb el TCEP s'eliminen els enllaços disulfur amb el glutatió unit però el compost TCEP no s'uneix a aquests enllaços (Wingfield, 2016).

Es va preparar una solució de TCEP 100 mM en tampó de gel filtració (50 mM Tris, 150 mM NaCl i 1 mM EDTA a pH 7,4 amb àcid acètic). Seguidament, es va dissoldre la proteïna H₆-ΔProΔLeuAptina purificada segons el mètode B.2 (que contenia la forma dimèrica i les dues formes monomèriques, M1 i M2) i es van fer dues alíquotes. Una de les alíquotes, es va incubar amb la solució de TCEP i l'altre, només amb tampó durant 2h a 37°C. Finalment, es van sotmetre a una cromatografia d'exclusió molecular (**figura 19**). La mostra tractada amb TCEP va presentar un únic pic corresponent al monòmer M1, en canvi, a la mostra sense tractar amb TCEP es va observar la presència dels dos pics de monòmer (M1 i M2). Així doncs, aquest experiment va confirmar que la fracció que contenia glutatió era la fracció M2.

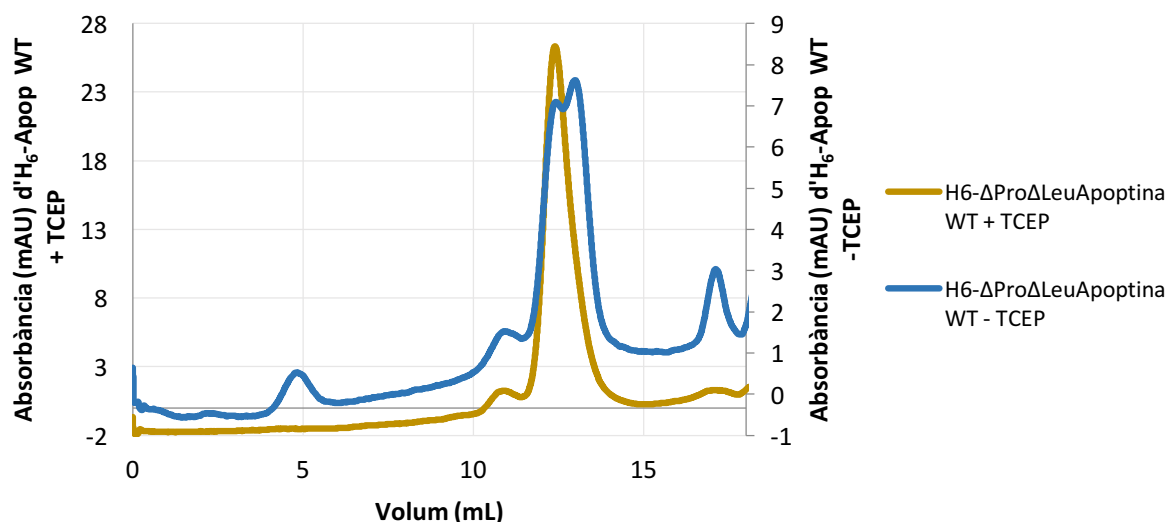


Figura 19. Cromatograma de la purificació per cromatografia líquida d'alta eficiència d'exclusió de l'H₆-ΔProΔLeuApoptina WT tractada amb el compost TCEP i sense tractar.

A partir d'aquests resultats vam pensar que el glutatió unit a l'Apoptina en la fracció M2, podria haver interaccionat amb les càrregues positives de la proteïna augmentant el seu grau de compactació (disminuint la seva mida), fent que quedés més retinguda a la cromatografia d'exclusió molecular. Aquest fet provocaria que la proteïna eluís amb posterioritat a la proteïna sense glutatió corresponent a la fracció M1.

Finalment, mitjançant el tractament amb el compost TCEP es va obtenir la proteïna amb la forma monomèrica sense presència de glutatió, per tant, es va augmentar el rendiment de la proteïna.

VI. Rendiments

A l'inici del projecte, es va realitzar la producció de totes les variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina mitjançant el mètode A, però es van perdre totes, principalment, en el procés de concentrar la mostra. Degut a això, ens vam plantejar realitzar una segona producció de totes les variants però aquesta vegada utilitzant els diferents mètodes esmentats anteriorment per tal de poder comparar els resultats i decidir modificar el protocol o no en futurs experiments. Tal i com es pot observar a la **taula 3**, el rendiment obtingut mitjançant el nou protocol de purificació (B.1 i B.2), de manera general, presenta rendiments clarament superiors al mètode convencional (a través del qual s'havia produït la pèrdua total de la proteïna). A part de la millora en el rendiment de producció de la proteïna, aquest nou mètode també va presentar millores temporals i econòmiques.

Comparant les dues variants del mètode B (B.1 i B.2) on s'avaluava l'efecte del procés de liofilització, no es pot determinar una millora significativa en el rendiment de les proteïnes ja que aquests resultats presentaven molta variabilitat en funció de la variant utilitzada. Respecte les variants P31A i P40A, el procés mostra un augment en el rendiment però en la variant salvatge (WT) es veu el procés invers. Així doncs, caldria realitzar noves produccions amb els dos mètodes per tal de corroborar que s'optimitza el rendiment del procés.

Respecte la proteïna GST-Ppil3, es va produir utilitzant el mètode usat prèviament en el grup (Ferrer, 2017) amb el qual s'havia obtingut un rendiment de 120 mg/L realitzant l'elució de la proteïna amb tampó PBS i 20 mM de glutatió reduït. En aquest projecte, es va realitzar el mateix protocol eluint la proteïna amb tampó PBS i 4 mM de glutatió reduït. El rendiment assolit amb aquest procés va ser de 10,281 mg/L, resultat força inferior que treballs anteriors realitzats al grup de recerca (Ferrer, 2017). Tot i que a la **figura 10** es veu una gran quantitat de proteïna eluïda, podria haver quedat part de la proteïna GST-Ppil3 unida a la reïna disminuint el rendiment total del procés. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi caldria realitzar un experiment on, partint

de la mateixa mostra, es realitzés el procés d'elució amb els dos tampons (PBS amb 4 mM i 20 mM de glutatió reduït) per veure si el tampó PBS amb 4 mM de glutatió reduït permet o no, l'elució total de la proteïna.

A la següent taula (**taula 3**) hi ha un recull dels rendiments obtinguts de cada variant en funció de la fracció i del mètode de purificació utilitzat.

Taula 3. Comparació dels rendiments (mg de proteïna per litre de cultiu) obtinguts utilitzant els diferents mètodes de producció

Mètode	Proteïna	Rendiment (mg/L)
A	P12A M1	0,401
A	P12A M2	0,371
B.1	P31A M1	2,040
B.1	P31A M2	2,656
B.2	P31A M1	2,543
B.2	P31A M2	2,657
A	P38A M1	1,417
A	P38A M2	0,136
B.1	P40A M1	0,421
B.1	P40A M2	0,408
B.2	P40A M1	1,201
B.2	P40A M2	1,204
B.1	WT M1	3,384
B.1	WT M2	2,507
B.2	WT M1	1,903
B.2	WT M2	1,856
GSTrap	GST-Ppil3	10,281

VII. Interacció entre GST-Ppil3 - H₆-ΔProΔLeuApoptina

Una vegada obtingudes les diferents variants de l'H₆-ΔProΔLeuApoptina purificades i liofilitzades, es va realitzar un assaig *pull-down* per tal d'intentar comparar la constant d'afinitat de les variants amb GST-Ppil3. Per això, es va dissenyar un experiment en el que s'incubaven diferents concentracions de GST-Ppil3 amb 20 µl de reïna Ni-NTA a la qual s'havia immobilitzat una quantitat constant de H₆-ΔProΔLeuApoptina (**figura 20**). L'assaig es va fer en *batch*, és a dir, s'eliminava la fase mòbil per centrifugació. Un cop eluït l'excés de GST-Ppil3 es volia comparar la quantitat de variant d'Apoptina que havia quedat capturada en cada cas. Per tal de descartar interacció inespecífica de l'Apoptina amb la reïna, es va incloure un control en el que no s'havia immobilitzat H₆-ΔProΔLeuApoptina a la reïna. Posteriorment es va analitzar per SDS-PAGE la presència de GST-Ppil3 a la reïna i a l'eluït.

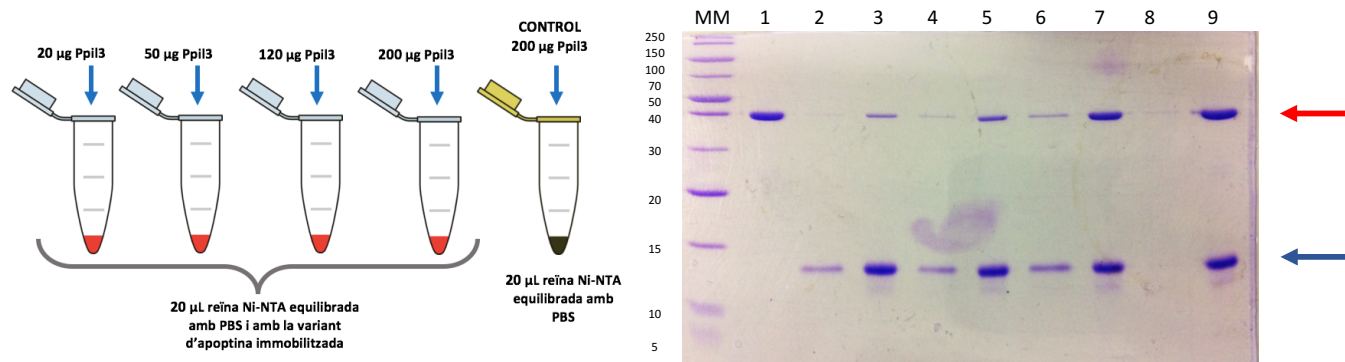


Figura 20. A la part esquerra es pot veure una representació gràfica de l'experiment d'interacció entre les variants d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina i GST-Ppil3. A la part dreta es veu el gel SDS-PAGE de l'experiment d'interacció entre la variant d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P31A (indicada amb una fletxa blava) i GST-Ppil3 (indicada amb una fletxa vermella). El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Control negatiu de GST-Ppil3 en reina Ni-NTA sense Apoptina (2) Sobrenedant de la mostra de 20 µg de GST-Ppil3 després d'interaccionar i centrifugar (3) Reina de Ni-NTA de la mostra de 20 µg de GST-Ppil3 després d'interaccionar i centrifugar (4) Sobrenedant de la mostra de 50 µg de GST-Ppil3 (5) Reina de Ni-NTA de la mostra de 50 µg de GST-Ppil3 (6) Sobrenedant de la mostra de 120 µg de GST-Ppil3 (7) Reina de Ni-NTA de la mostra de 120 µg de GST-Ppil3 (8) Sobrenedant de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3 (9) Reina de Ni-NTA de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3

Tal i com es pot observar a la **figura 20**, al carril corresponent al control negatiu apareixia una banda clarament marcada corresponent a la proteïna GST-Ppil3 (46,6 kDa). Encara que no hi havia la presència d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina (10,8 kDa), hi va haver unió de GST-Ppil3 amb la reina de Ni-NTA indicant que es produïa interacció inespecífica. Aquest fet va invalidar els resultats obtinguts en aquest assaig de *pull-down*.

Per això, es va realitzar un segon experiment per tal de trobar unes condicions en les que no es produís aquesta interacció inespecífica. En aquest cas, es van incubar diferents concentracions de GST-Ppil3 amb la reina Ni-NTA i es van realitzar diferents rentats amb tampó PBS que contenia 20 mM i 40 mM d'imidazol (veure **figura 21**). Posteriorment, es va analitzar per SDS-PAGE.

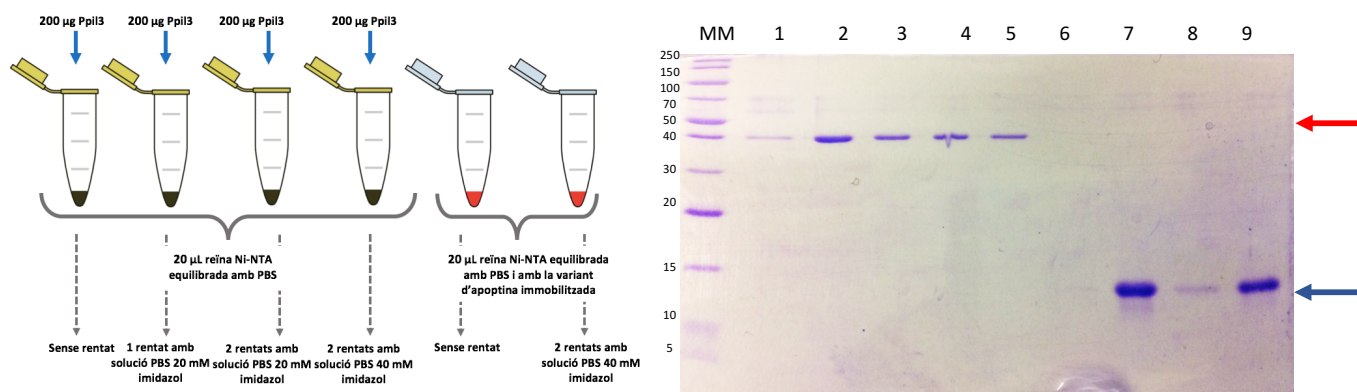


Figura 21. A la part esquerra, de la figura es pot veure una representació gràfica de l'experiment d'interacció de GST-Ppil3 i H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P31A amb reina d'agarosa Ni-NTA (Qiagen, Netherlands). A la part dreta, es pot veure el gel SDS-PAGE de l'experiment d'interacció entre la variant d' H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina P31A (indicada amb una fletxa blava) i GST-Ppil3 (indicada amb una fletxa vermella) afegint diferents passos de rentat. El carril MM és el marcador de pes molecular (PageRuler™ Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, USA) amb els pesos de cada banda indicats en kDa. (1) Sobrenedant de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3 després d'interaccionar i centrifugar sense realitzar cap rentat (2) Reina de Ni-NTA de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3 sense realitzar cap rentat (3) Reina de Ni-NTA de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3 realitzant un rentat amb solució 20 mM d'imidazol en PBS (4) Reina de Ni-NTA de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3 realitzant dos rentats amb solució 20 mM d'imidazol en PBS (5) Reina de Ni-NTA de la mostra de 200 µg de GST-Ppil3 realitzant dos rentats amb solució 40 mM d'imidazol en PBS (6) Sobrenedant de la mostra de reina Ni-NTA amb H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina sense rentat (7) Reina de Ni-NTA de la mostra de reina Ni-NTA amb H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina sense rentat (8) Sobrenedant de la mostra de reina Ni-NTA amb H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina amb dos rentats solució 40 mM d'imidazol en PBS (9) Reina de Ni-NTA de la mostra de reina Ni-NTA amb H_6 - Δ Pro Δ LeuApoptina amb dos rentats solució 40 mM d'imidazol en PBS.

Analitzant el gel SDS-PAGE obtingut de l'experiment per detectar interaccions inespecífiques, tot i realitzar rentats a diferents concentracions d'imidazol, es va detectar la presència d'interaccions inespecífiques entre la proteïna GST-Ppil3 i la reïna d'agarosa Ni-NTA. Aquest fet no es va poder explicar ja que, dins del grup de recerca, s'havien realitzat diversos experiments de *pull-down* entre aquestes mateixes proteïnes i van sortir correctament (veure Ferrer, 2017).

Així doncs, per tal de poder analitzar la constant de dissociació de les diferents variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina quan interaccionen amb GST-Ppil3, caldria realitzar de nou els experiments mitjançant el protocol descrit a (Ferrer, 2017). En aquest protocol, es realitzava l'experiment mitjançant la immobilització d'H₆-ΔProΔLeuApoptina a la columna de cromatografia d'afinitat, amb una columna de Ni Sepharose 6 Fast Flow amb ions de níquel presents al medi per poder capturar la proteïna (veure Ferrer, 2017), en comptes de realitzar l'experiment en *batch*.

Per altra banda, també es podria repetir l'experiment en *batch* immobilitzant la proteïna GST-Ppil3 amb reïna Glutathione Sepharose® que interacciona amb la glutatí S-transferasa (GST) de GST-Ppil3.

Analitzant els resultats obtinguts en aquest projecte, un punt d'interès després d'analitzar la constant d'afinitat de les diferents variants d'H₆-ΔProΔLeuApoptina, seria analitzar la seva capacitat citotòxica en un laboratori de cultius cel·lulars. Amb aquest experiment, es podria veure si les mutacions incorporades també donen lloc a diferents graus de citotoxicitat. D'aquesta manera, es podrien marcar aminoàcids clau ja que, possiblement, serien dianes d'interacció d'altres proteïnes essencials per a la funció de l'Apoptina.

CONCLUSIONS

According to the objectives of this project, the following conclusions can be drawn.

- We have successfully created and produced the different Apoptin gene variants carrying the replacement of the proline residues 12, 31, 38 and 40 by alanine.
- We have set up a new protocol for the purification of Apoptin variants that increases the yield of pure protein while decreasing the time necessary to carry it on.
- We have demonstrated that the lyophilisation process, does not affect the Apoptin's yield.
- We have not been able to assay through pull-down the interaction of some of these H₆-ΔProΔLeuApoptina variants with GST-Ppil3 because of an unspecific interaction of GST-Ppil3 and Ni-NTA agarose matrix.

BIBLIOGRAFIA

- Adair, B. M. (2000). Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 24(2–3), 247–255.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., i Walter, P. (2008). Molecular biology of the cell (5th ed., pp. 1205-1266). New York: Garland Science.
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21, 167–223.
- Bullenkamp, J., i Tavassoli, M. (2014). Signalling of Apoptin. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 818, 11–38.
- Castro, J., Ribó, M., Benito, A., i Vilanova, M. (2018). Rutin as a Natural Therapy for Alzheimer's Disease: Insights into its Mechanisms of Action. *Current Medicinal Chemistry*, 23(9), 860-873.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 16(22), 10881-10890.
- Cuykendall, T. N., Rubin, M. A., i Khurana, E. (2017). Non-coding genetic variation in cancer. *Current Opinion in Systems Biology*, 1, 9–15.
- Danen-Van Oorschot, A. A. A. M., Zhang, Y. H., Leliveld, S. R., Rohn, J. L., Seelen, M. C. M. J., Bolk, M. W. Van Zon, A., Erkeland, S. J., Abrahams, J., Mumberg, D., i Noteborn, M. H. M. (2003). Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27729–27736.
- Danen-Van Oorschot, A. A. A. M., Zhang, Y., Erkeland, S. J., Fischer, D. F., Van Der Eb, A. J., i Noteborn, M. H. M. (1999). The effect of Bcl-2 on Apoptin in 'normal' vs transformed human cells. *Leukemia*, 13, 75–77.
- Ferrer, C. (2017). Purification and in vitro analysis of Apoptin's interaction with GST-Ppil3 and Bca3. Final Grade Project. Universitat de Girona.
- Forman, H. J., Zhang, H., i Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 30, 1–12.
- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M.L., Mattanovich, D., i Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories*, 7, 11.
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Bray, J., Gileadi, O., i Knapp, S. et al. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135-146.
- Gupta, G. P., i Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4), 679–695.
- Huo, D. H., Yi, L. N., & Yang, J. (2008). Interaction with GST-Ppil3 leads to the cytoplasmic localization of Apoptin in tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 14–18.
- Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V., i Perelmuter, V. M. (2015). Cancer invasion: Patterns and mechanisms. *Acta Naturae*, 7(2), 17–28.

- Kuusisto, H. V., Wagstaff, K. M., Alvisi, G., i Jans, D. A. (2008). The C-terminus of apoptin represents a unique tumor cell-enhanced nuclear targeting module. *International Journal of Cancer*, 123(12), 2965–2969.
- Leliveld, S. R., Dame, R. T., Rohn, J. L., Noteborn, M. H. M., i Abrahams, J. P. (2004). Apoptin's functional N- and C-termini independently bind DNA. *FEBS Letters*, 557(1–3), 155–158.
- Los, M., Panigrahi, S., Rashedi, I., Mandal, S., Stetefeld, J., Essmann, F., i Schulze-Osthoff, K. (2009). Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(8), 1335–1342.
- Poon, I.K.H., Oro, C., Dias, M.M., Zhang, J., i Jans, D. a (2005b). Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells. *Cancer Research*, 65, 7059–7064.
- Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med*, 79(3–4), 123–130.
- Roulston, A., Marcellus, R., i Branton, P. (1999). Viruses and Apoptosis. *Annual Review Of Microbiology*, 53(1), 577–628.
- Ruiz-Martínez, S. (2016). Structural and functional characterization of Apoptin and design of a monomeric variant with antitumor activity. Doctoral Thesis Universitat de Girona.
- Ruiz-Martínez, S., Pantoja-Uceda, D., Castro, J., Vilanova, M., Ribó, M., Bruix, M., Benito, A., i Laurents, D. V. (2017). Insights into the mechanism of Apoptin's exquisitely selective anti-tumor action from atomic level characterization of its conformation and dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 614, 53–64.
- Santos, C. A., Beloti, L. L., Toledo, M. A. S., Crucello, A., Favaro, M. T. P., Mendes, J. S., Santiago, A. S., Azzoni, A.R., i Souza, A. P. (2012). A novel protein refolding protocol for the solubilization and purification of recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein from *Xylella fastidiosa* overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(2), 284–289.
- Schein, C.H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *BioTechnology*, 7, 1141–1148.
- Sørensen, H. P., i Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–8.
- Vivet, R. (2016). Cloning, production and purification of proteins that interact with Apoptin. Final Grade Project. Universitat de Girona.
- Wingfield, P. T. (2016). Use of Protein Folding Reagents, (1972), 1–11.
- You, J., & Jones, P. (2012). Cancer Genetics and Epigenetics : Two Sides of the Same Coin?. *Cancer Cell*, 22(1), 9–20.