



“Producción de ApoD en un sistema de expresión eucariota y estudio de su localización intracelular tras la endocitosis.”

Trabajo de Fin de Máster en Investigación Biomédica

RAQUEL PASCUA MAESTRO

Directores: M^a Dolores Ganfornina y Diego Sánchez

Julio 2013

ÍNDICE

1.- Resumen

2.- Introducción

- Apolipoproteína D
- Los lisosomas y el estrés oxidativo
- Rutas de endocitosis
- Antecedentes inmediatos al proyecto: Hipótesis de trabajo

3.- Objetivos

4.- Materiales y métodos

- Cultivos celulares
- Adaptación del cultivo de HEK293T a condiciones de bajo suero
- Congelación y descongelación de células
- Tratamiento con bajo suero y Paraquat de la línea celular 1321N1
- Purificación de plásmidos
- Transfección con lipofectamina
- Transfección con X-fect
- Producción de cubres con sustrato de adhesión de poli-L-lisina
- Inmunocitoquímica
- Estudio del curso temporal de la producción de ApoD
- Recolección y concentración del medio de cultivo
- Electroforesis (PAGE y SDS-PAGE) y *Western blot*
- *Stripping* de membranas para doble marcaje en *Western blot*
- Purificación mediante cromatografía de afinidad
 - Sistema 6xHistidine-tag/Ni-NTA
 - Sistema Strep-tag/Strep-Tactin

5.- Resultados

- Objetivo 1
- Objetivo 2

6.- Discusión y perspectivas

7.- Bibliografía

1.- RESUMEN

La apolipoproteína ApoD se expresa en el sistema nervioso durante su desarrollo y aumenta con el envejecimiento y la neurodegeneración. Estudios previos a nivel celular han demostrado que ApoD se sobreexpresa en respuesta a diversas formas de estrés (reducción de suero o tratamiento con agentes pro-oxidantes como el Paraquat). Nuestros datos sugieren que cuando una célula sufre estrés oxidativo, ApoD es endocitada. Nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente: tras su endocitosis, ApoD podría llegar hasta compartimentos subcelulares como los lisosomas, que son un elemento crítico en el inicio de programas de muerte celular o de supervivencia. Proteger la membrana lisosomal sería suficiente para explicar que ApoD pueda evitar la muerte celular en condiciones de estrés oxidativo.

Para poder estudiar el tráfico subcelular de ApoD ha sido necesario obtener una proteína que se pueda distinguir de la propia. Para ello, hemos desarrollado un sistema de expresión eucariota con el que obtenemos ApoD de ratón fusionada con dos secuencias de reconocimiento: polyHis-tag en el extremo N-terminal y Strep-tag en el C-terminal. Tras adaptar las células a condiciones de cultivo de bajo suero (1-2% de FBS) para evitar que la albúmina, componente muy abundante en el suero, interfiera con los sistemas de purificación, realizamos la transfección de células HEK293T y estudiamos el curso temporal de la producción de la proteína. Finalmente, hemos obtenido la proteína pura mediante cromatografía de afinidad.

Se ha encontrado ApoD dentro de la célula tanto durante su producción y secreción como durante su internalización. Una fracción importante de la misma colocaliza con marcadores lisosomales. Para conocer el papel de ApoD en los lisosomas, hemos cuantificado la proteína que colocaliza con el marcador lisosomal Lamp-2 en situaciones de privación de suero y tratamiento con Paraquat.

2.- INTRODUCCIÓN

Apolipoproteína D

La Apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de aproximadamente 29 kDa. Se expresa en el sistema nervioso durante su desarrollo [1, 2] y aumenta con el envejecimiento y con la aparición de múltiples patologías neurodegenerativas. Este cambio de expresión ocurre como mecanismo de defensa ante daños oxidativos e inflamatorios [3].

ApoD fue detectada por primera vez en 1963 [4] en el plasma, asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL), de donde en 1973 fue aislada por McConathy y Alaupovic [5]. Inicialmente se consideró que ApoD pertenecía al grupo de las apolipoproteínas, pero los estudios posteriores demostraron que tenía homología con la familia de las lipocalinas [6].

Las lipocalinas son pequeñas proteínas de unos 20kDa de peso, globulares y extracelulares [7]. Están presentes tanto en animales vertebrados como en invertebrados, en plantas e incluso en bacterias [8]. Su estructura terciaria está formada por un barril- β de 8 láminas antiparalelas abierto por uno de los lados y que forma una cavidad interior delimitada por aminoácidos apolares.



Figura 1.- Estructura tridimensional de ApoD humana obtenida mediante difracción de rayos X por Eichinger et al. en 2007 [9].

A esta cavidad o bolsillo se pueden unir diferentes moléculas hidrofóbicas, como por ejemplo ácidos grasos, odorantes, esteroides, etc. [10, 11]. Funcionalmente las lipocalinas están implicadas en numerosos procesos biológicos. En un principio se consideró a las lipocalinas como proteínas de transporte y almacenaje de vitaminas, hormonas y otros metabolitos secundarios. Actualmente se ha comprobado que están implicadas en otros procesos tales como la regulación del metabolismo y de la respuesta inmune, la respuesta al estrés, la guía de axones, etc.

El gen de ApoD se encuentra localizado en humanos dentro de la región p14.2 en el cromosoma 3 y en ratón en el cromosoma 16. Su cDNA fue clonado por primera vez en 1986 [12]. En humanos este gen contiene 855 pb divididos en 5 exones con una distribución característica de la familia de las lipocalinas en cordados [13]. El gen de ApoD muestra una región promotora que abarca 10 kpb por delante del primer exón, y estudios en esta región muestran la presencia de muchos elementos reguladores [14, 15].

La estructura primaria de ApoD es una cadena de aproximadamente 18,1 kDa. Dependiendo del tejido en el que sea sintetizada, presenta un patrón de glicosilaciones diferente; fundamentalmente en los residuos de asparragina en las posiciones 45 y 178, lo que varía su peso entre los 19 y los 32 kDa. En su secuencia aminoacídica se encuentra un péptido señal formado por 20 aminoácidos, que se elimina en el procesamiento. Las 5 cisteínas de su secuencia forman puentes disulfuro dos a dos para mantener la estructura. La quinta cisteína desapareada se unirá a otras macromoléculas biológicas del plasma. Esta última es una peculiaridad de ApoD humana que no se encuentra en el resto de los organismos conocidos, incluyendo al ratón [7].

ApoD consta de 8 láminas β -antiparalelas flanqueadas por una hélice α y conectadas entre sí por 7 lazos. Los puentes disulfuro de sus cisteínas ayudan finalmente a mantener la estructura de barril- β ligeramente distendido [9].

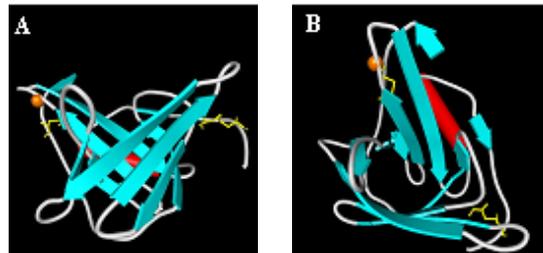


Figura 2.- Estructura tridimensional de ApoD humana. Se observa su estructura en barril- β formando un bolsillo y su hélice α . Se han destacado en amarillo los puentes disulfuro entre las cisteínas 41-165 y 8-114 y la cisteína 116 desapareada (esfera naranja).

ApoD se expresa durante la gestación y en el desarrollo del feto, pero también se expresa durante la vida adulta, siendo el Sistema Nervioso el tejido de máxima expresión de ApoD [16], tanto el central (SNC) como el periférico (SNP) [17]. ApoD es sintetizada fundamentalmente por las células de Schwann en el SNP [18]. La presencia de ApoD se ve aumentada en el nervio periférico de rata y de ratón tras una lesión [19, 20]. Su falta provoca en nervios sanos una disminución en la velocidad de la conductividad motora y vainas de mielina más delgadas. Se ha demostrado que ApoD, ante un daño, ayuda a recuperar la función locomotora, promoviendo la limpieza de mielina y regulando el número de macrófagos en la zona dañada, estando implicada en la señalización de procesos inflamatorios [20].

Además, ApoD se expresa en condiciones normales en el SNC en astrocitos y oligodendrocitos. Se detecta un aumento importante de la expresión durante el envejecimiento [21] y en muchas patologías neurodegenerativas como Alzheimer [22], Parkinson [23], esquizofrenia, trastorno bipolar, ataxias, etc. También es interesante destacar que tanto en cánceres de diversos tejidos, como en obesidad y diabetes, se ha detectado la sobreexpresión de ApoD [24]. ApoD está presente en altas concentraciones en el fluido de la enfermedad quística de mama, una condición asociada con un menor riesgo de cáncer de mama [7]. Además en cáncer colorrectal, se ha comprobado que los niveles de ApoD disminuyen durante la progresión del tumor. Una sobreexpresión de ApoD favorecería la apoptosis, disminuyendo su agresividad.

Ante estas situaciones de sobre-expresión se planteó la pregunta de si ApoD es la causa o la respuesta protectora del organismo frente a la enfermedad.

La función de ApoD ha sido ampliamente estudiada tanto en organismos modelo como en seres humanos [25]. Por otra parte, se ha demostrado que ApoD presenta efectos protectores en el cerebro del ratón ante el estrés oxidativo, característica respaldada por los resultados con moscas transgénicas que expresan ApoD humana [26].

Estudios previos en células en cultivo han demostrado que ApoD se sobreexpresa en respuesta a diversas formas de estrés celular: (i) deprivación de suero en diversas líneas celulares [27], (ii) tras lesionar monocapas confluentes de células de músculo liso vascular [28] y (iii) tras tratar las células con agentes pro-oxidantes como el Paraquat (PQ) [29].

El Paraquat es un productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por lo tanto un generador de estrés oxidativo, que afecta tanto a astrocitos [29, 30] como a neuronas [31]. Se ha visto que ApoD secretada por los astrocitos proporciona una protección autocrina a estas células gliales contra el estrés oxidativo inducido por PQ [32]. Si se añade ApoD al medio de cultivo, ésta es internalizada en la célula y aparece en compartimentos subcelulares. Estos compartimentos están aún por determinar.

Además se sabe que ApoD evita la acumulación de lípidos peroxidados, tanto *in vivo* [3, 33] como en células en cultivo [29]. El Paraquat produce una mayor peroxidación lipídica en ratones deficientes en ApoD (*knock out*) como en animales *wild-type* [34]. Por el contrario, la sobreexpresión de ApoD en el cerebro ante este estímulo, provoca una disminución de dicha peroxidación lipídica [3].

Se ha analizado la inducción de mRNA de ApoD en células 1321N1 expuestas a Paraquat, observándose una respuesta temprana al estrés oxidativo [34]. El máximo pico de expresión de mRNA se produce a las 6 horas después de la exposición a Paraquat, manteniéndose la proteína presente durante las 24 horas posteriores. La adición de ApoD humana a cultivos de astrocitos deficientes en esta proteína, promueve la supervivencia a través de un mecanismo acompañado de la internalización y la modulación de la reactividad astrogliar. Esto indica que ApoD favorece una protección autocrina, lo cual contribuye a la homeostasis del sistema nervioso ante el estrés oxidativo [34].

Toda esta información revela que ApoD ejerce un mecanismo neuroprotector y que este mecanismo se pone en marcha ante el estrés oxidativo y la inflamación, a fin de evitar el efecto dañino que ambos procesos tienen sobre las células.

Lisosomas y estrés oxidativo

Los lisosomas son los compartimentos principales de degradación de la célula. Estos compartimentos se componen de numerosas vesículas ácidas citoplasmáticas monomembrana (con un pH interior de 4-5), que constantemente se fusionan y se dividen. Sus principales marcadores son las proteínas Lamp-1 y Lamp-2 que están ubicadas en la

membrana lisosomal. El compartimento lisosomal recibe un gran número de hidrolasas de la red trans-Golgi y sus sustratos llegan tanto desde el exterior de la célula (heterofagia) como del interior (autofagia). Muchas macromoléculas que se degradan contienen hierro que, cuando se libera, hace a los lisosomas sensibles al estrés oxidativo [35].

La magnitud de la desestabilización lisosomal determina si una célula está sufriendo autofagia, apoptosis o necrosis. Dependiendo de lo eficiente que sea la actividad lisosomal, se permitirá o no a las células reparar el daño producido y sobrevivir.

Aunque una célula haya desencadenado el programa de apoptosis, si el compartimento lisosomal está intacto y mantiene su funcionalidad, se podría llevar a cabo de manera eficiente una autofagia que contrarrestaría a dicha apoptosis. Por el contrario, si la célula presenta una degradación lisosomal vinculada a un estrés oxidativo, este proceso no tendría lugar. Todo esto originaría, por ejemplo, cambios degenerativos en las neuronas durante el envejecimiento [36].

Durante el envejecimiento, la entrada inevitable de peróxido de hidrógeno en los lisosomas ricos en hierro provoca la formación lenta de lipofuscina por oxidación de macromoléculas. La lipofuscina ocupa una parte sustancial del volumen del compartimento lisosomal en células envejecidas. Esto parece dar lugar a un mal direccionamiento de enzimas lisosomales, lo que resulta en una depresión de la autofagia y en la acumulación de mitocondrias y proteínas defectuosas con la consiguiente disfunción celular [35].

Rutas de endocitosis

En los últimos años se han producido importantes avances en la comprensión de las rutas y de los mecanismos de endocitosis. Además de las rutas clásicas de la endocitosis mediada por clatrina y la endocitosis caveolar, se han descrito otras formas más diversas de endocitosis, como la endocitosis dependiente de RhoA o la endocitosis dependiente de flotilina [37].

La endocitosis mediada por caveolina es un mecanismo de endocitosis no fagocítica, ya que no se combina con los lisosomas [38]. Ésta se produce a través de una invaginación en la membrana plasmática. El interés actual por las caveolinas se basa en sus múltiples funciones: en la activación de endocitosis, en la homeostasis del colesterol, en la transcitosis en las células endoteliales, en la modulación de la señalización celular, en la entrada de patógenos y en el cáncer [37].

La endocitosis dependiente de clatrina se produce a través de la invaginación de la membrana plasmática en regiones que tienen una densidad alta de la proteína citosólica clatrina. Este proceso traslada materiales atrapados desde el endosoma temprano al endosoma tardío, para finalmente fusionarse con lisosomas y formar un híbrido lisosoma-endosoma [38].

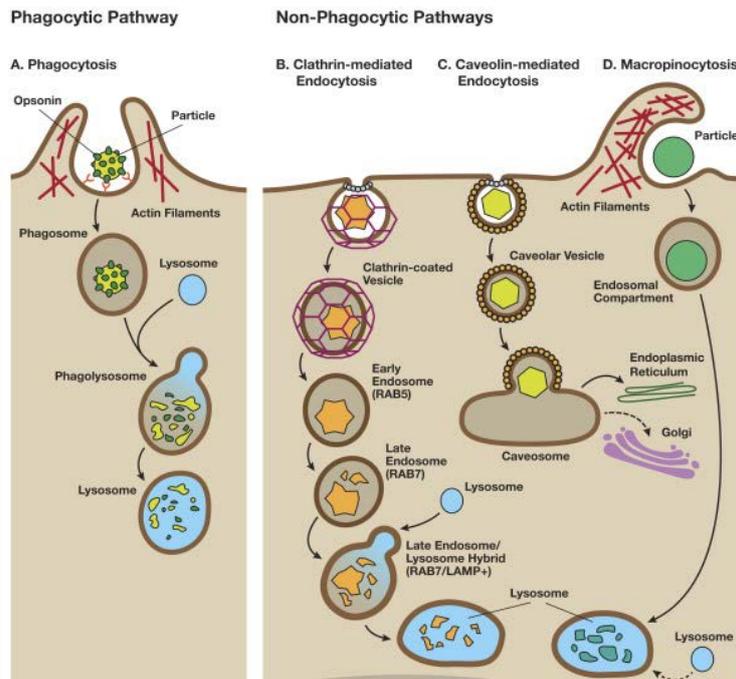


Figura 3.- Esquema representativo de las diferentes rutas de endocitosis celular fagocíticas y no fagocíticas [38].

Antecedentes inmediatos al proyecto: Hipótesis de trabajo

Dada la relación demostrada entre lisosomas y estrés oxidativo y entre ApoD y estrés oxidativo, nos proponemos explicar una posible relación entre ApoD y lisosomas.

Por lo tanto, nuestra HIPÓTESIS DE TRABAJO es la siguiente:

- Ante el estrés oxidativo, ApoD es capaz de entrar en la célula por endocitosis.
- Por esta vía llega hasta compartimentos subcelulares protegiendo sus membranas de la peroxidación.
- Entre los compartimentos subcelulares esperados están los lisosomas. Las membranas de los lisosomas son un elemento crítico de cuyo nivel de oxidación depende que la célula inicie un programa de muerte celular apoptótica, muera por necrosis o sobreviva.
- Proteger la membrana lisosomal sería suficiente para explicar que ApoD pueda evitar la muerte celular en condiciones de estrés oxidativo.

3.- OBJETIVOS

El OBJETIVO GENERAL de mi proyecto consiste en establecer si el mecanismo celular subyacente a la capacidad protectora de ApoD frente al estrés oxidativo, tanto en modelos humanos como murinos, requiere su internalización en las células afectadas mediante endocitosis, y encontrar en qué compartimento subcelular realiza su función. Para ello, necesitamos generar una fuente de producción y purificación de ApoD y una manera de analizar la colocalización de ApoD con los diversos compartimentos celulares.

Como OBJETIVOS ESPECÍFICOS me he propuesto:

- Objetivo 1. Obtención de ApoD de ratón (mApoD) y ApoD humana (hApoD) mediante un sistema de expresión eucariota. Para poder analizar el tráfico subcelular de ApoD tras la endocitosis y dado que en la actualidad no se conocen líneas celulares productoras de

mApoD fiables, el primer objetivo será producir dicha proteína en un sistema de expresión eucariota y purificarla a partir del medio.

- Purificación de plásmidos.
- Caracterización de cultivos celulares idóneos para transfectar.
- Puesta a punto de un sistema de purificación basado en cromatografía de afinidad.

- Objetivo 2. Análisis del tráfico de la proteína ApoD a nivel subcelular ante estímulos que ocasionan estrés oxidativo. Podemos encontrar ApoD dentro de la célula tanto durante su producción y secreción como durante su internalización. Para conocer el tráfico celular debemos realizar un estudio de colocalización, comenzando por un estudio de colocalización con marcadores lisosomales.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Para la realización de este estudio se han utilizado líneas celulares adherentes HEK293T (human embryonic kidney 293T) altamente transfectables. Estas células se cultivan en medio completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 4,5 g/l de glucosa suplementado con 1-10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 1% de L-glutamina y 1% P/S/A (penicilina 10 U/ μ l, estreptomycin 10 μ g/ μ l y anfotericina B 25 μ g/ml). La densidad celular óptima de los cultivos es de $2 \cdot 10^6$ células por placa en 10 ml de medio. Hemos comprobado en mis experimentos que las placas sobre las que mejor se adhieren pertenecen a la casa comercial IWAKI. Las células se mantienen en incubación a 37°C con 5% de CO₂ y 90-95% de humedad en incubadores de CO₂ (Heraeus). Para realizar los sucesivos pases, las células se levantan perfectamente con medio de cultivo atemperado.

Para los experimentos de inmunocitoquímica se utilizó la línea celular adherente 1321N1 de astrocitoma humano, que presenta una característica morfología glial. Se cultivan en medio completo de DMEM (con 1 g/l de glucosa) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina y 1% P/S/A (penicilina 10 U/ μ l, estreptomycin 10 μ g/ μ l y anfotericina B 25 μ g/ml). La densidad celular óptima de los cultivos de 1321N1 es de $2 \cdot 10^6$ células por frasco de 25 cm² en 5 ml de medio. Las células se mantienen en incubación a 37°C con 5% de CO₂ y 90-95% de humedad. Para realizar los sucesivos pases (o subcultivos), las células se levantan mecánicamente con PBS frío (manteniendo el frasco de células sobre hielo).

En ambos casos las células precipitan bien con una centrifugación de 4 min a 201g (1.000 rpm en una centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810R).

Adaptación del cultivo de HEK293T a condiciones de bajo suero

Inicialmente las células se cultivan con un suplemento del 10% de FBS. Este porcentaje se fue descendiendo gradualmente para adaptar a las células a las nuevas condiciones de cultivo siguiendo el siguiente esquema:

| |
|---|
| 10% → 5 pases → 8% → 4 pases → 6% → 4 pases → 4% → 1 pase → 2% → 7 pases → 1% |
|---|

Las células se habitúan perfectamente a esta disminución hasta el 2%, en el cual requieren un suplemento extra de 0,048 g de glucosa (obteniendo una concentración final de 5,22 g/l de glucosa). En estos casos la densidad celular óptima de los cultivos continuaba siendo de $2 \cdot 10^6$ células por placa.

Congelación y descongelación de células

Las líneas celulares utilizadas fueron descongeladas a partir de su almacenamiento en nitrógeno líquido en un baño a 37°C en agitación continua y resuspendidas en medio de cultivo.

Las células adaptadas a 2 ó 1% de FBS fueron congeladas en FBS con 5% de DMSO cuando se encontraban en un pase 19 y 12 respectivamente, y descongeladas al mes siguiente para comprobar la eficiencia de la congelación. Aunque tras el descongelado, la tasa de duplicación celular era inferior a lo esperado, se recuperaban perfectamente tras 2 pases.

Tratamiento con bajo suero y Paraquat de la línea celular 1321N1

En placas de Petri de 4 pocillos con cubres tratados con poli-L-lisina se sembraron 75.000 células de la línea celular 1321N1. Se realizaron 2 tipos de tratamiento: bajo suero y tratamiento con Paraquat (a su vez en medio de bajo suero). El tratamiento se mantuvo durante los siguientes tiempos: 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h y 48 h. Además se sembró una placa control con medio normal que se incubó durante 48 h. El medio con bajo suero está constituido por DMEM sin Phenol Red con 4,5 g/l de glucosa, 1% de L-glutamina, 1% P/S/A y 0.2% de FBS. Las placas tratadas con Paraquat fueron sembradas en medio de bajo suero con 500 µM de Paraquat. Tras las horas de tratamiento, las células fueron fijadas y se realizó una inmunocitoquímica.

Purificación de plásmidos

Se sembraron bacterias provenientes de los stocks congelados de los clones necesarios en placas de medio LB con ampicilina al 0,1% y se dejaron crecer durante 24 horas a 37°C. Una vez crecidas las colonias, se seleccionó una colonia individual y se creció en LB líquido a 37°C durante 24 horas. De este cultivo líquido se extrajeron los plásmidos.

Se utilizó el kit "*QiAprep Spin Miniprep Kit Qiagen*" para aislar los plásmidos mApoD-IBA42 (amp^r, neo^r, N-terminal his-tag) y hApoD-IBA42 (amp^r, neo^r, N-terminal his-tag) generados anteriormente en el laboratorio; y los plásmidos pCMV-hApoD-GFP (kan^r, peo^r, C-terminal GFP, Rassart Lab) y GFP alone (Kan^r, Gibson Lab), que se utilizarán como controles. Los plásmidos experimentales presentan la secuencia de ApoD (de ratón o humana) clonada en el vector de expresión eucariota Pexpr-IBA42 (que presenta resistencia a ampicilina) fusionada a una secuencia Strep-tag en el extremo C-terminal de la proteína recombinante y una secuencia 6xHistidina-tag en el N-terminal.

Para obtener los plásmidos, el cultivo se centrifuga durante 2 min a 13.000 rpm en una centrífuga CM-50M Centrifuge-Mixer. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las bacterias en 250 µl de Buffer P1. Se añaden 250 µl de Buffer P2 y se invierte la mezcla, que adquiere un color azul. A continuación se añaden 350 µl de Buffer N3 e inmediatamente se voltea. La solución se vuelve blanca. Se centrifuga 10 min a 13.000 rpm y se aplica el sobrenadante sobre una micro-columna ("*spin column*") por decantación. Se centrifuga 60 segundos a 13.000 rpm y se añade sobre la columna 0,75 ml de Buffer PE. Se centrifuga 2 min a 13.000 rpm y finalmente se eluye el plásmido con 50 µl de Buffer EB centrifugando 2 min a 13.000 rpm. Se mide la concentración con un espectrofotómetro en gota (Nanodrop® ND1000) a 260 nm y se guarda a -20°C hasta su utilización.

Transfección con lipofectamina

Las transfecciones se realizaron en células sembradas en placas con o sin cristales de 1,13 cm² recubiertos con poli-L-lisina (ver protocolo más abajo). Se utilizó el método químico de la lipofectamina LTX para la transfección. Para ello se siguió el protocolo del proveedor

Invitrogen. Se probaron distintas concentraciones de los reactivos para optimizar el protocolo.

La densidad óptima celular para realizar la transfección fué de 75.000 células/pocillo. Se siembran las células en un medio sin antibióticos 12 horas antes de la transfección. En el momento de realizar la transfección se retira este medio y se añade medio Optimen (GIBCO) (300 µl) para evitar interacciones con la lipofectamina. Se preparan 50 µl de Optimen con 1 µl de lipofectamina y se dejan 5 min a temperatura ambiente (RT) para permitir la formación de los liposomas. A continuación se añaden 50 µl de Optimen con la cantidad de plásmido deseada. Se utilizan 300 ng del plásmido. Se deja reposar entre 20 y 30 min a RT y se añade al cultivo. Tras una incubación de 5-6 horas a 37°C y 5% de CO₂ se sustituye el medio por medio completo.

La comprobación de las transfecciones se realizó mediante inmunocitoquímica o mediante la observación de la señal fluorescente de GFP mediante un microscopio invertido de fluorescencia: NIKON modelo Eclipse TS100 (Objetivos: 4x, 10x, 20x y 40x. Filtros: B-2A (Ex 450-490) y G-2A (510-560)).

Transfección con X-fect.

Se realizaron en células sembradas en placas con cubres con poli-L-lisina. Se utilizó el método químico de X-fect™ de la casa comercial Clontech para la transfección. Para ello se siguió el protocolo del proveedor. Se probaron distintas concentraciones de los reactivos para optimizar el protocolo. Es necesario agitar en Vórtex durante al menos 10 segundos todos los reactivos antes de utilizarlos. La densidad óptima celular para realizar la transfección fué de 75.000 células/pocillo. Antes de realizar la transfección se sustituyó el medio completo por medio Optimen. Se preparan 25 µl del tampón de reacción Xfect con la concentración de plásmido deseada y se le añaden 25 µl del mismo tampón Xfect con el polímero Xfect. Siempre se debe usar 0,3 µl del polímero por cada µg de plásmido. La suspensión se incuba durante 10 min para que se formen los complejos de nanopartículas (DNA-polímero) y se añade sobre el cultivo en forma de gotas. Tras una incubación de 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ se sustituye el medio por medio completo.

Producción de cubres con sustrato de adhesión de poli-L-lisina.

Se utilizaron 2 métodos distintos para la producción de cubres con poli-L-lisina (SIGMA 4707). El protocolo utilizado preferentemente se denomina “*en fresco*”. Consiste en añadir 200 µl de poli-L-lisina sobre cada cubre autoclavado para permitir su polimerización. Se mantiene 5 min a RT, se retira y se lava al menos 2 veces con agua. Antes de sembrar los cultivos sobre los cubres, debemos asegurarnos de que la poli-L-lisina se haya secado correctamente. El otro método utilizado sirve para obtener gran número de cubres de 12 mm de diámetro (máximo 50 cubres/tratamiento). Para ello se colocan los cristales autoclavados con 4 ml de poli-L-lisina en placas de Petri de 5 cm de diámetro. Tras incubar 5 min se retira la poli-L-lisina y se lava 2 veces con 4 ml de dH₂O estéril. Los cristales pueden usarse una vez secos, 2 horas después.

Inmunocitoquímica

La caracterización de los cultivos celulares se realizó inicialmente por inmunocitoquímica. De esta manera se podía comprobar el éxito de las transfecciones. Además, se utilizó la inmunocitoquímica para observar la situación de ApoD en su tráfico intracelular.

Tras 24 horas de cultivo (células HEK293T transfectadas o células 1321N1 tratadas), se realizó una fijación con formaldehído al 4% en PBS durante 15 min a RT después de haber realizado 1 lavado con PBS de 5 min. Debemos tener cuidado de que no se despeguen las células durante el proceso. Transcurrido ese tiempo se realizaron otros 3 lavados de 10

minutos con PBS para eliminar cualquier resto del fijador. Las muestras se mantienen selladas con Parafilm a 4°C hasta la realización de la inmunocitoquímica.

El proceso continúa para todos los experimentos de inmunocitoquímica con un bloqueo y permeabilización realizados con PBS con 0,1% Tween-20 y 1% suero de cabra durante 30 min. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución PBS - 0,1% Tween-20 e incubados a 4°C toda la noche (“*overnight*”) o 2 horas a RT. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario en PBS - 0,1% Tween-20 durante 30 min a RT.

En los experimentos de inmunocitoquímica con anticuerpo secundario conjugado con HRP, el revelado del color se realizó añadiendo una solución de 5 ml Tris 0,05 M con DAB 0,03% y H₂O₂ 0,0018%. Se debe controlar la reacción bajo lupa para pararla en el momento en que las células adquirieren un color marrón; momento en que se retira la solución de revelado y se añade PBS. El montaje de las muestras se realizó con glicerol y agua en relación 1:1 sellándolas con laca de uñas. Otras veces se utilizó como medio de montaje Vectashield-DAPI (Vector Labs). En los experimentos de inmunocitoquímica con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo, y más concretamente en la detección de lisosomas, se utilizó el medio de montaje EverBrite™ con DAPI y el sellador CoverGrip™ (Biotium).

| Anticuerpos primarios | Anticuerpos secundarios | Proteína detectada |
|---|---|------------------------------|
| - Policlonal de ratón anti-strep-tag (1:100) | - Policlonal de cabra anti-IgG de ratón-HRP (1:200) DAKO | - mApoD y hApoD recombinante |
| - Policlonal de conejo anti-hApoD [Oviedo] (1:1000) | - Policlonal de cabra anti-IgG de conejo-HRP (1:200) | - hApoD recombinante |
| - Monoclonal H4B4 de ratón anti- hLAMP-2 (1:20) | - Policlonal de cabra anti-IgG de ratón-Alexa 594 (1:1000) - Policlonal de cabra anti-IgG de ratón-FITC (1:1000) | - LAMP-2 |
| - Policlonal de conejo anti-hApoD [Oviedo] (1:4000) - Policlonal de conejo anti-hApoD 2B9 [Rassart] (1:100) Melon-Pure | - Policlonal de cabra anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1:1.000) | - hApoD recombinante |

Tabla 1.- Lista de anticuerpos utilizados.

Además se probaron otros anticuerpos para ver la eficiencia de los mismos (datos no mostrados).

Por otro lado se comprobó la especificidad de los anticuerpos primarios que reconocen hApoD. Para ello se preincubó en solución una mezcla de proteína:anticuerpo en una relación 2:1 molar (2,04 µg de hApoD purificada de fluido cístico más 1,02 µg de anticuerpo anti-hApoD [Oviedo]). Se realizó una incubación durante una hora a RT antes de realizar la inmunocitoquímica.

La observación de las células se realizó en un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una Cámara Digital DMX 1200c y con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i equipado con una cámara digital DS-Ril (Nikon).

Para el análisis de colocalización en células 1321N1 se utilizó el microscopio Confocal Leica TCS SP5 con scanner Resonante, láser Blanco (470 nm - 670 nm), 5 líneas de láser de Argón y una línea de 405 nm. Se realizaron series ("stacks") en el eje Z de 0,772 μm de grosor en células individuales de unos 10-14 μm . La fluorescencia inespecífica del anticuerpo secundario y la autofluorescencia de las células se eliminaron incluyendo un control sin anticuerpo primario en el que se disminuyó la ganancia, hasta anular las señales inespecíficas. Con esta ganancia se tomaron las imágenes de los pocillos experimentales.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante ImageJ, utilizando un "Plug-in" de colocalización denominado "Colocalization Indices" [39]. Los datos obtenidos del % de colocalización (*T-overlap*) se analizaron mediante el programa Sigma Plot, utilizando un test estadístico ANOVA de una vía, un t-test o el test de Mann-Whitney Rank Sum.

Estudio del curso temporal de la producción de ApoD

Se estudió el curso temporal de la producción de la proteína mediante Western blots del medio de cultivo tomando muestras en diferentes momentos (0, 17, 21, 24, 41, 45 y 48 h) a partir de la transfección.

Recolección y concentración del medio de cultivo

Se han utilizado dos tipos de concentradores MILLIPORE dependiendo de la cantidad de medio del que se quiera partir en la purificación. Para volúmenes de aproximadamente 15 ml se utilizaron los concentradores Amicon® Ultra-15; en cambio para volúmenes pequeños de aproximadamente 500 μl se han utilizado los concentradores Amicon® Ultra-0.5.

Para la utilización del Amicon® Ultra-15 utilizamos una centrífuga ROTANTA 460R (Hettich Zentrifugen). Primero lavamos la membrana del concentrador con agua y centrifugamos a 4.000 g durante 5 min a 4°C. Para la concentración de las muestras se centrifugó a 2.750 g durante 15 min a 4°C. Para los concentradores Amicon® Ultra-0.5 se utilizó una centrifuga CM-50M a 1.000 g durante 15 min a 4°C.

Electroforesis (PAGE y SDS-PAGE) y Western blot

Las proteínas fueron separadas en función de su peso molecular mediante una electroforesis vertical de proteínas en geles de poliacrilamida al 12%. Se polimerizaron monómeros de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 utilizando como catalizadores persulfato de amonio (APS) al 10% y TEMED (N, N, N', N'-Tetrametildiamina). Las electroforesis se realizaron bajo condiciones desnaturizantes con 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS) según el método de Laemmli (SDS-PAGE). Los extractos proteicos se prepararon añadiendo un tampón de carga (Tris-HCl 63 mM, Glicerol 10%, SDS 2% y DTT 10mM) y se desnaturizaron durante 5 minutos a 100°C. Las electroforesis se realizaron en una cubeta con una solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% y dH₂O) a un voltaje de 80 V durante 30 min y posteriormente elevado a 100 V hasta el final de la electroforesis. Los geles fueron teñidos con tinción de Coomassie y analizados mediante un Densitómetro GS 800.

Otras veces, tras la separación de las proteínas por SDS-PAGE, éstas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF a un amperaje constante de 400 mA durante 90 minutos en un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% con un pH 8,5).

Además también se realizó un PAGE discontinuo en estado nativo, en condiciones no-desnaturizantes (sin SDS), para comprobar la interacción entre proteínas. En este caso las proteínas fueron separadas en función de su carga nativa, la cual depende de su punto isoeléctrico y del pH del tampón utilizado en la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%. Los extractos proteicos se prepararon añadiendo un tampón de carga

(Tris-HCl 0,5 M, Glicerol 30%, azul de bromofenol 0,5% con un pH 6,8). Las electroforesis se realizaron en una cubeta con una solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM y glicina 190 mM en dH₂O) a un voltaje de 200 V para compensar la baja densidad de carga. A continuación fueron electrotransferidas a membranas de PVDF con un amperaje constante de 400 mA durante 90 minutos en un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% con un pH 8,5).

Al finalizar la transferencia, las membranas se lavaron durante 10 min en TBS con Tween-20 al 0,05%. Posteriormente fueron bloqueadas durante 30 min a RT con 5% de leche en polvo en solución tamponada con Tris (TBS + 0,05% Tween-20). El anticuerpo primario se añadió diluido en la solución de bloqueo y la incubación se realizó durante 12 horas a 4°C. Tras 3 lavados de 10 min con TBS + 0,05% Tween-20, la membrana se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido en TBS + 0,05% Tween-20. En el caso de utilizar un anticuerpo primario conjugado con HRP, la incubación de éste se realizó durante 1 hora a RT.

Finalmente tras los 3 últimos lavados, se procedió a revelar la señal quimioluminiscente con una solución de ECL (Millipore) usando el sistema de captura de imagen VersaDoc™ (BioRad).

| Anticuerpo primario | Anticuerpo secundario |
|--|---|
| - Policlonal de cabra anti-mApoD SCL-16 [Santa Cruz] (1:500/1:1.000) | - Policlonal de burro anti-IgG de cabra (1:10.000) |
| - Policlonal de conejo anti-hApoD [Oviedo] (1:1.000) | - Policlonal de cabra anti-IgG de conejo-HRP (1:10.000) |
| - Monoclonal anti-poliHis [Sigma] (1:2.000) | |

Tabla 2.- Lista de anticuerpos utilizados para *Western blot*.

Stripping de membranas para doble marcaje en *Western blot*

Una vez analizada una membrana con un determinado anticuerpo, para poder realizar un nuevo análisis de esa membrana, realizamos un “stripping” (o eliminación de los anticuerpos). Para ello incubamos la membrana 2 veces durante 10 min en el “*Stripping-Buffer*”. Éste contiene 0,6 g de glicina, 4 ml de HCl 1 N, 0,04 g de SDS, 40 µl de Tween-20 y hasta 40 ml de dH₂O (pH 2.5). A continuación realizamos 5 lavados con TBS + Tween 0,05% durante 10 min cada uno. Antes de tratar la membrana con un nuevo anticuerpo debemos realizar el bloqueo de nuevo.

Purificación mediante cromatografía de afinidad

Se realizó una cromatografía de afinidad utilizando el sistema Strep/6xHistidine. Para ello se siguió el protocolo del proveedor (5PRIME/IBA Biotagnology). El sistema Strep/6xHistidine (de etiqueta doble) fue desarrollado para garantizar la purificación de proteínas recombinantes en condiciones estandarizadas. Las proteínas recombinantes llevan la etiqueta 6xHistidina en el extremo N-terminal y la Strep-tag en el extremo C-terminal. Después de la elución de la matriz Ni-NTA con imidazol, se carga directamente la proteína recombinante en una matriz Strep-Tactin. Para la elución de la proteína recombinante de la matriz Strep-Tactin se usa destibiotina. Además se utilizó un método de purificación en *batch* y un método mixto *batch-column*. En ambos casos utilizamos la matriz de agarosa PerfectPro Ni-NTA

para la purificación mediante colas de histidina y la matriz Strep-Tactin para la purificación mediante la Strep-tag. Los lavados y eluidos son idénticos en *batch* y en columna. Antes de cualquier purificación, las matrices deben de ser equilibradas en la solución de lavado. El resultado se analiza mediante una electroforesis PAGE seguida de una tinción con Coomassie.

- Purificación mediante His-tag: purificación en *Batch*.

En el procedimiento en *batch*, la proteína se une a la resina en solución en un eppendorf de 1,5 o 2 ml. Este procedimiento se utiliza cuando la cantidad de muestra de partida es baja. Inicialmente se lava la matriz con solución de lavado y, tras centrifugar, se retira el sobrenadante evitando que la matriz se seque. Se añade el medio de cultivo procedente de células transfectadas, al que previamente se le realizó una centrifugación breve para eliminar partículas. Se incuba la suspensión medio-matriz con ayuda de un Agitador Intelli-Mixer RM-2M de SKY LINE (programa F1) a 10 rpm *overnight*. Tras la incubación se centrifuga y se retira el sobrenadante. Se añade la solución de lavado, se mezcla con ayuda de la pipeta y se vuelve a centrifugar. Éste último proceso se repite 3 veces. A continuación se añade la solución de elución, se incuba durante 5 min y se vuelve a centrifugar. Este proceso se repite 4 veces. Todo este proceso debe realizarse a 4°C para evitar la degradación de la proteína de interés.

- Purificación mediante His-tag: purificación en *Batch* y columna.

En el procedimiento en *batch* se lava la matriz con solución de lavado en un tubo Falcon. Tras centrifugar, se retira el sobrenadante evitando que la matriz se seque; se añade el medio de cultivo con las proteínas (eliminando previamente partículas mediante centrifugación) y se incuba la suspensión medio-matriz con ayuda de un Agitador Intelli-Mixer RM-2M de SKY LINE (programa F1) *overnight* a 10 rpm. Tras la incubación, se transfiere la matriz a una columna de 5 ml. Se añade la solución de lavado y la de elución utilizando un Generador de Gradientes Hoefer SG100 y una bomba peristáltica modelo EP-1 Econo Pump (Bio-rad) con un flujo del 2%. Todo este proceso debe realizarse a 4°C para evitar la degradación de la proteína de interés.

Las relaciones entre la cantidad de muestra, matriz, soluciones de lavado y de elución, así como sus concentraciones, se describen en las tablas 3 y 4.

| Método | Cantidad de muestra | Cantidad de matriz | Cantidad de lavado | Cantidad de eluido | Centrifugación |
|------------------------|---|--------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|
| <i>Batch</i> | 4 ml concentrados hasta 500 µl 24 ml concentrados hasta 1 ml | 100 µl | 3 x 1200 µl | 3 x 100 µl 1x 200 µl | 10 segundos a 1000 g |
| <i>Batch y columna</i> | 48 ml | 5 ml | 40 ml | 20 ml | |

Tabla 3.- Resumen de los volúmenes utilizados para la purificación mediante His-tag.

| Método | Concentración de imidazol en la muestra | Concentración de NaCl en la muestra | Solución de lavado | Solución de elución |
|------------------------|---|-------------------------------------|---|---|
| <i>Batch-1</i> | 0 mM | 150 mM | 50 mM de NaH ₂ PO ₄ 300 mM de NaCl 20 mM de imidazol 0,05% Tween-20 pH 8,0 con NaOH | 50 mM de NaH ₂ PO ₄ 300 mM de NaCl 250 mM de imidazol 0,05% Tween-20 pH 8,0 con NaOH |
| <i>Batch-2</i> | 20 mM | 500 mM | 50 mM de NaH ₂ PO ₄ 500 mM de NaCl 20 mM de imidazol 0,05% Tween-20 pH 8,0 con NaOH | 50 mM de NaH ₂ PO ₄ 500 mM de NaCl 250 mM de imidazol 0,05% Tween-20 pH 8,0 con NaOH |
| <i>Batch y columna</i> | 20 mM | 600 mM | 50 mM de NaH ₂ PO ₄ 500 mM de NaCl 20 mM de imidazol 0,05% Tween-20 pH 8,0 con NaOH | 50 mM de NaH ₂ PO ₄ 500 mM de NaCl 20-200 mM de imidazol (gradiente) 0,05% Tween-20 pH 8,0 con NaOH |

Tabla 4.- Resumen de las concentraciones utilizadas para la purificación mediante His-tag.

- Purificación mediante Strep-tag: purificación en *Batch*.

En el procedimiento en *batch* se usó la misma escala y procedimiento que el descrito arriba para la purificación mediante His-tag. En este caso el protocolo no requiere de una incubación muy larga de la proteína con la matriz, ya que existe la posibilidad de que se pierda la Strep-tag. Tras una incubación de 8 horas se centrifuga y se retira el sobrenadante. En este caso se realizan 5 lavados. A continuación se añade la solución de elución, se incuba durante 5 min y se vuelve a centrifugar (5 veces). Todo este proceso debe realizarse a 4°C para evitar la degradación de la proteína de interés.

- Purificación mediante Strep-tag: Purificación en columna.

En el procedimiento en columna se transfiere directamente la matriz a una columna de 5 ml, se lava con solución de lavado y se aplica la solución con la proteína. La proteína se deja interaccionar con la resina durante 8 horas parando el flujo de la columna. Posteriormente se añade la solución de lavado y la de elución utilizando un Generador de Gradientes Hoefer SG100 y una bomba peristáltica modelo EP-1 Econo Pump (Bio-rad) con un flujo del 2%. Todo este proceso debe realizarse a 4°C para evitar la degradación de la proteína de interés.

Las relaciones entre la cantidad de muestra, matriz, solución de lavado y de elución, así como sus concentraciones, se describen en las tablas 5 y 6.

| Método | Cantidad de muestra | Cantidad de matriz | Cantidad de lavado | Cantidad de eluido | Centrifugación |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Batch</i> | 4 ml concentrados hasta 500 μ l | 100 μ l | 5 x 300 μ l | 5 x 200 μ l | 30 segundos a 700 g |
| <i>Batch y columna</i> | 10 ml concentrados hasta 1 ml | 5 ml | 25 ml | 20 ml | |

Tabla 5.- Resumen de los volúmenes utilizados para la purificación mediante Strep-tag.

| Método | Solución de lavado | Solución de elución |
|------------------------|--|--|
| <i>Batch</i> | 100 mM de Tris-Cl pH 8,0 150 mM de NaCl 1 mM de EDTA | 100 mM de Tris-Cl pH 8,0 150 mM de NaCl 1 mM de EDTA 2,5 mM de destibiotina |
| <i>Batch y columna</i> | 100 mM de Tris-Cl pH 8,0 150 mM de NaCl 1 mM de EDTA | 100 mM de Tris-Cl pH 8,0 150 mM de NaCl 1 mM de EDTA 2,5 mM de destibiotina |

Tabla 6.- Resumen de los volúmenes utilizados para la purificación mediante Strep-tag.

Finalmente, la concentración de la proteína purificada se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop® ND1000 a 280 nm utilizando como blanco la solución de elución. Además se calculó la concentración de la proteína midiendo la absorbancia a 280 nm mediante un espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu utilizando una cubeta QS10.00 mm (Hellma) previamente lavada con ácido nítrico 2 M y dH₂O.

5.- RESULTADOS

- **Objetivo 1.** Obtención de ApoD de ratón (mApoD) y ApoD humana (hApoD) mediante un sistema de expresión eucariota.

Inicialmente se realizaron pruebas para conseguir una mayor eficiencia en la transfección de las células adaptadas previamente a condiciones de bajo suero. Finalmente se decidió que la relación de 75.000 células por pocillo, 300 ng de DNA y 1 μ l de Lipofectamina era la mejor.

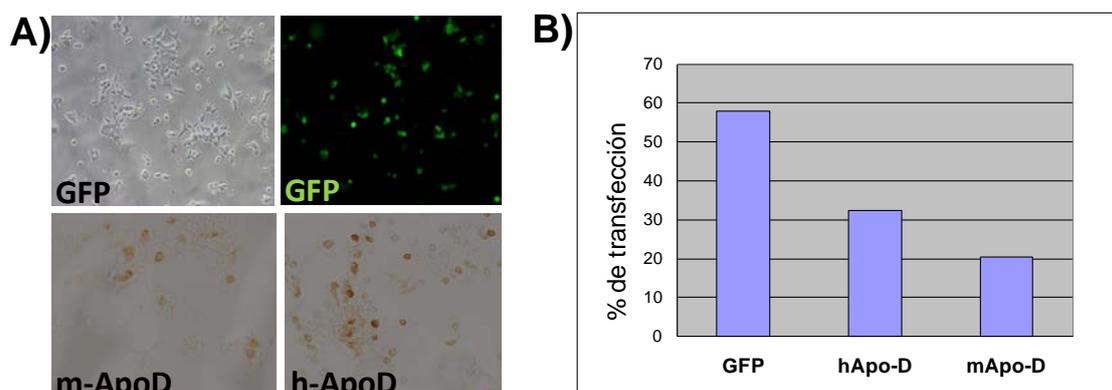


Figura 4.- Determinación de la eficiencia de transfección en medio con bajo suero. **A)** Microfotografía de fluorescencia de células transfectadas con el control GFP (se muestra también la imagen en Nomarski del cultivo). Microfotografía de campo claro de células transfectadas con mApoD y hApoD detectadas por inmunocitoquímica. **B)** Cuantificación de la eficiencia de la transfección.

A continuación se analizó el curso temporal de la producción de ApoD (mApoD y hApoD). Para ello se analizó el medio de cultivo con *Western blots* tomando muestras en diferentes momentos (17, 21, 24, 41, 45 y 48 h) a partir de la transfección. Se exploró así un intervalo de entre varias horas a varios días tras la transfección (Figura 5).

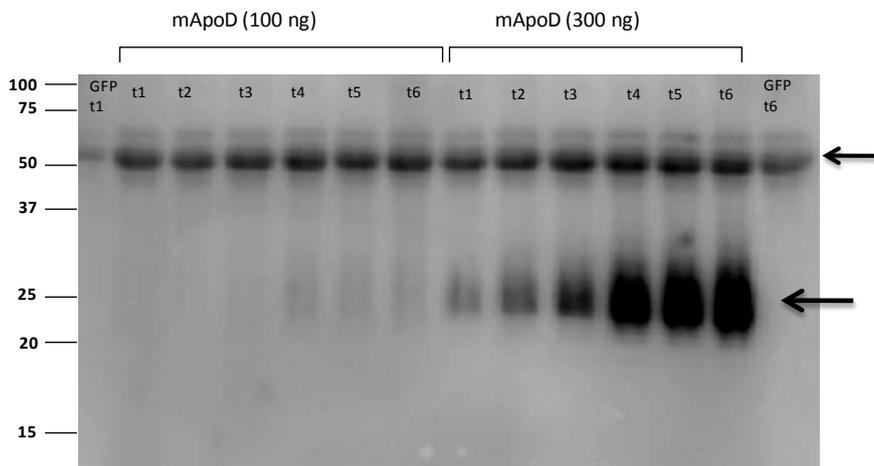


Figura 5.- Estudio del curso temporal de la producción de mApOD mediante *Western Blot*. Se representan las cantidades de DNA utilizadas en las transfecciones (100 ó 300 ng) y los seis puntos temporales explorados (de 17 a 48 h). El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce las colas de poli-His de la proteína de interés. Este anticuerpo reconoce inespecíficamente a la albúmina presente en el suero. La flecha indica la señal de albúmina y mApOD.

Se comprobó que tras 48 horas de transfección con un pulso de suero con un cambio de medio a las 24 h (entre t3 y t4 en la Figura 5), se consigue la mayor producción de mApOD en el intervalo temporal explorado.

En el caso de hApoD, las células eran transfectadas correctamente tanto en bajo suero (Figura 4) como en condiciones estándares de 10% de FBS (Figura 6). Sin embargo, no son capaces de secretar hApoD al medio de cultivo (Figura 7).

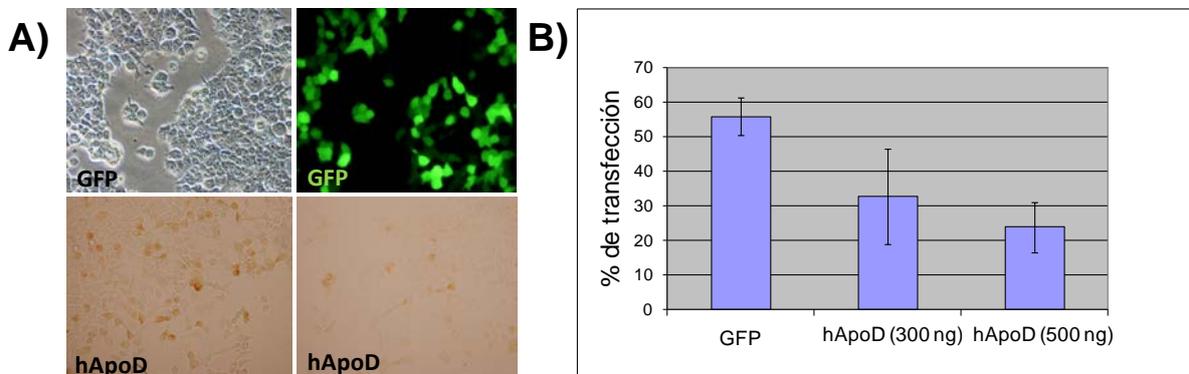


Figura 6.- Determinación de la eficiencia de transfección en medio con 10% de FBS. **A)** Microfotografía de fluorescencia de células transfectadas con el control GFP (se muestra también la imagen en Nomarski del cultivo). Microfotografía de campo claro de células transfectadas con hApoD (300 y 500 ng de DNA) detectada por inmunocitoquímica. **B)** Cuantificación de la eficiencia de transfección.

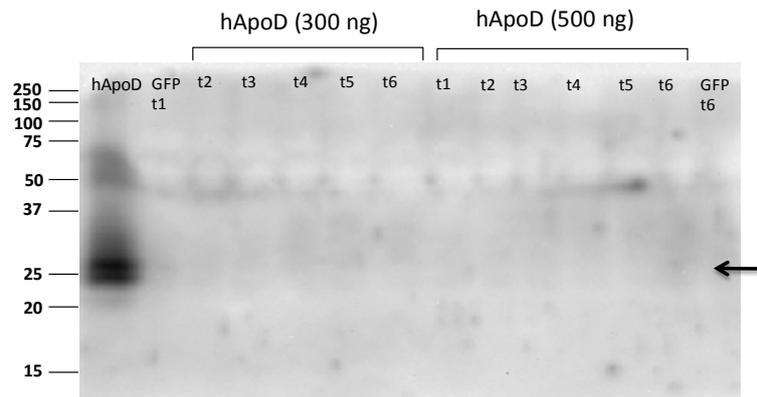


Figura 7.- Estudio del curso temporal de la producción de hApoD mediante *Western Blot*. Se representan las cantidades de DNA utilizadas en las transfecciones, 300 o 500 ng, y los seis puntos temporales explorados (de 17 a 48 h). El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la proteína de interés (hApoD). La flecha indica la señal de hApoD.

Los problemas de secreción de hApoD hicieron que nos centrásemos por el momento en mApoD. Dado que su producción parece eficiente, pusimos a punto su purificación mediante cromatografía de afinidad por la etiqueta His-tag. Inicialmente se realizó una purificación a pequeña escala en *bach* para poder ajustar los diversos parámetros que afectaban a la misma.

Esta primera purificación nos indicó que el método de purificación mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA era el correcto, ya que mApoD se unía a la matriz y sólo aparecía en el eluido (Figura 8).

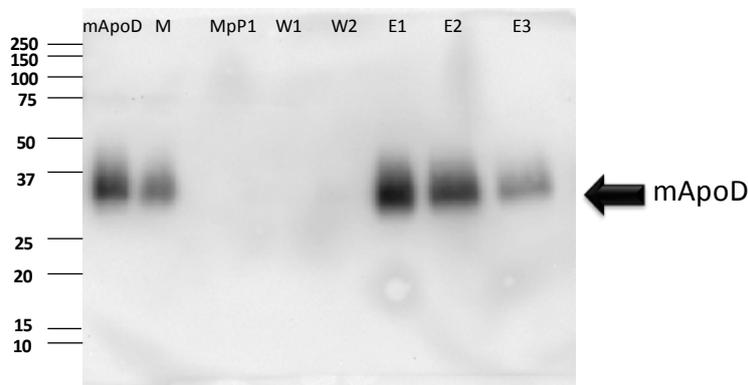


Figura 8.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad por la etiqueta His-tag. Se representa el análisis por *Western Blot*. La flecha indica la señal de mApoD. Las calles son: 1 mApoD presente en el cultivo (control positivo); 2 M muestra inicial (medio de cultivo); 3 MpP1 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 4 y 5 W lavados y 6 a 8 E fracciones de elución. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de la purificación fueron: relación matriz:muestra 10 μ l:500 μ l, 20 mM de imidazol en los lavados, 250 mM de imidazol y 300 mM de NaCl en la elución.

Sin embargo, cuando se analizan estas fracciones con tinción de Coomassie en el gel de electroforesis, se observaba que se obtenían fracciones contaminadas con albúmina del medio de cultivo (Figura 9), por lo que debíamos ajustar los parámetros de la purificación.

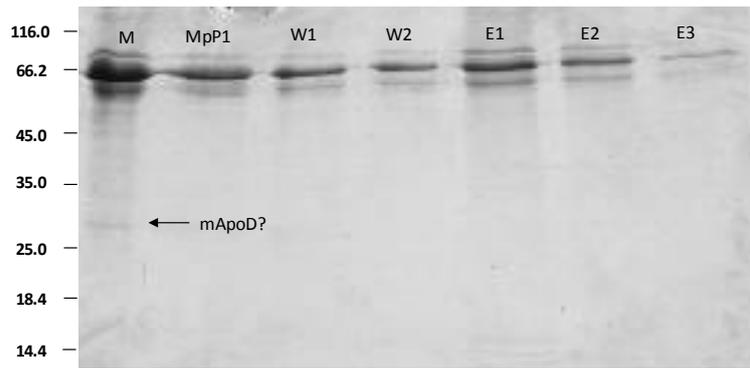


Figura 9.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad por la etiqueta His-tag. Se representa el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. La flecha indica la señal de mApoD. Las calles son: 1 M muestra inicial (medio de cultivo); 2 MpP1 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 y 4 W lavados y 5 a 7 E fracciones de elución. Las condiciones de la purificación fueron: relación matriz:muestra 10 μ l:500 μ l, 20 mM de imidazol en los lavados, 250 mM de imidazol y 300 mM de NaCl en la elución.

A lo largo del proceso se comprobó la temperatura de almacenamiento idónea de las muestras para evitar una posible degradación. Se decidió que la temperatura idónea era de 4°C (Figura 10). Los ciclos de congelado y descongelado podrían degradar o hacer precipitar a la proteína.

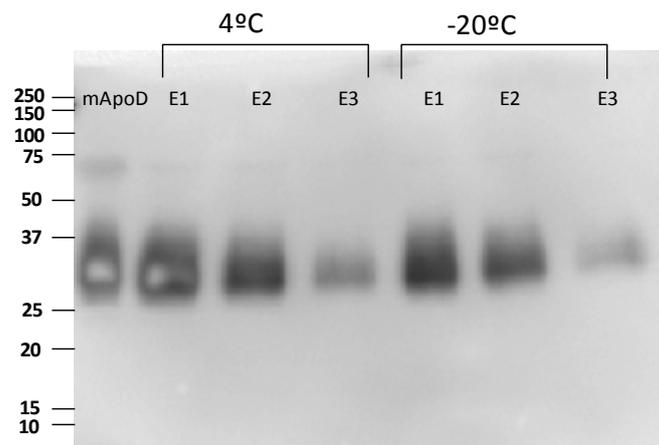


Figura 10.- Análisis de la estabilidad de mApoD. Se representa el análisis por *Western blot*. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las calles son: 1 muestra de mApoD; 2 a 4 almacenamiento de los eluidos a 4°C durante 7 días y 5 a 7 almacenamiento de los eluidos a -20°C durante el mismo intervalo de tiempo.

Uno de los ajustes que se realizaron inicialmente fue aumentar la cantidad de partida de muestra. Para ello se partió de 24 ml de medio de cultivo tras 48 h de transfección con mApoD, y se concentraron hasta un volumen de 1 ml (ver Materiales y métodos).

Además, ante la imposibilidad de detectar la proteína eluida en geles de electroforesis teñidos con Coomassie, se probaron otros métodos de detección más sensibles como el *Sypro Ruby* (Figura 11). La proteína se produce y se purifica, pero la escala usada sigue haciendo que el método de *Western blot* sea el más eficaz para detectar mApoD. Tras cada purificación se realizaba la comparación con las muestras separadas en un gel Coomassie para que nos permitiera observar las posibles contaminaciones de albúmina.

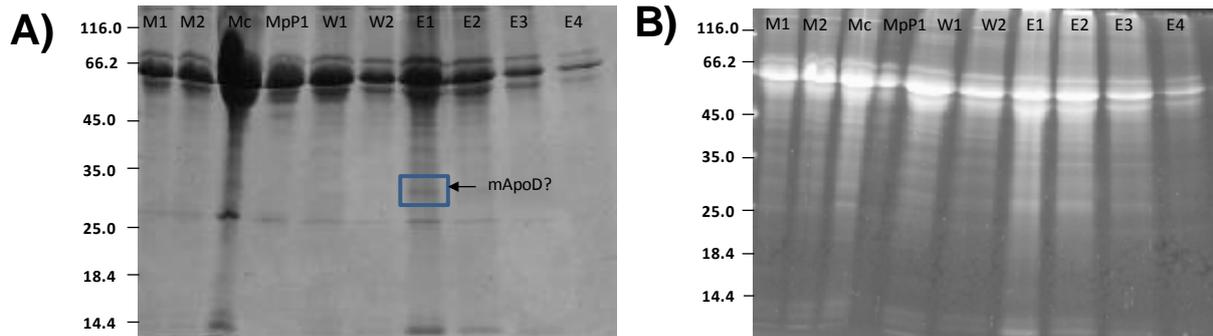


Figura 11.- Comparación de técnicas de tinción de geles de poliacrilamida. **A)** Tinción azul de Coomassie. La flecha indica la señal de mApoD. **B)** SYPRO Ruby. Las calles son: 1 y 2 M muestras iniciales (medio de cultivo); 3 Mc muestra combinada y concentrada 24 veces (en **A** se cargaron 6 μ l, en **B** 10 veces menos); 4 MpP1 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 5 y 6 W lavados y 7 a 10 E fracciones de elución.

Se realizaron diversas modificaciones sucesivas para conseguir fracciones más enriquecidas y más puras (Figura 12):

- Ajuste de la relación matriz:muestra.
- Ajuste de la concentración de sales (NaCl) y de la concentración del eluyente (imidazol).

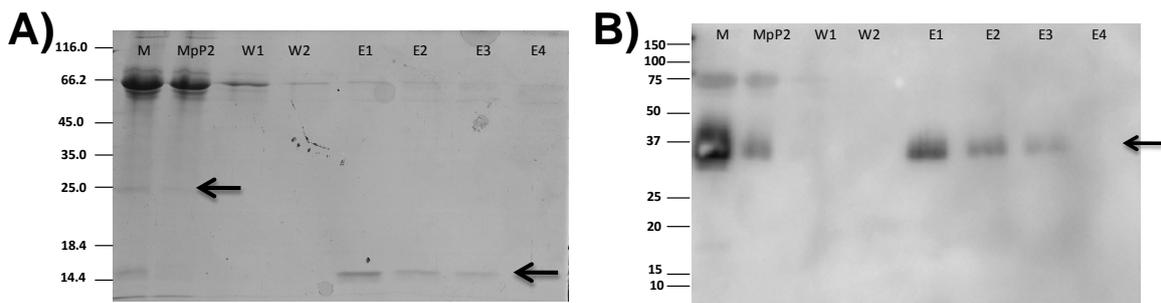


Figura 12.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad por la etiqueta His-tag. **A)** Se representa el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. La flecha muestra mApoD y un nuevo contaminante no percibido en las purificaciones anteriores. **B)** Se representa el análisis por *Western Blot*. Las calles son: 1 M Muestra inicial (medio de cultivo concentrado 24 veces); 2 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 y 4 W lavados y 5 a 8 E fracciones de elución. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de la purificación fueron: muestra y lavado 20 μ M de imidazol; relación matriz:muestra 100 μ l:500 (concentrada de 24 ml); 20 mM de imidazol en los lavados; 250 mM de imidazol y 300 mM de NaCl en la elución.

En ese momento apareció una nueva banda contaminando los eluidos que no habíamos detectado antes. Para comprobar que no se trataba de una degradación de mApoD utilizamos un anticuerpo diferente para revelar el *Western Blot* (Figura 13).

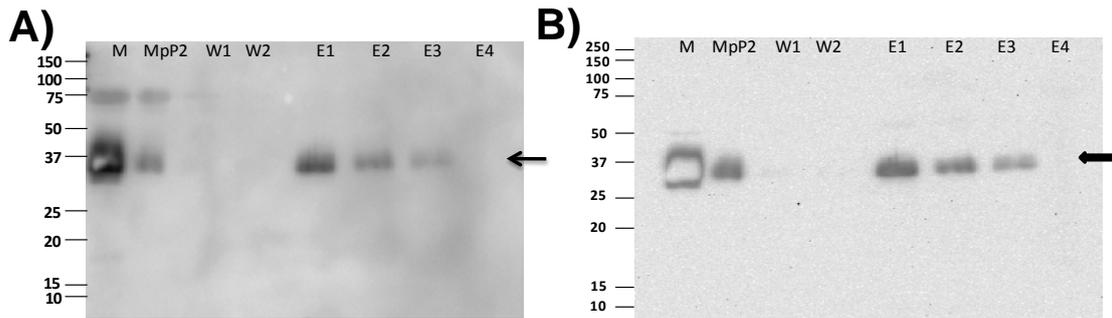


Figura 13.- *Western Blot* del análisis de la purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad. **A)** El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). **B)** El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la proteína de interés (mApoD). Las calles son: 1 M muestra; 2 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 y 4 W lavados y 5 a 7 E fracciones de elución. Las condiciones de la purificación fueron: muestra y lavado 20 μ M de imidazol; relación matriz:muestra 100 μ l:435 μ l (concentrada de 24 ml); 20 mM de imidazol en los lavados; 250 mM de imidazol y 300 mM de NaCl en la elución. La flecha indica la señal de mApoD.

Una vez descartada la posibilidad de degradación se modificó la concentración de NaCl para aumentar la fuerza iónica del medio y evitar en lo posible interacciones inespecíficas. Además introdujimos imidazol (20 μ M) durante la unión de la muestra a la matriz para favorecer la especificidad de las uniones, como se indica en la tabla 4.

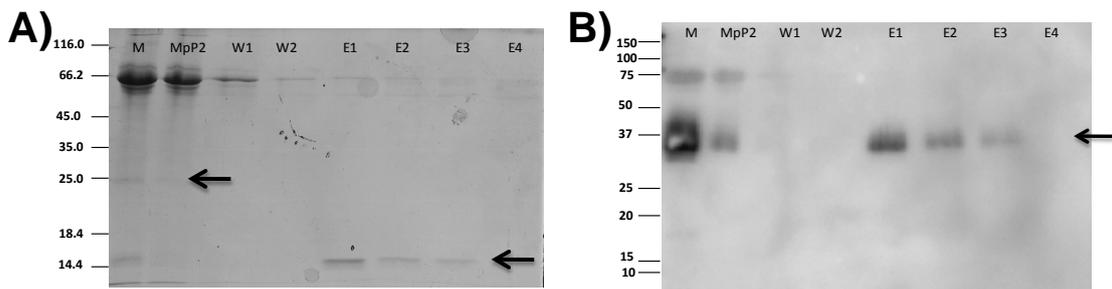


Figura 14.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. **B)** Se representa el *Western Blot*. Las calles son: 1 M muestra; 2 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 y 4 W lavados y 5 al 8 E fracciones de elución. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de la purificación fueron: muestra y lavado 20 μ M de imidazol y 600 mM de NaCl; relación matriz:muestra 100 μ l:435 μ l (concentrada de 24 ml); 20 mM de imidazol en el lavado; 250 mM de imidazol y 500 mM de NaCl en el eluido. La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

A pequeña escala, con estas concentraciones de imidazol y sal, conseguimos eliminar esta nueva contaminación, y la de albúmina también ha decrecido. En ese momento decidimos realizar una purificación utilizando la matriz Ni-NTA mediante un protocolo basado en la combinación de purificación en *Batch* y en columna, usando un gradiente de concentración creciente del eluyente.

Antes de realizar una purificación a gran escala se estudió la estabilidad de la proteína a 25°C, lo que facilitaría la tarea de purificación (Figura 15). Como se observa una ligera degradación de la proteína, se decidió seguir realizando todas las purificaciones a 4°C.

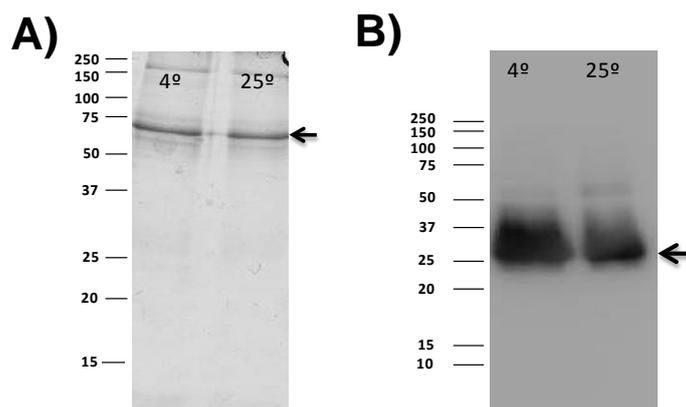


Figura 15.- Análisis de la estabilidad de mApoD. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. **B)** Se representa el *Western Blot*. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Se representa una muestra purificada de mApoD tras 3 días de almacenamiento a 4°C o a 25°C. La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

Para esta nueva fase nos inspiramos en el protocolo seguido por Bhatia y colaboradores [11]. Decidimos aumentar la escala de la muestra:matriz y realizar un gradiente creciente del eluyente (ver Materiales y métodos). Finalmente, las condiciones que mejor purificaban la proteína fueron:

- Relación matriz:muestra: 5 ml:24 ml.
- Imidazol: gradiente de 20 a 500 mM.
- NaCl: 500 mM (presente desde la fase de unión a la matriz hasta la elución).

El análisis de las diversas fracciones mostró que la purificación de mApoD era la correcta, obteniéndose una liberación completa de la proteína de la matriz de Níquel entre las fracciones 3 y 6 (Figura 16).

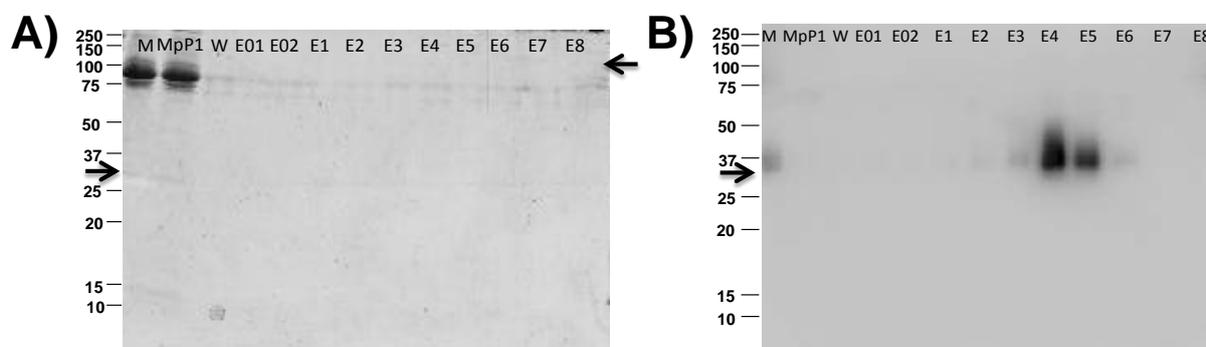


Figura 16.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. Las flechas indican la presencia de mApoD y albúmina. **B)** Se representa el *Western Blot*. Las calles son: 1 M muestra; 2 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 W lavado y 5 a 12 E fracciones eluidas. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de la purificación fueron: muestra y lavado 20 μ M de imidazol y 600 mM de NaCl; relación matriz:muestra 5 ml:48 ml; 20 mM de imidazol en el lavado; 20-200 mM de imidazol en gradiente y 600 mM de NaCl en el eluido. La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

En todos los casos la fracción enriquecida en ApoD seguía apareciendo contaminada en más o menos proporción con albúmina del medio de cultivo. Por eso analizamos en un gel nativo si había una interacción real entre ambas proteínas.

Mediante una electroforesis (PAGE) en condiciones nativas se analizó la posible interacción entre mApoD y albúmina.

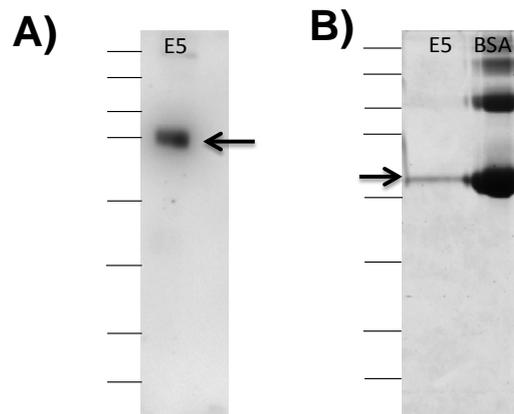


Figura 17.- PAGE en condiciones nativas. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. **B)** Se representa el *Western Blot* de las mismas muestras. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las calles son: 1 E fracción de elución (mApoD purificada); 2 BSA albúmina pura (Sigma). La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

Como se puede apreciar, no existe ninguna interacción física entre dichas proteínas (no hay cambio de movilidad electroforética en ninguna de las dos), por lo que se deberían separar fácilmente mediante una cromatografía de intercambio iónico. Además se realizó una prueba mediante una cromatografía de intercambio catiónico y la purificación no dio resultados satisfactorios (datos no mostrados).

Sin embargo, una vez obtenido un óptimo de purificación por afinidad a la etiqueta His-tag, era necesario seguir eliminando contaminantes. Decidimos realizar una purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando la etiqueta Strep-tag. Al realizar la purificación en las condiciones recomendadas por la casa comercial nos dimos cuenta de que las condiciones no eran las adecuadas (Figura 18). Esto podría deberse a un problema con la etiqueta o a que las bolas estuvieran estropeadas.

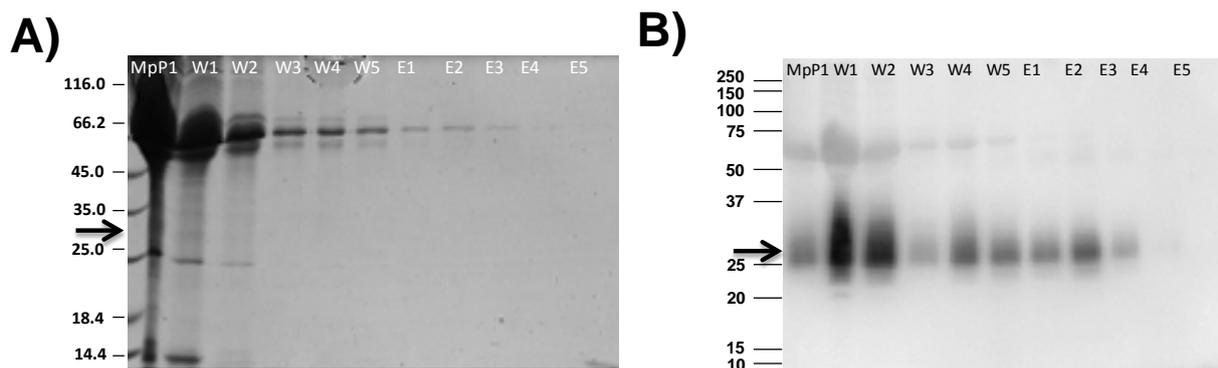


Figura 18.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad por Strep-tag. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. **B)** Se representa el *Western Blot*. Las calles son: 1 MpP1 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 2 a 6 W lavado y 7 a 11 E fracciones eluidas. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de purificación fueron: relación matriz:muestra 100 μ l:500 μ l (a partir de 4 ml concentrados); 1,5 ml de lavado y 1 ml de eluido. La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

Tras realizar una nueva purificación a partir de los lavados de una purificación previa, éramos capaces de eluir, por lo que la unión a las bolas era correcta. Por ello decidimos aumentar la cantidad de matriz y realizar un proceso de purificación en columna.

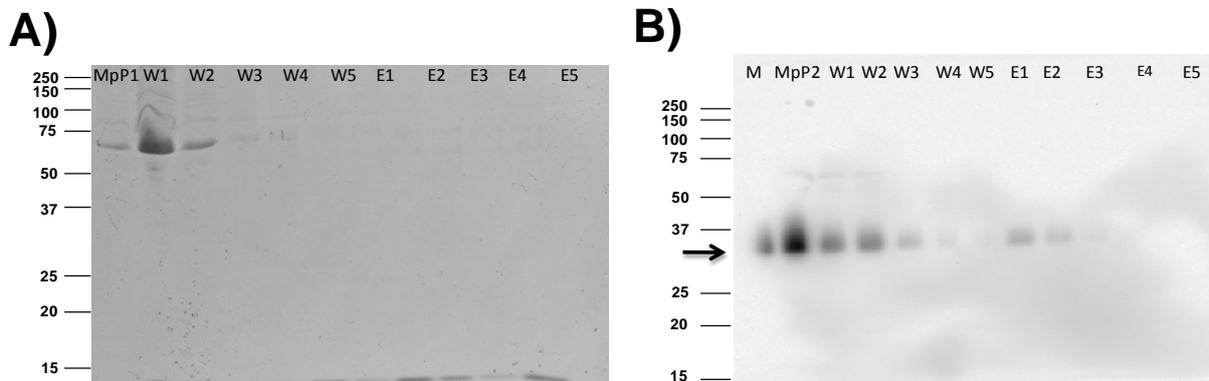


Figura 19.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. Las calles son: 1 MpP1 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 2 a 6 W lavado y 7 a 11 E fracciones eluidas. **B)** Se representa el *Western Blot*. Las calles son: 1 M muestra; 2 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 a 7 W lavado y 8 a 12 E fracciones eluidas. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de purificación fueron: relación matriz:muestra 100 μ l:500 μ l (a partir de 4 ml concentrados); 1,5 ml de lavado y 1 ml de eluido. La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

Una vez que mejoramos las condiciones de la purificación, realizamos una purificación mediante cromatografía de afinidad por la etiqueta Strep-tag a partir de las muestras eluidas en la cromatografía de afinidad por His-tag en columna (Figura 16, calles E3 a E6 combinadas). De esta manera obtuvimos una proteína bastante pura, de manera que habíamos eliminado la contaminación de albúmina (Figura 20).

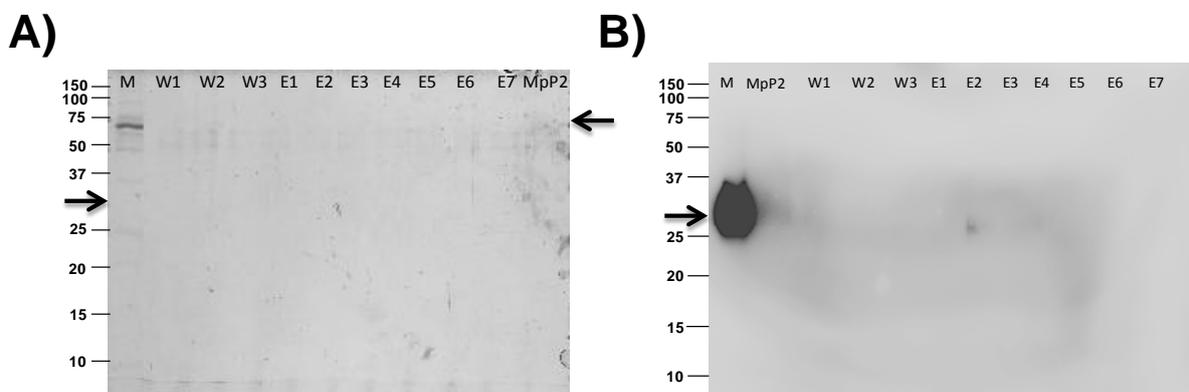


Figura 20.- Purificación de mApoD mediante cromatografía de afinidad. **A)** Se representa la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul Coomassie. Las calles son: 1 M muestra; 2 a 4 W lavado; 5 a 11 E fracciones eluidas y 12 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida). **B)** Se representa el *Western Blot*. Las calles son: 1 M muestra; 2 MpP2 sobrenadante tras exposición a la matriz (fracción no unida); 3 a 5 W lavados y 6 a 12 E fracciones eluidas. El revelado de la membrana se realizó con el anticuerpo que reconoce la etiqueta de la proteína de interés (poli-His). Las condiciones de purificación fueron: relación matriz:muestra 5 ml:1 ml (concentrados de 10 ml); 1,5 ml de lavado y 1 ml de eluido. La flecha indica la señal de albúmina y mApoD.

Llegado este punto, se estimó la concentración proteica de los eluidos en los que habíamos obtenido la proteína en sus versiones más puras (fracción E4 a E6 tras la purificación por His-tag [Figura 16] y fracción E3 a E6 tras purificación por Strep-tag [Figura 20]). Utilizamos

la absorbancia a 280 nm medida con dos espectrofotómetros con diferente escala (Nanodrop® ND1000 y Espectrofotómetro UV-1800). En la medida con Nanodrop se obtuvo una concentración de 30 ng/μl. En el espectrofotómetro UV-1800 se obtuvieron los datos que se muestran en la Tabla 7. Aplicando la expresión matemática de la ley de Lambert-Beer: $A=C \cdot \epsilon \cdot L$; donde: A = Absorbancia de la muestra; C = Concentración del cromóforo; L=longitud del paso óptico que contiene la muestra y ϵ = coeficiente de extinción molar. La absorbancia es adimensional y las unidades de ϵ son concentración⁻¹ longitud⁻¹, asumiendo que el coeficiente de extinción molar (ϵ) para una proteína desconocida vale 1 (ng/ml)⁻¹ cm⁻¹. De esta forma podemos estimar el rendimiento de las purificaciones y comprobar si el último paso de purificación por Strep-tag conlleva o no una pérdida de proteína.

| | A280 | Volumen (μl) | Concentración (ng/μl) | Cantidad de proteína total (μg) |
|---|------|--------------|-----------------------|---------------------------------|
| Fracción E3 a E6 tras purificación por His-tag | 0,04 | 1.000 | 40 | 40 |
| Fracción E2 a E4 tras purificación por Strep-tag | 0,06 | 200 | 60 | 6 |

Tabla 7.- Medidas espectrofotométricas de las muestras purificadas mediante cromatografía de afinidad por His-tag seguida de purificación por Strep-tag.

Aunque hemos obtenido suficiente proteína pura para iniciar los estudios de endocitosis y tráfico subcelular, dada la escala de trabajo, el proceso tiene un bajo rendimiento (ver discusión más abajo). En paralelo hemos realizado el siguiente objetivo cuyos resultados se exponen a continuación.

- Objetivo 2. Análisis del tráfico de la proteína ApoD a nivel subcelular ante estímulos que ocasionan estrés oxidativo.

Dada la relación demostrada entre lisosomas y estrés oxidativo, y entre ApoD y estrés oxidativo, nos proponemos explicar una posible relación entre ApoD y los lisosomas. Inicialmente pusimos a punto las condiciones de la inmunocitoquímica (Figura 21): concentración de anticuerpos primario y secundario, condiciones de bloqueo, tiempos, etc. en células HEK293T transfectadas con hApoD.

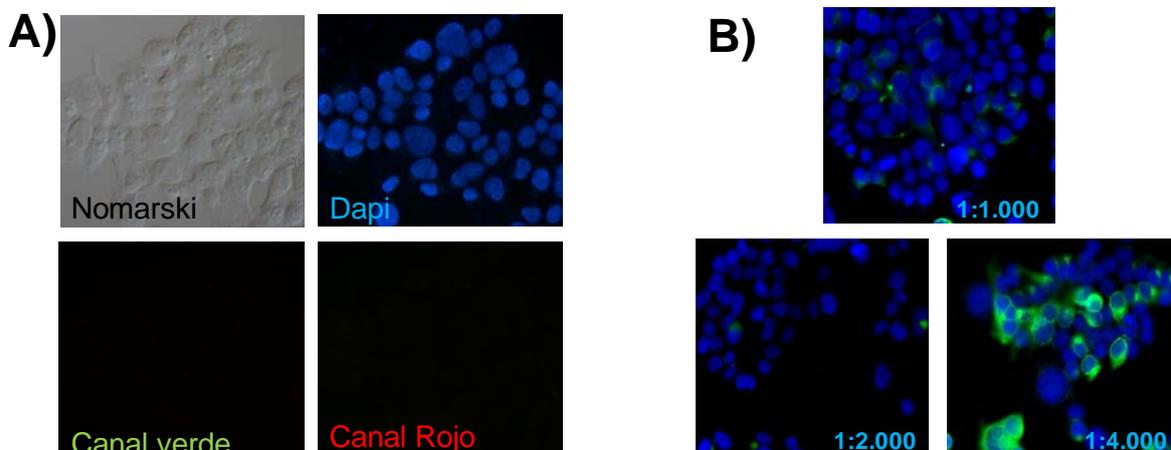


Figura 21.- Inmunocitoquímica realizada en células HEK293T transfectadas con hApoD. **A)** Control negativo sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario. **B)** Valoración de la concentración óptima de anticuerpo primario (1:1.000; 1:2.000 y 1:4.000). Anticuerpo primario:

policlonal de conejo anti-hApoD [OVIEDO] y anticuerpo secundario: policlonal de cabra anti-IgG de conejo-Alexa488 (1:1.000).

A continuación se analizó el patrón de expresión de hApoD en células 1321N1 (Figura 22) mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo seleccionado anteriormente (policlonal de conejo anti-hApoD [OVIEDO] 1:4.000). Además, para comprobar la especificidad del anticuerpo primario se incubó previamente el anticuerpo con el doble de molaridad de proteína hApoD (Figura 22C). Se comprobó que el marcaje punteado intracelular es específico.

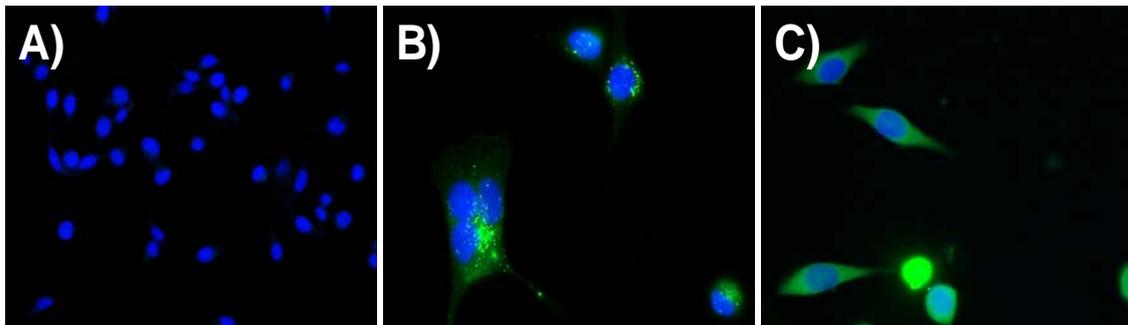


Figura 22.- Inmunocitoquímica de hApoD realizada en células 1321N1. **A)** Control negativo sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario. **B)** Valoración de la concentración óptima de anticuerpo primario (1:4.000). **C)** Control positivo en el que se ha realizado una incubación previa del anticuerpo primario con hApoD (relación molar 1:2). Nótese como desaparece el marcaje punteado observado en **B**. Anticuerpo primario: policlonal de conejo anti-hApoD [OVIEDO] y anticuerpo secundario: policlonal de cabra anti-IgG de conejo-Alexa488 (1:1.000).

Una vez que decidimos las condiciones idóneas para detectar hApoD, pusimos a punto las condiciones de la inmunocitoquímica (Figura 23) para la detección de LAMP-2: concentración de anticuerpos primario y secundario, condiciones de bloqueo, tiempos, etc. en células HEK293T.

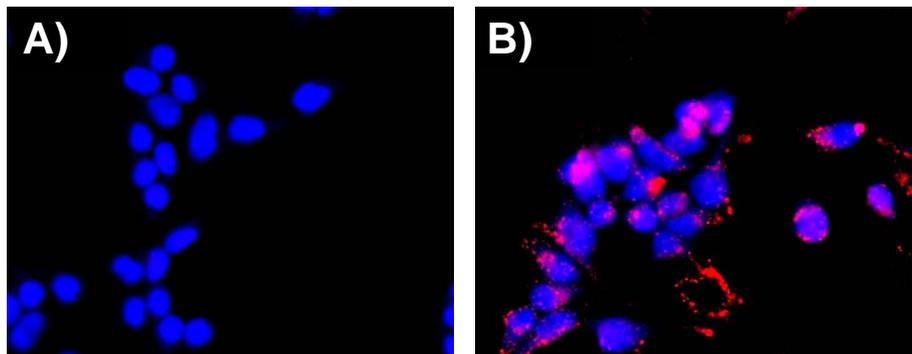


Figura 23.- Inmunocitoquímica de hLAMP-2 en células HEK293T. **A)** Control negativo sin anticuerpo primario pero con anticuerpo secundario. **B)** Valoración de la concentración óptima de anticuerpo primario. Anticuerpo primario: monoclonal H4B4 de ratón anti-hLAMP-2 (1:20) y anticuerpo secundario: policlonal de cabra anti-IgG de ratón-Alexa594 (1:1.000).

A continuación se puso a punto la doble inmunocitoquímica.

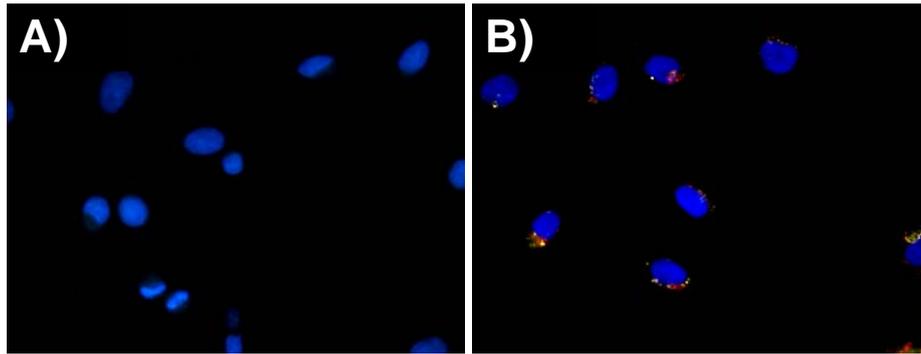


Figura 24.- Doble inmunocitoquímica de hApoD y hLAMP-2 en células 1321N1. **A)** Control negativo sin anticuerpos primarios pero con anticuerpos secundarios. **B)** Valoración del método óptimo de doble inmunocitoquímica. Anticuerpos primarios: policlonal de conejo anti-hApoD [OVIEDO] (1:4.000) y monoclonal H4B4 de ratón anti-hLAMP-2 (1:20); anticuerpos secundarios: policlonal de cabra anti-IgG de conejo-Alexa488 (1:1.000) y policlonal de cabra anti-IgG de ratón-Alexa594 (1:1.000).

Finalmente se realizaron los tratamientos de bajo suero y Paraquat (1, 2, 3, 6, 24 y 48 h) y se realizaron las dobles inmunocitoquímicas (hApoD y hLAMP-2) con el método establecido. Se analizaron 10 células de cada condición mediante microscopía confocal utilizando *stacks* en Z (Figuras 25 y 26).

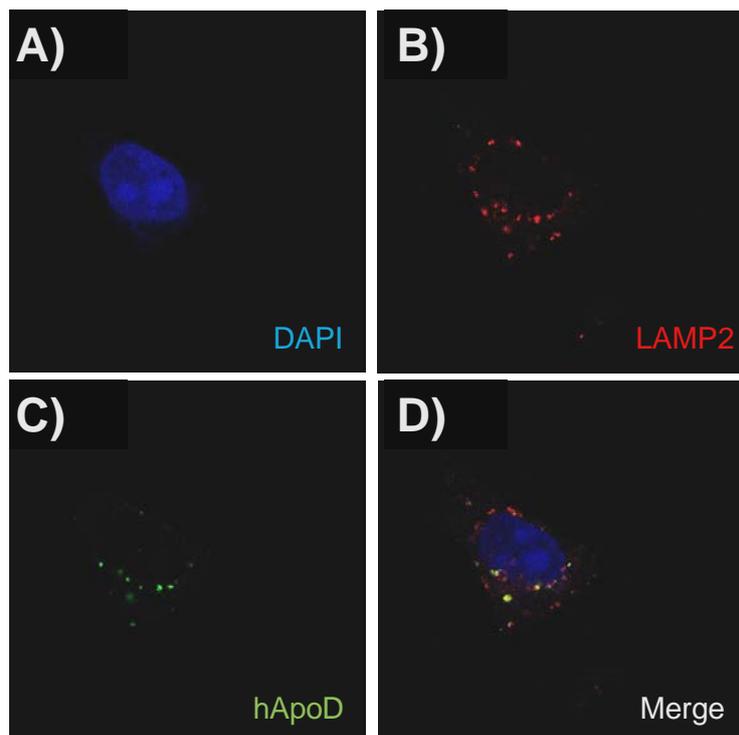


Figura 25.- Análisis de los diversos canales de las imágenes tomadas mediante microscopía confocal en condiciones de bajo suero. Se muestra un *stack* en Z (0.772 μm) de una célula representativa de bajo suero 1 hora. **A)** DAPI. **B)** LAMP-2. **C)** mApoD. **D)** Composición de los tres canales. Anticuerpos primarios: policlonal de conejo anti-hApoD [OVIEDO] (1:4.000) y monoclonal H4B4 de ratón anti-hLAMP-2 (1:20); anticuerpos secundarios: policlonal de cabra anti-IgG de conejo-Alexa488 (1:1.000) y policlonal de cabra anti-IgG de ratón-Alexa594 (1:1.000).

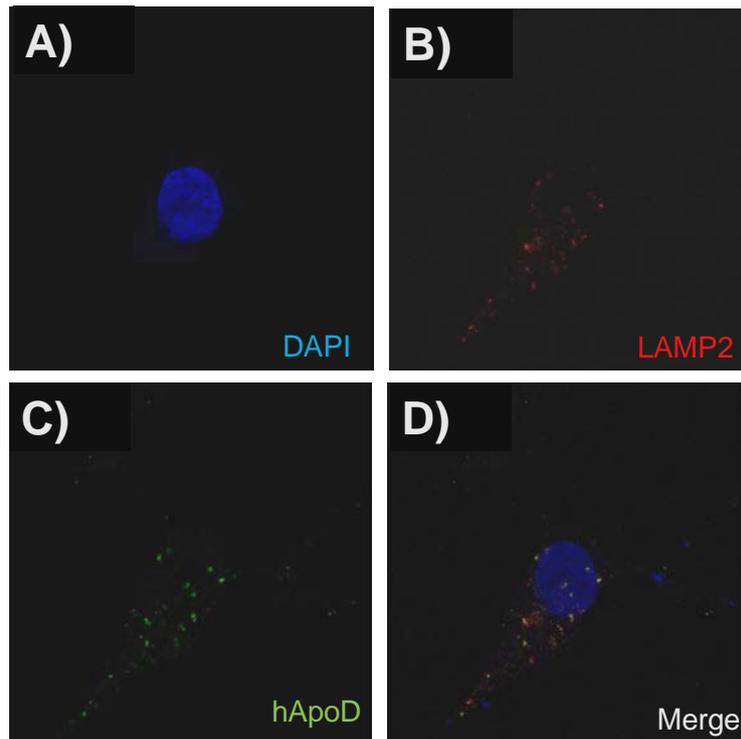


Figura 26.- Análisis de los diversos canales de las imágenes tomadas mediante microscopía confocal tomadas en condiciones de Paraquat. Se muestra un *stack* en Z (0.772 μm) de una célula representativa de Paraquat 1 hora. **A)** DAPI. **B)** LAMP-2. **C)** mApoD. **D)** Composición de los tres canales. Anticuerpos primarios: Policlonal de conejo anti-hApoD [OVIEDO] (1:4.000) y Monoclonal H4B4 de ratón anti-hLAMP-2 (1:20); anticuerpos secundarios: policlonal de cabra anti-IgG de conejo-Alexa488 (1:1.000) y policlonal de cabra anti-IgG de ratón-Alexa594 (1:1.000).

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante Image J obteniendo los porcentajes de colocalización para cada célula de cada condición (parámetro *t-overlap*).

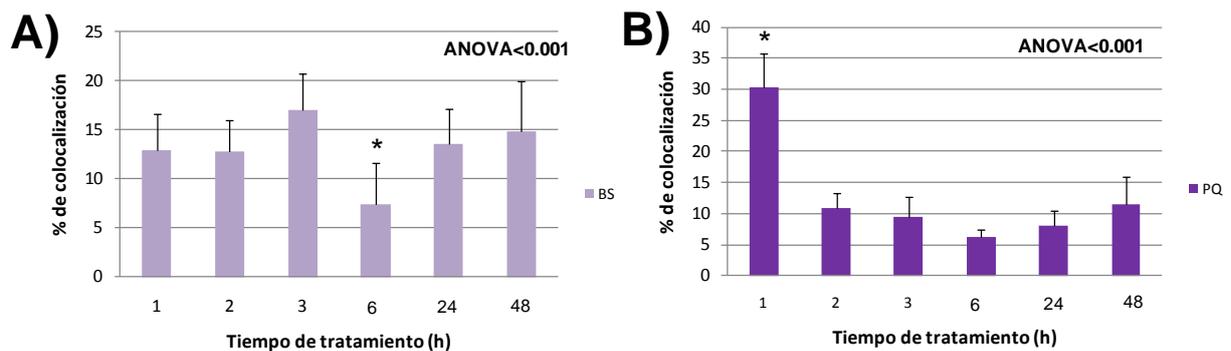


Figura 27.- Porcentaje de colocalización de hApoD y lisosomas en células 1321N1 en condiciones de bajo suero (BS) y Paraquat (PQ). Se representan las medias y las desviaciones estándar del porcentaje de colocalización de 10 células por cada condición en los tiempos indicados. Las diferencias son significativas según el test ANOVA<0,001. El asterisco indica los valores puntuales que son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) según el método estadístico post-hoc de Dunn.

En situaciones de bajo suero observamos un nivel basal de porcentaje de colocalización, con la excepción de las 6 horas de tratamiento en el que el nivel baja significativamente (Figura 27A).

En situaciones de estrés oxidativo producido por Paraquat observamos un aumento muy significativo (colocalización de un 30%) por encima de los niveles basales y un descenso posterior de la colocalización (Figura 27B).

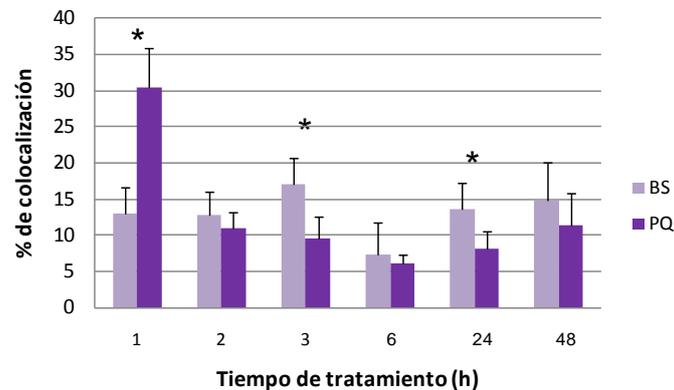


Figura 28.- Porcentaje de colocalización de hApoD y lisosomas en células 1321N1 en condiciones de bajo suero (BS) y Paraquat (PQ). Se representan las medias y las desviaciones estándar del porcentaje de colocalización de 10 células por cada condición (1, 2, 3, 6, 24 y 48 horas). El asterisco indica que las diferencias son estadísticamente significativas según el t-test ($p < 0,001$) o el Mann-Whitney Rank Sum Test ($p < 0,001$).

Sin embargo, al comparar las medias de ambos experimentos comprobamos que el aumento inicial es más patente que el posterior descenso, ya que en algunos casos este descenso no es estadísticamente significativo.

6.- DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

ApoD es una apolipoproteína que se expresa en el sistema nervioso tanto durante su desarrollo como durante el envejecimiento y la neurodegeneración. ApoD se sobreexpresa ante diversas formas de estrés (reducción de suero o tratamiento con el agente pro-oxidante como el Paraquat). Nuestros datos sugieren que, ante estas situaciones, ApoD es endocitada. Tras su endocitosis, ApoD podría llegar hasta los compartimentos subcelulares como los lisosomas, afectando al inicio de programas de muerte celular o supervivencia. Proteger la membrana lisosomal sería suficiente para explicar que ApoD pueda evitar la muerte celular en condiciones de estrés oxidativo.

Para poder estudiar el tráfico subcelular de ApoD ha sido necesario obtener una proteína que se pueda distinguir de la propia. Para ello hemos desarrollado un sistema de expresión eucariota con el que obtenemos ApoD de ratón y humana fusionada con dos secuencias de reconocimiento: poli His-tag en el N-terminal y Strep-tag en el C-terminal. Como el objetivo es expresar y obtener la proteína en el medio extracelular, hemos adaptado las células a condiciones de cultivo de bajo suero (1-2% de FBS) para evitar que la albúmina, componente muy abundante en el suero, interfiera demasiado con los sistemas de purificación.

En el caso de hApoD, aunque hemos sido capaces de transfectar eficazmente células HEK293T, no se secretaba al medio extracelular. Según Ahnström J. y colaboradores [40] la concentración de suero es una de las características que puede ayudar a la secreción de otras proteínas de la misma familia (como ApoM). Por lo tanto, se transfectaron cultivos celulares adaptados a 10% de suero. Sin embargo esto no mejoró la secreción, por lo que deberíamos estudiar la utilización de otros compuestos que mejoren la secreción para salvar este problema.

En el caso de mApoD hemos sido capaces de obtener la proteína pura mediante cromatografía de afinidad, combinando una purificación mediante His-tag en *Batch* y columna y una purificación mediante Strep-tag en columna. Tras las purificaciones mediante

la etiqueta His-tag, la proteína aparece relativamente pura pero con algo de contaminación (sobre todo de albúmina, a pesar de los esfuerzos para bajar su concentración en el material de partida). Tras un último paso por la columna de unión a la Strep-tag, la pureza aumenta mucho pero se pierde bastante cantidad. Durante el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad de Strep-tag, hemos perdido el 85% de la proteína que habíamos purificado en el paso anterior mediante cromatografía de afinidad de His-tag. Dada la baja eficiencia del proceso, proponemos la utilización de otro proceso de purificación, por ejemplo mediante una matriz de Strep-Tactin unida a bolas magnéticas, que parecen estar más optimizadas por la casa comercial y pueden evitar la pérdida de la proteína.

Actualmente no existe una fuente comercial de mApoD que nos permita realizar el estudio de la endocitosis correctamente. Todas las investigaciones realizadas hasta el momento consisten en la adición de hApoD a cultivos humanos. Pero si queremos usar en un futuro células de ratón (para tener la opción de usar células del ratón *knock-out*), la diferencia entre especies podría provocar que los resultados no fueran completamente fiables. Nuestra fuente de proteína pura permitiría dar fiabilidad a estos resultados si consiguiéramos aumentar la escala y la eficiencia de la purificación. En todo caso, para los estudios de tráfico intracelular que se pretenden realizar, no son necesarias grandes cantidades de proteína.

En una primera fase, en este trabajo se ha estudiado la localización de ApoD dentro de las células mientras que éstas la están expresando. Más adelante se podrá estudiar el tráfico durante su internalización cuando se añada de forma exógena al cultivo.

Hemos demostrado que una fracción importante de ApoD colocaliza con marcadores lisosomales en células 1321N1. Para conocer el papel de ApoD en los lisosomas, cuantificamos la proteína que colocaliza con Lamp-2 en situaciones de privación de suero y tratamiento con Paraquat.

En situaciones de bajo suero observamos un nivel basal de porcentaje de colocalización, con la excepción de las 6 horas de tratamiento en el que el nivel baja significativamente. Falta corroborar si este dato es fiable, ya que la medida de colocalización se ha realizado hasta ahora con 10 células (de un pocillo por condición) y se tienen ya preparadas otras dos réplicas con el objetivo de aumentar el número a 30 células por condición. En espera de aumentar la fiabilidad de la medida, podemos sin embargo comentar que la máxima producción de ApoD en estas mismas células se produce justamente a las 6 horas [29] y, de corroborarse el dato, podría indicar un aspecto relevante.

En situaciones de estrés oxidativo producido por Paraquat, observamos un aumento muy grande (colocalización de un 30%) por encima de los niveles basales y un descenso posterior muy significativo de la colocalización. Este descenso se mantiene a lo largo del tiempo hasta las 48 horas analizadas. Sin embargo, si comparamos el porcentaje de colocalización de las células tratadas con Paraquat y sus controles a bajo suero, el aumento del porcentaje de colocalización a 1 hora de tratamiento con Paraquat es más evidente que el descenso posterior.

En ambos casos podremos confirmar los resultados obtenidos cuando se haya realizado el análisis completo de los triplicados biológicos realizados.

Una posible explicación a la diferencia entre el aumento en la producción de ApoD y la disminución de colocalización entre ApoD y los lisosomas ante un estrés oxidativo, podría deberse a los requerimientos de ApoD fuera de las células gliales. Ante un estrés oxidativo aumentan los requerimientos extracelulares de ApoD, por lo que encontramos menos cantidad de proteína en los lisosomas de estas células de origen astrocítico. Cuando el estrés es más prolongado (6 horas) la célula debe aumentar la síntesis de proteína para compensar el estrés.

Otra posible explicación podría ser que la presencia de ApoD en los lisosomas condicione su estado de oxidación, y con ello la eficiencia del mismo en procesos como la autofagia. De esta manera se requeriría una disminución en la ApoD lisosomal para que la célula entrara en muerte celular provocada por un estrés oxidativo. El aumento de la colocalización al inicio del estímulo con Paraquat, podría indicar que la célula aumenta la ApoD lisosomal para hacer frente al estrés oxidativo y poder sobrevivir. Nuestros datos podrían dar luz a un mecanismo de acción nuevo para una lipoproteína como controlador de la supervivencia celular.

Además de confirmar éstos resultados, nos gustaría poder estudiar todo el tráfico intracelular de ApoD, continuando con los peroxisomas, endosomas, fagosomas, balsas lipídicas de las membranas, etc. tanto en condiciones de privación de suero como de estrés oxidativo. Además, gracias a que hemos sido capaces de purificar mApoD en pequeñas cantidades, seremos capaces de estudiar la endocitosis en cultivos primarios; así como la influencia de la adición de mApoD a cultivos primarios celulares de un ratón *Knock-out*. Actualmente la fuente de hApoD comercial no es muy homogénea, debido a que se obtiene de fluido cístico mamario. La puesta a punto de la purificación de hApoD sería también imprescindible para el estudio de la endocitosis de la proteína en cultivos celulares humanos.

7. - BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez, D., M.D. Ganfornina, and S. Martínez, *Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis*. *Mech Dev*, 2002. **110** (1-2): p. 225-9.
2. Ganfornina, M.D., et al., *Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins*. *Dev Dyn*, 2005. **232** (1): p. 191-9.
3. Ganfornina, M.D., et al., *Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress*. *Aging Cell*, 2008. **7** (4): p. 506-15.
4. Ayrault Jarrier M Fau - Levy, G., J. Levy G Fau - Polonovski, and J. Polonovski, [*Study of Humanserum Alpha-Lipoproteins by Immunoelectrophoresis*]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 1963. **45**: p. 703-13.
5. McConathy, W.J. and P. Alaupovic, *Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system*. *FEBS Lett*, 1973. **37** (2): p. 178-82.
6. Elliott, D.A., C.S. Weickert, and B. Garner, *Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders*. *Clin Lipidol*, 2010. **51**(4): p. 555-573.
7. Rassart, E., et al., *Apolipoprotein D*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1482** (1-2): p. 185-98.
8. Ganfornina, M.D., et al., *A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family*. *Mol Biol Evol*, 2000. **17** (1): p. 114-26.
9. Eichinger, A., et al., *Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D*. *J Biol Chem*, 2007. **282** (42): p. 31068-75.
10. Ruiz, M., et al., *Lipid binding properties of human ApoD and Lazarillo-related Lipocalins: functional implications for cell differentiation*. *FEBS J*, 2013. **(in press)**.
11. Bhatia, S., et al., *Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease*. *Biochem J*, 2012. **442** (3): p. 713-21.
12. Drayna, D., et al., *Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA*. *J Biol Chem*, 1986. **261** (35): p. 16535-9.
13. Sánchez, D., et al., *Exon-intron structure and evolution of the Lipocalin gene family*. *Mol Biol Evol*, 2003. **20** (5): p. 775-83.

14. Levros, L.C., Jr., et al., *Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1803** (9): p. 1062-71.
15. Lambert, J., et al., *Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1172** (1-2): p. 190-2.
16. Provost, P.R., et al., *Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D*. *J Lipid Res*, 1990. **31** (11): p. 2057-65.
17. Boyles, J.K., L.M. Notterpek, and L.J. Anderson, *Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I*. *J Biol Chem*, 1990. **265** (29): p. 17805-15.
18. García-Mateo, N., et al., *Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin breakdown*. *Glia*, 2013. **(submitted)**.
19. Spreyer, P., et al., *Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve*. *EMBO J*, 1990. **9** (8): p. 2479-84.
20. Ganfornina, M.D., et al., *ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury*. *Glia*, 2010. **58** (11): p. 1320-34.
21. Navarro, A., et al., *Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan*. *Age (Dordr)*, 2010. **32** (1): p. 85-96.
22. Terrisse, L., et al., *Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients*. *J Neurochem*, 1998. **71**(4): p. 1643-50.
23. Ordóñez, C., et al., *Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease*. *Histol Histopathol*, 2006. **21** (4): p. 361-6.
24. Soiland, H., et al., *Emerging concepts of apolipoprotein D with possible implications for breast cancer*. *Cell Oncol*, 2007. **29** (3): p. 195-209.
25. Ruiz, M., et al., *Grasshopper Lazarillo, a GPI-anchored Lipocalin, increases Drosophila longevity and stress resistance, and functionally replaces its secreted homolog NLaz*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012. **42** (10): p. 776-89.
26. Hull-Thompson, J., et al., *Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz*. *PLoS Genet*, 2009. **5** (4): p. e1000460.
27. Do Carmo, S., et al., *Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter*. *J Biol Chem*, 2002. **277** (7): p. 5514-23.
28. Leung, W.C., et al., *Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration*. *Circ Res*, 2004. **95** (2): p. 179-86.
29. Bajo-Grañeras, R., et al., *Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems*. *Glia*, 2011. **59** (10): p. 1551-66.
30. Olesen, B.T., J. Clausen, and O. Vang, *Characterization of the transcriptional profile in primary astrocytes after oxidative stress induced by Paraquat*. *Neurotoxicology*, 2008. **29** (1): p. 13-21.
31. González-Polo, R.A., et al., *Paraquat-induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells*. *Brain Res*, 2004. **1011** (2): p. 170-6.
32. Sanchez, D., et al., *Characterization of two novel lipocalins expressed in the Drosophila embryonic nervous system*. *Int J Dev Biol*, 2000. **44** (4): p. 349-59.

33. Sánchez, D., et al., *Loss of glial lazarrillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in Drosophila*. *Curr Biol*, 2006. **16** (7): p. 680-6.
34. Bajo-Grañeras, R., et al., *Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum*. *J Neurochem*, 2011. **117** (6): p. 949-60.
35. Kurz, T., et al., *Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780** (11): p. 1291-303.
36. Repnik, U., et al., *Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1824** (1): p. 22-33.
37. Tagawa, A., et al., *Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters*. *J Cell Biol*, 2005. **170** (5): p. 769-79.
38. Stern, S.T., P.P. Adisheshaiah, and R.M. Crist, *Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity*. *Part Fibre Toxicol*, 2012. **9**: p. 20.
39. Nakamura, K., et al., *Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient*. *Eur J Neurosci*, 2007. **26** (11): p. 3054-67.
40. Ahnstrom, J., O. Axler, and B. Dahlback, *HDL stimulates apoM secretion*. *Protein Pept Lett*, 2010. **17** (10): p. 1285-9.

- Páginas web utilizadas:

- <http://www.sigmaaldrich.com/>
- <http://www.iba-lifesciences.com/home.html>
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>
- <http://www.clontech.com/>
- <http://www.biotium.com/>
- <http://www.iba-go.com/>
- <http://www.bio-rad.com/>