

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GDNF PARA SU ENCAPSULACION Y APLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Elisa Garbayo Añena¹, M^a Soledad Aymerich Soler², José L. Lanciego Pérez², Eduardo Ansorena Artieda¹, María J. Blanco Prieto¹

⁽¹⁾ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080. Pamplona. España

⁽²⁾ laboratorio de Neuromorfología y Trazadores. CIMA. Universidad de Navarra. 31080. Pamplona. España

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la neurodegeneración primaria de las células dopaminérgicas en la sustancia negra compacta (SNc), lo que se traduce en un descenso en los niveles de dopamina en el estriado (caudado-putamen), núcleo diana principal de las células de la SNc. La patología motora consiguiente es la resultante de la falta de transmisión dopaminérgica en el putamen, principalmente.

La terapia farmacológica actual está dirigida a reemplazar la dopamina que se pierde a lo largo del proceso, terapia que es muy eficaz clínicamente pero que no detiene la progresión natural de la enfermedad y además presenta efectos adversos notables a largo plazo.

El factor neurotrófico derivado de las células de la glía (GDNF) se caracteriza por presentar un potente efecto trófico sobre las células del sistema dopaminérgico, (Arenas *et al.*, 1995; Beck *et al.*, 1995; Cass, 1996) por lo que han sido elaboradas distintas estrategias encaminadas a liberar GDNF en las zonas estriatales denervadas de dopamina. Estas estrategias abarcan un amplio abanico, que comprende desde diversos implantes celulares (Kishima *et al.* 2004) hasta el empleo de vectores virales (McBride *et al.*, 2002) pasando por métodos de infusión directa (Grondin *et al.*, 2002). Los resultados derivados de estas aproximaciones se vieron confirmados en un 'open trial' llevado a cabo en humanos mediante la liberación continuada de la proteína en el putamen empleando para ello una bomba de infusión (Gill *et al.*, 2003). No obstante, un reciente estudio de 'doble ciego' llevado a cabo por AMGEN, ha puesto en duda la eficacia de la liberación continuada mediante infusión de

GDNF en el putamen de pacientes parkinsonianos, proponiendo los autores que es necesario abordar el problema desde otras perspectivas de liberación y dosificación.

En este punto y mediante el empleo de modelos animales bien caracterizados de EP (ratas tratadas con 6-OHDA y primates tratados con MPTP), proponemos como estrategia a seguir la administración de GDNF utilizando vectores biodegradables así como la administración de dichos vectores en las zonas afectadas del cerebro. Consideramos que esta aproximación experimental resultará en la aparición de un efecto 'neurorestaurador' de la función motora en estos animales depleccionados de dopamina.

Debido a la baja pureza y al elevado coste del GDNF comercial nos planteamos la necesidad de producirlo y purificarlo. Por ello, el objetivo de este trabajo es establecer un protocolo para la expresión y purificación de dicho factor neurotrófico con una pureza elevada y en cantidad suficiente para su posterior microencapsulación y para la realización de los ensayos *in vivo*.

Materiales y Métodos

El sistema escogido para expresar el GDNF fue el sistema de células eucariotas de mamífero. El vector utilizado para la producción del GDNF en células eucariotas fue el pDEST26 (Tecnología Gateway de Invitrogen).

Como sistema de expresión de GDNF se utilizaron las líneas celulares eucariota BHK, 293 y COS 7. La línea celular BHK (Baby Hamster Kidney) procede de riñón de cría de hamster, la línea celular 293 procede de riñón humano y la línea celular Cos 7 procede de riñón de mono.

Estas células fueron cultivadas en medio D-MEM (Invitrogen) complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y Penicilina/Streptomina (100u/ml) (Invitrogen). La transfección se realizó con Lipofectamine Plus (Invitrogen). Se analizó la expresión de GDNF a nivel de mRNA mediante PCR y a nivel de proteína mediante Western Blot del medio condicionado.

Los clones positivos se crecieron en botellas de cultivo de 850 cm² (Corning) y se realizaron ciclos de recolección del medio. Cada ciclo fue analizado por SDS-PAGE y Western Blot.

A partir de los medios condicionados se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en una columna XK16/20 empaquetada con SP Sepharose High Performance (Amersham Biosciences). La muestra se eluyó creando un gradiente entre 0 M y 1M de NaCl. Durante todo el proceso se trabajó a una velocidad constante de 1.25 ml/min.

Las fracciones positivas para el GDNF en la cromatografía de intercambio catiónico, se reunieron y fueron sometidas a una cromatografía de exclusión molecular (columna Superdex 200 HR 10/30, cromatógrafo AKTA Purifier Amersham). Se seleccionaron aquellas fracciones que fueron positivas para el GDNF en la columna de exclusión molecular y se sometieron a cromatografía de intercambio catiónico (columna Mono S HR 5/5 Amersham). La muestra se eluyó creando un gradiente entre 0 M y 1M de NaCl.

Durante todo el proceso de purificación se trabajó a temperatura ambiente. Las fracciones recogidas después de cada etapa de dicha purificación fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot.

Para evaluar la actividad de la proteína se ha desarrollado un ensayo de actividad en el que se demuestra la diferenciación morfológica de células PC-12 inducida por GDNF.

La presencia de los receptores GFR α 1 y RET, necesarios para que el GDNF ejerza su acción, fue determinada por PCR.

También se determinó la dosis de GDNF más apropiada para realizar este ensayo.

El ensayo de actividad fue realizado después de cada paso de la purificación para comprobar que se mantenía la actividad del GDNF purificado.

Resultados y Discusión

Tras preparar el vector de expresión en mamíferos para el GDNF, se transfectaron establemente las líneas celulares BHK, 293 y COS 7. De la línea celular 293 se seleccionaron 6 clones, de la línea BHK se seleccionaron 18 clones y de la línea COS 7 no fue posible la selección de los clones. Para comprobar que los clones seleccionados habían incorporado el GDNF y lo expresaban se comprobó la presencia del mRNA para GDNF mediante PCR. En la Figura 1 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR.

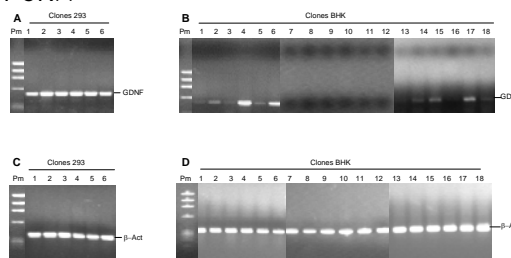


Fig 1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR para el estudio del mRNA de los clones seleccionados. A) Expresión de GDNF en los clones seleccionados a partir de la línea celular 293 B) Expresión de GDNF en los clones seleccionados a partir de la línea celular BHK C) Expresión de β -Actina en los clones seleccionados a partir de la línea celular 293 D) Expresión de β -Actina en los clones seleccionados a partir de la línea celular BHK. El marcador de peso molecular utilizado para todos ellos es el ϕ 174/HAEII.

Se analizó por Western Blot el medio condicionado para seleccionar aquellos clones que, teniendo expresión de mRNA para GDNF, poseían también expresión a nivel de proteína.

Como se observa en la Figura 2, el clon BHKpDEST26 clon 4 fue el clon con mayor expresión de GDNF. Los clones seleccionados a partir de la línea celular 293, aunque poseían el mRNA no expresaron el GDNF.

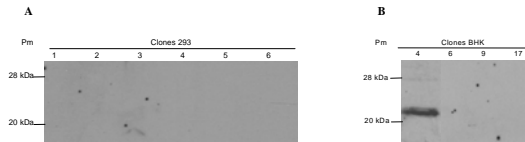


Fig 2. A) Western Blot de los medios condicionados producidos por los clones seleccionados a partir de la línea celular 293 transfectados de forma estable. B) Western Blot de los medios condicionados producidos por los clones seleccionados a partir de la línea celular BHK transfectados de forma estable.

El clon 4 de la línea celular BHK se creció en botellas de cultivo de 850 cm² (Corning) y se recogieron 13 ciclos que fueron analizados por SDS-PAGE y Western Blot como se muestra en la Figura 3.

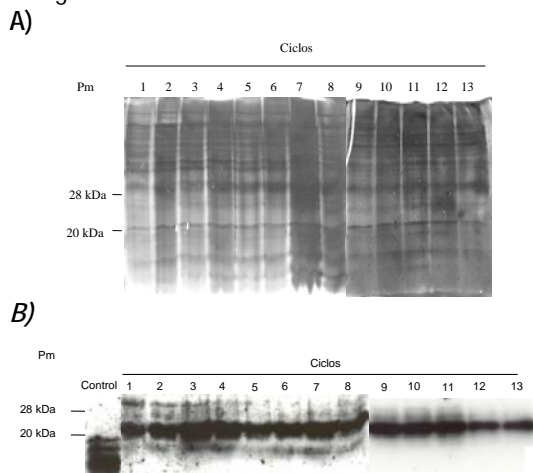


Fig.3. A) SDS-PAGE y tinción de plata de los ciclos de cultivo de las células BHK transfectadas con pDEST26GDNF. B) Western Blot del medio sin suero de los ciclos de cultivo de células BHK transfectadas con pDEST26-GDNF.

Para la purificación, en primer lugar se empleó una cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot y aquellas que contenían GDNF fueron reunidas y sometidas a cromatografía de exclusión molecular. Se analizaron las fracciones obtenidas y aquellas que contenían GDNF se sometieron a cromatografía de intercambio catiónico. El análisis de las fracciones mostró que el GDNF obtenido es puro. En la Figura 4 se observa la diferencia de pureza con el GDNF comercial.

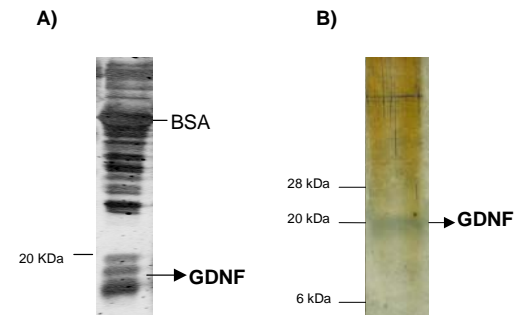


Fig 4. A) SDS-PAGE y Tinción de Plata del GDNF comercial. B) SDS-PAGE y Tinción de Plata del GDNF purificado.

En cuanto al ensayo de actividad, en la Figura 5 se observa que las células PC-12 poseen los 2 receptores necesarios para que el GDNF ejerza su acción.

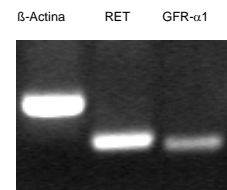


Fig 5. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR

Los resultados del ensayo de diferenciación se muestran en la Figura 6 en la que podemos observar la diferenciación de las células PC-12 tras 7 días de tratamiento con GDNF a una concentración de 50 ng/ml. Se puede observar el crecimiento de dendritas en las células tratadas con GDNF por lo tanto el GDNF purificado es activo.

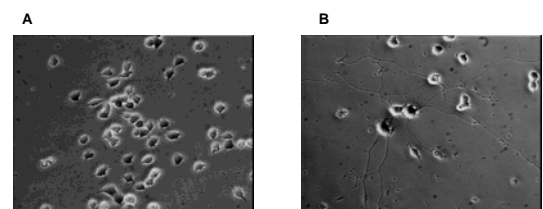


Fig 6. Ensayo de diferenciación de las células PC-12 tras 7 días de tratamiento con GDNF. A) Control negativo: Células tratadas con medio condicionado de BHK y B) Células tratadas con medio condicionado de BHKpDEST26 clon 4

Las conclusiones de este estudio son:

- Se ha obtenido GDNF recombinante a partir de un sistema de expresión en células eucariotas.

- Se ha desarrollado un protocolo para la purificación de la proteína recombinante.
- El GDNF recombinante obtenido es biológicamente activo.

El siguiente paso del trabajo será encapsular la proteína en vectores poliméricos biodegradables para su posterior implantación en el estriado de modelos animales de enfermedad de Parkinson (ratas y primates).

Bibliografía

1. Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibañez CF. (1995). GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*, 15 : 1465-1473.
2. Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F. (1995). Mesecephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, 373 : 339-341.
3. Cass WA. (1996). GDNF selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of metamphetamine. *J. Neurosci.*, 16 : 8132-8139.
4. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. (2003). Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 9 : 589-595.
5. Grondin R, Zhang Z, Yi A, Cass WA, Maswood N, Andersen AH, Elsberry DD, Klein MC, Gerhardt GA, Gash DM. (2002). Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain*, 125 : 2191-2201.
6. Kishima H, Poyot T, Dauguet J, Conde F, Dolle F, Hinnen F, Pralog W, Palfi S, Deglon N, Aebischer P, Hantraye P. (2004). Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis.* 16(2): 428-439.
7. McBride JL, Kordower JH. (2002). Neuroprotection for Parkinson's disease using viral vector-mediated delivery of GDNF. *Progr. Brain Res.*, 138 : 421-432.

Agradecimientos

Los autores agradecen:

- al Dpto. de Educación y Cultura del Gobierno de Navarra, la financiación de este trabajo, así

como la beca para la formación de investigadores concedida a Elisa Garbayo.

- A la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra

Autor de contacto

Nombre y apellidos: María J. Blanco Prieto

e-mail mjblanco@unav.es

Institución Dpto. Farmacia y Tecnología

Farmacéutica. Facultad de Farmacia. U. Navarra

Dirección Irunlarrea s.n.

Ciudad Pamplona

Telf.: 948425600 Ext 6519

Fax: 948425649