

Títol del treball:

Desenvolupament d'un sistema d'entrega de fàrmacs proteics antitumorals produït en *Escherichia coli* basat en la proteïna majoritària de la volta eucariota

Estudiant: Arnau Casadevall Monells

Correu electrònic: arnaucm2001@gmail.com

Grau en Biotecnologia

Tutor: Dr. Antoni Benito Mundet

Correu electrònic: antoni.benito@udg.edu

AGRAÏMENTS

Aquest Treball de Final de Grau ha estat possible gràcies a la col·laboració i ajuda de diverses persones, sense elles el meu treball no hagués estat el mateix.

En primer lloc, agraeixo la dedicació, orientació, consells i suport a tot el grup de recerca del qual n'he format part durant tot aquest any i en especial al meu tutor Antoni Benito Mundet, el qual sempre ha estat disposat a ajudar-me i explicar-me qualsevol dubte que tenia, donar-me un cop de mà en protocols més complexos i anar-me guiant durant tot el projecte.

M'agradaria agrair també a una de les companyes del grup de recerca, Jessica Castro Gallegos, la qual m'ha ajudat en el revelat del western blot i en la utilització del lector Chemiluminescent HRP substrate, el qual tenia un mètode d'utilització nou per mi.

Finalment, agraeixo l'ajuda brindada per Christian Sánchez Peral, el qual va ser l'estudiant que va realitzar el Treball de Final de Grau l'any anterior i que em va donar un cop de mà en totes les etapes inicials del meu treball.

A tots aquells que d'una manera o altra m'han ajudat, encara que el seu nom no figuri de forma explícita en aquestes línies, sense ells tampoc hauria estat possible.

Gràcies a tots per ajudar-me en aquest projecte tan prometedor.

ÍNDEX

RESUM	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
REFLEXIÓ ÈTICA	VIII
REFLEXIÓ DE SOSTENIBILITAT	VIII
PERSPECTIVA DE GÈNERE	VIII
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Proteïnes antitumorals	1
1.2. Tractaments actuals contra el càncer	1
1.3. Sistema d'entrega de fàrmacs.....	2
1.4. Volta eucariota	3
2. OBJECTIVES	6
3. MATERIALS I MÈTODES	7
3.1. Soques bacterianes	7
3.1.1. <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	7
3.1.2 <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3).....	7
3.2 Vectors	7
3.2.1 pTriEx-1,1-MVP-TPP-H6.....	7
3.2.2 pGex-INT.....	7
3.3. Medis de cultiu i antibiòtics	8
3.3.1. Medi LB	8
3.3.2. Antibiòtics	8
3.4. Tècniques de DNA recombinant.....	8
3.4.1. Obtenció de DNA plasmídic	8
3.4.2. Digestió del DNA.....	8
3.4.3. Fosfatasa alcalina	9
3.4.4. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa	9

3.4.5. Lligament del DNA	9
3.4.6. Preparació de les cèl·lules competents	9
3.4.7. Transformació de les cèl·lules competents	10
3.5 Producció i purificació de la proteïna	10
3.5.1. Expressió del recombinant.....	10
3.5.2. Fraccionament cel·lular	10
3.5.3. Purificació de MVP-TPP-H6.....	11
3.5.4. Purificació de GST-GFP-INT.....	11
3.6. Replegaments de la proteïna desnaturalitzada	11
3.7. Detecció i quantificació de les proteïnes	12
3.7.1. SDS-PAGE	12
3.7.2 Western-blot	12
3.7.3 Quantificació de proteïna	13
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	14
4.1. Clonatge del gen que codifica per la GFP dins el plasmidi pGEX-INT	14
4.2. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT	15
4.2.1. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sobrenedant amb condicions inicials	16
4.2.2. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sediment resuspès en urea amb condicions inicials	17
4.2.3. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sobrenedant mantenint la cadena del fred	18
4.2.4. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sediment resuspès en condicions diferents.....	18
4.3. Assaig de replegament de la MVP per prendre l'estructura de volta i incorporar la GST-GFP-INT.....	20
6. CONCLUSIONS.....	23
7. BIBLIOGRAFIA.....	23

RESUM

Un dels objectius del grup de recerca en el que m'he integrat durant la realització del meu TFG és el desenvolupament de ribonucleases humanes dirigides a nucli com agents antitumorals. Malgrat que aquestes variants són molt actives i selectives contra cèl·lules tumorals *in vitro*, la seva activitat *in vivo* és limitada degut a problemes de farmacocinètica. Per això, s'estan desenvolupant diferents projectes per tal de millorar-la. Actualment, s'està dissenyant un sistema d'entrega de fàrmacs (DDS) que contrarestarà part d'aquests inconvenients. Un DDS és una nanopartícula que envolta el fàrmac, facilitant la seva arribada al teixit diana i protegint-lo de la seva eliminació. En concret, el DDS es basa en aprofitar una nanopartícula proteica humana, la volta eucariota. La seva estructura és de gran interès gràcies a la seva baixa immunogenicitat, la seva estabilitat *in vitro* i a que és possible produir estructures similars buides per dins expressant la proteïna principal d'aquesta estructura, la MVP. Aquesta estructura recombinant és capaç d'encapsular agents terapèutics fusionats al domini INT. El grup està intentant produir de manera recombinant la MVP en *E. coli* per tal que formi volta eucariota amb un pèptid penetrador de tumors (TPP) que permeti encapsular una ribonucleasa citotòxica fusionada al domini INT. Com a eina per facilitar aquest desenvolupament, aquest projecte ha dissenyat una proteïna cargo que ens permeti determinar la funcionalitat d'aquesta volta recombinant. Aquest cargo consisteix en una proteïna de fusió entre el domini INT, la GFP i la glutatíon S-transferasa. S'han assajat diferents sistemes de purificació de la proteïna cargo GST-GFP-INT, tant a partir del sobrenedant com del sediment d'un lisat de cèl·lules i s'ha establert un protocol que permet obtenir-la en quantitat significativa i relativament pura. Mostrem que aquesta proteïna es pot encapsular dins d'una nanopartícula formada a partir del replegament de la MVP.

RESUMEN

Uno de los objetivos del grupo de investigación en el que me he integrado durante la realización de mi TFG es el desarrollo de ribonucleasas humanas dirigidas a núcleo como agentes antitumorales. A pesar de que estas variantes son muy activas y selectivas contra células tumorales *in vitro*, su actividad *in vivo* es limitada debido a problemas de farmacocinética. Por eso, se están desarrollando diferentes proyectos para mejorarla. Actualmente, se está diseñando un sistema de entrega de fármacos (DDS) que contrarrestaría parte de estos inconvenientes. Un DDS es una nanopartícula que rodea el fármaco, facilitando su llegada al tejido diana y protegiéndolo de su eliminación. En concreto, el DDS se basa en aprovechar una nanopartícula proteica humana, la bóveda eucariota. Su estructura es de gran interés debido a su baja inmunogenicidad, su estabilidad *in vitro* y por la posibilidad de producir estructuras similares vacías por dentro expresando la proteína principal de esta estructura, la MVP. Esta estructura recombinante es capaz de encapsular agentes terapéuticos fusionados al dominio INT. El grupo está intentando producir de manera recombinante la MVP en *E. coli* para que forme la vuelta eucariota con un péptido penetrador de tumores (TPP) que permita encapsular una ribonucleasa citotóxica fusionada al dominio INT. Como herramienta para facilitar este desarrollo, este proyecto ha diseñado una proteína cargo que nos permita determinar la funcionalidad de esta vuelta recombinante. Este cargo consiste en una proteína de fusión entre el dominio INT, la GFP y la glutatión S-transferasa. Se han ensayado diferentes sistemas de purificación para la proteína cargo GST-GFP-INT, tanto a partir del sobrenadante como del sedimento de un lisado de células y se ha establecido un protocolo que permite obtenerla en cantidad significativa y relativamente pura. Mostramos que esta proteína se puede encapsular dentro de una nanopartícula formada a partir del repliegue de la MVP.

ABSTRACT

One of the objectives of the research group in which I joined during my TFG is the development of nuclear-directed human ribonucleases as antitumor agents. Although these variants are highly active and selective against tumor cells in vitro, their activity in vivo is limited due to pharmacokinetic issues. For this reason, different projects are being developed to improve it. Currently, a drug delivery system (DDS) is being designed that would counteract some of these drawbacks. ADDS is a nanoparticle that surrounds the drug, facilitating its delivery to the target tissue and protecting it from its elimination. Specifically, this DDS is based on taking advantage of a human protein nanoparticle, the eukaryotic vault. Its structure is interesting due to its low immunogenicity, its in vitro stability and the possibility of producing similar structures that are empty on the inside by expressing the main protein of this structure, which is the MVP. This recombinant structure is capable of encapsulating therapeutic agents fused to the INT domain. The group is attempting to recombinantly produce MVP in *E. coli* to form the eukaryotic vault with a tumor penetrating peptide (TPP) to encapsulate a cytotoxic ribonuclease fused to the INT domain. As a tool to facilitate this development, in this project we designed a cargo protein that allows us to determine the functionality of this recombinant vault. This cargo consists of a fusion protein between the INT domain, GFP and glutathione S-transferase. Different purification systems have been tested for GST-GFP-INT cargo protein, both from the supernatant and from the sediment of a cell lysate, and a protocol has been established that allows it to be obtained in a large amount and purity. We show that this protein can be encapsulated within a nanoparticle formed from the refolding of MVP.

REFLEXIÓ ÈTICA

El grup de recerca del qual formo part se centra en l'Enginyeria de proteïnes i el projecte en el qual estic participant consisteix en la producció d'una proteïna eucariota en un hoste procariota utilitzant tècniques de DNA recombinant.

Respecte a la política d'autories del grup, ordenen els noms sempre seguint un mateix patró. El primer signant sol ser la persona que ha portat a terme la contribució més important dins el projecte. S'han donat casos en els quals s'han inclòs autors que no havien realitzat cap contribució en el projecte. Això es pot deure al "Publish and Perish", una pressió a la qual es veuen involucrats els investigadors i que porta a cometre errors com els mencionats anteriorment ^[1]. La política usada en el grup de recerca, reconeix objectivament el treball realitzat per cada participant.

REFLEXIÓ DE SOSTENIBILITAT

Per al desenvolupament dels diferents protocols utilitzats durant tot el projecte s'han seguit totes les normes de laboratori i els protocols d'ús dels diferents reactius, manipulació de material estèril i gestió adequada dels residus generats durant el procés. Sempre s'ha tingut en compte l'ús de la quantitat mínima de reactius i material necessari. També s'ha realitzat una gestió correcta de recursos no energètics com és el cas de l'aigua, la qual s'ha portat a terme un consum responsable en tot moment. El material biològic ha estat degudament esterilitzat i eliminat. Totes les consideracions de seguretat del treball en el laboratori sempre s'han seguit per tothom per tal d'evitar qualsevol tipus d'accident possible.

PERSPECTIVA DE GÈNERE

El projecte del qual formo part, es troba dins el grup de recerca d'Enginyeria de Proteïnes de la Universitat de Girona. Aquest, està format per dos investigadors principals, els quals són homes mentre que les investigadores són dones. Algunes de les causes podria ser que la dona ha hagut d'interrompre les seves carreres degut a la maternitat o a la idea principal que s'ha tingut durant tota la història de la ciència, on la investigació era una activitat per a homes i incompatible amb altres ocupacions quotidianes ^[2]. Aquest últim fet se l'anomena Terra Enganxós i ve causat per tota aquesta sèrie d'estereotips mencionats anteriorment. En el cas del meu grup de recerca, cal destacar que tot i que actualment hi ha dos homes com a investigadors principals, fins fa uns anys hi havia una dona la qual va demanar voluntàriament la seva substitució com a investigadora principal.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Proteïnes antitumorals

Les ribonucleases són uns agents molt prometedors per a l'ús en teràpies anticàncer. Un exemple clar és el cas de l'onconasa, la qual prové de la granota lleopard del nord, i que manifesta efecte citotòxic i citostàtic [3]. Una de les ribonucleases citotòxiques pancreàtiques humanes descrites és la PE5, la qual té la capacitat de degradar el RNA nuclear i induir l'apoptosi de les cèl·lules canceroses. La generació de variants citotòxiques de ribonucleases humanes permetria reduir la immunogenicitat i la toxicitat renal. A més les ribonucleases humanes solen ser resistents a inhibidors de ribonucleases citosòliques i podrien ser dirigides cap a tumors específics. La ribonucleasa pancreàtica humana (PE5) conté en la seva estructura un senyal de localització nuclear (NLS), la qual és reconeguda per la α -importina i internalitzada [4]. El domini NLS dirigeix la proteïna cap al nucli, en concret, el nuclèol [5], on els inhibidors de ribonucleases són absents. Per contra, tot RNA que no es trobi en el nucli no serà degradat [6].

1.2. Tractaments actuals contra el càncer

Actualment, la quimioteràpia, la cirurgia i la radioteràpia són els tractaments contra el càncer més comuns, tot i que n'hi ha d'altres com la teràpia dirigida o la utilització d'anticossos monoclonals. A causa de l'heterogeneïtat de càncers, el seu tractament depèn de diversos factors.

La quimioteràpia principalment pretén provocar danys en el DNA, el qual presenta una certa especificitat per les cèl·lules canceroses tot i que també afecta cèl·lules sanes, provocant efectes secundaris adversos i l'augment del risc de càncers secundaris conseqüència de la genotoxicitat dels agents [7].

Per altra banda, respecte al tractament de càncers amb cirurgia i radioteràpia, són la base del tractament de tumors sòlids. La radioteràpia es basa en l'emissió de radiació exclusivament a les cèl·lules canceroses, evitant danyar la pell [8].

Aquests tres mètodes de tractar els càncers, no són especialment dirigits cap a les cèl·lules tumorals i poden afectar a cèl·lules sanes, de manera que s'està donant molta importància als anticossos monoclonals els quals proveeixen especificitat i baixa toxicitat [8].

La teràpia dirigida consisteix en la utilització d'inhibidors farmacològics específics per un grup, fins ara reduït de molècules primordials per l'augment dels efectes antiproliferatius i citotòxics sobre cèl·lules tumorals [9].

L'ús de fàrmacs té inconvenients com la presència de resistència intrínseca i adquirida. La resistència intrínseca provoca una reducció de l'eficàcia del fàrmac. Algunes de les causes de la resistència intrínseca poden ser mutacions en la majoria dels tumors que disminueix l'efectivitat del fàrmac pel tumor i l'heterogeneïtat dels tumors ^[10]. Per altra banda, tenim la resistència adquirida per l'aparició d'un segon oncogen no silenciada pel fàrmac usat i que continua la proliferació del tumor, mutacions i alteracions de l'expressió de la molècula objectiu del fàrmac o de canvis en el microambient del tumor ^[10].

Es creu que en els tumors hi ha un grup de cèl·lules tumorals anomenades cèl·lules mare del càncer (CSC), capacitades d'iniciar tumors, la proliferació de cèl·lules malignes i que pot derivar a qualsevol cèl·lula del tumor ^[11]. i es consideren potencials dianes pel tractament amb fàrmacs amb les cèl·lules mare de càncer com a cèl·lules objectiu ^[12].

1.3. Sistema d'entrega de fàrmacs

Algunes de les teràpies actuals amb més potencial estan basades en l'administració de proteïnes recombinants que s'han optimitzat per incrementar la seva vida mitja. Tots aquests efectes adversos es poden evitar a partir de dosis múltiples o altes administracions per tal d'assolir la concentració desitjada a la cèl·lula o òrgan diana ^[13]. A la vegada, les proteïnes i molècules petites s'han de protegir normalment utilitzant sistemes d'entrega de fàrmacs ^[14].

Aquests, sistemes d'entrega de fàrmacs serveixen per distribuir de forma eficient medicaments per a la teràpia del càncer. Es tracta de la fabricació de dispositius de transport de medicaments amb alliberament programat que permet el transport, la protecció i l'alliberament de la substància farmacològica, normalment en una diana concreta, tot i que aquesta última qualitat és la més complicada d'adquirir ^[15].

Aquest, a la vegada es poden dissenyar per millorar la seva eficàcia, com pot ser el de lliurament a una diana molt concreta. Per tal de ser un bon sistema d'entrega de fàrmacs o Drug Delivery System (DDS), aquest hauria de ser capaç d'alliberar la seva càrrega en el moment, lloc, concentració idonis seguint una bona farmacocinètica ^[16].

Per una banda, tenim les nanopartícules compostes per polímers biodegradables o políplexes, que compleixen els requisits de seguretat en la seva administració, com ara la capacitat de transferir-se a un aerosol, l'estabilitat davant les forces generades durant l'aerosol, la biocompatibilitat, l'orientació a llocs específics o poblacions cel·lulars específiques, l'alliberament del fàrmac d'una manera predeterminada i la degradació en un període de temps acceptable ^[17].

Per altra banda, també s'usen com a Drug Delivery System (DDS) els liposomes els quals són una doble capa fosfolipídica amb una capa interna aquosa i soluble en aigua. Normalment, són vesícules esfèriques que poden ser produïdes a partir de colesterol, surfactants no tòxics, esfingolípids, glicolípids àcids grassos de cadena llarga i proteïnes de membrana [18].

També s'ha vist que poden ser útils les microbombolelles (microesferes plenes de gas), que primerament s'han fet servir per a l'entrega de material genètic com plasmidis de DNA, ja que l'entrega d'aquests no es pot realitzar a partir de vectors virals a causa de limitacions en la mida. Aquestes microbombolelles presenten les qualitats adequades per fer una entrega de càrregues terapèutiques en llocs específics i amb especificitat d'òrgan. Aquestes microbombolelles es dirigeixen cap a les localitzacions específiques a partir d'ultrasons [19].

Un altre DDS es basa en l'ús de bacteris per a l'entrega de fàrmacs. S'han trobat bacteris que poden ser útils com a vectors genètics biològics amb especificitat per un tumor amb capacitat d'entrega de productes genètics, a partir d'administració per via intravenosa [19].

1.4. Volta eucariota

Les voltes són ribonucleoproteïnes que es troben majoritàriament en cèl·lules eucariotes i absents en procariotes.

Aquestes nanocàpsules són considerades les ribonucleoproteïnes més grans en eucariotes. Presenten una mida de 40 x 70 nm, 13MDa *Figura 1*, amb una estructura en forma de barril amb dos taps que sobresurten i una cintura invaginada basada en un autoacoblament jeràrquic de proteïnes. Cada volta està formada per múltiples còpies de tres proteïnes les quals són la MVP, la vPRAP i TEP1. La proteïna principal, la "major vault protein" (MVP, 100 kDa), representa el 75% de la massa de la volta [20]. Per altra banda, el domini que permet encapsular cargos a la volta eucariota és el domini INT, que es troba en l'extrem C terminal de la proteïna vPRAP i que interacciona amb l'extrem N-terminal de la proteïna MVP [21].

L'arquitectura tancada s'obté a partir de la formació del dímer de dues mitges voltes on cada mitja volta conté 39 subunitats de MVP [22].

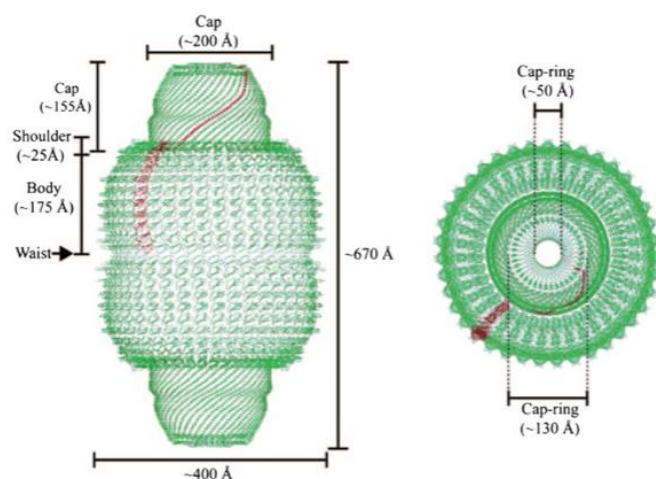


Figura 1: Representació de la part externa de la volta diferenciant amb color granat una molècula de MVP, mentre que a l'interior hi ha les altres dues proteïnes mencionades. A l'esquerra de la imatge es pot observar una vista lateral de la volta on es pot veure que consta d'un polímer de 78 oligòmers de molècules de MVP. La partícula té dos caps que sobresurten, dues espatlles i un cos amb una cintura invaginada. Dues partícules de mitja volta s'associen a través de la cintura mitjançant els dominis N-terminalis de la MVP. A la imatge de la dreta hi ha una vista superior on es pot veure el diàmetre exterior i interior [22].

A partir de diferents cèl·lules d'insecte o humanes s'han produït estructures similars a les voltes amb l'expressió única del gen de la proteïna MVP, la qual semblaria presentar la capacitat, per si sola, de generar la volta sense necessitat d'associació a les altres dues proteïnes [20].

Una de les facultats que tenen les voltes proteiques és la seva habilitat per encapsular proteïnes cargo a partir de dues estratègies diferenciades, les quals són la fusió de la proteïna cargo amb l'extrem N-terminal de la MVP o la fusió de la proteïna cargo amb el pèptid INT [23]. En el cas de la volta, a l'estar formada per l'autoacoblament de proteïnes, ofereix l'oportunitat de modificar la superfície mitjançant tècniques d'enginyeria genètica o mitjançant la conjugació d'altres proteïnes [24]. D'aquesta manera s'ha aconseguit centrar el tractament amb aquesta volta direccionant-la cap a un tipus concret de cèl·lules canceroses com les cèl·lules mare canceroses [21]. Aquestes voltes, quan arribin a la diana concreta seran internalitzades via macropinosi o fagocitosi [25]. Les voltes proteiques estan esdevenint un dels nanovehicles més prometedors per totes les seves propietats, com poden ser la seva mida, el seu lumen és prou gran per encapsular centenars de molècules proteiques, protegeixen la proteïna cargo, la seva biodegradabilitat i biocompatibilitat i sobretot que no són immunogèniques [24].

Actualment, la producció de la volta recombinant s'està realitzant principalment en cèl·lules de *Spodoptera frugiperda*, on la MVP s'autoacobla per si sola. Per contra, el sistema és molt costós i la seva purificació molt complexa ^[20].

Els bacteris són fàbriques excel·lents gràcies a la seva simplicitat en termes de bioquímica i fisiologia ^[26]. Els processos bacterians sempre són més econòmics que els processos en cèl·lules eucariotes perquè requereixen menor cost en medis de cultiu i temps més curts. *Escherichia coli* és el sistema d'expressió més popular ^[27].

2. OBJECTIVES

Previous research has achieved the conditions that allow the refolding of the MVP in a structure that is able to specifically internalize a fusion protein between the glutathione S-transferase (GST) and the INT domain. This final grade project has been developed with the aim of creating a new recombinant cargo that includes the green fluorescence protein (GFP), in order to facilitate to carry out future functional studies of this MVP-based structure.

Specifically, the main objectives of this project are:

- To construct a plasmid that encodes for a fusion recombinant protein between the GST, the GFP and the INT domain.
- To develop a protocol of production and purification of the designed fusion protein with enough yield and purity.
- To investigate whether this new cargo can be internalized into the MVP-based structure and also to search for new conditions to create it.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Soques bacterianes

3.1.1. *E. coli* BL21 (DE3)

Soca utilitzada per a l'expressió de les diferents construccions que estan sota el control del promotor reconegut per la polimerasa del fag T7. Aquesta soca presenta la peculiaritat que en el gen *int* del genoma bacterià s'hi ha inserit el pròfag defectiu DE3, que prové del fag λ , de manera que el gen *int* resta inactivat, impeding l'escissió del pròfag, de manera que resta com a lisogen estable. Aquest lisogen consisteix en un fragment de DNA que conté el promotor lacUV5, fragment inicial del lacZ i que codifica per la RNA polimerasa del fag T7. D'aquesta manera l'únic promotor que pot transcriure la RNA polimerasa del fag T7 és el promotor lacUV5, el qual és induïble amb isopropil- β -D-tiogalactopiranosid (IPTG). Una vegada s'afegeix IPTG a un cultiu d'aquesta soca durant la fase exponencial de creixement, es transcriu la RNA polimerasa del fag T7, la qual transcriu únicament el gen clonat darrere el promotor reconegut per aquesta polimerasa. Aquesta soca té el genotip següent: *F*, *ompT*, *hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺*, *gal (DE3)*, *Δlon* .

3.1.2 *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

Es tracta d'una variant de BL21 DE3 que conté un plasmidi anomenat pRARE 2 que expressa els codons rars en *E. coli* AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA i CGG. També conté el gen de resistència al cloramfenicol. Presenta el genotip següent: *$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac^+ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB$* .

3.2 Vectors

3.2.1 pTriEx-1,1-MVP-TPP-H6

Vector derivat de pTriEx-1.1 Hygro que està dissenyat per permetre l'expressió del gen clonat tant en *E. coli* com en cèl·lules d'insectes i de mamífers. Presenta el promotor híbrid format pel potenciador precoç immediat de citomegalovirus (CMV) fusionat amb el promotor de la β -actina de pollastre, el promotor p10 tardà de baculovirus i el promotor T7lac que permet la inducció amb IPTG a *E. coli*. Aquest vector expressa la MVP fusionada a un pèptid penetrador de tumors (TPP) que facilita l'arribada al tumor i una cua d'histidines que permet la seva purificació per cromatografia d'afinitat.

3.2.2 pGex-INT

Es tracta d'un plasmidi derivat de pBR322 que expressa el gen de la glutatió-S-transferasa (GST) fusionada a la seqüència codificant pel domini INT. Aquesta

construcció es troba sota el control del promotor *tac*, el qual és induït per IPTG. Alhora presenta un gen *lacIq* intern, el producte del qual és una proteïna repressora que s'uneix a la regió operadora del promotor *tac*, evitant l'expressió fins a la inducció amb IPTG. Presenta el gen de resistència a ampicil·lina.

3.3. Medis de cultiu i antibiòtics

3.3.1. Medi LB

Medi utilitzat pel creixement de diferents soques bacterianes d'*E. coli*. Està compost per 5 g d'extracte de llevat, 10 g de triptona i 10 g de NaCl en un volum d'1 L d'aigua MiliQ. Una vegada s'han dissolt aquests components, s'autoclava a 120°C durant 20 minuts. Els antibiòtics són afegits al medi abans del seu ús.

3.3.2. Antibiòtics

L'ampicil·lina va ser utilitzada com a marcador de selecció per les construccions usades en aquest treball. La solució estoc és de 50 mg/mL en aigua miliQ, esterilitzada per filtració i emmagatzemada a -20°C. La concentració de treball va ser de 50µg/mL.

3.4. Tècniques de DNA recombinant

3.4.1. Obtenció de DNA plasmídic

El procés de purificació del DNA plasmídic va ser realitzat amb el Kit comercial GeneJet™ Plasmidi Miniprep Kit (Thermo Fisher), seguint el protocol que proporciona el fabricant. Els plasmidis van ser obtinguts a partir de cultius de nit de cèl·lules transformades amb cada construcció. Es va recollir el sediment de 6ml de cultiu i es va resuspendre en tampó de resuspensió que conté un quelant de cations. A continuació, es va sotmetre a lisi alcalina a partir del tampó de lisi cel·lular a pH 11 i que conté NaOH i SDS, els quals permeten la lisi cel·lular i la desnaturalització del DNA. Seguidament, es va afegir solució neutralitzadora, la qual té acetat sòdic que baixa el pH de forma brusca i provoca la precipitació del DNA genòmic i proteïnes, també té agents caotrópics que faciliten la unió a la columna. Posteriorment, es va aplicar el sobrenedant a la columna i a partir de dues centrifugacions i d'un tampó de rentat que conté etanol, es va eliminar el Través i a continuació tots els components que s'han unit de forma inespecífica a la columna. Finalment, es va afegir la solució d'elució que provoca solubilització del DNA plasmídic i es recull l'eluit.

3.4.2. Digestió del DNA

El DNA plasmídic es va digerir amb 2 µL de l'enzim de restricció *Bam*HI, incubant la reacció durant 90 minuts a 37°C en presència del tampó subministrat per Thermo Fisher Científic.

3.4.3. Fosfatasa alcalina

Un cop acabada la reacció de restricció, es va adjuntar 1 unitat enzimàtica de fosfatasa alcalina per μL de mostra en tampó de restricció i es va incubar 15 minuts addicionals a 37°C . La reacció es va aturar incubant el DNA 10 minuts a 75°C i es va repurificar el plasmidi per GeneClean.

3.4.4. Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

Les mostres de DNA es van aplicar a un gel de 1% agarosa-TAE i es van sotmetre a 110 V durant 4 minuts. Posteriorment, es van tenyir en bromur d'etidi (0,5-0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durant 15 minuts i es van visualitzar les bandes.

Es va retallar la banda corresponent al fragment de DNA d'interès i es va col·locar en un eppendorf i es va pesar el fragment de gel tallat. A continuació, es va utilitzar el kit GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) per purificar els fragments de DNA seguint el protocol proporcionat per la casa comercial. Breument, es van solubilitzar les bandes a 60°C , durant 5 minuts i amb 3 volums de tampó de solubilització, el qual conté iodur sòdic que facilita la interacció del DNA amb la columna i evita que l'agarosa torni a solidificar. A continuació, es va afegir l'agarosa fosa a la columna amb membrana de sílice del kit i es va procedir a fer una sèrie de rentats amb el tampó de rentat, per tal d'eliminar impureses i finalment es va eluir el DNA d'interès.

3.4.5. Lligament del DNA

Pel lligament es va usar 1 μL de T4 DNA lligasa (Thermo Fisher Scientific) i es va incubar la reacció 12 hores a 18°C en presència de tampó subministrat per la casa comercial Thermo Fisher Scientific. Es va realitzar en paral·lel un control de relligats en el qual no s'inclouïa el fragment a inserir.

3.4.6. Preparació de les cèl·lules competents

A partir d'un cultiu de nit de la soca que es volia transformar i que es va incubar a 37°C i 250 rpm durant tota la nit, es va reinocular fent una dilució 1/100 en medi LB fresc i es va deixar incubant 2 hores a 37°C i 250 rpm fins a una OD_{550} de 0,5 aproximadament. Es va transferir en un tub Falcon de 15 ml i es va centrifugar a 3000 rpm, durant 10 minuts i a 4°C (Heraeus multifuge 4KR, Thermo Fisher Scientific). El sediment es va resuspendre amb el mateix volum de CaCl_2 100 mM fred i estèril (10 ml) i es va deixar incubant en gel uns 30 minuts. Es va tornar a centrifugar en les mateixes condicions, es va eliminar el sobrenedant i es va resuspendre el sediment en 1/10 del volum de CaCl_2 100 mM fred i estèril. Finalment, es va resuspendre en CaCl_2 100 mM, glicerol 16%, es va al·lotar en volums de 100 μL i es van guardar a -80°C .

3.4.7. Transformació de les cèl·lules competents

Es van afegir 1 µL de miniprep o 10 µL de reaccions de lligament als 100 µL al·liquotats de cèl·lules competents i es va incubar en gel picat durant 1-2 hores. A continuació, es va incubar a 42°C durant 90 segons i seguidament es va tornar a incubar en gel durant 5 minuts produint el xoc tèrmic i l'entrada del DNA dins les cèl·lules. Es van afegir 300 µL de medi LB i es va incubar a 37°C durant 1 hora, per tal d'aconseguir la recuperació fenotípica de les cèl·lules. Després de la incubació se'n van sembrar 100µL en plaques de LB-agar suplementades amb ampicil·lina i es van incubar a 37°C unes 12-15 hores.

3.5 Producció i purificació de la proteïna

3.5.1. Expressió del recombinant

Primerament, es va fer un cultiu inicial en 10 mL de medi LB suplementat amb ampicil·lina. Es va inocular la soca transformada amb el vector d'expressió corresponent i es va incubar tota la nit a 37°C i 250 rpm. Seguidament, s'inoculà una dilució 1/100 de cultiu de nit en medi LB suplementat amb ampicil·lina i es va deixar incubant a 37°C i 250 rpm durant unes 2-3 hores fins a una $OD_{550}=1$. A partir d'aquest punt, es va induir l'expressió amb l'addició d'IPTG (concentració final 1 mM) i es va incubar a 37°C i 250 rpm durant 3 hores més. Per tal de comprovar l'expressió de la proteïna, es van recollir dues mostres, una del cultiu abans d'induir (-IPTG) i una altra 3 hores després de la inducció (+IPTG) que van ser centrifugades a 7000 rpm durant 7 minuts guardant els sediments a -20°C.

3.5.2. Fraccionament cel·lular

Els sediments de l'expressió del recombinant guardats a -20°C es van resuspendre en 15 mL de 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA per cada litre de cultiu induït. Posteriorment, es va realitzar una lisi cel·lular mecànica fent passar tres vegades la suspensió cel·lular per una premsa de French Sim Aminco® (20.000 psi). La mostra lisada es va centrifugar a 10.000 rpm durant 40 minuts a 4°C. Es va separar el sobrenedant del sediment que contenia els cossos d'inclusió.

Inicialment, en tots els casos, els cossos d'inclusió es van solubilitzar amb 10 mL (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 7M Urea, pH 8.3) sota agitació 30 minuts. Passat aquest temps, es va afegir 0.1 M de glutatió reduït (GSH) i es va ajustar el pH fins a 8.5 amb Tris sòlid, es va bombollejar N₂ per desplaçar l'oxigen present i es va deixar en agitació durant 30 minuts. Finalment, es va centrifugar 40 minuts a 10.000 rpm i es va descartar el precipitat.

3.5.3. Purificació de MVP-TPP-H6

La purificació de la MVP-TPP-H6 es va realitzar en condicions desnaturalitzants a partir dels cossos d'inclusió en una columna de Ni-NTA agarosa (QIAGEN) a partir de la cua d'histidines. Es van empaquetar fins a 10 mL de reïna i es van rentar amb tres volums d'aigua miliQ. Seguidament, es va equilibrar la columna amb tres volums de tampó d'equilibrat (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 7M urea, pH 8.3). La reïna va ser transferida a un tub Falcon amb 5 mL de tampó d'equilibrat, es va afegir la proteïna solubilitzada i es va deixar en agitació O/N a 4°C.

Una vegada realitzada la incubació, es va carregar la barreja a la columna i es va eluir el través. Es va rentar la reïna amb tres volums de tampó d'equilibrat i finalment es van eluir en 6 fraccions de 2 mL de tampó d'elució (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 7M urea, 500 mM Imidazol, pH 7.5).

3.5.4. Purificació de GST-GFP-INT

La purificació es va dur a terme inicialment a partir de la fracció soluble cel·lular que provenia de la premsa de French. Aquesta es va purificar mitjançant una columna GSTrap™ 4B (1 mL) en un HPLC sistema Äkta. Primerament, la columna va ser equilibrada amb el tampó d'equilibrat (DPBS 1x) a un cabal de 1 mL/min. A continuació, es va injectar la mostra amb un cabal màxim de 0.2 mL/min. Seguidament, es va rentar la columna amb tampó d'equilibrat a un cabal de 0.5 mL/min. Finalment, es va eluir la mostra amb tampó d'elució (50 mM Tris-HCl, 20 mM GSH pH 8.0). Els tampons utilitzats durant la purificació van ser desgasificats i filtrats amb un filtre de 0.22µm (Millex®-GP) prèviament a la seva aplicació i es va configurar com a pressió màxima del sistema i de la pre-columna a 0.5 mPa.

3.6. Replegaments de la proteïna desnaturalitzada

Tant la MVP-TPP-H6 com alguns casos de la GST-GFP-INT, van ser purificades de forma desnaturalitzada per el que va ser necessari replegar la proteïna corresponent. El replegament de les dues proteïnes es va dur a terme conjuntament per intentar formar el complex volta:cargo. Inicialment, el replegament es va fer per diàlisi.

Primerament, es van hidratar els sacs de diàlisi en H₂O MiliQ durant uns 20 minuts. A continuació, es van rentar amb aigua i aigua destil·lada. A partir de la MVP-TPP-H6 i la GST-GFP-INT purificades, es va dipositar una quantitat de MVP dins de cada sac de diàlisi (Spectra/Por Dialysis Membrane Tubing mwco: 12-14.000) i una dilució 1/10 de GST-GFP-INT. Per altra banda, es van preparar una sèrie de tampons de diàlisi, els quals es van dipositar en tubs de 250 mL (tubs de centrífuga GSA) que contenien els

tampons de replegaments assajats. A continuació, es van col·locar els diversos sacs de diàlisi a l'interior, es van deixar 6 hores en rotació a 4°C i seguidament 48 hores a 4°C en repòs. Finalment, es van recollir les mostres dels sacs, es van centrifugar a 11000 rpm, durant 10 minuts a 4°C i es van guardar, tant el sediment com el sobrenedant, a -20°C.

3.7. Detecció i quantificació de les proteïnes

3.7.1. SDS-PAGE

Els gels SDS-PAGE van ser utilitzats per l'anàlisi de la puresa i el rendiment en diferents estadis de la producció i purificació. Les mostres van ser preparades amb tampó de càrrega 4x amb β -mercaptoetanol (250 mM Tris-HCl, SDS 8%, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 10%, blau de bromofenol 0.04% pH 6.8) i es van bullir a 95°C durant 5 minuts. Tots els gels polimeritzats són gels de poliàcrilamida discontinus, amb un gel separador de 12.5% d'acrilamida i un gel apilador del 3%. Les condicions d'electroforesi van ser de 200V durant aproximadament 1 hora en tampó d'elució i posteriorment van ser tenyits amb blau de Comassie (Blau de Comassie 0.1%, metanol 50% i àcid acètic 7%) durant 20 minuts en agitació suau. Finalment, es va destenyir en acètic al 7% en agitació suau durant tota la nit. Alternativament, van ser utilitzats per a la realització d'anàlisi de Western-blot. En ambdós casos, es van utilitzar gels de 1.5 mm de gruix i es va fer servir com a marcador de pes molecular el *PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

3.7.2 Western-blot

Una vegada finalitzada l'electroforesi, es va submergir el gel en tampó d'electrotransferència (192 mM Glicina, 25 mM Tris, metanol 20%) durant un mínim de 15 minuts. Alhora, la membrana PVDF (Millipore) va ser activada submergint-la en metanol durant 15 segons, rentada durant 2 minuts en aigua MilliQ i finalment va ser submergida en tampó d'electrotransferència durant 5 minuts. Les esponges i els papers de filtre també van ser submergits en tampó d'electrotransferència prèviament al muntatge del western-blot. L'electrotransferència es va realitzar durant 90 minuts a 60V a 4°C. A continuació, es va bloquejar la membrana amb BSA 1% durant 1 hora. Per a la realització dels diferents rentats es va utilitzar TBST (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, Tween 0.1%). Una vegada bloquejada la membrana, es van realitzar tres rentats amb TBST i posteriorment es va incubar la membrana a 70 rpm durant 1 hora amb l'anticòs primari Anti-GFP Mouse IgG (1/6000, Roche, Alemanya) O/N a 4°C. A continuació, es van fer tres rentats de 5 minuts amb TBST i posteriorment es va incubar amb l'anticòs

secundari anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate (1/20000, Calbiochem, Alemanya). Finalment, la membrana va ser rentada 3 vegades amb TBST.

Per tal d'observar els resultats, es va revelar la membrana amb Immobilon Western (Chemiluminescent HRP substrate). Es va preparar una solució 1:1 de solució A (substrat de la peroxidasa) i solució B (peròxid d'hidrogen). La membrana va ser incubada 5 minuts a la foscor amb la solució i finalment es va poder analitzar la quimioluminescència.

3.7.3 Quantificació de proteïna

Es va realitzar la quantificació a partir de la tècnica de Bradford per tal de determinar les quantitats totals obtingudes de proteïna pura per cada elució. Primerament, es va preparar per una banda, el reactiu de Bradford fent una dilució 1:4 en aigua miliQ. Per altra banda, es va dissenyar una recta patró la qual es va preparar a partir d'una mare de BSA de 1 mg/mL. Per últim, es va preparar les mostres a analitzar a partir d'una barreja de 50 mL de mostra en 350 mL d'aigua miliQ i 600 mL de reactiu de Bradford. A partir d'un espectrofotòmetre es va analitzar l'absorbància a 595 nm primer de la recta patró i finalment de cada mostra.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Clonatge del gen que codifica per la GFP dins el plasmidi pGEX-INT

El primer objectiu d'aquest treball va ser la clonació del gen que codifica per la proteïna GFP dins el plasmidi pGEX-INT. Es vol realitzar aquesta construcció (*Figura 2*) amb la finalitat d'aconseguir que per una banda, el nou cargo es pugui encapsidar gràcies al domini INT, per altra banda, que es pugui fer el seguiment intracel·lular de l'estructura per citometria de flux o per microscòpia confocal gràcies a la GFP i per últim que es pugui demostrar la funcionalitat de l'estructura formada per pull down gràcies a la GST, ja que el sistema de purificació de la GST-GFP-INT és diferent al sistema de purificació de la MVP-TPP-H6.

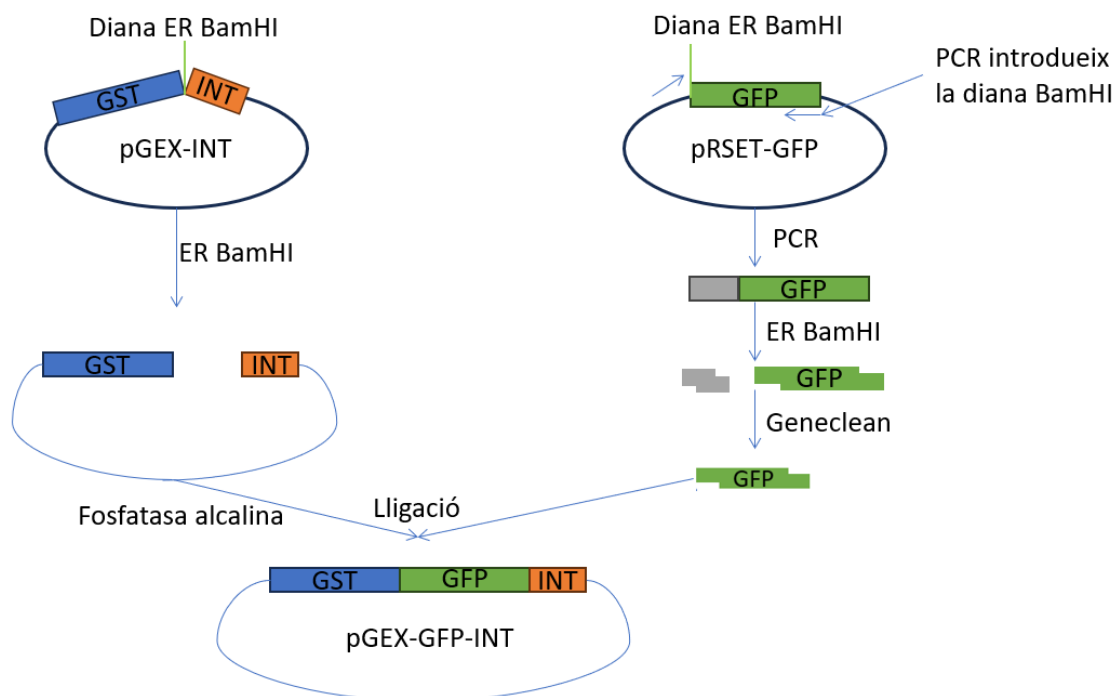
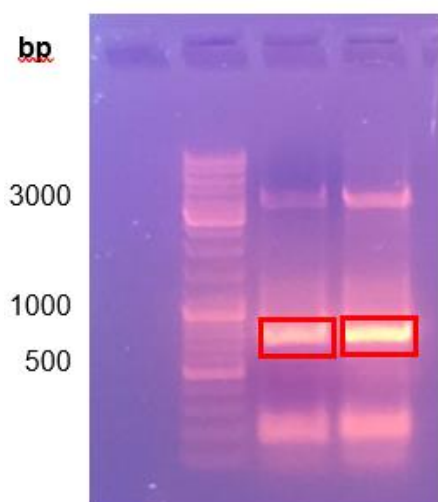


Figura 2.: Esquema del clonatge de la GFP dins el plasmidi pGEX-INT.

Per a la clonació de la GFP, es disposava del plasmidi pRSET-GFP que contenia el gen de la GFP amb diverses etiquetes entre les dianes de restricció *EcoRI* i *XhoI*. En un dels extrems del gen, hi ha una diana de l'enzim de restricció *BamHI*. Per altra banda, es van utilitzar uns primers que amplificaven una part del plasmidi fins al final del gen de la GFP. Per portar a terme la clonació de la GFP, primerament es va amplificar el gen de la GFP per tal d'introduir la segona diana de restricció per *BamHI* a partir dels primers següents: Prom: CCG GAT CAA GCC TCT CGG ATC CCT TGT ACA GCT CG i l'oligo mutagènic CGA GCT GTA CAA GGG ATC CGA GAG GCT TGA TCC GG.

Un cop amplificat el gen es va realitzar la digestió amb l'enzim de restricció *Bam*HI. Amb aquesta digestió es van obtenir dos fragments, un d'ells era una banda de 714 pb que corresponia al gen de la GFP i l'altre era el segment de plasmidi que també s'havia



amplificat degut al primer Prom. Per tal de separar aquests dos productes de PCR, es va córrer un gel d'agarosa i es va realitzar un Genclean de les bandes marcades en vermell per tal d'aïllar el segment corresponent a la GFP (Figura 3).

Figura 3.: Gel d'agarosa on el primer carril correspon als marcadors Gene Ruler DNA Ladder Mix de pes molecular, seguit de dues columnes corresponents als productes de la PCR digerits per *Bam*HI..

Per altra banda, també es va digerir el plasmidi pGEX-INT amb *Bam*HI, es va defosforil·lar amb fosfatasa alcalina per evitar relligats i a continuació es van realitzar la lligació.

El plasmidi resultant de la lligació es va anomenar pGEX-GFP-INT.

4.2. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT

Per tal de produir la GST-GFP-INT es va utilitzar la soca *E. coli* BL21 DE3 per produir la proteïna recombinant i es van analitzar els resultats de l'expressió a partir d'un gel SDS-PAGE.

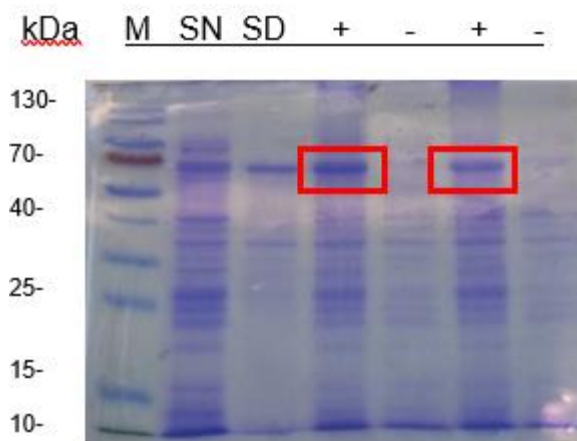


Figura 4: Anàlisi SDS-PAGE de l'expressió de la GST-GFP-INT en la soca *E. coli* BL21 DE3. Es van carregar 20 μ L de la mostra pre-inducció (-) i 10 μ L de la mostra post-inducció passades tres hores (+). Del sediment (SD) i el sobrenedant (SN) obtinguts després de la premsa de French es van carregar 10 μ L d'una dilució 1/5.

Tal i com es pot veure en la *Figura 4* després de les 3 hores d'inducció, apareix una banda sobre els 72kDa corresponent a la GST-GFP-INT.

Els cultius del clon d'*E. coli* BL21 DE3, es van lisar mitjançant la premsa de French i es van centrifugar per tal de separar la fase soluble dels cossos d'inclusió. Per tal d'evitar la degradació a la fase soluble, es va utilitzar un tampó de solubilització que contenia PBS 1x i PMSF com a inhibidor de proteases (dilució 1/100). Tal i com es pot observar en la *Figura 4*, hi ha la presència de la GST-GFP-INT tant en el sediment (SD) com en el sobrenedant (SN).

4.2.1. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sobrenedant amb condicions inicials

Inicialment es va decidir intentar la purificació a partir del sobrenedant de la premsa de French, utilitzant una columna GSTrap™ 4B i eluint amb glutatió. Els resultats de la purificació es van analitzar mitjançant un gel SDS-PAGE (*Figura 5*).

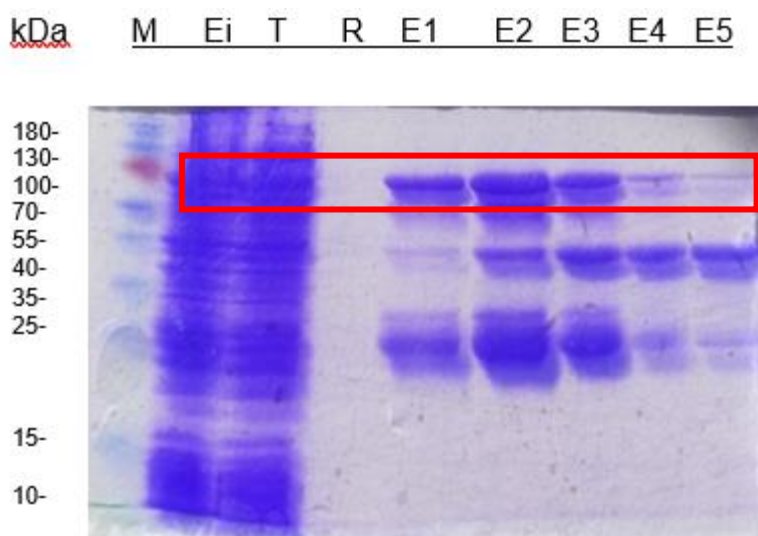


Figura 5: Anàlisi per SDS-PAGE de la purificació de la GST-GFP-INT. Es van carregar 40 μ L de cada elució i 20 μ L d'extracte inicial, Través i Rentat. Les mostres carregades són l'extracte inicial (Ei), el Través (T), la mostra de l'últim rentat (R) i les consecutives elucions (E1, E2, E3, E4, E5).

Com es pot veure a la *Figura 5* en les elucions apareixia una gran part de la proteïna degradada. Tot i que no s'ha comprovat per western blot, considerem que les bandes de menor pes molecular observades són probablement de degradació i no contaminants, ja que en els darrers rentats de la columna (carril R *Figura 5*) ja no s'observava la presència de cap proteïna contaminant.

Així doncs, al observar que hi havia molta degradació en la proteïna purificada a partir del soluble, es va optar per a la purificació a partir dels cossos d'inclusió del sediment. Les raons per optar per aquest sistema eren que al estar en forma agregada difícilment es degradaria durant la producció i que probablement la presència de proteases en el sediment seria menor.

4.2.2. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sediment resuspès en urea amb condicions inicials

El protocol de purificació a partir del sediment de la premsa de French es va basar en la solubilització dels cossos d'inclusió amb urea i el posterior replegament en successives diàlisis, que anaven reduint la concentració d'urea i així la proteïna es podia replegar correctament. Al final, en aparèixer una fracció insoluble es va centrifugar el dialitzat, es va separar el sobrenedant, el qual és el que es va purificar i per l'altra banda el sediment, aquest es va resuspendre novament en un tampó que contenia 7M urea, 50mM Tris, 500mM NaCl i pH 8.3. Aquesta fracció es va analitzar per SDS-PAGE i es va observar que una part significativa de la proteïna insoluble es mantenia intacta, sense degradació, tal i com es pot veure en la *Figura 6* en el carril SD.

El sobrenedant va ser filtrat i purificat a partir del sistema HPLC i la columna GStrap™ 4B eluint amb glutatió. Els resultats de la purificació van ser analitzats a partir d'un gel SDS-PAGE (*Figura 6*).

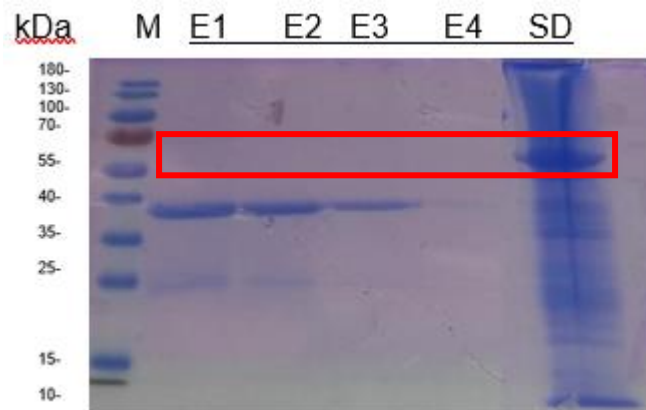


Figura 6: Anàlisi per SDS-PAGE de la purificació de la GST-GFP-INT a partir dels cossos d'inclusió. Es van carregar 50 μ L de cada elució (E1, E2, E3, E4) i 30 μ L del sediment resuspès en urea (SD).

Com es pot observar a la *Figura 6*, la gran majoria de la proteïna eluïda de la cromatografia estava degradada. Els resultats de la mostra del sediment (SD) de la *Figura 6* feien pensar que la proteïna sencera no s'havia plegat bé i romania insoluble en solució aquosa mentre que la fracció degradada es podria replegar, de manera que a lo millor les condicions utilitzades de solubilització i replegament no eren les òptimes.

En vista dels resultats, es va optar per a una purificació molt més estricta per evitar la degradació proteica.

4.2.3. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sobrenedant mantenint la cadena del fred

Per tal d'evitar la degradació de la proteïna durant el procés de lisi per la premsa de French es va utilitzar un tampó de resuspensió que contenia PMSF (dilució 1/100) i un còctel d'inhibidors de proteases cOmplete ULTRA Tablets EDTA-free. Per tal d'evitar el màxim possible la degradació a partir de proteases, abans de cada pas per la premsa de French es va refredar la mostra en un congelador de -80°C durant 10 minuts.

Es va decidir repetir la purificació amb la cromatografia GSTrap™ 4B a partir del sobrenedant però en aquest cas mantenint la columna dins d'un recipient ple de gel i injectant la mostra en volums petits per tal de mantenir la resta de mostra el màxim temps possible en gel. El resultat de la purificació en aquestes noves condicions es va analitzar per SDS-PAGE (*Figura 7*).

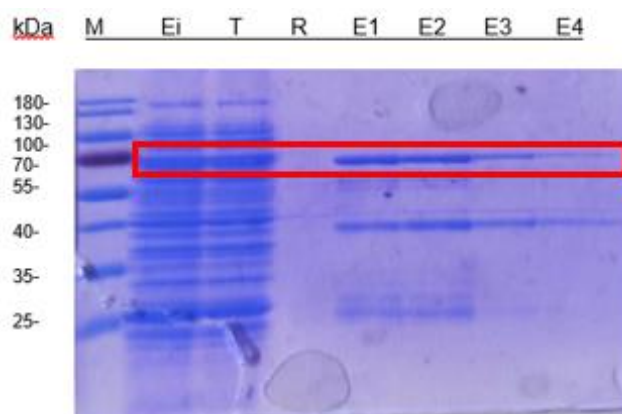


Figura 7: Anàlisi per SDS-PAGE de la purificació de la GST-GFP-INT a partir del sobrenedant. Es van carregar 40 µL de cada elució i 20 µL d'extracte inicial, Través i Rentat . Les mostres carregades són l'extracte inicial (Ei), el Través (T), la mostra de l'últim rentat (R) i les consecutives elucions (E1, E2, E3, E4).

Com es pot observar en la *Figura 7*, tot i que la fracció degradada de GST-GFP-INT era menor, aquesta encara era prou significativa. Per això, es va decidir purificar la GST-GFP-INT a partir del sediment de la premsa de French.

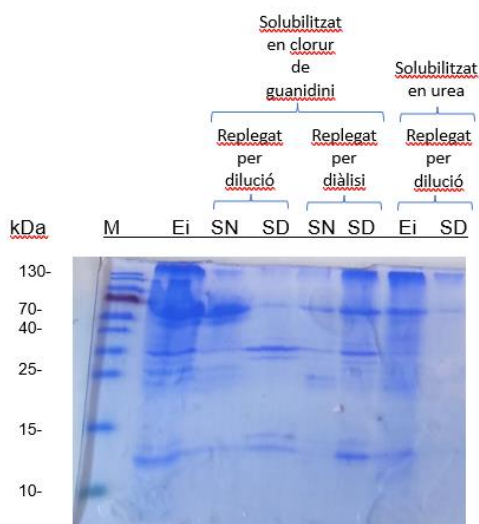
4.2.4. Optimització de la purificació de la proteïna GST-GFP-INT a partir del sediment resuspès en condicions diferents

Donat que en aquest cas el principal problema era aconseguir replegar la proteïna no degradada es van assajar diferents protocols de solubilització/replegament. Es van realitzar tres protocols diferents. Per una banda, el sediment de la premsa de French de la segona producció es va solubilitzar en un agent desnaturant diferent per tal

d'explorar si d'aquesta manera s'aconseguia un millor replegament. Es va solubilitzar el sediment amb 6M clorur de guanidini 2mM EDTA 100mM Tris pH 9.0. Es va afegir GSH en una concentració 100mM i es va ajustar el pH a 8.5 utilitzant Tris sòlid i bombollejat amb N₂ sota agitació 1h 30min. Aquest sediment resuspès es va fraccionar en dos volums de 2.5 mL on cada fracció es va sotmetre a un procés de replegament diferent. Paral·lelament, també es va assajar el replegament del sediment que no havia replegat en la purificació anterior i que s'havia re-solubilitzat amb urea (veure apartat 4.2.2).

Per una banda, una de les fraccions solubilitzades amb clorur de guanidini i la que estava solubilitzada amb urea es van replegar per dilució 1/20 gota a gota i sota agitació en 50 mL d'un tampó que contenia 0.5M L-Arginina, 1mM GSSG (glutatió oxidat), 2mM EDTA, 100mM Tris i pH 8.5 i posteriorment es va dialitzar en PBS i es va centrifugar per separar la fracció insoluble que no s'havia pogut replegar.

La segona fracció amb clorur de guanidini es va replegar per diàlisi en 250 mL d'un tampó que contenia 0.5M L-Arginina, 1mM GSSG (glutatió oxidat), 2mM EDTA, 100mM



Tris i pH 8.5 i posteriorment es va dialitzar en PBS i es va centrifugar per separar la fracció insoluble que no s'havia pogut replegar. Les tres mostres replegades es van analitzar per SDS-PAGE per tal d'observar quina fracció es la més rica i pura per tal de realitzar la purificació a partir d'aquella fracció (*Figura 8*).

Figura 8: Anàlisi per SDS-PAGE dels diferents protocols de replegament dels cossos d'inclusió del sediment de la GST-GFP-INT. Es van carregar 10 µL d'extracte inicial del sediment resuspès en

clorur de guanidini, 50 µL tant del sobrenedant com del sediment de la mostra replegada per dilució 1/20 del sediment resuspès en clorur de guanidini, 8 µL de les mostres replegades per diàlisi i resuspeses en clorur de guanidini, 16 µL de l'extracte inicial de la mostra resuspesa en urea i 50 µL del sobrenedant de la mostra replegada per dilució 1/20 resuspesa en urea.

Com es pot veure a la *Figura 8*, la mostra més pura i rica en GST-GFP-INT corresponia al sediment resuspès amb clorur de guanidini i replegada per dilució, en concret el sobrenedant, mentre que en el sediment s'hi trobava majoritàriament GST-GFP-INT degradada que no s'havia pogut replegar. Comparant-ho amb les altres fraccions, aquesta era la que s'obtenia una major quantitat de proteïna intacta de forma que es va decidir purificar el sobrenedant del sediment resuspès amb clorur de guanidini i replegada per dilució.

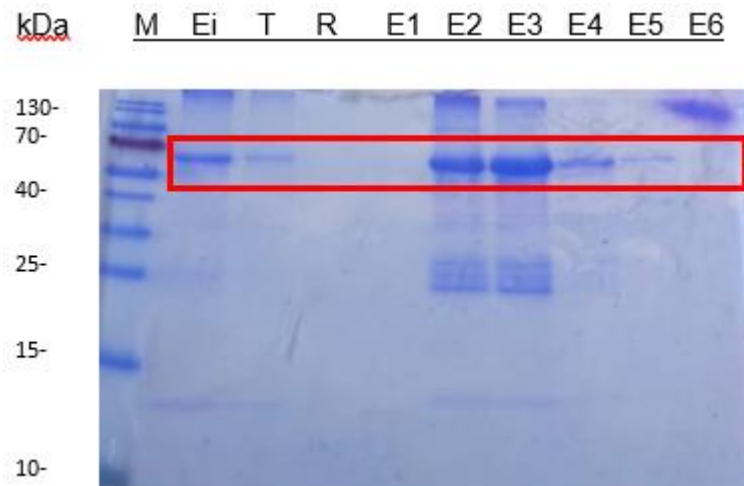


Figura 9: Anàlisi per SDS-PAGE de la purificació de la GST-GFP-INT a partir dels cossos d'inclusió del sediment resuspès en clorur de guanidini i replegat per dilució. M: marcador; Ei: extracte inicial; T: Través; R: darrer rentat; E: fraccions de l'elució.

El resultat de la purificació es pot observar en el gel SDS-PAGE de la *Figura 9*. Tal i com es pot veure, en el Través s'hi pot observar com una petita part de la GST-GFP-INT no s'ha enganxat a la columna. A més, els rentats s'han realitzat correctament ja que en l'últim rentat ja no s'hi observa cap proteïna. Centrant-nos en les elucions, es pot veure com l'elució més concentrada era la E3, que serà la que es farà servir per als assajos posteriors. La proteïna total purificada que es va obtenir utilitzant aquest sistema de solubilització i replegament és de 788.31 µg de GST-GFP-INT.

4.3. Assaig de replegament de la MVP per prendre l'estructura de volta i incorporar la GST-GFP-INT

Una vegada purificades les proteïnes, es va dur a terme el replegament de la proteïna MVP-TPP-H6 en presència de la GST-GFP-INT. El replegament es va realitzar per diàlisi per tal d'eliminar lentament la urea. En el replegament la MVP-TPP-H6 es trobava a una concentració de $2.7 \cdot 10^{-6}$ nM i la elució E3 de la purificació de la GST-GFP-INT amb una concentració de $8.1 \cdot 10^{-7}$ nM. Es van analitzar fins a 5 condicions de replegament de la MVP-TPP-H6 amb el cargo GST-GFP-INT (*Taula 1*).

Taula 1: Composició dels tampons de replegament de la MVP-TPP-H6 amb el cargo GST-GFP-INT.

Compost	A	B	C	D	E
NaCl	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM
GSSG	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
GSH	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Tris	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
L-Arg	100 mM	100 mM	100 mM	-	-
NP40	0.1 %	0.2%	0.1 %	0.1 %	0.1 %
PEG3500	-	-	0.3%	-	0.3%

Per tal de saber si la GST-GFP-INT havia estat encapsulada en l'estructura que es formava, es va repurificar la MVP replegada amb la reïna Ni-NTA agarosa en condicions no desnaturalitzants i es va analitzar la presència de GST-GFP-INT en la mostra repurificada per SDS-PAGE i western-blot usant un anticòs primari contra la GFP Anti-GFP Mouse IgG (Roche, Alemanya). En paral·lel, es va realitzar un control negatiu en el qual es va purificar la mateixa quantitat de GST-GFP-INT diluïda en tampó de replegament per comprovar que la GST-GFP-INT que es detectés provenia de l'encapsulament d'aquesta i no d'una unió inespecífica a la reïna de Ni-NTA. Per últim, també es va carregar un control positiu del procés de revelat que corresponia a la mostra purificada de GST-GFP-INT.

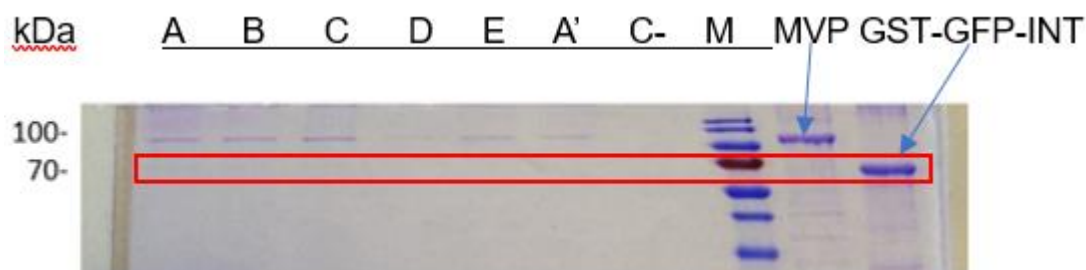


Figura 10: Anàlisi per SDS-PAGE de la presència de GST-GFP-INT en les fraccions de repurificació de la MVP-TPP-H6. Els diferents replegaments A, B, C, D i E per a la GST-GFP-INT i A' per a la GST-INT. C- és el control negatiu on únicament s'ha afegit GST-GFP-INT, M: marcador; MVP i GST-GFP-INT.

Tal i com es pot veure en la *Figura 10*, en les condicions A, B i C es podia observar una banda tènue amb el pes molecular de la GST-GFP-INT mentre que en la resta de condicions el resultat era negatiu. Per tal de comprovar que aquesta banda corresponia al cargo a encapsular, es va realitzar un western blot dels replegaments A, B i C utilitzant l'anticòs Anti-GFP Mouse IgG (Roche, Alemanya) amb una dilució 1/6000 i amb anticòs secundari Goat anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate (Calbiochem, Alemanya) amb una dilució 1/20000. Els resultats obtinguts es poden observar en la *Figura 11*.

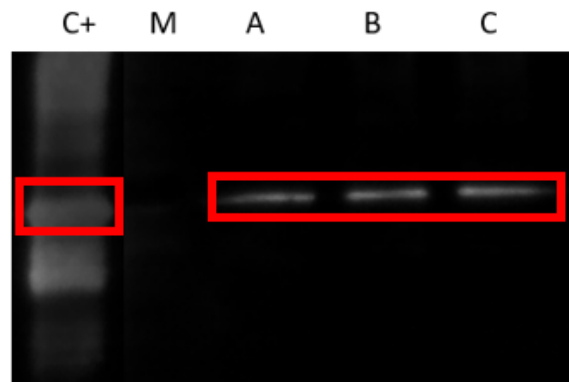


Figura 11: Anàlisi per western-blot de l'encapsulació de la GST-GFP-INT en l'estructura formada per la MVP-TPP-H6. Les condicions assajades es troben detallades en la Taula 1 i C+ correspon a una fracció purificada de GST-GFP-INT.

Tal i com es pot veure en la *Figura 11*, el control positiu mostrava que el procés de revelat s'havia realitzat correctament. Per altra banda, es va confirmar que en les tres condicions en que en el gel de SDS-PAGE ja s'hi observava tènueament una banda del pes molecular de la GST-GFP-INT (*Figura 10*), corresponien a aquesta proteïna, de manera que la GST-GFP-INT podia ser encapsulada en l'estructura formada per la MVP-TPP-H6. D'aquesta manera s'ha pogut dissenyar un mètode de replegament que ens permet encapsular un cargo que ens permetrà determinar la funcionalitat de l'estructura formada per la MVP. En un futur, aprofitant el domini GFP, es podrà realitzar un seguiment de la internalització d'aquesta estructura dins de la cèl·lula per microscòpia confocal o per citometria de flux.

6. CONCLUSIONS

According to the objectives of this project, the conclusions are:

- We have constructed a plasmid that encodes for a recombinant fusion protein between the GST, the GFP and the INT domain, to be used for encapsulation within the vault.
- We have set up a protocol for the production and purification of the fusion protein that allows to obtain it with significant yield and purity.
- The designed fusion protein can be encapsulated into the MVP-based structure that was previously described.
- We have identified new conditions of refolding of the MVP that are able to capture the GST-GFP-INT.

7. BIBLIOGRAFIA

[¹]: Gureev, V. N., Lakizo, I. G., & Mazov, N. A. (2019). Unethical authorship in scientific publications (a review of the problem). *Scientific and Technical Information Processing*, 46, 219-232.

[²]: Ramírez, N. (2010). Las relaciones objetales y el desarrollo del psiquismo: una concepción psicoanalítica. *Revista de investigación en psicología*, 13(2), 221-230.

[³]: Darzynkiewicz, Z., Carter, S. P., Mikulski, S. M., Ardelt, W. J., & Shogen, K. (1988). Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Proliferation*, 21(3), 169-182.

[⁴]: Rodríguez, M., Benito, A., Tubert, P., Castro, J., Ribó, M., Beaumelle, B., & Vilanova, M. (2006). A cytotoxic ribonuclease variant with a discontinuous nuclear localization signal constituted by basic residues scattered over three areas of the molecule. *Journal of molecular biology*, 360(3), 548-557.

[⁵]: Bosch, M., Benito, A., Ribó, M., Puig, T., Beaumelle, B., & Vilanova, M. (2004). A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. *Biochemistry*, 43(8), 2167-2177.

[⁶]: Tubert, P., Rodríguez, M., Ribó, M., Benito, A., & Vilanova, M. (2011). The nuclear transport capacity of a human-pancreatic ribonuclease variant is critical for its cytotoxicity. *Investigational New Drugs*, 29, 811-817.

[⁷]: Gurova, K. (2009). New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future oncology*, 5(10), 1685-1704.

[⁸]: Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, 3(3), 3279-3330.

[⁹]: Fuenmayor, J., Hoyos, R. G., & Montaña, R. F. (2013). Anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer. Terapia dirigida para tumores sólidos. *Revista venezolana de oncología*, 25(4), 236-254.

[¹⁰]: Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141.

[¹¹]: Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*, 355(12), 1253-1261.

- [12]: Soltanian, S., & Matin, M. M. (2011). Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumor Biology*, 32, 425-440.
- [13]: Ezan, E. (2013). Pharmacokinetic studies of protein drugs: past, present and future. *Advanced drug delivery reviews*, 65(8), 1065-1073.
- [14]: MaHam, A., Tang, Z., Wu, H., Wang, J., & Lin, Y. (2009). Protein-based nanomedicine platforms for drug delivery. *Small*, 5(15), 1706-1721.
- [15]: Fatima, H., Shukrullah, S., Hussain, H., Aslam, H., & Naz, M. Y. (2023). Utility of various drug delivery systems and their advantages and disadvantages. In *Nanotechnology for Drug Delivery and Pharmaceuticals* (pp. 235-258). Academic Press.
- [16]: McClements, D. J. (2018). Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Advances in colloid and interface science*, 253, 1-22.
- [17]: Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2–11.
- [18]: Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current drug delivery*, 4(4), 297-305.
- [19]: Jain, K. K. (Ed.). (2008). *Drug delivery systems* (Vol. 251). Totowa, NJ, USA:: Humana press.
- [20]: Stephen, A. G., Raval-Fernandes, S., Huynh, T., Torres, M., Kickhoefer, V. A., & Rome, L. H. (2001). Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23217-23220.
- [21]: Kickhoefer, V. A., Han, M., Raval-Fernandes, S., Poderycki, M. J., Moniz, R. J., Vaccari, D., ... & Rome, L. H. (2009). Targeting vault nanoparticles to specific cell surface receptors. *Acs Nano*, 3(1), 27-36.
- [22]: Tanaka, H., & Tsukihara, T. (2012). Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 88(8), 416-433.
- [23]: Kickhoefer, V. A., Garcia, Y., Mikyas, Y., Johansson, E., Zhou, J. C., Raval-Fernandes, S., ... & Rome, L. H. (2005). Engineering of vault nanocapsules with enzymatic and fluorescent properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), 4348-4352

^[24]: Martín, F., Carreño, A., Mendoza, R., Caruana, P., Rodriguez, F., Bravo, M., ... & Corchero, J. L. (2022). All-in-one biofabrication and loading of recombinant vaults in human cells. *Biofabrication*, 14(2), 025018..

^[25]: Lai, C. Y., Wiethoff, C. M., Kickhoefer, V. A., Rome, L. H., & Nemerow, G. R. (2009). Vault nanoparticles containing an adenovirus-derived membrane lytic protein facilitate toxin and gene transfer. *Acs Nano*, 3(3), 691-699.

^[26]: Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature biotechnology*, 24(10), 1241-1252.

^[27]: Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 211-222.