

Trabajo Fin de Grado

Autofagia y apoptosis en líneas de mieloma
deficientes en la expresión del gen Atg5

Autor

Alba Aguerri Lajusticia

Director/es

José Javier Naval Iraberri
Isabel Marzo Rubio

Facultad de Ciencias
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
2017-2018



**Universidad
Zaragoza**

D. José Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y Dra. Isabel Marzo Rubio, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Autofagia y apoptosis en líneas de mieloma deficientes en la expresión del gen Atg5” ha sido realizado por Alba Aguerri Lajusticia en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado (TFG), ya que cumple los objetivos recogidos en las directrices del TFG en el grado en Biotecnología.

Zaragoza, Septiembre 2018

Fdo: José Javier Naval Iraberri

Fdo: Isabel Marzo Rubio

ÍNDICE

1. RESUMEN – ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. MIELOMA MÚLTIPLE	2
2.1.1. Tratamiento del mieloma múltiple	2
2.2. MUERTE CELULAR	2
2.2.1. Apoptosis o muerte celular programada	3
2.3. AUTOFAGIA	4
2.3.1. Proteína ATG5	5
2.3.2. Proteína LC3B	6
2.3.3. Proteína p62	7
2.4. PAPEL DE LA GLUCOSA	7
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. LÍNEAS CELULARES	9
4.2. ENSAYOS	9
4.2.1. Curva de crecimiento	9
4.2.2. Cuantificación de apoptosis mediante citometría de flujo	9
4.2.3. Análisis de expresión proteica mediante <i>Western Blot</i>	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1. CURVAS DE CRECIMIENTO	13
5.2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE	15
5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	18
5.3.1. Proteína LC3B	18
5.3.2. Proteína p62	19
5.3.3. Control de carga	20
6. CONCLUSIONES – CONCLUSIONS	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22

1. RESUMEN

El final de la vida celular puede darse por tres mecanismos diferentes: muerte por apoptosis, muerte mediada por autofagia y muerte por necrosis. Este estudio recoge el análisis del segundo proceso y su importante función como alternativa a la apoptosis.

La autofagia es un proceso catabólico natural en el que la propia célula degrada y recicla orgánulos deteriorados, así como proteínas, macromoléculas citoplasmáticas y otras sustancias que podrían desembocar en la muerte celular, mediante vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Juega un papel esencial en la adaptación y supervivencia celular frente a condiciones adversas.

Para el desarrollo del trabajo se ha inducido estrés por ausencia de glucosa en una línea celular deficiente en autofagia, la línea MM.1S ShAtg5. La línea modificada genéticamente presenta silenciado el gen *ATG5* por lo que no expresa la proteína que lleva el mismo nombre, componente principal de las membranas autofagosómicas. Como control se ha empleado la línea *wildtype* MM.1S. Todos los experimentos han sido llevados a cabo de manera paralela en un medio suplementado con glucosa.

Los resultados de estudiar la densidad celular en una curva de crecimiento, la muerte por apoptosis con citometría de flujo y la expresión de proteínas autofágicas mediante un *Western Blot* determinan una sorprendente adaptación de las células deficientes en la expresión de *ATG5* a las condiciones desfavorables del medio sin glucosa. Dicho hallazgo pone en duda el estrés causado por la ausencia de glucosa así como el imprescindible papel de la proteína *ATG5*.

ABSTRACT

The end of cell life can occur three different ways: death by apoptosis, death by autophagy and death by necrosis. This study includes the analysis of the second process and its important function as an alternative to apoptosis.

Autophagy is a natural catabolic process in which cell degrades and recycles damaged organelles, as well as proteins, cytoplasmic macromolecules and other substances that can lead to cell death, through double-membrane vesicles called autophagosomes. It plays an essential role in cell adaptation and survival to adverse conditions.

For the development of the work stress has been induced by the absence of glucose in a cell line autophagy deficient, the MM.1S ShAtg5 line. The genetically modified line has the *ATG5* gene silenced, so it does not express the protein of the same name, autophagosomal membranes main component. The MM.1S wildtype line was used as control. All the experiments have been carried out in parallel in a medium supplemented with glucose.

The results of study cell density by a growth curve, death by apoptosis with flow cytometry and autophagic proteins expression by Western Blot determine a surprising adaptation of the defective cells in the expression of *ATG5* to the unfavorable conditions of the medium without glucose. This fact into question the stress caused by the absence of glucose as well as the essential role of the *ATG5* protein.

2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del trabajo ha consistido en el estudio de los fenómenos de autofagia y apoptosis en líneas celulares de mieloma múltiple.

2.1. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple o MM es una neoplasia hematológica en la que se produce proliferación de células B plasmáticas anómalas en la médula ósea. Se desconoce con exactitud las causas que conducen a la transformación de una célula plasmática normal en una célula mielomatosa. No obstante, es sabido que existen hemopatías asintomáticas, como la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), que pueden provocar translocaciones, pérdidas o ganancias cromosómicas o mutaciones en genes individuales de inmunoglobulinas. Esto provoca una gran inestabilidad genómica que puede desembocar en la aparición de mieloma múltiple. [1], [2]

A diferencia de la mayoría de fenómenos neoplásicos, el mieloma múltiple no se desarrolla como un tumor localizado dando lugar a una agrupación de células malignas. Dado que la médula ósea es el tejido que ocupa el interior de huesos largos, huesos del cráneo, vértebras, costillas, esternón, cintura escapular y pelvis, las células defectuosas se expanden por todo el cuerpo. Las consecuencias son daños en gran parte del organismo, de ahí el adjetivo de “múltiple”. [1], [3]

2.1.1. Tratamiento del mieloma múltiple

El MM es considerado una enfermedad incurable. A pesar de existir tratamiento, éste va dirigido a paliar los síntomas. Se logra reducir la carga tumoral sin erradicarla. [4]

El procedimiento es variable según el estado de avance de la enfermedad, la sintomatología o la edad. En personas de avanzada edad se administra quimioterapia de manera aislada; en pacientes jóvenes se practica previamente un trasplante autólogo de células madre (ASCT). La combinación del trasplante con los nuevos fármacos y el tratamiento convencional ha aumentado la media de supervivencia de 3 a 6 años en las últimas décadas, según Röllig, Knop y Bornhäuser (2015). [1], [5]

No obstante, sigue sin conocerse la manera de evitar la latencia del cáncer. Las investigaciones actuales se centran en la búsqueda de agentes anti-tumorales dirigidos contra el subconjunto de células malignas que reconstruyen el tumor, así como en el estudio del idóneo microambiente que la médula ósea les ofrece. [1]

2.2. MUERTE CELULAR

La muerte celular ocurre de manera natural y programada y permite que una célula sea reemplazada por otra para mantener la adecuada función tisular. En los organismos multicelulares la muerte es un proceso imprescindible para mantener la plasticidad y la salud de los tejidos. También se puede dar de forma excepcional por daños localizados o por la muerte del organismo. [6], [7]

El NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) establece divisiones dentro del término de muerte celular. La más superficial diferencia tres tipos: muerte celular programada o apoptosis, muerte celular dependiente de autofagia y muerte por necrosis. Nos centramos en las dos primeras, procesos controlados molecularmente por la célula. [8]

2.2.1. Apoptosis o muerte celular programada

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada provocado por el propio organismo para controlar el desarrollo y el crecimiento celular. Abarca una agrupación de mecanismos genéticamente codificados que eliminan selectivamente células sobrantes, dañadas de forma irreversible y/o potencialmente dañinas. La apoptosis actúa en el desarrollo de tejidos, la renovación celular, el funcionamiento del sistema inmune, etc. [8], [9], [10], [11]

Es un fenómeno que conlleva cambios morfológicos tales como condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, formación de ampollas en la membrana plasmática o encogimiento celular. También se forman cuerpos apoptóticos: pequeños fragmentos celulares rodeados de membrana que desembocan en fagocitosis. [8], [9], [10], [12]

Una ejecución incorrecta de la apoptosis está asociada con la aparición de múltiples patologías como el cáncer, las enfermedades autoinmunes y la neurodegeneración. Así, el fenómeno apoptótico unido a su carácter modulable ha convertido en un aspecto clave el estudio de sus mecanismos moleculares. [8], [10], [11]

La apoptosis es llevada a cabo por caspasas. Se trata de una familia de cisteín-proteasas que se encuentra en forma de zimógenos inactivos en la mayoría de células animales. Presentan un dominio grande (p20), un dominio pequeño (p10) y un pro-dominio N-terminal cuya escisión activa estas moléculas. Las señales que desembocan en la respuesta apoptótica son variadas: daños en el DNA, ausencia de factores de crecimiento, radicales libres de oxígeno, fármacos, radiaciones... [10], [11], [13]

Se han identificado 14 caspasas en las especies humana y murina. Están subdivididas en moléculas iniciadoras: caspasas 2, 8, 9 y 10, y moléculas efectoras: caspasas 3, 6, y 7. La diferencia reside en la longitud del pro-dominio N-terminal y en el papel que desempeñan. Las iniciadoras se activan por autoproteólisis y actúan sobre las efectoras, que, una vez proteolizadas y liberadas del fragmento N-t, forman un heterotetrámero consistente en dos heterodímeros de p20 y p10. Son el eje central de la apoptosis. Sin embargo, su función no es degradar proteínas celulares sino inactivar por hidrólisis una serie de proteínas clave para la estructura y función celular. Sorprendentemente, también pueden activar proteínas implicadas en la inactivación de macromoléculas o estructuras al proteolizar y desactivar un dominio regulador negativo. [10], [12] La apoptosis tiene lugar por dos caminos complementarios:

- **Vía intrínseca o vía mitocondrial:** La mitocondria detecta situaciones de estrés y provoca una caída en su potencial de membrana. Actúan proteínas Bcl-2 inhibiendo proteínas antiapoptóticas y formando el apoptosoma, que activa a la caspasa 9 (iniciadora) y ésta a la caspasa 3 (ejecutora). [15], [16], [17], [18]
- **Vía extrínseca o vía de los mensajeros mortales:** Mensajeros mortales, como el factor de necrosis tumoral (TNF) o FasL, se unen a sus respectivos receptores. Estos receptores oligomerizan y reclutan proteínas adaptadoras que reclutan a las caspasas 8 y 10 (iniciadoras) que activan a las caspasas 3 y 7 (ejecutoras). [14], [19]

Ambas rutas convergen en la caspasa 3, que continuará la cascada de activación de caspasas, provocando los cambios morfológicos apoptóticos y, en consecuencia, la muerte de la célula. [10]

2.3. AUTOFAGIA

La muerte celular no solo ocurre por apoptosis sino que, como se indica en el apartado 2.2. *Muerte celular* existen al menos tres tipos de muerte. Según el NCCD, entre la apoptosis (Tipo I de muerte celular) y la autofagia (Tipo II), no existen unos límites definidos y ambos procesos podrían influir el uno en el otro. De hecho, una célula puede comenzar el proceso apoptótico y acabar mostrando un fenotipo de autofagia y viceversa. [8], [20]

No obstante, la autofagia es esencialmente un proceso adaptativo de supervivencia celular. Consiste en la degradación de orgánulos, proteínas citoplasmáticas y otras sustancias para reciclar sus componentes y sobrevivir en situaciones de privación de nutrientes. El papel de la autofagia es clave en el mantenimiento de la homeostasis celular en situaciones de estrés. Un defecto en autofagia aumenta la probabilidad de aparición de patologías pulmonares, hepáticas, cardíacas, metabólicas, miopatías, neurodegeneración, cáncer, lupus, envejecimiento, etc. [21], [22], [23], [24]

Las señales que conducen a la autofagia son señales de estrés celular tales como el fallo funcional de orgánulos, infección de patógenos, atrofia, complicaciones metabólicas o inanición. Si la célula logra superar este estrés y recupera su estado inalterado, habrá evitado la apoptosis. Por el contrario, si el estrés se mantiene o la autofagia es insuficiente para detenerlo, se desencadenarán los correspondientes mensajes para terminar con la vida celular sin causar respuesta inflamatoria. Dada la ventaja que supone esta interrelación de procesos, la autofagia, a la par que la apoptosis, se encuentra muy conservado evolutivamente en eucariotas. [20], [22]

Se diferencian tres formas diferentes de autofagia aunque todas convergen en la eliminación de las moléculas potencialmente peligrosas a manos de los lisosomas: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas o CMA. En microautofagia, la carga celular que va a ser hidrolizada y reciclada se captura mediante invaginaciones de la membrana plasmática; en CMA, son las chaperonas las que detectan y transportan el material; en macroautofagia, la carga es secuestrada lejos del lisosoma y transportada a este por vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. [22], [23]

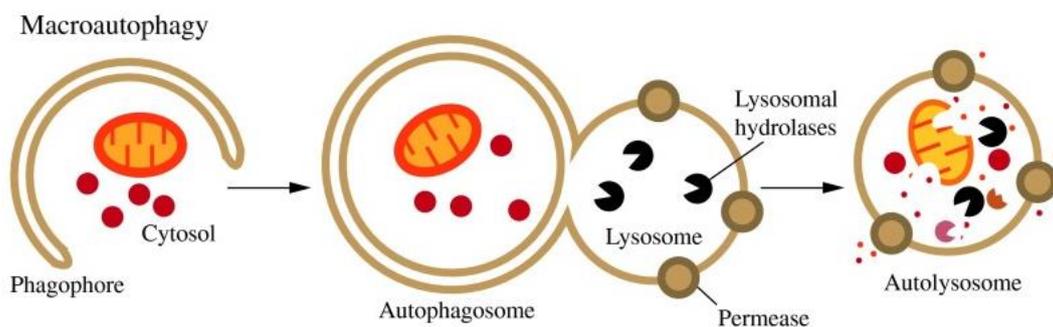


Figura 1. Fenómeno de macroautofagia. Formación de un autofagosomas y su fusión con un lisosoma para dar un autolisosoma. [22]

La macroautofagia es la ruta más importante y la más estudiada al ser inducible en situaciones de estrés. De hecho, en condiciones normales su nivel basal es relativamente bajo. [22], [23]

La formación de autofagosomas es característica de la macroautofagia. Estas dobles vesículas se sintetizan *de novo* a partir de la membrana del retículo endoplásmico (y no a partir de la membrana plasmática, como en microautofagia) y ajustan su tamaño a la carga. Además, los autofagosomas son capaces de transportar su carga desde cualquier punto de la célula hasta los lisosomas. [22]

La formación de éstas dobles vesículas comprende tres pasos: inducción, que comienza ante la falta de nutrientes; nucleación, la carga comienza a ser envuelta y alargamiento, el autofagosoma rodea completamente el material citoplasmático a destruir. El estudio de la autofagia en levaduras mostró que en la formación de esta doble membrana intervenían proteínas de la familia ATG (*autophagy related*) o autofaginas. [22], [25], [26]

El autofagosoma ya formado transporta la carga hasta el lisosoma, orgánulo con el que se fusionará obteniéndose como producto un autolisosoma. Las hidrolasas ácidas del lisosoma degradan el material, así como la membrana interna del autofagosoma, reciclando los componentes citoplasmáticos para posteriores usos. [22], [27]

Una de las líneas celulares que hemos utilizado, la línea MM.1S ShAtg5, presenta silenciado el gen *ATG5*, que codifica la proteína ATG5, clave para la extensión y cierre del autofagosoma. En estas células el proceso autofágico se ve interrumpido y, consecuentemente, carecen de este mecanismo de supervivencia.

2.3.1. Proteína ATG5

La proteína ATG5 pertenece a la familia ATG, ejecutora por excelencia de la muerte mediada por autofagia. Presenta tres dominios diferenciados: extremo N-terminal o dominio UblA; extremo C-terminal o dominio UblB, ambos de tipo ubiquitina; unidos por dos regiones enlazadoras a un dominio interno rico en hélices o dominio HR. [28]

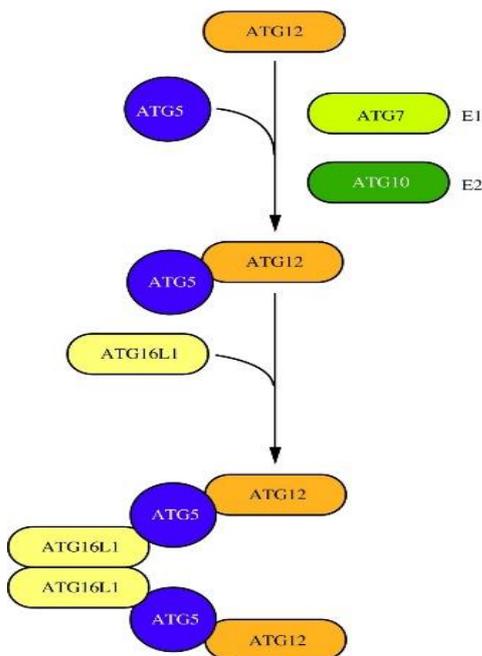


Figura 2. Formación del complejo homodimérico ATG12-ATG5-ATG16L1. [22]

La proteína ATG5 colabora en la extensión de membrana durante la formación de los autofagosomas. En concreto, aparece en la fase de alargamiento. Actúa conjuntamente con otras proteínas de su familia: es activado por ATG7 y ATG10 para formar un complejo con ATG12 y ATG16L1 tras una reacción enzimática de tipo ubiquitinación. Inicialmente ATG5 forma el complejo con ATG12. Aunque se trata de un proceso que se encuentra aún en vías de estudio, se sabe que ATG5 se une a ATG12 por su dominio UblA de manera covalente y, por tanto, irreversible. De ahí sus diferencias con la ubiquitinación. [22], [28], [29]

La unión no covalente de ATG12-ATG5 a ATG16L1 y su dimerización forman un complejo preparado para unirse a la membrana en crecimiento del autofagosoma. [29], [30]

Además del importante papel que cumple en el proceso autofágico, numerosos estudios se centran actualmente en la relación del complejo ATG12-ATG5 con la respuesta

inmune antiviral innata. Los mutantes deficientes o con baja expresión del complejo muestran una mayor resistencia frente a virus impidiendo la replicación de su RNA en el huésped. De esta manera, la expresión de ATG12-ATG5 favorecería la invasión vírica. [31], [32]

Volviendo a la función de ATG5 en la autofagia, las líneas celulares que no van a expresar dicha proteína serán incapaces de llevarla a cabo, aunque sí podrán realizar la muerte celular programada o apoptosis. Esto se comprobará analizando la expresión de dos proteínas implicadas en el desarrollo del proceso autofágico: p62 y LC3B, así como con la inducción de marcadores de muerte por apoptosis.

2.3.2. Proteína LC3B

La proteína LC3B pertenece a la familia LC3, conjunto de proteínas estructurales asociadas a microtúbulos y presentes en las membranas del autofagosoma. LC3 constituye el ortólogo en humanos de la proteína de levaduras ATG8. [33], [34], [35]

Existen tres tipos de LC3: LC3A, LC3B y LC3C. A su vez, LC3A y LC3B presentan dos isoformas: LC3A-I y LC3A-II, LC3B-I y LC3B-II. Un estudio del patrón de expresión celular de esta familia (Koukourakis et al., 2015) reveló que LC3B era la única que se distribuía de manera uniforme en todo el citoplasma. Por este motivo, es el marcador de autofagia endógeno más empleado. [33], [34]

La existencia de las dos isoformas de LC3B es determinante para la autofagia. LC3B se encuentra en las células en forma del propéptido "proLC3B". La proteína ATG4 escinde una parte de éste dando lugar a LC3B-I (18 kDa). Esta es la forma activa citosólica, que será activada por ATG7 y transferida a ATG3 para ser conjugada con fosfatidiletanolamina formando LC3B-II (16 kDa) cuando se inicie la autofagia. LC3B-II pasa a formar parte de las dos membranas autofagosómicas. Una vez se fusionen autofagosoma y lisosoma para dar autolisosomas, la LC3B-II de la cara externa es liberada al citosol y la interior es degradada por las hidrolasas lisosomales a la vez que el resto del contenido. [33], [34], [36]

Es importante disponer de anticuerpos específicos para LC3B que permitan analizar sus niveles celulares por *Western Blot*. Si LC3A sigue el mismo camino que LC3B es un aspecto que todavía se discute. En la actualidad, la gran mayoría de estudios se centra en LC3B y en su destacado papel en autofagia, perfectamente comprobado. De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de LC3B, junto con ATG5 y ATG12, puede aumentar la vida útil de una célula. [34], [37]

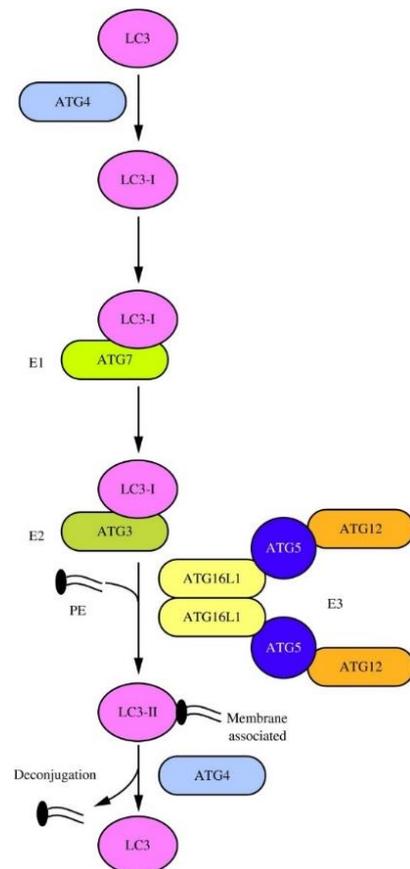


Figura 3. Formación de LC3B-II a partir de LC3B-I durante el proceso autofágico. [22]

2.3.3. Proteína p62

La proteína p62 o sequestoma 1 (SQSTM1) es una proteína multifuncional que destaca por su papel como adaptador. Participa principalmente en dos procesos, autofagia y ubiquitinación, lo que los relaciona directamente. Tiene un peso molecular de unos 60 kDa y presenta varios dominios, entre los que destaca una región que interacciona con las proteínas LC3. Así, al igual que LC3B, p62 es un marcador autofágico, el primero descubierto en mamíferos. Sin embargo, se diferencian en la función que realizan. En un primer momento, p62 es la encargada de reconocer específicamente la carga celular que será envuelta en los autofagosomas y eliminada en los autolisosomas; al finalizar el proceso, se convierte en un sustrato de autofagia y será degradado. [38], [39]

La expresión de p62 está afectada por muchos factores debido a su participación en numerosas vías de transducción de señales. Además de su papel en autofagia, también está involucrada en rutas como la ruta Ras/MAPK y la ruta JNK/c-Jun. Por ello se relaciona con patologías causadas por fallos en la destrucción y el reciclado proteico. Por encima de esto, los niveles celulares de p62 están modulados sobre todo por la degradación autofágica. [38], [39], [40]

Durante la autofagia, p62 recluta material celular destinado a la degradación y reciclado del que acabará formando parte. Por tanto, su expresión aumenta inicialmente al desencadenarse la autofagia para después desaparecer por proteolización. [38], [40]

Destacar que p62 es un marcador de autofagia promiscuo. Una bajada en sus niveles de expresión puede deberse a su eliminación en los autolisosomas, o bien, por ejemplo, a una interrupción en otro de sus procesos. La solución es no utilizar p62 como marcador autofágico de forma aislada. En nuestro caso, para estudiar el flujo autofágico, se ha analizado la expresión de p62 junto a la transformación de LC3B-I en LC3B-II. [40]

2.4. PAPEL DE LA GLUCOSA

La principal función de la glucosa es la metabólica ya que es el sustrato energético primario y más importante para las células; se trata de un monosacárido, la unidad más simple de los azúcares, que mantiene el crecimiento, la proliferación y el desarrollo celular. Cuando la glucosa llega a una célula se produce la glucólisis, conjunto de reacciones catabólicas secuenciales en las que se generan moléculas más pequeñas como el piruvato, punto de partida de los procesos de la respiración celular; y se produce la conversión de ADP en ATP, molécula que actúa como una moneda de energía celular.

Sin embargo, no debemos olvidar que el papel de la glucosa no es exclusivamente energético. Participa en numerosos procesos como la glicosilación de proteínas, imprescindible para que éstas, en el caso de que su forma activa lo requiera, ejecuten su función biológica *in vivo*. [41]

Así pues, vamos a estudiar el comportamiento de una línea celular deficiente en autofagia en un medio carente de glucosa a lo largo de cuatro tiempos: 0, 6, 24 y 48 horas. Como control, estudiaremos de manera paralela la misma línea en medio con glucosa y una línea cuya muerte mediada por autofagia funciona correctamente en ambos tipos de medio.

3. OBJETIVOS

Con este Trabajo Fin de Grado se busca contribuir a los conocimientos actuales sobre la muerte programada y los métodos de supervivencia que llevan a cabo las células frente a situaciones de estrés: autofagia y apoptosis. Concretamente, la autofagia y las proteínas que la llevan a cabo, la familia ATG o autofaginas, son actualmente objeto de estudio debido a su relación con múltiples patologías. Se habla del proceso autofágico como un método de limpieza celular que podría ser la cura a numerosas enfermedades actuales como el cáncer o el Alzheimer.

En base a lo expuesto, los objetivos específicos del trabajo son los siguientes:

- Estudiar, de forma comparada, la inducción de autofagia y apoptosis en células de mieloma múltiple cultivadas en presencia o ausencia de glucosa.
- Analizar el efecto que tiene sobre autofagia y apoptosis el silenciamiento del gen *ATG5* en células de mieloma múltiple, cultivadas en presencia o ausencia de glucosa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LÍNEAS CELULARES

- Líneas celulares y mantenimiento de cultivos

Las líneas celulares utilizadas han sido líneas celulares establecidas de mieloma múltiple, MM.1S y MM.1S ShAtg5, cuyo gen *ATG5* se encuentra silenciado mediante horquillas generadas por infección lentiviral con 4 plásmidos pGIPZ. Ambas están disponibles en el grupo "Apoptosis, Inmunidad y Cáncer" de la Universidad de Zaragoza.

El cultivo de las líneas se ha llevado a cabo en el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen), L-glutamina 2 mM, estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml (Sigma). También se ha utilizado el mismo medio pero carente de glucosa y suplementado con suero fetal dializado. Los cultivos se han mantenido en un incubador termostático (Heraeus Cell) a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y saturada de humedad. Así mismo, las manipulaciones celulares se han realizado en condiciones estériles en campanas de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P).

- Contaje y determinación de la viabilidad celular

La determinación de la densidad y viabilidad celular se ha llevado a cabo mediante tinción por exclusión con Azul Trypan, diluido al 0,4% en NaCl 0,15 M. Este colorante únicamente penetra en las células muertas que poseen la membrana celular dañada, mientras que las células vivas la tienen intacta y ésta es selectiva respecto a los compuestos que pueden atravesarla. Así, al microscopio (Ophipot, Nikon) podremos observar y contar las células vivas no teñidas. Para ello, se utiliza la cámara de Neubauer o hemocitómetro y un cubreobjetos añadiendo una mezcla 1:1 de Azul de Trypan y cultivo celular. Para el cálculo de la densidad y viabilidad celular, las expresiones utilizadas han sido las siguientes:

$$\text{Densidad (D)} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables} \times \text{dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}} \qquad \text{Viabilidad (V)} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables}}{n^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$

4.2. ENSAYOS

4.2.1. Curva de crecimiento

Se ha realizado un seguimiento del crecimiento de las líneas en los diferentes medios de cultivo. Así, se establecieron curvas de crecimiento en medio estándar (control) y se compararon con la curva de crecimiento en medio sin glucosa. Estos cultivos se han llevado a cabo de manera paralela. Se han recogido datos de densidad celular y de viabilidad a lo largo de 5 días, como aparece explicado en el apartado anterior.

4.2.2. Cuantificación de apoptosis mediante citometría de flujo

La citometría de flujo se ha utilizado para analizar los niveles de muerte celular en las líneas de estudio sometidas a las distintas condiciones experimentales. Para ello, se realizó el marcaje con anexina V y su posterior detección con el citómetro BD FACSCalibur (BD Biosciences). Para la recogida de resultados se ha empleado el programa CellQuest Pro y para su procesamiento, FlowJo 7.6.1.

La anexina V es una proteína de la familia de las anexinas. Se utiliza en citometría de flujo para detectar muerte celular por apoptosis ya que se une específicamente a fosfatidilserina (PS), fosfolípido situado en la cara interna de la membrana celular que sufre una translocación a la parte externa en los primeros estadios del proceso apoptótico. En el desarrollo de la técnica, la anexina V se encuentra acoplada a un fluorocromo, el isotiocianato de fluoresceína o FITC ($\lambda_{\text{abs}}=492$ nm, $\lambda_{\text{em}}=518$ nm). [42]

Para la realización del experimento se utilizó una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por mililitro de cada punto a estudiar. Se trasvasaron las células a tubos de citometría, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos (Allegra X-15R Centrifuge, Beckman Coulter) y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 100 μ l por tubo de una solución de ABB 1x (Anexin Binding Buffer) y anexina V-FITC 1:100 de la siguiente manera:

- N° de tubos x 100 μ l ABB 1x (dilución 1:10 del stock)
- N° de tubos x 4 μ l anexina V-FITC (dilución 1:100 del stock)

Tras el marcaje, se dejaron los tubos 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de ABB 1x a cada tubo y se pasaron las muestras por el citómetro.

4.2.3. Análisis de expresión proteica mediante *Western Blot*

La técnica de *Western Blot* ha sido utilizada para analizar proteínas implicadas en la autofagia, proceso interrumpido en la línea MM.1S ShAtg5. Estas proteínas son LC3B y p62, cuyas funciones aparecen explicadas en el apartado 1. *Introducción*.

- **Extracción y fraccionamiento de lisados celulares**

Para poder identificar las proteínas de interés, el primer paso fue extraerlas de las células. Se necesitaron unos 5 millones de células por punto a estudiar. Para la línea *wildtype*, el experimento se ha repetido con 8 millones de células debido a la poca señal obtenida la primera vez.

Se dispusieron, por tanto, 5-8 millones de células por pocillo en placas de 6 pocillos. Después de dejar pasar los tiempos indicados (0, 6, 24 y 48h), se trasvasaron las células a tubos Falcon estériles, a los que se añadieron también 5 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*, NaCl 0,15 M, tampón fosfato K^+ 0,01 M, pH 7,4) y se realizó un primer lavado por resuspensión. Se centrifugó (en la misma centrífuga que para la citometría de flujo) a 1200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 1 ml de PBS para un segundo lavado y se pasó a un tubo Eppendorf. De nuevo, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, esta vez en una microcentrífuga (Microfuge 16, Beckman Coulter). Tras este segundo lavado, se volvió a descartar el sobrenadante, aunque esta vez por succión con la bomba de vacío, para lograr una mayor precisión. Se apartaron 3 alícuotas por pocillo antes de comenzar para ser marcadas y analizadas por citometría de flujo. De esta manera, los dos experimentos fueron realizados simultáneamente a cada uno de los tiempos.

Después de los lavados, el *pellet* se resuspendió en tampón de lisis 1x, añadiendo 20 μ l por cada millón de células. El tampón tiene la siguiente composición: Tritón-X-100 al 1% (Sigma), NaCl 150 mM (Merck), Tris/HCl 50 mM pH=7,6 (Sigma), glicerol al 10% v/v (Scharlau), EDTA 1 mM (Sigma), ortovanadato sódico 1 mM pH 7,6 (Sigma), pirofosfato sódico 10 mM (Sigma), leupeptina 10 μ g/ml (Sigma), fluoruro de sodio 10 mM (Sigma),

fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM (Sigma), compuestos necesarios para la lisis celular e inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las diferentes muestras se incubaron con el tampón de lisis durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C para clarificar el sobrenadante y separarlo de los restos celulares insolubles (citoesqueleto, DNA, etc) esta vez en una microcentrífuga capaz de mantener la temperatura (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron las muestras en un congelador a -20°C hasta su uso.

- **Cuantificación y preparación de las muestras para electroforesis**

Para normalizar la cantidad de proteínas cargada en cada pocillo, la cantidad de proteínas en cada muestra se determinó en una pequeña alícuota utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) usando el kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoFisher). Las muestras a analizar se mezclaron con tampón de carga (3x, por lo que la cantidad añadida fue una tercera parte del volumen total). El tampón de carga contiene glicerol al 30% v/v (Scharlau), que aumenta la densidad de la muestra y facilita la carga y azul de bromofenol (0,06%, p/v), para señalar el frente de migración. El tampón de carga también contiene Tris/HCl 150 mM pH 7.4 (Sigma), 3% dodecilsulfato de sodio SDS (Merck), molibdato de sodio y 2-β-mercaptoetanol 30% v/v (Sigma).

Las muestras se calentaron 5 minutos a 95°C para promover la desnaturalización de la proteína antes de ser cargadas en el gel de electroforesis.

- **Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS**

Los geles utilizados para la electroforesis han sido geles de acrilamida/bisacrilamida al 12% conteniendo SDS. Cada gel presenta dos partes según el tamaño del poro y el pH:

	Acrilamida/bis	Tris/HCl	SDS	Persulfato amónico	TEMED
Gel concentrador (<i>stacking</i>)	2%	125 mM pH 6.8	0.1%	0.1%	0.01%
Gel de resolución (<i>resolving</i>)	12%	370 mM pH 8.8	0.1%	0.1%	0.01%

Figura 4. Composición de las dos partes de los geles de acrilamida/bisacrilamida utilizados.

Tras la gelificación, se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis (Hoefer), llena de tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%) y se cargaron 18 µl de muestra por carril además de 3 µl del marcador de pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, ThermoFisher) en el primer carril. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V y 20 mA por gel durante 10 minutos para que las proteínas atravesaran el gel concentrador, y a 180 V y 20 mA por gel durante unas 2 horas, para que recorrieran el gel de resolución, con el que finalmente se trabaja.

- **Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa**

Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (GE HealthCare). Para ello, se colocó la

membrana y el gel entre papeles Whatman empapados en tampón de transferencia formando un sándwich de manera que la membrana quedó en el ánodo (abajo) y el gel en el cátodo (arriba). La composición del tampón es la siguiente: Tris/HCl 48 mM pH 8,3 (Sigma), glicina 39 mM (Sigma), 0,037% SDS (Merck) y 20% metanol (Panreac), necesario para “activar” la membrana, facilitando la transferencia de proteínas de bajo peso molecular. La transferencia se llevó a cabo en un sistema de electrotransferencia semiseca (Bio-Rad) a 20 V y 400 mA durante 1h y 15 minutos.

Para una primera visualización de las proteínas se añadió Rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético 0,05%. Se trata de un colorante inespecífico de unión a proteínas. Tras verificar el éxito de la transferencia, se bloqueó 30 minutos con leche al 5% en tampón B (Tris/HCl mM pH 8 (Sigma), NaCl 0,12 M (Sigma), Tween-20 0,01% (Sigma), timerosal 10% (p/v) (Merck)) para impedir el pegado inespecífico de los anticuerpos.

- **Análisis de proteínas por *Western Blot***

Una vez bloqueada la membrana se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón B en agitación, se añadió el anticuerpo primario dirigido contra una de las proteínas de interés, diluido 1:1.000 en tampón B con 5% de BSA y 0,05% de azida de sodio. La incubación se realizó *overnight* a 4°C y en agitación.

Tras reciclar el anticuerpo y realizar 3 lavados más, se añadió el anticuerpo secundario, dirigido contra el primario, diluido 1:10.000 en tampón B con 2,5% de leche desnatada en polvo. La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. El anticuerpo secundario está conjugado con peroxidasa de rábano lo que permitió su detección por ensayo enzimático. Se detecta la luz emitida por el sustrato de la peroxidasa usando el kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher), al producirse su oxidación química. Para ello, se transfiere la membrana a una funda de plástico transparente y se lleva al detector de quimioluminiscencia Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Este proceso se llevó a cabo consecutivamente con los anticuerpos frente a las proteínas de interés y frente a la β -actina. La β -actina es una proteína constituyente de los microfilamentos, muy abundante en todos los tipos celulares por lo que se utiliza como control de carga.

Anticuerpo primario	Especie	Proveedor	Anticuerpo secundario	Especie	Proveedor
Anti-LC3B	Conejo	Sigma	Anti-conejo PO	Cabra	Sigma
Anti-p62	Ratón	SantaCruz	Anti-ratón PO	Cabra	Sigma
Anti-β-actinas	Ratón	Sigma	Anti-ratón PO	Cabra	Sigma

Figura 5. Procedencia y proveedor de cada uno de los anticuerpos utilizados en la técnica *Western Blot*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CURVAS DE CRECIMIENTO

Partiendo de un cultivo con la misma densidad para ambas líneas celulares y para las dos condiciones de medio, la línea MM.1S ShAtg5, que no expresa la proteína ATG5 alcanzó mayor densidad celular que la línea MM.1S o línea *wildtype* control en el medio con glucosa pero inferior a esta en el medio carente de glucosa.

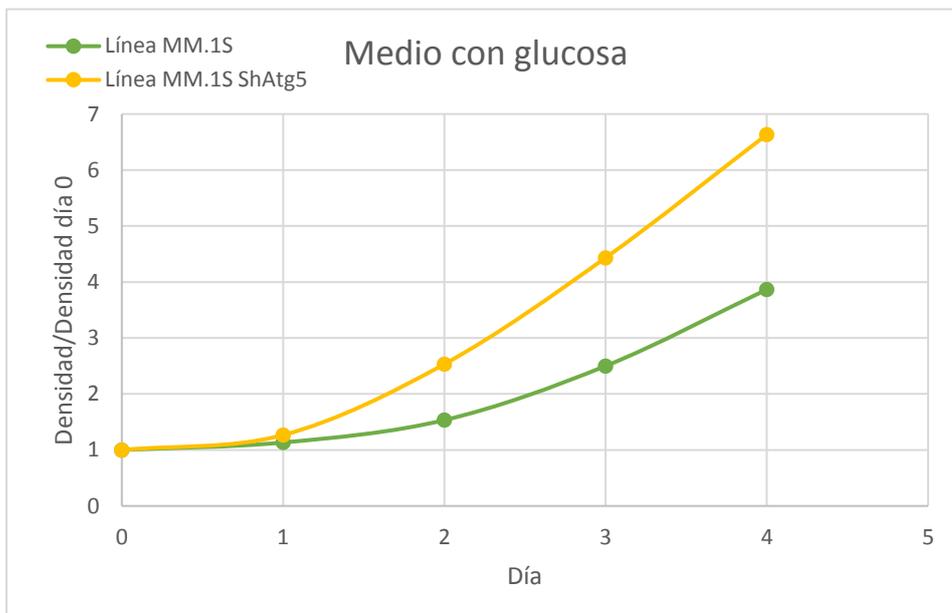


Figura 6. Crecimiento celular de las líneas MM.1S y MM.1S ShAtg5 en medio de cultivo con glucosa.

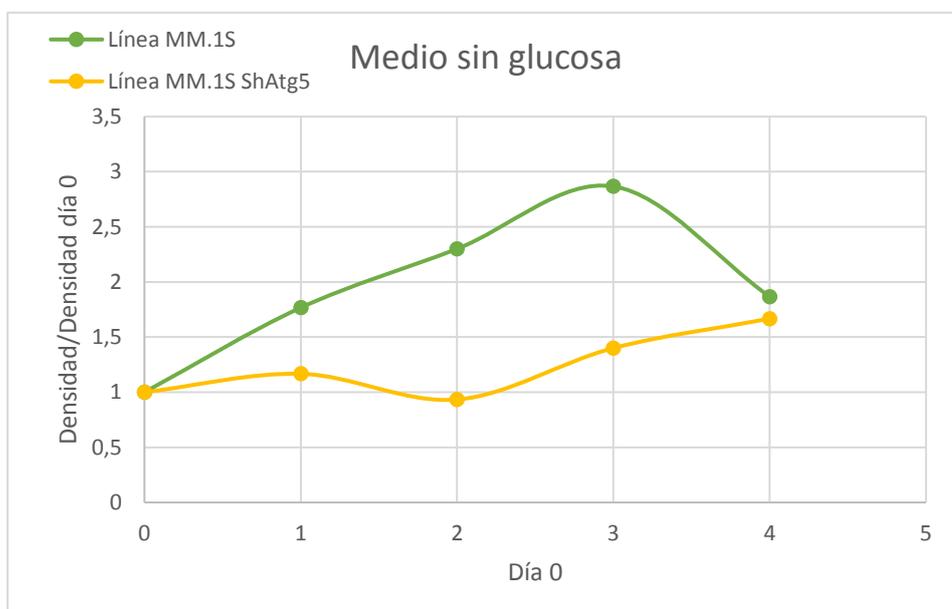


Figura 7. Crecimiento celular de las líneas MM.1S y MM.1S ShAtg5 en medio de cultivo sin glucosa.

El medio con glucosa constituye el ambiente habitual en el que las líneas son cultivadas en el laboratorio ya que trata de imitar las condiciones de crecimiento de las células en el organismo. Los resultados obtenidos de medir la densidad celular a lo largo de 5 días mostraron un mayor aumento de la población celular en el caso de la línea MM.1S

ShAtg5 frente al control. No está claro cómo el silenciamiento de ATG5 puede influir en el crecimiento celular. En todo caso, hubiera sido razonable, a priori, encontrar un resultado opuesto. Sin embargo, también debemos de tener en cuenta que la línea mutada fue sometida a selección durante su proceso de generación por lo que se pudo seleccionar un subclón celular con mayor capacidad proliferativa y este hecho ser independiente de ATG5.

Los resultados obtenidos indicaron que las dos líneas crecieron con mayor dificultad en el medio sin glucosa. Destacó la disminución de densidad celular de la línea parental al 4^o día en cultivo. En ambos casos, la densidad celular máxima alcanzada fue menor que en el medio con glucosa. La densidad celular de la línea parental llegó a ser cuatro veces mayor en el medio con glucosa mientras que solo fue tres veces mayor en el medio carente de glucosa. En el caso de la línea mutada, en el medio con glucosa, su crecimiento aumentó hasta llegar a ser casi siete veces más, y fue menos del doble en el medio de cultivo sin glucosa.

El cultivo de líneas celulares en medios sin glucosa pone a las células en situación de estrés celular al ver ausente su principal fuente de energía. Como resultado, ambas líneas redujeron considerablemente su crecimiento, aunque con diferentes patrones.

La línea parental creció, en medio carente de glucosa, con una curva de crecimiento aparente normal, aunque con valores de densidad celular significativamente más bajos en comparación con su crecimiento en medio con glucosa. Incluso experimentó una disminución de su crecimiento en las últimas 24 h de cultivo. Esto podría deberse a un aumento de la apoptosis celular. En un primer momento, las células intentan subsistir sin glucosa activando el proceso autofágico pero a tiempos más largos, la autofagia no puede proporcionar suficientes nutrientes y las células desarrollan apoptosis.

En el caso de la línea mutada, al carecer de autofagia, las células no crecieron, aunque en los últimos días algunas células empezaron a proliferar. Cabe teorizar que quizá en esas células el silenciamiento de Atg5 no fue completo y desarrollaron autofagia.

El cultivo en un medio sin glucosa obliga a las células a reorganizar sus mecanismos metabólicos y biosintéticos. Como se comenta en el apartado 2.4. *Papel de la glucosa*, la falta de glucosa provoca carencias a todos los niveles, no solo en el ámbito energético sino también en la modificación postraduccional de proteínas, entre otros.

5.2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE

Para analizar los niveles de apoptosis celular en las líneas de estudio sometidas a las distintas condiciones se utilizó la citometría de flujo. Por un lado, las curvas de crecimiento nos informaron sobre la viabilidad de los cultivos y con esta técnica obtuvimos información complementaria: la inducción de muerte celular en los mismos.

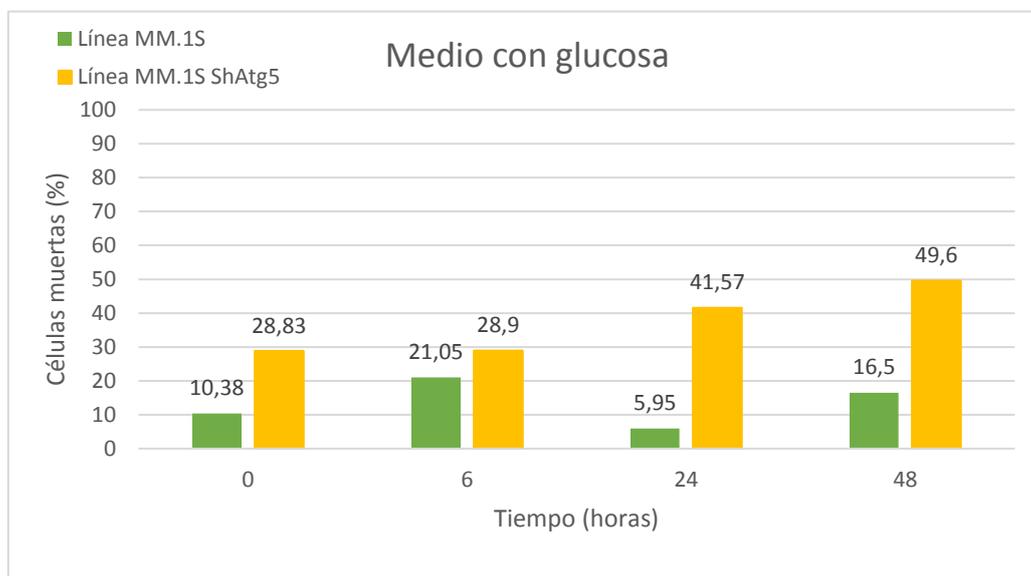


Figura 8. Evolución del porcentaje de muerte celular por apoptosis (anexina positivas) de las líneas MM.1S y MM.1S ShAtg5 tras 0, 6, 24 y 48 horas de cultivo en medio con glucosa.

En la figura 8 se puede observar la variación de la muerte celular para las dos líneas estudiadas en medio estándar, con glucosa. En la línea parental MM.1S se puede apreciar que la muerte basal inicial es del 10%, aproximadamente. Este resultado se puede considerar dentro de los límites de lo que puede ser considerado como “normal” en un cultivo de líneas tumorales. Sin embargo, a las 6 horas el porcentaje se duplicó, pero a las 24 h se obtuvieron valores inferiores a los de muerte basal. Una posible explicación podría ser que, en los cultivos, a medida que se consume la glucosa y otros nutrientes se empieza a producir la autofagia de forma adaptativa y esto mantiene e incluso mejora la viabilidad celular.

En la línea MM.1S ShAtg, se observó desde el inicio el cultivo (0 horas) existe un porcentaje de muerte celular mayor que el de las células parentales. A las 6 horas, la muerte celular apenas se incrementó, pero esto sí ocurrió a las 24 y 48 horas de cultivo.

Al comparar lo ocurrido en ambas líneas, cabe pensar que los mayores porcentajes de muerte celular en el caso de la línea deficiente en ATG5 se debe, esencialmente, a su deficiencia en autofagia. A pesar de crecer en un medio con glucosa, los datos obtenidos en los cultivos de células parentales sugieren que la inducción de autofagia ya es importante a partir de las 24 en cultivo para mantener la viabilidad celular. En la línea MM.1S ShAtg5 al no poder desencadenar la autofagia se empieza a producir apoptosis.

Además, al recordar la curva de crecimiento de ambas líneas celulares en medio con glucosa, podría deducirse que el aumento de muerte en la línea mutada se debe a su mayor ritmo de crecimiento. Las células de esta línea se reproducen más y con mayor rapidez que la línea parental, consumiendo más nutrientes.

Una circunstancia significativa a destacar es la siguiente. Tras la realización de los experimentos con ambas líneas celulares, en las distintas condiciones y a los diferentes

tiempos, observamos que el marcaje fluorescente de la línea MM.1S ShAtg5 para su estudio por citometría de flujo no había sido el adecuado. La línea MM.1S ShAtg5, como se explica en el apartado 4. *Materiales y métodos*, fue obtenida por silenciamiento del gen *ATG5* mediante horquillas generadas por cuatro plásmidos diferentes a partir de la línea parental MM.1S. En este proceso y para la selección de las células correctamente modificadas se utilizó la proteína fluorescente verde o GFP ($\lambda_{\text{abs}}=395$ nm, $\lambda_{\text{em}}=503$ nm y $\lambda_{\text{abs}}=475$ nm, $\lambda_{\text{em}}=508$ nm).

Para analizar la apoptosis por citometría de flujo es necesario el marcaje con anexina, proteína a que se une a la fosfatidilserina translocada a la membrana externa en las células apoptóticas. En estos experimentos se utilizó la anexina conjugada con isotiocianato de fluoresceína o fluorocromo FITC ($\lambda_{\text{abs}}=492$ nm, $\lambda_{\text{em}}=518$ nm). Como observamos, GFP emite a 503 o 508 nm y FITC a 518 nm. Sus espectros de emisión se solapan lo que supone la imposibilidad de utilizarlos juntos o bien, de descifrar los resultados tras emplearlos en las mismas células. Por lo tanto, las medidas de fluorescencia realizadas en las células parentales son correctas, pero no así las realizadas en las células MM.1S/shAtg5.

En este último caso, para estimar la muerte celular, se han utilizado los datos de tamaño celular (Forward scatter, FSC) y rugosidad celular (Side scatter, SSC) que también nos proporciona el citómetro, aprovechando las variaciones en la morfología celular que se producen durante la muerte apoptótica. Las células, al sufrir apoptosis, se encogen y retraen disminuyendo su volumen (disminuyen su FSC). Además, aparecen numerosas vesículas apoptóticas (*blebs*), aumentando su SSC. Por tanto, aparecen en una parte concreta de los *spots* obtenidos en la citometría de flujo según el tamaño de las células.

En resumen, con los resultados obtenidos hasta el momento y teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas, se puede concluir que la mutación en *ATG5* que sufre la línea MM.1S/shAtg5 altera la reproducción de esta línea celular, afectando al equilibrio entre crecimiento y muerte celular por apoptosis.

Para profundizar en las consecuencias del silenciamiento génico de *ATG5* en la línea MM.1S ShAtg5 y su consecuente carencia de autofagia, se analizó la muerte en las células cultivadas en medio carente de glucosa.

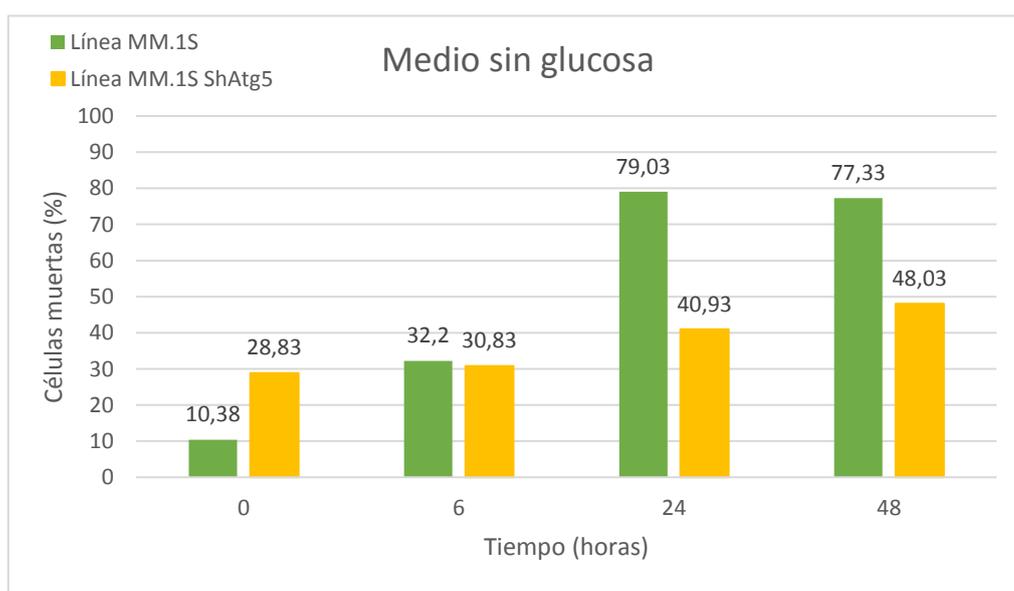


Figura 8. Evolución del porcentaje de muerte celular por apoptosis (anexina positivas) de las líneas MM.1S y MM.1S ShAtg5 tras 0, 6, 24 y 48 horas de cultivo en medio sin glucosa.

La figura 9 nos muestra la muerte celular apoptótica resultante al inducir estrés celular mediante el cultivo de las líneas de estudio en medio carente de glucosa. A las 0 horas la muerte basal tiene el mismo valor que en el caso del cultivo con glucosa ya que las condiciones del medio todavía no han afectado a las células que crecen en él.

Lo primero que observamos es el hecho de que, a partir de las 24 h la línea parental experimenta una mayor tasa de muerte por apoptosis que la línea mutada. Este resultado fue un tanto inesperado. Ya que la autofagia es un mecanismo que la célula pone en marcha frente a una determinada situación de estrés antes de recurrir a la apoptosis, la línea parental que presenta intacto su mecanismo autofágico debería experimentar menos apoptosis. A pesar de ello, éste parece no haber sido eficaz debido a los altos porcentajes de muerte celular obtenidos. Por otro lado, la línea mutada o MM.1S/shAtg5 debería haber sufrido una mayor tasa de apoptosis al no poder llevar a cabo la autofagia, pues presenta silenciado uno de los genes claves en el proceso. Sin embargo, según muestran los resultados, la línea mutada parece sobrevivir mejor que la parental en medio sin glucosa.

Para encontrar una explicación, hay que pensar en los múltiples papeles que cumple la glucosa en una célula. El primero es el papel clave como sustrato metabólico. Sin embargo, esto por sí solo no resuelve la incógnita. Otra de sus principales funciones es la glicosilación de proteínas. Son numerosas las proteínas incapaces de ejercer su función sin haber sufrido las pertinentes modificaciones postraduccionales a manos de la glucosa. Si se relaciona este proceso con los datos de muerte celular, podríamos pensar que las células parentales, no han sido capaces de superar la falta de glucosa debido a la inutilización de todas aquellas proteínas que necesitarían residuos glicosilados para ejercer su función. Si se suma este efecto al déficit de energía y a otras actividades que hayan podido verse afectadas por la falta de glucosa, parece lógico el camino apoptótico que las células han seguido.

Una vez justificado el motivo por el que la línea parental sufre apoptosis desmesuradamente, habría que intentar explicar por qué la línea mutada no parece haber sido afectada por la falta de glucosa. Comparando las Figuras 7 y 8, se observa que, aparentemente, los porcentajes de muerte celular apoptótica de la línea MM.1S/shAtg5 no han variado; sin embargo, estas células apenas crecen en medio sin glucosa. Cabe pensar en los posibles mecanismos de resistencia que la línea mutada pudiera haber desarrollado en su obtención por selección tras el silenciamiento génico. Estos la habrían dotado de la capacidad de verse inalterada frente a una falta de glucosa.

No obstante, habría que repetir este estudio para tener mas datos antes de concluir acerca del comportamiento de las células MM.1S ShAtg5.

Se debe también considerar que parecen existir otros tipos de autofagia independientes de Atg5 y, por tanto, disponibles para esta línea mutada. Además, se han observado casos en los que la ausencia de glucosa no solo no provoca autofagia sino que además la inhibe. [43], [44]

Podríamos concluir que la aparente supervivencia de las células MM.1S ShAtg5 en un medio carente del principal aporte energético celular se debería a mecanismos de resistencia desarrollados en la obtención de la línea.

5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

Una vez analizado el crecimiento celular y la muerte celular apoptótica en las dos líneas de estudio, los niveles de expresión de 3 proteínas implicadas en autofagia: LC3B-I, LC3B-II y p62, cuyas funciones aparecen explicadas en el apartado 1. *Introducción*, fueron determinados por la técnica de *Western Blot*. Con este método inmunoquímico podemos comprobar en qué líneas y en qué condiciones las células han realizado autofagia en mayor o menor medida mediante la valoración del aumento, disminución, transformación, aparición o desaparición de las formas proteicas implicadas.

5.3.1. Proteína LC3B

La proteína LC3B forma parte de las membranas de los autofagosomas. En concreto, se produce la conjugación de la isoforma I con fosfatidiletanolamina dando lugar a LC3B-II cuando se activa la autofagia. Por tanto, al añadir el anticuerpo anti-LC3B se debería observar, a lo largo de los cuatro tiempos medidos, la desaparición de LC3B-I con la consecuente manifestación de LC3B-II, en los casos de cultivo en medio sin glucosa.

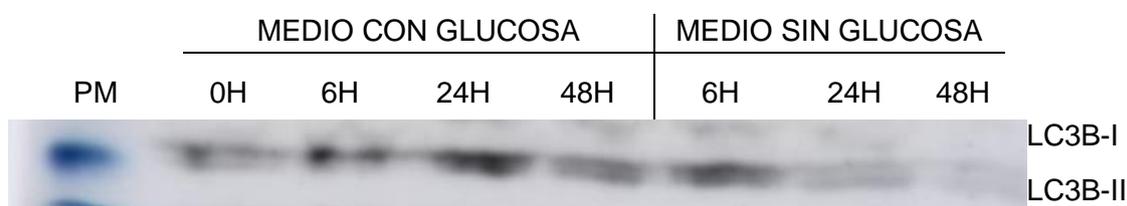


Figura 10. Western Blot de la línea MM.1S para LC3B-I y LC3B-II, de 16 y 18 kDa respectivamente.

En la imagen superior se pueden intuir dos bandas dispuestas verticalmente en cada uno de los carriles que pertenecen a las muestras recogidas en los dos tipos de medios y en los diferentes tiempos de medida. La banda superior corresponde a la proteína LC3B-I y la inferior a L3B-II. Para los cuatro carriles de la línea MM.1S cultivada en medio con glucosa se debería observar únicamente la banda superior, es decir, LC3B-I. En condiciones normales es la única forma activa. Por el contrario, en el cultivo con medio carente de glucosa, lo observado debería ser, a lo largo de tiempos medidos consecutivamente, la desaparición de la banda superior, LC3B-I, a la vez que se manifiesta LC3B-II, en la banda inferior.

En el caso del medio sin glucosa, aunque vagamente, se puede apreciar la presencia de la isoforma LC3B-II. Su manifestación indica la ausencia de glucosa ha inducido autofagia dado que, de otra forma, no se habría formado esta proteína. Sin embargo, también observamos LC3B-II en el caso de glucosa positivo. Esto podría deberse a casos de estrés no inducido que hayan podido darse en el medio con glucosa o bien, al hecho de que sí exista esta isoforma autófaga en condiciones basales.

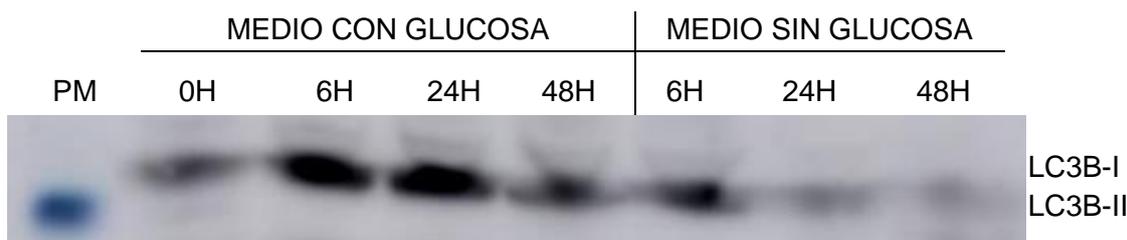


Figura 11. Western Blot de la línea MM.1S ShAtg5 para LC3B-I y LC3B-II, de 16 y 18 kDa respectivamente.

En el caso de la línea MM.1S ShAtg5 no debería apreciarse la banda inferior en ningún caso, puesto que presenta inhibida la expresión del gen *ATG5* y por tanto, del proceso autofágico y, en consecuencia, LC3B-II no se forma. A pesar de la mala calidad de la imagen, podemos intuir que las bandas observadas corresponden a la forma citosólica activa LC3B-I. La desaparición gradual de las bandas en el caso del medio sin glucosa puede deberse a la inducción de muerte celular.

Además, como se comenta en el apartado de *Introducción*, son tres los tipos de LC3 y, aunque los anticuerpos comerciales afirman solo reconocer uno de ellos, éstos podría no ser así y se podrían detectar varios tipos de LC3 a la vez. Esto podría contribuir a la falta de claridad en las bandas en las Figuras 9 y 10. Además, las isoformas de LC3B se diferencian en 2 kDa, cantidad difícil de apreciar en un gel al 12%. Se debería haber realizado el experimento con un mayor porcentaje de poliacrilamida en el gel de electroforesis para observar de manera más nítida e independiente las dos isoformas.

5.3.2. Proteína p62

La proteína p62 tiene una doble función en autofagia. En un primer momento, recluta la carga celular que será degradada en los autofagosomas y tras esto, pasa a formar parte de ella y es proteolizada. Así, en las células que desencadenen autofagia, mediante *Western Blot* se debería observar cómo aumenta la expresión proteica para, según avanza el proceso, verse reducida.



Figura 12. Western Blot de la línea MM.1S para p62, de 60 kDa.

En el cultivo con o sin glucosa, se aprecia perfectamente un aumento de la proteína p62 en el punto correspondiente a las 6 horas seguido de una desaparición de la expresión proteica en las muestras siguientes, a las 24 y 48 horas. Las células MM.1S han activado el proceso autofágico al ser puestas a crecer en un medio con o sin glucosa. En los primeros instantes de este proceso, la cantidad de p62 aumenta ya que es la encargada de reconocer selectivamente la carga que engullirán los autofagosomas. Una vez formados, p62 es degradada.

En el caso del cultivo con glucosa, también se observa un aumento de la expresión de p62 esta vez de mayor duración pues se mantiene también en la muestra correspondiente a las 24 horas de cultivo. En el punto de 48 horas se aprecia una disminución en la intensidad de la banda, aunque el contraste con la anterior es muchísimo menor que en el caso del cultivo en medio carente de glucosa. En otras palabras, las células MM.1S en medio con glucosa también han aumentado la expresión de p62. No obstante, la evolución no es la misma que en el caso de estrés inducido por ausencia de glucosa por lo que podría deberse a otras razones. Bien a otros mecanismos en los que p62 se ve implicado como el sistema de ubiquitinación, de gran importancia para la vida celular, o bien a algún evento de autofagia sin relación con la concentración de glucosa o simplemente encargado de controlar la expresión de p62.

Dado que la proteína es degradada en este proceso, puede que su degradación se lleve a cabo en condiciones basales a modo de control.

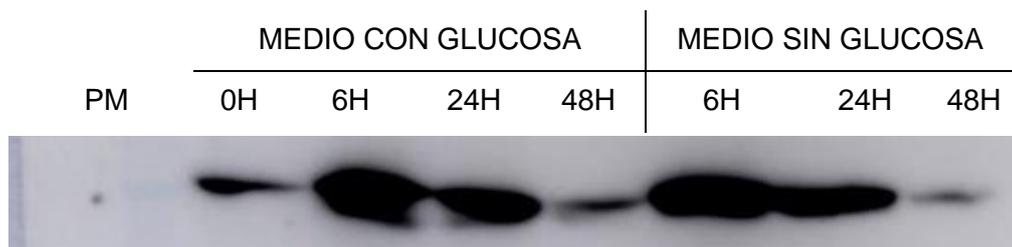


Figura 13. Western Blot de la línea MM.1S ShAtg5 para p62, de 60 kDa.

En la figura 13 se observa la evolución de la proteína p62 de la línea MM.1S ShAtg5 en los distintos medios de cultivo. La primera diferencia es la abundancia de la proteína en ambos casos de cultivo. Vemos que la intensidad de las bandas es muchísimo superior a la obtenida con la línea *wildtype*, lo que indica que p62 se acumula al fallar su sistema de degradación, la autofagia. En el medio sin glucosa, p62 aumenta notablemente su expresión, como se aprecia en las bandas correspondientes a las 6 y 24 horas. Es decir, la célula detecta el estrés y pone en marcha el mecanismo autofágico: p62 comienza a reclutar la carga que será degradada, pero en el momento de formación de la doble membrana autofagosómica el proceso se ve interrumpido debido a la falta de la proteína ATG5. La autofagia finaliza y p62 se acumula. La causa de la disminución al pasar a las 48 horas podría deberse a cualquier otro mecanismo que la célula haya activado para acabar con el exceso de proteína o, como bien hemos señalado en el caso de las células MM.1S, a algún proceso de los que p62 realiza en paralelo como la ubiquitinación.

En el medio con glucosa también se produce esta acumulación de p62 lo que podría confirmar que, de alguna manera, la autofagia participa, posiblemente a bajos niveles, en el metabolismo propio de la proteína p62 degradándola y manteniendo unos niveles de concentración.

5.3.3. Control de carga

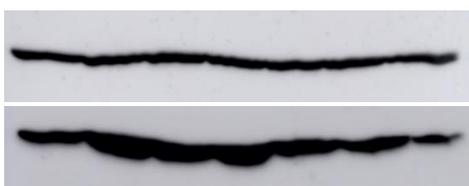


Figura 13. Control de carga del Western Blot para la línea MM.1S (arriba) y MM.1S ShAtg5 (abajo).

La detección de actina en los mismos *Western Blot* mostrados anteriormente sirve como control de carga. Asegura que se ha añadido la misma cantidad de proteínas a cada carril para validar que los cambios en los niveles de proteínas analizadas sean específicos.

6. CONCLUSIONES

- I. El cultivo en un medio carente de glucosa provoca una situación de estrés celular e induce autofagia en las células de la línea MM.1S.
- II. La línea MM.1S no logra superar el estrés causado por la ausencia de glucosa desembocando en apoptosis.
- III. La defectuosa glicosilación de proteínas en el caso del medio sin glucosa podría ser la causa que acaba con la supervivencia de la línea MM.1S.
- IV. La línea MM.1S ShAtg5 alcanza valores superiores de crecimiento celular a los de la línea *wildtype*, lo que relaciona su modificación genética con el aumento de densidad celular.
- V. La línea MM.1S ShAtg5 no se ve afectada por la falta de glucosa debido a resistencias como consecuencia de la selección con la que se obtuvo.

CONCLUSIONS

- I. Cultivation in a medium without glucose causes a situation of celular stress and induces autophagy in the cell line MM.1S.
- II. The cell line MM.1S fails to overcome stress caused by the absence of glucose leading to apoptosis.
- III. Defective proteins glycosylation in the medium without glucose case could be the reason why cell line MM.1S does not survive.
- IV. The cell line MM.1S ShAtg5 achieves higher cell growth values than the wildtype line, which relates its genetic modification to the increase in cell density.
- V. The cell line MM.1S ShAtg5 is not affected by the lack of glucose due to a resistance as a result of the selection from which it was obtained.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Röllig, C., Knop, S., & Bornhäuser, M. (2015). Multiple myeloma. *The Lancet*, 385(9983), 2197–2208.
2. Van de Donk, N. W. C. J., Mutis, T., Poddighe, P. J., Lokhorst, H. M., & Zweegman, S. (2016). Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38, 110–122.
3. AEAL. (2011). ¿Qué es el mieloma?. Recuperado de <https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2013/pacientes/documentos-y-videos/Mieloma.pdf>
4. Bianchi, G., & Anderson, K. C. (2014). Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(6), 422–444.
5. McCarthy, P. L., Holstein, S. A., Petrucci, M. T., Richardson, P. G., Hulin, C., Tosi, P., . . . Attal, M. (2017). Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 35(29), 3279–3289.
6. Arya, R., & White, K. (2015). Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, 12–19.
7. Muerte celular - Wikipedia, la enciclopedia libre. (s.f.). Recuperado de https://es.wikipedia.org/wiki/Muerte_celular
8. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541.
9. Apoptosis - Wikipedia, la enciclopedia libre. (s.f.). Recuperado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>
10. Reed, J. C. (2000). Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415–1430.
11. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
12. Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776.
13. Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., & Greenwood, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(1), 238–259.

14. Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241.
15. Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 95–118.
16. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell*, 94(4), 481–490
17. Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289–317.
18. Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2015). The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discovery*, 5(5), 475–487.
19. Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M., Alharbi, S. A., . . . Sethi, G. (2015). Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 760–773.
20. Booth, L. A., Tavallai, S., Hamed, H. A., . . . N., & Dent, P. (2014). The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cellular Signalling*, 26(3), 549–555.
21. Diccionario de cáncer. (s.f.). Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/autofagia>
22. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473.
23. Kroemer, G. (2015). Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 1–4.
24. Yuan, J., Han, R., Esther, A., Wu, Q., Yang, J., Yan, W., . . . Ni, C. (2017). Polymorphisms in autophagy related genes and the coal workers' pneumoconiosis in a Chinese population. *Gene*, 632, 36–42.
25. Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., . . . Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), 1981–1991.
26. Ohsumi, Y. (2013). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1), 9–23.
27. Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1542–1552.
28. Pfam: Family: APG5 (PF04106). (s.f.). Recuperado de <https://pfam.xfam.org/family/PF04106>

29. Yamaguchi, M., Noda, N., Yamamoto, H., Shima, T., Kumeta, H., Kobashigawa, Y., . . . Inagaki, F. (2012). Structural Insights into Atg10-Mediated Formation of the Autophagy-Essential Atg12-Atg5 Conjugate. *Structure*, 20(7), 1244–1254.
30. Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2002). Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18619–18625.
31. Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K., . . . Okuda, K. (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(35), 14050–14055.
32. Jackson, W. T., Giddings, T. H., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., & Kirkegaard, K. (2005). Subversion of Cellular Autophagosomal Machinery by RNA Viruses. *PLoS Biology*, 3(5), 156.
33. Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Autophagosome and Phagosome*, , 77–88.
34. Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., Harris, A. L. (2015). Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLOS ONE*, 10(9).
35. Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2503–2518.
36. He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., . . . Yu, L. (2003). Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29278–29287.
37. Mai, S., Muster, B., Bereiter-Hahn, J., & Jendrach, M. (2012). Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy*, 8(1), 47–62.
38. Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., . . . Liu, H. F. (2016). p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1).
39. Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2010). p62, an autophagy hero or culprit? *Nature Cell Biology*, 12(3), 207–209.
40. Bresciani, A., Spiezia, M. C., Boggio, R., Cariulo, C., Nordheim, A., Altobelli, R., . . . Weiss, A. (2018). Quantifying autophagy using novel LC3B and p62 TR-FRET assays. *PLOS ONE*, 13(3).

41. León-Annicchiarico, C. L., Ramírez-Peinado, S., Domínguez-Villanueva, D., Gonsberg, A., Lampidis, T. J., & Muñoz-Pinedo, C. (2015). ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. *FEBS Journal*, 282(18), 3647-3658.
42. Lu, J., Le Brun, A., Chow, S., Shiota, T., Wang, B., & Lin, T. et al. (2015). Defining the structural characteristics of annexin V binding to a mimetic apoptotic membrane. *European Biophysics Journal*, 44(8), 697-708.
43. Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, 461(7264), 654-658.
44. Ramírez-Peinado S., León-Annicchiarico, C. L., Galindo-Moreno, J., Iurlaro, R., Caro-Maldonado, A., Prehn, J. H. M., Muñoz-Pinedo, C. (2013). Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30387-30398.