

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis.

María del Pilar Mollinedo Sedano

Director: Dr. José Luis Fernández-Luna

Junio 2013

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

Tabla de contenidos

- Antecedentes del tema	4
o Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen actividades apoptóticas opuestas	6
o Activación de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2	9
o Modelos para explicar la activación de BAX y BAK	10
o Mecanismo por el que BAX y BAK forman un homo-oligómero e interrumpen la membrana externa mitocondrial	12
o Dinámica de la localización subcelular	13
o Glioblastoma	14
o Carcinoma testicular	14
- Objetivos	15
- Metodología	16
o Cultivo celular de glioblastoma	16
o Cultivo celular de células germinales de carcinoma testicular	16
o Sustrato de colágeno para el cultivo de células de glioblastoma	16
o Ensayos de viabilidad celular en glioblastoma	17
o Ensayos de viabilidad celular en células germinales de carcinoma testicular	17
o Extracción de RNA y obtención de cDNA	17
o Diseño de primers	18
o PCR cuantitativa (Real time-PCR)	19
- Resultados	20
o Diseño de primers que amplifiquen los genes reguladores de la apoptosis que nos interesan	20
o Validación de los primers diseñados	21
o Diseño del ensayo para PCR cuantitativa de los genes reguladores de la apoptosis	23
o Aplicación del ensayo para PCR cuantitativa: modelo de glioblastoma	25
o Aplicación del ensayo para PCR cuantitativa: modelo de células germinales de carcinoma testicular	30
- Conclusiones	33
- Discusión	34
- Agradecimientos	36
- Referencias	37

Antecedentes del tema

La apoptosis es un proceso altamente regulado y muy eficiente por el que se produce la muerte celular programada. Se caracteriza por la condensación de la cromatina y la contracción del núcleo y del citoplasma, seguido de la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos los cuales son atrapados por los fagocitos y digeridos por los lisosomas (Kerr, Wyllie et al. 1972). Los estímulos que la originan son la unión de ligandos a receptores de membrana, falta de factores de crecimiento o daño en el DNA debido a defectos en la reparación de errores. Estos estímulos se pueden producir en el proceso de formación de tumores, por lo que la apoptosis tiene una función supresora de tumores. Incluso defectos en la apoptosis se consideran actualmente marcadores en algunos tipos de cáncer. Además, el proceso de apoptosis está altamente conservado a lo largo de la evolución.

El papel de la apoptosis en el desarrollo de tumores se descubrió a partir del análisis citogenético de células B procedentes de linfomas humanos. Se vio una correlación entre la translocación cromosómica t(14; 18) y el linfoma de células B del centro folicular humano. Con la translocación se produce un reordenamiento cromosómico que conlleva la colocación del gen *bcl-2* bajo el control del gen potenciador de la cadena pesada de la inmunoglobulina. De esta forma se produce un aumento de expresión del gen *bcl-2* y se inhibe el proceso de muerte celular programada, pero no aumenta la proliferación celular. Se vio que defectos en el control de la apoptosis puede conllevar la aparición de cáncer (Kelly and Strasser 2011).

La apoptosis se produce por la familia de proteínas Bcl-2. En mamíferos la familia de proteínas Bcl-2 está formada por unas 14 proteínas divididas en proteínas anti-apoptóticas (inhiben la apoptosis favoreciendo la supervivencia celular) y en proteínas pro-apoptóticas (favorecen la muerte celular). Todas las proteínas de la familia Bcl-2 tienen una serie de dominios homólogos llamados BH1, BH2, BH3 y BH4. Los dominios BH1, BH2 y BH3 contienen un bolsillo hidrofóbico al que pueden unirse péptidos de las proteínas BH3-only, las cuales solo contienen el dominio BH3 en su estructura. El dominio BH3 es el responsable de la interacción entre las proteínas BH3-only y el resto de proteínas de la familia Bcl-2 durante el proceso de apoptosis (Youle and Strasser 2008).

Existen dos vías mediante las cuales se lleva a cabo la apoptosis: vía extrínseca y vía intrínseca. Todas las rutas de apoptosis convergen en la activación de las caspasas, que son proteasas que coordinan el proceso de muerte celular. Las dos rutas de apoptosis se diferencian entre ellas en si las proteínas de la familia Bcl-2 son necesarias o no. En ambas rutas las caspasas son cruciales para la ejecución de la apoptosis.

La vía intrínseca (vía mitocondrial o vía regulada por Bcl-2) se activa por señales citotóxicas como una infección viral, daño en el DNA y/o falta de factores de crecimiento. Está controlada por proteínas de la familia Bcl-2. Conduce a la activación de la caspasa-9, pero en algunas células la ruta intrínseca se puede llevar a cabo en ausencia de caspasa-9 o en ausencia de su activador: la proteasa apoptótica de activación del factor 1 (APAF1).

La ruta extrínseca se activa por ligación de receptores de muerte, que son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Estos receptores son Fas, Trail o TNFR1, los cuales contienen un dominio intracelular. Estos receptores reclutan y activan la caspasa-8 a través de la proteína adaptadora Fas asociada al dominio FADD en la superficie celular. Este reclutamiento de la caspasa-8 causa la activación de otras caspasas: caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7. En esta ruta no participa ninguna proteína de la familia Bcl-2. En algunas células, como los hepatocitos, la vía extrínseca puede cortar la vía intrínseca a través de la caspasa-8, cuya activación media la escisión de la proteína BID. El extremo C-terminal truncado de BID, llamado tBID se transloca a la mitocondria y promueve la activación de la caspasa-9. La caspasa-9 es el efector de la caspasa-3, la caspasa-6 y de la caspasa-7 a través de la vía intrínseca. Por tanto, la pérdida de BID o la sobreexpresión de Bcl-X inhiben la muerte celular.

Por tanto, las células carentes de caspasa-9 o de su activador, APAF1, tienen defectos en la apoptosis regulada por Bcl-2, pero la apoptosis por vía extrínseca funciona correctamente.

La pérdida o inhibición de la caspasa-8 permite la supervivencia a largo plazo de células estimuladas a través de un receptor (vía extrínseca). Pero la pérdida de la caspasa-9 o de APAF1 no permite la supervivencia celular a largo plazo si la vía mitocondrial está ocupada. Esto se debe a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial producida por la activación de las proteínas BAX y BAK.

En ausencia de actividad de las caspasas se reduce la respiración seguida de la liberación del citocromo c, lo que produce la muerte celular.

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

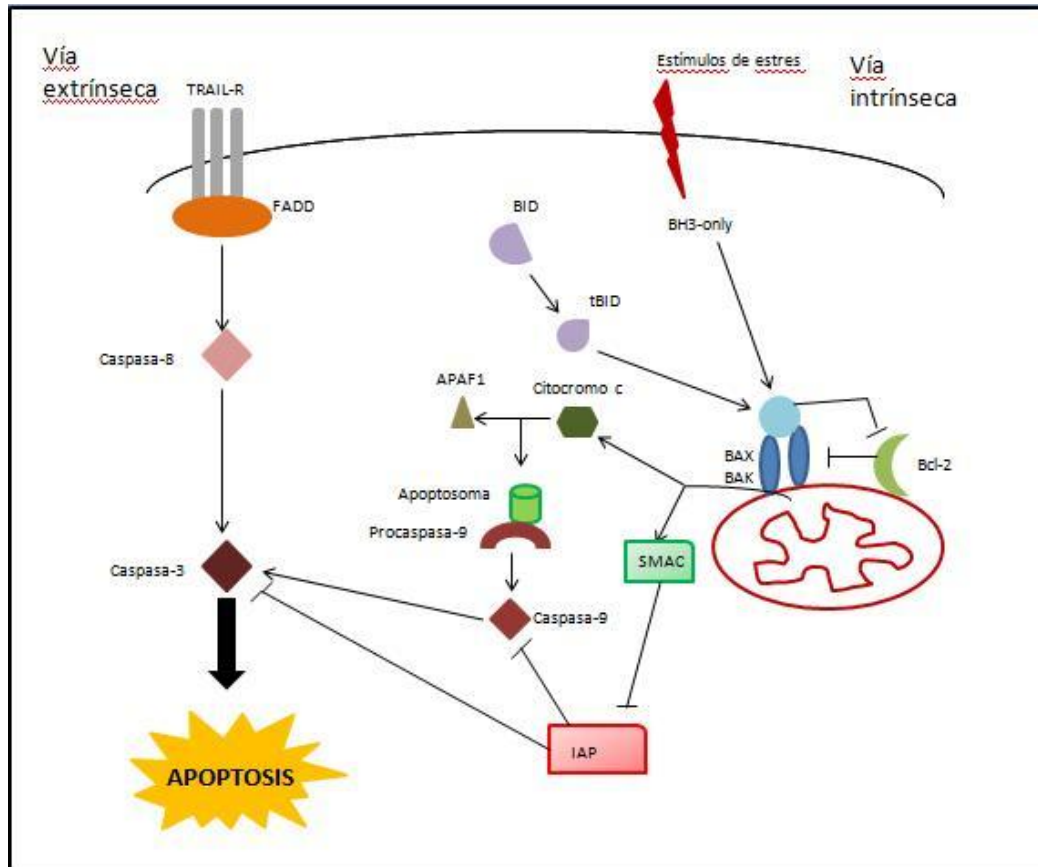


Figura 1. Esquema de la ruta de la apoptosis donde se reflejan las dos vías por las que se puede iniciar el proceso.

✓ Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen actividades apoptóticas opuestas.

Las proteínas de la familia Bcl-2 se dividen en tres clases atendiendo a su papel durante el proceso de apoptosis:

- Inhibidores de la apoptosis: Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Mcl-1, Bcl-B y A1.
- Promotores de la apoptosis: BAX, BAK, BOK.
- BH3-only: BAD, BIK, BID, Hrk, BIM, BMF, NOXA, PUMA. Éstas solo poseen el dominio homólogo BH3 y su función es unirse y regular a las proteínas anti-apoptóticas para promover la apoptosis.

BAX y BAK son dos proteínas cruciales para inducir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación de moléculas apoptogénicas (citocromo c y SMAC) que conducen a la activación de las caspasas en caso de daño, poseen una redundancia funcional. Ambas son inhibidas por las proteínas de la familia anti-apoptótica y estas últimas a

su vez son inhibidas por las proteínas BH3-only. Existen modelos para explicar la activación de BAX y BAK que se explican más adelante (Youle and Strasser 2008).

Las proteínas BH3-only son los iniciadores de la apoptosis. Poseen una hélice α anfipática mediante la que se unen e inactivan a las proteínas anti-apoptóticas y también se unen transitoriamente y activan BAX y BAK. Estas proteínas se activan por diferentes estímulos citotóxicos, incluyendo el potenciamiento de la transcripción y modificaciones post-traduccionales. BID es capaz de unirse a los receptores de ambas rutas (extrínseca e intrínseca) porque su escisión por la caspasa-8 genera un segmento C-terminal activo denominado tBID. tBID promueve que BAX y BAK medien la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Strasser, Cory et al. 2011).

Las proteínas anti-apoptóticas se unen con alta afinidad a BAX y BAK y a los miembros del subgrupo BH3-only mediante la asociación del dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas al surco hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas. Las uniones que se producen son:

- BIM, PUMA y tBID se unen fuertemente a las proteínas anti-apoptóticas.
- BAD se une a Bcl-2, Bcl-X y Bcl-W.
- NOXA se une a Mcl-1 y a A1.
- A BAK se unen Bcl-X, Mcl-1 y A1.
- A BAX se unen Mcl-1, A1, Bcl-X, Bcl-2 y Bcl-W.

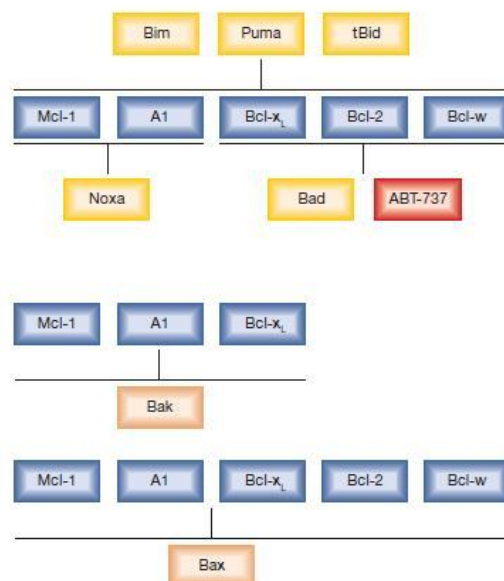


Figura 2. Esquema modificado de Strasser, Cory et al. 2011. Uniones entre las diferentes proteínas de la familia Bcl-2.

Si se potencia la expresión de BIM y PUMA aumenta la muerte celular. Y si BAD y NOXA coexpresan se induce la muerte.

BAX y BAK promueven la activación de las caspasas por sus efectos sobre la mitocondria. Ambas proteínas inducen la liberación de proteínas desde el espacio intermembrana de la mitocondria. Este proceso de permeabilización de la membrana externa mitocondrial resulta en la liberación de citocromo c y otras proteínas solubles hacia el citosol con el objetivo de promover la activación de las caspasas. Al mismo tiempo que se libera el citocromo c, BAX y BAK inducen la fragmentación de la mitocondria, lo que sugiere que hay una conexión entre el proceso de división mitocondrial y las funciones de la familia Bcl-2.

El citocromo c se une a APAF1 y forman un anillo proteico heptamérico denominado apoptosoma. El apoptosoma se une a la pro-caspasa-9 e induce su activación mediante un cambio conformacional. La activación de la caspasa-9 de esta forma es necesaria en neuronas y fibroblastos.

Existe una vía independiente de APAF1 para activar las caspasas: consiste en la inhibición de caspasas por proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) como XIAP. Estas proteínas se unen y neutralizan las caspasas-9 y -3. Esta inhibición puede ser antagonizada por la unión de SMAC, que es liberado junto con el citocromo c por la mitocondria tras la activación de BAX/BAK.

Los receptores NOD son proteínas relacionadas con APAF1 que regulan las rutas alternativas de activación de las caspasas que se producen en procesos de defensa no apoptótica asociados a la inmunidad innata.

La etapa en la regulación de la apoptosis controlada por la familia Bcl-2 parece ser el paso final en la decisión entre vida y muerte celular. La ruptura de la mitocondria por BAX y BAK puede ser una causa de la muerte eventual de las células clonogénicas en ausencia de la activación del apoptosoma (Youle and Strasser 2008).

Normalmente la activación de las caspasas media la muerte celular y su eliminación. Pero cuando las caspasas están bloqueadas se pueden perder algunas características de la apoptosis, lo que conlleva una muerte celular lenta mediada por la familia Bcl-2 (ruptura de las mitocondrias).

✓ Activación de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2

Las proteínas del subgrupo BH3-only (pro-apoptóticas) funcionan como sensores de señales apoptóticas procedentes de diferentes procesos celulares. Su expresión se puede inducir por factores de transcripción:

- NOXA y PUMA se expresan inducidas por la presencia de p53, que aparece en respuesta a daño en el DNA.
- La expresión de BIM esta inducida por FOXO3A en respuesta a la privación de factores de crecimiento.

Pero las proteínas BH3-only también pueden activarse por modificaciones post-traduccionales:

- BAD se expresa por la pérdida de fosforilación debida a la privación de factores de crecimiento.
- BID se activa mediante proteólisis mediada por la caspasa-8.
- La expresión de BIM se activa por la liberación del complejo motor de la dineína. Pero también se activa por la pérdida de la quinasa reguladora de la señal extracelular (ERK) que media la fosforilación (en células sanas es la diana para la ubiquitinación y degradación proteasomal).
- BMF se expresa por la liberación de los complejos motores actina-miosina.
- BIK se expresa por un mecanismo desconocido en respuesta a la inhibición de la síntesis proteica.

Otra forma de regular la apoptosis es mediante la expresión de las proteínas anti-apoptóticas:

- Bcl-X: su transcripción se induce por factores de crecimiento a través de la ruta JAK-STAK para promover la supervivencia celular.
- Mcl-1 se degrada rápidamente por la ruta ubiquitina-proteasoma en respuesta a la falta de citoquinas u otros estímulos de muerte. También puede aumentar su regulación post-transcripcional para prevenir la apoptosis por inhibición de su ratio de degradación.

La regulación de los niveles de expresión de BAX y BAK es menos aparente. Ambas se expresan constitutivamente en niveles más o menos constantes. Su regulación es post-traducciona por otros miembros de la familia Bcl-2.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando se inducen o se activan las proteínas BH3-only, interactúan con las proteínas de la familia Bcl-2 para promover la apoptosis. Algunas proteínas BH3-only (BIM y PUMA) se unen a todas las proteínas anti-apoptóticas. Otras (BAD y NOXA), se unen solo a algunas proteínas anti-apoptóticas. En ensayos de la permeabilización de la membrana se ha visto que hay una sinergia de BID o BIM con BAX, lo que sugiere que algunas proteínas BH3-only deben unirse a BAX y BAK y activarlos (Youle and Strasser 2008). Es difícil detectar la unión de BID, tBID o BIM a BAX o BAK, aunque un péptido BH3 modificado puede unirse a BAX y/o BAK. Parece que las proteínas BH3-only inducen la apoptosis por inhibición de las proteínas anti-apoptóticas y de esta forma liberan a BAX y BAK para que se produzca la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la activación de la cascada de las caspasas.

✓ Modelos para explicar la activación de BAX y BAK.

- Activación directa:

En este modelo unas proteínas actúan como activadores y otras actúan como sensibilizadores. Las proteínas activadoras son BIM, tBID y PUMA y actúan uniéndose transitoriamente a BAX y a BAK activándolos. Las proteínas sensibilizadoras son BAD y NOXA, cuya función es unirse a las proteínas anti-apoptóticas.

Las proteínas anti-apoptóticas están secuestradas por los activadores y la apoptosis se produce cuando los sensibilizadores desplazan a los activadores desde las proteínas anti-apoptóticas, permitiendo la unión y activación de BAX y BAK.

La unión de ciertos dominios BH3 a BAX y BAK es transitoria y de baja afinidad, pero el mecanismo exacto de unión aun no se conoce.

La unión de las proteínas BH3 activadoras se produce por la presencia de un surco hidrofóbico en la superficie de BAX y BAK parecido al presente en las proteínas anti-apoptóticas.

- Activación indirecta:

BAX y BAK adquieren su conformación primaria de forma que exponen su dominio BH3 al cual se unen las proteínas anti-apoptóticas para evitar la apoptosis. De esta forma se evita la oligomerización de BAX y BAK.

Las proteínas BH3-only se unen a las proteínas anti-apoptóticas de forma que la apoptosis se produce cuando todas las proteínas anti-apoptóticas relevantes están neutralizadas.

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

En ese momento BAX y BAK pueden oligomerizar produciéndose la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

Si las moléculas de BAX poseen mutaciones en el dominio BH3 se impide su unión y neutralización por las proteínas anti-apoptóticas, lo que conlleva a una apoptosis desenfrenada.

- Modelo “cebamiento-captura-desplazamiento”:

Se produce la activación directa de las proteínas BH3 y se ceban a BAX y BAK, pero las proteínas anti-apoptóticas capturan esta forma cebada de BAX y BAK hasta que las proteínas BH3-only se desplazan.

En células sanas, BAX se transloca espontáneamente desde el citosol para asociarse periféricamente con las mitocondrias. Pero Bcl-X se une y retrotransloca BAX hacia el citosol. Después el heterodímero BAX-Bcl-X se disocia.

- Modelo “embebido”:

Postula que BAX y Bcl-2 interactúan solo después de que ambas se han reorganizado para esconder sus hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ y la hélice terminal $\alpha 9$ dentro de la membrana externa mitocondrial.

Usando proteínas recombinantes con liposomas o aislando mitocondrias se vio que tBID se une a la membrana y recluta BAX, pero este reclutamiento puede ser evitado por Bcl-X: Bcl-X es capaz de secuestrar tBID y BAX hasta la adición de BAD desplazando BAX desde Bcl-X (Strasser, Cory et al. 2011).

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

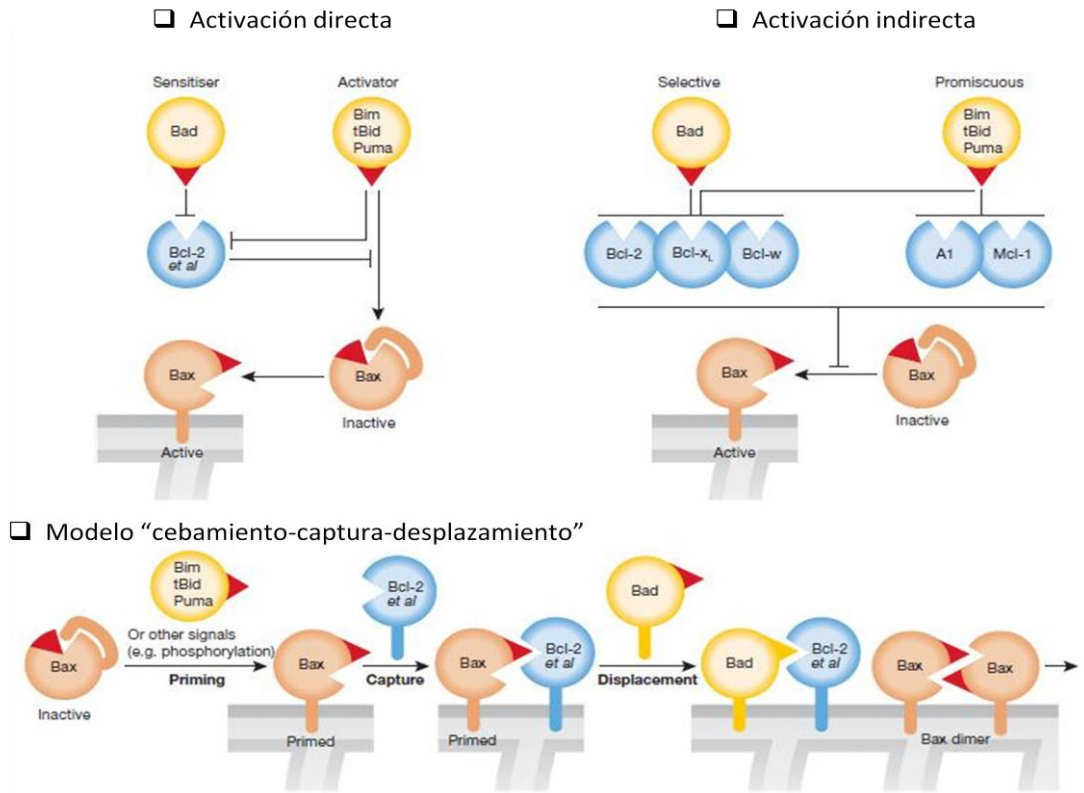


Figura 3. Modificado de Strasser, Cory et al. 2011. Esquema de los diferentes modelos de activación de las proteínas BAX y BAK.

✓ Mecanismo por el que BAX y BAK forman un homo-oligómero e interrumpen la membrana externa mitocondrial.

Mediante sondas bioquímicas y anticuerpos se observó que las estructuras globulares que inactivan BAX y BAK durante su activación son alteradas mediante reordenamientos (Strasser, Cory et al. 2011).

En las etapas iniciales BAK expone su dominio BH3, el cual se intercala en el surco parcial de la superficie de otra molécula BAK activada formando un dímero simétrico. Este dímero puede multidimerizarse y formar un oligómero cada vez más grande de forma que cada dímero está unido por la hélice $\alpha 6$ de BAK.

La oligomerización de BAX se produce por un proceso similar. BAX puede insertar su dominio BH3 expuesto en otra molécula BAX, formando dímeros asimétricos que producen una cadena de monómeros.

Un paso clave en la oligomerización de BAX y BAK y en la permeabilización de la membrana es la inserción de sus hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ como una horquilla a través de la bicapa lipídica de la membrana externa mitocondrial.

Los poros producidos por BAX y BAK en la membrana mitocondrial son lo suficientemente grandes para permitir la salida de todas las proteínas intermembrana. Sin embargo, el tamaño de los poros formados por los oligómeros no está definido.

✓ Dinámica de la localización subcelular.

BAX es una proteína citosólica. Su extremo C-terminal se ancla a la membrana externa mitocondrial mediante la unión en el bolsillo hidrofóbico del dominio BH3. Se encuentra en el citosol como un monómero, no está unido a ninguna proteína anti-apoptótica. Durante la inducción de la apoptosis BAX se transloca a la mitocondria y se inserta en la membrana externa mitocondria como una proteína integral de membrana mediante su extremo C-terminal. Esta translocación de BAX es irreversible normalmente y conlleva a la liberación del citocromo c.

BAK se encuentra en la membrana externa mitocondrial en las células sanas y se une a Mcl-1 y a Bcl-X. La localización mitocondrial de BAK es una consecuencia de su unión con Mcl-1 mediante el bolsillo hidrofóbico BH3 de BAK y un desplazamiento del anclaje C-terminal a la membrana, lo que permite la interacción con las membranas.

BAK se ancla a la membrana mediante su unión con Mcl-1, pero la unión de BAX esta mediada por Bcl-X, el cual está anclado a la membrana mediante su extremo C-terminal.

Al inducirse la apoptosis, Mcl-1 se degrada y las interacciones Mcl-1-BAK y Bcl-X-BAX se rompen por la acción de las proteínas BH3-only: NOXA, BIM y BIK, que dejan libres a BAK y BAX para promover la apoptosis.

La translocación de BAX a la mitocondria correlaciona con la actividad pro-apoptótica. Por este motivo es curioso que Bcl-2 este unida a la membrana de forma constitutiva, pero Bcl-X, Bcl-W y Mcl-1 están en el citosol y se translocan desde el citosol a la mitocondria durante la apoptosis. La unión a las proteínas BH3-only potencia este hecho. La translocación intracelular se correlaciona con los cambios conformacionales y la inserción de Bcl-X en la membrana externa mitocondrial. Esta translocación de las proteínas anti-apoptóticas no se sabe si representa un mecanismo de inhibición de la apoptosis, una inactivación de las proteínas BH3-only o una conversión en efectores pro-apoptóticos. Se ha postulado que la unión de las proteínas BH3-only cambia la conformación de las proteínas anti-apoptóticas al unirse a ellos y de esta forma se inicia la formación de los oligómeros de BAX y BAK en la mitocondria

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

y en otras membranas intracelulares para causar la iniciación de la activación de las caspasas (Youle and Strasser 2008).

➤ Glioblastoma

El glioblastoma también es conocido como glioblastoma multiforme (GBM) o astrocitoma de grado IV. Es el tipo más común de tumor primario en el cerebro en individuos adultos. Es uno de los tumores sólidos más letales y con peor resultado al tratamiento. La supervivencia media de los pacientes tratados con un tratamiento multimodal agresivo que incluya la resección quirúrgica combinada con radiación y quimioterapia está entre 12 y 15 meses (Cheng, Bao et al. 2010).

En la mayoría de los pacientes con cáncer la principal causa de muerte es el desarrollo de metástasis, pero en el caso del glioblastoma rara vez metastatiza fuera del sistema nervioso central. El glioblastoma se infiltra en el cerebro y la médula espinal, lo cual complica la curación mediante resección quirúrgica. Las células tumorales son resistentes a la terapia con citotóxicos y a menudo están protegidas por una unidad neurovascular intacta. La mayoría de los pacientes se someten a un tratamiento primario que falla tras una resección quirúrgica, lo que sugiere que la resistencia terapéutica es en todo el tumor, no solo en la parte central que se extrae en la cirugía. Por estos motivos se ha intentado conseguir una terapia que logre la máxima eficacia con toxicidades mínimas.

➤ Carcinoma testicular

El carcinoma testicular es el tumor sólido más común en varones entre 15 y 34 años de edad y la causa más común de muerte en este grupo de edad. La mayoría son tumores de células germinales. Desde la década de los 70 hasta la actualidad se han logrado grandes avances en el tratamiento de este tipo de cáncer hasta el punto de que en la actualidad la tasa de supervivencia de los pacientes es del 80 % (Feldman, Bosl et al. 2008) . Esto es debido principalmente a la alta sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino. Este citotóxico induce la muerte celular programada de las células.

Objetivos

Mediante la técnica conocida como qPCR se estudia el nivel de expresión de los genes que nos interesan. Nosotros nos hemos centrado en el estudio de los genes que regulan la apoptosis, concretamente en 17 genes pertenecientes a la familia Bcl-2 e IAP. Para facilitar el estudio de su expresión génica queremos diseñar y optimizar un ensayo para qPCR. La forma común de realizar esta técnica es preparar la mezcla de reacción cada vez que se quiere hacer la qPCR, pero nosotros pretendemos diseñar y optimizar un ensayo en el que ya tengamos preparada la mezcla de reacción que contenga el SYBR Green PCR Master Mix y los primers para amplificar el gen que nos interesa. Al tener preparada la mezcla de reacción se consigue disminuir el tiempo empleado en el desarrollo de la técnica.

Tras optimizar la técnica pretendemos aplicarla a dos modelos de células tumorales: células primarias de glioblastoma (resistentes a la inducción de la apoptosis) y células germinales de carcinoma testicular (sensibles a la inducción de la apoptosis). Mediante el análisis de los resultados obtenidos podremos validar el diseño del ensayo para qPCR.

Metodología

➤ Cultivo celular de glioblastoma

Las muestras de glioblastoma proceden de pacientes que previamente han sido informados y han dado su consentimiento por escrito según lo aprobado por el Junta Ética de Investigación del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. El tejido procedente de la muestra quirúrgica se sometió a digestión enzimática y posteriormente se resuspendieron las células tumorales en medio de cultivo libre de suero Dubelcco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con EGF recombinante humana (20 ng/ml, Sigma, St Louis, MO, EE.UU), bFGF (20 ng/ml, Sigma), B-27 (20 ml/ml de medio, Invitrogen) y heparina (2 mg/ml). En las dos primeras semanas de cultivo se forman neuroesferas primarias que son disociadas cada 3-4 días para facilitar el crecimiento celular (Nogueira, Ruiz-Ontanon et al. 2011).

➤ Cultivo celular de células germinales de carcinoma testicular

Las células de la línea celular NTERA2 (células germinales de carcinoma testicular embrionario) fueron mantenidas en cultivo en medio Dubelcco's Modified Eagle's (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Flow Laboratories, Irvine, CA) (Grande, Bretones et al. 2012).

➤ Sustrato de colágeno para el cultivo de células de glioblastoma

Tanto para el recubrimiento de las placas con colágeno como para la matriz de colágeno se utilizó colágeno I (PureCol 5005-B, Nutacon BV, Leimuden, The Netherlands) a una concentración de 1,8 mg/ml. Para el recubrimiento de las placas con colágeno, se añade la cantidad apropiada de colágeno para que la superficie de la placa quede cubierta. En el caso de la matriz de colágeno se añade más cantidad de colágeno a las placas hasta tener un grosor mayor (Artym and Matsumoto 2010). Se deja polimerizar el colágeno durante 2 horas a temperatura ambiente o a 37 °C. Las células de disgregan enzimáticamente para deshacer las neuroesferas y se siembran con medio de cultivo sobre el colágeno. Se deja incubar a 37 °C durante 2 horas (Ruiz-Ontanon, Orgaz et al. 2013). Tras ese tiempo se retira el medio de cultivo junto con las células que no se han adherido y se añade medio de cultivo con los diferentes citotóxicos. Se incuba a 37 °C con una atmosfera que contiene un 5% de CO₂ durante 48 horas. Tras las 48 horas se realiza en ensayo de viabilidad celular.

➤ Ensayos de viabilidad celular en glioblastoma

La viabilidad de las células de glioblastoma en respuesta a los diferentes tratamientos a las que fueron sometidas (cisplatino, carmustina, ABT, obatoclax, roscovitina, flavopiridol, sorafenib, sunitinib y bortezomib) se midió con el reactivo de viabilidad celular alamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este reactivo se utiliza como indicador de células vivas usando el poder reductor de las células vivas para medir cuantitativamente la proliferación de las células. De esta forma se puede establecer la citotoxicidad relativa de los diferentes agentes tóxicos. Cuando las células están vivas mantienen un ambiente reductor en el citosol. El agente activo del alamarBlue es la resazurina, un agente permeable no toxico, que en el interior de la célula es de color azul y no fluorescente. Cuando la resazurina penetra en las células se reduce a resorufina, un compuesto de color rojo y altamente fluorescente. Las células metabólicamente activas están convirtiendo continuamente resazurina en resorufina, por lo que se produce un aumento de la fluorescencia. Este aumento de la fluorescencia se mide mediante un espectrofotómetro. Los resultados se analizan mediante representación de la intensidad de fluorescencia (o absorbancia) frente a la concentración del compuesto.

➤ Ensayos de viabilidad en células germinales de carcinoma testicular

La viabilidad en respuesta al tratamiento con cisplatino se analizó mediante el reactivo WST-1 (sal de tetrazolio estable) (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Este reactivo se escinde formándose formazán soluble mediante el sistema succinato-tetrazolio reductasa (EC 1.3.99.1) en la superficie celular. Esta biorreducción depende de la producción glicolítica de NAD(P)H en las células viables (metabólicamente activas) ya que el sistema succinato-tetrazolio reductasa pertenece a la cadena respiratoria de las mitocondrias. De esta forma la cantidad de formazán que se detecta mediante un espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos (lector ELISA) se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo (Grande, Bretones et al. 2012).

➤ Extracción de RNA y obtención de cDNA

Tanto en las células de glioblastoma como en las células germinales de carcinoma testicular se extrajo el RNA mediante el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Gutierrez, Pipaon et al. 2002). En el proceso de homogeneización de las células, el reactivo lisa las células y desnaturaliza las nucleasas endógenas. Después se añade cloroformo y se centrifuga la muestra, separándose en tres fases: una fase incolora superior donde se encuentra el RNA, una interfase blanca donde se encuentran las proteínas y una fase rosácea orgánica que

contiene el DNA. Se aísla la fase incolora que contiene el RNA y se precipita con isopropanol. Después se lava el pellet con etanol al 75%. Se deja secar el pellet a temperatura ambiente y por último se resuspende en agua libre de RNasa (agua DEPC). La concentración y pureza del RNA se determina mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-1000). Se considera que el RNA es puro cuando la absorbancia $260/280 \geq 1,8$. El RNA se almacena hasta su uso a -80°C .

Para analizar la expresión del RNAm se obtuvo el cDNA mediante el método de transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR) (Benito, Silva et al. 1996). Para llevar a cabo esta reacción se partió de 1 μg de RNA y se mezcló con primers al azar (Random Primers) (Promega, Madison, USA), desoxinucleótidos (dNTP) (GE Healthcare, UK), la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 5X First-Strand Buffer, 0,1M DTT y Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente programa: primero se incubó el RNA junto con los Random Primers y los dNTPs durante 5 minutos a 65°C . Tras esa incubación se añadieron las enzimas junto con el 5X First-Strand Buffer y 0,1M DTT y se prosiguió con una incubación a 25°C durante 10 minutos, otra a 42°C durante 50 minutos y finalmente se inactiva la reacción calentando durante 15 minutos a 70°C .

➤ Diseño de primers

Los oligonucleótidos usados como primers fueron diseñados con Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Una vez diseñados fueron verificados en el website BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comprobar que al realizar la PCR cuantitativa no se amplificase ningún producto no específico. En el caso de los genes reguladores de la apoptosis que poseen varias isoformas se diseñaron oligonucleótidos que reconociesen todas las isoformas. Las secuencias sentido y antisentido de los oligonucleótidos y el tamaño de los productos de reacción para los 17 genes seleccionados aparecen en la Tabla 1.

Como genes de referencia para la PCR cuantitativa se usaron B-actina y G6PD. Ambos genes son usados frecuentemente como genes de referencia (Gutierrez, Pipaon et al. 2002, Valente, Teixeira et al. 2009, Nogueira, Ruiz-Ontanon et al. 2011, Grande, Bretones et al. 2012). Las secuencias sentido y antisentido para la b-actina son: 5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3' y 5'-GCTGCCTCAACACCTCAAC-3' respectivamente. Las secuencias sentido y antisentido para el G6PD son: 5'-ATCGACCACTACCTGGGCAA-3' y 5'-TTCTGCATCACGTCCCGGA-3'.

➤ PCR cuantitativa (Real-time PCR)

La cuantificación de la expresión de los diferentes genes se hizo a partir del cDNA de las diferentes muestras obtenido previamente. Las PCR cuantitativas se llevaron a cabo en el sistema de detección 7000 Sequence Detection System (Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA) usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied-Biosystems). Cada mezcla de reacción contiene 1 µl de cDNA diluido 10 veces a partir del cDNA cuya concentración es 1 µg, 0,4 µl de cada primer (cuya concentración es 0,4 µM), 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (2X) y 10,7 µl de agua estéril. El programa que se lleva a cabo para amplificar los fragmentos es el siguiente: 2 minutos a 50 °C seguido de 10 minutos a 95 °C. A continuación 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60°C. Cada ciclo de amplificación va seguido del paso de creación de la curva de disociación: 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a 60 °C y otros 15 segundos a 95 °C.

El ratio de abundancia de la expresión de los 17 genes respecto a los dos genes de referencia (b-actina y G6PD) se calculo como 2^n , donde n es el valor del Ct (ciclo umbral) del gen de referencia (uno de los dos) menos el valor del Ct del gen regulador de la apoptosis que estemos analizando y normalizado con el valor de la muestra con expresión más baja de cada uno de los genes. En la aplicación del ensayo a los modelos de glioblastoma y células germinales de carcinoma testicular la normalización de la expresión de los genes se realizo con el valor de expresión de la muestra que no había sido tratada con los citotóxicos. La especificidad de los productos obtenidos mediante la PCR cuantitativa fue determinada mediante el análisis de la curva de disociación.

Resultados

- Diseño de primers que amplifiquen los genes reguladores de la apoptosis que nos interesan

Primero y consultado la bibliografía previa elegimos los genes reguladores de la apoptosis más significativos. Nos centramos en los de la familia Bcl-2, en los de la familia IAP y en dos genes reguladores: APAF1 y Smac. Dentro de los genes de la familia Bcl-2 seleccionamos 3 genes antiapoptóticos: Bcl-2, Bcl-X y Mcl-1 y 8 genes proapoptóticos: Bax, Bak, Bnip3L, Bid, Bad, Bim, Puma y Noxa. De la familia IAP seleccionamos los genes IAP1, IAP2, XIAP y survivina. Menos Bak y Bnip3L, el resto de genes seleccionados poseen varias isoformas o variantes espliceosomales. Por este motivo diseñamos oligonucleótidos que reconociesen y amplificasen todas las isoformas. Las isoformas que presentan estos genes son las siguientes:

- Bcl-2: α y β
- Bcl- X: 1 y 2
- Mcl-1: 1, 2 y 3
- Bax: α , β , δ , σ y ϵ (no codificante)
- Bid: 1-7
- Bad: 1 y 2
- Bim: 1-18
- Puma: 1-4
- IAP1: 1 y 2
- IAP2: 1, 2 y 3
- XIAP: 1 y 2
- Survivina: 1, 2 y 3
- Smac: 1-5, pero las variantes 4 y 5 no son codificantes.
- APAF1: 1-5

Una vez seleccionados los genes que nos interesan diseñamos los oligos teniendo en cuenta que deben cumplir unas características óptimas para su análisis mediante PCR cuantitativa: una T_m de unos 60 °C y un tamaño de los productos de reacción que debe estar entre las 100 y 300 pares de bases (pb), aunque si es algo menor de 100 pb o algo mayor de 300 pb no supone un gran inconveniente. Los oligonucleótidos sentido y antisentido diseñados y el tamaño de los productos de reacción que originan se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Selección de oligonucleótidos para el diseño del ensayo.

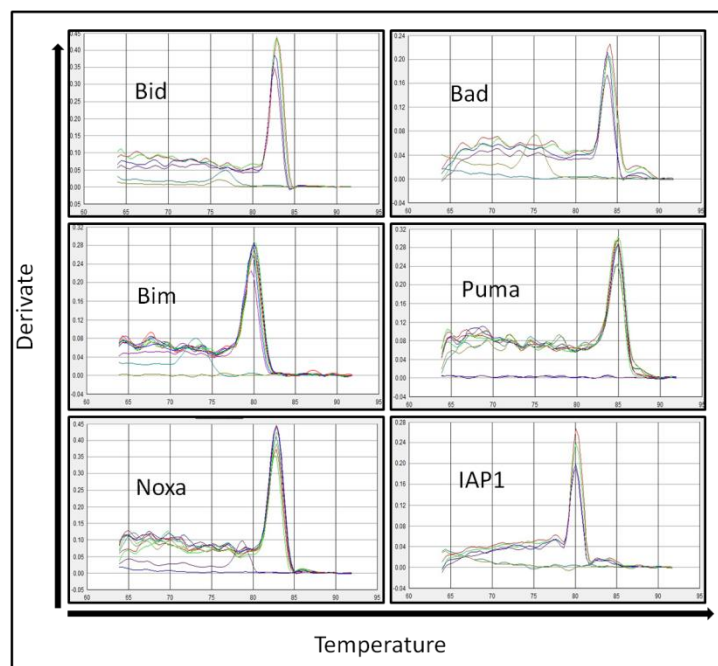
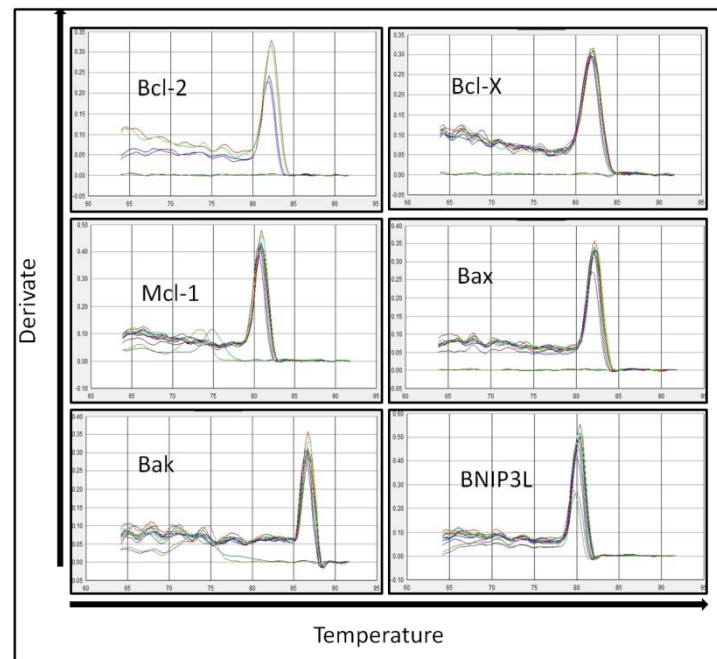
Genes antiapoptóticos	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño del amplicón (pb)
Bcl-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA	82
Bcl-X	CTCCCTCAGCGCTTGCTTTA	CGCACAGCAGCAGTTTGG	65
Mcl-1	CAAGGATGGGTTTGTGGAGT	TAGATATGCCAAACCAGCTC	112
Genes proapoptóticos			
Genes del subgrupo Bax			
Bax	TGGAGCTGCAGAGGATGATTG	CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGA	100
Bak	ACGGCAGAGAATGCCTATGA	AGAACCACACCCAGAACCAC	289
Genes del subgrupo BH3			
BNIP3L	GTGGAAATGCACACCAGCAG	CTTGGGTGGAATGTTTTCGG	140
Bid	GATGAGCTGCAGACTGATGGC	GATGCTACGGTCCATGTGTC	140
Bad	AGCCATCATGGAGGAGCT	ATGTGGAGCGAAGGTCAC TG	346
Bim	CACAAACCCCAAGTCCTCCTT	TTCAGCCTGCCTCATGGAA	73
Puma	ACGACCTCAACGCACAGTACG	TGGGTAAGGGCAGGAGTCC	110
Noxa	AGCTGCGTTTCACCAGGG	TCCAGCTACTTGCACTTGTTCT	101
Genes de la familia IAP			
IAP1	TGAGCATGCAGACACATGC	TGACGGATGAACTCCTGTCC	249
IAP2	CAGAATTGGCAAGAGCTGG	CACTTGCAAGCTGCTCAGG	273
XIAP	TGGCAATATGGAGACTCAGC	TGCACTTGGTACCAATAC	380
Survivina	GCCAGATGACGACCCCATAG	CGCACTTTCTCCGCAGTTTC	192
Genes reguladores			
SMAC	TCTGAAGAGTTGGCTGTCGC	CTGTGCAATAGGAACCGCAC	175
APAF1	CCTGTTGTCTCTTCTCCAGTGT	CTGAAACCCAATGCACTCCC	253

➤ Validación de los primers diseñados

Para comprobar que los oligonucleótidos diseñados amplifican el fragmento que nos interesa realizamos varias PCR cuantitativas usando cDNA procedente de diferentes tipos de muestras, todas ellas correspondientes a algún tipo de cáncer. Usamos cDNA procedente de la línea celular THP1 (línea celular de leucemia monocítica aguda), HL60 (línea celular de leucemia promielocítica), GAMG (línea celular de glioblastoma), A172 (línea celular de glioblastoma) y NTERA2 (línea celular de células germinales de carcinoma testicular). En lugar de analizar los niveles de expresión de los genes en las diferentes líneas celulares, lo que observamos son las curvas de disociación de los genes amplificados originadas durante la reacción de PCR. Vemos que con todos los oligonucleótidos obtenemos un único pico en la curva de disociación y que dicho pico es agudo en su parte superior, no aparece ninguna meseta

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

(Fig. 4). Además de introducir el cDNA de las líneas celulares, también introducimos controles negativos en los que no observamos ningún pico en la curva de disociación.



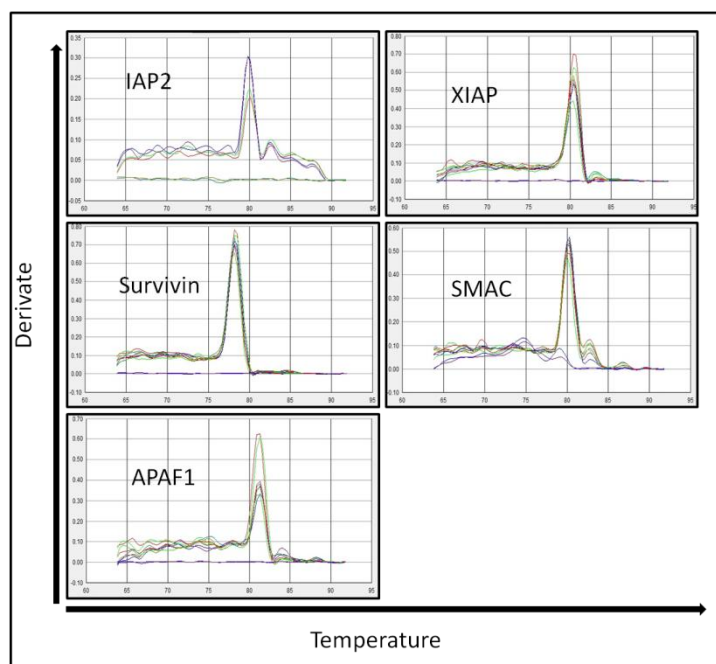


Figura 4. Control de calidad de los oligonucleótidos seleccionados. Curvas de disociación de los genes amplificados.

➤ Diseño del ensayo para PCR cuantitativa de los genes reguladores de la apoptosis

A medida que se fueron validando los oligonucleótidos diseñados para amplificar los 17 genes que regulan la apoptosis fuimos diseñando una plantilla para realizar el ensayo de PCR cuantitativa. Nuestro objetivo es tener preparada la mezcla de reacción (SYBR Green Master Mix y oligonucleótidos específicos para cada gen) y almacenada a -20 °C para facilitar el desarrollo de la técnica en el laboratorio. Así, en el momento en el que queramos realizar la cuantificación de la expresión génica solo tenemos que añadir el cDNA a la mezcla preparada previamente.

Realizamos el diseño para un formato de placas de 96 pocillos, pero en lugar de usar placas, usamos tiras de 8 tubos de PCR. En cada tubo tendremos preparados los 24 µl de la mezcla de reacción a falta de 1 µl de cDNA diluido 10 veces a partir del cDNA original. Cada fila de tubos lleva asociado un código para identificar que gen se amplificara en cada uno de los tubos. El objetivo de realizarlo en tiras de tubos y no en placas de 96 pocillos es que así podemos seleccionar que genes queremos estudiar en cada caso sin necesidad de tener que amplificar todos los genes que se encuentren en una placa en el caso de que no nos interese conocer la expresión de alguno de ellos en el momento de realizar el estudio (Fig. 5). Es decir, a partir del diseño de tres plantillas que hemos desarrollado, en la práctica podremos combinar las tres de la forma que más convenga a nuestros intereses en un momento determinado de la

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

investigación, según los genes que nos interesen estudiar. Por este motivo, cada tira de genes posee un código que identifica que genes se amplificaran en cada tira (Fig. 6).



Figura 5. Tira de 8 tubos ópticos para PCR con tapas incluidas en los que está preparada la mezcla de reacción.

El ensayo está diseñado para la realización de triplicados, por tanto cada vez que nos interese estudiar una serie de genes habrá que introducir tres filas de tubos que amplifiquen los mismos genes. En principio se han distribuido los genes en las plantillas según el tipo de gen: genes antiapoptóticos de la familia Bcl-2 en una plantilla más Bax y Bak, genes proapoptóticos de la familia Bcl-2 en otra plantilla y los genes de la familia IAP más los dos genes reguladores en la tercera plantilla (Fig. 6). Además, en cada fila de tubos siempre habrá dos tubos preparados para amplificar b-actina y G6PD, que son los genes de referencia seleccionados para normalizar el resto de genes en el momento de analizar los resultados que obtengamos en cada experimento.

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													B-actina
B													G6PD
C													Bcl-2
D													Bcl-X
E													Mcl-1
F													Bax
G													Bak
H													
	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	
	Sample 1			Sample 2			Sample 3			Sample 4			

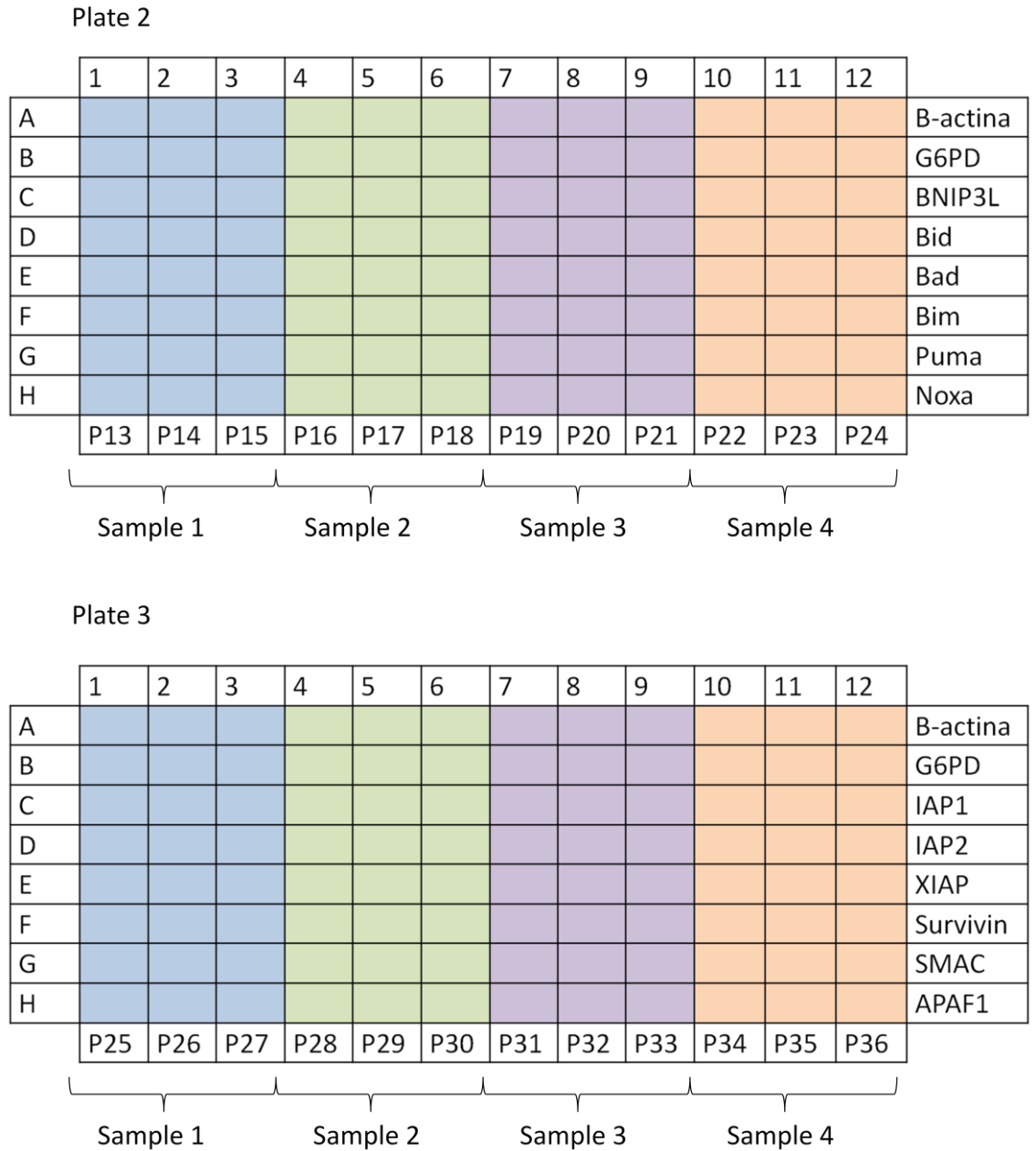


Figura 6. Plantillas diseñadas en formato de 96 pocillos para la realización del ensayo de PCR cuantitativa.

➤ Aplicación del ensayo para PCR cuantitativa: modelo de glioblastoma

Los glioblastomas son extremadamente resistentes al tratamiento con fármacos y citotóxicos que inducen la muerte celular por apoptosis. Por este motivo lo elegimos como modelo para estudiar como sería el patrón de expresión de los genes reguladores de la apoptosis bajo diferentes condiciones de cultivo y sometidas al tratamiento con un citotóxico.

Cultivamos células de glioblastoma sobre una capa de colágeno tipo I a una concentración de 1,8 mg/ml de forma que las células crecerán sobre esa capa de colágeno; y

cultivamos otras células en una matriz de colágeno tipo I también a una concentración de 1,8 mg/ml de forma que las células crecerán embebidas en la matriz de colágeno. El objetivo de que las células crezcan sobre un sustrato de colágeno es imitar lo máximo posible las condiciones en las que las células crecen en el cerebro: el ambiente será más parecido al del cerebro sobre una capa de colágeno que sobre plástico, y a su vez será más parecido en una matriz de colágeno que sobre una capa de colágeno. De esta forma conseguiremos que la respuesta que obtenemos sea la que más se asemeje a la respuesta que se produce en el organismo.

A las células que crecen sobre los dos tipos de sustratos se las trata con diferentes citotóxicos durante 48 horas y se estudia la viabilidad celular con el reactivo alamarBlue (Fig. 7). Los citotóxicos con los que tratamos las células son cisplatino, carmustina, ABT, obatoclax, roscovitina, flavopiridol, sorafenib, sunitinib y bortezomib. Vemos que no hay grandes diferencias entre la viabilidad de las células que han crecido sobre la placa de colágeno y la viabilidad de las células que han crecido embebidas en la matriz de colágeno tras ser sometidas al tratamiento con los citotóxicos salvo en el caso del tratamiento con sunitinib.

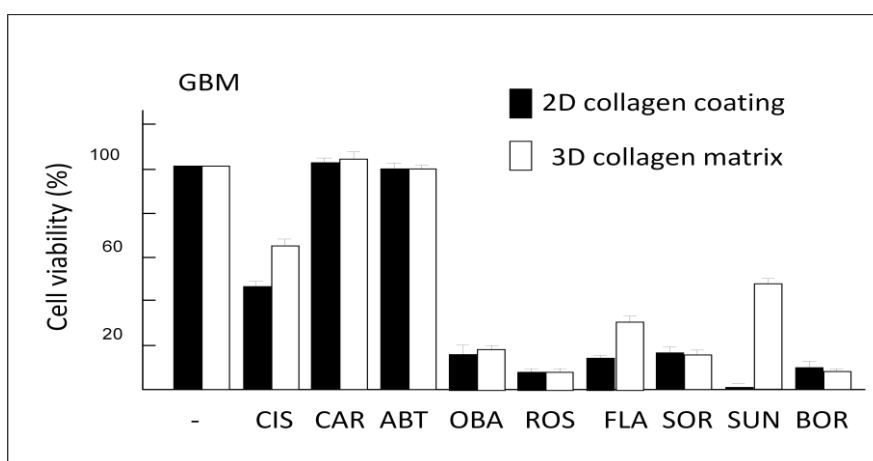


Figura 7. Viabilidad celular de las células de glioblastoma que han crecido sobre diferentes sustratos en respuesta al tratamiento con diferentes citotóxicos durante 48 horas.

En las células tratadas con sunitinib observamos que las que han crecido sobre la placa de colágeno sobreviven peor que las que han crecido embebidas en la matriz (Fig. 7). Esto nos hace pensar que las células pueden estar protegidas por esa matriz de colágeno frente a los efectos del sunitinib. Por este motivo elegimos estas células para estudiar la expresión de los genes reguladores de la apoptosis, para saber si la posible desregulación de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis puede ser una de las razones por las que las células crecidas en la matriz no mueren tras el tratamiento.

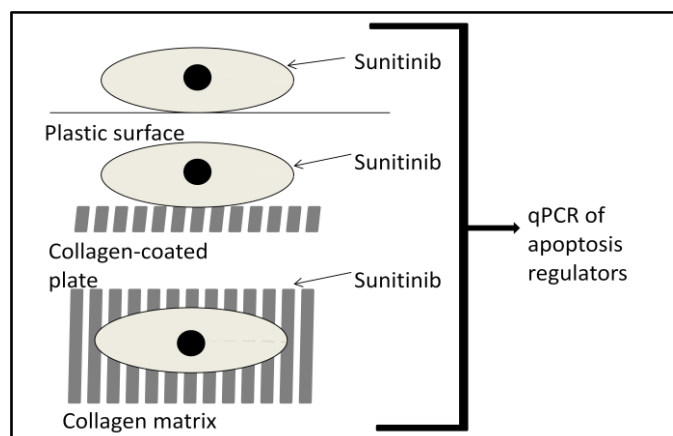


Figura 8. Esquema del proceso que realizamos en el modelo de células de glioblastoma.

Lo siguiente que hicimos fue extraer el RNAm de estas células y a partir de él obtuvimos el cDNA mediante la reacción de la transcriptasa inversa. Realizamos el ensayo de PCR cuantitativa para todos los genes reguladores que seleccionamos previamente. En las figuras 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos más significativos normalizados con ambos genes de referencia representados gráficamente. Observamos cambios significativos en la expresión de Bim y de Smac entre ambas condiciones de cultivo. Vemos que en las células que han estado sobre la capa de colágeno aumenta la expresión de estos genes tras el tratamiento, mientras que en las células que han crecido embebidas en la matriz de colágeno disminuye la expresión de estos genes respecto a las células no tratadas. Esto apoya la teoría de la protección que proporciona la matriz de colágeno a las células que crecen en ella de verse afectadas por los efectos del sunitinib. Estos resultados también nos indican la alta resistencia del glioblastoma a los diferentes tratamientos, ya que según el estudio de la expresión de los genes apoptóticos que hemos realizado comprobamos que en las condiciones más parecidas a las que existen en el organismo (matriz de colágeno), la expresión de los genes responsables de que la célula entre en apoptosis es menor en células sometidas a tratamiento. Respecto a la expresión de Bax y Bnip3L ocurre lo mismo que con Bim y Smac, pero el cambio en la expresión no es tan significativo.

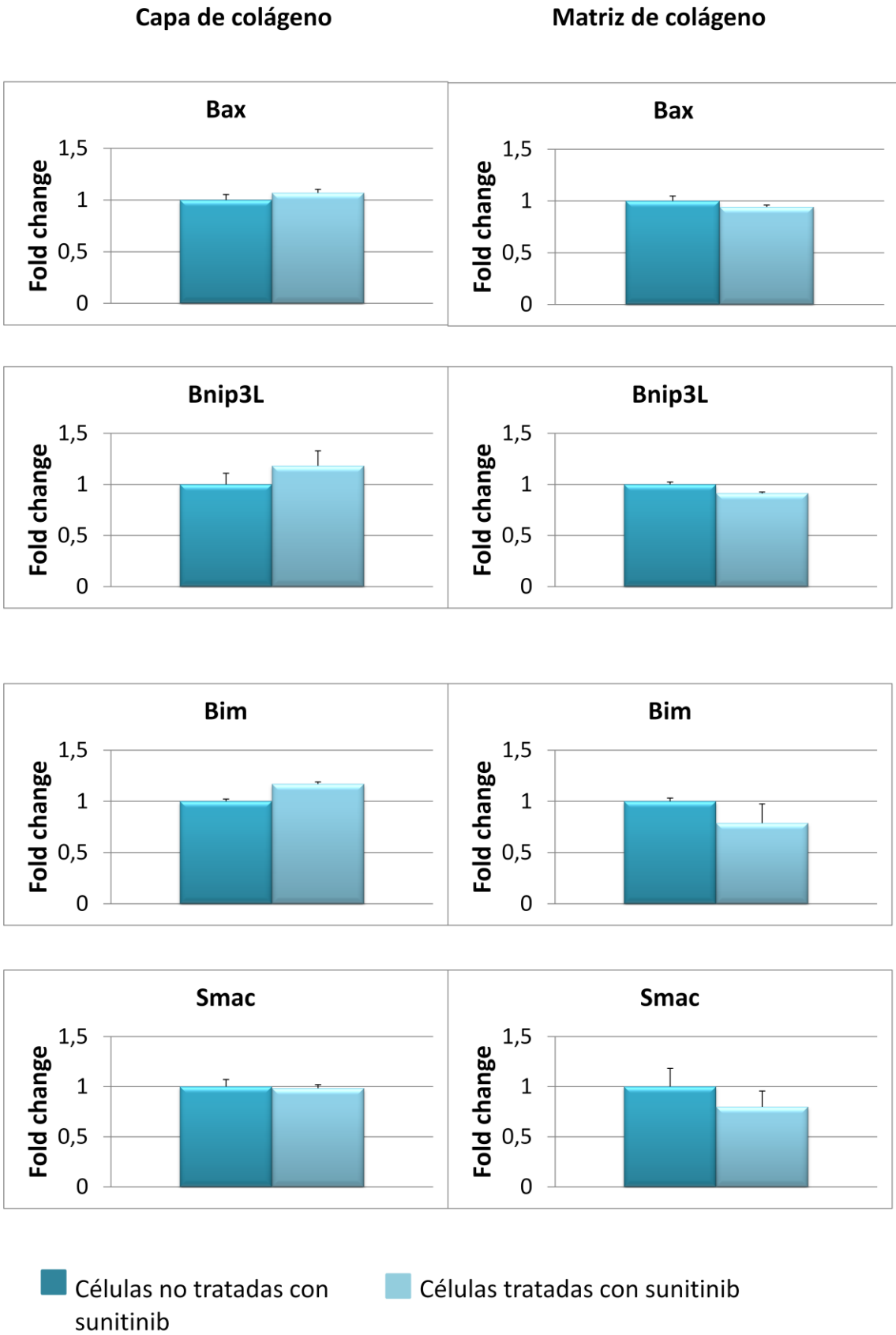


Figura 8. Expresión de los genes apoptóticos en glioblastoma normalizados con b-actina.

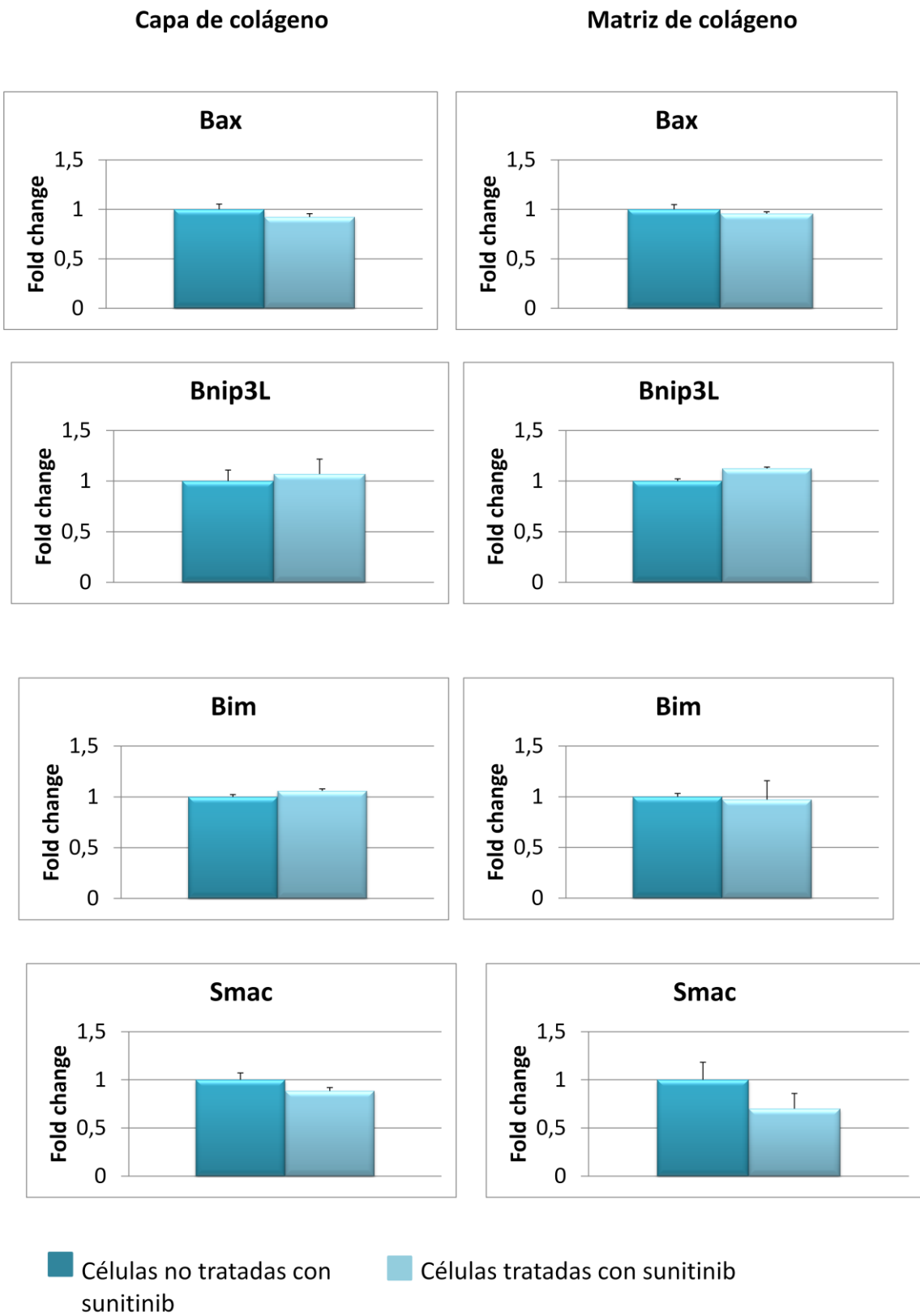


Figura 9. Expresión de los genes apoptóticos en glioblastoma normalizados con G6PD.

➤ Aplicación del ensayo para PCR cuantitativa: modelo de células germinales de carcinoma testicular

Las células germinales de carcinoma testicular, al contrario que en el caso de los glioblastomas, son sensibles al tratamiento con fármacos y citotóxicos que inducen la muerte celular por apoptosis. Por eso este modelo fue elegido para estudiar el patrón de expresión de los genes apoptóticos, para estudiar como varia la expresión de estos genes en células sensibles a un tratamiento.

En este caso las células no se cultivaron sobre ningún sustrato, simplemente se cultivaron sobre el plástico de las placas de cultivo. Se sometió a algunas células al tratamiento con cisplatino durante 48 horas. El cisplatino es el fármaco usado actualmente en pacientes con cáncer de testículos y cuyo índice de supervivencia es del 100%. Tras las 48 horas de tratamiento realizamos un ensayo de viabilidad celular con el reactivo WST-1 (Fig. 10). Observamos que las células que no han sido sometidas al tratamiento con cisplatino poseen una mayor supervivencia que las células que si han sufrido el tratamiento. Por tanto, estudiamos el patrón de expresión de los genes reguladores de la apoptosis en este modelo para conocer qué genes varían más sus niveles de expresión cuando las células son tratadas respecto a los niveles de expresión en las células que no han sido tratadas.

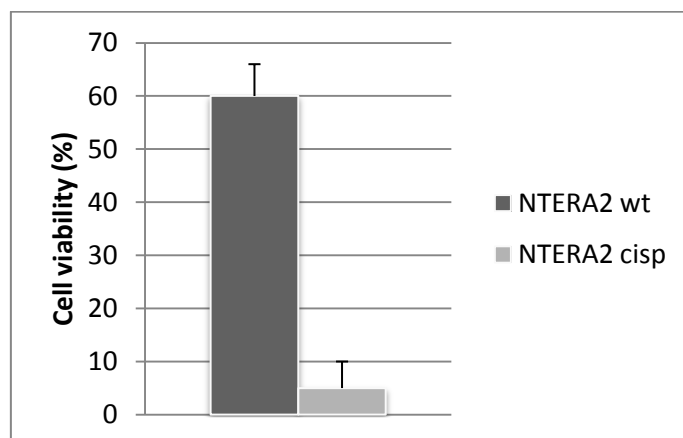


Figura 10. Viabilidad celular de las células germinales de carcinoma testicular tratadas con cisplatino.

Como en el modelo anterior, lo primero que hicimos fue extraer el RNAm de las células tratadas y no tratadas y a partir de él obtuvimos el cDNA mediante la reacción de la transcriptasa inversa. Realizamos el ensayo de PCR cuantitativa para todos los genes reguladores del proceso de muerte celular programada que seleccionamos previamente. En las

figuras 11 y 12 se muestran los resultados más significativos obtenidos normalizados con ambos genes de referencia representados gráficamente. Observamos un incremento significativo de la expresión de los genes Noxa, Bid, Bim y Puma en las células tratadas con cisplatino. Esto nos indica que efectivamente, el tratamiento con cisplatino es efectivo, ya que se induce la expresión de los genes responsables de la regulación de la muerte celular programada de las células cancerígenas, que las células son sensibles al tratamiento con cisplatino. Respecto a la expresión de Bcl-2 y Bak vemos pequeñas variaciones que no son significativas en la expresión de estos genes entre células no tratadas y células tratadas.

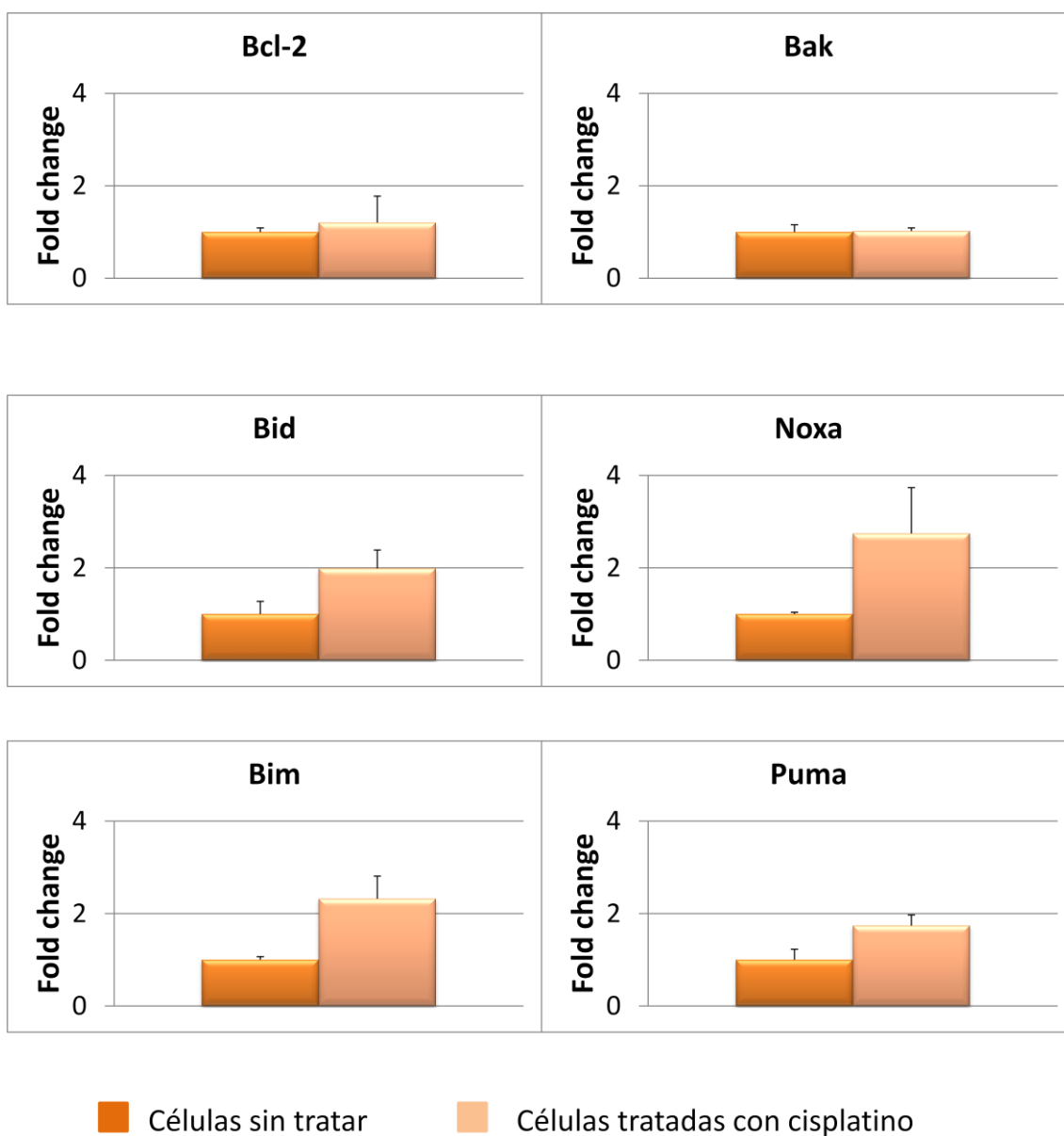


Figura 11. Expresión de los genes apoptóticos en células germinales de carcinoma testicular normalizados con b-actina.

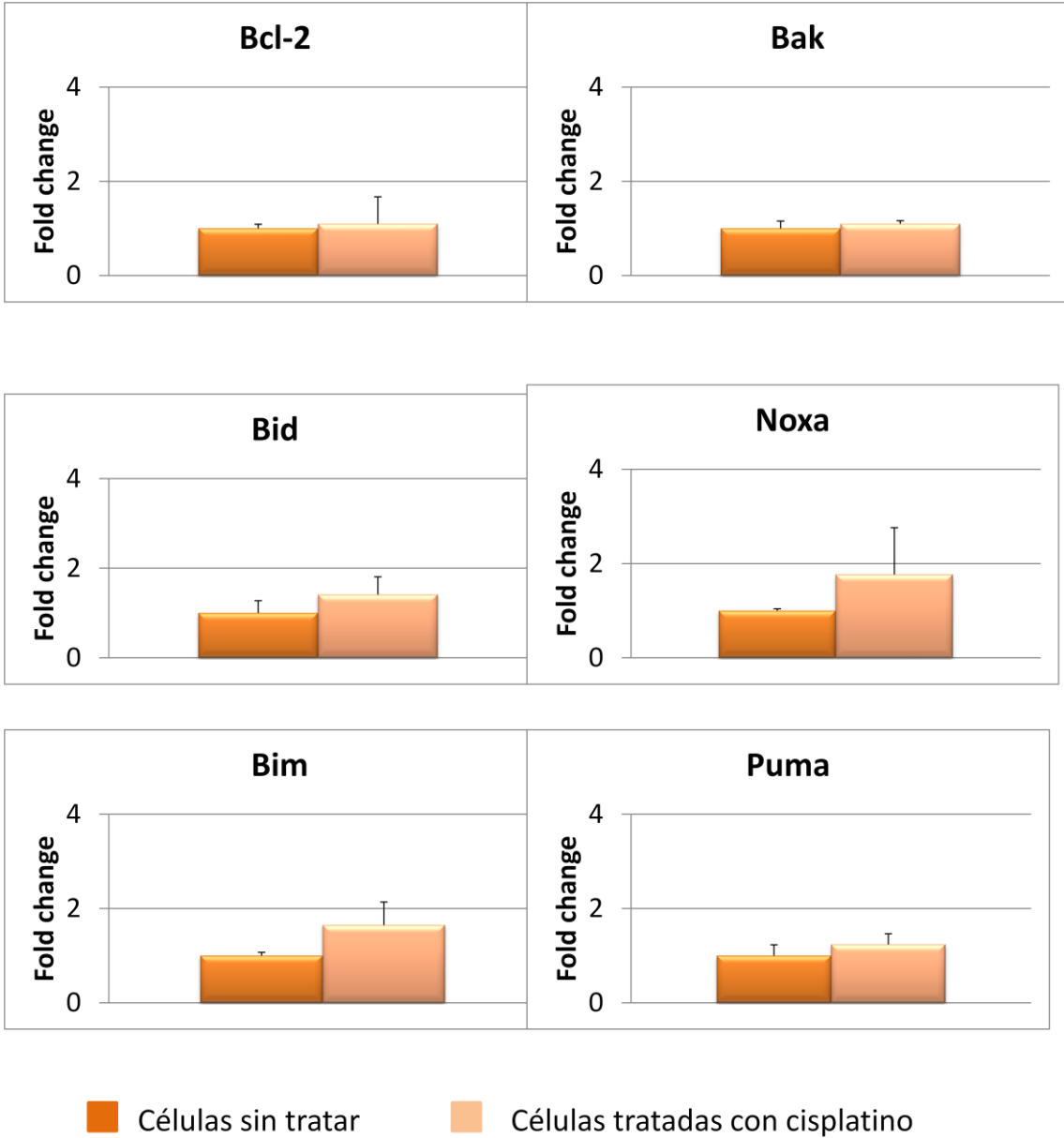


Figura 12. Expresión de los genes apoptóticos en células germinales de carcinoma testicular normalizados con G6PD.

Conclusiones

Hemos diseñado un ensayo para qPCR para estudiar la expresión de 17 genes implicados en la regulación de la apoptosis.

Hemos optimizado los oligonucleótidos y las condiciones adecuadas para realizar la qPCR y obtener una cuantificación óptima de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis.

Hemos validado el ensayo para PCR cuantitativa mediante dos modelos de células tumorales: células primarias de glioblastoma y células germinales de carcinoma testicular.

Las células de glioblastoma son resistentes al sunitinib cuando crecen embebidas en una matriz de colágeno. Esto lo deducimos tras observar una reducción en la expresión de los genes proapoptóticos Bim y Smac.

Las células germinales de carcinoma testicular son altamente sensibles al cisplatino. Esto lo vemos mediante un incremento de los genes proapoptóticos Noxa, Bid, Bim y Puma.

Discusión

Esta establecido que en las células la muerte celular programada se produce mediante un proceso conocido como apoptosis que se induce por numerosos estímulos como la unión de ligandos a receptores de membrana, falta de factores de crecimiento o errores en el DNA (Fernandez-Luna 2008). La apoptosis conlleva una serie de cambios morfológicos en la célula que concluye en la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados y digeridos por los lisosomas (Kerr, Wyllie et al. 1972). La ruta de la apoptosis puede iniciarse mediante dos vías (intrínseca y extrínseca) cuya diferencia entre ambas es la participación o no de proteínas de la familia Bcl-2 (Strasser, Cory et al. 2011). Se sabe que fallos o errores en la ruta de apoptosis conlleva a la aparición de enfermedades, y en el caso del cáncer, se sabe que las células cancerígenas tienen defectos en la regulación de la ruta apoptótica (Hanahan and Weinberg 2011). Por este motivo, la ruta que regula la apoptosis se considera una diana terapéutica sobre la que pueden actuar fármacos anticancerígenos (Kelly and Strasser 2011). Debido a la importancia del estudio de la expresión de los genes que regulan la apoptosis en laboratorios en cuya rama de investigación es la oncología, como es el caso del nuestro, hemos querido diseñar un ensayo que facilite el estudio de la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa. Nuestro principal objetivo es facilitar el proceso de estudio y disminuir el tiempo requerido en la realización de la técnica.

En principio nos hemos centrado en 17 genes reguladores de la apoptosis de la familia Bcl-2 y de la familia IAP (inhibidores de la apoptosis) más representativos (Youle and Strasser 2008, Strasser, Cory et al. 2011), pero el diseño del ensayo permite ampliarlo al estudio de mas genes reguladores según las necesidades que surjan en un determinado momento en la investigación. Hemos elaborado un diseño para 17 genes en el que la mezcla de reacción ya esta prepara y almacenada a -20 grados y a la que solo hay que añadir la muestra para realizar el estudio. Pero en lugar de usar placas de 96 pocillos, usamos tiras de tubos para PCR con el objetivo de poder combinar los genes que introducimos en el estudio de la forma que más convenga en un determinado momento. Por tanto, si solo nos interesa la regulación de un gen determinado, podemos estudiar la expresión del mismo gen en varias muestras diferentes utilizando los tubos que tienen preparada la mezcla de reacción para ese gen. Si el diseño estuviese pensado solo para hacerlo en placas de 96 pocillos, esto no sería posible: habría que estudiar todos los genes y malgastar muestra, o solo añadir muestra en los pocillos que contuviesen la mezcla para el gen que nos interesa y malgastar el resto de mezclas de reacción preparadas.

Relacionado con esto, y dependiendo de las necesidades de la investigación, también se podría aumentar el número de genes que se estudian incluyendo por ejemplo, miembros de la familia de las caspasas u otros genes miembros de la familia Bcl-2 o IAP.

Otra ventaja de tener un ensayo diseñado a medida es el abaratamiento de la técnica. Existen kits comerciales (Qiagen) en los que la mezcla de reacción ya viene preparada, pero su diseño es en placa de 96 pocillos y no se pueden combinar los genes a estudiar según nuestras necesidades ya que estos kits vienen preparados para usarse completos. Y además su precio es más elevado que adquiriendo los materiales y reactivos necesarios por separado y diseñando nuestro propio ensayo.

Por otra parte, los programas usados para el diseño de los oligonucleótidos (BLAST, PubMed) son los programas más habituales y los que mejor resultados dan actualmente, consiguiendo diseñar unos oligos que amplifican los fragmentos que nos interesan sin muchos diseños fallidos anteriores.

Los modelos celulares utilizados para validar el ensayo diseñado para PCR cuantitativa representan ambos extremos en la resistencia a la muerte celular programada. Los glioblastomas son resistentes a los tratamientos con quimioterapia y radioterapia (Stegh, Chin et al. 2008, Cheng, Bao et al. 2010). Nosotros observamos este hecho combinando el cultivo de las células sobre diferentes sustratos que tratan de imitar las condiciones del cerebro con el tratamiento a diferentes citotóxicos. Estudiando la viabilidad celular observamos que no se aprecian diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad celular. Después, mediante la cuantificación de la expresión génica de los genes reguladores de la apoptosis corroboramos este hecho, ya que vemos que cuando tratamos las células con sunitinib, la expresión de los genes proapoptóticos disminuye, lo que explica que las células no mueran.

Por otro lado, el otro modelo celular usado para validar el diseño del ensayo para PCR cuantitativa son células germinales de carcinoma testicular. El carcinoma testicular es un tipo de cáncer altamente sensible al tratamiento con citotóxicos (Grande, Bretones et al. 2012), y esto también lo hemos observado mediante estudios de viabilidad celular en los que las células tratadas con cisplatino poseen una menor viabilidad que las no tratadas. Posteriormente con el estudio mediante PCR cuantitativa hemos corroborado este hecho viendo que la expresión de los genes proapoptóticos aumenta en las células tratadas, lo que explica que las células mueran.

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar este espacio para mostrar mi agradecimiento a las personas y empresas que durante estos meses han formado parte de este trabajo, ya sea de forma directa o indirecta.

En primer lugar al Dr. José Luis Fernández-Luna, director de este proyecto de Fin de Máster, ya que sin sus enseñanzas, orientaciones y sugerencias no podría haberse llevado a cabo este trabajo.

A Lara Grande González, mi mayor apoyo durante estos meses, gracias por todos los ánimos recibidos en la recta final. Y gracias sobre todo por todas las enseñanzas que me has aportado, tanto a nivel profesional como personal. Vales mucho.

Al resto de componentes del laboratorio de la Unidad de Genética Molecular: Gonzalo, Olga, Ana Fontalba y Ana Ibáñez, porque todos habéis aportado algo a este trabajo: experiencia, conocimientos, apoyo.

Al IFIMAV y al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, por darme la oportunidad de realizar el proyecto en sus instalaciones.

A la Dra. Patricia Ruiz-Ontañón, por las valiosas enseñanzas al principio de este trabajo. Y a la Dra. Ana Talamillo, por los consejos recibidos en la recta final.

A Silvia Torices, otro gran apoyo del que he recibido constantemente palabras de ánimo.

A Ana, Bea, Carmen, Elena, Estefania, Lorena y Nuria. Porque juntas hemos realizado este viaje, cada una con nuestro proyecto, pero nada habría sido lo mismo sin vosotras, nuestras quedadas durante estos meses y nuestras conversaciones sobre nuestros agobios y alegrías.

A mis amigos: Isabel, Silvia, Gema, Víctor, las Saras, Silvia (Lola), Mayte. Por esos días en los que necesitábamos despejarnos. Y especialmente a Carmen Alonso Piney, que desde Berlín has estado muy presente estos meses.

Y por supuesto, a mis padres, Pilar y Juan Carlos, que durante estos meses (y años, incluyendo la carrera) habéis sido mi todo: estáis en los momentos buenos, en los malos, soportáis mis momentos insoportables, me levantáis cuando me derrumbo, me habéis aportado las mayores enseñanzas en mi vida, y seguís haciéndolo. En definitiva, gracias, infinitas gracias por todo.

Referencias

- Artym, V. V. and K. Matsumoto (2010). "Imaging cells in three-dimensional collagen matrix." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 10**: Unit 10 18 11-20.
- Benito, A., M. Silva, D. Grillot, G. Nunez and J. L. Fernandez-Luna (1996). "Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-XL." Blood **87**(9): 3837-3843.
- Cheng, L., S. Bao and J. N. Rich (2010). "Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma." Biochem Pharmacol **80**(5): 654-665.
- Feldman, D. R., G. J. Bosl, J. Sheinfeld and R. J. Motzer (2008). "Medical treatment of advanced testicular cancer." JAMA **299**(6): 672-684.
- Fernandez-Luna, J. L. (2008). "Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance." Cell Signal **20**(11): 1921-1926.
- Grande, L., G. Bretones, M. Rosa-Garrido, E. M. Garrido-Martin, T. Hernandez, S. Fraile, L. Botella, E. de Alava, A. Vidal, X. Garcia del Muro, A. Villanueva, M. D. Delgado and J. L. Fernandez-Luna (2012). "Transcription factors Sp1 and p73 control the expression of the proapoptotic protein NOXA in the response of testicular embryonal carcinoma cells to cisplatin." J Biol Chem **287**(32): 26495-26505.
- Gutierrez, O., C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Nunez and J. L. Fernandez-Luna (2002). "Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation." J Biol Chem **277**(44): 41701-41705.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Kelly, P. N. and A. Strasser (2011). "The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy." Cell Death Differ **18**(9): 1414-1424.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Nogueira, L., P. Ruiz-Ontanon, A. Vazquez-Barquero, M. Lafarga, M. T. Berciano, B. Aldaz, L. Grande, I. Casafont, V. Segura, E. F. Robles, D. Suarez, L. F. Garcia, J. A. Martinez-Climent and J. L. Fernandez-Luna (2011). "Blockade of the NFkappaB pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both in vitro and in vivo." Oncogene **30**(32): 3537-3548.
- Ruiz-Ontanon, P., J. L. Orgaz, B. Aldaz, A. Elosegui-Artola, J. Martino, M. T. Berciano, J. A. Montero, L. Grande, L. Nogueira, S. Diaz-Moralli, A. Esparis-Ogando, A. Vazquez-Barquero, M. Lafarga, A. Pandiella, M. Cascante, V. Segura, J. A. Martinez-Climent, V. Sanz-Moreno and J. L. Fernandez-Luna (2013). "Cellular Plasticity Confers Migratory and Invasive Advantages to a Population of Glioblastoma-Initiating Cells that Infiltrate Peritumoral Tissue." Stem Cells **31**(6): 1075-1085.
- Stegh, A. H., L. Chin, D. N. Louis and R. A. DePinho (2008). "What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator." Cell Cycle **7**(18): 2833-2839.
- Strasser, A., S. Cory and J. M. Adams (2011). "Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases." EMBO J **30**(18): 3667-3683.
- Valente, V., S. A. Teixeira, L. Neder, O. K. Okamoto, S. M. Oba-Shinjo, S. K. Marie, C. A. Scrideli, M. L. Paco-Larson and C. G. Carlotti, Jr. (2009). "Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR." BMC Mol Biol **10**: 17.

Diseño de un ensayo de qPCR para el estudio de la expresión de los genes reguladores de la apoptosis

Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.