



FACULTAD DE BIOLOGÍA

DOBLE GRADO EN BIOLOGÍA Y EN QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Expresión de enzimas celulares para la creación de redes
metabólicas artificiales mediante su combinación con
catalizadores metálicos. PARTE B**

Alejandra Vale Gómez

Tutores: José Manuel Martínez Costas / Natalia Barreiro Piñeiro

Curso Académico: 2021/2022

Índice

Abreviaturas	3
1. Introducción.....	4
1.1. La importancia de la monitorización por fluorescencia de la actividad enzimática.....	4
1.2. La química bioortogonal en el mundo celular.....	5
1.3. Combinación de catálisis organometálica y enzimática.....	8
2. Objetivos.....	8
3. Material y métodos.....	9
3.1. Materiales.....	9
3.2. Procedimientos generales.....	10
3.2.1. Transformación bacteriana.....	10
3.2.2. Crecimiento bacteriano en medio líquido.....	10
3.2.3. Purificación del plásmido por Midiprep (kit PureYield™ Plasmid Midprep System)	10
3.2.4. Transfección celular con plásmidos.....	11
3.3. Evaluación del grado de sobreexpresión.....	12
3.3.1. Detección de actividad ALP mediante NBT/BCIP Stock Solution.....	12
3.3.2. Fijación de células para análisis por microscopía.....	12
3.3.3. Dot-Blot empleando el aparato de Microfiltración Bio-Dot®.....	12
4. Resultados y Discusión.....	13
4.1. Evaluación del grado de sobreexpresión enzimática ALP en células HEK-293 y Vero tras transfección con plásmido p-BLUESCRIPT CMV SEAP.....	13
4.1.1. Medición actividad ALP mediante NBT/BCIP Solution.....	13
4.1.2. Comparación de células transfectadas y sin transfectar por microscopía.....	14
4.1.3. Detección de la enzima ALP mediante técnica Dot- Blot por microfiltración.....	15
4.2. Estudios de viabilidad de una reacción <i>tándem in cellulo</i>	16
4.2.1. Funcionamiento de la sonda/sustrato de la reacción.....	16
4.2.2. Evaluación de la reacción <i>tándem</i> mediante ensayos <i>in vitro</i>	16
4.2.3. Evaluación de la reacción <i>tándem</i> en cultivos celulares.....	17
5. Conclusiones.....	19
6. Bibliografía.....	20

Agradecimientos:

En primer lugar, me gustaría agradecer a José Manuel Martínez Costas su paciencia y atención a la hora de llevar a cabo las mediciones del grado de sobreexpresión, así como, junto a José Luis Mascareñas (tutor del TFG homólogo del Grado en Química), la buena disposición a la hora de permitirme realizar un TFG conjunto entre Biología y Química con las molestias que eso pudiera ocasionar. En segundo lugar, agradecer a Natalia Barreiro por mostrarme la importancia de una buena y ordenada dinámica de trabajo, así como por toda la ayuda prestada en el desarrollo experimental y redacción de este trabajo, a pesar de su ocupado día a día. Agradecer también a Rebeca Menaya todos los consejos en el laboratorio y la

preparación del material biológico y a Paula Sánchez sus indicaciones en cuanto a las técnicas de transfección, así como también al resto de integrantes del grupo por hacer del laboratorio un lugar agradable de trabajo. Dar las gracias igualmente a todos los integrantes del grupo de Química, y en especial a María y Alejandro, por su constante atención a lo largo del desarrollo de todo el proyecto. Por último, agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, y a mis amigos de Santiago y Viveiro por todo el apoyo brindado, así como también a mis compañeros de carrera por haber recorrido juntos estos largos seis años.

Abreviaturas.

Alloc	Aliloxicarbonilo	MAO	Monoamina oxidasa
ALP	Fosfatasa alcalina	min	Minuto
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
CMV	Citomegalovirus	NIR	Near Infrared
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	PBS	Tampón de fosfato salino
ESIPT	Efecto de transferencia de protón intramolecular en estado excitado	Rho	Rodamina
GSH	Glutati6n reducido	SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase
h	Hora	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
HEK-293	Línea celular derivada de tejido epitelial renal embrionario humano	Tween-20	Monolaurato de polioxietileno(20) sorbitano
HeLa	Línea celular inmortal derivada de tejido de cáncer de cuello uterino de Henrietta Lacks	Vero	Línea celular derivada de tejido epitelial renal de mono verde africano (<i>Chlorocebus sabaeus</i>)
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas	x g	Veces a aceleración gravitacional
LB	Caldo de lisogenia	λ_{em}	Longitud de onda de emisión

Resumen.

Una de las actuales líneas de trabajo en el ámbito de la investigación en la química biológica se basa en el diseño y realización de reacciones no naturales en ambientes biológicos sin afectar al funcionamiento de los mismos. Los numerosos avances en el campo han abierto la posibilidad al desarrollo de nuevas rutas metabólicas artificiales, fruto de la combinación de estas reacciones artificiales, con los propios procesos enzimáticos celulares, lo que podría dar lugar a nuevos tipos de herramientas biomédicas. Con este fin, en este trabajo se llevará a cabo la sobreexpresión de enzimas en diferentes líneas celulares para comprobar la viabilidad de un proceso tándem entre dos tipos de catálisis (metálica y enzimática) tanto en escenarios con niveles fisiológicos enzimáticos como sobreexpresados.

La sobreexpresión enzimática y sus medidas correspondientes, así como la preparación del material biológico necesario, serán el objeto de este trabajo, mientras que el diseño de la reacción tándem y sus estudios de reactividad *in vitro* e *in cellulo* del proceso se recogen detallados en el TFG homólogo del Grado en Química, realizado en el grupo del Prof. Mascareñas.

1. Introducción.

Las enzimas son proteínas que actúan como biocatalizadores disminuyendo la energía de activación de las reacciones en el interior celular y por tanto acelerando la velocidad de las mismas. Presentan una gran especificidad en cuanto a sustrato y eficiencia y aunque muchas se encuentran en los líquidos corporales no se forman en éstos, sino que se liberan a partir de las células, de manera que niveles anormales se asociarán con diversas patologías.

1.1. La importancia de la monitorización por fluorescencia de la actividad enzimática.

Dado que las sondas fluorescentes son herramientas muy útiles a la hora de visualizar la distribución espacial y temporal de especies de interés en células, el desarrollo de sondas diana para la actividad de enzimas se ha convertido en un importante campo de estudio para la investigación biomédica. Son compuestos que se diseñan en base a relaciones específicas con los sitios activos enzimáticos, de forma que no interfieren en las complejas redes metabólicas del sistema. Al interactuar con el catalizador enzimático, van a ver modificada su estructura molecular y con ella sus propiedades fluorescentes, permitiendo, de este modo, la visualización y monitorización del proceso en tiempo real.¹

Tan *et al.*,² desarrollaron en 2017 una sonda basada en fluorescencia NIR (*near infrared*) que detecta de manera selectiva la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), demostrando su biocompatibilidad y rápida internalización celular en células HeLa y ratones (**Figura 1**).

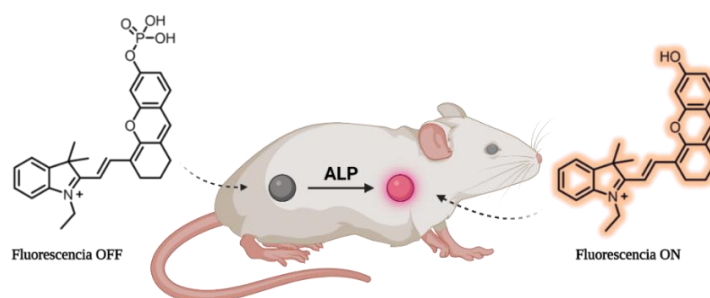


Figura 1: Esquema de la reacción basada en una sonda fluorescente de infrarrojo cercano para monitorización de actividad ALP en células vivas y ratones. (*Elaboración propia*)

Esta enzima constituye un ejemplo de una enzima con interés clínico que se emplea como indicador patológico. La ALP se localiza, mayoritariamente, anclada en la membrana plasmática de las células y se caracteriza por catalizar la hidrólisis de ésteres de fosfato en proteínas y ácidos nucleicos, entre otros.¹ Valores elevados de esta enzima en sangre se relacionan con enfermedades tales como los desórdenes metabólicos óseos,³ síndrome metabólico⁴ o incluso algunos tipos de cáncer como el hepatocarcinoma⁵ o el de próstata⁶, relacionándose estos valores con un peor pronóstico postoperatorio e índice de reaparición tumoral.

En el grupo de Zhang,⁷ desarrollaron en 2019 una sonda fluorescente (basada en un efecto de transferencia de protón intramolecular en estado excitado, ESIPT), que incorporaba un motivo director a mitocondrias, además del grupo fosfato diana para la actividad de la ALP. Esta sonda, en estado fosforilado emite señal de fluorescencia verde ($\lambda = 514 \text{ nm}$) y sufre un cambio en la señal de fluorescencia a rojo ($\lambda = 650 \text{ nm}$) al ser desfosforilada por la ALP presente en las mitocondrias (**Figura 2**), incrementando de este modo la capacidad de control en la localización en la monitorización del proceso.

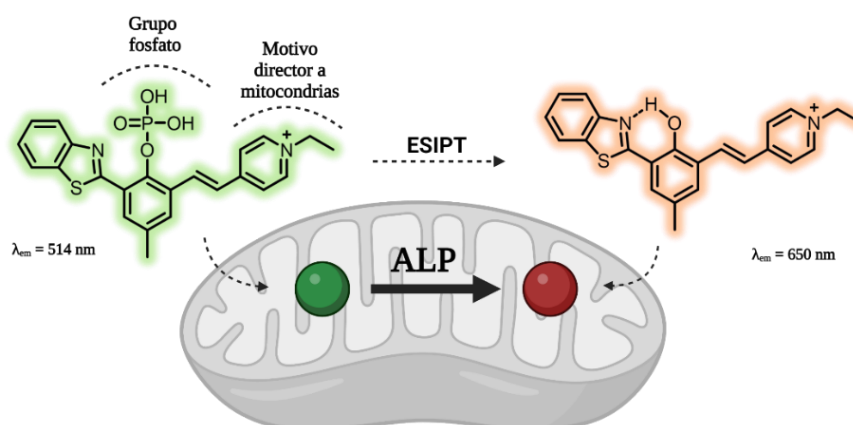


Figura 2: Esquema del funcionamiento del efecto ESIPT de la sonda con grupo director a mitocondrias. (Elaboración propia)

También se describieron sondas fluorescentes para otras enzimas como por ejemplo la tirosinasa, implicada en procesos cutáneos o la monoamina oxidasa (MAO-A y MAO-B) relacionadas con desórdenes cognitivos y neurodegenerativos, respectivamente, entre muchas otras.⁸

1.2. La química bioortogonal en el mundo celular.

En el año 2003 surge de la mano de Carolyn Bertozzi la Química Bioortogonal, centrada en el desarrollo de herramientas químicas para realizar reacciones no naturales en ambientes biológicos y celulares. Estas

reacciones bioortogonales han de tener lugar en condiciones fisiológicas, por lo que deben ser biocompatibles evitando la generación de especies tóxicas. Además, se caracterizan por una gran quimioselectividad y cinética rápida para no interferir con las propias rutas metabólicas del sistema.⁹

Aunque en sus inicios la Química Bioortogonal se empleó para monitorizar y visualizar los procesos fisiológicos que tienen lugar a nivel celular y subcelular, desde el descubrimiento de la compatibilidad de los procesos organometálicos con los biológicos, el estudio y diseño de catalizadores de reacciones basados en metales de transición se ha disparado en los últimos años para el estudio de reacciones en medios celulares. A pesar de ello, las eficiencias alcanzadas siguen distando mucho de las conseguidas por los enzimas naturales.¹⁰

En este campo, destacan sobre todo las reacciones de ruptura de enlace promovidas por metales de transición, como el rutenio o el paladio, que fundamentalmente se han empleado para la liberación de fármacos y monitorización de procesos mediante la generación de moléculas fluorescentes.^{11,12} El proceso consistiría en el empleo de una sonda modificada previamente de forma que alguna de sus propiedades se vea alterada. Una vez esta sonda entra en la célula, sufre una reversión de esta modificación previa, a través de una reacción catalítica promovida por un catalizador organometálico bioortogonal introducido también en el medio celular, volviendo a recuperarse la propiedad que permite monitorizar el transcurso del proceso. (Figura 3)

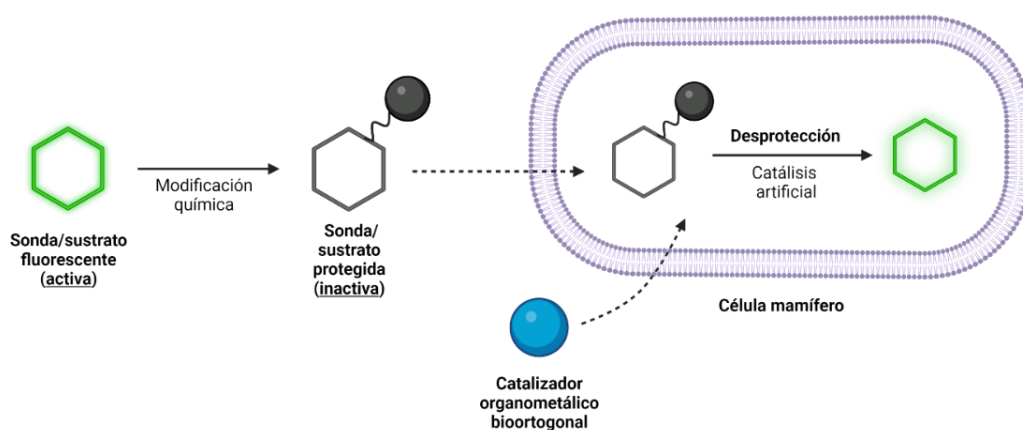


Figura 3: Esquema del proceso bioortogonal promovido por catálisis artificial. (Elaboración propia)

Del mismo modo que mediante la incorporación de grupos directores a ciertos orgánulos se podía monitorizar de manera localizada la actividad enzimática, estos catalizadores metálicos también van a poder ser diseñados de manera que su actividad catalítica se dirija a un compartimento celular concreto.

Un ejemplo de esto es el catalizador de rutenio (**Ru1**) descrito por Tomás-Gamasa y colaboradores en el 2016. Tomando como base catalizadores de rutenio diseñados por Völker y Meggers,^{13,14} pioneros en el campo, desarrollaron un catalizador capaz de llevar a cabo reacciones de desprotección (de aminas con grupos aliloxycarbonilo (alloc) y alcoholes con grupos alilo) de forma selectiva en mitocondrias (**Figura 4**).¹⁵ Para ello, incorporaron como vector director en el catalizador metálico un grupo trifenilfosfonio que, por su lipofilia y carga positiva, promueve la entrada del catalizador a dicho orgánulo. Para poder visualizar su localización modificaron el grupo trifenilfosfonio con un grupo pireno que emite fluorescencia azul. Como sonda emplearon el fluoróforo rodamina (Rho) protegido con grupos alloc, diana por lo tanto para la desprotección promovida por el catalizador.

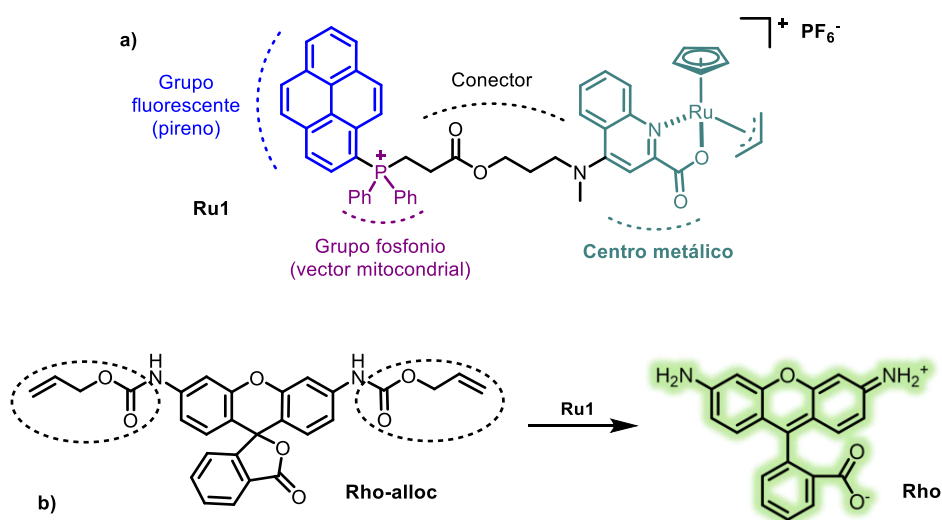


Figura 4: a) Estructura del complejo de rutenio **Ru1** con grupo director a mitocondrias y grupo fluorescente (pireno) integrado. b) Reacción de desprotección de Rho-alloc promovida por el complejo de rutenio **Ru1**.

Los resultados de los ensayos *in vivo* empleando el catalizador **Ru1**, mostrados en la **Figura 5**, confirmaron la acumulación del catalizador en las mitocondrias gracias a la presencia del grupo director trifenilfosfonio y su funcionamiento como catalizador de desprotección de aminas-alloc.

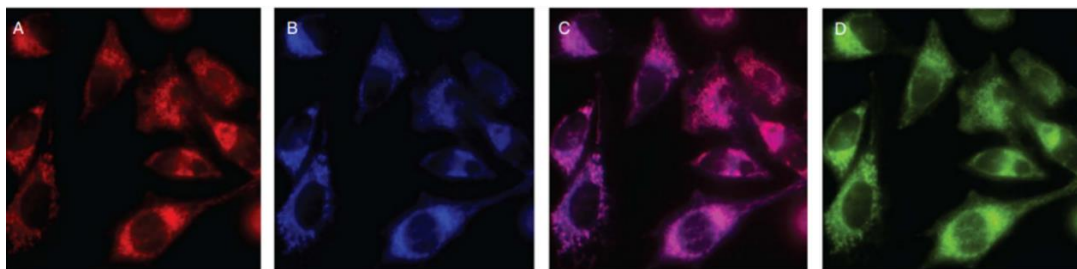


Figura 5: Microscopía de fluorescencia de la reacción de desprotección promovida por el catalizador Ru1 de Rho-alloc. En el panel A la señal roja procedente del marcaje de las mitocondrias de células HeLa con TMRE, un marcador mitocondrial comercial. El panel B muestra la emisión de fluorescencia azul propia del grupo pireno del catalizador. Finalmente, la total superposición de las imágenes de A y B, que se muestra en el panel C, revela la localización del catalizador en las mitocondrias. En el panel D, se observa la fluorescencia que se genera tras la reacción de desprotección promovida por el catalizador de Ru de la Rho-alloc, señal que también colocaliza con este orgánulo. Esto confirma que el nuevo complejo no sólo tiende a acumularse en mitocondrias, sino que mantiene su actividad en las mismas.¹⁵

1.3. Combinación de catálisis organometálica y enzimática.

Teniendo en cuenta el potencial de los catalizadores organometálicos de rutenio como catalizadores de reacciones bioortogonales de desprotección, y las increíbles propiedades de los catalizadores enzimáticos en cuanto a cinética y selectividad, además del interés biomédico de muchas de estas, podría ser interesante el diseño de reacciones bioortogonales tándem en las cuales ambos catalizadores colaboran entre sí. Esta combinación de catálisis organometálica y enzimática contribuiría al diseño de nuevas redes metabólicas artificiales, así como también al desarrollo de nuevas técnicas biomédicas y síntesis de fármacos. Sería un proceso tándem de dos etapas consecutivas en las que el producto de la primera se convertiría en el sustrato de la segunda.

2. Objetivos.

Los objetivos principales de este trabajo son:

1. Sobreexpresión del enzima fosfatasa alcalina en células de mamífero mediante transfección de un plásmido de expresión.
2. Medición del grado de expresión, a fin de comprobar la viabilidad de la combinación de la actividad de estas enzimas con la de catalizadores organometálicos.

La combinación en reacciones tándem de estas reacciones artificiales con los procesos enzimáticos celulares, tendría como fin la construcción de circuitos metabólicos exógenos o descubrimiento de nuevos tipos de herramientas biomédicas que puedan ejecutarse *in vivo*.

3. Material y métodos.

3.1. Materiales.

Material biológico

Cepas bacterianas: Para el crecimiento del plásmido se usó la cepa XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, California; genotipo: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac[F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^R)]*)).

Líneas celulares: La sobreexpresión del plásmido se llevó a cabo en células de mamífero de las líneas HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) y Vero (células de riñón de mono verde africano).

Plásmido recombinante: Se empleó el plásmido p-BLUESCRIPT CMV-SEAP (Addgene #24595), que codifica para el gen SEAP (*Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase*) (35-1552) bajo el control del promotor de CMV (citomegalovirus) (1717-1920), la presencia el gen AmpR (3300-4160) le confiere resistencia a ampicilina, carbenicilina y similares.

Material no biológico

Medios de cultivo:

Medio LB: 0.1% triptona, 0.5% extracto de levaduras, 1% NaCl, suplementado con ampicilina (1:1000) cuando era necesario. Para cultivos sólidos, se suplementó con 1.5% bacto-agar. **Medio DMEM stock:** comercial (Invitrogen, Barcelona, España), conteniendo 3.7 g·L⁻¹ de NaHCO₃, 4.5 g·L⁻¹ de glucosa, y piruvato. **Medio DMEM completo:** para el mantenimiento de las líneas celulares se suplementó el medio DMEM stock con 10% de FBS, 1% de glutamina y 1% de penicilina y estreptomina.

Disoluciones y tampones:

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂PO₄ y 1.5 mM KH₂PO₄. **Tampón de lisis:** 0.25% Tween-20, 1 mM DDT, 200 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7.5), 2 mM MgCl₂. **PEI** (polietilimina). **NBT/BCIP** para detección

de actividad ALP: 200 μ L de disolución stock por cada 10 mL (0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 NaCl, 0.05 M $MgCl_2$). Paraformaldehído al 4% en PBS. TBS: 20 mM Tris, 500 mM NaCl. TBS-leche: TBS y 4% de leche desnatada.

3.2. Procedimientos generales.

3.2.1. Transformación bacteriana.

Viales de bacterias competentes (XL1-BLUE) conservados a -80 °C se descongelaron en hielo para proceder a su transformación con el plásmido p-BLUESCRIPT CMV-SEAP. A continuación, en un tubo Eppendorf, a 100 μ L de la suspensión de bacterias se añadió 1 μ L de plásmido y se agitó suavemente. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, seguido de un choque térmico de 1 min a 42 °C y, a continuación, se mantuvo 2 min en hielo. Se añaden 900 μ L de LB sin antibiótico y se incuba a 37 °C durante 40-60 min. Seguidamente, se centrifuga 1 min a 3000 x g, se retira el sobrenadante volcando el tubo y se resuspende el *pellet* en el volumen restante (aprox. 50 μ L). La suspensión obtenida se siembra en una placa LB-agar con el antibiótico correspondiente (ampicilina en este caso) y se deja toda la noche en la estufa a 37 °C.

3.2.2. Crecimiento bacteriano en medio líquido.

Para poner a crecer las bacterias transformadas con el plásmido, se pica una colonia de la placa LB-agar con ampicilina y se tira la punta de la micropipeta en 50 mL de LB con el antibiótico ampicilina (1:1000), en este caso, en un matraz Erlenmeyer con 4 volúmenes de aire, con respecto a los 50 mL de LB, para asegurar un buen crecimiento. Se deja toda la noche en agitación.

3.2.3. Purificación del plásmido por Midiprep (kit PureYield™ Plasmid Midprep System)

PREPARACIÓN DEL LISADO (parámetros para 50 mL): se centrifuga el cultivo líquido con las bacterias crecidas a 7 000 x g durante 10 min empleando la centrífuga de rotor fijo. A continuación, se resuspende el *pellet* en la disolución de Resuspensión (3 mL) y se añade la disolución de Lisis Celular para lisar las bacterias (3 mL). Se invierte el Falcon 3-5 veces para homogeneizar la mezcla y se incuba 3 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añade la disolución de Neutralización (5 mL) para una buena separación del DNA del resto del material bacteriano. Se invierte el Falcon 3-5 veces para mezclar y se incuba 2-3 min a temperatura ambiente para asegurar una buena limpieza.

PURIFICACIÓN DE DNA POR CENTRIFUGACIÓN (empleando la centrífuga de rotor fijo): se coloca la columna azul de limpieza del kit en un nuevo Falcon de 50 mL y se vierte el lisado en ella, incubando durante 2 min para permitir a los residuos subir. A continuación, se centrifuga a 1500 x g durante 5 min (si el lisado siguiese en la columna, repetir el centrifugado). Se coloca la columna blanca del kit, donde quedará retenido el DNA, en un tubo de centrífuga de 50 mL. Se vierte el lisado ya centrifugado en la columna y se centrifuga de nuevo a 1500 x g durante 3 min.

LAVADO: se añaden 5 mL de *Endotoxin Removal Wash* (con isopropanol) a la columna blanca. Se centrifuga a 1500 x g 3 min, se vacía la disolución recogida y se vuelve a poner la columna con el ADN en el mismo tubo. Se añaden 5 mL de *Column Wash solution* (con etanol) a la columna blanca y se centrifuga de nuevo a 1500 x g 5 min. Se saca la columna y se tira la disolución. Para asegurar la eliminación del etanol, se centrifuga a 1500 x g durante 10 min y, a continuación, se deja secar 10 min al aire.

ELUCIÓN: en un nuevo tubo, se añaden 400 µL de *Nuclease-Free Water* a la columna y se centrifuga a 1500 x g durante 5 min. Se recoge la elución en un tubo Eppendorf (Elución 1) y se repite el proceso para una segunda elución (Elución 2).

PRECIPITACIÓN DE DNA: para precipitar el DNA y tener la concentración de plásmido deseada, se añade a cada tubo 1/10 del volumen de la disolución (400 µL) de acetato de sodio (3M, pH 5.3), es decir, 40 µL, y 2 volúmenes del volumen total de etanol (100%) (800 µL). Se incuba a -20 °C al menos 30 min y se centrifugan las muestras 30 min a 16000 x g (4 °C) en la microfuga y se obtiene finalmente el *pellet* de DNA tras retirar el sobrenadante. Se deja secar y el *pellet* se resuspende en 100 µL de agua estéril. A continuación, se juntan las suspensiones procedentes de ambas eluciones en un mismo tubo y se procede a la medición de la concentración del plásmido en el Nanodrop (ND-1000 Thermo).

3.2.4. Transfección celular con plásmidos.

La transfección celular con dicho plásmido se llevó a cabo para dos tipos de líneas celulares: HEK-293 y Vero. En placas de 12 pocillos, se sembraron las células con 24 h de antelación a la transfección. El día de la transfección, se prepararon tantos tubos estériles como pocillos de la placa se deseaba transfectar. En cada tubo estéril, se añadieron 100 µL de disolución D-MED Stock y se añadió el volumen correspondiente a 1 µg del

plásmido purificado, y 3 μ L de PEI como agente de transfección, asegurándose de mezclar bien con el medio. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, el contenido de los tubos se pipeteó gota a gota sobre los correspondientes pocillos de las células y se dejaron en incubación en la estufa a 37 °C.

Recogida de extractos de lisados celulares: la recogida de los lisados se efectuó a tres tiempos diferentes de incubación: 24, 48 y 72 h. Para ello, se retiró el medio por aspiración, se lavaron con PBS (3 x 1mL) y, por último, se recogieron en 100 μ L de tampón de lisis frotando con la pipeta el fondo de los pocillos para asegurar una recolección más efectiva. Los lisados se recogieron en tubos que se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

3.3. Evaluación del grado de sobreexpresión.

3.3.1. Detección de actividad ALP mediante NBT/BCIP Stock Solution.

Para la determinación del grado de sobreexpresión de la enzima ALP en células HEK-293 y Vero (transfectadas y sin transfectar) se tomaron 10 μ L de los extractos recogidos en tampón de lisis a 24, 48 y 72 h y se le añadió a cada muestra 200 μ L de disolución NBT/BCIP (kit específico para detección de actividad ALP) previamente preparada. A continuación, se mantuvieron 30 min en incubación en la estufa a 37 °C y el grado de sobreexpresión se midió por absorbancia en UV-Vis empleando el Nanodrop.

3.3.2. Fijación de células para análisis por microscopía.

Las células HEK-293 y Vero destinadas a este análisis, se sembraron con 24 h de antelación a la transfección en placas de 12 pocillos sobre cubres. Pasadas 48 h del momento de su transfección, se procedió a la fijación de ambas líneas celulares (transfectadas y sin transfectar) para su posterior análisis por microscopía. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS x1 (2 x 1 mL), se adicionaron 500 μ L de disolución NBT/BCIP previamente preparada y se dejó 10 min en el agitador. Seguidamente, se realizó otro lavado con PBS (1 mL) y se prepararon las muestras para observar al microscopio empleando 20 μ L de Mowiol DABCO para el montaje. Las muestras se observaron en un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara Olympus DP-71.

3.3.3. Dot-Blot empleando el aparato de Microfiltración Bio-Dot®.

Para el montaje del aparato Bio-Dot® se introducen 3 láminas de papel de filtro Bio-Dot SF sobre la junta de estanqueidad, y a continuación se coloca la membrana (9 x 12 cm) membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad #1620094), previamente hidratada en TBS durante 10 min. Una vez colocada la membrana, se ajusta la parte

superior del aparato apretando los tornillos 2 a 2 en cruz para asegurar una buena filtración por vacío. Para asegurar la correcta hidratación de las láminas, se rellenaron todos los pocillos del aparato con 250 μ L de TBS y se conectó el sistema a vacío. Para evitar la difusión entre pocillos a la hora de filtrar, aquellos que no iban a ser empleados se bloquearon con la adición de 300 μ L de TBS + leche.

Una vez efectuado el montaje e hidratación del aparato se añadieron las disoluciones de los lisados celulares previamente preparadas (se tomaron 10 μ L de extracto de cada una de las muestras a analizar, se centrifugaron y a los correspondientes sobrenadantes se les añadieron 250 μ L de TBS). Tras añadir los extractos, se vuelve a conectar el aparato a vacío para que tenga lugar su filtración. Acto seguido, se añadieron 250 μ L de TBS en estos pocillos y conectó de nuevo a vacío el sistema para el lavado de las proteínas que quedaran retenidas en la membrana. Para el revelado de las proteínas retenidas en la membrana, se desmonta el aparato Bio-Dot tras volcar el contenido de los pocillos con TBS y leche, y se sumerge en una disolución de NBT/BCIP (10 mL) para determinación selectiva de la actividad ALP.

4. Resultados y Discusión.

4.1. Evaluación del grado de sobreexpresión enzimática ALP en células HEK-293 y Vero tras transfección con plásmido p-BLUESCRIPT CMV SEAP.

4.1.1. Medición actividad ALP mediante NBT/BCIP Solution.

El plásmido p-BLUESCRIPT CMV SEAP se creció y purificó según los procedimientos descritos, obteniéndose finalmente a una concentración de 480 ng/ μ L. A continuación, se empleó para la transfección de las líneas celulares HEK-293 y Vero y los lisados se recogieron para tiempos de incubación de 24, 48 y 72 h. El grado de sobreexpresión enzimática se determinó empleando el kit NBT/BCIP, el cual interacciona con la ALP dando lugar a un precipitado azul como resultado de una reacción redox posterior a la desfosforilación del sustrato BCIP. Los resultados observados por medición de absorbancia en UV-Vis en el Nanodrop mostrados en la **Figura 6**, indican un aumento de la presencia de actividad ALP a medida que van pasando las horas desde el momento de la transfección en el caso de las células HEK-293. Sin embargo, en el caso de la línea celular Vero, la transfección no sería lo suficientemente exitosa como para producir un aumento significativo de la actividad ALP en relación a las células sin transfectar.

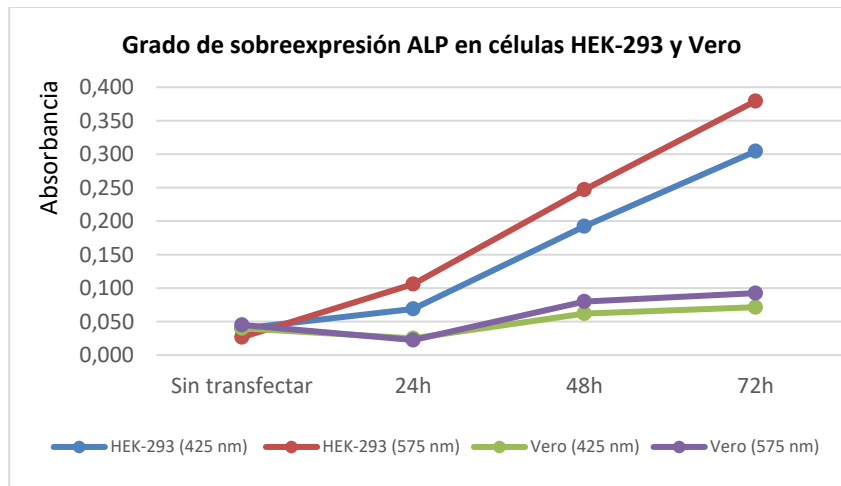


Figura 6: Representación valores medios de absorbancia obtenidos en las transfecciones de células con plásmido p-BLUESCRIPT CMV SEAP de HEK-293 y Vero realizadas. En el caso de la línea celular HEK-293 se observa un aumento progresivo de la actividad ALP desde el día de la transfección. Al contrario, las células Vero, no parecen presentar un aumento significativo de dicha actividad enzimática en comparación con las células sin transfectar).

4.1.2. Comparación de células transfectadas y sin transfectar por microscopía.

Coincidiendo con lo observado a través de las anteriores mediciones de señal de absorbancia, en las micrografías de células fijadas que se muestran a continuación (**Figura 7**) se puede observar como el tratamiento con NBT/BCIP de células transfectadas (y por tanto con niveles sobreexpresados de enzima ALP) va a dar lugar a una mayor cantidad de depósitos azulados que en el caso de las células sin transfectar, y que poseen por tanto niveles fisiológicos de ALP. Este hecho, del mismo modo que ocurría en el análisis por absorbancia, será mayormente notable en el caso de las células HEK-293 (paneles A y B), que en las Vero, (paneles C y D), denotando así una menor cambio en la actividad de la enzima ALP tras las transfección en estas últimas.

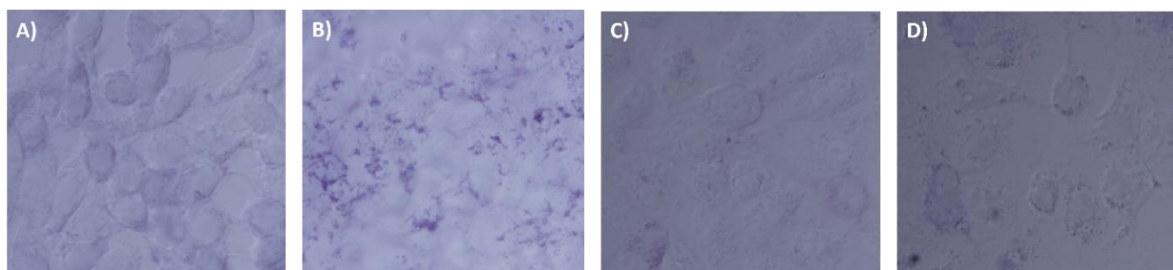


Figura 7: Análisis microscópico en rango UV-Vis de células HEK-293 (A, B) y células Vero (C, D). Los paneles A y C, se corresponderían con las células HEK-293 y Vero, respectivamente, sin transfectar, de ahí que la presencia de depósitos azules al reaccionar con el kit NBT/BCIP específico para actividad ALP sea muy reducida. Sin embargo, al observar los paneles B y D, correspondientes a células transfectadas HEK-293 y Vero, respectivamente, vemos que sí va a haber depósitos de precipitado azulado en lo que sería la membrana plasmática de la célula, coincidiendo así con su

principal localización. Este hecho será mucho más notable en el caso de las células HEK-293 que las Vero, coincidiendo con lo observado por absorbancia de los extractos).

4.1.3. Detección de la enzima ALP mediante técnica Dot- Blot por microfiltración.

Siguiendo el montaje y procedimiento descrito anteriormente, se llevó a cabo la detección de la enzima ALP mediante la técnica Dot-Blot. Tras la microfiltración de los extractos de lisados celulares, la enzima se queda retenida en la membrana de nitrocelulosa, de manera que al tratarla luego con el kit NBT/BCIP se va a revelar la presencia de esta con mayor o menor intensidad en función del grado de sobreexpresión alcanzado en dichos extractos. Dado que las células de la línea Vero no mostraban resultados de sobreexpresión muy satisfactorios, esta técnica sólo se llevó a cabo con los lisados de células HEK-293, con y sin transfectar, obteniéndose la membrana con la enzima revelada que se observa en la **Figura 8**.

Los resultados obtenidos, coinciden con lo esperado y muestran un mayor del grado de sobreexpresión enzimática al comparar células transfectadas con respecto a sin transfectar, así como también un aumento de la expresión con el aumento de las horas de incubación dentro de las propias transfectadas.

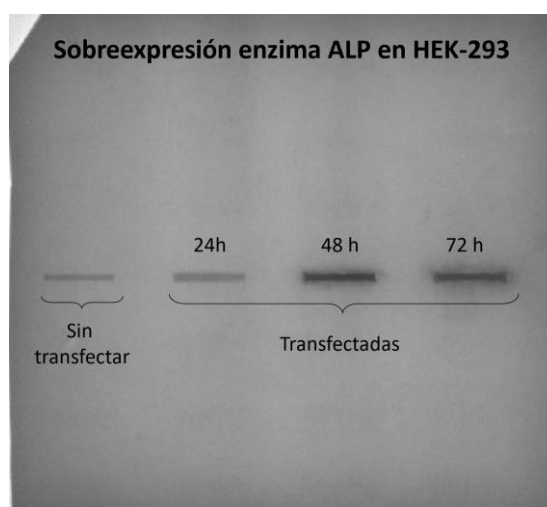
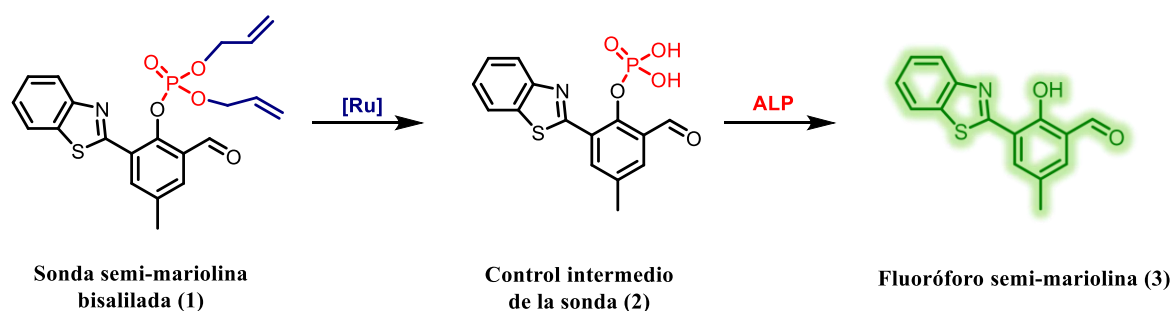


Figura 8: Análisis Dot-Blot del grado de sobreexpresión de la enzima ALP lisados de células HEK-293. Se observa la mayor expresión de la enzima en las células transfectadas con respecto a las sin transfectar, y un aumento de la presencia de enzima con el aumento de las horas de incubación tras la transfección con el plásmido, siendo especialmente notable el aumento de la concentración en el paso de 24 a 48 h.

4.2. Estudios de viabilidad de una reacción *tándem in cellulo*.

4.2.1. *Funcionamiento de la sonda/sustrato de la reacción.*

Para los estudios de la reacción *tándem*, llevados a cabo en el TFG homólogo del Grado en Química, se diseñó y sintetizó una sonda sustrato (**1**) que involucraría dos reacciones encadenadas, como se muestra en el **Esquema 1**: una desprotección mediada por rutenio (catálisis artificial metálica) y una reacción promovida por la enzima fosfatasa alcalina (ALP) (catálisis natural). Para ello, el fluoróforo semi-mariolina (**3**), con fluorescencia verde por efecto ESIPT, se modificó incorporando las funciones reactivas para cada catalizador: un grupo alilo, para la desprotección mediada por rutenio, y por otro, el grupo fosfato sobre el que actuará la ALP. Al completarse la reacción *tándem*, se recuperará la fluorescencia del compuesto **3**, permitiendo de ese modo la monitorización del proceso en tiempo real.



Esquema 1: Etapas del proceso *tándem* diseñado.

4.2.2. *Evaluación de la reacción tándem mediante ensayos in vitro.*

Una vez obtenidos los lisados de células HEK-293, tanto con niveles sobreexpresados como con niveles fisiológicos de ALP, se iniciaron los estudios *in vitro* en una disolución tamponada de fosfato de pH 7.2 como el PBS. Para ello, se prepararon diferentes tubos donde se fueron añadiendo las diferentes posibles combinaciones de los reactivos de interés: adición de complejo de rutenio y de lisado, ausencia de rutenio, ausencia de extracto y ausencia de ambos. Los resultados, resumidos en la **Figura 9**, se analizaron por HPLC-MS.

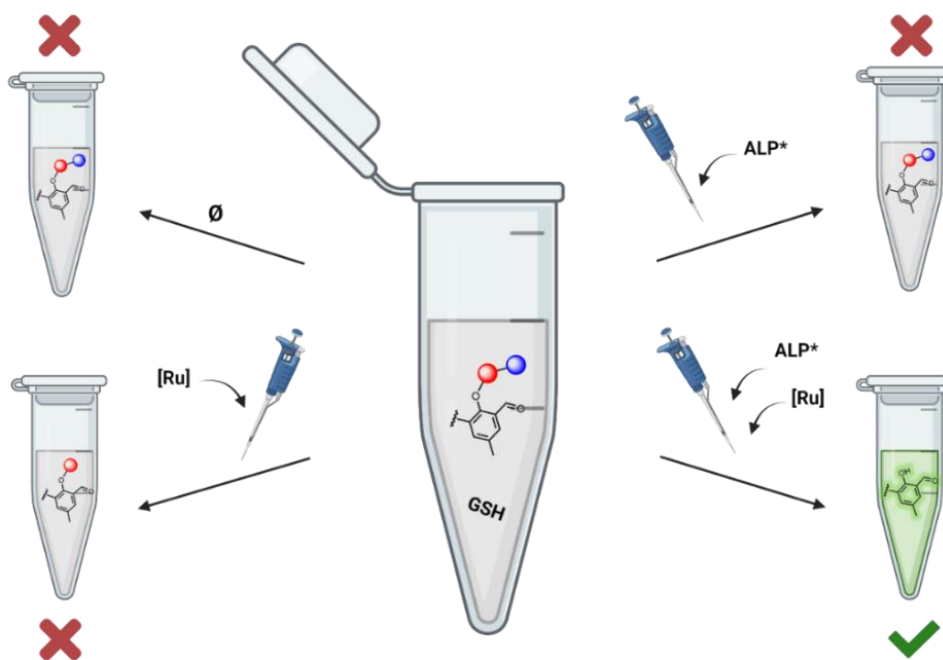


Figura 9: Esquema resumen de los ensayos in vitro llevados a cabo y sus resultados (*) La enzima ALP empleada procede de 2 stocks de lisados celulares diferentes: células transfectadas con ALP sobreexpresada y células sin transfectar con niveles fisiológicos de ALP. El glutatión reducido (GSH) funciona como activante del complejo de rutenio. (*Elaboración propia*)

Solo se aprecia la presencia del producto **3**, resultado de la reacción tándem, en aquellos ensayos en los que se añade tanto lisado celular, que contiene la enzima ALP, como catalizador de rutenio. Al contrario, en aquellos experimentos que transcurren en ausencia de alguno de los dos catalizadores, se detectaron los intermedios de reacción, correspondientes, pero no el fluoróforo producto **3** de la reacción tándem.

A pesar de probar la reacción a distintos tiempos de incubación, no se observaron diferencias entre el stock de células transfectadas, con altos niveles de ALP, y sin transfectar, con niveles fisiológicos. Esto podría deberse a una situación de exceso de concentración de ALP en ambos extractos, en relación a la necesaria para que tenga lugar la reacción, de manera que en futuros experimentos se emplearán diluciones de los extractos para poder apreciar diferencias en la actividad de la ALP al trabajar a menores concentraciones de enzima.

4.2.3. Evaluación de la reacción tándem en cultivos celulares.

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, se procedió a estudiar dicha transformación en el interior de las células vivas usando de nuevo células HEK-293 transfectadas siguiendo los procedimientos previamente descritos. El procedimiento empleado se encuentra resumido en la **Figura 10**.

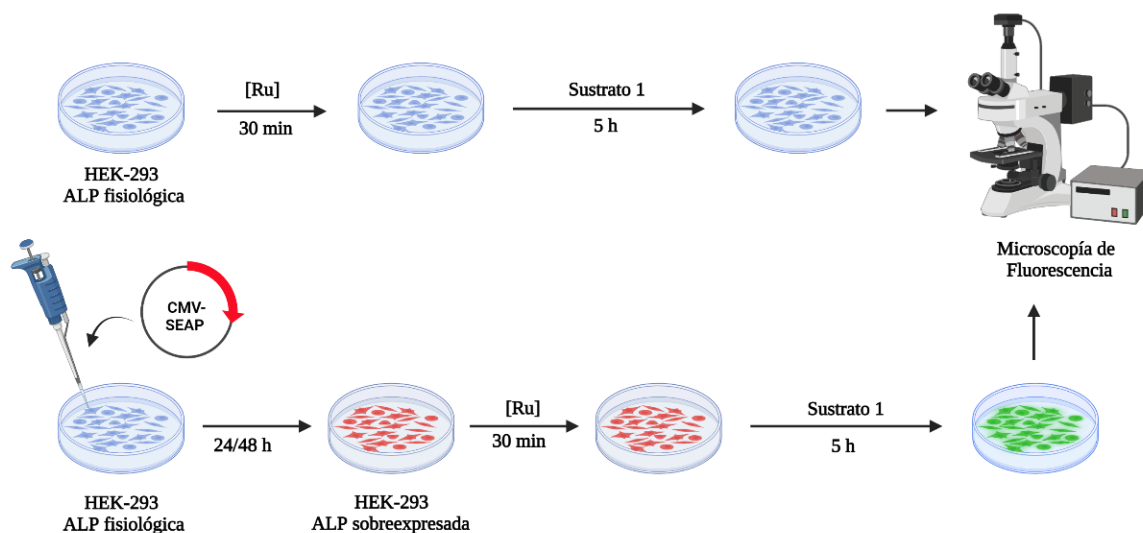


Figura 10: Procedimiento experimental llevado a cabo en estudios *in cellulo*. Las células (con ALP sobreexpresada y con niveles fisiológicos) se incubaron con los dos complejos de rutenio **Ru2-AG** (con grupo director a aparato de Golgi) y **Ru3-RE** (con grupo director a retículo endoplasmático), previamente empleados en el grupo del Prof. Mascareñas, durante 30 min y a una concentración de 25 μM en 300 μL de DMEM. A continuación, se realizaron dos lavados con DMEM (2 x 300 μL) para eliminar el complejo de rutenio restante del medio extracelular asegurando así el carácter intracelular del proceso. Las células resultantes se incubaron con el sustrato **1** (50 μM) durante 4-5 h. (*Elaboración propia*)

Dado que únicamente el producto **3** del proceso tándem es fluorescente y, ni el sustrato inicial ni el intermedio que se genera entre ambas reacciones (**2**) presenta fluorescencia, un aumento en la intensidad de esta solo puede ser debido a la formación del producto **3** al finalizar correctamente la reacción. Las micrografías obtenidas como resultado de los ensayos llevados a cabo con células HEK-293 sin transfectar y células HEK-293 transfectadas con tiempos de incubación de 24 y 48 h se muestran en la **Figura 11**. Coincidiendo con los resultados obtenidos en la sección 4.1. se observará un incremento de señal de fluorescencia acorde con la mayor presencia de enzima ALP en el medio, siendo las células sin transfectar las que muestran una señal más débil y las transfectadas con un tiempo de incubación de 48 h las que más.

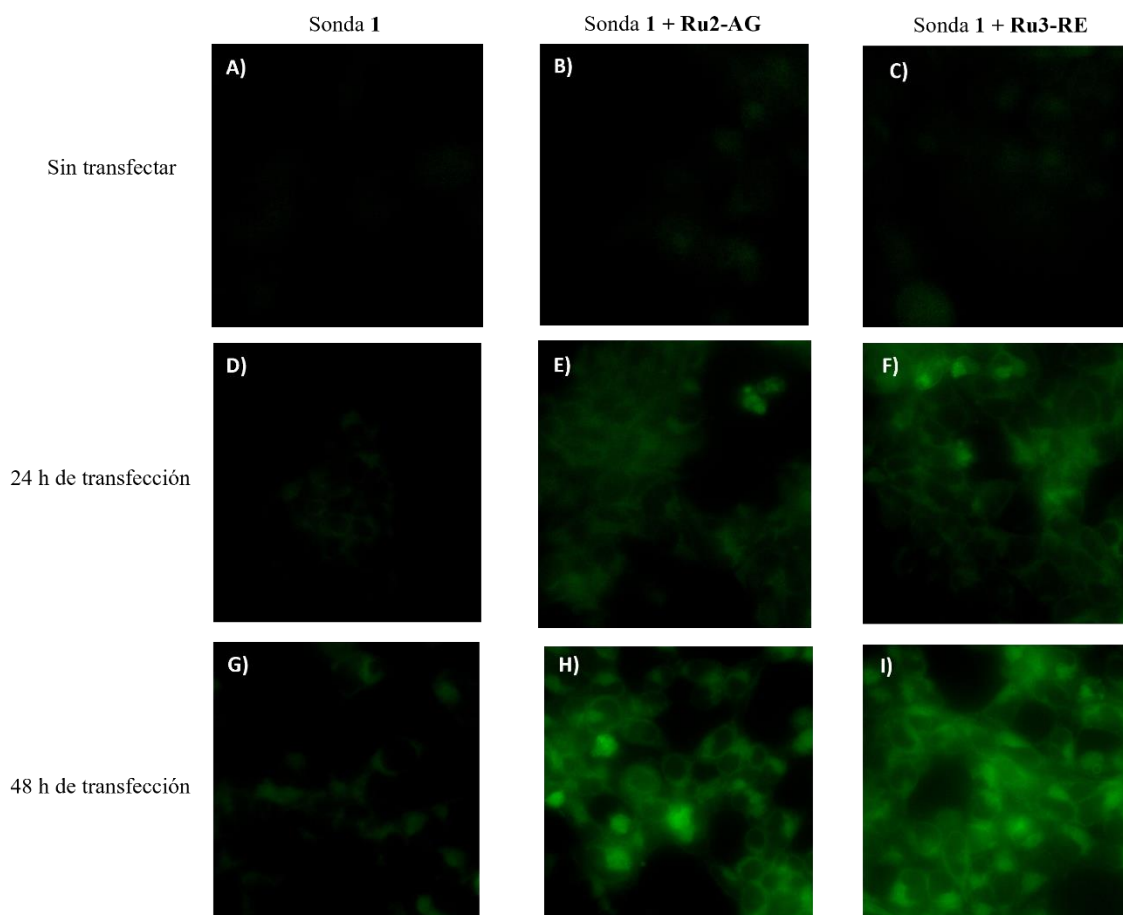


Figura 11: Micrografías de la reacción tándem. Promovida por **Ru2-AG** y **Ru3-RE** en células HEK-293 sin transfectar (A-C), a 24 h de la transfección (D-F) y a 48 h de la transfección (G-I). Se observa un incremento de la fluorescencia por formación del producto 3, concordante con el aumento de la enzima ALP en el medio. Canal verde, $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 490\text{-}580 \text{ nm}$.

5. Conclusiones.

Este trabajo se ha centrado en la sobreexpresión enzimática en diferentes líneas celulares para el desarrollo y estudio de nuevas rutas metabólicas artificiales en sistemas biológicos mediante el diseño de un proceso tándem que combina dos tipos de catálisis: catálisis artificial, promovida por complejos de rutenio, y catálisis natural, mediada por la enzima ALP. Los análisis del grado de sobreexpresión conseguida tras la transfección mostraron una mayor diferencia de actividad ALP entre células transfectadas y sin transfectar en el caso de las células HEK-293 que en las Vero, observándose además el incremento de la actividad enzimática según aumentaba el tiempo de incubación tras la transfección. La evaluación del proceso tándem con la sonda **1** mediante los ensayos *in vitro* en lisados celulares de células HEK-293 e *in vivo* en células HEK-293 vivas (con y sin niveles sobreexpresados de enzima ALP en ambos casos), demuestran la bioortogonalidad y compatibilidad del proceso con los medios biológicos.

6. Bibliografía.

1. Liu, H. W., Chen, L., Xu, C., Li, Z., Zhang, H., Zhang, X. B., Tan, W. (2018). Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging. *Chem. Soc. Rev.*, **47** (18), 7140-7180.
2. Tan, Y., *et al.* (2017). Reaction-Based Off-On Near-infrared Fluorescent Probe for Imaging Alkaline Phosphatase Activity in Living Cells and Mice. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9** (8), 6796–6803.
3. Park, J.C., Kovesdy, C.P., Duong, U., Streja, E., Rambod, M., Nissenson, A.R., Sprague, S.M., Kalantar-Zadeh, K. (2010), Association of serum alkaline phosphatase and bone mineral density in maintenance hemodialysis patients. *Hemodialysis International*, **14** (2), 182-192.
4. Krishnamurthy, V. R. *et al.* (2011) Associations of serum alkaline phosphatase with metabolic syndrome and mortality. *Am J Med*, **124** (6), 566.
5. Kim, J. M. *et al.* (2013). The effect of alkaline phosphatase and intrahepatic metastases in large hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*, **11** (40).
6. Rao, S. *et al.* (2017). Tumour-derived alkaline phosphatase regulates tumour growth, epithelial plasticity and disease-free survival in metastatic prostate cancer. *Br J Cancer*, **116**, 227–236.
7. Zhang, P. *et al.* (2019). Ratiometric Fluorescent Strategy for Localizing Alkaline Phosphatase Activity in Mitochondria Based on the ESIPT Process. *Anal. Chem.*, **91** (19), 12377–12383.
8. Wu, X., Shi, W., Li, X., Ma, H. (2019). Recognition Moieties of Small Molecular Fluorescent Probes for Bioimaging of Enzymes. *Chem. Res.* **52** (7), 1892–1904.
9. Fu, H., Li, Y. (2020). Bioorthogonal ligations and cleavages in chemical biology. *ChemistryOpen*, **9** (8), 835-853.
10. Völker, T., Meggers, E. (2017). Chemical Activation in Blood Serum and Human Cell Culture: Improved Ruthenium Complex for Catalytic Uncaging of Alloc-Protected Amines. *ChemBioChem*, **18** (12), 1083-1086.
11. Völker, T., Meggers, E. (2015). Transition-metal-mediated uncaging in living human cells - an emerging alternative to photolabile protecting groups. *Current Opinion in Chemical Biology*, (25), 48-54.
12. Li, J., *et al.* (2014). Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. *Nature Chem* **6**, 352–361.
13. Streu, C., Meggers, E. (2006). Ruthenium-Induced Allylcarbamate Cleavage in Living Cells. *Angew. Chem Int. Ed.*, **45** (34), 5645-5648.
14. Völker, T., Dempwolff, F., Graumann, P. L., Meggers, E. (2014). Progress towards Bioorthogonal Catalysis with Organometallic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 10536-10540.
15. Tomás-Gamasa, M., Martínez-Calvo, M., Couceiro, Mascareñas, J. L. (2016). Transition metal catalysis in the mitochondria of living cells. *Nat Commun*, **7**, 12538.