



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

ANÁLISIS DE DIFERENTES MOTIVOS DE CORTE PARA PROTEASAS ESPECÍFICAS DE CÉLULAS DE OVÁRIO TUMORALES Y SU USO COMO ELEMENTO TERAPÉUTICO

ANÁLISE DE DIFERENTES MOTIVOS DE CORTE PARA PROTEASAS ESPEFÍCAS DE CÉLULAS DE OVARIO TUMORAIS E O SEU USO COMO ELEMENTO TERAPEUTICO

ANALYSIS OF DIFFERENT CUTTING MOTIFS FOR SPECIFIC TUMOR OVARY CELL PROTEASES AND THEIR STUDY AS A THERAPEUTIC ELEMENT

Elena Rosa Cobián García-Rebull

Curso: 2020 - 2021. Convocatoria: Septiembre

Directores Académicos:

Ángel José Vizoso Vázquez

Mónica Lamas Maceiras

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACS: *American Cancer Society*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNp: Ácido desoxirribonucleico plasmídico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASACO: Asociación de Afectados por Cáncer de Ovario

ATCC. *American Type Culture Collection*

BSA: Albúmina de suero bovino

CV: *Column Volume*

DMEM: *Eagle's minimal essential medium*

DPBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

DTT: Ditioneitol

ECACC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FBS: Suero Fetal Bovino

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

GST: Glutathion-S-Transferasa

HGSC: Carcinoma Seroso de Alto Grado

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

KLK: *Human kallikrein-related peptidase*

LB: Medio Luria-Bertani

LBA: Medio Luria-Bertani con Ampicilina

LGSC: Carcinoma Seroso de Bajo Grado

PARD: Poli ADP-ribosa polimerasa

PBS: Tampón Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS

TAE: Tampón Tris, Acetado, EDTA

TBST: Tris-Buffered Saline Tween

UV: Ultravioleta

INDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 CANCER	7
2.2 CANCER DE OVARIO	8
2.3 AFFIBODY	9
2.4 HER 2	10
2.5 KLKs	11
3. OBJETIVO	12
4. MATERIAL Y METODOS	12
4.1 CLONAJE	12
4.1.1 PCR	12
4.1.2 ELECTROFORESIS DE ADN	13
4.1.3 RECUPERACIÓN DE ADN PLASMIDICO A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA	14
4.1.4 CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS	14
4.1.5 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	14
4.1.6 PURIFICACIÓN DEL ADN DEL PLASMIDO	14
4.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN PROTEINAS	15
4.2.1 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN EN BACTERIAS	15
4.2.2 LISIS DE LAS CÉLULAS POR SONICACIÓN	15
4.2.3 COMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	16
4.2.4 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	16
4.2.5 ELECTROFORESIS	16
4.2.6 WESTERN-BLOT	17
4.3 CULTIVOS CELULARES	17
4.3.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS	17
4.3.2 TRATAMIENTO CON LAS DISTINTAS VARIANTES GST-Z342 Y RECOGIDA DE CÉLULAS	18
4.3.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 RESULTADOS DE PCR	19
5.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEINAS DE FUSIÓN	19
5.3 WESTER BLOT	21

6. CONCLUSIONES	23
6. CONCLUSIÓN.....	Error! Bookmark not defined.
6. CONCLUSIONS	24
7.BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. RESUMEN

El cáncer de ovario es el segundo más común entre mujeres mayores de 40 años, y que, en la mayoría de los casos, es detectado en fases tardías debido a su sintomatología leve en fases temprana, lo que conlleva a una elevada mortalidad con tasas de supervivencia a 5 años menores al 50%. La primera línea de tratamiento para el cáncer de ovario es la cirugía en combinación con quimioterapia, pero los efectos secundarios del tratamiento, la aparición de recidivas y resistencia a dichos fármacos impiden la superación de la enfermedad. Por otro lado, el desarrollo de fármacos de nueva generación como los anticuerpos monoclonales no son todo lo efectivos que se hubiese deseado, debido en general a su rápida eliminación, deficiente biodistribución o elevados costes de producción, entre otras muchas desventajas. Es por esto por lo que surge, y urge, la necesidad de buscar y desarrollar nuevos sistemas terapéuticos basados en nuevos mecanismos de acción y diferentes dianas celulares que ofrezcan alternativas eficaces en el tratamiento de la enfermedad. En el presente trabajo hemos analizado las dianas de corte de cuatro kallkreínas para comprobar su utilidad como diana terapéutica. Para ello analizamos 4 KLKs implicadas en la aparición de tumores combinadas con el marcador celular HER2 para llegar a obtener una construcción específica de células tumorales.

PALABRAS CLAVE: cáncer de ovario, KLK (*Human kallikrein-related Peptidase*), HER2, células tumorales.

1. ABSTRACT

Ovarian cancer is the second most common cancer among women over 40 years of age, and that, in general, is detected in late stages due to mild symptoms in early stages, which leads to high mortality with survival rates of 5 years less than 50%. The first line of treatment for ovarian cancer is surgery in combination with chemotherapy, but the side effects of the treatment, the appearance of recurrences and resistance to these drugs prevent the overcoming of this disease. On the other hand, the development of new generation drugs such as monoclonal antibodies are not as effective as would have been desired, generally due to their rapid elimination, poor biodistribution or high costs, among many other disadvantages. This is why the need to seek and develop new therapeutic systems based on new mechanisms of action and different cellular targets that offer effective alternatives in the treatment of the disease arises and is urgent. In the present

work we have analyzed the cutting targets of four kallikreins to verify their usefulness as a therapeutic target. For this, we analyzed 4 KLKs involved in the appearance of tumors combined with the HER2 cell marker to obtain a specific construction of tumor cells.

KEY WORD: ovarian cancer, KLK (*Human kallikrein-related Peptidasas*), HER2, tumor cells.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CANCER

El cáncer es una de las enfermedades más comunes entre la población y ocurre debido a daños genéticos que derivan en fallos en los mecanismos que controlan el crecimiento y proliferación celular. Los procesos de formación de cáncer son denominados oncogénesis o tumorigénesis y son debidos a una interacción entre la genética y el medio ambiente. En caso de que las células del tumor primario migren hacia nuevos sitios, producirá tumores secundarios que con frecuencia tienen un mayor impacto sobre la salud, en este caso el proceso recibe el nombre de metástasis (Lodish et al, 2016).

Los tumores pueden ser benignos, donde las células que componen los tumores se asemejan a las células normales y pueden funcionar como ellas, mientras que los tumores malignos o cáncer, crecen y se dividen más rápidamente que las normales, no mueren en el tiempo previsto o invaden tejidos cercanos. Algunos tumores como el cáncer de ovario o de mama permanecen encapsulados durante algún tiempo. Los tumores malignos se pueden clasificar como carcinomas, si derivan del endodermo o ectodermo y sarcomas si derivan del mesodermo (Lodish et al, 2016).

En los fallos genéticos están implicadas mutaciones en dos amplias clases de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores, ya que muchos genes de ambas clases codifican proteínas que ayudan a regular el nacimiento o la muerte celular mediante apoptosis y otros codifican proteínas que participan en la reparación del ADN dañado. Los cambios genéticos que se producen en la oncogénesis dan lugar a la alteración de propiedades fundamentales de las células, para dar lugar al fenotipo de célula cancerígena. Estos cambios son la insensibilidad a las señales antiproliferación, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, invasión tisular y metástasis al cambiar su adhesión a las células circundantes o la matriz celular, angiogénesis sostenida

y autosuficiencia en las señales de crecimiento (Lodish et al, 2016).

El cáncer de ovario se clasifica en varios estadios según la extensión de la enfermedad. Los estadios según la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) diferencian los tumores en estadios tempranos (I y II) y estadios avanzados (III o IV), lo que determinará en gran medida la prognosis del paciente y el éxito del tratamiento oncológico elegido (Asociación ASACO).

2.2 CANCER DE OVARIO

Las mujeres poseen dos ovarios que son las glándulas sexuales femeninas y se encuentran en la parte baja del abdomen a ambos lados del útero, siendo los encargados de la producción de las hormonas (estrógenos y progesterona) que aseguran el correcto funcionamiento de los órganos sexuales.

El cáncer de ovario es el segundo cáncer más común en mujeres de más de 40 años después del cáncer de mama. Con frecuencia no se diagnostica hasta que se encuentra en una etapa avanzada debido a sus síntomas generalmente poco notorios, dificultando así su tratamiento curativo. Más del 70% de los cánceres de ovario no se diagnostican hasta que la enfermedad se encuentra en el estadio III o IV (Stewart et al., 2019)

Existen 3 tipos de cáncer de ovario (Figura 1). El carcinoma epitelial es más común y afecta a las células epiteliales que recubren el ovario, el tumor de las células germinales, que están en el interior de los ovarios y que forman los óvulos, y por último el estromal que afecta a las células estromales, las encargadas de producir las hormonas (Asociación ASACO).

Por otro lado, se pueden diferenciar hasta 4 subtipos de carcinoma epitelial: serosos, endometrioides, mucinosos y de células claras.

Los tumores serosos se clasifican en carcinomas serosos de alto grado (HGSC) y en carcinomas seroso de bajo grado (LGSC). Los HGSCS representa del 70% al 80% de casos de todos los subtipos de cáncer de ovario epitelial, mientras que los LGSC representan menos del 5%. Los subtipos endometrioide, mucinoso y de células claras representan el 10%, 3% y 10% respectivamente (Stewart et al., 2019).

La detección del cáncer de ovario es complicada debido a que sus síntomas son poco notorios. CA125 era un antígeno del cáncer utilizado como marcador tumoral con

intención de llegar a ser un método de detección, hasta que fue rechazado tras descubrir que carecía de especificidad y sensibilidad.

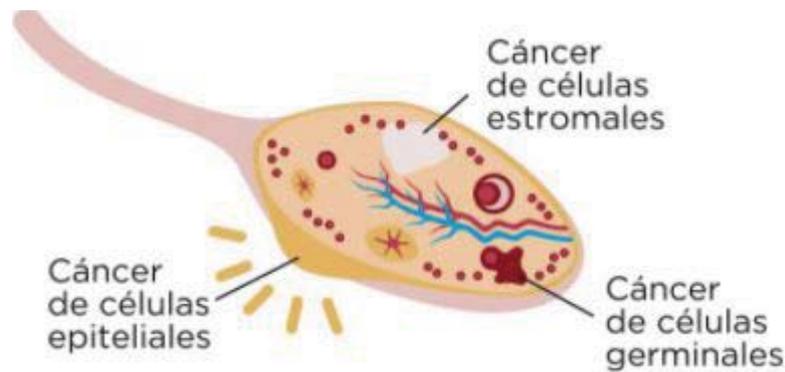


Figura 1: Tipos de cáncer de ovario. Fuente: www.teknogin.com

Debido a que las mutaciones genéticas pueden aumentar significativamente el riesgo de desarrollar cáncer ginecológico, la detección genética es una opción para descubrir el estado de riesgo, pero sin embargo de momento, un diagnóstico verdadero proviene de una biopsia de tejido de muestra (Stewart et al., 2019).

El tratamiento para el cáncer de ovario ha sido tradicionalmente una combinación de quimioterapia y cirugía. La quimioterapia que se utiliza con más frecuencia consiste en carboplatino y paclitaxel (Taxol), aunque el cisplatino se puede usar en lugar del carboplatino, y el docetaxel (Taxotere) se puede usar en lugar del paclitaxel (ACS).

Uno de los tratamientos novedosos para tratar el cáncer de ovario es el uso de inhibidores de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa). Estas proteínas ayudan a la autorregeneración de las células y las células cancerosas también las utilizan para recuperarse de los daños que les ocasiona la quimioterapia. Por esto es de gran interés utilizar los inhibidores de las PARP para evitar que las células cancerosas se regeneren y se expandan. Medicamentos en esta categoría, como olaparib y rucaparib, han comenzado a generar interés para la utilidad en el tratamiento de cáncer de ovario cuando se utiliza en combinación con la quimioterapia. Sin embargo, estos medicamentos son beneficiosos en el tratamiento del cáncer de ovario, son muy costosos (Stewart et al., 2019).

2.3 AFFIBODY

Los affibody son pequeñas proteínas de afinidad no inmunoglobulínicas basadas en un dominio de 58 aminoácidos distribuidos en tres hélices. Este dominio deriva del dominio B de la proteína A estafilococo (Ståhl et al., 2017), y son capaces de reconocer y unirse a otra proteína con alta afinidad y especificidad. El pequeño tamaño (58 aminoácidos, 7 kDa) de los affibodies permite que puedan ser producidos mediante síntesis química.

La obtención y selección de affibodies específicos contra una proteína diana se realiza mediante la generación de bibliotecas génicas a través de ingeniería combinatoria de proteínas, aleatorizando genéticamente 13 posiciones ubicadas en la superficie del dominio del affibody.

Los affibody presenta una elevada estabilidad y extrema facilidad a la hora de modificar la proteína según las necesidades de aplicación. Además, la eficaz extravasación y penetración del tumor, en combinación con su baja inmunogenicidad y rápida eliminación de estas moléculas en órganos y tejidos sanos, hacen de los affibodies una alternativa prometedora tanto para aplicaciones diagnósticas como terapéuticas (Ahlgren y Tolmachev, 2010; Ståhl et al., 2017).

2.4 HER 2

HER2 (Gene: ERBB2; UniProtKB ID: P04626) es un gen que se encuentra en el cromosoma 17q12-21 y codifica para un receptor de tirosina quinasa de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que desempeña un papel fundamental en la proliferación celular y metástasis de células tumorales (Luo et al., 2018).

Her2 se localiza en la membrana plasmática y presenta una estructura típica asociada a los receptores de factores de crecimiento, con un dominio extracelular de unión a ligando y uno intracelular con actividad tirosin-quinasa (Colomer et al, 2001). Esta proteína está implicada en la proliferación celular al formar dímeros con otros factores de crecimiento. Se trata de una proteína presente en una amplia mayoría de tejidos (Figura 2). La sobreexpresión de *HER2* y la aparición en la mayoría de los tumores se debe a su amplificación génica por un mecanismo todavía desconocido que lleva a una transformación de las células a un fenotipo maligno y a una formación de tumores de manera más rápida.

Diversos estudios muestran que el 30% de los pacientes con cáncer de mama presentan sobreexpresión del gen *HER2*, estando además relacionada con un mal pronóstico (Slamon, Clark et al. 1987), en carcinomas de ovario también existe correlación entre la sobreexpresión de esta proteína y un mal pronóstico (Luo et al, 2018).

HER2 tiene varias utilidades clínicas: tiene valor en pronóstico, valor predictivo (por inmunohistoquímica) y valor como diana terapéutica para los nuevos tratamientos que están dirigidos contra la proteína o el propio gen *HER2*. Un anticuerpo monoclonal específico para Her2 ha sido un tratamiento nuevo, notablemente exitoso para el subgrupo de cánceres de mama que producen en exceso Her2. La inyección intravenosa de anticuerpo contra Her2, que reconoce dicha proteína, hace que sea internalizada eliminando selectivamente las células cancerosas sin efecto aparente sobre las células

sanas que normalmente expresan niveles moderados de *HER2* (Lodish et al, 2016).

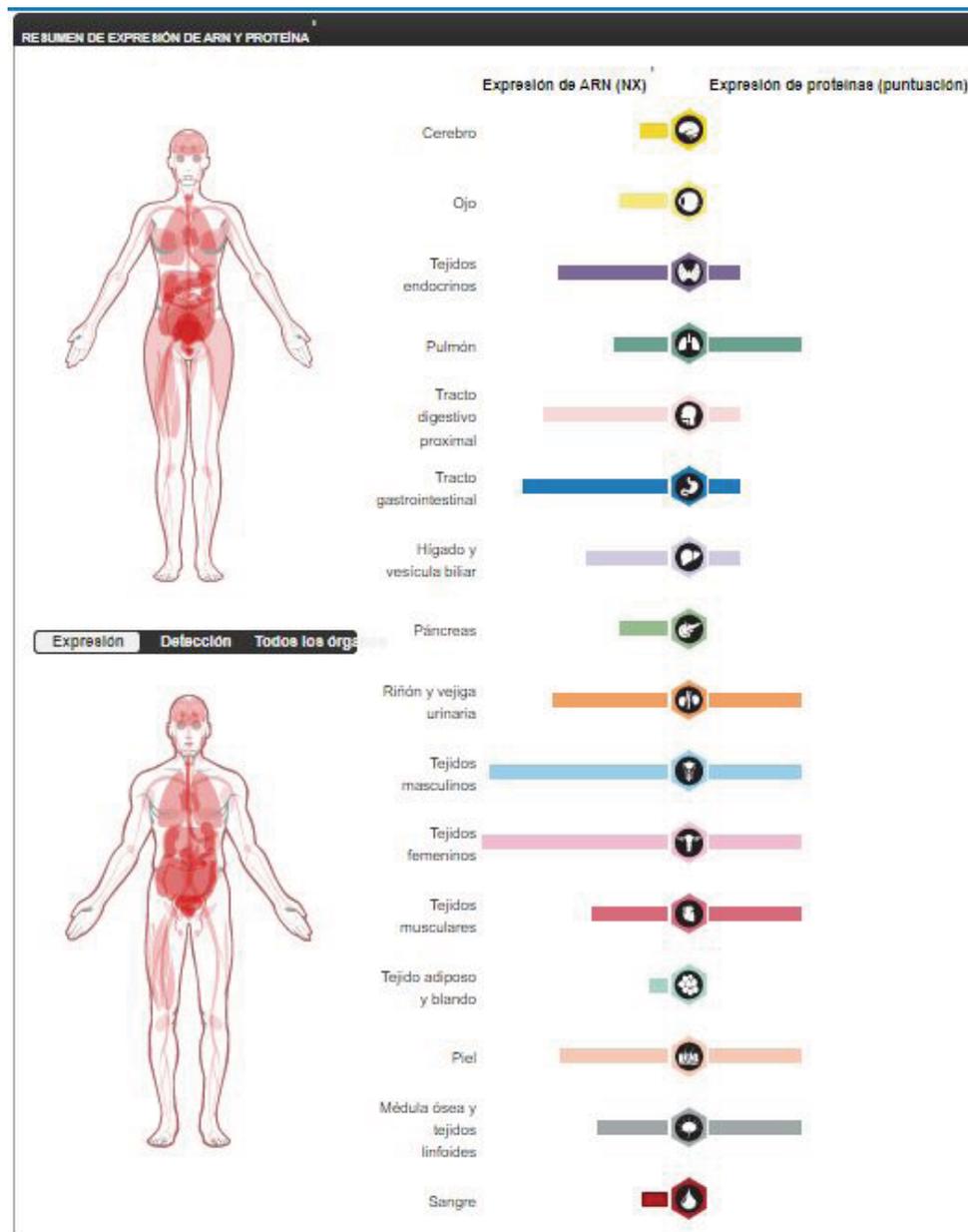


Figura 2: Expresión de la proteína HER2 en el cuerpo humano. Fuente: proteinatlas.org

2.5 KLKs

Las KLKs (*Human kallikrein-related peptidasas*) son una familia de serin-proteasas que abarca aproximadamente 265 kb en el cromosoma 19q13.3-13.4. El locus de las KLKs está compuesto por 15 genes en humanos. (Stefanini et al, 2015). Todos los genes KLK están formados por 5 exones muy conservados en cuanto a estructura, aunque la longitud de cada gen varía entre 4,3 y 10,5 kb. El primer exón siempre contiene el codón de inicio y un 5'-UTR corto (región no traducida), mientras que el codón de stop, la cola poli-A y el 3'-UTR se encuentran en el exón 5 (Kriza et al, 2015).

Las KLKs están relacionadas principalmente con la coordinación de varias funciones

fisiológicas incluyendo la presión sanguínea, licuefacción del semen y la descamación de la piel (Avgeris et al, 2016).

Ciertas KLK se expresan de forma aberrante en diferentes tipos de cáncer y proporcionan nuevos marcadores tumorales (ARNm, proteínas, metilación del ADN genómico) para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer. (Kriza et al, 2015)

Las KLK se expresan principalmente por células cancerosas en tumores sólidos y se secretan en el microambiente tumoral, pueden cambiar el avance del cáncer positiva o negativamente mediante un gran número de mecanismos moleculares. Entre estos mecanismos podemos encontrar la regulación de varias hormonas y factores de crecimiento que activan receptores de la superficie celular, controlando el crecimiento de las células cancerosas; hidrolizar las proteínas de la matriz celular promoviendo la migración e invasión de las células cancerosas o participar en la quimiorresistencia de las células cancerosas y, lo que es más importante, en la regulación de las interacciones entre las células cancerosas y otras poblaciones celulares que se encuentran en el microambiente tumoral, como fibroblastos, células endoteliales u osteoblastos (Lawrence, G. M et al, 2009)

Los datos de microarrays disponibles en la base de datos de Oncomine (Rhodes. R. D et al, 2004), permite comparar los resultados obtenidos de experimentos independientes, mostraron que la expresión de cada KLK está regulada diferencialmente según el tipo de cáncer específico. Por ejemplo, KLK7 estaba mayormente sobreexpresada en los cánceres de ovario, pero significativamente reprimido en los tumores de mama y esófago. Una observación similar es evidente para KLK5-8, que se encontró sobreexpresado en cáncer de ovario, pero cuyos niveles descienden claramente en cáncer de mama (Kriza et al, 2015).

3. OBJETIVO

- Clonar y purificar varias versiones la proteína de fusión GST-Z342 que contengan en su región *linker* distintas dianas de corte para proteasas de la familia de las kalkreinas.
- Comprobar en cultivos celulares la utilidad de dichas dianas de corte como diana terapéutica en cáncer de ovario.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 CLONAJE

4.1.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR se realiza en un termociclador *T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)* con la presencia de una polimerasa, en nuestro caso será la polimerasa Phusion con actividad 3' exonucleasa. Este proceso implica un primer ciclo inicial en el cual se activará la polimerasa y se desnaturalizará el ADN dando lugar a un ADN monohebra (98°C 3 min). Posteriormente comienzan 35 ciclos con 3 etapas cada uno. La primera etapa será la desnaturalización (98°C 15 seg), seguida de la etapa de anillamiento (58°C 30 seg) y finalmente la etapa de extensión (72°C 7 min 30 seg). Tras esto habrá un ciclo final de extensión extra que le permitirá a la polimerasa terminar de replicar si el producto es muy grande (72°C 10 min). Los componentes de la mezcla y sus concentraciones finales se resumen en la tabla 1.

Los cebadores, mostrados en la tabla 2, con orientación universal hibridarán en la región ORF que codifica para el affibody Z342, mientras que el cebador antisentido hibridará con GST (Glutación S-transferasa). De esta forma obtendremos un amplicón lineal.

Tabla 1. Componentes de la PCR.

COMPONENTES	VOLUMENES FINALES
H ₂ O destilada	30 µL
Phusion HF buffer 10X	10 µL
dNTPs 2,5 mM	5 µL
Cebador universal 10 µM	2,5 µL
Cebador reverso 10 µM	2,5 µL
DNA molde 50 µg/µL	0,5 µL
DNA Polimerasa Phusion High-Fidelity	0,5 µL

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados.

NOMBRE	SECUENCIA	DIANA PROTEASA
AJVV196r	<i>cagttcgtctttgaagcc</i> TGCTTTTTGTACAACTTGTGGATCCGGTCC	
AJVV197f	<i>ggcttcaagacgaactg</i> AAAGACGAACTGGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK5
AJVV198f	<i>ggcttcaagacgaactg</i> GGCCGCGTGGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK6
AJVV199f	<i>ggcttcaagacgaactg</i> TATCTGTGCTATCAGGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK7
AJVV200f	<i>ggcttcaagacgaactg</i> GTGGTGCCTGGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK8

4.1.2 ELECTROFORESIS DE AGAROSA NO DESNATURALIZANTE

Se preparan geles de agarosa al 0,7% p/v en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x. Se utiliza el tampón de carga *Loading Buffer* (NZYTech) y el marcador de pesos moleculares GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) como estándar de referencia. Dejamos que la muestra migre durante 45 minutos a 65V. Tras esto observaremos el gel en un fotodocumentador *Molecular Imager® Gel Doc XR* (Bio-Rad).

4.1.3 RECUPERACIÓN DE ADN PLASMIDICO A PARTIR DE UN GEL DE AGAROSA

Para el rescate de las bandas de ADN de interés se utiliza el kit NZYGelpure (NZYTech). Siguiendo las instrucciones del fabricante, añadimos 500 µL de *Binding Buffer* por cada 100 mg de gel de agarosa correspondiente a la banda recortada previamente. Incubamos la muestra a 65°C hasta la completa resolubilización de la matriz de agarosa, para a continuación pasar la mezcla a una columna *microspin* de sílica y centrifugamos a 13000 rpm durante un minuto.

Posteriormente, lavamos dos veces la membrana con 600 µL de *Wash Buffer*, y centrifugamos durante un minuto a 13000 rpm. Por último, añadiremos 50 µL de solución *Elution Buffer*, dejamos incubar 2 minutos a temperatura ambiente y tras esto, centrifugamos 2 minutos a 13000 rpm para que eluya nuestro ADN. Conservaremos el ADN purificado a -20°C hasta su uso en experimentos posteriores.

4.1.4 CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS

Para poder cuantificar las muestras utilizaremos un espectrofotómetro *BioSpectrometer* (Eppendorf) y una cubeta *Eppendorf µCuvette® G1.0*, con un paso de luz de tan solo 1mm y en la cual únicamente podremos incorporar 1µL de muestra para medir la absorbancia. El ratio a 260/280 nos indica el grado de pureza de la muestra con respecto a contaminantes proteicos. Por otro lado, el ratio de 260/230 nos permite ver si la muestra contiene sales orgánicas.

4.1.5 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

La transformación de bacterias permite que bacterias ultracompetentes incorporen ADN plasmídico exógeno al interior celular. Añadimos 150 ng de la alícuota obtenida por PCR en nuestra alícuota de bacterias ECOS XL-1 Blue (Yeastern Bitotech) e incubamos en hielo durante 30 minutos. A continuación, se realiza un choque térmico de 45 segundos a 42°C que permite que se formen poros en la membrana plasmática de las bacterias a través de los cuales entrará el ADN exógeno. Posteriormente se paraliza el choque térmico en hielo incubando las muestras durante 2 minutos, y finalmente se siembra en placas Luria-Bertani (LB) suplementadas con ampicilina a 100 µg/µL y pre-incubadas a

37°C.

4.1.6 PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMIDICO

Para recuperar el ADN plasmídico desde un cultivo de bacterias en LBA, utilizamos el kit comercial *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific).

Partimos del *pellet* de nuestras células y, siguiendo los pasos que nos indica el protocolo, primero resuspendemos las células en solución *Resuspension Buffer* (250 µL) mediante vortex. Posteriormente rompemos la membrana de las células añadiendo *Lysis Buffer* (250 µL) mezclando mediante inversión del tubo. Tras esto, neutralizamos añadiendo *Neutralization Buffer* (350 µL) y mezclamos de nuevo por inversión, para finalmente clarificar el sobrenadante mediante centrifugación a 13000 rpm durante 5 min.

A continuación, transferimos el sobrenadante a una columna *micro-spin* y centrifugamos 1 min. a 13000 rpm. Lavamos la membrana de silica dos veces con la solución *Wash Buffer* (500 µL) con sucesivas centrifugaciones de 1 min. a 13000 rpm.

Por último, eluimos el ADN plasmídico (ADNp) añadiendo el tampón *Elution Buffer* (50 µL) e incubamos a temperatura ambiente durante 5 min antes de realizar la última centrifugación de 2 min a 13000 rpm.

4.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN PROTEINAS

4.2.1 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN EN BACTERIAS

La expresión de las distintas construcciones obtenidas se realiza en la cepa BL21 DE3 (Novagen) en medio de cultivo LB. Para cada proteína se utiliza un litro de medio de cultivo en matraces Erlenmeyer con capacidad de hasta 2 L a una agitación constante de 250 rpm y 37°C. Cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm de longitud de onda y 1 cm de paso de luz alcanza un valor de 0,8, se induce la expresión proteica por adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, Fisher Scientific) a una concentración final de 1 mM durante toda la noche. Al día siguiente, las células se recuperan por decantación en una centrifuga Beckman Coulter de alta capacidad volumétrica, a 5000 rpm durante 5 minutos. Los *pellets* son lavados con tampón PBS (tampón fosfato salino) y conservados a -80°C hasta su posterior uso.

4.2.2 LISIS DE LAS CÉLULAS POR SONICACIÓN

Para purificar las proteínas primero tendremos que romper las células, y para ello utilizaremos un tampón de lisis compuesto por: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, inhibidores de proteasas (Pepstatina 1mM, Benzamidina 0,5mM, PMSF 5 mM) y lisozima 2 mg/mL. Resuspendemos los *pellets* celulares con el tampón de lisis y dejamos

incubando durante 30 minutos en hielo para que la lisozima actúe en la digestión de la pared celular. Pasado este tiempo, procedemos a la sonicación que consiste en ciclos de ultrasonidos a 70% de amplitud durante 5 minutos, en pulsos de 3 segundos de sonicación y 8 segundos en parada. Una vez terminada la sonicación, clarificamos el lisado mediante centrifugación a 4°C durante 30 minutos y 14000 rpm. Nos quedamos con el sobrenadante donde se encuentra la fracción soluble de proteínas.

4.2.3 COMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Para la cromatografía de afinidad usamos columnas de flujo por gravedad. En primer lugar se empaqueta 1 mL de resina HisTrap (Thermo Scientific) (50% p/v en 20% de etanol) en columnas *Econo-pac 10 mL* (Bio-Rad), para a continuación hacer un lavado con 1 CV (*Column Volume*) de agua destilada y 2 CV de solución *Wash Buffer* (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM). Tras esto, introducimos nuestra muestra en las columnas para que las proteínas afines queden retenidas en la resina, mientras que el resto de proteínas del extracto crudo eluyen de manera inespecífica. A continuación, utilizamos 3 CV de *Wash Buffer* y 1 CV de *Elution Buffer 1* (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, Imidazol 25 mM) para eliminar cualquier proteína inespecífica que pudiera estar uniéndose de manera inespecífica o con baja afinidad a la columna de níquel. Finalmente, eluimos nuestra proteína de manera específica añadiendo 2 mL de *Elution Buffer 2* (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, Imidazol 250 mM).

4.2.4 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

La cromatografía de exclusión molecular permite obtener un mayor grado de pureza en nuestras proteínas de fusión, es el conocido como *polishing step* o fase de pulimiento. Para ello inyectamos nuestra muestra (2 mL provenientes de la cromatografía de afinidad) en el cromatógrafo AKTA Prime Plus (GE Healthcare). La muestra pasará a través de una columna de exclusión molecular HiLoad 16/70 S200 (GE Healthcare) equilibrada con tampón *Wash Buffer* (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM), y se tomarán alícuotas de 1 mL. Un detector medirá la absorbancia a 280 nm (máximo de absorbancia para proteínas) a la salida de la columna y lo reflejará en el cromatograma, permitiendo correlacionar los picos de absorbancia con las alícuotas correspondientes.

4.2.5 ELECTROFORESIS

Para comprobar si el proceso de purificación de las diferentes proteínas de fusión ha tenido lugar adecuadamente, en términos de integridad proteica y grado de pureza, se lleva a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS- PAGE) en un sistema Mini PROTEAN 3 Cell (BioRad), con el marcador de pesos moleculares

NZYColour Protein Marker II (NZYTech), como referencia. Para ello, se prepara un gel separador con 15% de acrilamida, que separa las muestras en función de su peso molecular, y un gel concentrador con 5% de acrilamida, que concentra las muestras en un único frente de migración. En tubos Eppendorf de 1,5 mL, se diluyen las muestras en tampón de carga 4X (Tris HCl pH 6.8 0.12 M, SDS 6%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 15%, azul de bromofenol 0.0025%) y se incuban a 100 °C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas. Transcurrido este tiempo, se procede a realizar la electroforesis en tampón de electroforesis (Tris HCl pH 8.3 0.02 M, Glicina 0.2 M, SDS 0.003 M) manteniendo un voltaje constante de 150 V hasta que el frente alcanzó el final del gel. Una vez concluida la electroforesis, los geles se tiñen con azul de Coomassie (BioRad) en ácido acético al 10% y metanol al 20% durante 10 minutos en agitación orbital. Posteriormente, se realizan varios lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. La captura de las imágenes se adquiere mediante digitalización con el equipo Molecular Imager® Gel Doc XR y el software Image Lab™ (BioRad).

4.2.6 WESTERN-BLOT

Una vez completada la electroforesis SDS-PAGE, haremos la electrotransferencia de las proteínas contenidas en el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa, previamente humedecida en metanol y tampón de transferencia (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) durante 30 segundos. Posteriormente, se realiza la transferencia con un voltaje constante de 300 mA durante 1 hora en el sistema Mini Trans-Blot Cell (BioRad). Se bloquea la membrana en tampón TBST 1X (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2%) con BSA al 5%, en agitación, durante 1 hora y a temperatura ambiente, para posteriormente incubarla en una dilución del anticuerpo primario (IgG de ratón anti-Flag (Thermo Fisher Scientific), o IgG de ratón anti-actina (Santa Cruz Biotechnologies), según sea el caso, de nuevo en BSA al 5% en TBST 1X, en agitación, durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lava la membrana tres veces con TBST 1X durante 10 minutos y se incuba en una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario IgG-HRP de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) en BSA al 5% en TBST 1X, a temperatura ambiente durante 3 horas. Finalmente, se lava nuevamente la membrana tres veces con TBST 1X durante 10 minutos y se revela con el sustrato quimio-luminiscente Pierce ECL Plus (Thermo Fisher Scientific). En el caso del anticuerpo IgG de ratón anti-6xHis, no es necesaria la utilización de un anticuerpo secundario, puesto que ya está conjugado con HRP. La captura de las imágenes se realiza mediante digitalización con el equipo Molecular Imager® Gel Doc XR y el software Image Lab™ (BioRad).

4.3 CULTIVOS CELULARES

4.3.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS

Trabajaremos con 4 líneas celulares a las que añadiremos nuestras proteínas, estas son:

- CHO: una línea celular de tejido ovárico de hámster (*Cricetulus griseus*) (código ATTC: CCL-61).
- PNT2: una línea celular de tejido de próstata de hombre (*Homo sapiens*) (código ECACC: 95012613).
- PEO1: una línea celular cancerosa ovárica de mujer (*Homo sapiens*) (código ECACC: 10032308).
- SK-OV-3: línea celular de carcinoma ovárico de mujer (*Homo sapiens*) (código ATTC: HTB-77).

Estas células se hacen crecer adheridas a la superficie de placas p100 utilizando medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bobino (FBS) y con un 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) (ThermoFisher Scientific).

Los cultivos se llevan a cabo en una cámara de flujo laminar *Telstar Bio II Advance*, previamente esterilizada con radiación UV. También es obligatorio utilizar material esterilizado para evitar la contaminación de los medios de cultivo y reactivos. Las células se incuban en condiciones estándar (37 °C, CO₂ al 5% y humedad a niveles de saturación).

Previamente al inicio del tratamiento es necesario obtener células suficientes mediante sucesivos pases (1:3), asegurándose de que el número de placas y su confluencia sean los deseados. Para esto, a partir de placas Petri p100 con células que han alcanzado una confluencia del 70-80% lo primero es retirar el medio de cultivo para luego, con 10 mL de tampón DPBS (Dulbeco's Phosphate-Buffered Saline) (Gibco) lavar las células para eliminar cualquier resto del medio. A continuación, se tratan con 500 µL de una solución de tripsina-EDTA al 0.25% p/v (Thermo-Fisher Scientific) durante dos minutos, una proteasa que digiere las proteínas adherentes de la superficie celular y permite que las células se liberen de la placa, para recogerlas y pasarlas a una superficie nueva. A continuación, se para la actividad proteolítica de la enzima agregando 10 mL del medio de cultivo nuevo para conseguir una completa inactivación. Finalmente, se transfieren 3 mL a una placa nueva, donde se agregó más medio hasta tener un volumen final de 8 mL.

4.3.2 TRATAMIENTO CON LAS DISTINTAS VARIANTES GST-Z342 Y RECOGIDA DE CÉLULAS

Todas las líneas celulares se incuban hasta alcanzar una confluencia del 70-80% de

células en placa. A continuación, se recuperan las células adheridas mediante tratamiento con tripsina a un tubo estéril, y se procede a realizar el conteo celular mediante el uso de una cámara de Neubauer y tinción con azul de tripán en una relación volumétrica 1:1 entre células y tinte. Según los resultados, se estima el volumen necesario para sembrar 500.000 células en cada pocillo de placas *24-well plates* (Corning), adicionando DMEM suplementado con FBS 10% y pen/strep 1% hasta alcanzar un volumen final de 500 μ L. Se incuban en condiciones estándar (37 °C, CO₂ al 5% y humedad a niveles de saturación) para permitir adaptación y adherencia. Pasadas 24h, se añade a cada pocillo 500 μ g de proteína purificada, previamente esterilizadas con filtros de 0,22 μ M. Se deja además un pocillo de cada línea celular sin tratamiento como control .

4.3.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Pasadas 48h de tratamiento se procede a lavar las células con 1 mL de DPBS (Gibco), para a continuación tratar las células con la solución de lisis RIPA (Sodium Chloride 150 mM, NP-40 or Triton X-100 1.0% v/v, Sodium Deoxycholate 0.5% w/v, SDS 0.1% w/v) durante 10 minutos en agitación constante de 250 rpm. Transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante y se congela a -80°C hasta el momento de su uso.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESULTADOS DE PCR

En la figura 3 se recogen los resultados de la electroforesis de las cuatro PCR explicadas en el apartado 4.1.2, cada una de ellas con una diana de corte para KLK diferente. Con el marcador GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) como referencia podemos observar que el resultado de cada una de nuestras PCRs inversas es una única banda próxima a los 7000 pares de bases, el tamaño esperado (entre 6853 y 6868, según la secuencia nucleotídica de la diana introducida). Tras esto procedemos a la recuperación del ADN plasmídico explicado en el apartado 4.1.3 y a la posterior transformación en bacterias, que va a permitir la re-circularización del vector plasmídico.

5.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Tras la combinación de una cromatografía de afinidad y una cromatografía de exclusión molecular se obtienen las proteínas purificadas con la diana para cada una de nuestras KLKs (Figura 4), y según el protocolo descrito en los apartados 4.2.3 y 4.2.4.

Tras la realización de una electroforesis SDS-PAGE y posterior tinción con Azul de Coomassie, podemos observar el grado de pureza y el peso molecular de las proteínas

aisladas, con un tamaño próximo al esperado (36.2 kDa).

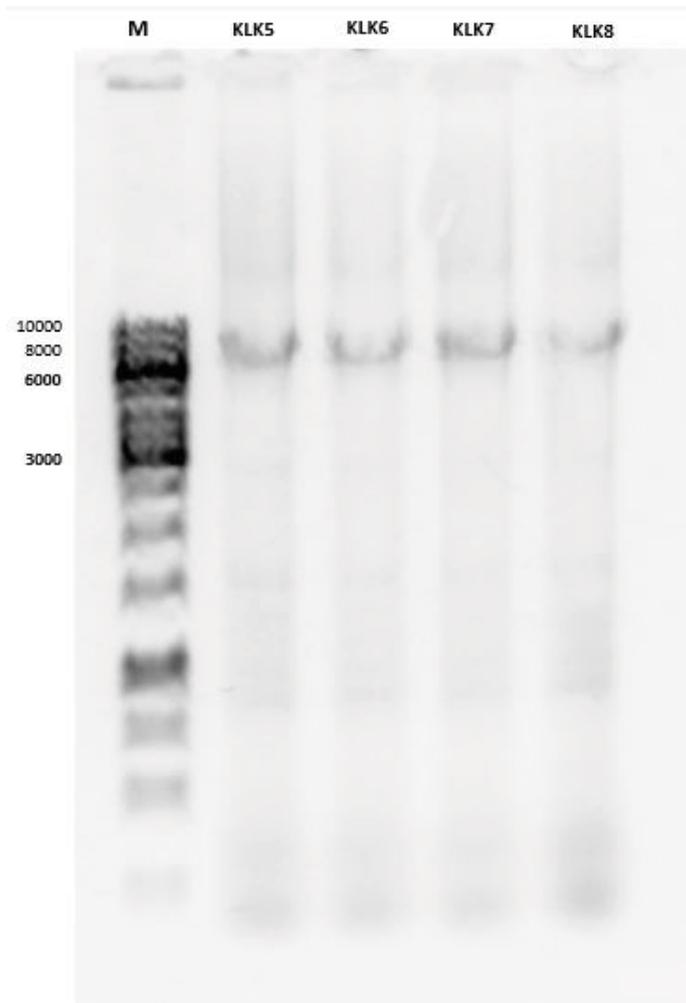


Figura 3. Resultados de la PCR en gel de agarosa. M: Marcador. Los números indican los pares de bases.

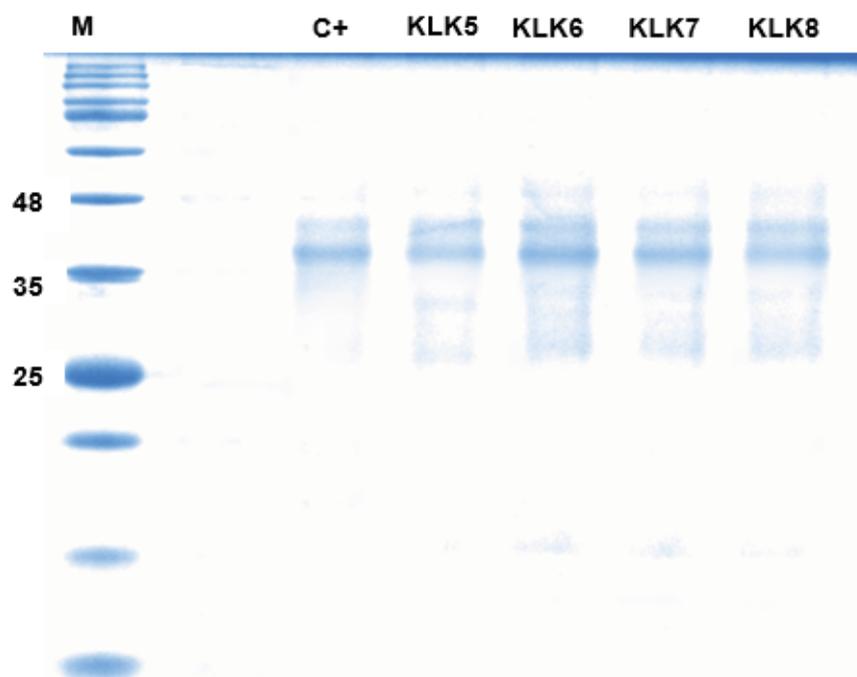


Figura 4. Gel de acrilamida para ver el resultado de la purificación de las proteínas y el control. M: marcador

NZYColour Protein Marker II, C+: control positivo. Los números indican los pesos moleculares en KDa.

5.3 WESTERN-BLOT

En las figuras 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos por Western-blot de una misma membrana, pero utilizando primero anticuerpos anti-6XHis (Figura 5) y tras lavar la membrana utilizando el anticuerpo anti-Flag (Figura 6) para la detección de las KLKs.

Las proteínas purificadas nos permiten determinar la idoneidad de las secuencias diana incluidas mediante la presencia o ausencia de proteólisis tras 48 horas de tratamiento de distintas líneas celulares.

CHO es una línea celular sana de ovario de hámster (*Cricetulus griseus*). Esta línea celular nos permite testar la especificidad de las proteínas por los tejidos humanos gracias a la especificidad del affibody (Z342) contra el marcador celular (HER2). Siendo esta la causa de que en ninguna membrana se aprecien bandas ya que la proteína no se ha unido a las células. Es por esto por lo que podemos afirmar que el affibody contra HER2 es útil para incrementar la especificidad de tejido.

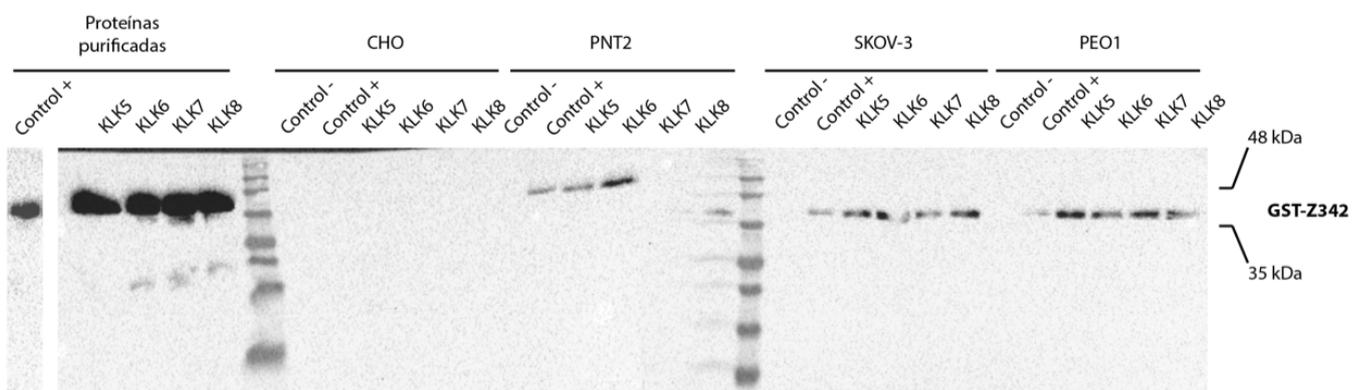


Figura 5. Western-blot con el anticuerpo anti-6XHis en las proteínas purificadas y en 4 líneas celulares (CHO, PNT2, SKOV-3, PEO-1) cada una de ellas con un control +, control – (sin tratamiento), KLK5, KLK6, KLK7 Y KLK8. GST-Z342 corresponde con nuestra proteína de fusión.

PNT2 es una línea celular sana de células epiteliales de próstata. Her2 también es una proteína que se expresa en tejidos masculinos, por lo tanto, lo que podemos observar en la figura 5 es una banda próxima a 35 kDa en la construcción completa de la proteína de fusión, a excepción del control negativo (sin tratamiento), en el cual no se aprecia ninguna banda. En el Western-blot incubado con un anticuerpo anti-flag (Figura 6) solamente podemos observar bandas en la KLK7 y KLK8 próximas a 25 kDa, una proteína de menor

tamaño que la construcción completa, indicativo de que dichas proteínas de fusión han sido internalizadas y proteolizadas y que la diana ha sido efectiva.

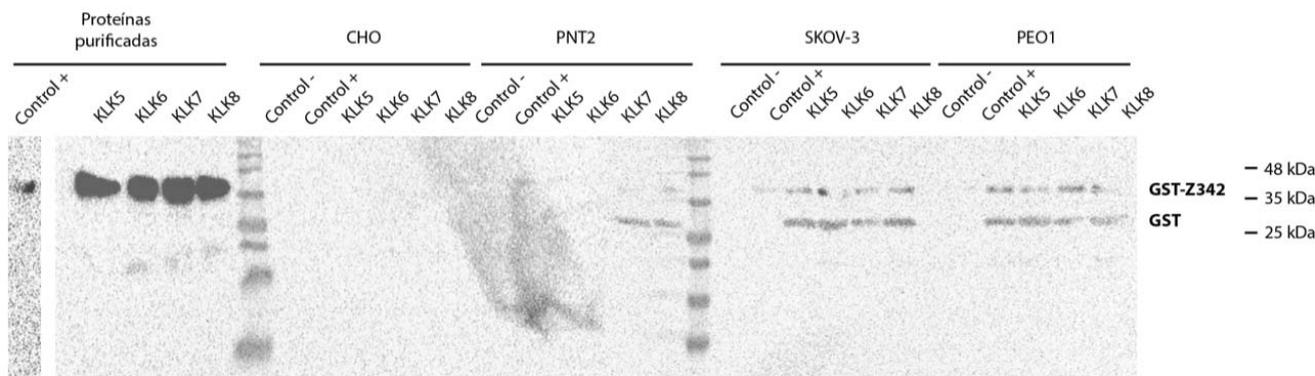


Figura 6. Western-blot utilizando el anticuerpo anti-Flag en las proteínas purificadas y en 4 líneas celulares (CHO, PNT2, SKOV-3, PEO-1) cada una de ellas con un control +, control – (sin tratamiento), KLK5, KLK6, KLK7 Y KLK8. GST-Z342 corresponde con nuestra proteína de fusión y GST corresponde con la proteína proteolizada.

SKOV-3 y PEO1 son líneas celulares obtenidas a partir de células cancerosas del epitelio de ovario en humanos. En ambas se expresa HER-2 y en ambas líneas celulares aparece una banda en cada KLK y en el control positivo próximo a 35 kDa que corresponden con las construcciones completas de las proteínas (Figura 5). En el resultado de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-Flag (Figura 6) observamos que todas las proteínas de fusión han sido internalizadas efectivamente y que las distintas dianas han sido reconocidas por sus correspondientes kalkreínas al observar una banda de menor tamaño próximas a 25 kDa, mientras que el control positivo, que corresponde a la proteína de fusión sin la diana, permanece intacta, al no observarse dicha banda próxima a 25 kDa.

A partir del Western-blot de la figura 6, se calcularon los porcentajes de digestión enzimática de cada KLK para las distintas líneas celulares mediante cuantificación por densitometría de cada banda. Los resultados resumidos en la tabla 3 nos permite ver en las distintas líneas celulares el grado de proteólisis de cada proteína de fusión en un mismo período de tiempo de 48 horas. De esta forma podemos ver como en la línea celular CHO, la cual no tiene origen humano, ninguna de las proteínas de fusión se ha proteolizado ni incorporado a la célula debido a la ausencia de HER2. En PNT2 observamos cómo las proteínas de fusión que contienen las dianas para KLK7 y KLK8 ha sido proteolizadas, teniendo KLK7 un mayor porcentaje de digestión (79.52%).

En las líneas cancerosas SKOV-3 y PEO1 observamos como la proteína de fusión que contienen la diana para KLK6 ha sido proteolizada, a diferencia de la línea celular sana.

Por otro lado, la proteína de fusión que contienen la diana para KLK5 sólo es efectiva en la línea celular PEO1, a diferencia de SKOV-3 y de la línea celular sana PNT2.

Tabla 3. Porcentajes de digestión enzimática de cada KLK en las distintas líneas celulares.

	<u>CHO</u>	<u>PNT2</u>	<u>SKOV-3</u>	<u>PEO-1</u>
<u>Control +</u>	-	-	-	-
<u>KLK5</u>	-	-	0%	58.99%
<u>KLK6</u>	-	-	63.77%	68.15%
<u>KLK7</u>	-	79.52%	65.67%	43.47%
<u>KLK8</u>	-	69.54%	62.65%	62.48%

Por lo tanto, KLK6 parece ser un candidato idóneo para el utilizar en los próximos estudios, ya que aparece proteolizado en ambas líneas celulares cancerígenas, pero no en la línea celular sana, mostrando esta diana especificidad por las líneas cancerígenas. Además, este estudio nos ha permitido ver que KLK7 y KLK8 no son válidos ya que son procesados por una línea sana. En el caso de KLK5, sería necesario probar la proteína de fusión en líneas de cáncer de ovario alternativas y confirmar su validez o por el contrario ser descartada.

6. CONCLUSIONES

- Tras clonar y purificar versiones de proteínas con distintas dianas de corte para proteasas de la familia kalkreinas hemos confirmado que el affibody Z342 contra HER2 es útil como elemento específico de tejido.
- Los resultados obtenidos indican que las dianas de corte para KLK5 y KLK6 podrían ser elementos diferenciadores entre células de ovario sanas y cancerosas, mostrándose importantes diferencias en el grado de proteólisis de dichas dianas de corte.
- Finalmente, el presente estudio permite descartar las dianas de corte para KLK7 y KLK8 como elementos terapéuticos para cáncer de ovario.

Con los resultados obtenidos se pretende ampliar el estudio para utilizar dichas dianas en proteínas multi-dominio estructurados en la RTA-diana-Z342-VPg. RTA corresponde a las siglas de la Ricina, una fitotoxina que se extrae de la semilla del ricino y que es capaz de inactivar los ribosomas (RIP) de tipo 2. VPg (*Viral genoma-linked protein*) es el fragmento 1-110 del virus en mosaico del nabo con capacidad inhibidora de la ricina. El objetivo

último es obtener sistemas capaces de eliminar las células cancerosas mediante la actividad citotóxica de la ricina, una vez liberada de su inhibidor VPg por la especificidad de las KLK que separan ambos elementos de la proteína de fusión.

6. CONCLUSIONS

- After cloning and purifying versions of proteins with different cutting targets for proteases of the kallikreins family, we have confirmed that affibody Z342 against HER2 is useful as a tissue-specific element.
- The results obtained indicate that the cutting targets for KLK5 and KLK6 could be differentiating elements between healthy and cancerous ovarian cells, showing important differences in the degree of proteolysis of said cutting targets.
- Finally, the present study makes it possible to rule out the cutoff targets for KLK7 and KLK8 as therapeutic elements for ovarian cancer.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Accessed at *Frente al cancer de ovario*. ASACO. <https://www.asociacionasaco.es/cancer-de-ovario/que-son-los-ovarios/> on July 7th 2021.
- Accessed at *Tissue expression of ERBB2 - Summary - The Human Protein Atlas*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/tissue> on July 9th 2021.
- Ahlgren, S., Tolmachev, V., (2010) Radionuclide molecular imaging using Affibody molecules. *Curr Pharm Biotechnol.* 11:581-9 <https://doi.org/10.2174/138920110792246609>
- Aitbakieva, V. R., Ahmad, R., Singh, S., Domasheyskiy, A. V. (2019) Inhibition of ricin A-chain (RTA) catalytic activity by a viral genoma-linked protein (VPg). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 1867:645-653. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.002>

- Avgeris, M., & Scorilas, A. (2016). Kallikrein-related peptidases (KLKs) as emerging therapeutic targets: focus on prostate cancer and skin pathologies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 20:801–818. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1147560>
- Colomer, S., Montero, S., Ropero, J. A., Menéndez, H. Cortés, H., Solanas, M., Escrich, E. (2001) The HER2 oncogene as an example of diagnostic and therapeutic progress in breast cancer. *Journal of Breast Science*. 14:8-19.
- Kriza, T., Silva, M.L., Loessner, D., Heuzé-Vourch, N., Clements, J.A. (2015) The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Science*. 122:283-299 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.002>
- Lawrence, G. M., Lai, J., & Clements, J. A. (2009) Kallikreins on Steroids: Structure, Function, and Hormonal Regulation of Prostate-Specific Antigen and the Extended Kallikrein Locus. *Endocrine Reviews*. 31:407-446. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0034>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M. P. (2016). *Biología Celular y Molecular*. (7th ed.). Medica Panamericana.
- Luo, H., Xu, X., Ye, M., Sheng, B., Zhu, X. (2018). The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *PLOS ONE*. 13:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191972>
- Rhodes. R. D., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N. Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pander, A., & Chinnaiyan, M. A. (2004) ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining Platform. *Neoplasia*. 6:1-6. [https://doi.org/10.1016/s1476-5586\(04\)80047-2](https://doi.org/10.1016/s1476-5586(04)80047-2)
- Slamon, D. J., Clark, M. G., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L., (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>

- Ståhl, S., Gräslund, T., Eriksson Karlström, A., Frejd, F. Y., Nygren, P. Å., & Löfblom, J. (2017). Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications. *Trends in Biotechnology*, 35:691–712. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.007>

- Stefanini, A. C. B., Da Cunha, B. R., Henrique, T., & Tajara, E. H. (2015). Involvement of kallikrein-related peptidases in normal and pathologic processes. *Disease Markers*, 2015:946572. <https://doi.org/10.1155/2015/946572>

- Stewart, C., Ralyea, C., Lockwood, S. (2019). Ovarian cancer: As Integrated Review. *Seminars in Oncology Nursing*, 35:151-156. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>