



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de ciències

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

# Estudio de las proteínas celulares fijadoras del ácido graso de diseño LP226

Rubén Fernández Sánchez

**Grado en Bioquímica**

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 43468728Q

Trabajo tutelado por Dr. Xavier Busquets Xaubet  
Departamento de Biología, Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	x		x	

Palabras clave del trabajo:

Enfermedad del Alzheimer (EA), neurodegeneración, proteína Tau,  $\beta$ -Amiloide, ácido graso docosahexaenoico (DHA), ácido 2-hidroxi-docosahexanoico (OHDHA), proteína de unión a ácidos grasos 7 (FABP7), receptor acoplado a proteína G 120 (GPR120), proteína verde fluorescente (GFP)



## **RESUMEN**

La enfermedad del Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común caracterizada por la pérdida de memoria, siendo en personas mayores la principal causa de demencia. Se estima que actualmente la padecen más de 46 millones de personas y a día de hoy no hay tratamientos disponibles para detener o revertir su progresión. Todavía se desconoce en gran parte qué causa la enfermedad y su fisiopatología. Por estos motivos se siguen investigando sus bases moleculares y terapias. La enfermedad supone un coste económico notable y un problema socio-sanitario. El objetivo del presente trabajo es tratar de identificar los receptores cerebrales para la molécula ácido 2-hidroxi-docosahexaenoico (OHDHA; LP226), un hidroxil-derivado del ácido graso poliinsaturado docosahexaenoico (DHA). Este derivado hidroxilado del DHA ha mostrado en estudios animales ser eficaz como tratamiento contra la EA, pero aún se desconoce en gran medida su mecanismo de acción. Nuestra hipótesis en el presente trabajo parte del principio de que los eicosanoides derivados del DHA (formas hidroxiladas de DHA principalmente) interaccionan con receptores celulares para ejercer su acción fisiológica (anti-inflamatoria fundamentalmente). En este trabajo se aborda la expresión a nivel celular de dos receptores potenciales para OHDHA presentes en cerebro: FABP7 y GPR120, con la finalidad de analizar su interacción con OHDHA.

## **ABSTRACT**

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and it is characterized by memory loss, being the leading cause of dementia in the elderly. It is estimated that this disease affects more than 46 million people worldwide and nowadays no suitable treatments are available to slow or reverse its progression. It still remains largely unknown both what the cause(s) of the disease and its pathophysiology. This is why the research on AD molecular basis is still ongoing. The pathology accounts for remarkable economic burden and a public health problem. This work aims to identify brain receptors for 2-hydroxy-docosahexaenoic acid (OHDHA; LP226), a hydroxyl-derivative of the polyunsaturated docosahexaenoic acid (DHA). This DHA hydroxyl derivative has shown to be efficient as a treatment against AD in animal models, but its mechanism of action is still largely unknown. Our hypothesis for the present work is based on the fact that eicosanoids derived from DHA (mainly hydroxylated forms of DHA) bind to cellular receptors to mediate their physiological activity (basically anti-inflammatory). In this work it is addressed the expression at cellular level of two potential receptors for OHDHA which are present in brain: FABP7 and GPR120, with the aim of testing their interaction with OHDHA.

# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	<b>pág. 5</b>
1. El Alzheimer	
2. Bases moleculares de la enfermedad del Alzheimer	
3. Evolución del cerebro en la enfermedad del Alzheimer	
4. Tratamientos contra la enfermedad del Alzheimer	
5. Terapia lipídica dirigida a la membrana celular	
<b>Objetivos</b>	<b>pág. 10</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>pág. 11</b>
1. Uso y modificación de secuencias	
2. Diseño de <i>Primers</i>	
3. Subclonación del cDNA de tGFP, FABP7 y GPR120 en vector de expresión pcDNA3.0	
4. Transformación bacteriana	
5. Genotipación de colonias de <i>E. coli</i> – PCR de colonias	
6. Amplificación y purificación del DNA plasmídico	
7. Transfección génica	
8. Extracción y cuantificación de proteínas	
9. Electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS	
10. Western blotting	
<b>Resultados</b>	<b>pág. 20</b>
1. Construcción vectores de expresión en células de mamífero para FABP7, GPR120 y tGFP	
2. Expresión de las proteínas tGFP, FABP7 y GPR120 en cultivos celulares	
<b>Discusión</b>	<b>pág. 27</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>pág. 29</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>pág. 30</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. El Alzheimer

La enfermedad del Alzheimer (EA) fue descubierta en 1906 por un neurobiólogo y psiquiatra alemán, Alois Alzheimer<sup>1</sup>. Dicha enfermedad, la mayor causa de demencia en personas de mediana y avanzada edad, se caracteriza a nivel histopatológico por una  $\beta$ -amiloidosis cerebral y ovillos neurofibrilares. Clínicamente cursa con una disminución de la memoria, lenguaje, capacidad de resolver problemas y otras habilidades cognitivas que afectan a la capacidad de las personas para realizar actividades diarias<sup>2,3</sup>.

La edad es el principal factor de riesgo en la EA, la mayoría de los pacientes la desarrollan a partir de los 65 años de edad (figura 1). Las tasas de incidencia específicas por edad para la EA muestran una duplicación de la incidencia cada 6 años<sup>4</sup>. Se estima que 46 millones de personas, en su mayoría mayores de 60 años, padecen demencia en todo el mundo, y se prevé que esta cifra se duplique cada 20 años, al menos hasta el año 2050<sup>5</sup> con aproximadamente 74,7 millones de personas afectadas para 2030 y 131,5 millones en 2050<sup>6</sup>.

La demencia también conlleva un alto coste económico. En la actualidad el coste total asociado a la demencia a nivel mundial es de 818 billones de dólares y se alcanzará el trillón en 2018<sup>6</sup>.

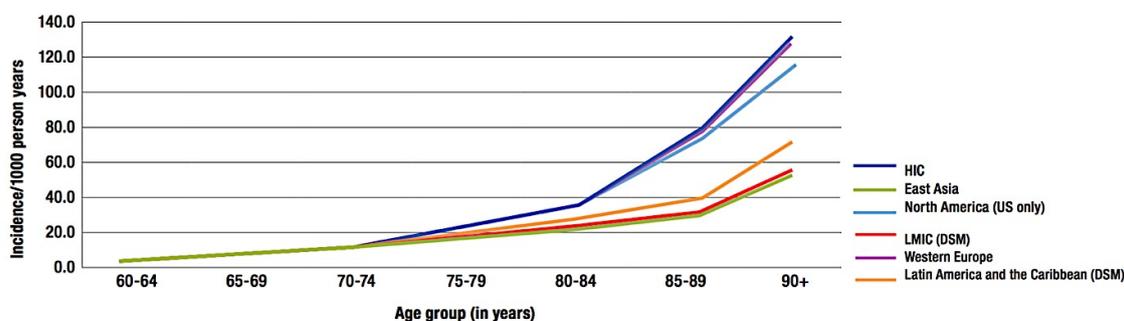


Figura 1. Cálculo de la incidencia de demencia según la edad en 2015 para regiones mundiales. HIC (países con ingresos altos), LMIC (países con ingresos bajos-medios)<sup>6</sup>.

La enfermedad de Alzheimer se desarrolla durante un largo período preclínico (varias décadas), lo que nos hace preguntarnos en qué medida los factores de riesgo asociados a la enfermedad son resultado del desarrollo de cambios patológicos en lugar de una relación causal<sup>7</sup>. Estudios que se iniciaron hace décadas y que incluyeron personas de vida temprana-media permitieron la evaluación de las relaciones entre factores de riesgo en los primeros años de vida o de mediana edad, el deterioro cognitivo y el riesgo de demencia en edad avanzada. Los resultados de la mayoría de los estudios han confirmado la relación entre el estado de salud vascular, el riesgo de deterioro cognitivo y la probabilidad de demencia en edades avanzadas<sup>8</sup>. Además otros factores relacionados con el estilo de vida, incluyendo la diabetes, la obesidad, inactividad física y mental, depresión, tabaquismo, bajo nivel educativo y la dieta tienen un papel importante en la aparición de demencia, y el potencial para la prevención primaria relacionada con tales factores de riesgo modificables es alto<sup>9</sup>.

## 2. Bases moleculares de la enfermedad del Alzheimer

### 2.1 Formación de las placas $\beta$ -amiloideas

La proteína precursora amiloide (APP) es una proteína transmembrana que se expresa en altos niveles en el cerebro y se metaboliza de manera rápida y con gran complejidad. La proteína APP se procesa por dos vías principales conocidas. Por un lado, la vía no amiloidogénica, en donde la proteína APP es metabolizada por la  $\alpha$  y  $\gamma$ -secretasa. Por otro lado, el procesamiento a través de la  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa (ruta amiloidogénica) da lugar al péptido amiloide (A $\beta$ ). Esta ruta produce varias especies de fragmentos  $\beta$ -

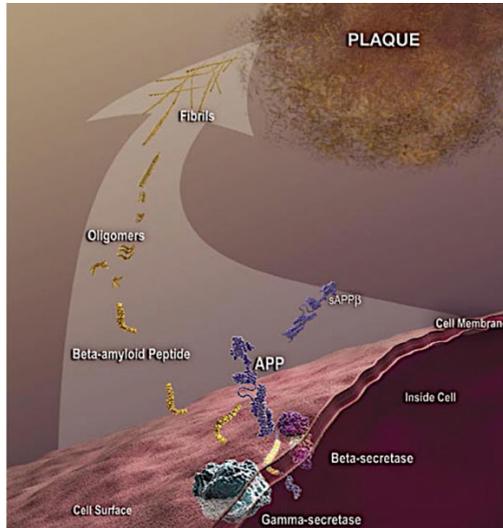
amiloides. Los más largos por lo general son más hidrofóbicos y tienden a agregarse dando lugar a la formación de agregados en forma de placas que son detectados en el cerebro de los enfermos de EA (ver figura 2)<sup>10</sup>. Las  $\alpha$ -secretasas pertenecen a la familia enzimática ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase*)<sup>11</sup>. La  $\alpha$ -secretasa procesa a APP dentro de la secuencia de aminoácidos del A $\beta$ , previniendo así su formación. Después de la escisión por la  $\alpha$ -secretasa, el dominio N-terminal de APP (APP $\alpha$  soluble) se libera, mientras el fragmento C-terminal C83 queda en la membrana<sup>11</sup>. BACE1 (del inglés *Beta-site APP Cleaving Enzyme 1*) es la principal enzima con actividad  $\beta$ -secretasa del cerebro y su mediación es absolutamente necesaria para la formación del péptido A $\beta$ . El procesamiento  $\beta$ -secretasa sobre APP da lugar a la liberación del dominio N-terminal (APP $\beta$  soluble), mientras el fragmento C-terminal C99 queda anclado en la membrana. Finalmente, la  $\gamma$ -secretasa es una aspartil proteasa compuesta por cuatro miembros diferentes: la presenilina 1 o 2 (centro catalítico), aph1, pen-2 y nicastrina, responsable del procesamiento de los fragmentos C-terminales generados por la  $\alpha$ - o la  $\beta$ -secretasa<sup>12</sup>. El procesamiento de  $\gamma$ -secretasa del fragmento C99 da lugar a la formación del péptido A $\beta$  y de AICD (*APP intracellular domain*), mientras que el procesamiento de C83 da lugar al péptido p3 y AICD. En este contexto, cabe destacarse que tanto APP como  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa son proteínas de membrana, muy influenciadas por el ambiente lipídico que las rodea. De hecho, el procesamiento amiloidogénico se cree que tiene lugar en unos dominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingomielina denominados *rafts* lipídicos<sup>13</sup>.

En la EA existen dos grandes variedades clínicas de la enfermedad, por un lado, la forma esporádica abarca la mayor parte de los casos, y la causa es desconocida. Por otro lado, está la variedad familiar de la EA que se caracteriza por la aparición temprana de la patología y solo supone 1-3% de todos los casos. Existen mutaciones genéticas asociadas a la patología en APP y en las presenilinas (PS1 o PS2). Las mutaciones en APP por lo general favorecen el corte  $\beta$ -secretasa y la producción de A $\beta$ <sup>14</sup>. Por otro lado, las mutaciones clínicas en PS1 se traducen en cambios de actividad amiloidogénica, favoreciendo un incremento en la razón de péptidos largos vs. cortos, por ejemplo, favoreciendo la relación de Abeta42/40<sup>15</sup>.

El péptido  $\beta$ -amiloide es un marcador neuropatológico, pero no existe una relación causal clara entre A $\beta$  y la EA. Los pacientes son diagnosticados en estadios medios-avanzados, cuando la carga amiloide en el cerebro ya es alta, y pueden pasar años con el cerebro cargado de placas de A $\beta$  sin que aparezcan signos de deterioro cognitivo hasta edades muy avanzadas. Además, durante el envejecimiento fisiológico, también aparecen placas de A $\beta$  en el cerebro de personas sanas a nivel cognitivo. Sin embargo, por otro lado hay una gran cantidad de estudios haciendo hincapié en que los oligómeros solubles  $\beta$ -amiloides desempeñan un papel principal en la disfunción neuronal y la EA<sup>16,17</sup>. De hecho, aunque es cierto que los oligómeros son muy neurotóxicos y podrían explicar la muerte neuronal en la EA, también se cree que aparecen en estadios tardíos de la patología, por lo que otras causas deben mediar la muerte neuronal propia de la EA. En definitiva, asumir que el amiloide es la causa de la enfermedad podría ser un error y, recientemente, los resultados derivados de ensayos clínicos han puesto en entredicho la validez del amiloide para explicar la fisiopatología de la enfermedad y como base en el desarrollo de nuevas terapias<sup>18</sup>. En consecuencia, la causa(s) son a día de hoy desconocidas, y tanto el A $\beta$  como los ovillos neurofibrilares posiblemente son una consecuencia del proceso patológico, más que la causa<sup>17</sup>.

La deposición de péptidos  $\beta$ -amiloides es responsable de la activación de la microglía. La respuesta inmune e inflamatoria en los estadios iniciales de la EA, con abundante acumulación de placas, ha sido descrita como respuesta neuroprotectora en modelos animales<sup>19</sup>, en donde tanto los linfocitos como la microglía activada producen factores neurotróficos o citoquinas anti-inflamatorias que controlan la supervivencia neuronal y su plasticidad<sup>20</sup>. En cambio, en etapas avanzadas de la EA la inmunidad

humoral y celular están alterados. Los péptidos A $\beta$ , además de bloquear a la acción de las neurotrofinas, contribuyen a un aumento de la respuesta inflamatoria por la estimulación del factor NF- $\kappa$ B, un factor nuclear implicado en la producción de citoquinas y que también regula las vías MAPK/ERK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) que conducen a la producción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas, que pueden favorecer la muerte neuronal<sup>10</sup>.

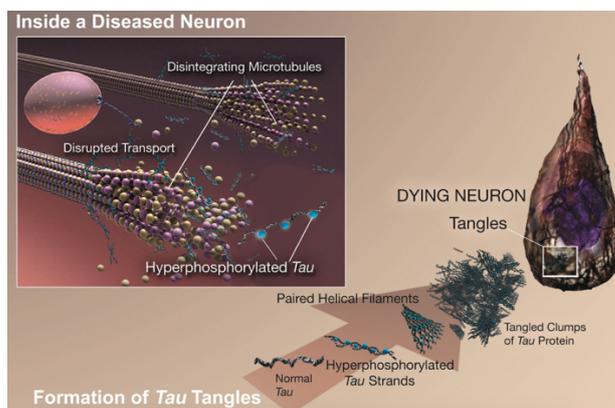


**Figura 2. Formación de la placa  $\beta$ -amiloide.** Primero beta-secretasa se une y escinde a APP liberando APP $\beta$  de la célula. A continuación gamma-secretasa corta el fragmento de APP resultante (C99), todavía unido en la membrana de la neurona, dando lugar al péptido beta-amiloide. A continuación, el péptido beta-amiloide se libera al espacio fuera de la neurona y empieza a agregarse a otros péptidos A $\beta$ . Estos pequeños agregados solubles se denominan oligómeros. Se ha descrito que tamaños específicos de oligómeros pueden ser responsables de interactuar con los receptores de las células vecinas y las sinapsis, alterando su funcionamiento. A medida que el proceso continúa, los oligómeros se hacen más grandes, transformándose en protofibrillas y fibrillas que forman las placas A $\beta$ <sup>17</sup>.

## 2.2 Formación de los ovillos neurofibrilares

La segunda característica de la EA son los ovillos neurofibrilares. Son acumulaciones anormales de hebras de proteínas trenzadas que se encuentran dentro de las células nerviosas. El principal componente de los ovillos es una proteína llamada *tau*, proteínas abundantes en todo el Sistema Nervioso Central (SNC) que estabilizan microtúbulos, y que son producto de la familia de proteínas MAP (Proteínas Asociadas a Microtúbulos)<sup>21</sup>. Las neuronas en buen estado son sostenidas internamente, en parte, por estructuras llamadas microtúbulos que permiten transportar nutrientes y otros componentes celulares, por ejemplo vesículas que contienen neurotransmisores, desde el cuerpo celular a lo largo del axón<sup>22</sup>.

*Tau*, que generalmente tiene un determinado número de moléculas de fosfato unidos a él, se une a los microtúbulos y los estabiliza. En la EA hay una cantidad anormal de aminoácidos fosforilados de la proteína *tau*. Como resultado *tau* se desacopla de los microtúbulos y empieza a formar hebras con otras hebras de proteína *tau*<sup>22</sup>. Estas hebras de *tau* forman estructuras llamadas filamentos helicoidales apareados, enredándose unos con otros y formando ovillos neurofibrilares dentro de la célula (*Neurofibrillary tangles*, NFT). Como consecuencia, los microtúbulos se disgregan en el proceso alterando el transporte interno de la neurona. Finalmente, este colapso daña la capacidad de las neuronas para comunicarse entre sí, llevando a la muerte (ver figura 3)<sup>23</sup>.



**Figura 3. Formación de los ovillos neurofibrilares.** Una hiperfosforilación de *tau* desencadena la formación de los ovillos<sup>17</sup>.

### 3. Evolución del cerebro en la EA

Aunque el curso de la enfermedad no es el mismo en todas las personas que padecen la EA, los síntomas parecen desarrollarse sobre las mismas etapas generales. En el estadio preclínico, la EA comienza en la corteza entorrinal, una región del cerebro cercana al hipocampo y con conexiones directas con él. Las neuronas sanas de la región empiezan a ser menos eficientes, pierden su capacidad de comunicación y finalmente mueren. El proceso se extiende gradualmente al hipocampo y las regiones afectadas comienzan a atrofiarse, aparecen los primeros problemas de memoria. Los ventrículos, los espacios llenos de líquido cefalorraquídeo dentro del cerebro, se agrandan a medida que el proceso avanza<sup>24</sup>. En el estadio leve, a medida que la EA se propaga a través del cerebro el número de placas amiloides y ovillos neurofibrilares crecen, la contracción progresa, y la corteza cerebral se ve cada vez más afectada. La pérdida de memoria continúa y alteraciones en otras capacidades cognitivas emergen. El diagnóstico clínico se hace presente en esta etapa. En la etapa moderada, el daño se ha extendido a las áreas de la corteza cerebral que controlan el procesamiento sensorial, el razonamiento y el lenguaje. Las regiones dañadas siguen con el proceso neurodegenerativo, los ventrículos se agrandan, y los signos y síntomas de la enfermedad son más acentuados y generalizados. En la última etapa, etapa severa, las placas y los ovillos están muy extendidos en diversas regiones del cerebro, prácticamente toda la corteza del cerebro se ha atrofiado. Los pacientes ya no son capaces de comunicarse<sup>25</sup>.

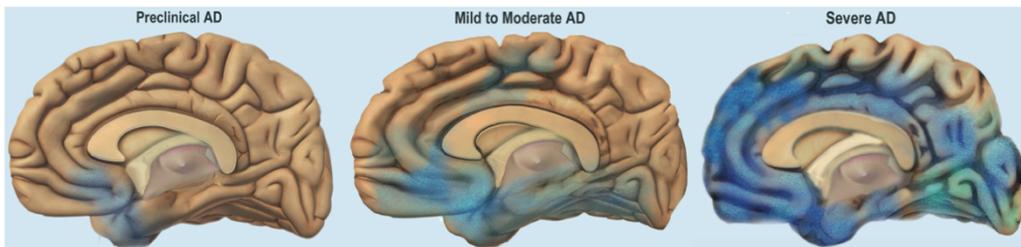


Figura 4. Distribución de las placas  $\beta$ -amiloides y ovillos neurofibrilares, así como de las regiones afectadas en el cerebro, en las diferentes etapas de la EA<sup>14</sup>.

### 4. Tratamientos contra la enfermedad del Alzheimer

Debido a la escasa comprensión sobre la patología molecular de la EA, a día de hoy no hay disponibles fármacos que sean capaces de detener su progresión. Actualmente, las agencias *Food and Drug Administration* (EE.UU.) y la Agencia Europea del Medicamento sólo han aprobado dos tipos de medicamentos para tratar los síntomas de la EA. El primero actúa sobre el sistema colinérgico y el segundo sobre el glutamatérgico<sup>26</sup>. Son los inhibidores de la colinesterasa (ICE) y un antagonista parcial de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Ambos tipos han demostrado una eficacia limitada o ausente<sup>27</sup>. Por un lado, los ICE aumentan los niveles de acetilcolina (ACh) inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa<sup>28</sup> y, por otro lado, los antagonistas de NMDA normalizan el sistema glutamatérgico bloqueando los receptores NMDA para evitar el agonismo mediado por oligómeros  $A\beta$ , la apertura de canales y muerte por excitotoxicidad<sup>29</sup>.

La investigación farmacológica actual en la EA se centra principalmente en el desarrollo de fármacos modificadores de la enfermedad (*Disease Modifying Drugs*, DMDs) que se suponen que pueden retrasar o revertir su progresión. Los objetivos de estos fármacos en investigación incluyen la producción de  $\beta$ -amiloide y su agregación, así como la fosforilación de tau y la formación de ovillos. Aunque hasta la fecha, ninguno de estos fármacos ha demostrado eficacia en ensayos clínicos de fase III<sup>30</sup>. El hecho de que todos los fármacos desarrollados hasta el momento para inhibir la producción/agregación de amiloide o la fosforilación de tau no hayan tenido eficacia clínica pone de manifiesto una serie de cuestiones, empezando por la validez de la hipótesis de la cascada amiloide para explicar la aparición y el desarrollo de la enfermedad. En definitiva, se están diseñando fármacos para tratar un aspecto de la enfermedad que muy posiblemente no es la causa, sino una consecuencia de la fisiopatología de la EA<sup>18</sup>.

## 5. Terapia lipídica dirigida a la membrana celular

Las membranas representan el punto de encuentro de lípidos y proteínas, y muestran una amplia variedad de funciones importantes. Se ha demostrado que los lípidos regulan muchas proteínas de membrana, así como dominios de membrana que permiten la interacción de proteínas de señalización. Los lípidos de membrana son importantes en la fisión y la fusión de las bicapas lipídicas, pudiendo controlar las condiciones ambientales y fisiológicas. De modo que los lípidos y estructuras lipídicas como los *rafts* lipídicos participan como mensajeros o reguladores de la transducción de señales. Por otra parte, su alteración está asociada con el desarrollo de diversas enfermedades<sup>31</sup>. Las proteínas interactúan con las membranas a través de todo tipo de interacciones. La influencia de los lípidos en la función de proteínas permitiría utilizar estas moléculas como dianas terapéuticas contra enfermedades como el cáncer, obesidad, trastornos neurodegenerativos, entre otros. Esta aproximación terapéutica se denomina Terapia Lipídica de Membrana (TLM)<sup>32,33</sup>.

El ácido graso docosahexaenoico (DHA) es el ácido graso polinsaturado omega-3 más abundante del cerebro implicado en el SNC y juega un papel decisivo en la sinaptogénesis, la función sináptica, cognición y neuroprotección<sup>34</sup>. La forma no hidroxilada del DHA regula la expresión génica de programas de neuroprotección, anti-inflamación y anti-apoptóticos que promueven la supervivencia celular y revierte la muerte neuronal inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide<sup>35</sup>. Se obtiene a través de la dieta y su deficiencia está asociada con la pérdida cognitiva debido a la edad y con enfermedades neurodegenerativas como la EA<sup>36</sup>. Varios estudios en ratones han demostrado que la ingesta de DHA reduce la patología cerebral asociada a la EA mejorando la protección contra la degeneración sináptica y reduciendo los niveles de péptidos  $\beta$ -amiloides. En cambio en ensayos clínicos con humanos con la EA sólo mostró la mejora de la cognición en pacientes con disfunción cognitiva leve<sup>37</sup>.

Las propiedades biofísicas y estructurales de membrana de DHA influyen en la fluidez de las membranas y ello influencia la actividad de las proteínas de membrana<sup>38</sup>. Alternativamente, DHA, a través de la fosfolipasa A2, puede ser liberada de los fosfolípidos y actuar como una molécula de señalización, y también ser hidroxilada produciendo lípidos bioactivos secundarios como resolvinas (RVs) y protectinas. Esta hidroxilación se cree que está mediada a través de la lipoxigenasa-15 (LOX-15) o la ciclooxigenasa-2 acetilada (COX-2)<sup>39</sup>. Los compuestos derivados de DHA se clasifican como resolvinas o protectinas de la serie D, mientras que los formados a partir del ácido eicosapentaenoico (EPA) son designados como resolvinas de la serie E. DHA puede ser hidroxilado en el carbono 17 por 15-LOX o COX-2 acetilada, lo que lleva a la formación estereoselectiva de 17S- o 17R-hidroxi-DHA (17-HDHA), respectivamente. Estos derivados adicionalmente pueden ser hidroxilados dando lugar a trihidroxi-derivados, como el D1, D2, D3 y D4 17-(S/R)-RVs (RVs de la serie D), y a dihidroxi 17-(R)- y 17(S)-protectina. Este último también es conocido como neuroprotectina D1 (NPD1) y se caracteriza por sus propiedades anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y neuroprotectoras. Además, la generación de estos segundos mensajeros hidroxi-derivados tendrán la capacidad de interactuar con receptores<sup>40</sup>.

En este contexto, estudios recientes han demostrado que una molécula hidroxi-derivada de DHA, la OHDHA (ácido 2-hidroxi-docosahexanoico) (sintetizada por Lipopharma Therapeutics) es también terapéuticamente eficaz contra la EA en modelos animales de la enfermedad<sup>41</sup>. Su administración aumentó los niveles de DHA y fosfatidiletanolamina (PE) en el cerebro. Además de las modificaciones lipídicas, también hubo una reducción de  $\beta$ -amiloide y una recuperación cognitiva total. En cultivos neuronales la administración de OHDHA redujo además la fosforilación de la proteína *tau* inducida por  $\beta$ -amiloide y se mejoró su supervivencia ante la neurotoxicidad mediada por NMDA. Estos resultados fueron avalados por estudios basados en membranas lipídicas, en donde se administró OHDHA en vesículas similares a *raft* lipídicos y se vio una reducción de la afinidad de unión de oligómeros y fibras  $\beta$ -amiloides a las membranas<sup>42,43</sup>.

Sin embargo, aún se desconoce en gran medida el mecanismo de acción de OHDHA. Por este motivo este estudio se ha centrado en estudiar la posible actuación de OHDHA mediante la unión a receptores proteicos, siendo éste punto el objetivo del presente trabajo.

## **OBJETIVOS**

1. Subclonación de las secuencias codificantes de cDNA de los genes humanos FABP7 y GPR120 en el vector de expresión pcDNA 3.0 para producir la proteína en diferentes líneas celulares.
2. Posterior comprobación de la afinidad de OHDHA por unirse a las proteínas expresadas mediante ensayo de proteína unión.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Uso y modificación de secuencias

En el presente estudio trabajaremos con tres secuencias de cDNA de diferentes proteínas codificadas por sus respectivos genes: tGFP (turbo *Green fluorescent protein*), FABP7 (*Fatty Acid Binding Protein 7*) y GPR120 (*G-protein coupled receptor 120*). Dichas secuencias han sido subclonadas quitando el codón STOP en el extremo 3' para así añadir seis codones CAC, es decir, seis codones que se traducen en histidina, y a continuación se añade el codón de terminación TAA. Esta modificación permitirá más adelante reconocer a las proteínas expresadas con las que estamos trabajando haciendo uso de un anticuerpo específico contra el epítopo C-His 6x.

### 2. Diseño de *Primers*

Haciendo uso del software *primer express 2.0* se diseñaron los *primers* a utilizar (tabla 1). Las condiciones de diseño fueron: Contenido en G+C 40-60%, temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) 55-60°C y longitud de la secuencias 20-25 nucleótidos. La producción de dichos *primers* fue realizada por Sigma-Aldrich.

Tabla 1. *Primers* diseñados mediante *primer express 2.0*

Primer	Secuencia
FABP7_CDS_cloning_BamHI_UP	ACTGACGGATCCATGGTGGAGGCTTTCTGTGC
GPR120_CDS_cloning_BamHI_UP	ACTGACGGATCCATGTCCCCTGAATGCGCG
GFP_CDS_cloning_BamHI_UP	ACTGACGGATCCATGGAGAGCGACGAGAGCG
pT7CFE1-CHis_EcoRI_LO	ATCTAAGAATTCAGTCAGATCTCAGTGGTGGTG
pcDNA 3.0_Polilynker_UP	CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATT
pcDNA 3.0_Polilynker_LO	GGCAACTAGAAGGCACAGTCG
GPR120_Sequence_UP	TCACGGTAAGCCTGGCCTAC
GPR120_Sequence_LO	TAGAAGAGCAGGTGGCAGGC

El sentido de las secuencias es 5'-3'. Los nucleótidos en rojo representan dos tripletes extras añadidos para favorecer la eficiencia de los enzimas de restricción en el proceso de digestión. Los nucleótidos en verde y azul son las dianas de restricción de BamHI (verde) y EcoRI (azul). Los nucleótidos en negro son los que hibridan en la hebra molde.

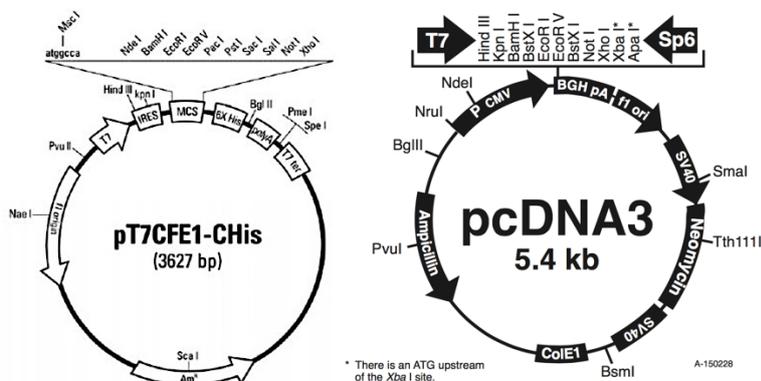
### 3. Subclonación del cDNA de GFP, FABP7 y GPR120 en el vector pcDNA3.0

#### 3.1 Materiales

- 5 PRIME™ Exact™ Polymerase
- *Primers* pT7CFE1-CHis\_EcoRI\_LO y FABP7/GFPR120/GFP\_CDS\_cloning\_BamHI\_UP
- Plásmido de origen pT7CFE1-CHis con los insertos de de GFP/FABP7/GPR120
- Termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf)
- Enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Promega™)
  - Reacción de digestión con enzimas de restricción (Promega™): Agua libre de nucleasas, BSA acetilada (10 µg/µl), tampón de digestión (6 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 6 mM Tris-HCl pH 7.5)
- Vector de destino pcDNA3.0 (Invitrogen™)
- Para la electroforesis horizontal (Bio-Rad®):
  - Geles agarosa 1% (2.5 g Agarosa en 250 ml TBE (Tris-Base 1% (p/v), Ácido bórico 0.5% (p/v), 0.5 mM EDTA) y 0.005% (v/v) bromuro de etidio (EtBr)), marcador de DNA de rango amplio (Sigma-Aldrich®) y tampón de carga DNA 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), 30% glicerol (v/v))
- *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen™)
- *Rapid DNA Ligation kit* (Thermo Scientific™)
- Fosfatasa alcalina, 1 u/µl (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, TSAP) (Thermo Scientific™)

### 3.2 Fundamento metodológico

La subclonación de cDNA es una técnica ampliamente utilizada para mover fragmentos de DNA de un vector a otro. En el presente estudio, el vector de destino es pcDNA 3.0, mientras que el de origen es pT7CFE1-CHis (ver figura 5)



**Figura 5. Vectores de origen, pT7CFE1-CHis, y destino, pcDNA3.0.** Dichos vectores contienen en la región MCS (Multiple Cloning Site) diversas dianas de restricción que pueden ser utilizadas para ensamblar fragmentos de DNA para su clonación. *Imágenes obtenidas en Thermo Scientific™.*

En nuestro caso, las dianas de restricción BamHI y EcoRI no se encuentran presentes en los vectores de origen, pT7CFE1, que a su vez portan los insertos de tGFP, FABP7 y GPR120. Dichas secuencias, en un estudio anterior, fueron introducidas utilizando las dianas de restricción NdeI y NotI, por tanto todas las demás dianas entre ellas dos fueron eliminadas. Por este motivo, hemos añadido las dianas BamHI y EcoRI a los insertos de interés mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando los *primers* pT7CFE1-CHis\_EcoRI\_LO y FABP7/GFPR120/GFP\_CDS\_cloning\_BamHI\_UP que aparecen en la tabla 1.

Para obtener un gran número de copias de los insertos con las dianas de BamHI y EcoRI en los extremos 5' y 3', respectivamente, hemos empleado una reacción de PCR de alta fidelidad. Esta reacción utiliza una polimerasa con baja tasa de error y con alta precisión en la replicación del DNA de interés, de modo que se obtiene un producto de PCR con un mínimo número de errores, mutaciones inducidas. Una vez terminada dicha PCR, los insertos de interés estarán presentes en gran número y presentarán las dianas de restricción BamHI y EcoRI en sus extremos.

Posteriormente a la PCR, se llevó a cabo la digestión con las enzimas BamHI y EcoRI tanto del vector de destino como de los productos de PCR de tGFP, FABP7 y GPR120. Así se obtienen extremos cohesivos presentes en el vector de destino y en los insertos de interés que, posteriormente, se pueden ligar, obteniendo así al vector de destino con los insertos de interés introducidos.

### 3.3 Procedimiento

#### 3.3.1 PCR de alta fidelidad

Mezclamos 1 µg del plásmido de origen conteniendo el inserto de interés junto con los componentes de la reacción para la PCR: *Exact PCR Buffer 1x*, 300 mM dNTPs, 1 µM *Primers*, *Exact Polymerase 0.05 u/µl*, 3.5 mM MgSO<sub>4</sub>.

**Tabla 2. Programa de amplificación llevado a cabo en la PCR de alta fidelidad**

Protocolo PCR	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Temperatura	95°C	94°C	58°C	72°C	Repetición 40	4°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	1 minuto	1 minuto	veces los pasos 2, 3 y 4	∞

#### 3.3.2 Digestión

A. La digestión para los productos de la PCR consistió en 500 ng de producto de PCR, tampón de digestión E (*Buffer E*, Promega™): BamHI tiene 100% de actividad y EcoRI entre 75-100% de

actividad), 10U de las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (mezcla de reacción detallada en sección 3.1). Para la digestión de pcDNA3.0 la concentración de pcDNA3.0 fue de 1µg, además se añadió 10U de fosfatasa alcalina (TSAP) para evitar la recircularización y religación del vector de clonación linealizado. Éste proceso cataliza la eliminación de los grupos fosfato de 5' del DNA.

- B. La incubación para la digestión fue de 2 horas a 37°C.
- C. Por último, la inactivación de los enzimas se realizó a 74°C durante 15 minutos.

### 3.3.3 Purificación de pcDNA 3.0

- A. Realizamos electroforesis en gel de agarosa al 1% a 135V durante 30 minutos. Para ello se cargaron la totalidad de la reacción de digestión de pcDNA 3.0 con 5 µl de tampón de carga 6X en gel de agarosa al 1%.
- B. Una vez terminada la electroforesis, el gel de agarosa se irradia con luz ultravioleta para identificar una banda de 220 pb que corresponde al plásmido pcDNA 3.0 linealizado. Se secciona el gel para tomar sólo la parte donde se encuentra la banda y pasamos a purificar el DNA de la agarosa haciendo uso del *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific™).
- C. Se disolvió el gel solubilizándolo con 803 µl de *Gel Solubilization Buffer* (Thermo Scientific), se incubó a 50°C durante 10 minutos y añadimos 268 µl de isopropanol para precipitar el DNA.
- D. El DNA plasmídico se purificó sobre una columna de sílica empleando centrifuga. Para ello, se pipeteó el volumen de gel disuelto que contiene el fragmento de DNA sobre la columna (*Quick Gel Extraction Columm*, Invitrogen™), y la columna se situó dentro de un tubo de lavado. Se centrifugó a 12500 g 1 minuto para que este volumen pase a través de la columna. A continuación añadimos 500 µl de tampón de lavado, que contenía 70% etanol (v/v), y se centrifuga. Se descarta el tampón de lavado eluido y se añadieron 30 µl de agua libre de nucleasas en el centro de la columna e incubamos 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 12400g 1,5 minutos. Finalmente, el volumen recuperado que contiene el DNA plasmídico purificado se guardó.
- E. En NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer leímos la concentración de pcDNA 3.0.

### 3.3.4 Ligación

- A. El proceso de ligación consistió en añadir en un tubo 50 ng de pcDNA3.0 linealizado, 150 ng del producto de PCR digerido (relación 3:1 exceso molar sobre vector), 5 U µl de DNA Ligasa T4 en tampón de ligación en un volumen final de 20 µl.
- B. Se agitaron y centrifugaron los tubos, y finalmente se incubaron a temperatura ambiente 30 minutos.

## 4. **Transformación bacteriana**

### 4.1 **Materiales**

- Placas Agar-LB-Ampicilina (100 µg/ml)
- *E. Coli* XL-1 Blue competentes
- Producto de ligación (*apartado 3*)

### 4.2 **Fundamento metodológico**

Para poder amplificar el vector de expresión es necesario introducirlo en bacterias mediante transformación. Este método consiste en introducir DNA exógeno en células, de manera que las bacterias son utilizadas para la replicación de este DNA. En nuestro caso, se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli* XL1-Blue, que es fácilmente transformable, y como pcDNA3.0 confiere resistencia a la ampicilina solamente crecerán las bacterias que incorporen el plásmido.

Las células competentes se crearon mediante tratamiento con cloruro de calcio para aumentar la permeabilidad de las membranas. La transformación se realizó mediante choque térmico. Una vez realizado, las bacterias transformadas se cultivaron en placas de LB-Ampicilina para obtener crecimiento de colonias aisladas.

### 4.3 Procedimiento

- A. Se descongelaron las bacterias *E. Coli* XL-1 Blue competentes y se añadió 5 µl del producto de ligación, manteniéndolas en hielo 20 minutos.
- B. A continuación se pusieron durante 1.5 minutos a 42°C en termobloque y se volvieron a dejar 2 minutos más en hielo.
- C. Se añadió 200 µl de LB (sin Ampicilina) e incubamos a 37°C durante 1 hora.
- D. Por último, se sembró la mezcla en placas LB-Ampicilina (100 µg/ml) y se dejó incubando a 37°C toda la noche.

## 5. Genotipación de colonias de *E.coli* – PCR de colonias

### 5.1 Materiales

- Mix PCR: tampón PCR que contiene 2 mM de Mg<sup>2+</sup>, 2.5 mM de cada dNTPs (10 mM total), 0.4 µM *primers*, Taq polimerasa 1 U/µl
- Termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf)
- Para electroforesis horizontal (Bio-Rad®):
  - Geles agarosa 1% en TBE (Tris-Base 1% (p/v), Ácido bórico 0.5% (p/v), 0.5 mM EDTA) y 0.005% (v/v) bromuro de etidio (EtBr)), marcador de DNA de rango amplio (Sigma-Aldrich®) y tampón de carga DNA 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), 30% glicerol (v/v))

### 5.2 Fundamento metodológico

Se realizó una genotipación de las colonias de *E. coli* previamente transformadas con el producto de la ligación (apartado 4). Es posible comprobar si las bacterias crecidas en LB-Ampicilina contienen el plásmido de interés realizando una amplificación de los insertos de cDNA de interés mediante PCR.

La muestra para este tipo de PCR se obtiene al tomar una muestra de cada colonia(s) de interés de la placa de LB-Ampicilina.

Para realizar dicha PCR se utilizó una pareja de *primers* (pcDNA3.0\_polylinker UP y LO; ver tabla 1) que hibridan en las regiones de pcDNA 3.0 que flanquean la secuencia polylinker (Multicloning Site), de modo que el producto de PCR generado dependerá directamente del tamaño del cDNA insertado en pcDNA 3.0. En consecuencia, para cada inserto de interés, tGFP, FABP7 y GPR120, se obtiene un amplicón de tamaño conocido. Además, para GPR120 se utilizó una pareja adicional de *primers* (GPR120\_sequence UP y LO) que hibridan específicamente en su secuencia codificante.

Finalmente, para comprobar que nuestros insertos se encuentran en las colonias, se realizaron electroforesis de las colonias seleccionadas y testadas para la PCR.

### 5.3 Procedimiento

- A. Picamos con una punta de pipeta las colonias bacterianas, y estas muestras se dispersaran en 50 µl de agua estéril mediante agitación en vortex y se hierven a 95°C durante 10 minutos para provocar una lisis de las colonias.
- B. Añadimos 1µl de cada muestra a la mezcla de reacción de la PCR; un tubo por muestra.

**Tabla 3. Componentes de la reacción de la PCR**

Componentes PCR	Tampón PCR 1X	10 mM dNTPs	Primers (10 $\mu$ M)	1 U/ $\mu$ l Taq pol	H <sub>2</sub> O PCR	V <sub>Total</sub> : 24 $\mu$ l
Volumen ( $\mu$ l) reacción	2.5 $\mu$ l	0.63 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	17.87 $\mu$ l	

C. Por último, se realizó la PCR para la amplificación del DNA.

**Tabla 4. Programa de amplificación de la PCR para la genotipación bacteriana de *E. coli***

Protocolo PCR	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7
Temperatura	95°C	95°C	63°C	72°C	Repetición 30 veces los pasos 2, 3 y 4	72°C	4°C
Tiempo	5 minutos	30 segundos	1 minuto	2 minutos		5 minutos	$\infty$

## 6. Amplificación y purificación del DNA plasmídico

### 6.1 Materiales

- Medio LB-Ampicilina (100  $\mu$ g/ml)
- Muestras colinas cultivada en LB-Ampicilina
- *PureLink<sup>®</sup> HiPure Plasmid Filter DNA Purification Kits* (Invitrogen<sup>™</sup>)

### 6.2 Fundamento metodológico

Se realizó el aislamiento y la purificación del DNA plasmídico haciendo uso del kit *PureLink<sup>®</sup> HiPure*. Este kit de filtración permite clarificar el lisado bacteriano combinándolo con una resina de intercambio aniónico al que se le une el DNA. En dicho kit se permite realizar una clarificación rápida sin necesidad de centrifugar. En la columna de filtración proporcionada por el kit, el DNA queda retenido, mientras que proteínas y otras moléculas son eliminadas.

### 6.3 Procedimiento

- Se llevó a cabo una producción en masa de la colonia bacteriana de interés, picando previamente con una punta de pipeta estéril la colonia y depositándola en un matraz con 200 ml de LB-Ampicilina (100  $\mu$ g/ml). A dicho matraz lo dejamos agitando toda la noche a 37°C.
- Se centrifugó el cultivo bacteriano en LB-Ampicilina durante 10 minutos a 4000g. Se descartó sobrenadante.
- Siguiendo las instrucciones del kit (Invitrogen<sup>™</sup>), el *pellet* se resuspendió en tampón de resuspensión, el cual contenía RNase A para degradar el RNA, y se añadió el tampón de lisis. Mezclamos invirtiendo el tubo hasta que la mezcla era homogénea. A continuación se añadió el buffer de precipitación, invertimos el tubo hasta que fue homogéneo y se transfirió el precipitado a la columna dejando que drenase por gravedad. Una vez drenada la columna se lavó con el tampón de lavado (Invitrogen<sup>™</sup>). Se descartó el eluido y se añadió el tampón de elución a la columna.
- A continuación, para precipitar el DNA se añadió isopropanol a la elución y se centrifugó a 12500g durante 45 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y añadimos etanol al 70% sobre el pellet, y centrifugamos de nuevo, descartando el sobrenadante y permitiendo que se seque al aire. Finalmente, el precipitado de DNA purificado se resuspendió en agua ultrapura estéril.

Para comprobar que el vector de expresión purificado contiene la secuencia de interés correcta (pcDNA3.0+GFP/FABP7/GPR120), se envió a secuenciar al servicio de Secuenciación de DNA de Sistemas Genómicos de Valencia.

## 7. Transfección génica

### 7.1 Materiales

- Células **HEK293** (*Human Embryonic Kidney 293 cells*): en medio base de cultivo DMEN (Sigma-Aldrich®) suplementado con 10% *HyClone™ Fetal Bovine Serum* (FBS) y L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich®)
- Células **SF295** (*Human Glioblastoma Cells*), **A549** (*Adenocarcinomic Human Alveolar Basal Epithelial cells*) y **CHO** (*Chinese Hamster Ovary*): en medio de cultivo RPMI (Sigma-Aldrich®) suplementado con 10% *HyClone™ Fetal Bovine Serum* (FBS)
- Células **SH-SY5Y** (*Human Neuroblastoma Cells*): en medio de cultivo DMEN y HAM'S-F12 (Sigma-Aldrich®) suplementado con 10% *HyClone™ Fetal Bovine Serum* (FBS), L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich®) y aminoácidos no esenciales (1X; Sigma-Aldrich®)
- Células **Sf-9** (*Insect Cells Line de Spodoptera frugiperda*): en medio de *Grace's Insect Medium* (Gibco™) suplementado con 10% *HyClone™ Fetal Bovine Serum* (FBS)
- *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen™)
- *Cellfectin® II Reagent* (Thermo Scientific™)
- Medio Opti-MEM® 1X (Thermo Scientific™)
- Placas (10 cm) y Multiplacas (6 pocillos de 3 cm) Nunc™ para cultivo celular (Thermo Scientific™)
- Incubadora (Thermo Scientific™)
- Cámara de recuento celular *Bürker* (Marienfeld®).

### 7.2 Fundamento metodológico

La transfección genética permite el estudio de genes y proteínas producto de éstos en células. Dichas células se encuentran en un medio de cultivo que les proporciona vitaminas, aminoácidos y otros componentes. Además éstos medios se encuentran suplementados con suero fetal bovino que proporciona a las células hormonas y enzimas proteicas, metabolitos, nutrientes...

Para realizar la transfección se utilizaron los reactivos de transfección *Lipofectamine®* (Invitrogen™), en líneas celulares de mamíferos, y *Cellfectin® II Reagent* (Thermo Scientific™), específico para líneas celulares de insecto Sf9 y Sf21; ambos son reactivos de transfección de alto rendimiento con un formulación de lípidos-catiónicos, actuando a nivel de membrana. En dicho proceso de transfección se utilizó medio Opti-MEM® (Gibco™), un medio con una baja concentración de suero para favorecer la transfección.

### 7.3 Procedimiento

- A. En un tubo *ependorf* se mezcló medio Opti-MEM® y lipofectamina (o Cellfectin si es para Sf9) y en otro tubo medio Opti-MEM® con el DNA plasmídico (pcDNA3.0+FABP7/GFP/GPR120). Se incubaron los tubos a temperatura ambiente 5 minutos. A continuación, se juntó el contenido de los 2 tubos e incubaron 20 minutos a temperatura ambiente.
- B. Acabada la incubación, en las placas de cultivo celular, se retiró la parte proporcional del contenido y se añadió el complejo DNA-Lipofectamina en Opti-MEM.
- C. Dichas placas se dejaron incubando a 37°C.

A pesar de que los medios de cultivo están suplementados con penicilina-estreptomina para prevenir posibles contaminaciones, las placas han de ser controladas cada 24 horas para ver que no haya ninguna contaminación y el cultivo se encuentre en buen estado.

## 8. Extracción y cuantificación de proteínas

### 8.1 Materiales

- Células transfectadas (*apartado 7*)
- Detergente CHAPS y SDS (Thermo Scientific™)
- Inhibidor de Proteasas (Roche®)
- Sonicador (Braun Labsonic® T)
- *Bio-Rad® Protein Assay Kit*
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich®)
- Placas 96 pocillos *Pierce™* (Thermo Scientific™)

### 8.2 Fundamento metodológico

Para poder cuantificar las proteínas expresadas por el vector de expresión en las células transfectadas, primero se tuvieron que extraer de dichas células. Para ello se utilizaron detergentes: CHAPS (*3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate*) y SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Estos detergentes, gracias a sus propiedades anfipáticas, liberan las proteínas mediante lisis celular y solubilizan los lípidos y proteínas de membrana. Los detergentes actúan formando micelas, un agregado coloidal de monómeros de detergente con extremos no polares en el interior y los polares en el exterior en contacto con el agua. Ambos detergentes utilizados presentan una alta Concentración Micelar Crítica (CMC), es decir, un alto número de monómeros de detergente por micela y alta formación de micelas a baja concentración de detergente.

El método de Lowry es una técnica colorimétrica que emplea dos reactivos: el Reactivo A que contiene iones de cobre, los cuales, además de reaccionar con las proteínas dando lugar a complejos de color azul claro, hacen que los aminoácidos de tirosina y triptófano sean expuestos, y Reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu) que reacciona con los grupos fenoles expuestos en la cadena lateral de los aminoácidos de tirosina y triptófano, haciendo que el reactivo de Folin sea reducido y produciendo un color azul oscuro que se podrá medir mediante un análisis colorimétrico a 750 nm.

En dicha cuantificación se usó una recta patrón de muestra conocida, albúmina sérica bovina (BSA) (0.2 mg/ml a 1.2 mg/ml). A partir de la recta obtenida con el patrón es posible determinar la concentración proteica de las muestras de interés, por interpolación de la densidad óptica entre nuestras muestras y el patrón.

### 8.3 Procedimiento

- A. Se solubilizaron las muestras con tampón de lisis conteniendo CHAPS 1% (p/v) en TBS (Tris-Buffer salino, pH 7.6) con inhibidores de proteasas (Roche) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugaron a 20000 g 30 min a 4°C para precipitar la fracción proteica resistente a la solubilización por CHAPS. El precipitado se resuspendió en SDS 2% y esta última muestra fue sometida a ultrasonidos (1000W, 3 pulsos de 10 segundos).
- B. Haciendo uso del kit *Bio-Rad® Protein Assay Kit*, en la placa de lectura se preparó la recta patrón de BSA y se depositaron los 10 µl muestras diluyéndolas 1/2 y 1/5. Se aplicaron 20 µl del Reactivo A y 200 µl del reactivo B. Se dejó incubar 15 minutos la placa y se leyó a 750 nm en el espectrofotómetro.

## 9. Electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS

### 9.1 Materiales

- *Running gel* 14% (9.5% Acrilamida - 0.25% (bis)acrilamida (p/v), 0.1% SDS, 0.06% persulfato amónico (p/v), 0.12% TEMED (p/v), Tris-HCl 150 mM pH 8.8)
- *Stacking gel* 4% (4% Acrilamida - 0.1% (bis)acrilamida (p/v), 0.1% SDS, 0.06% persulfato amónico (p/v), 0.12% TEMED (p/v), Tris-HCl 150 mM pH 6.8)
- Tampón electroforesis (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM glicina, 0.1% SDS)

### 9.2 Fundamento metodológico

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) es una técnica utilizada comúnmente para separar proteínas de una muestra en función del tamaño. El SDS, al ser un detergente aniónico aporta carga negativa neta a las proteínas, se une a ellas y las desnatura. Gracias a esta carga, las proteínas migran en un campo eléctrico a través del gel de acrilamida, separándose exclusivamente en función del tamaño.

### 9.3 Procedimiento

- A. Los cristales, que sirven como molde para la construcción del gel, se limpiaron con etanol 70% y se colocaron en el equipo de montaje Mini-protean 3 (Bio-Rad®). Los reactivos necesarios para el gel se mezclaron y añadieron a la apertura que dejan los cristales molde para la formación del gel. Acto seguido, también se añadieron unas gotas de isopropanol para quitar las burbujas en la superficie y se dejó polimerizar.
- B. Polimerizado el *running gel* y limpiado el isopropanol con agua, se preparó el *stacking gel* y se vertió sobre el gel de corrido. Se colocó el peine para formar los pocillos y se dejó polimerizar.
- C. Previamente a la carga de las muestras se quitó el peine y se enjuagaron los pocillos con agua. Los geles se colocaron en el sistema de electroforesis Mini-Protean 3 (Bio-Rad®), se introdujeron en la cubeta de electroforesis y se llenó con el tampón de electroforesis. La carga de proteína por muestra fue de 5 µg. La electroforesis se desarrolló con amperaje constante, a 20 mA por gel durante 60 minutos aproximadamente.

## 10. Western blotting

### 10.1 Materiales

- *Cassettes* para transferencia (Mini-Protean 3, Bio-Rad®)
- Tampón de transferencia (200 mM Glicina, 20% metanol (v/v), 25 mM Tris-HCl (pH 8.8))
- Membrana nitrocelulosa (GE Healthcare Life Sciences)
- Solución de bloqueo (5% leche desnatada en polvo (p/v) en T-TBS (0.1% Tween 20 (p/v), 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl)
- Anticuerpos primarios: *His-probe Antibody (H-3)* (monoclonal producido en ratón) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 1/100 en 2.5% leche desnatada (p/v) en T-TBS y Anti-Alpha-Tubuline (monoclonal producido en ratón), 1:10000 en T-TBS; Sigma-Aldrich®)
- Anticuerpo secundario *IRDye® 800 Secondary Antibody anti-mouse* (1:5000 en T-TBS)
- Odyssey® Imaging System (Licor)

### 10.2 Fundamento metodológico

El concepto “*blotting*” consiste en la transferencia de macromoléculas a una membrana a partir de un gel, y su detección en la superficie de ésta. Por tanto, terminada la electroforesis las proteínas separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, se bloqueó la membrana para impedir

uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana y se añadió el anticuerpo primario específico para poder detectar las proteínas de interés. Acabada la incubación, se añade el anticuerpo secundario, marcado con un fluoróforo, que actúa uniéndose al primario y permitiendo su detección.

### **10.3 Procedimiento**

- A. Terminada la electroforesis (SDS-PAGE, ver apartado 9), se realizó la técnica de transferencia en Sándwich (Bio-Rad®) para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron de 350 mA constantes durante 90 minutos y en hielo.
- B. Acabada la transferencia, las membranas se incubaron con la solución de bloqueo a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora.
- C. A continuación las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C y en agitación.
- D. Previo a la incubación con el anticuerpo secundario se hicieron 3 lavados de 5 minutos con T-TBS con el fin de eliminar el anticuerpo sin unir y disminuir el ruido de fondo. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
- E. Finalmente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos, 3 con T-TBS y un último con TBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Las membranas se escanearon en el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Licor) en el canal de 700 nm (para los marcadores de peso molecular) y 800 nm (señal procedente del anticuerpo secundario).

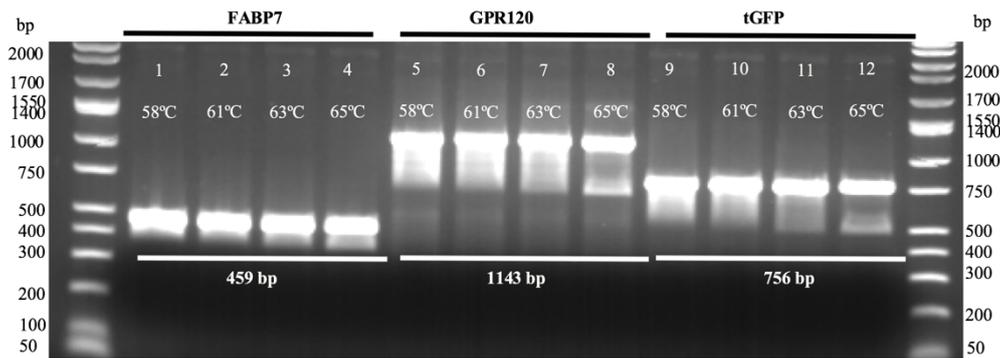
## RESULTADOS

### 1. Construcción de vectores de expresión en células de mamífero para FABP7, GPR120 y tGFP

Existen varias familias de proteínas que presentan afinidad para unirse a ácidos grasos. De hecho, esta unión puede modular la actividad de la proteína receptora en cuestión, lo que en definitiva implica que los ácidos grasos de las membranas celulares no son meros elementos estructurales sino que presentan un papel fisiológico a nivel celular. De entre todas las familias que pueden comportarse como receptores para ácidos grasos, en este trabajo nos hemos centrado en las denominadas “proteínas de unión a ácidos grasos” (*fatty acid binding proteins* o FABPs) y en los receptores acoplados a proteínas G (*G-protein coupled receptors* o GPRs). Por un lado, hemos trabajado con FABP7 y GPR120, porque ambos candidatos se expresan abundantemente en cerebro de mamíferos y ambos son receptores para ácidos grasos de cadena larga como DHA<sup>44,45</sup>. Por otro lado, también hemos trabajado con tGFP (*turbo Green Flourescent Protein*) que es una proteína de la medusa *Aequorea victoria*. GFP no es realmente un candidato a unirse a OHDHA, pero es un control útil a la hora de sobre-expresar estas proteínas en cultivos celulares porque esta proteína puede excitarse y emitir luz verde, lo que nos permite comprobar la eficiencia de la transfección *in situ* en el mismo cultivo.

Para poder reconocer las proteínas de interés una vez sean expresadas, todas estas proteínas presentan una cola de seis histidinas (His) en el extremo C-terminal (epítipo antigénico reconocido por un anticuerpo específico). Para obtener las proteínas de interés expresadas con una cola de His en el extremo C-terminal, se eliminó el codón STOP en el extremo 3' del cDNA de origen y se añadieron seis codones CAC (codón que se traduce en His) seguidos de un codón de terminación TAA. El procedimiento seguido para obtener el cDNA de FABP7, GPR120 y tGFP junto con la secuencia de nucleótidos que codifica la cola de His en C-terminal no se ha desarrollado en el presente trabajo, pero las construcciones que portan las secuencias de estos genes con la cola de His sí suponen el punto de partida del mismo (construcciones en pT7CFE-1-CHis, ver Materiales y métodos, apartado 3). Esto permitirá más adelante, haciendo uso de un anticuerpo específico, reconocer a las proteínas mediante el epítipo antigénico de 6xHis.

En primer lugar, se realizó una PCR de alta fidelidad para obtener un gran número de copias del cDNA de FABP7, GPR120 y tGFP con una baja tasa de mutaciones. El cDNA de estos genes se ha amplificado empleando parejas de cebadores que delimitan exclusivamente la secuencia codificante del gen junto con la secuencia que da lugar a la cola de 6xHis, obviando las regiones reguladoras 5' o 3'-UTR (*untranslated regions*) del mRNA de estos genes (ver Materiales y métodos, apartado 3). De modo que, una vez subclonados en el vector de destino, la expresión de estos cDNAs sólo dependerá del promotor de expresión presente en dicho vector. Por otro lado, la parejas de cebadores empleadas presentan en su extremo 5' la secuencia de nucleótidos correspondiente a las dianas de restricción de BamHI y EcoRI, lo que nos ha permitido digerir el producto de PCR dejando extremos cohesivos que permiten la subclonación desde el vector de origen al vector de destino (pCDNA 3.0). Además, dicha PCR se realizó a diferentes temperaturas de alineamiento (*annealing temperatures*) (58, 61, 63, 65 °C) con la finalidad de comprobar cuál de estas condiciones favorece más la formación del producto de PCR de interés. A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el tamaño del amplicón obtenido se corresponde con lo esperado y también para comprobar qué condición ha favorecido la formación del producto. Nuestros resultados, además de mostrar el tamaño del amplicón esperado, mostraron que la temperatura de *annealing* a 63°C es la que proporciona mejores resultados, es decir, un menor grado de inespecificidad detectado (ver figura 6).



**Figura 6. Electroforesis de los productos de la PCR de alta fidelidad para FABP7, GPR120 y tGFP.** Los tamaños de los productos de PCR son los esperados. La hibridación a 63°C, carriles 3, 7 y 11, es la que presenta un menor grado de inespecificidad.

Posteriormente, las secuencias de interés amplificadas por PCR se subclonaron al vector de destino pCDNA 3.0. Este plásmido se caracteriza principalmente por presentar el promotor de citomegalovirus (CMV), lo que permite la expresión del inserto de interés en líneas celulares de mamíferos. Para llevar a cabo este proceso, tanto el vector pCDNA 3.0, como los productos de PCR de FABP7, GPR120 y tGFP se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Además, el plásmido pCDNA 3.0 digerido también se trató con fosfatasa alcalina con la finalidad de desfosforilar los extremos digeridos y así disminuir el grado de recircularización (auto-ligación) del vector recién digerido (ver Materiales y métodos, apartado 3). Por otro lado, no se debe asumir que la reacción de digestión sea 100% eficiente, lo que significa que siempre queda una fracción de plásmido no digerido. Para eliminar esta fracción, la digestión de pCDNA 3.0 se sembró en gel de agarosa y se sometió a electroforesis, lo que nos permitió diferenciar el DNA circular del DNA lineal, ya que aunque ambos presenten un tamaño similar, la movilidad electroforética es muy diferente. Entonces, la banda correspondiente al plásmido lineal (en torno a 5000 pbs) se visualizó mediante radiación con luz UV de baja intensidad y el fragmento de gel que contiene dicha banda fue seccionado minuciosamente. El DNA presente en esta banda (pCDNA 3.0 lineal con extremos cohesivos) fue purificado sobre una columna de sílica, eluido en agua libre de nucleasas y empleado en la reacción de ligación (ver Materiales y métodos, apartado 3).

Los productos de PCR de FABP7 y tGFP digeridos se ligaron directamente con el plásmido pCDNA 3.0 (digerido y purificado) y el producto de esta ligación se transformó en bacterias competentes (*E. Coli* XL1blue) (ver Materiales y métodos, apartado 4). Este procedimiento es el más sencillo porque se hace sin purificación de los productos de PCR digeridos antes de la ligación. Aun así, este procedimiento resultó ser eficiente, pues como se muestra en la figura 8A, las construcciones incorporan el inserto de tGFP o FABP7 con relativa facilidad (presente en la mayoría de las colonias testadas). Por el contrario, el producto de PCR correspondiente a GPR120 no se pudo ligar con pCDNA 3.0 siguiendo este simple procedimiento. En este caso, el producto de PCR ya digerido se sembró en gel de agarosa y se sometió a electroforesis con la finalidad de seccionar la banda de ADN correspondiente a GPR120 (GPR120 con extremos cohesivos) y purificarlo sobre una columna de sílica como ya se ha descrito previamente para pCDNA 3.0. Este ADN purificado se ligó con éxito en pCDNA 3.0 para obtener la construcción de interés (ver figura 8B).

Las bacterias transformadas con los productos de ligación anteriormente mencionados se sembraron en placas de Petri conteniendo LB y ampicilina. Puesto que el plasmido pCDNA 3.0 porta la secuencia codificante de la enzima Beta-lactamasa, la incorporación de este plásmido en las bacterias se traduce en resistencia a antibióticos beta-lactámicos como las penicilinas (p.ej. ampicilina). En consecuencia, en estas placas solo pueden crecer bacterias competentes que hayan incorporado pCDNA 3.0 durante el proceso de transformación. Para comprobar si las colonias que han crecido portan la construcción con el inserto de interés, se llevó a cabo una PCR de colonias (ver Materiales y métodos, apartado 5). Esta

técnica tiene como objetivo amplificar mediante PCR los insertos de interés (FABP7, GPR120 y tGFP) incorporados en pCDNA 3.0, y de ese modo, identificar qué colonias contienen la construcción de interés. En este sentido, nuestra estrategia se ha centrado en diseñar una pareja de cebadores

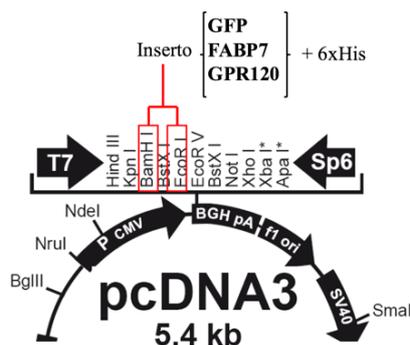


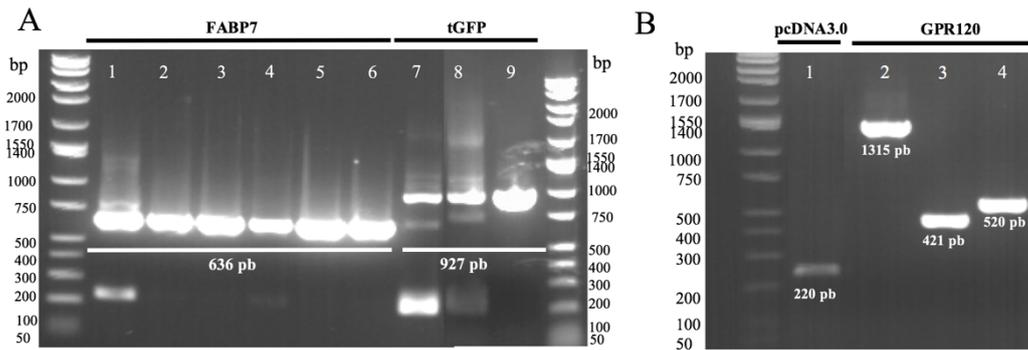
Figura 7. Diagrama de la región MCS (MultiCloning Site o polylinker) de pCDNA 3.0. Los primers pcDNA3.0 polylinker UP y LO hibridan entre T7 (5') y Sp6 (3') respectivamente. En cambio, los primers de GPR120 Sequence UP y LO hibridan en el extremo 5' y 3' de la secuencia de GPR120. Imagen obtenida en Thermo Scientific™.

que hibriden en el plásmido, flanqueando la región denominada MCS (MultiCloning Site o polylinker) con los cebadores pcDNA3.0-Polylinker UP y LO (ver figura 7). Puesto que las dianas de restricción BamHI y EcoRI se encuentran dentro de la región MCS, los insertos de interés ligados con pCDNA 3.0 han debido subclonarse, a priori, dentro de esta región. En consecuencia, el producto de PCR obtenido con estos cebadores deberá variar conforme al tamaño del inserto subclonado, siendo así el más pequeño, el producto obtenido del plásmido sin inserto (religado o recircularizado; 220 pbs; ver figura 8B carril 1)) y el más grande aquel procedente de la construcción con el inserto de GPR120 (1315 pbs; ver figura 8B carril 2)). Por último, cabe destacar que en el caso de las bacterias transformadas con la construcción pCDNA3.0+GPR120, también se utilizó una pareja de cebadores adicionales que hibrida específicamente dentro de la secuencia codificante de GPR120 (ver tabla 6).

Tabla 6. Primers PCR colonias y amplicones esperados

Primers	Tamaño amplicón esperado
FABP7: pcDNA 3.0_Polilynker_UP + pcDNA 3.0_Polilynker_LO	636 pb
tGFP: pcDNA 3.0_Polilynker_UP + pcDNA 3.0_Polilynker_LO	927 pb
GPR120: pcDNA 3.0_Polilynker_UP + pcDNA 3.0_Polilynker_LO	1315 pb
GPR120: pcDNA 3.0_Polilynker_UP + GPR120_Sequence_LO	421 pb
GPR120: GPR120_Sequence_UP + pcDNA 3.0_Polilynker_LO	520 pb

En la figura 8 se observan los resultados de la genotipación de las colonias crecidas en LB-ampicilina, obtenidos mediante PCR. En la figura 8A se muestra los resultados obtenidos a partir de colonias que fueron transformadas con las construcciones que portan los insertos de FABP7 (636 pb) y tGFP (927 pb). Puesto que ambos insertos son de un tamaño considerablemente menor a GPR120, en ambos casos se han utilizado solamente los cebadores que flanquean la región MCS, pcDNA3.0-Polylinker UP y LO. Aunque cabe decir, que en algunas colonias testadas aparecían productos inespecíficos, como se puede ver en los carriles 1, 7 y 8, posiblemente correspondientes a dímeros de cebadores. Por otro lado, en la figura 8B se muestran los resultados obtenidos después de testar con la misma técnica las bacterias que se habían transformado con las construcciones que portan los insertos de GPR120 con diferentes combinaciones de cebadores. Como era de esperar, el tamaño del producto de PCR es mayor (1315 pb) utilizando los cebadores que flanquean la región MCS (carril 2). En cambio, cuando se combina uno de los cebadores anteriores con uno de los que hibridan dentro de la secuencia codificante de GPR120, GPR120-Sequence UP o LO, el tamaño del producto de PCR se reduce a 520 o 421 pb, respectivamente (carriles 3 y 4). Estos resultados permiten confirmar la incorporación del inserto en el sentido 5'-3'. Como se observa en la figura 8B, no se aprecia ningún producto inespecífico para las diferentes combinaciones de cebadores empleados.



**Figura 8. Genotipación bacteriana de colonias *E. coli* para pcDNA 3.0 + GPR120, FABP7 y tGFP.** En la figura A se muestran las colonias testadas de los vectores con los insertos de FABP7 (636 pb) y tGFP (927 pb), donde en ambos insertos se han utilizado los *primers* de pcDNA3.0 Polylinker UP + LO. En la figura B en el primer carril la banda de 220 pb representa al vector sin inserto y los carriles 2, 3 y 4 corresponden al vector con el inserto de GPR120 combinando los *primers* utilizados (de izquierda a derecha: pcDNA3.0-Polylinker UP + LO (1315 pb), pcDNA3.0-Poli UP + GPR120-Sequence Lo (421 pb) y GPR120-Sequence UP + pcDNA3.0-Poli LO (520 pb)).

Las colonias seleccionadas, que contenían las construcciones con los insertos de FABP7, GPR120 y tGFP, se amplificaron produciéndolas en masa en medio de LB-ampicilina (ver Materiales y métodos, apartado 6) y posteriormente se purificaron los DNA plasmídicos mediante un kit de clarificación rápido que permite clarificar el lisado bacteriano combinándolo con una resina al que se le une el DNA. El DNA eluido de la columna se precipitó con isopropanol para realizar una limpieza adicional del plásmido antes de transfectar. El DNA así precipitado se centrifugó y se lavó con etanol al 70% antes de volverse a precipitar. El DNA plasmídico purificado se resuspendió con agua ultrapura estéril. Finalmente, para comprobar que el vector de expresión purificado contenía la secuencia de interés correcta junto con la secuencia que codifica la cola de 6xHis en el extremo 3', se envió a secuenciar al servicio de Secuenciación de DNA de Sistemas Genómicos (Valencia). Las secuencias de FABP7, GPR120 y tGFP resultaron ser correctas y estaban incorporadas entre las dianas de restricción BamHI y EcoRI en pCDNA 3.0 según la estrategia previamente establecida.

## 2. Expresión de las proteínas tGFP, FABP7 y GPR120 en cultivos celulares

Las construcciones generadas durante la primera parte del presente trabajo se han empleado para transfectar diferentes líneas celulares (apartado 7, Materiales y métodos). Se realizaron seis ensayos de transfección en diferentes líneas celulares: células embrionarias de riñón humano (HEK293), células ováricas de hámster chino (CHO), células de glioblastoma humano (SF295), células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), células epiteliales humanas de adenocarcinoma alveolar (A549) y células de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Siendo HEK293 y CHO líneas no tumorales y SF295, SH-SY5Y y A549 líneas tumorales. Se emplearon reactivos de transfección de alto rendimiento (Lipofectamina 2000 para células de mamíferos y Cellfectin II para Sf9), en un medio de cultivo con baja concentración de suero (Opti-Mem; Invitrogen), para favorecer la transfección y obtener altos niveles de expresión de las proteínas de interés. Además, cada ensayo de transfección se realizó empleando distintas concentraciones del reactivo de transfección y tiempos de post-transfección (24, 48 y 72 horas) con la finalidad de delimitar las condiciones más adecuadas para la sobre-expresión proteica (figura 9).

Por un lado, todas las líneas celulares mamíferas se transfectaron con las construcciones de pCDNA 3.0 para expresar tGFP-Chis, FABP7-Chis y GRP120-Chis (Chis hace referencia a la cola de 6xHis incorporada al extremo C-terminal de la proteína). Por otro lado, se ha descrito previamente que las construcciones de pCDNA 3.0 también permiten la expresión de la proteína de interés en células Sf9<sup>46,47</sup>. En consecuencia, estas células también se transfectaron con las mismas construcciones. Sin embargo, en este caso, 2 controles adicionales también se incluyeron: una transfección con un vector Bacmido que permite expresar la proteína G- $\alpha$  con 6xHis en el extremo C-terminal (42 kDa), y una transfección con un vector pFastBac que permite expresar la proteína G- $\beta$ 1 (36 kDa) con 6xHis en C-terminal. El

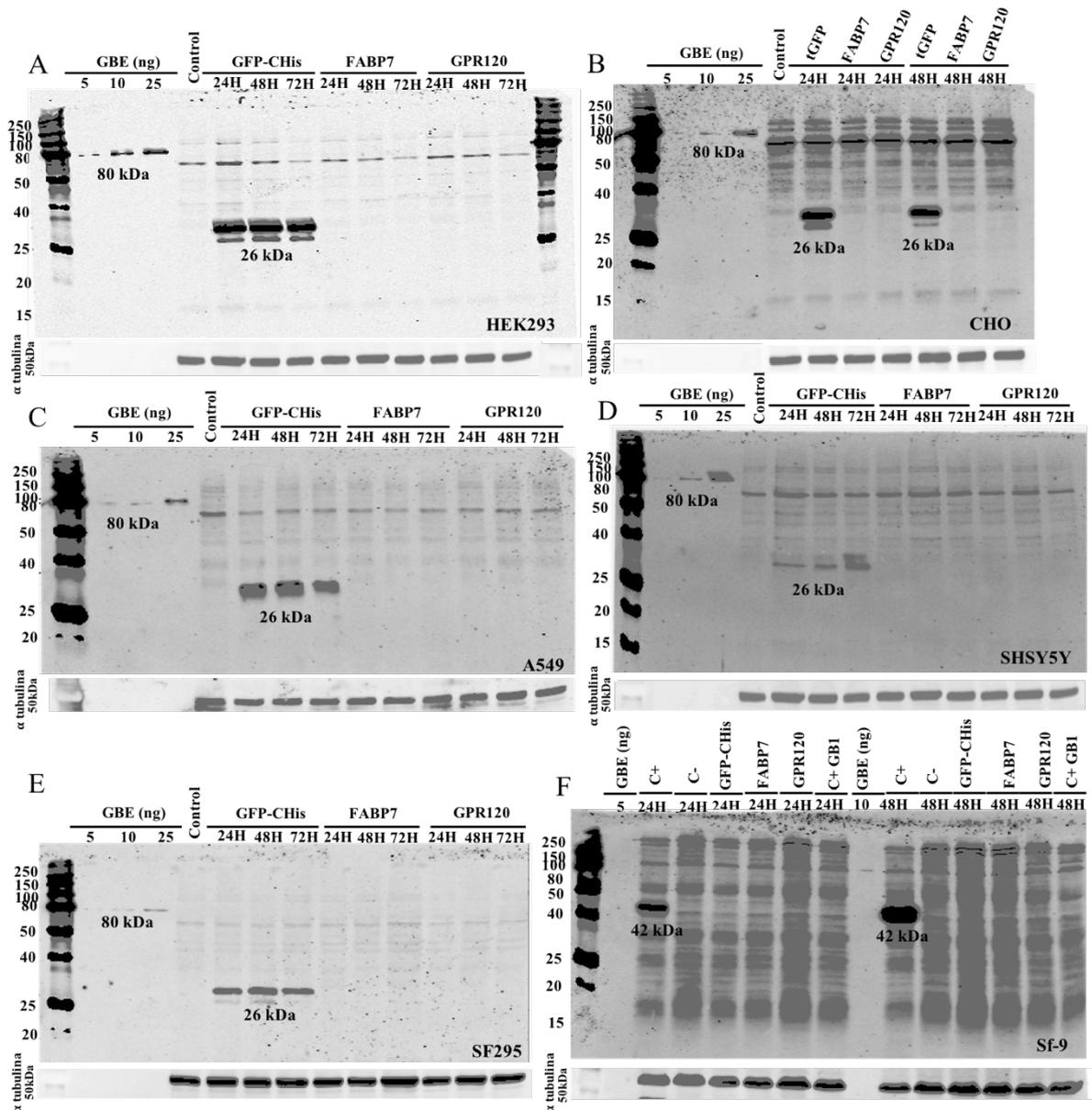
Bacmido (Invitrogen) contiene el conjunto de material genético necesario para que tenga lugar la construcción de un baculovirus dentro de las células Sf9. La subsiguiente infección de las células vecinas por este virus se traduce en la sobreexpresión de la proteína de interés porque el cDNA que codifica dicha proteína se ha insertado previamente en el báculo.

Acabados los tiempos de transfección, se recogieron y lisaron las células para poder extraer las proteínas totales. Los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas en células de mamífero no mostraron diferencias significativas entre los tiempos de transfección, lo que se podría deber a una inhibición en la división o muerte celular inducida como consecuencia de la transfección. En cambio, la concentración proteica total en la línea celular de insecto fue totalmente diferente, la concentración iba en aumento en función del tiempo de post-transfección. Una vez obtenidas las proteínas, se realizaron electrophoresis en geles de poliacrilamida-SDS al 14% para separar las proteínas en función de su tamaño. Acabada la electrophoresis se realizaron los *Western blots* (ver Materiales y métodos, apartado 10) y se incubaron las membranas con el anticuerpo primario anti-His-Probe, que reconoce específicamente las colas de histidinas presentes en el extremo C-terminal de FABP7, GPR120 y tGFP, así como en los controles G $\alpha$  y G $\beta$ -1 transfectadas en Sf9.

En primer lugar, cabe destacarse que además de las muestras procedentes de las células transfectadas también se han cargado sistemáticamente tres concentraciones crecientes de la proteína GBE-Chis (80 kDa) (ver figura 9), que es una proteína purificada de concentración conocida que nos permite, por un lado, mantener un control positivo en estos experimentos y, por otro lado, cuantificar el grado de expresión de la proteína de interés sobre-expresada gracias al reconocimiento de la cola de 6xHis, presente en la proteína expresada y en el patrón GBE-Chis, por el mismo anticuerpo. Como se puede ver en la figura 9A-E sólo obtuvimos expresión de la proteína tGFP (26 kDa) en las diferentes líneas celulares de mamífero utilizadas. Por tanto, a juzgar por los resultados obtenidos en tGFP, la transfección ha sido eficiente. Sin embargo, no hemos detectado expresión de FABP7 ni GPR120. De haber existido expresión de FABP7 y GPR120, debería aparecer una banda de 14 y 46 kDa, respectivamente. Respecto a la línea celular de insecto Sf9 (imagen 9F) tampoco se ha detectado expresión de tGFP, pero sí hubo expresión de la proteína G- $\alpha$  (42KDa) expresada con el bacmido. Cabe decir, que a pesar de haberse detectado la presencia de G- $\alpha$ , la imagen está muy saturada, lo que dificulta visualizar si hay o no alguna otra expresión.

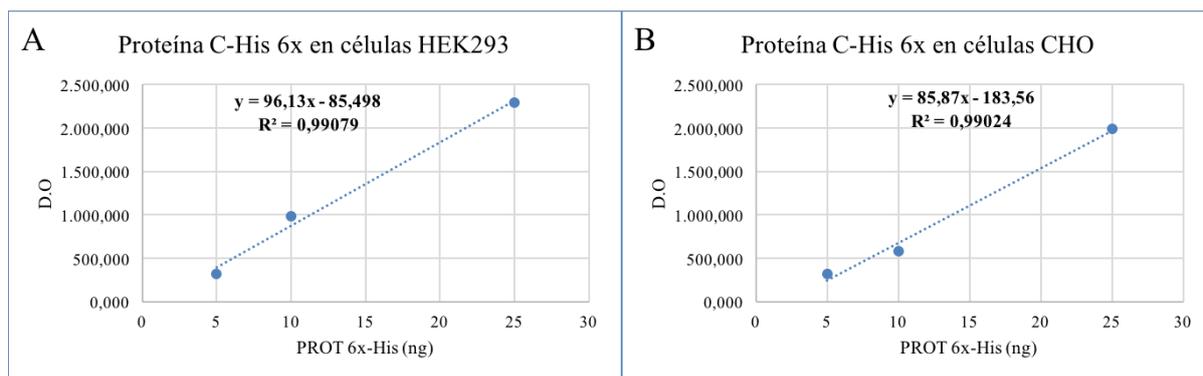
Por otro lado, para demostrar la presencia de proteína celular sembrada a pesar de la ausencia de expresión de las proteínas específicas de interés en nuestros experimentos, las membranas de *western blot*, previamente utilizadas para revelar las proteínas unidas a C-His, se re-incubaron con anticuerpo anti- $\alpha$  tubulina. Esta proteína citosólica se encuentra presente en todas las células debido a que es un componente del citoesqueleto fundamental para mantener la estructura de la célula. Como se puede ver en la figura 9, la presencia de tubulina en todas muestras de células transfectadas y controles, denota la presencia de la muestra de proteínas celulares sembradas, lo que confirma los resultados previamente descritos.

Nuestros resultados demuestran que: a) el vector pCDNA 3.0 es adecuado para inducir sobre-expresión de una proteína en varias líneas celulares de mamífero, b) que la expresión de FABP7 y GPR120 debe estar inhibida a través de algún mecanismo celular y c) que la expresión en Sf9 solo es viable empleando el bacmido mientras que la expresión a través de una construcción de PCDNA 3.0 no es eficiente.



**Figura 9. Expresiones de tGFP, FABP7 y GPR120 en el ensayo de transfección *in vivo*.** Las transfecciones se realizaron en tres tiempos, a 24, 48 y 72 horas. Las figuras A y B pertenecen a dos líneas celulares no tumorales, mientras que D y E pertenecen a células tumorales. Los cuatro primeros carriles corresponden al marcador y al patrón, que es utilizado para cuantificar la cantidad de proteína de interés presente. Como se muestra en las figuras solamente hay expresión de tGFP, el resto de bandas que aparecen corresponden a producto inespecífico. Al ser tGFP utilizado como control positivo podemos decir que el ensayo ha funcionado, pero no explica porqué no ha habido expresión de FABP7 y GPR120. Respecto a la figura E, que corresponde a células de insecto, no ha habido expresión de ninguna de las proteínas de interés, pero sí que ha habido expresión del vector Bácmido que ha sido utilizado como control positivo. Por último, las membranas de los *western blot* también se incubaron con tubulina para comprobar que definitivamente el ensayo sí había funcionado. Como se puede ver en las imágenes la tubulina está presente para todos los carriles correspondientes a las muestras de células.

Por tanto, no hemos podido expresar las proteínas de interés FABP7 y GPR120. Aun así, se realizaron dos regresiones lineales con los datos obtenidos del patrón GBE-Chis de las líneas celulares no tumorales. Como se puede ver en la figura 10, ambas regresiones presentan un buen ajuste de la línea de tendencia en relación con los datos obtenidos. Haciendo uso de la ecuación de la recta obtenida, se cuantificó la expresión de tGFP. El nivel de expresión de tGFP respecto a la proteína total que se han obtenido son de 20.09 ng tGFP/ $\mu$ g proteína total para HEK293 y 17.14 ng tGFP/ $\mu$ g proteína total para CHO. En consecuencia, estos datos sugieren que la expresión de la proteína es muy similar en ambas líneas HEK293 y CHO.



**Figura 10. Regresiones lineales del patrón de proteína C-His 6x en las líneas celulares no tumorales HEK293 y CHO.** Las regresiones lineales se calcularon a partir de las concentraciones crecientes de proteína conocida C-His 6x tras revelar las membranas con el anticuerpo.

## DISCUSIÓN

Todavía no está claro cómo los PUFAs ejercen sus funciones celulares y, en consecuencia, qué cascadas de señalización en el cerebro están alteradas debido a su deficiencia en la EA o durante el proceso de envejecimiento normal<sup>48</sup>. Por un lado, la deficiencia de DHA puede inducir alteraciones en la composición lipídica que, a su vez, pueden provocar modificaciones en la estructura de las membranas de las neuronas, como alteraciones en la viscosidad, rigidez, espesor y otros parámetros que a su vez podrían alterar la actividad de las secretasas y la producción de beta-amiloide. Por otro lado, junto con la deficiencia en DHA, en la EA también se ha descrito una alteración en la síntesis de segundos mensajeros hidroxilados como protectinas y resolvinas (ver también introducción, apartado 5)<sup>35</sup>. Se cree que estos derivados de PUFAs ejercen su función biológica mediante mecanismos que van más allá de la regulación en la composición y estructura de las membranas lipídicas. Diversos estudios han demostrado que los receptores de PUFAs  $\omega$ -3 median las propiedades neuroprotectoras de estos ácidos grasos y representan un papel importante en el tratamiento de la EA<sup>49,50</sup>. De hecho, DHA no esterificados, resolvinas y protectinas pueden unirse a diferentes receptores de ácidos grasos como al Receptor X Retinoide (RXR), a receptores acoplados a proteína G (GPCRs), a receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) y a proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs). Aunque la cascada de señalización exacta mediada por muchas de estas proteínas todavía no se ha identificado, se ha propuesto que el mecanismo de acción de DHA o hidroxi-derivados de DHA como NPD1 (Neuroprotectina D1) podría estar involucrado en la activación de PPAR $\gamma$  en términos de neuroprotección<sup>51,52</sup>.

Por otro lado, OHDHA es una resolvina de diseño (una forma hidroxilada de DHA sintetizada artificialmente), cuyo mecanismo de acción también podría estar mediado por receptores. Hasta el momento, las evidencias de las que se dispone se basan en modelos animales, en donde se ha demostrado que OHDHA regula la composición lipídica de las membranas cerebrales y su estructura. De hecho, varias de las modificaciones lipídicas inducidas por OHDHA contrarrestan aquellas propias de la EA, como por ejemplo la disminución en DHA y otros ácidos grasos poli-insaturados<sup>43,53</sup>. A nivel de eficacia clínica, se ha demostrado que OHDHA protege contra la toxicidad provocada por  $\beta$ -amiloide y NMDA en cultivos neuronales, previene la acumulación de A $\beta$  y hiperfosforilación de la proteína Tau, y favorece una recuperación cognitiva prácticamente total en modelos animales de la enfermedad<sup>41</sup>. Parte de su mecanismo de acción se entiende debido al aumento en la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas cerebrales, ya que esta modificación lipídica inhibe la interacción de oligómeros del péptido  $\beta$ -amiloide con receptores proteicos asociados a *rafts* lipídicos, inhibiendo así en parte su citotoxicidad<sup>43</sup>. Sin embargo, la investigación sobre los mecanismos de acción de OHDHA está aún en curso. En el presente trabajo se ha abordado el estudio de FABP7 y GPR120 como posibles receptores de OHDHA. Estos dos candidatos han sido seleccionados por diferentes motivos:

- Ambos son reconocidos receptores para DHA o para otros PUFAs. Por un lado, FABP7 se une preferencialmente a DHA y su unión permite la regulación de factores de transcripción, pero para que tengan efecto es necesario la presencia de receptores nucleares como PPAR $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) que es a su vez activado por FABP7<sup>54,55</sup>. Por otro lado, DHA y otros PUFAs son ligandos endógenos de GPR120, y una vez unido presenta propiedades de señalización anti-inflamatorias<sup>56,57</sup>.
- Ambos se expresan en cerebro, FABP7 se encuentra localizada principalmente en astrocitos, regulando su proliferación y reactividad, y en células progenitoras de oligodendrocitos (OPC), controlando su proliferación y diferenciación<sup>58</sup>. GPR120 media acciones anti-inflamatorias en las neuronas del SNC, pero su papel todavía es poco conocido<sup>44</sup>. Aunque se ha demostrado que la familia GPCR está implicada en numerosos sistemas de neurotransmisores en el cerebro<sup>59</sup>.

- Ambos están implicados en procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer, o en el proceso inflamatorio asociado a la patología. Por ejemplo, varios estudios muestran evidencias de una asociación de FABP7 en las principales enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC), tales como trastornos neurodegenerativos, que sugieren funciones reguladoras de FABP7 en astrocitos; de hecho FABP7 se encuentra sobre-expresada en astrocitos reactivos y se incrementa en trastornos neurodegenerativos como la EA<sup>58,60</sup>. Por otro lado, la activación de GPR120, tras la unión de DHA, media acciones anti-inflamatorias reduciendo la respuesta inflamatoria del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa), una citoquina pro-inflamatoria implicada en la patogénesis de la EA<sup>44</sup>.

Todas estas evidencias en conjunto sugieren que ambos candidatos podrían mediar, al menos en parte, el efecto neuroprotector del OHDHA.

Sin embargo, en nuestro ensayo de expresión *in vivo* no ha habido expresión ninguna de FABP7 ni de GPR120 (ver figura 9), solamente hubo expresión de tGFP, una proteína utilizada habitualmente como control de transfección. En consecuencia, en el presente trabajo, no ha sido posible evaluar la interacción de FABP7 y GPR120 con OHDHA. Los genes que codifican para dichas proteínas fueron transfectados en seis líneas celulares diferentes, cuatro de ellas pertenecientes a humanos, una de ellas a hámster y la última a insecto. En ésta última tampoco hubo expresión de tGFP, pero sí la expresión de G- $\alpha$  mediada por un bacmido (como control positivo), lo que sugiere que la transfección en estas células de hecho fue satisfactoria, pero que pCDNA 3.0 no es un vector de expresión adecuado. Por otro lado, tGFP sí se expresa en una gran variedad de líneas celulares de mamífero de forma abundante como hemos mostrado previamente (ver resultados, apartado 2), lo que demuestra que la expresión mediada por el vector pCDNA 3.0 es satisfactoria, mostrando altos rendimiento en ambas líneas HEK293 y CHO. Sin embargo, los resultados obtenidos con FABP7 y GPR120 no concuerdan con los obtenidos para tGFP. Partiendo del hecho de que las secuencias subclonadas en pCDNA 3.0 han sido debidamente cotejadas con la secuencia original del gen y habida cuenta de que el proceso de transfección del vector es eficiente. Una explicación plausible para este fenómeno estaría basada en los mecanismos de regulación transcripcional y de traducción de estas proteínas dentro de la célula. Así, por ejemplo, cuando una proteína heteróloga (recombinante) ejerce algún efecto perjudicial sobre las células, pudiendo deberse a que la proteína sea tóxica, la propia célula puede degradar la proteína generada o inhibir su traducción<sup>61</sup>.

Sin embargo, esta justificación sigue siendo controvertida puesto que, según la literatura, las líneas celulares empleadas en el presente trabajo son adecuadas para la expresión de las proteínas de interés, por ejemplo HEK293 es ampliamente utilizada para expresar ambas, tanto de FABP7 como de GPR120<sup>62,63</sup>. Así que estas evidencias ponen de manifiesto que la expresión de estas proteínas en HEK293 es factible, por lo que otros motivos, posiblemente inherentes al método de transfección y expresión (p.ej. en la literatura se emplean regularmente líneas celulares establemente transfectadas o virus como vectores de expresión) deben estar detrás de la falta de expresión de FABP7 y GPR120 observada en el presente trabajo.

En resumen, el objetivo de este trabajo era determinar si FABP7 y GPR120 se comportan como receptores de OHDHA para obtener un mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción de esta molécula. Sin embargo, no hemos podido obtener expresión y, en consecuencia, no hemos podido evaluar dicha interacción. Con respecto a la dirección que debería seguir esta línea de investigación, en un futuro próximo intentaremos abordar la expresión de estas proteínas a través de la infección con baculovirus. Este sistema ya ha demostrado ser eficiente expresando G- $\alpha$  como control positivo en el presente trabajo y es ampliamente utilizado en la literatura, habiendo diversos estudios sobre la EA haciendo uso de las células Sf9 e infectando con baculovirus recombinante<sup>64,65</sup>. De hecho, el atractivo del sistema de infección por baculovirus reside en técnicas de fácil clonación y propagación de virus

combinada con la maquinaria de modificación post-traducciona eucariota de las células de insecto. Además, los virus pueden contener grandes inserciones de ADN extraño y replicarlo en células de insecto<sup>66</sup>. Por ejemplo, podemos encontrar el sistema de expresión BaculoDirect™ (ThermoFisher Scientific), un potente sistema eucariota para expresar proteínas en células de insecto permitiendo producir de manera rápida baculovirus recombinantes.

Por lo tanto, una vez que consigamos expresar a estos receptores, se podrá comprobar *in vitro* si existe interacción entre ellos y OHDHA, y cuáles son las cascadas de señalización que modulan a nivel celular. Esta aproximación nos permitirá indagar en el mecanismo neuroprotector del OHDHA para el tratamiento de la EA en modelos animales.

## CONCLUSIONES

1. La construcción de un vector de expresión basado en pCDNA 3.0 ha resultado ser útil para sobre-expresar tGFP, demostrando que la transfección con este vector es eficiente y se traduce en una alta tasa de producción proteica en diversas líneas celulares tanto tumorales como no tumorales.
2. Las construcciones basadas en pCDNA 3.0 no ha permitido expresar FABP7 o GPR120, probablemente como consecuencia de algún mecanismo de regulación interna a nivel celular.
3. Las construcciones basadas en pCDNA 3.0 no se expresan eficientemente en células de insecto Sf9 pero la expresión proteica empleando b́acmidos es aparentemente una estrategia prometedora.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Selkoe, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* **81**, 741–766 (2001).
2. Iqbal, K. & Grundke-Iqbal, I. Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers. Dement.* **6**, 420–4 (2010).
3. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **12**, 459–509 (2016).
4. Background paper 6.11. Alzheimer disease and other dementias. WHO. (2013) <[http://www.who.int/medicines/areas/priority\\_medicines/BP6\\_11Alzheimer.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_11Alzheimer.pdf)>
5. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)* (2016). doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1
6. Prince, M. *et al.* World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Dis. Int.* **84** (2015). doi:10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x
7. Exalto, L. G. *et al.* Risk score for prediction of 10 year dementia risk in individuals with type 2 diabetes: a cohort study. *lancet. Diabetes Endocrinol.* **1**, 183–90 (2013).
8. Nyberg, J. *et al.* Cardiovascular and cognitive fitness at age 18 and risk of early-onset dementia. *Brain* **137**, 1514–23 (2014).
9. Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K. & Brayne, C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* **13**, 788–794 (2014).
10. Sadigh-Eteghad, S. *et al.* Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med. Princ. Pract.* **24**, 1–10 (2015).
11. Postina, R. A closer look at alpha-secretase. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 179–86 (2008).
12. Lleó, A. Activity of gamma-secretase on substrates other than APP. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 9–16 (2008).
13. Tun, H., Marlow, L., Pinnix, I., Kinsey, R. & Sambamurti, K. Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J. Mol. Neurosci.* **19**, 31–5
14. Selkoe, D. J. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 447–53 (1998).
15. Ridge, P. G., Ebbert, M. T. W. & Kauwe, J. S. K. Genetics of Alzheimer's disease. *Biomed Res. Int.* **2013**, 254954 (2013).
16. Bao, F. *et al.* Different  $\beta$ -amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity. *Neurobiol. Aging* **33**, 825.e1–13 (2012).
17. Susan R. Farrer, M. M.-B. Alzheimer's Disease. Unraveling the Mystery. at <[https://d2cauhfh6h4x0p.cloudfront.net/s3fs-public/alzheimers\\_disease\\_unraveling\\_the\\_mystery\\_2.pdf?k0OsljJHDyFRrRXL78dV\\_YsOeNIvbaw1](https://d2cauhfh6h4x0p.cloudfront.net/s3fs-public/alzheimers_disease_unraveling_the_mystery_2.pdf?k0OsljJHDyFRrRXL78dV_YsOeNIvbaw1)>
18. Mullane, K. & Williams, M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis-but what lies beyond? *Biochem. Pharmacol.* **85**, 289–305 (2013).
19. Jimenez, S. *et al.* Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J. Neurosci.* **28**, 11650–61 (2008).
20. Jimenez, S. *et al.* Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse m. *J. Biol. Chem.* **286**, 18414–25 (2011).
21. Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006247 (2012).
22. Brion, J. P. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* **40**, 130–40 (1998).
23. Shoghi-Jadid, K. *et al.* Localization of Neurofibrillary Tangles and Beta-Amyloid Plaques in the Brains of Living Patients With Alzheimer Disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **10**, 24–35 (2002).
24. Caselli, R. J. & Reiman, E. M. Characterizing the preclinical stages of Alzheimer's disease and the prospect of presymptomatic intervention. *J. Alzheimers. Dis.* **33 Suppl 1**, S405–16 (2013).
25. Bird, T. D. Alzheimer Disease Overview. (2015). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1161/>>
26. Villegas, S. [Alzheimer's disease: New therapeutic strategies]. *Med. clínica* **145**, 76–83 (2015).
27. Massoud, F. & Léger, G. C. Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *Can. J. Psychiatry.* **56**, 579–88 (2011).
28. Pohanka, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **22**, 871–86 (2012).
29. Olivares, D. *et al.* N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **9**, 746–58 (2012).
30. Yiannopoulou, K. G. & Papageorgiou, S. G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **6**, 19–33 (2013).

31. Escribá, P. V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **12**, 34–43 (2006).
32. Escribá, P. V *et al.* Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 829–75 (2008).
33. Escribá, P. V *et al.* Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog. Lipid Res.* **59**, 38–53 (2015).
34. Salem, N., Litman, B., Kim, H. Y. & Gawrisch, K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* **36**, 945–59 (2001).
35. Lukiw, W. J. *et al.* A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 2774–83 (2005).
36. Astarita, G. *et al.* Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. *PLoS One* **5**, e12538 (2010).
37. Freund-Levi, Y. *et al.* Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegaAD study: a randomized double-blind trial. *Arch. Neurol.* **63**, 1402–8 (2006).
38. Shaikh, S. R. Biophysical and biochemical mechanisms by which dietary N-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil disrupt membrane lipid rafts. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 101–5 (2012).
39. Ibarguren, M., López, D. J. & Escribá, P. V. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1518–28 (2014).
40. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* **510**, 92–101 (2014).
41. Fiol-deRoque, M. A. *et al.* Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment. *Biogerontology* **14**, 763–75 (2013).
42. Torres, M., Marcilla-Etxenike, A., Fiol-deRoque, M. A., Escribá, P. V & Busquets, X. The unfolded protein response in the therapeutic effect of hydroxy-DHA against Alzheimer's disease. *Apoptosis* **20**, 712–24 (2015).
43. Torres, M. *et al.* Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosahexaenoic acid on Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1680–92 (2014).
44. Wellhauser, L. & Belsham, D. D. Activation of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 mediates anti-inflammatory actions in immortalized hypothalamic neurons. *J. Neuroinflammation* **11**, 60 (2014).
45. Mita, R., Beaulieu, M. J., Field, C. & Godbout, R. Brain fatty acid-binding protein and omega-3/omega-6 fatty acids: mechanistic insight into malignant glioma cell migration. *J. Biol. Chem.* **285**, 37005–15 (2010).
46. Lillehoj, H. S. & Choi, K. D. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avian Dis.* **42**, 307–14
47. Pons, L. *et al.* Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One* **4**, e6325 (2009).
48. Martín, V. *et al.* Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J. Alzheimers. Dis.* **19**, 489–502 (2010).
49. Bazinet, R. P. & Layé, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 771–785 (2014).
50. Khan, M. Z. & He, L. The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology* (2015). doi:10.1016/j.neuropharm.2015.05.013
51. Zhao, Y. *et al.* Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR $\gamma$ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One* **6**, e15816 (2011).
52. Stark, D. T. & Bazan, N. G. Neuroprotectin D1 induces neuronal survival and downregulation of amyloidogenic processing in Alzheimer's disease cellular models. *Mol. Neurobiol.* **43**, 131–8 (2011).
53. Chan, R. B. *et al.* Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **287**, 2678–88 (2012).
54. Elsherbiny, M. E., Emara, M. & Godbout, R. Interaction of brain fatty acid-binding protein with the polyunsaturated fatty acid environment as a potential determinant of poor prognosis in malignant glioma. *Prog. Lipid Res.* **52**, 562–70 (2013).
55. Schroeder, F. *et al.* Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* **43**, 1–17 (2008).
56. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–98 (2010).
57. Kim, N. *et al.* Endogenous Ligand for GPR120, Docosahexaenoic Acid, Exerts Benign Metabolic Effects on the Skeletal Muscles via AMP-activated Protein Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* **290**, 20438–47 (2015).

58. Kazem Sharifi, M. E. Proteomic Differential Display Analysis Reveals Decreased Expression of PEA-15 and Vimentin in FABP7-Deficient Astrocytes. *J. Proteomics Bioinform.* **08**, (2015).
59. Thathiah, A. & De Strooper, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 73–87 (2011).
60. Guttula, S. V., Allam, A. & Gumpeny, R. S. Analyzing microarray data of Alzheimer's using cluster analysis to identify the biomarker genes. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, 649456 (2012).
61. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 172 (2014).
62. Yun, S.-W. *et al.* Neural stem cell specific fluorescent chemical probe binding to FABP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10214–7 (2012).
63. Watson, S.-J., Brown, A. J. H. & Holliday, N. D. Differential signaling by splice variants of the human free fatty acid receptor GPR120. *Mol. Pharmacol.* **81**, 631–42 (2012).
64. Verdile, G. *et al.* Baculoviruses expressing the human familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutation lacking exon 9 increase levels of an amyloid beta-like protein in Sf9 cells. *Mol. Psychiatry* **9**, 594–602 (2004).
65. Gómez-Ramos, A. *et al.* Expression of an altered form of tau in Sf9 insect cells results in the assembly of polymers resembling Alzheimer's paired helical filaments. *Brain Res.* **1007**, 57–64 (2004).
66. Oker-Blom, C., Airenne, K. J. & Grabherr, R. Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **2**, 244–53 (2003).