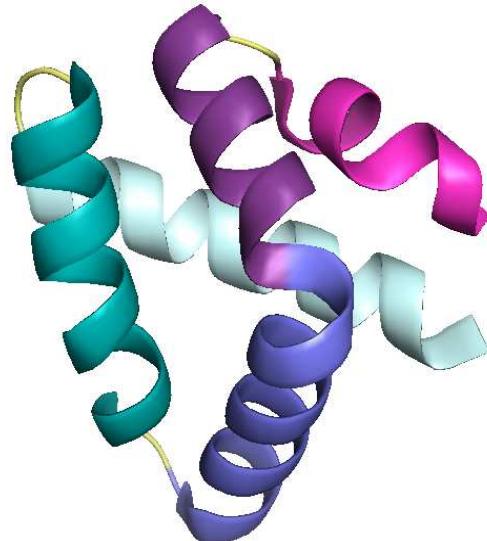


LA GRANULISINA COMO NUEVA TERAPIA ANTITUMORAL



Trabajo de fin de grado de Biotecnología, Julio 2015

AUTORA:

RAQUEL IBÁÑEZ PÉREZ

TRABAJO ACADÉMICAMENTE DIRIGIDO POR:

ALBERTO ANEL y RAMÓN HURTADO



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Dto. Bioquímica y biología molecular



Instituto Universitario de Investigación
Biocomputación y Física
de Sistemas Complejos
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
4. OBJETIVO	4
5. MATERIALES Y MÉTODOS	5
5.1. TRABAJO EN ESTERILIDAD	5
5.2. MEDIOS DE CULTIVO DE <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i>	5
5.3 MATERIAL GENÉTICO DE PARTIDA: pPICZ α C-GRNLY	6
5.4 TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> COMPETENTES CON pPICZ α C-GRNLY POR CHOQUE TÉRMICO.....	7
5.4.1. SELECCIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMADAS.....	7
5.4.2. CULTIVO DE BACTERIAS SELECCIONADAS.....	7
5.5 AISLAMIENTO DEL PLÁSMIDO.....	7
5.5.1. MINIPREPARACIÓN.....	7
5.5.2. MIDIPREPARACIÓN.....	8
5.5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	8
5.5.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	8
5.6. TRANSFECCIÓN DE <i>Pichia pastoris</i> CON pPICZ α C-GRNLY.....	8
5.6.1. PLÁSMIDO LINEALIZADO.....	8
5.6.2. PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE <i>PICHIA PASTORIS</i> SMD1168	9
5.7. PRODUCCIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE	10
5.7.1. PRECULTIVOS.....	10
5.7.2. INDUCCIÓN.....	10
5.7.3. PRUEBA DE EXPRESIÓN.....	10
5.7.3.3. Detección de la granulisina mediante inmunoblot.....	11

LA GRANULISINA COMO NUEVA TERAPIA ANTITUMORAL (RAQUEL IBÁÑEZ PÉREZ)

5.8. PURIFICACIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE	12
5.8.1. FILTRACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS SOBRENADANTES	12
5.8.2. DIALISIS PARA CAMBIAR EL TAMPÓN	12
5.8.3. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	13
5.8.4. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE ACRILAMIDA.....	13
5.9. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD IN VITRO	14
6. RESULTADOS	15
6.1. MINIPREPARACIÓN	15
6.2. MIDIPREPARACIÓN	15
6.3. TRANSFECCIÓN DE PICHIA PASTORIS CON PPICZAC-GRNLY	15
6.4. PRODUCCIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE	16
6.5. PURIFICACIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE	17
6.6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LA GRANULISINA RECOMBINANTE SOBRE LAS CÉLULAS JURKAT	20
7. DISCUSIÓN	22
8. CONCLUSIÓN	23
8. CONCLUSION	23
BIBLIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN

La granulisina (GRNLY) es una proteína producida por los linfocitos T citolíticos y células asesinas naturales. Tiene dos isoformas estables con peso molecular de 9 y 15 kDa. La granulisina recombinante de 9 kDa muestra actividad citolítica contra una variedad de microbios y también contra líneas celulares tumorales, debido a que induce la apoptosis celular. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la granulisina es relevante para prevenir una variedad de infecciones humanas y, posiblemente, el cáncer. Hasta el momento, los estudios encaminados a utilizar la GRNLY como terapia anti-tumoral, se habían realizado con granulisina recombinante producida en bacterias, de la cual era difícil eliminar el lipopolisacárido bacteriano (LPS).

En este trabajo se pretendía producir granulisina humana recombinante de 9kDa en *P. pastoris*, una levadura metilotrófica que es capaz de producir proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales solubles y correctamente plegadas, para evitar este problema. Para ello, el plásmido pPICZαC-GRNLY se linealizó con Sall y se transfeció mediante electroporación en *P. pastoris*. Se cultivaron las colonias transfectadas y se indujo con metanol la expresión de la granulisina recombinante. La proteína recombinante se purificó a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante columna de afinidad de níquel, ya que la proteína contenía una cola de histidinas. Se obtuvo un buen rendimiento de purificación. Seguidamente, la bioactividad de esta preparación de granulisina se ensayó sobre la línea celular Jurkat, demostrándose que la granulisina recombinante producida en *P. pastoris* induce muerte celular dependiente de la dosis. Estos resultados aseguran la futura producción de granulisina recombinante usando este sistema para poder continuar los ensayos *in vivo* previos a su posible utilización futura en la clínica.

1. ABSTRACT

Granulysin (GRNLY) is a protein produced by human cytolytic T-lymphocytes and natural killer cells. Granulysin has two stable isoforms with molecular weight of 9 and 15 kDa. Recombinant 9-kDa granulysin shows cytolytic activity against a variety of microbes and tumor cell lines too, inducing apoptosis in these last ones. Studies to date suggest that granulysin is relevant to prevent a variety of human infections and possibly cancer. So far, studies to use GRNLY as an anti-tumoral therapy had been made with recombinant granulysin produced in bacteria, in which was difficult to remove bacterial lipopolysaccharide (LPS).

In this work, it was intended to produce recombinant human 9 kDa granulysin in *P. pastoris*, a methylotrophic yeast which can produce soluble, correctly folded recombinant proteins with post-translational modifications, to avoid this problem. In order to do it, the plasmid pPICZαC-GRNLY was linearized with Sall and transfected by electroporation into *P. pastoris*. Transfected colonies were grown and expression of recombinant granulysin was induced with methanol. The recombinant protein was purified from culture supernatants by nickel affinity column, because the protein is attached to a histidine tag. A good purification yield was obtained. Then, the bioactivity of this granulysin preparation was tested on the Jurkat cell line, demonstrating that recombinant granulysin produced in *P. pastoris* induces dose-dependent cell death. These results ensure the future production of recombinant granulysin using this system for further medical applications.

2. INTRODUCCIÓN

La granulisina es una proteína que se encuentra en los gránulos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) activados y células “asesinas naturales” (NK) humanas [1, 2].

La granulisina tiene dos isoformas estables con peso molecular de 9 y 15 kDa [3]. La isoforma de 15 kDa se produce rápidamente, tiene una vida media más corta, es secretada constitutivamente [4] y funciona como una alarmina inmunitaria, aumentando el reclutamiento y la infiltración inflamatorios [5]. La maduración proteolítica de la isoforma de 15 kDa, tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal, da como resultado la isoforma de 9 kDa [1, 6], que se produce más lentamente, es relativamente estable y se localiza solamente en gránulos de alta densidad [4].

La granulisina de 9 kDa recombinante muestra actividad citolítica contra gran variedad de microbios: bacterias como *M. tuberculosis*, hongos como *Cryptococcus neoformans*, levaduras como *Candida albicans* o protozoos como *Leishmania major*, siendo esta su función fisiológica más aceptada. [3, 7, 8, 9]

Por otra parte, esta isoforma de la granulisina es también citotóxica sobre células tumorales [1, 10, 11, 12]. El posible papel fisiológico antitumoral de la granulisina viene apoyado por algunos estudios que demuestran que su expresión en linfocitos T CD8⁺ infiltrados en tumores de colon correlaciona con el mejor pronóstico de los pacientes [13], u otros en los que se demuestra mejor pronóstico si el nivel de expresión de la granulisina es alto en células NK periféricas o en el suero en diferentes tipos de cáncer [8, 14, 15].

La granulisina es una proteína compuesta por 5 hélices alfa espaciadas por tres giros [2, 16], cuya superficie tiene mayoritariamente carga positiva. Estas cargas positivas se distribuyen principalmente en un anillo alrededor de la molécula, aproximadamente donde se sitúan las hélices II y III [2] (Figura 1). Pertenece a la familia SAPLIP, lo que sugiere que puede ejercer su función citolítica a través de la interacción con lípidos [1, 2].

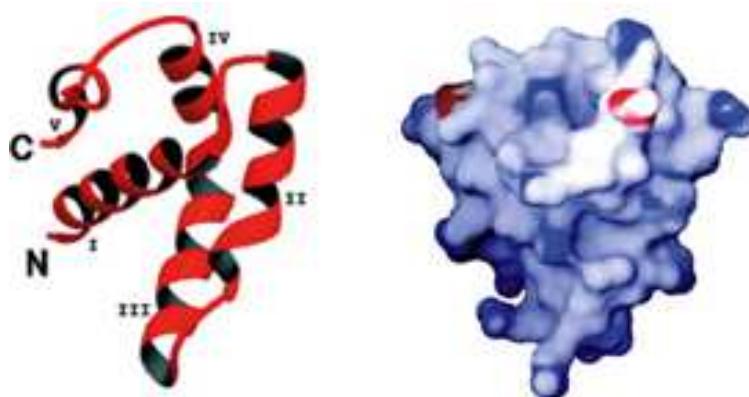


FIGURA 1: Estructura de la granulisina (9 kDa). Las hélices α están numeradas con números romanos (imagen de la derecha). En la imagen de la izquierda se muestra el potencial electrostático de la superficie molecular en la misma orientación que en la imagen de la izquierda (potencial positivo en azul y potencial negativo en rojo) [17]

Las cargas positivas de la superficie de la granulisina, sobre todo los residuos básicos de las hélices II y III, parecen orientar la molécula hacia la superficie cargada negativamente de los microbios o de las células tumorales [2].

En el caso de las células tumorales, la granulisina se inserta en la membrana plasmática de sus células diana, produciendo un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular [12]. El aumento de la concentración de calcio intracelular produce la generación de ROS mitocondriales, lo cual conduce a una caída del potencial de membrana mitocondrial, con liberación de citocromo c (cyt c) y del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria [6, 10, 11, 12, 16, 18]. El citocromo c, una vez en el citoplasma, forma el apoptosoma junto con Apaf-1 y la procaspasa-9, produciéndose la activación de esta última y de las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3 [11, 12, 18], que acaba causando fragmentación nuclear [11]. Por otra parte, AIF se transloca al núcleo provocando la condensación de la cromatina y degradación del DNA independiente de caspasas [11]. Se ha demostrado también una activación lenta de esfingomielinasas que causan la acumulación de ceramida, contribuyendo también a la activación de la vía apoptótica mitocondrial. [10,11]

La evaluación del mecanismo apoptótico de la granulisina recombinante se ha llevado a cabo *in vitro* mayoritariamente utilizando la línea celular Jurkat, una leucemia linfocítica aguda de tipo T y líneas celulares derivadas [8, 10, 11, 12].

Más adelante, se ha demostrado que la granulisina actúa también sobre diversas líneas celulares de mieloma múltiple humano, así como *ex vivo* sobre células de pacientes de leucemia linfática crónica de células B, siendo inocua sobre linfocitos de sangre periférica obtenidos de pacientes sanos [12]. Se demostró también que la granulisina actúa *in vivo* sobre tumores inyectados en ratones transgénicos que expresaban granulisina humana [19].

Estos estudios indican que la granulisina recombinante podría utilizarse como una nueva terapia antitumoral.

3. ANTECEDENTES

Más recientemente, nuestro grupo de investigación ha realizado estudios *in vivo* usando la granulisina recombinante en dos modelos de xenotrasplante de tumores humanos en ratones atípicos, el adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 y el mieloma múltiple NCI-H929, obteniéndose resultados positivos. En concreto se detiene el crecimiento del tumor mamario y se erradican los tumores producidos por el mieloma múltiple. Estos resultados se correlacionan con la aparición de células tumorales apoptóticas en el tumor, así como con la infiltración de células NK presentes en estos ratones [20].

Todos estos estudios se han realizado con granulisina recombinante producida en bacterias. Estas proteínas recombinantes suelen contener lipopolisacárido (LPS) bacteriano y en el caso de la granulisina se comprobó que así era. Aunque se demostró que el LPS por sí solo no tenía los efectos antitumorales descritos, y que la granulisina ejercía todos estos efectos independientemente de la cantidad de LPS presente en las preparaciones, sería deseable poder producir granulisina recombinante sin LPS. Esto es importante de cara a su posible aplicación clínica, ya que el LPS produce reacciones inmunitarias exacerbadas como la sepsis [21].

Una alternativa a explorar sería la utilización de la levadura *Pichia Pastoris*. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que sirve como sistema de expresión de proteínas eucariotas, ya que al ser eucariota puede producir proteínas recombinantes solubles, y plegadas correctamente con modificaciones post-traduccionales [22, 23]. Se usa principalmente para la producción de productos biofarmacéuticos y enzimas industriales [23]. Es fácil de manipular genéticamente y puede ser crecida a altas densidades de células por estrategias de cultivo simples, que en conjunto contribuyen a los altos niveles de producción de proteínas recombinantes estables [24]. Se ha convertido en una importante herramienta para la biotecnología, especialmente para la producción de proteínas heterólogas [23].

De hecho, otro grupo de investigación ha producido granulisina recombinante de 9kDa en *P. pastoris* utilizando una estrategia de fermentación simple en la que se demostró que la granulisina muestra toxicidad contra bacterias de una manera dependiente de la dosis [25].

4. OBJETIVO

- Producción de granulisina humana recombinante de 9kDa en *Pichia Pastoris*
- Purificación de la proteína recombinante
- Ensayo de su bioactividad sobre la leucemia humana Jurkat

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. TRABAJO EN ESTERILIDAD

Uno de los aspectos más importantes a la hora de trabajar con microorganismos es la esterilidad para evitar contaminaciones indeseadas. Existe un riesgo de contaminación tanto de los medios como de los recipientes de cultivo que hay que evitar. Es conveniente realizar las manipulaciones en una campana de flujo laminar y, en el caso de no disponer de ésta, deben realizarse cerca de un mechero, que es capaz de crear un ambiente semiestéril en la zona inmediata alrededor y debajo de la llama, de forma que los riesgos de contaminación disminuyen considerablemente.

En el caso de estos experimentos, al trabajar con cultivos de *E. coli* siempre se usa un mechero de alcohol y tanto para trabajar con *Pichia Pastoris* como para preparar sus los medios de cultivo se usa una cabina aislada estéril con mechero Bunsen.

Para evitar la contaminación, algunos componentes de los medios de cultivo se filtran o se autoclavan, junto con las probetas y matraces que se van a utilizar para preparar los medios y para crecer la levadura.

5.2. MEDIOS DE CULTIVO DE *E. coli* y *P. pastoris*

Para el crecimiento y transformación de *E. coli* se ha usado medio LB, preparado con 10 g de triptona (Panreac), 5 g de extracto de levadura (Panreac) y 5 g de NaCl (Panreac) disueltos en 1 L de agua, pH 7. Los recipientes que contiene esta preparación se autoclavan para evitar contaminaciones indeseadas.

Por otro lado, para el crecimiento de *Pichia Pastoris*, la electroporación y la inducción de la expresión proteica se han utilizado diferentes medios:

- YPD ("Yeast Extract Peptone Dextrose Medium"): 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona y 2% (V/V) de dextrosa (glucosa); pH 6. Si se hace una placa de agar también se añaden 20 g/l de agar. Se usa para el crecimiento de *Pichia pastoris* antes de la electroporación.
- YPDS ("Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol") + Zeocina: 10 g/l de extracto de levadura , 20 g/l de peptona, 2% (V/V) de dextrosa, 182.2 g/l sorbitol y 200 µg/ml de zeocina, pH 6 .Si se hace una placa de agar también se añaden 20 g/l de agar. Se utiliza para la selección de levaduras transfectadas.
- BMGY: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 100 mM tampón fosfato (pH 6,0), 13.4g/L base de levadura nitrogenada (YNB) sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mL/L de glicerol y 0,4 mg/L de histidina; pH 6. Se utiliza para el crecimiento de *Pichia* tras la electroporación.
- BMMY: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 100 mM tampón fosfato (pH 6,0), 13.4 g/L base de levadura nitrogenada (YNB) sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mL/L de metanol y 0,4 mg/L de histidina; pH 6. Se utiliza para la inducción del promotor AOX1.

Tanto en el medio BMGY como en el BMMY, se preparan primero el extracto de levadura, la peptona y el agua en una botella que luego es autoclavada y, por otro lado, la base de levadura nitrogenada disuelta en agua se filtra (tamaño del poro 0,22 µm).

Los medios de cultivo se guardan hasta su uso a 4°C en una cámara fría [26]

5.3 MATERIAL GENÉTICO DE PARTIDA: pPICZ α C-GRNLY

pPICZ α C es un plásmido integrativo que contiene, como se muestra en la Figura 2 [27]:

- pUC ori: permite la replicación del plásmido dentro de E. coli
- Promotor AOX1: se induce por metanol y dirige la integración del plásmido en el locus AOX1 de Pichia por recombinación homóloga. Para promover la integración, se linealiza el plásmido con una secuencia de corte dentro de la región 5' AOX1.
- Factor α , procedente de S. cerevisiae: permite la secreción eficiente de proteínas
- Sitio de clonaje múltiple: permite la inserción de DNA en el vector de expresión
- Epítopo c-myc: permite la detección con anticuerpo anti-myc
- Cola de polihistidinas: permite purificar la proteína recombinante con mayor facilidad
- Terminador de la transcripción AOX1: incrementa la estabilidad del mRNA permitiendo un eficiente procesamiento del extremo 3' del mRNA, incluyendo poliadenilación
- Gen de resistencia a zeocina (antibiótico de amplio espectro): sirve como marcador de selección. Se encuentra precedido por los promotores TEF1 y EM7 y seguido del terminador de la transcripción CYC1

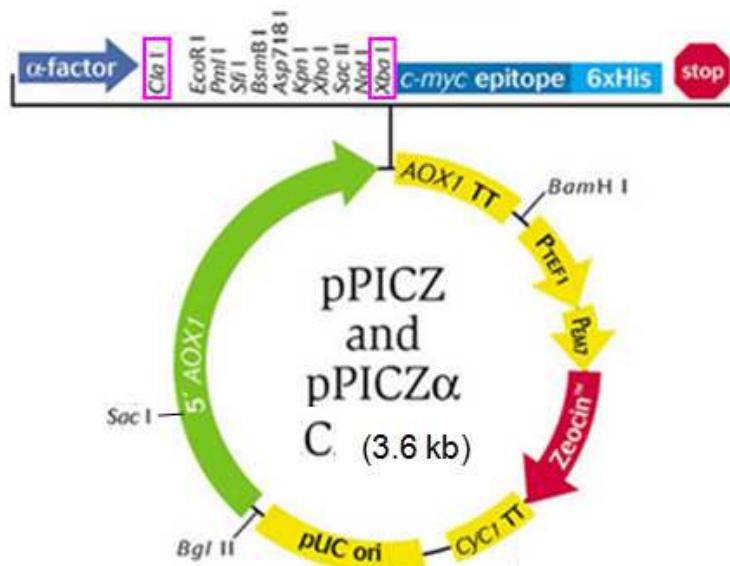


FIGURA 2: Mapa de pPICZ α C.

El cDNA de la granulisina humana fusionado con varias etiquetas (Figura 3) se integra direccionalmente entre los sitios de corte de enzimas de restricción Clal y XbaI que se encuentran en el sitio de clonaje múltiple (encuadradas en morado en la Figura 2) de pPICZ α C, dentro del marco de lectura.

El plásmido pPICZ α C-GRNLY (9kDa) fue sintetizado por la Dra. Laura Sanz (Hospital Puerta de Hierro, Madrid) a partir de la secuencia de DNA de granulisina humana cedida por el Dr. Alan Krensky (Northwestern University, Chicago).

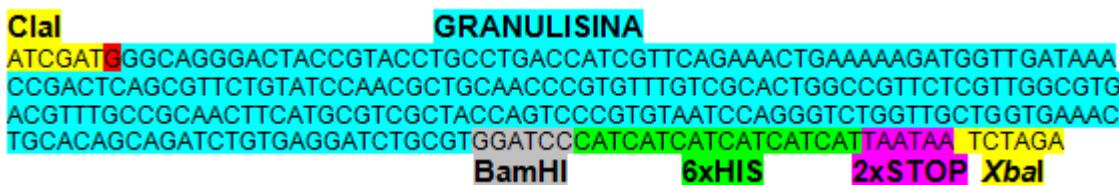


FIGURA 3: Inserto utilizado para clonar el gen de la granulisina en pPICZ α C: contiene el cDNA de granulisina humana (azul), la secuencia de corte de BamHI (gris), 6 codones seguidos que codifican para histidinas (verde) y dos codones STOP (rosa). Esta secuencia se encuentra flanqueada por secuencias reconocidas por las enzimas de restricción Clal y XbaI en amarillo. El nucleótido G (rojo) se introduce en la secuencia para que el gen de la granulisina quede dentro del marco de lectura y se traduzca unido al factor α una vez se haya insertado direccionalmente en el plásmido pPICZ α C.

5.4 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* COMPETENTES CON pPICZ α C-GRNLY POR CHOQUE TÉRMICO

Se descongela una alícuota de *E. coli* DH5 α (cepa adecuada para la propagación de pPICZ α) contenida en un tubo Eppendorf, se añaden 5 μ l de plásmido pPICZ α C-GRNLY, se incuban 20 minutos en hielo y se aplica choque térmico. Para ello, en el baño térmico se alcanzan 42°C durante 1 minuto y 30 segundos y se pasa a hielo 2 minutos. A continuación, se añade 1 ml de medio LB, se deja 15 minutos a 37°C en la estufa, se centrifuga el Eppendorf 5 minutos a 2500 rpm, se eliminan unos μ l del sobrenadante y se resuspende el precipitado bacteriano en lo que queda de sobrenadante.

5.4.1. SELECCIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

La disolución resultante se siembra en una placa de LB con zeomicina (25 μ g/ml) y se incuba en la estufa a 37°C durante un día, de forma que crecen las bacterias que tienen el gen de resistencia a zeocina, y por tanto, han adquirido el plásmido. La zeocina es sensible a la luz, por lo que se protegen los recipientes que la contienen con papel de aluminio.

5.4.2. CULTIVO DE BACTERIAS SELECCIONADAS

Con puntas de micropipeta se cogen varias colonias y se introduce cada una en un tubo Falcon que contiene 10 ml de LB y zeocina (25 μ g/ml). Se cultivan en un incubador orbital en agitación a 37°C durante un día.

5.5 AISLAMIENTO DEL PLÁSMIDO

5.5.1. MINIPREPARACIÓN

Se pasan 1,5 ml de cultivo del tubo Falcon a un tubo Eppendorf para extraer los plásmidos gracias al kit “Nucleospin ® Plasmid Easypure”, en el que, tras centrifugar, el precipitado de bacterias se resuspende en tampón A1 y el DNA plasmídico se libera de las células de *E. coli* por lisis alcalina en SDS (Tampón A2). El tampón A3 neutraliza el lisado resultante y crea las condiciones apropiadas para la unión del DNA del plásmido a la membrana de sílice de la columna. Al centrifugar, en el precipitado queda proteína precipitada, DNA genómico y restos celulares. El sobrenadante se carga en la columna y se eliminan sales, metabolitos, nucleasas y componentes celulares macromoleculares solubles por lavado con Tampón AQ. Finalmente el DNA plasmídico puro se eluye en condiciones de baja fuerza iónica con un tampón ligeramente alcalino (tampón AE). La composición de los tampones no se detalla en el kit, salvo la del tampón AE: 5 mM Tris/HCl, pH 8.5.

5.5.2. MIDIPREPARACIÓN

El cultivo restante se pasa del tubo Falcon a un Enlermeyer con 100ml de medio LB y 25 µg/ml de zeomicina. Se deja en un orbital a 37°C hasta el día siguiente.

Se usa un kit para hacer la preparación en cantidad media ("Quantum Prep™ Plasmid Midiprep"). El cultivo saturado se centrifuga, el precipitado se resuspende en Solución de resuspensión celular y las células se lisan con Solución de Lisis. Luego, se añade Solución de neutralización, se centrifuga y el precipitado se mezcla bien con "Quantum Matrix Prep". El sobrenadante se coloca en la columna que se proporciona con el kit de preparación. La columna se lava dos veces con tampón de lavado, se centrifuga y el tampón de lavado con los restos de sustancias que no interesan se desechan. Finalmente, el plásmido se eluye con agua MilliQ mediante centrifugación.

5.5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se determinó la concentración y pureza del plásmido obtenido tanto de la minipreparación como de la midipreparación mediante un aparato NanoDrop® (NanoVue)

La relación de Abs_{260/280} se utiliza para evaluar la pureza del DNA y RNA. Una proporción de aproximadamente de 1.8 está generalmente aceptada como "puro" para el DNA. Si la relación es apreciablemente menor, puede indicar la presencia de contaminantes.

Los valores esperados de Abs_{260/230} son 2,0-2,2, los valores alejados pueden indicar un problema con la muestra o con el procedimiento de extracción.

5.5.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se prepara un gel de agarosa al 1%, compuesto por 0,3 g de agarosa (Scharlau), 30 ml de tampón TAE (tampón de Tris-Acetato de EDTA, Invitrogen pH 8,3) y 3 µl de SYBR® Safe (Invitrogen) para teñir el DNA.

Las muestras que se cargan en el gel se obtienen mezclando 5 µl de cada muestra procedente de la minipreparación o midipreparación a 1 µl de tampón de carga 6x (0,25% azul de bromofenol y 30% glicerol en TE (TRIS 1M pH 8, EDTA 0,25 M); pH 8). Como marcador de peso molecular se usa 1Kb Ladder (Invitrogen)

Se rellena la cubeta de electroforesis con TBE 1x (0.5 M de Tris Base, 0.5 M de ácido bórico y 10 mM de EDTA, en agua) y se realiza la electroforesis a 90V durante aproximadamente 30 minutos. La visualización de los geles se realizó en un Gel Doc 2000 transiluminador (BioRad).

5.6. TRANSFECCIÓN DE *Pichia pastoris* CON pPICZαC-GRNLY

5.6.1. PLÁSMIDO LINEALIZADO

Es necesario digerir el plásmido para que quede de forma lineal y se integre con más facilidad en el genoma de *Pichia pastoris*.

5.6.1.1. Digestión

Se realiza una digestión con la enzima SacI, la cual tiene un sitio de corte único dentro de pPICZαC y no corta dentro del inserto que se quiere introducir (Figura 4). Se mezclan 25µl de tampón "cut smart" 10x (500 mM de acetato de potasio, 200 mM de Tris-acetato, 100 mM de acetato de magnesio, 1 mg/ml BSA pH 7,9; New England Biolabs), 7 µl de SacI,

aproximadamente 40 µg de plásmido y el resto de agua MiliQ hasta completar un volumen de 250 µl. La digestión se realiza a 37°C durante 2 horas.

Seguidamente se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa, como se ha indicado en el apartado 5.5.4, para comprobar que el plásmido se ha digerido correctamente. Se realiza a 115 voltios durante 40 minutos y como control se añade una muestra del plásmido sin digerir.

5.6.1.2. Purificación

Tras comprobar que la digestión ha ido bien, se realiza la limpieza de restos de la digestión (sales y gel de agarosa residual) y se purifica el plásmido utilizando el kit "AccuPrep® Gel Purification". El principio de este kit se basa en la adsorción del DNA sobre un filtro de vidrio en presencia de sales caotrópicas, que mejoran la unión de DNA sobre éste, el cual se fija en el tubo de la columna de unión "AccuPrep". El lavado elimina sales y agarosa residual que pueden unirse de forma no específica. Finalmente, los fragmentos de DNA de alta pureza se eluyen con agua destilada.

5.6.2. PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE *PICHIA PASTORIS* SMD1168

Tres días antes de empezar la electroporación hay que comprobar que las placas de YPDS/zeocina (200 µg/ml de zeocina) para la selección posterior de colonias transfectadas funcionan correctamente. Para ello, se pone una placa sin zeocina y otra con zeocina con *Pichia pastoris* SMD1168 sin transfectar (en la placa que contiene antibiótico, no debería crecer nada). Se dejan las placas en la estufa a 30°C durante todo el proceso de electroporación a modo de control.

5.6.2.1. Preparación de *Pichia* para la electroporación

Se inocula desde una placa *Pichia pastoris* SMD1168 en un matraz de 500 ml con 100ml de medio YPD y se crece toda la noche a 30°C. Al día siguiente se mide la OD₆₀₀ y, cuando se encuentra en un valor entre 1 y 2, se centrifugan 80-100 µL del precultivo en tubos Falcon a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende en 8 ml de solución 100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M sorbitol y 10 mM Tris-HCL, pH 7.5 por cada 8·10⁸ células y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.

Esta solución se autoclava antes de añadir el DTT, el cual se filtra y se agrega a la solución justo antes de usarse. Para calcular la cantidad de células se considera que una unidad de OD₆₀₀ de *Pichia* corresponde a 3·10⁷ células/ml.

Seguidamente, se centrifugan las células a 2000 rpm durante 5 minutos, se resuspenden en 1,5 ml de sorbitol 1 M (4°C) y se repite este procedimiento 3 veces. Finalmente, se resuspenden las células en sorbitol 1M hasta una concentración de 10¹⁰ células/ml.

5.6.2.2. Electroporación

Se mezclan 80-100 µL de la suspensión de células con 5-6 µg de plásmido linealizado en 5-10 µl de agua estéril y se transfiere a una cubeta de electroporación de 0,2 cm en hielo, se incuba durante 5 minutos y se les da un pulso en el electroporador (MicroPulser™ de BIORAD) utilizando el programa para electroporar *Pichia*.

Seguidamente, se añade inmediatamente a la cubeta de electroporación 1 ml de sorbitol 1M mantenido en hielo. Finalmente, se transfiere el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 15 ml y se incuba a 30°C sin agitar durante 1 ó 2 horas.

5.6.2.3. Selección de colonias transfectadas

Se vierten 100 µl de suspensión celular a baja densidad en sorbitol en una placa de YPDS/zeocina (200 µg/ml de zeocina) para la selección. 800µl se centrifugan 10 minutos a 2000 rpm y, para concentrar las células, se eliminan 700 µl de sobrenadante, se resuspende en los 100 µl que quedan y se siembra en otra placa, por si hay un problema con la primera.

Los 100 µl restantes del mililitro de suspensión celular a baja densidad se guardan a 4°C, por si hubiera problemas en los cultivos establecidos.

Finalmente, se incuban las placas 3-10 días a 30°C hasta que aparezcan colonias.

5.7. PRODUCCIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE

5.7.1. PRECULTIVOS

Para realizar la producción de granulisina a pequeña escala, se eligen algunas colonias bien aisladas que hayan crecido en la placa con zeocina, se guardan cultivándolas en una placa, para más adelante elegir la mejor cepa, y se inocula cada colonia en un tubo Falcon de 50 ml que contienen 1 ml de medio BMGY. Para realizar la producción de granulisina a gran escala, se elige una colonia, se inocula en un matraz de 500 ml con 250 ml de medio BMGY. En ambos casos se cultivan a 30°C durante un día para que crezca la levadura.

5.7.2. INDUCCIÓN

En el caso de la producción a pequeña escala, se realiza un cambio de medio mediante la centrifugación de los tubos Falcon durante 10 min a 4000 rpm, eliminación del sobrenadante y adición de medio BMMY para que empiece la inducción de la expresión de la proteína recombinante. En el caso de la producción a mayor escala, se pasan los cultivos a tubos de centrífuga de 500 ml y se centrifugan 6 min a 6400 rpm. A continuación se desecha el sobrenadante, se añade a cada tubo 250 ml de medio BMMY y se resuspende el precipitado de levadura dando unos golpes. Después, se vierten en el matraz de 500 ml donde han crecido inicialmente. En ambos casos, se induce la producción de proteína recombinante a 18°C en agitación durante un día.

Seguidamente, se añade metanol a una proporción 1:100 con el medio de cultivo y se deja hasta el día siguiente a 18°C en agitación. Este proceso se realiza dos veces.

5.7.3. PRUEBA DE EXPRESIÓN

En el caso de la producción a pequeña escala, los precultivos inducidos se centrifugan durante 10 min a 4000 rpm y en el caso de la producción a mayor escala, el contenido del los matraces de 2 litros se vierte en tubos de centrífuga de 500 ml y se centrifuga durante 20 minutos a 9500 rpm dos veces para separar las células del sobrenadante, donde se encuentra la granulisina.

5.7.3.1. Electroforesis desnaturizante en el gel de acrilamida

La electroforesis en gel de acrilamida/SDS se realiza en geles verticales discontinuos de 0,2 mm de espesor, compuestos por dos tipos de geles de la misma composición pero en distinta proporción: gel concentrador, o “stacking gel” (gel superior, de alrededor de 2 cm de longitud) y gel separador o “resolving gel” (gel inferior, de alrededor de 2 cm de longitud). La composición de los geles fue la siguiente:

TABLA 1. Composición para un gel de acrilamida al 15%. Estos geles son utilizados para realizar electroforesis desnaturalizante en gel de acrilamida/SDS

	Stacking gel	Resolving gel 15%
Acrilamida/bisacrilamida 30%	325µl	2,5 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	-	1,25 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	630 µl	-
Agua destilada	1,5 ml	1,17 ml
SDS 10%	25µl	50 µl
APS 10%	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Volumen total	2,5 ml	5ml

Se toman 20 µl de sobrenadante y se mezclan con 10 µl de tampón de carga 3x (Laemli 3x sample buffer: 240 mM Tris-Cl pH 6.8, 6% SDS, 30% de glicerol, 16% de β-mercaptopropanoico ácido, 0.06% de azul de Bromofenol, pH 6,8) en tubos Eppendorf. Se calientan 10 minutos a 100°C y se cargan en un gel de acrilamida al 15% junto con un marcador de peso molecular ("Bluray prestained protein marker"). Finalmente se pone en marcha la electroforesis a 180V durante 80 minutos. Las electroforesis se realizan en cubetas BioRad con 1 L de tampón de electroforesis (Tris 25 mM, pH 8.3, glicina 0.192 M, 0.1% SDS)

5.7.3.2. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas en el gel se transfieren a las membranas de nitrocelulosa de acuerdo con el método descrito previamente [28]. La transferencia se lleva a cabo en una cubeta semiseca para transferencias (BioRad) a 20 V durante 55 minutos en tampón de transferencia (Tris / HCl 48 mM de pH 8,3, Sigma; glicina 39 mM, Sigma; 0,0373% de SDS, Merck; 20% de metanol, pH 8,3, Panreac).

5.7.3.3. Detección de la granulisina mediante inmunoblot

La membrana con las proteínas del sobrenadante fijadas se bloquea con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris/HCl 10 mM pH 8, Sigma; NaCl 0,12 M, Sigma; Tween-20 0,1%, Sigma; timerosal, Merck 0,1 g/L) durante unos 30 minutos. Despues, se lava con tampón B durante 10 minutos.

Seguidamente, se incuba con un anticuerpo primario polyclonal de conejo, amablemente cedido por la Dra. Carol Clayberger (Northwestern University, Chicago), a una concentración de 1:500 en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo durante 20 minutos. A continuación, se lava 3 veces con tampón B en agitación cada 10 minutos y se añade una mezcla de 10 ml de leche, 10 ml de tampón B y 1 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma). La incubación con el anticuerpo secundario se mantiene durante 1-2 horas a temperatura ambiente y en agitación, seguida de tres nuevos lavados de 10 minutos con tampón B en agitación para eliminar el exceso de anticuerpos.

La detección de los complejos se lleva a cabo mediante revelado por quimioluminiscencia (ECL). Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida por la oxidación de luminol, un sustrato quimioluminiscente, por parte de la peroxidasa. Esta luz se capta por películas fotográficas (High performance chemiluminescence film, GE HealthCare) en oscuridad y previa incubación de las membranas con "Pierce ® ECL Western Blotting Substrate" (Thermo Scientific) durante 20 minutos. La exposición de las películas se lleva a cabo dentro

de un cassette de revelado radiológico (Hypercassette™, Amersham Bioscience) y en un cuarto oscuro con iluminación adecuada para revelado fotográfico. Las películas se revelan, tras la exposición, mediante inmersión en soluciones de revelador-agua destilada-fijador, variando el tiempo de solución de revelador según la señal obtenida.

5.8. PURIFICACIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE

5.8.1. FILTRACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS SOBRENADANTES

El sobrenadante de las levaduras se filtra mediante un sistema de filtración por vacío primero con un filtro de 0,45 µm y luego con un filtro de 0,22 µm.

Seguidamente se concentra en un concentrador Pellicon XL Ultracel 5 kDa 0,005 m² (Millipore) desde 500 ml hasta aproximadamente 25 ml. Este sistema de concentración necesita una bomba que ajuste la velocidad de concentrado en este caso a 48 ml/min y sus componentes se colocan siguiendo un determinado esquema (Figura 4). Este proceso dura aproximadamente 4 horas.

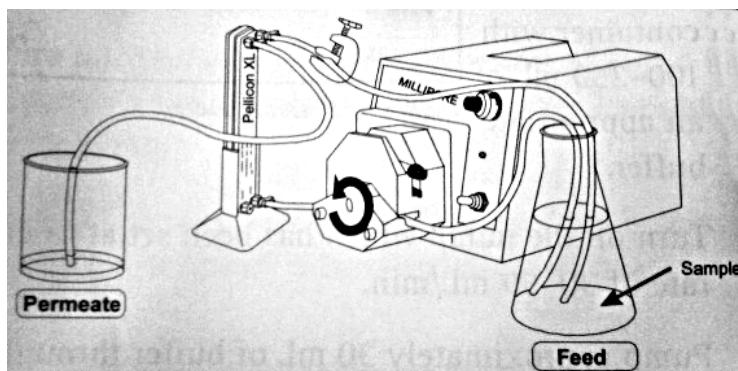


FIGURA 4: Esquema del sistema de concentración. Al principio del proceso se coloca el sobrenadante en el vaso de la alimentación, de forma que circula por un tubo a través de la bomba y llega a Pellicom, donde se separa en el permeado, que va al vaso de permeado y en el retenido, que vuelve al vaso de la alimentación. De esta forma, al final del proceso el vaso del permeado contiene el sobrenadante que no contiene la proteína, mientras que en el vaso de la alimentación queda la proteína concentrada.

5.8.2. DIALISIS PARA CAMBIAR EL TAMPÓN

Se realiza una dialisis utilizando un “Cassette de diáisis Slide-A-Lyzer™” (Thermo Scientific Pierce), con una membrana de tamaño de poro de 3,5kDa y capacidad para albergar 12-30ml. La membrana se sumerge en 5L de tampón de lavado (300 mM de NaCl, 50 mM de TRIS-HCl y 20 mM de imidazol pH 7,4) y se deja dializando toda la noche.

Se realiza diáisis para cambiar el medio procedente del sobrenadante de levaduras en el que se encuentra la granulisina por el tampón que se va a utilizar más adelante en la cromatografía de afinidad con níquel. El imidazol se encuentra en el tampón en baja concentración, de forma que compite con las moléculas que se unen inespecíficamente al níquel.

Al día siguiente se mide el pH para comprobar que se ha cambiado el tampón.

5.8.3. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La granulisina recombinante se expresa con una cola de histidinas con el fin de purificarla mediante una cromatografía de afinidad a níquel, ya que los anillos de imidazol de las histidinas poseen una alta afinidad por el catión Ni^{2+} .

Para ello, 1 ml de Ni-NTA agarosa (Qiagen), que equivale a 500 μl de resina, se mezcla con 8 ml de tampón de lavado, se centrifuga a 2500 rpm durante 2 minutos y se elimina el sobrenadante. Seguidamente se añaden 5 ml de tampón de lavado, se vuelve a centrifugar a 2500 rpm durante 2 minutos y a eliminar el sobrenadante, se resuspende la resina en 1 ml de tampón de lavado y se vierte en el tubo Falcon que contiene la solución resultante tras la diáisisis. Después se coloca en una noria en rotación a 4°C durante 1 hora y media aproximadamente.

A continuación, se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se traspasa la resina a un tubo Falcon de 15 ml. Se lava tres veces con 5 ml de tampón de lavado, se pone en rotación en una noria 15 minutos, se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos y se retira el sobrenadante. Se coloca en una columna con aproximadamente 3 ml de tampón de lavado, y se deja unos 10 minutos para que se pose la resina. La columna se eluye con tampón de elución (500 mM de imidazol, 300 mM de NaCl y 50 mM de TRIS-HCl, pH 7,4) en 7 tubos Eppendorf recogiendo 12 gotas en cada tubo, que equivalen a aproximadamente 0,5 ml en cada fracción.

En todos los pasos de la purificación se van guardando alícuotas para poder analizarlas mediante electroforesis posteriormente.

Seguidamente, se cuantifica la cantidad de proteína en las fracciones eluidas procedentes de la cromatografía de afinidad mediante un kit colorimétrico basado en el reactivo BCA (Pierce) que permite calcular la concentración de proteína total mediante espectrofotometría gracias a la creación de una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de BSA y posterior interpolación.

Finalmente, se unifican las fracciones de elución dando un volumen aproximado de 2,7 ml, se les añade PBS hasta un volumen de 10 ml para cambiar el tampón y se concentran con Amicon 3kDa. El concentrado se esteriliza por filtración, a través de un filtro de 0,22 μm .

Con un aparato NanoDrop® (NanoVue) se mide la concentración de proteína. El aparato mide la absorbancia a 260, 280 y 340 nm, y mediante un algoritmo es capaz de estimar la concentración de proteína.

5.8.4. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE ACRILAMIDA

Con el fin de observar el avance de la purificación y el contenido de las fracciones de elución obtenidas en la columna de níquel, se extraen varias alícuotas de diferentes etapas de la purificación y se cargan 20 μl de estas con 10 μl de tampón de carga 3x en geles de acrilamida al 15% y se lleva a cabo la electroforesis durante 10 minutos a 80V y 45 minutos a 180V. Se cargan dos geles con muestras tomadas de distintos pasos a lo largo de la purificación y también las fracciones de elución.

5.9. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

Células de la línea celular Jurkat se tratan *in vitro* con la granulisina recombinante para determinar la citotoxicidad de la proteína purificada contra este tipo de células tumorales.

Las células Jurkat tienen una sensibilidad conocida descrita previamente para la granulisina recombinante producida en bacterias [10,12]. Sin embargo, no se consiguió una concentración muy elevada de granulisina recombinante en la purificación, por lo que se usaron concentraciones por debajo de las descritas en los artículos anteriores, no superando una concentración de 15 µM junto con células de la línea Jurkat en medio RPMI 1640 (Gibco®). La muestra control se llevó a cabo mediante la adición de un volumen equivalente de PBS sobre el medio de cultivo. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una de 5000.000 células/ml y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 16 horas.

Una característica importante del fenotipo apoptótico es la exposición de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática [29]. Para medir esta translocación, se utilizó la anexina V, una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina. Se utilizó anexina V conjugada con el fluoroforo Alexa-46. Mediante citometría de flujo se puede cuantificar el porcentaje de células apoptóticas en cada una de las condiciones del ensayo.

6. RESULTADOS

6.1. MINIPREPARACIÓN

Tras realizar la minipreparación a partir de ambas colonias transformadas se ha conseguido aislar pPICZαC-GRNLY con un grado de pureza alto (Tabla 2). El plásmido se presenta en al menos dos conformaciones diferentes, ya que en la separación en el gel de acrilamida que se muestra en la Figura 5 se aprecian dos bandas, una en torno a 3-4kb y otra en torno a 8-10kb, marcadas con flechas.

TABLA 2: Absorbancia y concentración de DNA tras la minipreparación.

	Concentración de DNA (ng/ µl)	Abs _{260/280}	Abs _{260/230}
Colonia 1	27,5	1,899	1,904
Colonia 2	25,5	1,901	1,889



FIGURA 5: Gel de agarosa al 1% tras la minipreparación en el que se incluyen muestras de la colonia 1 (calle 1), colonia 2 (calle 2) y marcador de peso molecular (calle 3).

6.2. MIDIPREPARACIÓN

Tras realizar la midipreparación, también se ha conseguido aislar pPICZαC-GRNLY con un grado de pureza alto (ver Tabla 3), aunque en el caso del tubo 2 aparece un valor relativamente bajo para Abs_{260/230}, lo que puede indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm. Debido a esto, en las siguientes pruebas se ha usado solamente DNA procedente del tubo 1.

TABLA 3: Absorbancia y concentración de DNA tras la midipreparación.

	Concentración de DNA (ng/ µl)	Abs _{260/280}	Abs _{260/230}
Tubo 1	199,5	1,891	1,928
Tubo 2	127,0	1,939	1,558

6.3. TRANSFECCIÓN DE PICHIA PASTORIS CON PPICZAC-GRNLY

La digestión de pPICZαC-GRNLY con SacI se realizó con éxito, ya que en la Figura 6 se aprecia una banda correspondiente al plásmido digerido (linealizado) en torno a 3-4 kb (pPICZαC-GRNLY tiene 3787 bp), mientras que en el caso del plásmido antes de digerir se aprecian 3 bandas correspondientes a diferentes conformaciones del plásmido.

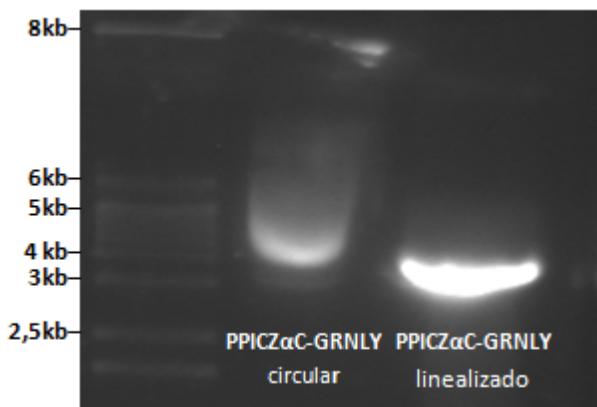


FIGURA 6: Gel de agarosa al 1% de pPICZ α C-GRNLY antes (circular) y después (linealizado) de digerir con SacI, según se indica.

6.4. PRODUCCIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE

Como se puede apreciar en el gel de agarosa de la Figura 7, en la expresión a pequeña escala se consigue expresar y secretar al medio proteína recombinante, ya que se detecta una banda correspondiente a un peso molecular cercano a 11 kDa que se corresponde con el peso de la proteína recombinante en todas las colonias escogidas e inducidas. La granulisina tiene un peso de aproximadamente 9 kDa, pero al ser estar fusionada a una cola de histidinas su peso molecular asciende aproximadamente hasta 11 kDa. Para asegurarnos que la proteína de aproximadamente 11 kDa detectada en una cantidad apreciable en los sobrenadantes de las colonias de *P. pastoris* era en efecto a granulisina, se procedió a analizar esos mismos sobrenadantes por immunoblot con anticuerpo específico. Como se muestra en la Figura 8, se detectó esa misma banda en el sobrenadante de todas las colonias analizadas, aunque la cantidad detectada fue inferior en la colonia 3 y algo mayor en las colonias 1 y 2.

A la vista de estos resultados, se decidió hacer la expresión a mayor escala con la colonia 1.

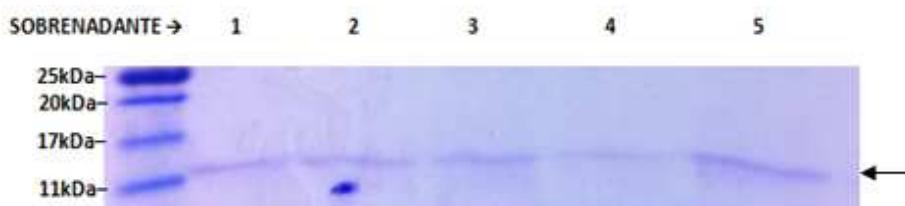


FIGURA 7: Gel de acrilamida al 15% de los sobrenadantes obtenidos en la prueba de expresión a pequeña escala en cinco colonias diferentes.

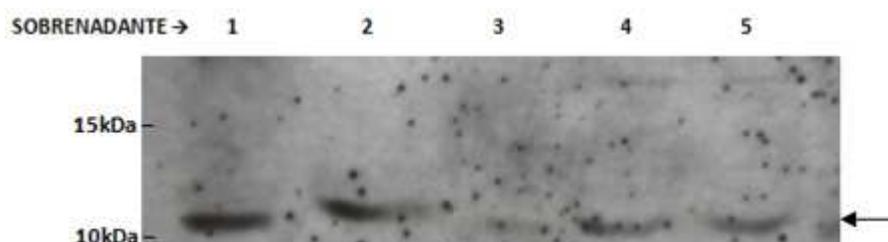


FIGURA 8: Análisis por inmunoblot utilizando un anticuerpo polyclonal anti-granulisina de los sobrenadantes obtenidos en la prueba de expresión a pequeña escala.

6.5. PURIFICACIÓN DE GRANULISINA RECOMBINANTE

En el gel que se muestra en la Figura 9, se puede apreciar que el sobrenadante de *P. Pastoris* obtenido tras la inducción contiene proteínas bastante diluidas (calle 1). Tras concentrarlo con Pellicom, en el permeado se encuentra proteínas también muy diluidas en su mayoría de peso molecular menor de 3,5 kDa (calle 2), mientras que en el concentrado se encuentran las proteínas mucho más concentradas (calle 3). Tras dializar, el perfil de bandas se mantiene similar al concentrado (calle 4). Tanto en el concentrado, como en el dializado, se puede apreciar una banda con un poco de más de intensidad entre los marcadores de 10 y 15 kDa indicada con una flecha, la cual podría corresponder a la granulisina recombinante. Al añadir la resina de níquel, la granulisina recombinante se une a ésta debido a que tiene una cola de histidinas. Parece que en el eluido de la columna (calle 5) también se aprecia esta banda, lo cual podría indicar que la resina de níquel se saturó. En los lavados realizados a la resina (calles 6-8), sobre todo en el primero (calle 6), se aprecia cómo se eliminan restos de otras proteínas. Posteriormente, los lavados están prácticamente limpios (calle 7 y 8).

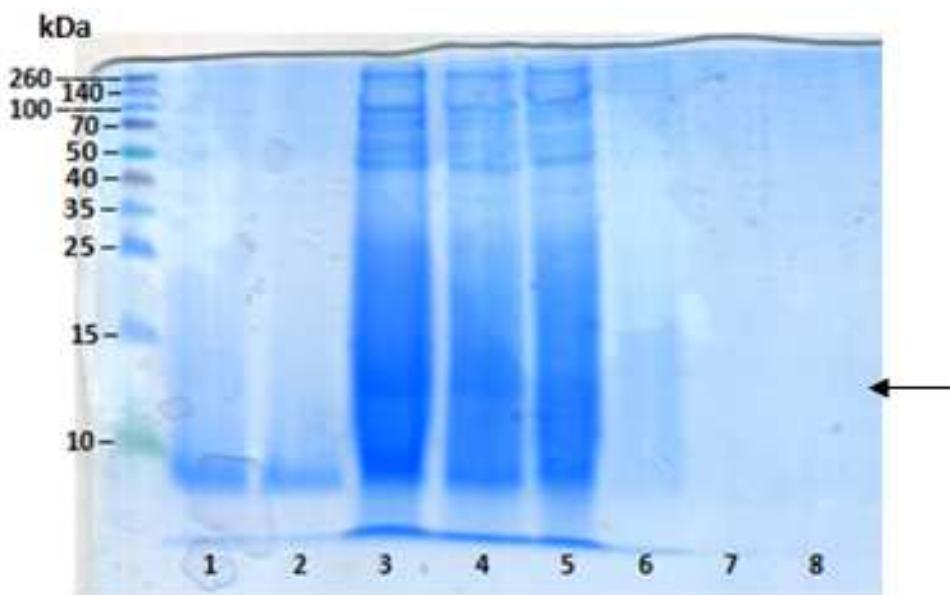


FIGURA 9: Gel de agarosa al 15% del sobrenadante de *P. Pastoris* transfectada con pPICZ α -GRNLY en diferentes fases de purificación: sobrenadante filtrado (1); permeado (2) y concentrado (3) resultantes tras concentrar con Pellicom; dializado (4); dializado tras añadir la resina de níquel y centrifugar (5); y sobrenadante de los tres lavados que se realizan a la resina (6, 7, 8)

En las fracciones eluidas se detectan proteínas, sobretodo en la fracción de elución 2 (Figura 10 y 12). Con los datos de la tabla 4, se construye una recta de calibrado, la cual tiene un alto coeficiente de determinación (Figura 11) para poder cuantificar la concentración de proteína que hay en cada fracción de elución. Con este fin se interpola la absorbancia a 562 nm obtenida en las muestras en la recta de calibrado y se multiplica por el factor de dilución de las muestras para averiguar la concentración de las fracciones de elución. Como cada fracción contiene aproximadamente 0,5 ml, podemos averiguar la masa de la proteína que se ha obtenido aproximadamente en las fracciones. En este caso, se desecha la fracción de elución 1 al contener muy poca cantidad de proteína. Finalmente, se estima que hay aproximadamente 580 μ g de proteína en todas las fracciones de elución salvo la primera (Tabla 5).

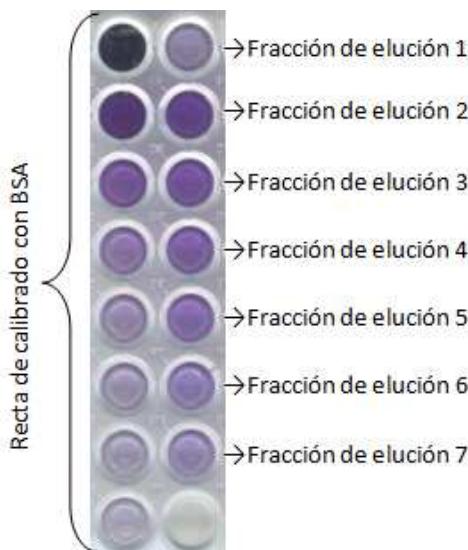


FIGURA 10: Placa que contiene concentraciones conocidas de BSA, para construir la recta de calibrado (pocillos de la izquierda), y las fracciones eluidas procedentes de la cromatografía de afinidad (pocillos de la derecha) tras el revelado con el kit colorimétrico basado en el reactivo BCA (Pierce).

TABLA 4: Recta patrón de concentraciones de BSA y absorbancia a 562 nm

Concentración BSA (μg/ml)	Absorbancia a 562 nm	$\text{Abs}_{562} - \text{blanco}$
200	2,159	2,063
66,67	0,794	0,698
22,22	0,34	0,244
7,407	0,186	0,09
2,469	0,134	0,038
0,823	0,105	0,009
0,274	0,097	0,001
0	0,096 (blanco)	0

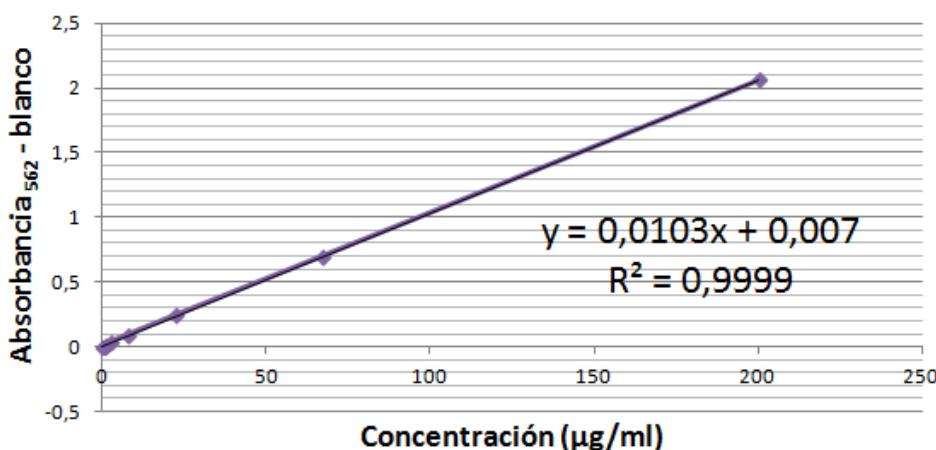


FIGURA 11: Gráfica que representa la recta de calibrado obtenida de los datos de la Tabla 4.

TABLA 5: Datos de absorbancia a 562 nm y cuantificación de la cantidad de proteína presente en las fracciones de elución.

Fracción de elución	Abs ₅₆₂	Abs-blanco	Interpolación (Abs=0,0103·C + 0,007)	Dilución 1:11	Masa (μg)
			Concentración (μg/ml)	Concentración (μg/ml)	
1	0,136	0,040	3,20	35,24	17,62
2	0,481	0,385	36,70	403,69	201,84
3	0,345	0,249	23,50	258,45	129,22
4	0,277	0,181	16,89	185,83	92,91
5	0,244	0,148	13,69	150,58	75,29
6	0,195	0,099	8,93	98,25	49,13
7	0,161	0,065	5,63	61,94	30,97
μg totales (sin tener en cuenta la fracción de elución 1)					579,37

En la tabla 5 se muestra la cuantificación de las fracciones de elución, consigiéndose una una cantidad total de proteína de 579,37 μg. Seguidamente se procede a la concentración de la proteína hasta 1 ml de volumen final utilizando Amicon. La cantidad final de proteína obtenida, cuantificada utilizando Nanoview fue de 217,5 μg/ml (Tabla 6). El rendimiento final conseguido es de 435 μg/L, ya que se parte de 500 ml de cultivo.

Considerando que el peso molecular de la granulisina es de 11 kDa, la concentración final obtenida es de 19,8 μM.

Parece ser que se pierde una importante cantidad de proteína que se queda adherida a la membrana de Amicon. La granulisina, al tener carga positiva, tiene una cierta tendencia a pegarse a la membrana.

TABLA 6: Medidas de absorbancia y concentración estimada de proteína tras la purificación.

Abs ₂₆₀	Abs ₂₈₀	Abs ₃₄₀	Concentración (μg/ml)
0,253	0,291	0,047	222
0,270	0,294	0,048	213
media		217,5	

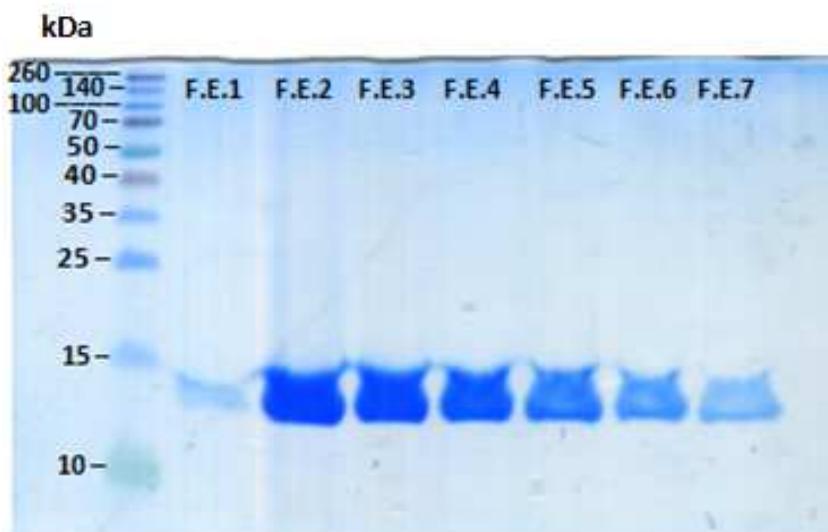


FIGURA 12: Gel de agarosa al 15% de las fracciones de elución.

En el gel de la Figura 12 se muestra tinción por Coomasie de las fracciones eluidas de la columna, demostrándose la presencia de una sola proteína (o de un doblete) al peso molecular esperado.

6.6. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LA GRANULISINA RECOMBINANTE SOBRE LAS CÉLULAS JURKAT

En nuestro grupo, se utilizaba una concentración de 50 μM de granulisina recombinante producida en bacterias sobre la leucemia humana Jurkat, que producía una citotoxicidad de alrededor del 40% en 4 horas y cerca del 100% en 24 horas [11,12]. En nuestro caso, no se alcanza la concentración deseada, pero se realiza un ensayo con concentraciones entre 2,6 y 15 μM , con una incubación de 16 horas.

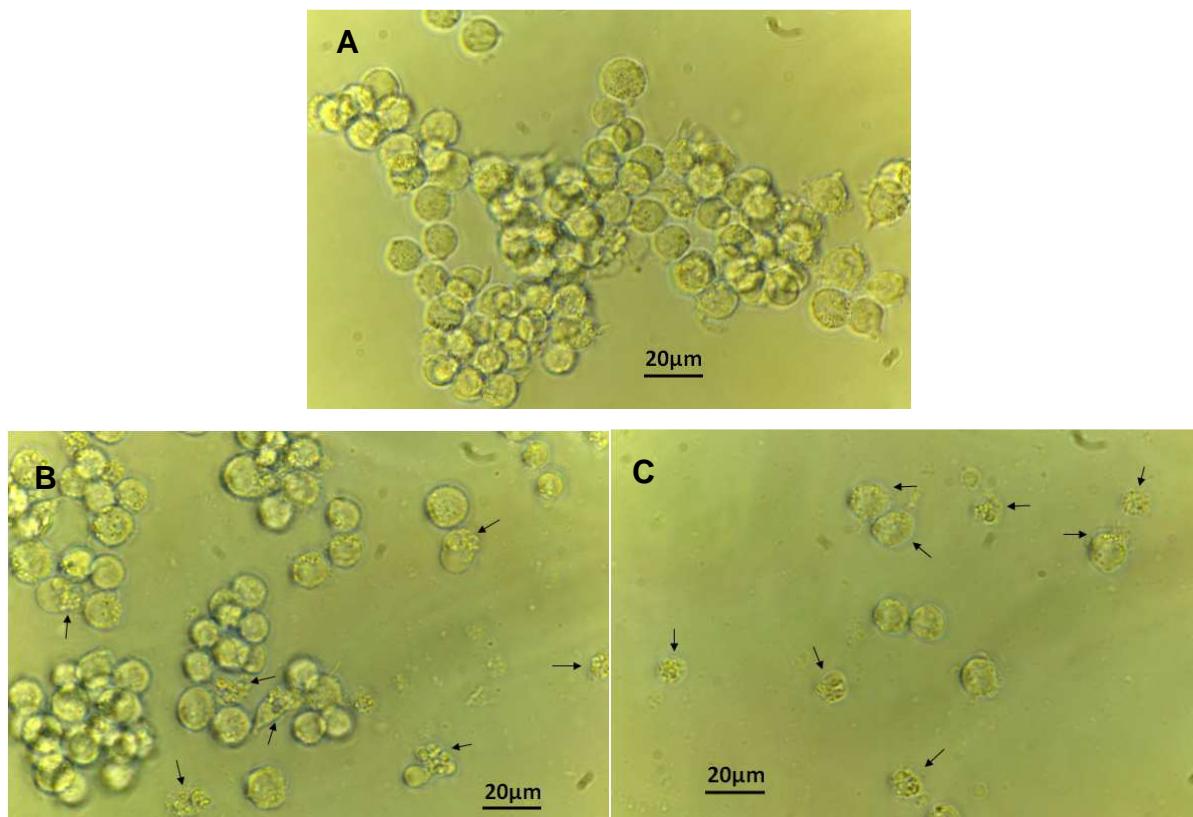


FIGURA 13: Células Jurkat que se trataron o bien con medio de cultivo que contenía la misma cantidad de PBS que las muestras tratadas (A), o bien con concentraciones de 7,9 μM (B) ó 15 μM (C) de granulisina recombinante producida en *P. pastoris*. Seguidamente, se tomaron las fotografías de contraste de fase que se muestran en el microscopio (Nikon). Mediante flechas se señalan algunas de las células que están en proceso de apoptosis, caracterizadas por la condensación nuclear, arrugamiento y burbujeo de membrana.

Al finalizar la incubación las células se marcaron con anexina-V conjugada con Alexa-46 y la exposición de fosfatidilserina en la membrana externa de las células se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados de este análisis se pueden ver en la Figura 14.

Como se puede apreciar en la Figura 13 y 14, la granulisina recombinante producida en *P. pastoris* induce apoptosis sobre las células Jurkat, siendo el efecto máximo a la concentración más alta utilizada de 15 μM . Los histogramas de la Figura 14 muestran el marcaje con el conjugado anexina-V-Alexa-46 y los números indican el porcentaje de células apoptóticas en cada caso.

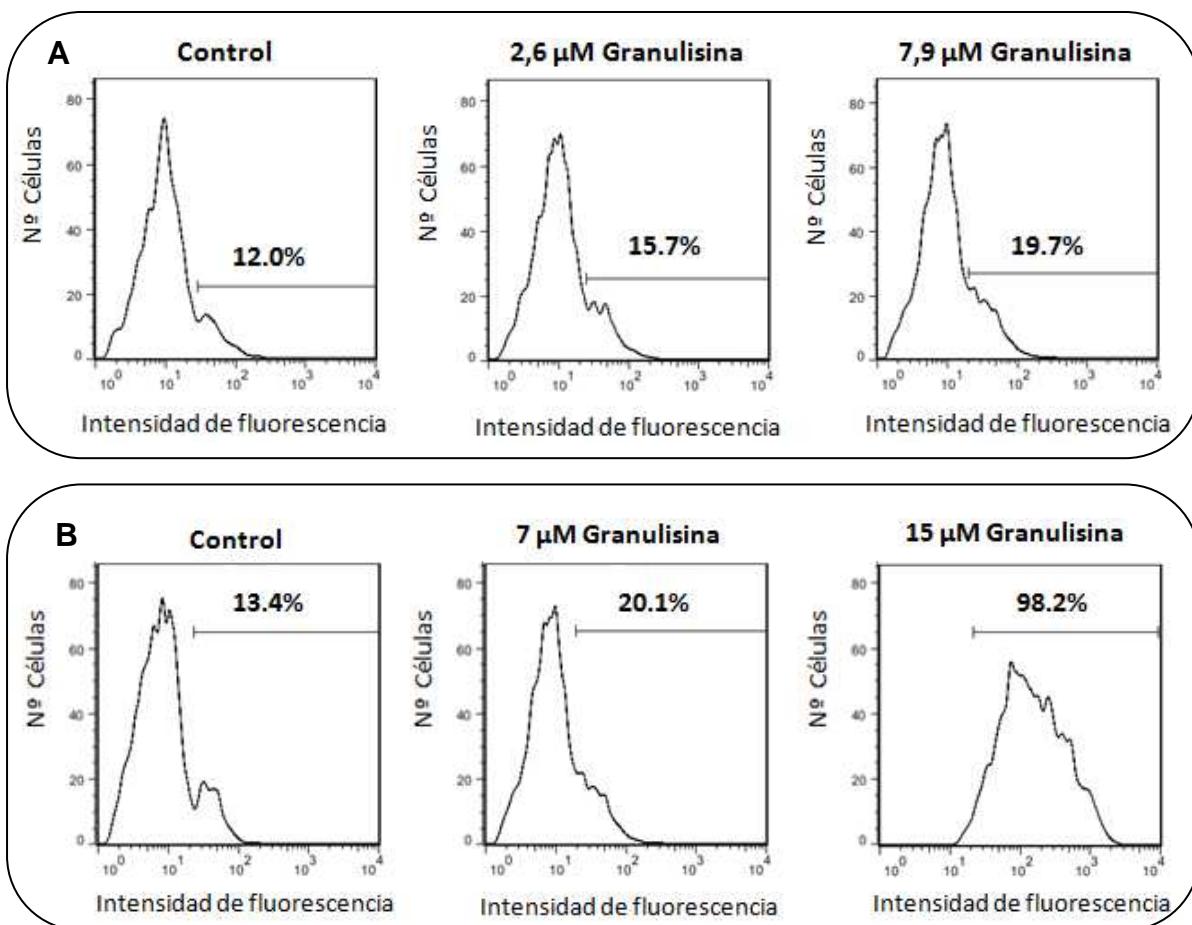


FIGURA 14: Histogramas obtenidos tras analizar células Jurkat, tratadas como se indica en el pie de la Figura 12, mediante citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos, A y B, y por eso aparecen dos histogramas control.

7. DISCUSIÓN

En este estudio, se ha logrado con éxito la expresión de granulisina de 9 kDa recombinante en *Pichia Pastoris*.

Para ello, se usa un plásmido integrativo de levadura (YIP) con el que se ha transfectado *P. pastoris* y se ha conseguido que el inserto deseado se integre en su genoma, se mantenga de forma estable y se transmita a la descendencia.

El rendimiento obtenido en la purificación de granulisina recombinante es similar que el conseguido en bacterias (Al-Wasaby, comunicación personal). Sin embargo, se tarda menos tiempo y es un método menos laborioso, en el que se necesitan realizar menos etapas, ya que no es necesario desnaturar la proteína y volver a renaturalizarla, el mayor problema del protocolo de producción anterior. Estas ventajas son posibles en parte gracias a que el factor α hace que la granulisina recombinante se secrete en el sobrenadante del cultivo directamente y se pueda purificar fácilmente.

El rendimiento aun podría ser mayor si se hubiera utilizado más cantidad de resina y si se hubiera partido de más cantidad de cultivo, ya que la cantidad de proteína que se pierde al adherirse a la membrana de Amicon en la concentración final es una cantidad fija.

La actividad citolítica de la granulisina recombinante purificada se mide con un ensayo sobre células de la línea celular Jurkat. En este ensayo preliminar, los resultados muestran muerte celular dependiente de dosis. Cabe destacar que la citotoxicidad inducida por la granulisina producida en *P. pastoris* es mayor que la que solía inducir la producida en bacteria, para obtener un 90% de toxicidad en tiempos de incubación entre 16 y 24 horas se precisaban concentraciones entre 30 y 50 µM [12] y en este caso se ha logrado con 15 µM.

Al ser *P. pastoris* un microorganismo eucariota, produce proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales. Tras la purificación, en el gel de la Figura 12, donde se cargan las fracciones de elución, se aprecian al menos dos bandas con pesos moleculares muy similares pertenecientes a diferentes isoformas de la granulisina recombinante. Esto es debido a que la granulisina sufre modificaciones postraduccionales de O-glicosilación. Observaciones similares se habían hecho previamente por otro grupo de investigación que realizó un trabajo similar en el que se determinó que las diferentes bandas obtenidas eran debidas a la O-glicosilación [25].

La granulisina recombinante procedente de levadura se encuentra O-glicosilada, mientras que la procedente de bacterias no. Los carbohidratos unidos a la proteína alteran la estructura y en consecuencia la función de ésta. Además, la glicosilación parece aumentar la estabilidad de la proteína reduciendo su vulnerabilidad a la degradación proteolítica [31]. Todo esto parece indicar que el aumento aparente en la bioactividad de la granulisina recombinante puede deberse a la O-glicosilación.

Mediante las herramientas informáticas Glycoep, YinOYang y DictyOGlyc (Expasy) se predicen los residuos de granulisina susceptibles de O-glicosilación, los cuales se pueden apreciar en la Figura 15.

GRDYRTCLTIVQQLKKMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDVCRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR

FIGURA 15: Secuencia de aminoácidos de la granulisina de 9 kDa. En azul se encuentran marcados los residuos de treoninas y serinas susceptibles de ser O-glicosiladas.

Estos resultados sugieren que la producción de granulisina recombinante en *P. pastoris* es una buena estrategia y se utilizará en los ensayos preclínicos que el grupo de investigación quiere llevar a cabo en lo sucesivo.

El futuro de la experimentación se centrará en analizar el efecto *in vivo* de la granulisina recombinante producida en *P. pastoris* sobre tumores humanos xenotrasplantados en ratones atípicos.

8. CONCLUSIÓN

- Se ha conseguido una expresión y purificación exitosa de granulisina de 9 kDa recombinante expresada en *P. pastoris*. Esta preparación carece de LPS y se utilizará para trabajos futuros del grupo con esta proteína
- La granulisina recombinante producida en *P. pastoris* induce muerte celular dependiente de dosis.
- La O-glicosilación de la granulisina recombinante podría estar implicada en una cierta mejora de su bioactividad citolítica sobre las células Jurkat.

8. CONCLUSION

- A successful expression and purification of recombinant 9 kDa granulysin expressed in *P. pastoris* has been achieved.
- Recombinant 9 kDa granulysin expressed in *P. pastoris* induces dose-dependent cell death.
- Recombinant granulysin O-glycosylation may be involved in some improvement in their cytolytic activity on Jukat cells.

BIBLIOGRAFÍA

1. Peña SV, & Krensky AM. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Seminars in Immunology*, 9(2), 117
2. Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A., et al. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 325(2), 355
3. Krensky, A. M., & Clayberger, C. (2009). Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*, 73(3), 193
4. Peña SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, & Krensky AM. (1997). Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 158(6), 2680
5. Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, & Krensky AM. (2005). Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(9), 5243
6. Okada S, Li Q, Whitin JC, Clayberger C, & Krensky AM. (2003). Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(5), 2556
7. Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., et al. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282(5386), 121
8. Clayberger, C., & Krensky, A. M. (2003). Granulysin. *Current Opinion in Immunology*, 15(5), 560
9. Wang Z, Choice E, Kaspar A, Hanson D, Okada S, Lyu SC, et al. (2000). Bactericidal and tumorcidal activities of synthetic peptides derived from granulysin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(3), 1486
10. Gamen S, Hanson DA, Kaspar A, Naval J, Krensky AM, & Anel A. (1998). Granulysin-induced apoptosis. I. involvement of at least two distinct pathways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(4), 1758
11. Pardo J, Pérez-Galán P, Gamen S, Marzo I, Monleón I, Kaspar AA, et al. (2001). A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(3), 1222
12. Aporta, A., Catalán, E., Galán-Malo, P., Ramírez-Laborda, A., Pérez, M., Azaceta, G., et al. (2014). Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors. *Biochemical Pharmacology*, 87(3), 410
13. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(25), 2654
14. Nagasawa M, Kawamoto H, Tsuji Y, & Mizutani S. (2005). Transient increase of serum granulysin in a stage IVs neuroblastoma patient during spontaneous regression: Case report. *International Journal of Hematology*, 82(5), 456
15. Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, Sugawara H, Majima T, Kawarabayashi N, et al. (2007). Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(8), 1322

16. Linde CM, Grundström S, Nordling E, Refai E, Brennan PJ, & Andersson M. (2005). Conserved structure and function in the granulysin and NK-lysin peptide family. *Infection and Immunity*, 73(10), 6332
17. Kolter T, Winau F, Schaible UE, Leippe M, & Sandhoff K. (2005). Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41125
18. Yi, Z., Fu, Y., Jin, G., Li, M., Zhang, X., & Song, W. (2009). Intracellularly expressed granulysin induced apoptosis in hepatoma cells and role of mitochondrial apoptotic pathway. *Cellular Immunology*, 255(1), 76
19. Huang LP, Lyu SC, Clayberger C, & Krensky AM. (2007). Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(1), 77
20. Al-Wasaby, S, De Miguel, D, Aporta, A, Conde, B, Martínez-Lostao, L y Anel, A. In vivo potential of recombinant granulysin against human tumors. *Oncolimmunol.*, en prensa, 2015.
21. Płociennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., & Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 72(3), 557
22. Casteluber MC, Damasceno LM, da Silveira WB, Diniz RH, Passos FJ, & Passos FM. (2012). Cloning and expression of a functional core streptavidin in pichia pastoris: Strategies to increase yield. *Biotechnology Progress*, 28(6), 1419
23. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in pichia pastoris: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 98(12), 5301
24. Heterologous expression of diverse barley XTH genes in the yeast pichia pastoris.(2010). 27(3), 251
25. Guo, Y., Luan, G., Shen, G., Wu, L., Jia, H., Zhong, Y., et al. (2013). Production and characterization of recombinant 9 and 15 kDa granulysin by fed-batch fermentation in pichia pastoris. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 97(17), 7669
26. Pichia Expression Kit: For expression of recombinant proteins in Pichia pastoris, MAN0000012, Invitrogen, Corporate Headquarters, Rev. Date: 10/1/2014
27. pPICZα A, B, and C: *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins, MAN0000035, Invitrogen, Corporate Headquarters, Rev. Date: 7/7/2010
28. Anel A, & Kleinfeld AM. (1993). Tyrosine phosphorylation of a 100-kDa protein is correlated with cytotoxic T-lymphocyte function. evidence from cis unsaturated fatty acid and phenylarsineoxide inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(23), 17578
29. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1545
30. Clayberger C, Finn MW, Wang T, Saini R, Wilson C, Barr VA, et al. (2012). 15 kDa granulysin causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(12), 6119
31. Peregrina García, J. M. (2009). *Beta-o-glicosilación de péptidos que incorporan aminoácidos no naturales*. (Tesis doctoral inédita). Departamento de química, área de química orgánica, Universidad de La Rioja