

# Expresión y purificación de GDNF para su microencapsulación y aplicación en la enfermedad de Parkinson

## *Expression and Purification of GDNF for its microencapsulation in drug delivery systems and application in Parkinson's disease*

 Garbayo Atienza E.<sup>1</sup>

 Blanco Prieto M.<sup>1</sup>

 Aymerich M.S.<sup>2</sup>

 Lanciego J. L.<sup>2</sup>
<sup>1</sup> Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.

<sup>2</sup> Laboratorio de Neuromorfología y Trazadores CIMA. Universidad de Navarra.

### RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central que afecta a las neuronas de dopamina de la sustancia negra, núcleo mesencefálico del control motor. La pérdida en el cerebro de este neurotransmisor vital causa los síntomas de la enfermedad. La EP afecta actualmente a 200 de cada 100.000 personas y a 2 de cada 100 entre los mayores de 60 años. En España hay unos 110.000 enfermos. Además, hoy por hoy no se conoce nada que pueda prevenir o curar la enfermedad, ni existe ninguna prueba de laboratorio que permita diagnosticarla. Recientemente se ha demostrado que el GDNF, factor neurotrófico derivado de las células gliales, es capaz de proteger las neuronas dopaminérgicas e incluso inducir la regeneración del tejido dopaminérgico dañado in vivo.

El objetivo del trabajo fue diseñar y desarrollar un método de expresión y purificación de GDNF bioactivo para su posterior microencapsulación y aplicación en la enfermedad de Parkinson.

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. Estas células fueron cultivadas en medio D-MEM (Invitrogen) complementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y Penicilina/Streptomycin (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 condicio-

### ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a slowly progressive neurodegenerative disorder caused by decreased levels of dopamine in the substantia nigra, brain region responsible for movement. The lack of dopamine is believed to be responsible of the symptoms of PD. Parkinson's affects 200 in 100000 people and 2 in every 100 persons over 60 years old. In Spain, there are about 110000 people with PD. There is no cure at this time, and there are no prevention techniques or therapies. Recently, it has been demonstrated that GDNF, a glial-derived neurotrophic factor is able to protect the dopaminergic neurons of the substantia nigra and it can also induce regeneration of injured neurons in the central nervous system in vivo.

The aim of this work was to develop a procedure for the expression and purification of bioactive GDNF in view of its microencapsulation for the treatment of PD.

The cDNA of the GDNF gene was cloned in the expression vector pDEST26 (Invitrogen) using the Gateway® Technology. Several eukaryotic mammalian cell lines (BHK, COS-7, and 293) were stably transfected with the construction with Lipofectamine Plus (Invitrogen). In those clones in which the presence of the mRNA of the GDNF was confirmed by PCR studies, the expression of the recombinant protein in the serum free medium was analyzed by Western Blot studies. The highest GDNF-producing clone, obtained from the BHK cell line, was cultured in 850 cm<sup>2</sup> roller bottles (Corning) alternating the presence or the absence of FBS in the medium every 24 hours, being collected only the serum free medium for the production of the recombinant GDNF. Each cycle protein

#### Correspondencia

M. J. Blanco-Prieto

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra  
Irunlarrea, 1 - 31080 Pamplona  
mjblanco@unav.es

Este trabajo

ha sido subvencionado por  
FUNDACIÓN MAPFRE, a través de una beca de  
investigación, convocatoria 2004/2005



→ nado. Los clones positivos se crecieron en botellas de cultivo de 850 cm<sup>2</sup> (Corning) y se realizaron ciclos de recolección del medio. Cada ciclo fue analizado 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 GFRa1 y RET, necesarios para que el GDNF ejerza su acción, fue determinada por PCR.

Las conclusiones obtenidas de este estudio son la obtención de GDNF recombinante a partir de un sistema de expresión en células eucariotas, el desarrollo de un protocolo para su posterior purificación y la obtención de GDNF recombinante biológicamente activo.

**Palabras clave:**

*GDNF, factores neurotróficos, enfermedad de Parkinson, regeneración axonal.*

→ expression was analyzed by SDS-PAGE and by Western Blot. The secreted protein was purified by several chromatography steps. After each step of the purification procedure the fractions obtained were analyzed by SDS-PAGE, Western Blot and silver staining analysis. A neuronal differentiation PC-12 cell-based bioassay was also developed to confirm the biological activity of the purified recombinant protein. Previously, the presence of GFRa1 and RET, receptors required for GDNF activity were confirmed by PCR.

In conclusion, recombinant GDNF was produced in an eukaryotic mammalian cell line-based system. The protein purification procedure developed, allowed to obtain a highly purified recombinant GDNF. Furthermore, the recombinant protein is bioactive.

**Key words:**

*GDNF, neurotrophic factors, Parkinson's disease, axonal regeneration.*

MAPFRE MEDICINA, 2006; 17 (3): 166-171

## INTRODUCCIÓN

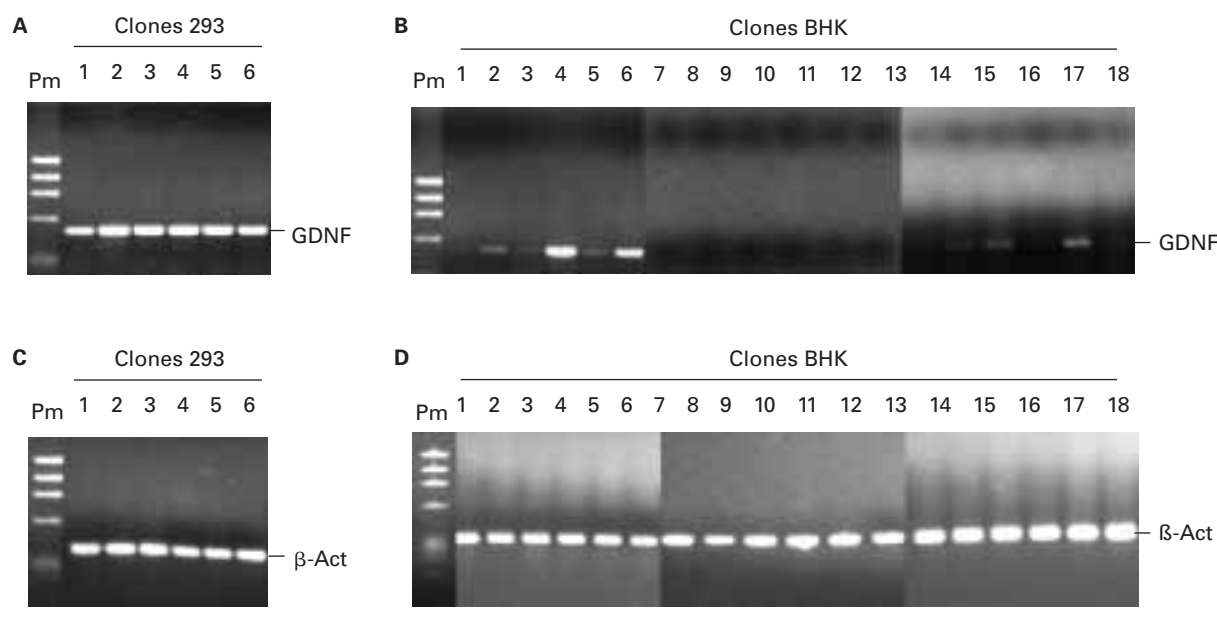
La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la neurodegeneración primaria de las células dopaminérgicas en la sustancia negra compacta (SNc), lo que se traduce en un descenso en los niveles de dopamina en el estriado (caudado-putamen), núcleo diana principal de las células de la SNc. La patología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

Aunque es difícil establecer el número real de personas que padecen la EP, debido principalmente a la dificultad de diagnóstico, se cree que actualmente afecta a 200 de cada 100.000 personas y a 2 de cada 100 entre los mayores de 60 años. Además se estima que de un 5 a un 20 por ciento de los pacientes tienen menos de 40 años de edad. En España hay unos 110.000 enfermos. Teniendo en cuenta el incremento de la esperanza de vida de la población, parece probable que en un futuro próximo esta enfermedad se observe con mayor frecuencia en nuestra sociedad (datos obtenidos de la "Asociación Española para el Parkinson"). La EP genera una carga significativa sobre la economía a través de los costes de tratamientos, la hospitalización y las residencias asistidas, y de los ingresos no percibidos. La EP constituye, por lo tanto, un problema sanitario grave, cuyo tratamiento implica un coste farmacéutico muy elevado (1).

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, (2-4) por lo que han sido elaboradas distintas estrategias encaminadas a liberar GDNF en las zonas estriales denervadas de dopamina. Estas estrategias abarcan un amplio abanico, que comprende desde diversos implantes celulares (5) hasta el empleo de vectores virales (6) pasando por métodos de infusión directa (7). 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 (8). 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



**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  $\beta$ -Actina en los clones seleccionados a partir de la línea celular 293 D) Expresión de  $\beta$ -Actina en los clones seleccionados a partir de la línea celular BHK. El marcador de peso molecular utilizado para todos ellos es el  $\varnothing$ 174/HAEII.

6-OHDA y primates tratados con MPTP) (9), proponemos como estrategia a seguir la administración de GDNF utilizando vectores biodegradables (10, 11) 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.

## MATERIAL 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/Streptomocina (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 cm<sup>2</sup> (Corning) y se realizaron ciclos de recolección del medio. Cada ciclo fue analizado por SDS-PAGE y Western Blot.

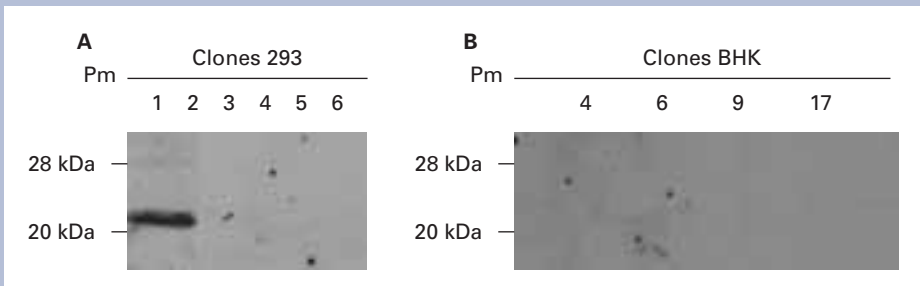


Fig. 2. A) Western Blot de los medios condicionados producidos por los clones seleccionados a partir de la línea celular 293 transfectados de forma estable. B) Western Blot de los medios condicionados producidos por los clones seleccionados a partir de la línea celular BHK transfectados de forma estable.

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, cromatografo 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 (ACTT, USA) inducida por GDNF.

La presencia de los receptores GFRA1 y RET, necesarios para que el GDNF ejerza su acción, fue determinada por PCR.

También se determinó que dosis de GDNF era la 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.

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 BHKp-DEST26 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.

El clon 4 de la línea celular BHK se creció en botellas de cultivo de 850 cm<sup>2</sup> (Corning) y se recogieron 13 ciclos que fueron analizados por SDS-PAGE y Western Blot como se muestra en la Figura 3. En el medio condicionado hay GDNF pero existen también muchas otras proteínas por lo que es necesario establecer un protocolo para purificar el GDNF a partir de este medio condicionado.

Para la purificación, en primer lugar se empleó una cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-

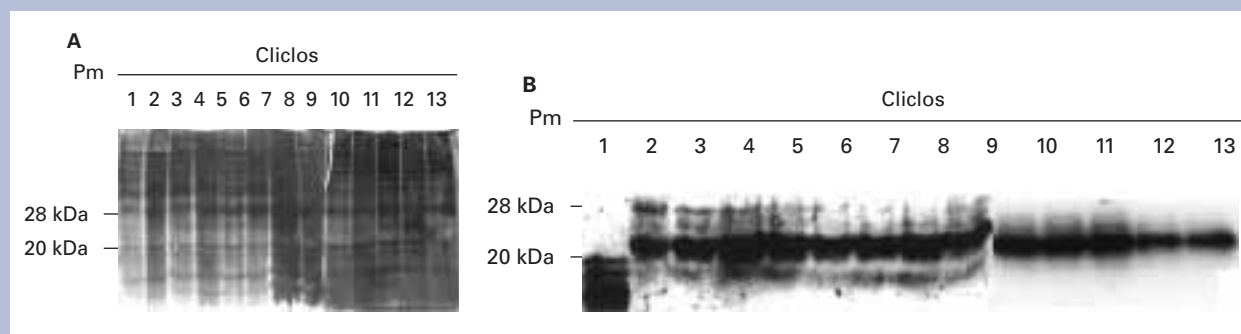


Fig. 3. A) SDS-PAGE y tinción de plata de los ciclos de cultivo de las células BHK transfectadas con pDEST26GDNF. B) Western Blot del medio sin suero de los ciclos de cultivo de células BHK transfectadas con pDEST26-GDNF.

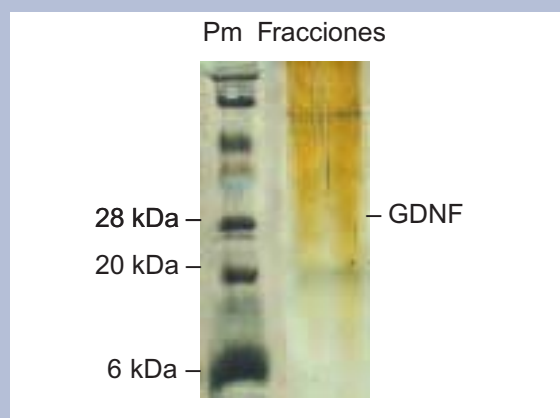


Fig. 4. SDS- PAGE y Tinción de Plata del GDNF puro.

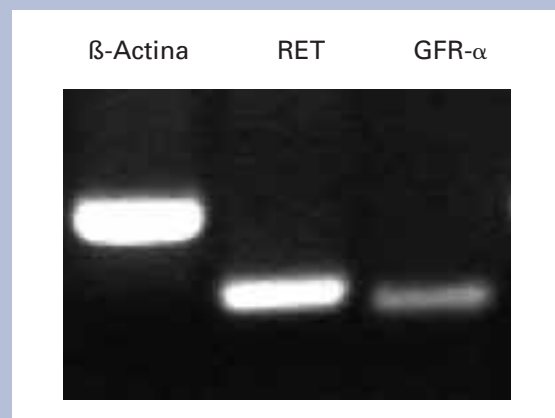


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR.

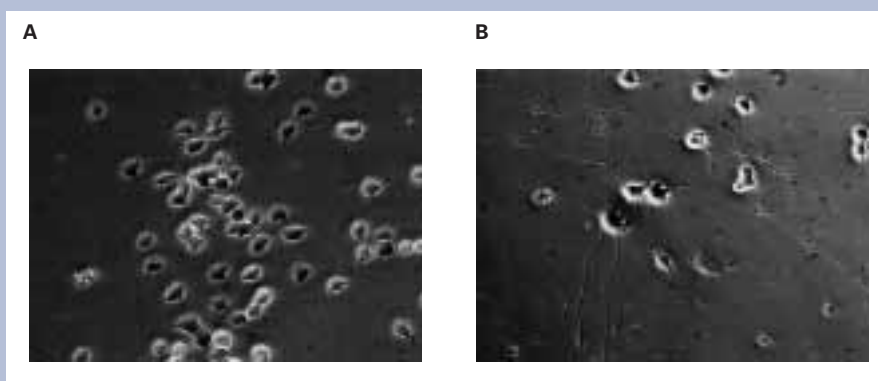


Fig. 6. Ensayo de diferenciación de las células PC-12 tras 7 días de tratamiento con GDNF. A) Control negativo: Células tratadas con medio condicionado de BHK y B) Células tratadas con medio condicionado de BHKpDEST26 clon 4



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 muestra la obtención de GDNF puro. En la Figura 4 se observa la diferencia de pureza entre el GDNF comercial y el producido.

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

También se determinó que dosis de GDNF era la más apropiada para realizar este ensayo, siendo de 50 ng/ml.

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 de medio. Se puede observar el crecimiento de dendritas en las células tratadas con GDNF. Podemos concluir que el GDNF purificado es activo.

## CONCLUSIÓN

Las conclusiones obtenidas de este estudio son la obtención de GDNF recombinante a partir de un sistema de expresión en células eucariotas, el desarrollo de un protocolo para su posterior purificación y la obtención de GDNF recombinante 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).

## Referencias bibliográficas

1. Elli Lilly and Company. Lilly España. 2003. [http://www.lilly.es/template.cfm?cat\\_id=206](http://www.lilly.es/template.cfm?cat_id=206)
2. Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibañez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 1995; 15 : 1465-1473.
3. Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 1995; 373 : 339-341.
4. Cass WA. GDNF selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of amphetamine. *J. Neurosci.* 1996; 16 : 8132-8139.
5. Kishima H, Poyot T, Dauguet J, Conde F, Dolle F, Hinnen F, Pralog W, Palfis S, Deglon N, Aebischer P, Hantraye P. Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis.* 2004; 16 (2): 428-439.
6. McBride JL, Kordower JH. Neuroprotection for Parkinson's disease using viral vector-mediated delivery of GDNF. *Prog. Brain Res.* 2002; 138 : 421-432.
7. Grondin R, Zhang Z, Yi A, Cass WA, Maswood N, Andersen AH, Elsberry DD, Klein MC, Gerhardt GA, Gash DM. Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain* 2002; 125 : 2191-2201.
8. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine* 2003; 9 : 589-595.
9. Emborg ME. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J. Neurosci. Meth.* 2004; 139 : 121-143.
10. M. J. Blanco-Prieto, CH. Durieux V. Dauge E. Fattal P. Couvreur and B. P. Roques. Slow delivery of the selective cholecystokinin agonist pBC 264 into the rat nucleus accumbens using microspheres. *Journal of Neurochemistry* 1996; 67 (6): 2417-24.
11. M. J. Blanco-Prieto. Nuevas formas farmacéuticas como vehículos de medicamentos. Una visión actual. *Anales de la real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid* 2002; vol. XL: 249-260.