

PROYECTO FIN DE GRADO

Determinación del efecto en cultivos celulares de la alteración de los niveles de Mtch1/PSAP mediante microscopía óptica multidimensional.

Grado en Biotecnología. Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza, Junio 2014

Raquel Tarancón Iñiguez

Tutor de Proyecto: José A. Carrodegua

Lugar de realización: Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.



Universidad
Zaragoza

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	7
METODOLOGÍA: TÉCNICAS Y MATERIAL	7
MATERIAL UTILIZADO.....	7
Líneas Celulares estudiadas	7
Microscopio de fluorescencia.....	9
TÉCNICAS	9
Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo	10
Experimentos en células viva con microscopia óptica multidimensional.	10
Análisis de imagen	14
Control con Antibióticos	14
Western blot Anti Myc	15
Detección de Micoplasmas.....	15
RESULTADOS.....	17
CULTIVO CELULAR.....	17
EXPERIMENTOS DE CÉLULA VIVA	17
Experimento con ponasterona en células HEK control, HEK clon8 y HEK293-11C.....	17
Experimento con ponasterona y fluorocromos en células HEK control, HEK clon 8	18
Experimento con ponasterona y fluorocromos en células HEK clon 8 y HEK293-11C.....	18
Experimento con fluorocromos en las células HeLa.....	19
Experimento de viabilidad celular con camptotecina en las células HEK293 y HeLa	19
CONTROL CON ANTIBIÓTICOS.....	21
WESTERN BLOT ANTI-MYC.....	22
DETECCIÓN DE MICOPLASMAS	23
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	27
CONCLUSIONS.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	29

RESUMEN

En este Proyecto estudiamos la proteína PSAP (presenilin 1-associated protein) también conocida como Mtch1 (mitochondrial carrier homolog 1) por su función proapoptótica y su posible relación con la enfermedad del Alzheimer.

Con la intención de determinar si la sobreexpresión o la reducción de los niveles de PSAP producían cambios en la proliferación, muerte o morfología celular, se cultivaron células HEK293T y HeLa modificadas genéticamente que sobreexpresan o expresan muy bajos niveles de PSAP. Se ha constatado que las células conservaban las características propias de su modificación genética, por medio de la realización de controles con antibióticos y por la técnica del western blot, que demostró que los niveles de sobreexpresión de PSAP eran los esperados tras la modificación de las células HEK293 e inducción de la expresión.

Las células se tiñeron con distintos fluorocromos y se estudiaron utilizando un microscopio óptico multidimensional, que también puede realizar experimentos en célula viva, lo que permitió llevar a cabo estudios de viabilidad y morfología celular.

En el experimento de viabilidad, se puso de manifiesto la actividad proapoptótica de PSAP tras añadir camptotecina pues la población que sobreexpresaba PSAP tenía la mayor tasa de mortalidad. Sin embargo, sin camptotecina, el crecimiento de esta población era similar al del resto de poblaciones con niveles de PSAP normales.

Por otro lado, se vieron diferencias en cuanto a la morfología entre las células HEK293 con niveles de PSAP reducidos al 20% (HEK293-11C) y el resto de poblaciones.

Estos resultados indican la importancia de las investigaciones de PSAP para estudiar las consecuencias de su inhibición y para entender en profundidad la vía apoptótica que implica a esta proteína.

ABSTRACT

We have studied the PSAP protein (presenilin 1-associated protein) also known as Mtch1 (mitochondrial carrier homolog 1), because of their proapoptotic function and the eventual relation with Alzheimer's disease.

In order to determine if overexpression or reduction of PSAP levels lead to changes in proliferation, death or cell morphology, we have cultivated modified HEK293T and HeLa cells which overexpress or express very low levels of PSAP. We have found that

cells conserve their specific characteristics by carrying out controls with antibiotics and by using the Western Blot technique, which have shown that overexpression levels of PSAP were the ones expected after the modification of the HEK293 cells.

Cells were stained with different fluorochromes and examined using an optic microscope which can also be used for live cell experiments, allowing us to study cell viability and morphology.

In the viability experiment, we have seen the proapoptotic activity of PSAP after adding camptothecin, an apoptosis inducer, because the population overexpressing PSAP had the highest mortality rate. Nevertheless, without camptothecin, the growth of this population was similar to the samples with normal levels of PSAP.

On the other hand, we have seen differences in the morphology of HEK293 cells with PSAP levels reduced down to 20% (HEK293-11C) with regard to the other samples.

These results show the relevance of research with PSAP in order to study the consequences of their inhibition and to understand the apoptotic pathway involving PSAP.

ANTECEDENTES

El proceso apoptótico es ejecutado por un grupo de cisteín-proteasas denominadas caspasas. Las caspasas son activadas por dos vías principales distintas[1]:

- Extrínseca: desencadenada por la unión de ligandos a los receptores de muerte, que da lugar a la formación del complejo DISC y con esto a la activación de la caspasa-8.
- Intrínseca: comienza con la formación de canales en la membrana mitocondrial por el complejo Bak/Bax y la liberación del citocromo c de la mitocondria. Después, esta molécula se une a Apaf-1 con la consecuente formación del apoptosoma, que conduce a la activación de la caspasa-9.

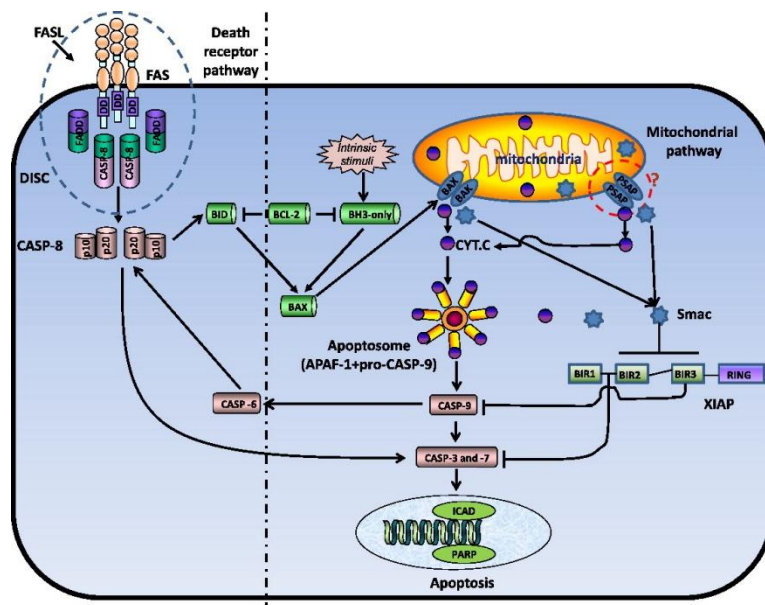


Imagen 1. Diagrama del receptor de muerte (DR) y las vías mitocondriales para la inducción de la apoptosis [1]

Además, estas vías están interconectadas por la caspasa-8. Esta caspasa activada puede producir la proteólisis de Bid, generando t-Bid, que activará a la vía de Bak/Bax.

En este proyecto, se estudiará la acción de la proteína PSAP/Mtch-1, implicada en apoptosis.

La proteína asociada a la presenilina 1 (PSAP), también conocida como homólogo de transportadores mitocondriales 1 (Mtch1), se identificó por primera vez como una proteína que interactúa con el extremo C-terminal de la presenilina 1, proteína implicada en la enfermedad del Alzheimer. Más tarde se descubrió que PSAP es una proteína mitocondrial proapoptótica implicada en la vía intrínseca de la apoptosis. Esta hipótesis se formuló debido a que la células entran en apoptosis cuando la proteína PSAP se sobreexpresa en células cultivadas [2], pues al sobreexpresarse se libera citocromo c de la mitocondria.

La proteína PSAP es una proteína integral de la membrana externa mitocondrial (imagen 2). Contiene múltiples motivos de localización mitocondrial dispersos a lo largo de la proteína [3]; más específicamente, posee un dominio transmembrana, que, en la posición y orientación correcta, es necesario para la inserción en la membrana.

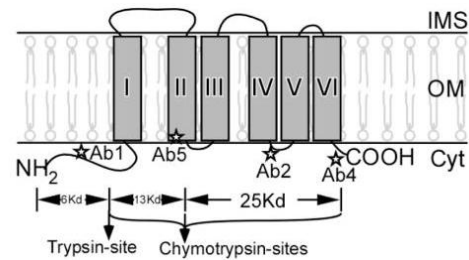


Imagen 2. Estructura predicha de PSAP [2].

Además, se descubrió la existencia de dos isoformas de PSAP que comparten dos dominios pro-apoptóticos y múltiples señales internas para la importación a la membrana mitocondrial externa [3]. Se vio entonces que estas dos regiones del extremo amino terminal de la proteína, supuestamente independientes, son las responsables de su actividad proapoptótica [3]. A continuación, se descubrió que la localización en la membrana mitocondrial efectuada por el dominio N- terminal de PSAP, junto con su dominio PDZ, son imprescindibles para que la proteína induzca la vía apoptótica [2]. Después, se descubrió que la vía de apoptosis inducida por la sobreexpresión de PSAP ocurría de una manera independiente de Bax/Bak [4], y se sugirió además que podría depender de la formación del poro de transición de permeabilidad. Esto explicaría la despolarización de la mitocondria que se pone de manifiesto en esta vía y que ocurre antes de la activación de las caspasas.

Finalmente, el último trabajo, realizado en 2013 [1] postula que la vía apoptótica inducida por PSAP es una nueva vía de apoptosis: la proteína PSAP desencadena la liberación de citocromo c y de Smac por una vía independiente de Bcl-2. Este mecanismo es dependiente de las proteínas Apaf-1 y Smac, y por lo tanto de la formación del apoptosoma desencadenado por la salida del citocromo c, que activará a la caspasa 9. Por último, se corroboró además que esta ruta es independiente, incluso en cuanto a su regulación, de las proteínas de la familia Bcl-2.

Parte del interés de esta proteína reside en su posible relación con el Alzheimer, enfermedad causada por la muerte neuronal y, posiblemente, por la disfunción mitocondrial de las neuronas. Se produce por la acumulación extracelular de agregados proteicos principalmente de amiloide β ($A\beta$). Se ha visto además que los oligómeros solubles de $A\beta$ son tóxicos para las neuronas y que estos péptidos se sintetizan mediante el procesamiento de precursores de proteína $A\beta$ llevado a cabo por una β -secretasa y una γ -secretasa. La relación con PSAP radica en que la γ -secretasa se compone de presenilina que parece responsable de la actividad catalítica. Además, la implicación de la presenilina y del péptido $A\beta$ en la muerte celular por apoptosis se ha demostrado en numerosos artículos. Por ejemplo, se demostró que el péptido $A\beta$ induce la liberación del citocromo c de mitocondrias aisladas y la apoptosis neuronal. Además, por otro lado demuestran como la presenilina 1 interacciona con Bcl-2 y como las presenilina 1 y 2 interaccionan con Bcl-XL promoviendo así la apoptosis al reducir la concentración de Bcl-2 mitocondrial [3].

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El objetivo de este proyecto es entender la influencia e implicación de la proteína PSAP (presenilin 1-associated protein) en células humanas, particularmente, en la apoptosis. En concreto, se pretendió ver posibles cambios celulares, detectables por microscopía, producidos por la sobreexpresión o reducción de los niveles de PSAP.

Como ya se ha explicado anteriormente, se ha descubierto que esta proteína es una proteína integral de membrana externa mitocondrial y que al sobreexpresarse induce apoptosis, vía independiente de Bax y Bak.

Para alcanzar el objetivo, en este trabajo se estudiaron las líneas celulares HEK293 (células embrionarias humanas de riñón) y HeLa (células derivadas de cáncer cérvico-uterino), de las que se crearon anteriormente clones que expresan la proteína PSAP a diferentes niveles:

- Clones que expresan RNA de interferencia complementario a PSAP que reducen su expresión hasta dejarla en un 20%: se han designado como 11C.
- Clones que sobreexpresan PSAP, tras ser inducidos: se han denominado clon 8.
- Clones que tienen niveles de PSAP inalterados: han sido las células control.

Estas células se mantuvieron en cultivo en el microscopio entre uno y tres días para poder observarlas a lo largo del tiempo mediante microscopía óptica multidimensional, previa tinción con fluorocromos. Tras esto, se procedió a analizar las imágenes y en algunos casos, al recuento celular, determinando cambios morfológicos o de viabilidad.

Por otro lado, a lo largo del tiempo se hicieron distintos test para verificar que las líneas celulares no se hubieran modificado o contaminado, dando así validez a los resultados: test de antibióticos, western blot anti-Myc, test de detección de micoplasmas.

Con esto se pretendió determinar si tanto la viabilidad como la morfología celular variaban de una línea a otra, pudiendo concluir así la implicación de la proteína PSAP en esos procesos.

METODOLOGÍA: TÉCNICAS Y MATERIAL

MATERIAL UTILIZADO

Líneas Celulares estudiadas

En este proyecto se pusieron en cultivo diversas líneas celulares, que se encontraban criogenizadas pues se habían creado con anterioridad. Estos cultivos fueron de dos tipos celulares: células HEK-293 T y células HeLa.

Dentro de las células HEK293, se trabajó con las siguientes líneas:

- Control: son células HEK- 293T wild type.
- HEK 293-293 o clon 8: son células que sobreexpresan PSAP, tras inducción con ecdisona o análogos. Se crearon introduciendo la secuencia que codifica para la proteína PSAP fusionada al epítipo Myc, por delante de un promotor que responde a ecdisona, en el vector pIND, que confiere además resistencia a ampicilina y neomicina (geneticina en células eucariotas). Este vector se llamó pJAC293. Las células se cotransfectaron además con el vector pVgRXXR, que expresa el receptor de ecdisona bajo un promotor de CMV y confiere resistencia a zeocina. Por último, se seleccionaron con los antibióticos adecuados las células que habían integrado adecuadamente ambos vectores, obteniendo así una línea celular estable y con el DNA foráneo integrado.
- HEK 293- 11C: son células que expresan siRNA complementario a la secuencia de RNA de PSAP, disminuyendo así los niveles de esta proteína a un 20%. En estas células, el siRNA se forma a partir de una secuencia de DNA que presenta un extremo complementario al otro y una secuencia central independiente; así al transcribirse el RNA se pliega formando una horquilla que posteriormente reconocerá la maquinaria celular DICER/RISC. Esta horquilla será procesada por DISC que creará el siRNA para que luego RISC lo una dando lugar a la interferencia.

Esta línea se construyó transfectando con vectores, que se componían de un promotor H1 para la DNA polimerasa III, y de un fragmento de la secuencia completa de RNA a interferir (cada uno de los fragmentos se denominó con un número distinto).

Se seleccionaron cuatro regiones correspondientes al mRNA de PSAP, puesto que a priori no se sabía cuál de ellas produciría una mejor interferencia. De diez posibles regiones identificadas tras un primer análisis, se seleccionaron las regiones 1, 3, 8 y 10. La construcción se generó mediante una serie de PCRs consecutivas, utilizando el Silencer Express Kit de Ambion. Al haber secuencias complementarias en las PCRs, es frecuente que haya delecciones o inserciones, por ello tuvieron que seleccionarse varios pools de clones de cada región, hasta dar con el correcto (esto añadió un número adicional a la denominación de cada clon o pool de clones). Tras transfectar células, se seleccionaron varios clones para cada región, y se analizaron sus niveles de PSAP mediante western blot. Esto se hizo varias veces, hasta obtener resultados satisfactorios, lo cual añadió una letra a la denominación de cada clon o pool de clones. Finalmente, se seleccionó el pool de clones 11C (región 1, construcción de DNA 1 -integrado en un pool de clones- y experimento C), como el que mayores niveles de interferencia mostraba. Se seleccionaron también otros con menores niveles de interferencia, o sin interferencia para usar como control (región

3, DNA 2, experimento C; región 8, DNA 3, experimento C; región 10, clon 1, experimento C). Lamentablemente todos los clones, excepto los 11C, se perdieron en un laboratorio anterior, por lo que se repitió el proceso en células HeLa.

Dentro de las células HeLa, se trabajó con las siguientes líneas:

- HeLa 11C: creadas de la misma manera que las HEK 293- 11C.
- HeLa 83C: clones que disminuyen los niveles de PSAP pero no tanto como las 11C.
- HeLa 32: incorporan una secuencia de ARN interferente pero no reducen los niveles de PSAP. Se utilizaron como control del proceso de manipulación, pues todos los diferentes clones siguieron el mismo proceso.
- HeLa 101C: clones que disminuyen ligeramente los niveles de PSAP pero no tanto como las 11C ni como las 83C.

Microscopio de fluorescencia

Es un sistema de microscopía multidimensional modelo Leica DMI 6000B con luz estructurada y software de análisis MMAF (Metamorph). El sistema está compuesto por un microscopio invertido de fluorescencia completamente automatizado, un sistema de luz estructurada OptiGrid, que permite obtener imágenes semiconfocales, y un sistema de incubación con control de temperatura y CO₂ para célula viva. Dispone también del sistema Dual View de Photometrix, que permite utilizar técnicas como FRET. Todo el sistema está controlado por el software Metamorph, que permite tanto el manejo de todos los componentes del equipo como el procesamiento de imágenes.

Este equipo tiene varios objetivos de diferentes aumentos y que además permiten utilizar microscopía de contraste de fases, de campo claro etc.

También dispone de varios filtros para distintos fluorocromos que permiten seleccionar distintas longitudes de onda de excitación y de emisión.

Gracias a todo este equipamiento, el microscopio permite realizar técnicas de microscopía de fluorescencia invertida, microscopía multidimensional (que utiliza dimensiones espaciales (x, y, z), canales de fluorescencia, tiempo, distintas posiciones de platina), adquisición de Z stacks y reconstrucción 3D, colocalización, FRET, seguimiento de partículas, análisis morfométricos etc.

TÉCNICAS

El trabajo experimental se basará en los siguientes procesos:

- Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo.
- Experimentos en célula viva utilizando microscopía óptica multidimensional.
- Análisis de imagen.

- Control con antibióticos.
- Western Blot.
- Test de micoplasmas.

Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo

Lo primero que se hizo en el proyecto es descongelar todas estas líneas celulares, que se encontraban criogenizadas, y ponerlas en cultivo. El cultivo se realizó en frascos de 25 cm² que contenían medio DMEM completo (composición: medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 100X y penicilina y estreptomicina 100X (a concentraciones tras la dilución de 100 U/ml penicillina, y de 0,1 mg/ml estreptomicina).

Posteriormente, durante las semanas que duró el estudio de PSAP, día a día, se visualizaron las células cultivadas para mantenerlas bajo las condiciones adecuadas. Para ello, cuando se requería se cambiaba el medio (si había muchas células muertas o el medio estaba agotado y viraba a naranja) o se hacía una dilución de las células utilizando una solución de tripsina-EDTA (cuando las células alcanzaban la confluencia).

Experimentos en células viva con microscopia óptica multidimensional.

A lo largo de los días se hicieron distintos experimentos con las células en cultivo. Estos experimentos consistían básicamente en seguir el desarrollo de las distintas líneas celulares en el microscopio óptico multidimensional, que permite visualizar las células mientras proliferan. Esto se logra gracias a que las placas de cultivo se pueden colocar en la platina del microscopio, acoplada a una cabina de cultivo que mantiene las condiciones adecuadas: temperatura de 37°C; 5 % CO₂; humedad. Estos experimentos se realizaron en placas de 24 pocillos, en donde cada pocillo tenía una superficie de 2 cm².

Para visualizar las células en cultivo, estas se tiñeron con distintos fluorocromos que permiten visualizar el núcleo o las mitocondrias o distinguir las células vivas de las muertas. Para teñir el núcleo celular y las mitocondrias de células vivas, se utilizó, respectivamente: Hoechst 33342 y Mitotracker Red, a una concentración final de 1 µM y de 25 nm, respectivamente.

- Hoechst 33342: colorante que se une al surco menor del ADN con una preferencia por secuencias ricas en adenina y timina. Puede atravesar la membrana de células vivas, tiñendo así células viables y fijadas. Este colorante ha de dejarse durante 30 minutos para que se ligue al DNA, pero luego ha de eliminarse pues es tóxico para las células. Así, a lo largo del tiempo, esta tinción perderá intensidad pues conforme se vayan dividiendo las células se repartirán el colorante que tenían las primeras, que fueron las únicas que se tiñeron antes de eliminarlo.

- Mitotracker Red: es un colorante-rojo fluorescente que tiñe las mitocondrias en células vivas y su acumulación depende del potencial de membrana. Ocurre lo mismo que con el Hoechst 3342, este colorante ha de eliminarse tras 30 minutos de tinción para disminuir su toxicidad.

Por otra parte, para identificar células muertas, se utilizó ioduro de propidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$.

- Ioduro de propidio: es un agente intercalante que se une a los ácidos nucleicos de manera inespecífica de secuencia. Es una molécula hidrofílica que no puede atravesar la membrana celular intacta, de modo que sólo tiñe células muertas que tienen la membrana permeabilizada. A diferencia de los dos colorantes anteriores, este ha de mantenerse durante todo el experimento en el medio de cultivo pues si no las células muertas que van a apareciendo no se teñirían.

A) Experimentos de tinción de núcleo y mitocondrias

En los experimentos de tinción de núcleo y mitocondrias se intentó ver cambios significativos en morfología y en la viabilidad celular. Para ello, se sembraron en cada pocillo el mismo número de células, para lo que previamente se procedió al conteo de cada una de las líneas celulares con la cámara de Neubauer. Además, se sembraron un determinado número de células que permitía que tras 24 o 48 horas, según el experimento, las células que se tomaban como referencia alcanzaran la confluencia (es decir, se sembraban al 50% o al 25 % de confluencia, respectivamente). Así, se podían observar diferencias de morfología y de viabilidad celular.

Para explicar cómo se sabía cuántas células se necesitaba sembrar en cada pocillo de 2 cm^2 de la placa de 24, se expone el ejemplo de sembrar al 50% de confluencia. Para ello se tomó como referencia el frasco de 25 cm^2 que contenía células que estaban totalmente confluentes en un volumen de 5ml. Con esto, para tener las células en el pocillo de 2 cm^2 al 50 % de confluencia había que echar 200 μl de células en él y rellenar con 300 μl de medio.

Como había que poner el mismo número de células en cada pocillo, se necesitaba saber cuántas células había en los 200 μl sembrados. Para esto, se procedió al conteo de las que se tomaron como referencia y del resto de líneas y se concluyó echar 300.000 células/pocillo. También se sembró cada pocillo por duplicado para descartar más fácilmente errores y contrastar los resultados.

B) Experimentos de viabilidad celular

Por otro lado, tras la tinción de células vivas (con Hoechst) y de células muertas (con ioduro de propidio), se pudo proceder a su conteo mediante el análisis de imagen con el software Metamorph. Con esto se calcularon porcentajes de viabilidad celular para determinar diferencias en la tasa de mortalidad.

Además, en estos experimentos, se añadió a las muestras de HEK clon 8 una concentración de 1 μ M ponasterona, molécula análoga a la ecdisona. La ponasterona activa al promotor inducible por ecdisona de PSAP insertado, y de esta manera se sobreexpresa la proteína PSAP, pudiendo así analizar su efecto sobre la viabilidad, o incluso sobre la morfología celular.

Para acabar, decir que en todos estos experimentos, las células crecían bajo el microscopio, el cual tomaba fotos de las células a distintos tiempos. Estas fotos luego se visualizaron y analizaron con el software Metamorph.

A continuación se exponen los experimentos más relevantes de los efectuados. Todos ellos se han realizado con el objetivo de 10X (100 aumentos) y en campo claro, aunque en los que se incorporan fluorocromos se utilizan también los filtros de fluorescencia adecuados para ellos (Texas Red y DAPI, apto para detectar la fluorescencia del DAPI y del Hoechst).

A.1) Experimento con ponasterona en células HEK control, HEK clon 8 y HEK 293-11C

Se realizó sin fluorocromos para evitar la toxicidad que estos ejercen. Se utilizó el objetivo de 10X (100 aumentos) en campo claro (contraste de fases) y se tomaron fotos cada 30 minutos durante 24 horas.

Las células HEK control y HEK clon 8 que se sembraron en los pocillos no se contaron porque los frascos de 25 cm² de cultivo estaban ambos confluentes por igual. Se pusieron 200 μ l/ pocillo para tener en el pocillo confluencia aproximada del 50%, con 300.000 células.

De las células HEK 293- 11C se añadieron también 300.000 células/pocillo, pero estas sí se contaron, pues no habían alcanzado la confluencia.

A.2) Experimento con ponasterona y fluorocromos en las células HEK control y HEK clon 8

Se sembraron en la placa para estar al 50% y al 25% de confluencia. Después, estas células se tiñeron con los fluorocromos Mitotracker Red y DAPI (fluorocromo que se une al ADN). Además, las clon 8 se incubaron sin ponasterona y con ponasterona a una concentración final de 1 μ M y se tomaron fotos cada 30 minutos durante 24 horas. Este experimento se realizó cuando aún no se disponía de Hoechst.

A.3) Experimento con ponasterona y fluorocromos en las células HEK clon 8 y HEK 293- 11C

Las líneas HEK clon 8 y HEK 293- 11C se sembraron en la placa para estar al 50% de confluencia y para ello antes se procedió a su conteo utilizando la cámara de Neubauer. Tras adherirse, se tiñeron con los fluorocromos Mitotracker Red y Hoechst y se tomaron fotos cada 30 minutos durante 24 horas.

A.4) Experimento con fluorocromos en las células HeLa

Se realizó el conteo de las células para echar 150.000 células por pocillo, que son las células necesarias que tiene que haber en cada pocillo para estar al 25% de confluencia. Una vez sembradas, se incubaron 24 horas antes de empezar el experimento, tras las cuales estaban a aproximadamente al 50 %. Entonces, las distintas líneas celulares HeLa se tiñeron con los fluorocromos Mitotracker Red y Hoechst.

En este experimento se decidió incubar las células en la placa de 24 pocillos durante 24 horas antes de proceder a la tinción con fluorocromos. Se tomó esta decisión porque en los anteriores estudios las células sólo se habían incubado durante 2 horas antes de cambiar el medio para añadir y eliminar luego el Hoechst y en sólo este tiempo no todas las células se habían conseguido adherir, de modo que algunas se arrastraban al retirar el medio, impidiendo así que hubiera el mismo número de ellas en cada pocillo.

B.1) Experimento de viabilidad celular con camptotecina en células HEK293 y HeLa

Por último, se hizo un experimento con el inductor de apoptosis camptotecina, que se añadió a una concentración final de 5 μ M. Este estudio se hizo con todos los tipos de HEK293 y HeLa que se habían cultivado.

Para ello se sembraron los pocillos a una confluencia de entre el 5 y el 10%, de manera que las células estuvieran muy espaciadas y no hubiera muchas, facilitando así su conteo posterior. A continuación se añadió la ponasterona durante 4 horas y después se tiñó con Hoechst y con ioduro de propidio, añadiendo además camptotecina en los pocillos necesarios (imagen 3).

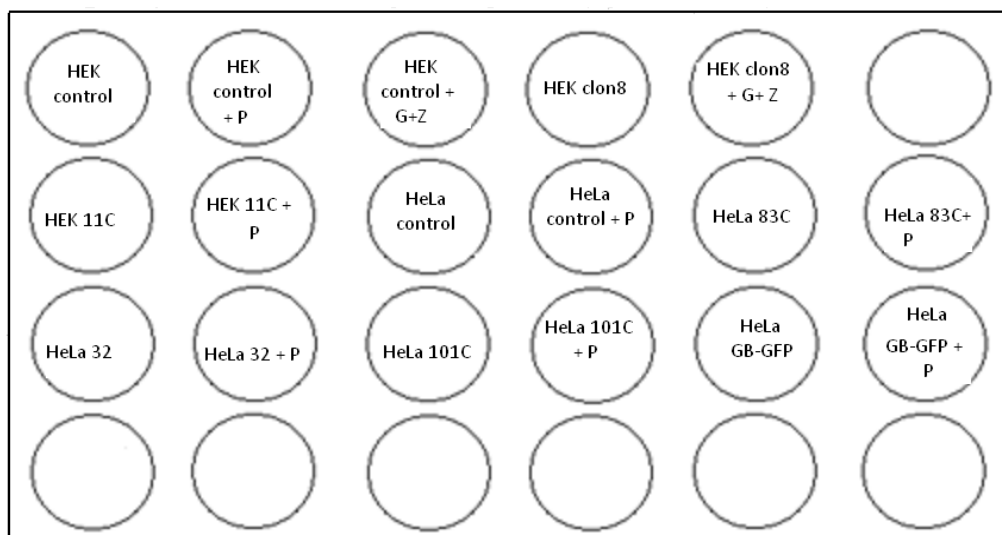


Imagen 3. Distribución celular y de compuesto en la placa de 24 pocillos. * CMT es camptotecina y P es puromicina

Finalmente se realizó un experimento de célula viva en el microscopio multidimensional durante 48 horas, tomando fotos cada hora.

En este experimento no se eliminaron los fluorocromos pues sino los núcleos no se marcaban lo suficiente como para proceder al contaje celular, que se hizo con el módulo Live/Dead cells del software Metamorph.

Este experimento aportó los datos necesarios para calcular la mortalidad cuando el inductor de apoptosis está presente.

Análisis de imagen

Para visualizar y analizar las imágenes se utilizó el módulo Metamorph y para el recuento de células y el cálculo de la mortalidad el módulo Live Dead. Este módulo de la aplicación permite usar dos longitudes de onda y dos fluorocromos diferentes; un colorante (Hoechst) marca todas las células y el otro (ioduro de propidio) marca las muertas. Luego este módulo procede al recuento de las “manchas” producidas por cada fluorocromo y se obtiene el porcentaje de mortalidad.

Control con Antibióticos

Consistió en añadir antibióticos a las células para ver si estas conservaban el gen insertado, pues con él van también genes de resistencia a antibióticos.

Se usó puromicina, para ver si las células interferidas (HEK293-11C, HeLa 11C, HeLa 83C, 101C y 32) mantenían el inserto, pues este incluía el gen de resistencia a este antibiótico. Para ver si las HEK clon 8 conservaban el inserto, se utilizaron zeocina y geneticina, (las clon 8 tienen resistencia a dos antibióticos pues se han insertado 2 vectores, uno que contiene el receptor de ecdisona necesario para que la ecdisona se internalice y otro con el promotor inducible con ecdisona).

Para ello, se sembró una placa de 24 pocillos con los distintos tipos celulares añadiendo 50.000 células por pocillo en un volumen final de 500 µl de DMEM completo.

La concentración y volúmenes necesarios de antibiótico añadido se muestran en la tabla a continuación:

	Puromicina	Zeocina	Geneticina
[Stock]	10mg/ml→se diluye a 0'1mg/ml	100mg/ml	50mg/ml
[Final]	1 µM	400 µg/ml	400 µg/ml
Volúmen a echar	2,72 µl/pocillo	2 µl/pocillo	4 µl/pocillo

Tabla 1. Concentración y volúmenes de antibióticos utilizados.

Western blot Anti Myc

El objetivo fue detectar el epítipo Myc, que está fusionado al gen de PSAP, mediante la incubación con el anticuerpo antiMyc: con ello, se podrá ver qué líneas celulares codifican la proteína PSAP correspondiente al inserto, pues esta se detectará indirectamente mediante la detección de Myc.

La técnica se basa en distintas etapas:

- Preparación del buffer de carga con SDS que dota a la proteína de una carga negativa uniforme y que rompe las membranas, lisando las células.
- Preparación y conservación del gel de poliacrilamida: Running gel 10% y Staking gel 4%.
- Carga de muestras, centrifugadas y hervidas, en el gel de poliacrilamida.
- Electroforesis: voltaje=cte=130V; mA≈50; tiempo=1 hora.
- Transferencia a membrana de PVDF: mA= cte= 200; tiempo= 1 hora.
- Bloqueo de la membrana mediante la adición de PBS Tween y de leche en polvo.
- Adición del anticuerpo de ratón antiMyc.
- Adición del anticuerpo secundario HRP antimouse.
- Revelado: se utiliza el kit chemiluminiscent HRP substrate: inmovilan western compuesto por: “HRP substrate Luminol Reagent” y “HRP substrate peroxide solution”. Después, la solución de revelación y luego la de fijación.

Detección de Micoplasmas

El objetivo fue detectar micoplasmas en los cultivos pues estos no se observan en el microscopio (excepto cuando se tiñen con Hoechst o DAPI y hay muchos). Sin embargo muchas veces se encuentran en experimentos en los laboratorios, pudiendo alterar el comportamiento y morfología celular falseando los resultados obtenidos en los experimentos de microscopía.

Se decide comprobar si las HEK293 y las HeLa control tienen micoplasmas, pues llevan más tiempo en cultivo que el resto; así que si estas líneas no están contaminadas, las demás seguramente tampoco. Para ello se utiliza el sobrenadante de los cultivos de HEK clon 8, HEK293- 11C, HeLa control, HEK293-T, agua estéril (es el control negativo) y el control positivo, que no era fiable pues se encontraba mal etiquetado y no se sabía quién lo había preparado.

A continuación, se prepararon las muestras (tabla 2) para realizar una PCR de tapa caliente: cada muestra contenía 18 µl como se especifica en la tabla posterior más 2 µl de muestra de un cultivo en particular, dando un total de 20 µl por muestra.

Reactivo	Volumen para 1 muestra	Volumen para 7 muestras
H2O miliQ	14,1 µl	102, 9 µl
Buffer + MgCl2 10x	2.0 µl	14,0 µl
dNTPs 25 mM 3	0,4 µl	2,8 µl
Primer Fwd 10 µM 4	0,4 µl	2,8 µl
Primer Rvs 10 µM 4	0,4 µl	2,8 µl
Taq Pol. 5 U/ µl	0,1 µl	0,7 µl
Total	18,0 µl	126, 0 µl

Tabla2. Preparación de las muestras a amplificar por PCR.

Tras las PCR, se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1% con 0,5 µl de SYBR Safe.

A cada muestra se le añadieron 4 µl de tampón de carga 6x y se cargaron 15 µl de cada una en su pocillo correspondiente; luego se puso en marcha la electroforesis durante 50 minutos a voltaje=cte.=80 V y mA≈400 mA.

RESULTADOS

CULTIVO CELULAR

Cabe destacar que en general las células HEK293 han crecido formando más conglomerados que las células HeLa.

Hay ciertas diferencias en el crecimiento de las 3 líneas celulares de tipo HEK293, pues las clon 8 y las HEK control se dividen más rápidamente que las HEK293- 11C. Además, se observa la aparición de “células gigantes”, redondeadas, grandes y con filopodios en los cultivos de las células HEK293- 11C, células que no aparecen en el resto de cultivos. Estas células podrían ser senescentes, pues el aspecto es similar a ellas; lo que permitiría suponer que niveles bajos de PSAP inhiben la división celular y acaban matando a las células. Las “células gigantes” también podrían ser otro tipo celular proveniente de la diferenciación o transformación, producto de la continua manipulación de esta población. A lo largo de los experimentos, se ha intentado comprender su origen.

Sin embargo, no se puede concluir que estas diferencias en crecimiento y morfología se deban a los diferentes niveles de PSAP que las células expresan, pues podrían deberse también a otras causas que se discutirán después.

EXPERIMENTOS DE CÉLULA VIVA

Se han hecho numerosos experimentos de célula viva, con diferentes fluorocromos y concentraciones de células. Cabía esperar que las HEK clon 8 inducidas con ponasterona tuvieran una tasa de mortalidad mayor que el resto, pues la proteína proapoptótica estaba sobreexpresada, sin embargo, como se ha observado en los experimentos, esto no es evidente. A continuación se mostrarán los experimentos con resultados más significativos.

Experimento con ponasterona en células HEK control, HEK clon8 y HEK293-11C

Como se muestra en el anexo, en las fotos 1-12, tanto las HEK control como las clon 8 con y sin ponasterona alcanzan la confluencia tras 24 h de la siembra en la placa. Se observa también como al sembrar las células, estas tienen una forma redondeada, pero al irse adhiriendo a la placa, van alargándose. Los 3 tipos celulares tienen una morfología y tiempo de duplicación similares. De esto se deduce que la sobreexpresión

de la proteína PSAP al añadir ponasterona no alcanza niveles suficientes para inducir la apoptosis celular, como ya se sabía anteriormente, ni influye en la morfología a nivel celular (no se puede saber a nivel de orgánulos pues no están teñidos).

Las células HEK293-11C (anexo, fotos 13- 16) también crecen a lo largo de las 24 h, pero el tiempo de duplicación es algo inferior al de las HEK control y clon 8 anteriores. Cabe destacar que la morfología celular es distinta a la de los casos anteriores, con la existencia de alguna “célula gigante” (no mostrado) cuyo origen se discutirá posteriormente.

Experimento con ponasterona y fluorocromos en células HEK control, HEK clon 8

Se ha intentado ver diferencias en los orgánulos y en la viabilidad producidas por la sobreexpresión de PSAP, para lo que se tiñeron las células con los fluorocromos MT. Red y Hoechst.

Sin embargo, como se muestra en el anexo, fotos 17 -22, el fluorocromo DAPI no se ha fijado a los núcleos (por imposibilidad de atravesar la membrana íntegra) y tan solo se tiñen unos pocos, que corresponden a células muertas. Se repetirá el experimento con otro fluorocromo (Hoechst), del que no se dispuso hasta más tarde, que tiñe mejor las células vivas pues de este no se pueden extraer conclusiones.

Hay que remarcar que de nuevo las HEK control y las clon 8 con y sin ponasterona crecen a ritmos similares.

Experimento con ponasterona y fluorocromos en células HEK clon 8 y HEK293-11C

Las imágenes del experimento (ver anexo fotos 23-34) muestran los núcleos teñidos en azul y las mitocondrias en rojo. No se distinguen diferencias en la morfología de estos orgánulos entre los 3 tipos celulares aquí analizados, dentro de lo que se ha alcanzado a observar con el objetivo de 10X.

Al poner la placa sembrada en el microscopio (ver anexo fotos 23-34), destacó las células tenían un aspecto extraño. Como se ve en las fotos, las células se agrupan en conglomerados redondeados y no definidos. Sin embargo, durante las 24 horas que duró el experimento, las células se siguieron dividiendo. Estas agrupaciones pueden deberse en parte a una resuspensión insuficiente de las células antes de sembrarlas, a una mala adaptación al plástico de la placa pero también a la toxicidad que ejercieron sobre ellas la combinación de los fluorocromos añadidos Hoechst y Mitotracker Red. Esta toxicidad se ha puesto en evidencia en un experimento en el que el Hoechst no se eliminó de la placa de 24 pocillos durante un experimento de 48 h (no mostrado) y la viabilidad celular se redujo a más del 50 %. Se ve de nuevo que no hay diferencias a

nivel de crecimiento entre las HEK clon 8 con la proteína PSAP sobreexpresada (anexo, fotos 27 y 28) y sin sobreexpresar (anexo, fotos 29 y 30).

También se ve como la morfología de las HEK293- 11C (anexo, fotos 23-26) es algo distinta de los dos tipos de clon 8 (las que sobreexpresan la PSAP y las que la expresan a niveles normales), lo que podría deberse al tratamiento que estas recibieron, al lugar en el que se integró el inserto, o a los bajos niveles de proteína PSAP. Además, también aparecen “células gigantes”, en las que se distinguen varios núcleos (anexo fotos 35 y 36), descartando así que sean senescentes.

Experimento con fluorocromos en las células HeLa

La morfología de los distintos tipos de células HeLa analizados en este experimento, Hela control (anexo, fotos 37-40), 83C (anexo, fotos 41- 44), 101C (anexo, fotos 45-48) y 32 (anexo, fotos 48 -52) es muy similar. En la población de células HeLa ni las modificaciones que han sufrido ni los distintos niveles de expresión de PSAP alteran la morfología celular. Además, los tiempos de duplicación son muy parecidos.

En todas estas imágenes (anexo, fotos 37-52) se ve como las células alcanzan la confluencia, y por falta de espacio para crecer, comienzan a despegarse y redondearse, lo que indica que están muriendo.

Experimento de viabilidad celular con camptotecina en las células HEK293 y HeLa

A lo largo de este experimento se dejaron los fluorocromos, Hoechst e Ioduro de propidio, para que todas las células se tiñeran mejor. Esto causó, en todas las líneas celulares, una disminución considerable en su viabilidad. Sin embargo, como las condiciones de todos los tipos celulares son las mismas, se van a poder comparar unas con otras remarcando o no diferencias en la viabilidad.

Células HEK293

Los datos de este estudio se reflejan en la gráfica 1 y en la tabla 1 del Anexo. Hay que destacar que para todos los tipos de HEK293, la viabilidad es mayor en ausencia que en presencia de camptotecina, que es lo que se esperaba al ser este compuesto un inductor de apoptosis. Además, la acción de este compuesto se hizo notar a partir de las 24 h de su adición.

Se distingue como la máxima viabilidad alcanzada tanto en ausencia como en presencia de camptotecina es para las HEK control. No está claro por qué ocurre esto, pero podría deberse a que, al ser las únicas células sin modificar, sean más estables; el resto podría tener alguna secuencia genética modificada consecuencia de la integración del inserto. En el cultivo celular normal, también se observó que las HEK control eran las más resistentes. A estas les siguen las HEK293-11C, lo que resulta lógico pues tienen sólo un 20% de PSAP por lo que han entrado menos en apoptosis.

Tras las 11C se encuentran las clon 8 sin ponasterona, que expresan niveles de PSAP equivalentes a los de las HEK control. Y finalmente, las que tienen el mayor porcentaje de células muertas son las clon 8 con ponasterona, pues tienen los más altos niveles de PSAP. Hay que destacar que estas últimas células se mueren todas al cabo de 48 h en presencia de camptotecina, lo que no ocurre con las demás poblaciones. Esta situación pone de manifiesto la actividad proapoptótica de la proteína.

Células HeLa

Los datos de este estudio se reflejan en la gráfica 2 y en la tabla 2 del Anexo. Al igual que en el caso anterior, para todos los tipos de HeLa, la viabilidad es mayor en ausencia que en presencia de camptotecina, dato esperable como ya se ha explicado antes. Además, la toxicidad de la camptotecina queda de manifiesto al observar las imágenes (Anexo, fotos 69 – 84), en las que se ve como tras 48 h con camptotecina, las células se redondean. Esto es típico de cuando las células comienzan a morir, por lo que seguramente, al cabo de alguna hora más, el yoduro de propidio ya habrá penetrado en la gran mayoría de las células, efecto que no se ha podido ver pues el experimento se paró.

Siguiendo el ejemplo de las HEK control, en este caso también son las HeLa control las que alcanzan una mayor viabilidad tanto en ausencia como en presencia de camptotecina. Como con las HEK293, no está claro por qué se da esta situación, aunque podría deberse a que el resto de líneas pudieron volverse más inestables como resultado de su modificación genética.

En cuanto al menor porcentaje de mortalidad, a las control le siguen las HeLa 11C, lo que resulta lógico pues estas tienen sólo un 20% de PSAP, y entrarán menos en apoptosis.

El tercer puesto está reñido entre las células HeLa 83C y 32, las primeras alcanzan la mayor tasa de muerte en ausencia de camptotecina, lo que se debe a su inestabilidad que ya quedaba reflejada durante el mantenimiento de los cultivos. Estas células luego alcanzan la misma tasa de mortalidad que las 32. Se ve como el aumento de mortalidad que hay entre la ausencia y la presencia de camptotecina es mayor en las 32 que en las 83C. Este hecho podría explicarse porque a pesar de la inestabilidad de las 83C (pueden tener algún gen importante interrumpido por el inserto), estas expresan niveles más bajos de proteína PSAP.

CONTROL CON ANTIBIÓTICOS

Cuando se visualiza al microscopio óptico la placa con antibióticos, se observan las siguientes características (tabla 3):

Pocillos	Día 29/05/2014	Día 30/05/2014	Día 1/06/2014
HEK Control	Buen aspecto, las hay dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HEK Control + Puromicina	Están vivas pero con un mal aspecto.	Comienzan a morir.	Hay muchas muertas.
HEK Control+ Zeocina+ Geneticina	Se están comenzando todas a morir.	Casi todas muertas.	Todas las células muertas, en suspensión formando una nebulosa.
HEk clon8	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HEk clon8 + Puromicina	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa control	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa control+ Puromicina	Se están comenzando todas a morir.	Casi todas muertas.	Todas las células muertas, en suspensión formando una nebulosa.
HeLa 83C	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa 83C+ Puromicina	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa 32	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa 32+ Puromicina	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa 101C	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.
HeLa 101C+ Puromicina	Buen aspecto, dividiéndose.	Bastantes vivas y con buen aspecto.	Confluentes comenzando a despegarse por falta de superficie.

Tabla3. Aspecto y condiciones de los distintos tipos celulares tras la adición de antibióticos

Además, con la observación de la placa destaca que en las HEK293-11C siguieron estando las “células gigantes”, redondeadas y con varios filopodios (anexo, fotos 35 y 36).

También se observó, lo que concuerda con lo que se esperaba, que las control morían con los antibióticos pues no tenían el inserto que les dotaba de resistencia y se confirmó que los antibióticos tenían que actuar más de un día para matar a las células sensibles.

Las clon 8 con y sin antibiótico tenían similar viabilidad lo que concuerda con que seguían teniendo el gen de resistencia insertado, al igual que lo que ocurrió con las HEK 293- 11C y todas las HeLa interferidas.

WESTERN BLOT ANTI-MYC

A continuación se indican las muestras cargadas en el gel:

M: 3 µl marcador + 12 µl SLBT

1. HEK control procedente de placa de 24 pocillos, son células muertas.
2. HEK control de frasco 25 cm², son células vivas.
3. HEK293-11C.
4. HEK clon 8 sin ponasterona.
5. Muestra 1 de clon 8 con ponasterona, procedente de placa de 24 pocillos.
6. Muestra 2 de clon 8 con ponasterona, procedente de placa de 24 pocillos.

SLBT: sample loading buffer (contiene 2X SDS LDL) + TRIS. Es el buffer desnaturizante. Se cargó además a ambos extremos del gel pues allí las muestras migran distinto y así se evita que las muestras de interés sufran ese efecto.

Tras el revelado, se obtuvo la siguiente imagen de la radiografía (imagen 5):

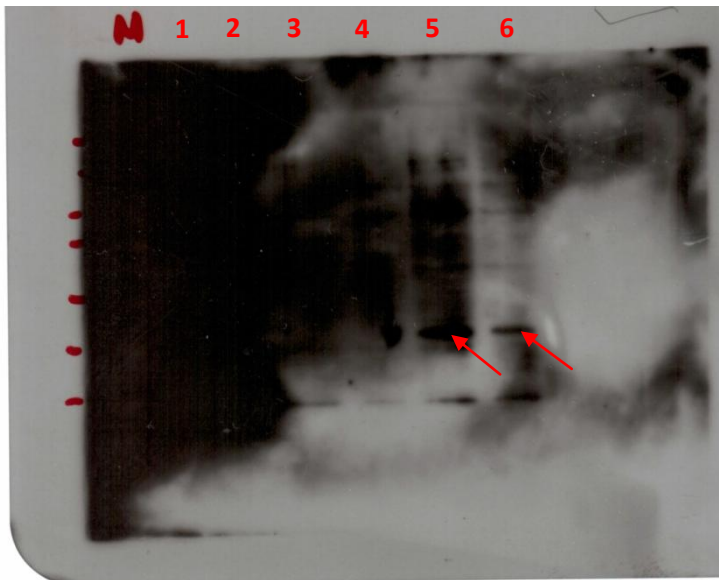


Imagen 5. Radiografía resultante del western blot anti-Myc

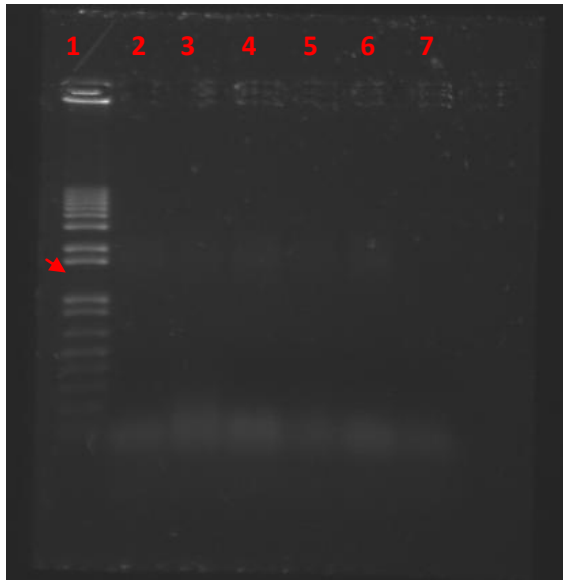
Hay problemas con el fondo que podrían deberse al mal estado de la leche en polvo (bloqueante) o al agitador usado, pues se cambió sin permiso.

En los carriles correspondientes a las HEK clon 8 con ponasterona (indicados con una flecha) se ven claramente dos bandas con el máximo grosor de las bandas presentes, que comparando con el marcador, se supo que correspondían a la masa de la proteína PSAP

recombinante; esto era de esperar pues en estos clones PSAP está sobreexpresada gracias a la activación del promotor del inserto. En el resto de carriles, incluido el de clon 8 sin ponasterona, estas bandas son prácticamente inapreciables, demostrando que los niveles de PSAP que expresan son mucho más bajos.

DETECCIÓN DE MICOPLASMAS

Tras cargar las muestras de la PCR y correr la electroforesis, se tiñó el gel con Syber – Safe y se visualizó con el transiluminador (Imagen 6):



1. Marcador (anexo, figura 1).
2. HeLa.
3. HEK clon 8.
4. HEK293- 11C.
5. HEK control.
6. Contiene teóricamente el control positivo, aunque al no aparecer la banda del DNA de micoplasmas, se ve qué no era tal control.
7. Control negativo.

Imagen 6. Gel de agarosa para la detección de micoplasmas

Al comparar con el marcador (anexo, imagen 7) se observa que no aparece banda en la posición 467 pb (indica con una flecha). Sin embargo, el control positivo, del que no se puede confiar pues no se sabe quién lo preparó, tampoco tiene banda, lo que podría deberse a que los primers no estaban a la concentración correcta (no estaban etiquetados), a que el control positivo estaba en mal estado o a que no se había amplificado bien.

Se concluye que es muy probable que no hubiera micoplasmas: no se detectaron alteraciones de la morfología celular y además el test se repitió (no mostrado) y tampoco se obtuvo banda en la posición correspondiente a DNA de micoplasmas ni en la banda con el control positivo, lo que hizo pensar que el control positivo estaba en mal estado, o no era realmente el control positivo.

DISCUSIÓN

Las células modificadas genéticamente para alterar sus niveles de PSAP que se han estudiado a lo largo de este trabajo fueron creadas en el BIFI años atrás. Se había estudiado su viabilidad con tests colorimétricos y no se habían encontrado diferencias significativas, pero no obstante las líneas celulares no se habían estudiado mediante microscopía de célula viva, al no disponer del microscopio adecuado en aquel momento. La microscopía de célula viva da mucha más información acerca de alteraciones celulares que los tests de viabilidad basados en cambios de color del medio de cultivo, en los cuales no se observan las células directamente.

En este proyecto, se ha continuado el estudio de PSAP utilizando microscopía, en concreto mediante el estudio en célula viva.

Los resultados aquí obtenidos muestran lo que ocurre al sobreexpresar e inhibir PSAP, pues se hicieron controles que confirmaron que las células continuaban con el inserto (control de antibióticos) y que los niveles de PSAP en las clon 8 inducidas seguían altos (Western- Blot).

Al igual que lo ocurrido anteriormente, no se han encontrado diferencias significativas entre las células que expresan bajos niveles de PSAP y las que la sobreexpresan.

Sin embargo, cabe destacar que se distinguen ciertas diferencias entre algunas poblaciones celulares. Las células HEK293-11C, en las que el inserto se ha integrado no por recombinación homóloga, presentan una morfología distinta a aquella que manifiestan las HEK control y las clon 8 sobreexpresadas y sin sobreexpresar. Además entre las HEK293-11C se desarrollan unas “células gigantes” con filopodios. En un principio se creía que estas células eran senescentes, pues compartían rasgos con ellas, como el gran tamaño y los filopodios. Sin embargo, posteriormente esta hipótesis ha quedado descartada pues se puede ver como las “células gigantes” se componen de varios núcleos (anexo, fotos 35 y 36)

Estas diferencias morfológicas pueden ser resultado de varios factores:

- Los bajos niveles de PSAP influyen en la morfología de alguna manera todavía no descubierta.
- Las manipulaciones que estas células han sufrido, ya sea la adquisición de la resistencia a antibióticos o el lugar en el que se ha integrado el vector, han alterado algún gen responsable de estos cambios.
- En algún momento durante el cultivo de esta línea, las células, inestables, se han transformado, debido por ejemplo, al estrés.
- Otra opción es que el RNA interferente de las HEK293-11C afectara a otras funciones celulares ya que cabe la posibilidad de que pueda hibridarse con otras secuencias celulares a parte de la de PSAP.

La explicación que tiene en cuenta el primer factor aquí citado es apoyada al tener en cuenta el origen de las HEK293-11C. Este tipo celular está formado por distintos clones que inhiben un 20% la expresión de PSAP. Al tratarse de una población de clones, es más probable que los rasgos que manifiesta se deban a las características que tienen en común todas las células y no a las características de cada clon (como el lugar en el que se ha integrado el inserto en cada uno de ellos), que no se dejarían notar en el total de los clones. Es decir, el efecto del lugar de integración se elimina al estudiar un conjunto de clones en donde el lugar de inserción es distinto en cada uno.

Sin embargo, esta posibilidad no es muy probable ya que las células en las que se observa esta morfología, las HEK293-11C, fueron sometidas años atrás a un cuello de botella por estropearse el contenedor donde estaban congeladas. Esto pudo conducir a la selección de algún clon en particular o incluso a la transformación celular.

Además, también se observa tanto en los cultivos como en los experimentos de célula viva que las HEK293-11C crecen más lento y tardan más en alcanzar la confluencia que el resto de HEK293. Esto podría explicarse con cualquiera de las hipótesis anteriores.

Para aclarar el motivo de estos rasgos morfológicos particulares de las HEK293-11C, se podrían llevar a cabo diferentes estudios.

Un estudio podría incluir la creación de otras poblaciones celulares HEK que inhibieran un 20% los niveles de PSAP. Si estas poblaciones presentaran los mismos rasgos de morfología que las HEK293-11C y aparecieran las “células gigantes” con varios núcleos, sería mucho más probable que los bajos niveles de PSAP fueran los responsables de estos rasgos, ya que tendríamos una mezcla de clones, y veríamos el efecto global, en donde el punto de inserción ya no importaría.

También sería interesante realizar un control que consistiera en recuperar los niveles normales de PSAP sobreexpresando un clon con los codones cambiados que codificaran también para PSAP. Así, este mRNA no se degradaría, pues no sería complementario al RNA de interferencia y se podría ver si se recuperaba el fenotipo normal. El problema de este tipo de estudios es alcanzar los niveles justos de PSAP, porque si se superan o no se alcanzan, entonces el efecto podría deberse a estas variaciones.

Por otro lado, en el estudio de la población HEK clon 8, hay también ciertos puntos a destacar.

La inducción con ponasterona no refleja ningún cambio aparente respecto a las clon 8 sin inducir, como ya se sabía. Tanto el crecimiento, muerte celular y morfología son similares en ambos casos. Esto indica que los niveles de sobreexpresión alcanzados en esta población tras la inducción no son suficientes para poner de manifiesto la actividad proapoptótica de la PSAP, lo que ya se dedujo en los estudios realizados cuando se crearon estas células.

Sin embargo, en presencia de camptotecina, sí se ven los efectos de la sobreexpresión de la proteína PSAP. El inductor de apoptosis activa de manera más eficaz la muerte celular programada cuando la proteína proapoptótica está sobreexpresada, explicando así que la mortalidad en este caso sea superior al del resto de tipos de células HEK293.

De todas maneras, esto no da información de la vía apoptótica inducida por PSAP. Para saberlo, habría que crear poblaciones que sobreexpresaran la proteína hasta niveles que llegaran a causar, por sí solos, cierta apoptosis celular. Esto ya se ha hecho en el departamento en el que se realizó este proyecto, mediante experimentos de transfección transitorios; sin embargo estas investigaciones sólo permiten estudiar el tipo de muerte celular: apoptosis por liberación de citocromo c independiente de Bax y Bak.

En cuanto a los distintos tipos de células HeLa, no se han visto entre ellos cambios en la morfología ni en el ciclo celular. Esto no invalida lo que ocurre con la morfología en las células HEK293, pues en cada tipo celular la proteína puede afectar de distinta manera.

Podría remarcarse que en el experimento con camptotecina, sí se ve que las HeLa 11C tienen una tasa de mortalidad menor a la del resto de HeLa modificadas, que expresan la PSAP a mayores niveles. Esto se explica por el hecho de que tienen menores niveles de una de las proteínas proapoptóticas, la proteína PSAP.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado la implicación de la proteína proapoptótica PSAP a nivel celular. Tras los experimentos realizados se concluye que la sobreexpresión de la proteína PSAP en las células HEK clon 8 no conduce a la apoptosis debido a que los valores de expresión proteicos que se alcanzan no son suficientes. Sin embargo, su actividad proapoptótica se pone en evidencia en el estudio con camptotecina. No se observan otros cambios celulares significativos, que era el principal objetivo de este trabajo.

El tipo celular HEK293-11C, en el que los niveles de PSAP se reducen al 20%, presenta una morfología distinta al resto de HEK293, pero no se ha podido demostrar que se deba a los bajos niveles de PSAP. Además, en las HEK293-11C, aparecen “células gigantes”. Debido a su morfología, primero se creyó que eran células senescentes, pero, finalmente, esta hipótesis se descartó pues se vio como cada una de ellas poseía varios núcleos. Esto se debe probablemente a que estas extrañas células se modificaron o fueron seleccionadas por el cuello de botella que sufrieron al estropearse el contenedor que las conservaba.

En definitiva, todavía quedan muchos aspectos sin resolver en lo referente a la proteína PSAP. Para intentar esclarecerlos, sería interesante estudiar el knockout de PSAP en ratones, ya que con niveles del 20% respecto a los normales, en células en cultivo no ocurre nada significativo.

Además, sería interesante realizar experimentos con ratones knockout de PSAP para determinar qué le ocurre al ratón y también para contrastar la información obtenida con lo que ocurre en las moscas, en las que la apoptosis tiene otro mecanismo de acción, como se indica a continuación.

En *Drosophila*, se ha descubierto que cuando no hay expresión de PSAP, la mosca muere en el estadio de pupa por exceso de apoptosis. Otros estudios de interferencia en la mosca también indican un exceso de apoptosis, lo cual se contradice en principio con lo visto en células humanas, en las que una interferencia que reduce los niveles de PSAP al 20% no produce cambios significativos.

CONCLUSIONS

In this work we have studied the implication of the proapoptotic protein PSAP at a cellular level. As a conclusion, the overexpression of this protein, in the HEK clon 8 cells, does not induce apoptosis because the protein expression levels are not high enough. However, the proapoptotic activity is evident in the study with camptothecin.

We have not observed other significant cellular changes, what was our main objective in this work.

The HEK293 cell line 11C, in which PSAP levels are reduced to 20%, have a different morphology from the rest of HEK293, but it has not been demonstrated to be due to low levels of PSAP. Furthermore, in HEK293-11C, "giant cells" appear. Due to this morphology we first assumed that these were senescent cells, but finally this hypothesis was rejected because we saw that they had multiple nuclei. These cells went through a bottleneck due to accidental thawing when kept at -80°C, nevertheless they survived, but specific cell clones could have been selected during this process.

In conclusion, there are still many unresolved issues regarding the PSAP protein. To try to clarify them it would be important to study a PSAP mouse knockout, since reduction of protein levels down to a 20% with respect to normal levels in cultured cells does not lead to any evident phenotypic change.

Furthermore, experiments with knockout PSAP mice would be interesting to determine what happens to the mouse and also to compare the information obtained with what happens in flies, in which apoptosis has another mechanism of action, as indicated below.

In *Drosophila*, it was found that when PSAP is not present, the fly dies in the pupal stage due to excessive apoptosis. RNA interference studies in *Drosophila* cultured cells also indicate excessive apoptosis, which is in principle contradictory with what is seen in human cells, where an interference reducing PSAP levels down to 20%, does not produce significant changes. It must be indicated that there are differences in apoptosis pathways between mammals and flies.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] T.Li, L. Zeng, W.Gao , M.Z. Cui , X. Fu, X. Xu (2013). PSAP induces a unique Apaf-1 and Smac-dependent mitochondrial apoptotic pathway independent of Bcl-2 family proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* 1832: 453–474.
- [2] G. Mao, J. Tan, W. Gao, Y. Shi, M.Z. Cui, X. Xu (2008). Both the N-terminal fragment and the protein–protein interaction domain (PDZ domain) are required for the pro-apoptotic activity of presenilin-associated protein PSAP, *Biochimica et Biophysica Acta* 1780: 696–708
- [3] V. Lamarca, A. Sanz-Clemente, R. Pérez-Pe, M.J.Martínez-Lorenzo, N. Halaihel, Pedro Muniesa and J.A. Carrodegua (2007). Two isoforms of PSAP/MTCH1 share two proapoptotic domains and multiple internal signals for import into the mitochondrial outer membrane, *Am J Physiol Cell Physiol* 293: 1347–1361.
- [4] V.lamarca, I.Marzo, A. Sanz-Clemente, J.A. Carrodegua (2008). Exposure of any of two proapoptotic domains of presenilin 1-associated protein/mitochondrial carrier homolog 1 on the surface of mitochondria is sufficient for induction of apoptosis in a Bax/Bak-independent manner, *European Journal of Cell Biology*, 87: 325–334.