



Universitat de Lleida

Identificación de nuevas vías de señalización de la ciclinaD3 implicadas en la viabilidad y funcionalidad de la célula beta pancreática en la diabetes autoinmune

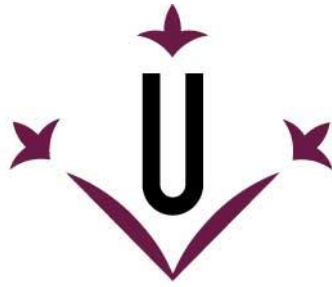
Celia Vived Maza

<http://hdl.handle.net/10803/671732>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESIS DOCTORAL

Identificación de nuevas vías de señalización de la ciclinaD3 implicadas en la viabilidad y funcionalidad de la célula beta pancreática en la diabetes autoinmune.

Celia Vived Maza

2020

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Lleida

Programa de Doctorado en Salud

Directora y tutora:

Conchi Mora Giral

RESUMEN · RESUM · ABSTRACT

RESUMEN

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos por la activación de linfocitos autorreactivos. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la infiltración leucocitaria de los islotes pancreáticos en el proceso autoinmune causa una disminución significativa de la expresión tanto de *ciclinaD3* como de *Cdk11* en el modelo murino NOD (*Non Obese Diabetic*) de diabetes autoinmune. Hemos observado que la deficiencia en ciclinaD3 en los ratones NOD provoca apoptosis en las células beta-pancreáticas independientemente del ciclo celular y alteraciones en los flujos de calcio implicados en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Contrariamente, la hemideficiencia en *Cdk11* protege significativamente las células beta frente a la apoptosis en comparación con el genotipo salvaje. Por todo ello, los objetivos principales de este proyecto han sido:

1. Hallar vías de señalización que impliquen a la ciclinaD3 en la viabilidad y supervivencia de las células beta mediante la identificación de interacciones positivas de la ciclinaD3 con otras moléculas.
2. Estudiar la función de la *Cdk11* en la precipitación de la diabetes autoinmune y su represión como mecanismo de protección contra la apoptosis, teniendo en cuenta que la ciclinaD3 es la subunidad reguladora de *Cdk11p58*, e interacciona físicamente con ella.

Como resultado, observamos que la ciclinaD3 interacciona con proteínas independientes de ciclo celular como *Pdia6* y *Stx8*, implicadas en procesos fisiológicos como la respuesta UPR y el tráfico vesicular, respectivamente. La ciclinaD3 mediante su unión con *Pdia6* estaría, por tanto, ejerciendo una acción antiapoptótica en las células beta pancreáticas mediante la regulación de la vía UPR y la inhibición de la apoptosis inducida por estrés de retículo endoplasmático (ER). En el caso de *Stx8*, la interacción con dicha proteína podría afectar el tráfico de vesículas que transportan insulina.

Con respecto a *Cdk11*, hemos observado que los islotes de ratones hemideficientes en *Cdk11* son menos susceptibles que los procedentes de ratones salvajes a la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias. Además, observamos que marcadores de estrés

de retículo como Atf4 y Chop se inducen menos en los islotes hemideficientes en Cdk11 comparados con los islotes de genotipo salvaje. Este resultado confirmaría la hipótesis sobre el papel de Cdk11 en promover la muerte de las células beta, ya que su hemideficiencia protege a las células beta de la apoptosis al inhibir la expresión de Chop inducida por UPR.

Según estos resultados, se puede concluir que ciclinaD3 y Cdk11 llevan a cabo papeles antagónicos, y ambos desarrollan una función independiente de ciclo celular en la viabilidad de las células beta. Por su parte, ciclinaD3 interactúa con otras proteínas clave para la viabilidad de las células beta, modulando su actividad, lo cual revierte en el incremento del bienestar y la supervivencia de las células beta mientras que Cdk11 podría ser una diana natural en la T1D que está reprimida en las células beta como mecanismo de protección contra la apoptosis inducida por inflamación.

Estos descubrimientos ofrecen nuevas perspectivas con respecto al tándem Cdk11/ciclinaD3 como una potencial nueva diana de intervención en la diabetes autoinmune.

RESUM

La diabetis tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmune caracteritzada per la destrucció de les cèl·lules beta productores d'insulina en els illots pancreàtics per l'activació de limfòcits autorreactius. Estudis previs del nostre laboratori han demostrat que la infiltració leucocitària dels illots pancreàtics en el procés autoimmune causa una disminució significativa de l'expressió tant de ciclinaD3 com de Cdk11 en el model murí NOD (*Non Obese Diabetic*) de diabetis autoimmune. Hem observat que la deficiència en ciclinaD3 en els ratolins NOD provoca apoptosi en les cèl·lules beta-pancreàtiques independentment del cycle cel·lular i alteracions en els fluxos de calci implicats en la secreció d'insulina estimulada per glucosa. Contràriament, l'hemideficiència en Cdk11 protegeix significativament les cèl·lules beta enfront de l'apoptosi en comparació amb el genotip salvatge. Per tot això, els objectius principals d'aquest projecte han estat:

1. Trobar vies de senyalització que impliquin la ciclinaD3 en la viabilitat i supervivència de les cèl·lules beta mitjançant la identificació d'interaccions positives de la ciclinaD3 amb altres molècules.
2. Estudiar la funció de la Cdk11 en la precipitació de la diabetis autoimmune i la seva repressió com a mecanisme de protecció contra l'apoptosi, tenint en compte que la ciclinaD3 és la subunitat reguladora de Cdk11p58, i interacciona físicament amb ella.

Com a resultat, observem que la ciclinaD3 interacciona amb proteïnes independents de cycle cel·lular com Pdia6 i Stx8, implicades en processos fisiològics com la resposta UPR i tràfic vesicular, respectivament. La ciclinaD3, mitjançant la seva unió amb Pdia6, estaria per tant exercint una acció antiapoptòtica en les cèl·lules beta pancreàtiques mitjançant la regulació de la via UPR i la inhibició de l'apoptosi induïda per estrès de reticle endoplasmàtic (ER). En el cas de Stx8, la interacció amb aquesta proteïna podria afectar el trànsit de vesícules que transporten insulina.

Pel que fa a Cdk11, hem observat que els illots de ratolins hemideficients en Cdk11 són menys susceptibles que els procedents de ratolins salvatges a l'apoptosi induïda per citocines proinflamatòries. A més, observem que marcadors d'estrès de reticle com Atf4 i Chop s'indueixen menys en els illots hemideficients per Cdk11 comparats amb els illots de genotip salvatge. Aquest resultat confirmaria l'hipòtesi sobre el paper de Cdk11 en promoure la mort de les cèl·lules beta, ja que la seva hemideficiència protegeix les cèl·lules

beta de l'apoptosi a l'inhibir l'expressió de Chop induïda per UPR.

Segons aquests resultats, es pot concloure que ciclinaD3 i Cdk11 duen a terme papers antagònics, i tots dos desenvolupen una funció independent de cicle cel·lular en la viabilitat de les cèl·lules beta. Per la seva banda, ciclinaD3 interactua amb altres proteïnes clau per a la viabilitat de les cèl·lules beta, modulant la seva activitat, la qual cosa reverteix en l'increment del benestar i la supervivència de les cèl·lules beta, mentre que Cdk11 podria ser una diana natural a la T1D que està reprimida en les cèl·lules beta com a mecanisme de protecció contra l'apoptosi induïda per inflamació.

Aquests descobriments ofereixen noves perspectives pel que fa al tàndem Cdk11/ciclinaD3 com una potencial nova diana d'intervenció en la diabetis autoimmune.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing beta cells in pancreatic islets by the activation of autoreactive lymphocytes. Previous studies from our laboratory have shown that leukocyte infiltration of pancreatic islets in the autoimmune process causes a significant decrease in the expression of both cyclinD3 and Cdk11 in the murine NOD (Non Obese Diabetic) model of autoimmune diabetes. We have observed that cyclin D3 deficiency in NOD mice causes cell cycle-independent apoptosis in beta-pancreatic cells and alterations in calcium fluxes involved in glucose-stimulated insulin secretion. Conversely, Cdk11 hemideficiency significantly protects beta cells against apoptosis compared to wildtype. For all these reasons, the main objectives of this project have been:

1. To find signaling pathways that implicate cyclin D3 in beta cell viability and survival by identifying positive interactions of cyclin D3 with other molecules.
2. To study the role of Cdk11 in the precipitation of autoimmune diabetes and its repression as a protection mechanism against apoptosis, taking into account that cyclin D3 is the regulatory subunit of Cdk11p58, and physically interacts with it.

As a result, we observe that cyclinD3 interacts with cell cycle-independent proteins such as Pdia6 and Stx8, which are involved in physiological processes such as the UPR response and gallbladder traffic, respectively. CyclinD3, by binding to Pdia6, would therefore be exerting an antiapoptotic action on pancreatic beta cells by regulating the UPR pathway and inhibiting endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis. In the case of Stx8, the interaction with this protein could affect the traffic of vesicles that transport insulin.

With respect to Cdk11, we have observed that the islets of Cdk11 hemideficient mice are less susceptible to proinflammatory cytokine-induced apoptosis than those from wild mice. Furthermore, we observed that reticulum stress markers such as Atf4 and Chop are less induced in Cdk11 hemidefficient islets compared to wildtype islets. This result would confirm the hypothesis about the role of Cdk11 in promoting beta cell death, since its hemideficiency protects beta cells from apoptosis by inhibiting the expression of Chop induced by UPR.

Based on these results, it can be concluded that cyclinD3 and Cdk11 play antagonistic roles, and both play an independent role in the cell cycle in beta cell viability. CyclinD3 interacts with other key proteins for beta cell viability, modulating its activity, which reverts to increased well-being and survival of beta cells, while Cdk11 could be a natural target in T1D, using its suppression in beta cells as a protective mechanism against inflammation-induced apoptosis.

These discoveries offer new perspectives regarding the Cdk11/cyclinD3 tandem as a potential new target for intervention in autoimmune diabetes.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN · RESUM · ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	7
1.1. Manifestaciones clínicas y diagnósticas.....	7
1.2. Epidemiología.....	8
1.3. Etiología.....	9
1.3.1. Factores genéticos	10
1.3.2. Factores ambientales	12
1.3.3. Factores epigenéticos.....	16
1.4. Patogénesis de la T1D.....	18
1.4.1. Papel de los linfocitos T.....	19
1.4.2. Papel de los linfocitos B.....	20
1.5. Estadios de la T1D	21
2. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA VS. AUTOTOLERANCIA.....	22
2.1. Autoinmunidad.....	23
2.1.1. Enfermedades autoinmunes	24
3. TRATAMIENTO Y TERAPIAS DE LA T1D	25
3.1. Tratamiento con insulina exógena	26
3.2. Terapias de regeneración	26
3.2.1. Trasplantes.....	26
3.2.2. Proliferación endógena de células beta funcionales	27
3.3. Inmunoterapias	27
3.3.1. Terapias dirigidas a linfocitos T	27
3.3.2. Terapias dirigidas a linfocitos B	28
3.3.3. Terapias antígeno-específicas	28
4. MODELO NOD DE DIABETES AUTOINMUNE.....	29
5. FISIOLÓGÍA DEL ISLOTE PANCREÁTICO.....	31
5.1. Función de la célula beta pancreática	32
5.2. La insulina y su procesamiento.....	33
5.3. Línea celular NIT-1 de insulinoma de ratón NOD.....	35
6. INFLAMACIÓN, ESTRÉS Y ACTIVACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA EN LAS CÉLULAS BETA	36
6.1. Proceso inflamatorio en las células β	36

6.2.	Muerte de las células β	37
6.3.	Estrés de retículo	40
6.3.1.	Respuesta a proteínas mal plegadas o UPR	40
6.4.	Estrés oxidativo.....	42
7.	CDK11 Y CICLINAD3 EN LA INFLAMACIÓN DE LA CÉLULA BETA	44
7.1.	El ciclo celular	44
7.2.	La familia de las ciclinas	45
7.2.1.	La proteína ciclinaD3 y su papel en las células beta	46
7.3.	Kinasas Dependientes de Ciclina o Cdk	48
7.3.1.	La proteína Cdk11 y su papel en las células beta	49
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
	MATERIALES Y MÉTODOS	55
1.	MÉTODOS DE INGENIERÍA GENÉTICA	57
1.1.	Cepas de <i>E.Coli</i> utilizadas para subclonación de construcciones	57
1.1.1.	Condiciones de cultivo.....	57
1.2.	Plásmidos.....	57
1.3.	Purificación de DNA plasmídico en <i>E.Coli</i>	58
1.4.	Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	59
1.5.	Electroforesis de DNA	60
1.6.	Digestión con enzimas de restricción.....	61
1.7.	Generación de extremos romos	62
1.8.	Purificación de fragmentos de DNA previa a la ligación.....	63
1.9.	Cuantificación con λ DNA <i>HindIII</i>	63
1.10.	Ligación de fragmentos de DNA	64
1.11.	Análisis de clones positivos para la construcción mediante PCR de colonias o <i>Colony-PCR</i>	64
1.12.	Transformación de los productos de ligación en cepa <i>E.Coli</i> XL1-Blue	65
1.13.	Análisis del DNA por secuenciación.....	68
2.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	69
2.1.	Obtención de muestras.....	69
2.1.1.	Obtención de lisados celulares de NIT-1.....	69
2.1.2.	Obtención de extractos proteicos en levadura	70
2.1.3.	Obtención de lisados celulares de islotes pancreáticos murinos	71
2.2.	Métodos de estudio de la expresión de RNA	73
2.2.1.	Extracción de RNA	73

2.2.2.	Transcripción reversa y obtención de DNA complementario (cDNA).....	74
2.2.3.	PCR cuantitativa o a tiempo real (qRT-PCR)	75
2.3.	Métodos de estudio de la expresión de proteínas	77
2.3.1.	Cuantificación por BCA.....	77
2.3.2.	Técnicas electroforéticas de proteínas en condiciones desnaturalizantes	78
2.3.3.	Inmunodetección de proteínas por <i>Western Blot</i>	80
3.	MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	84
3.1.	Línea NIT-1 de insulinoma murino NOD	84
3.1.1.	Transfección de células NIT-1.....	84
3.1.2.	Contaje de número de células.....	85
3.2.	Cultivo de islotes pancreáticos de ratón.....	86
3.2.1.	Inducción de estrés con citoquinas proinflamatorias	86
3.2.2.	Inducción de estrés con taspigargina	86
4.	SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO.....	87
4.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : cepas y condiciones de crecimiento	87
4.1.1.	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.....	87
4.1.2.	Condiciones de cultivo de <i>S.cerevisiae</i>	87
4.1.3.	Transformación de <i>Sacharomyces Cerevisiae</i>	89
4.1.4.	Purificación de DNA plasmídico en <i>S.cerevisiae</i>	90
4.2.	Principio del ensayo de Doble Híbrido.....	92
4.3.	Genes reporteros del Sistema Matchmaker Gold Yeast	93
4.4.	Subclonación del gen cebo de interés en el plásmido pGBKT7 (Gal4BD).....	94
4.5.	Placas de crecimiento utilizadas para ensayos Y2H.....	94
4.6.	Experimentos control	95
4.6.1.	Análisis de autoactivación del cebo.....	97
4.6.2.	Análisis de toxicidad del cebo	98
4.7.	Apareamiento o <i>mating</i>	98
4.8.	Titulación librería	100
4.9.	Confirmación de candidatos positivos.....	101
4.10.	Apareamiento a pequeña escala o <i>small-scale mating</i>	101
4.11.	Apareamiento con cDNAs enteros de los candidatos	101
5.	ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEICA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS	102
5.1.	Ensayos de co-inmunoprecipitación (interacción ex vivo).....	102
5.2.	Tecnología NanoBiT.....	104
5.2.1.	Subclonación de los cDNAs candidatos en los vectores NanoBiT	106
6.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	108

6.1.	Modelos de ratón con fondo genético NOD	108
6.1.1.	Deficientes en ciclinaD3.....	109
6.1.2.	Transgénicos para ciclinaD3	109
6.1.3.	Hemideficientes en Cdk11	109
6.2.	Modelos de ratón con fondo genético NOD/SCID	109
6.3.	Genotipaje de las distintas cepas murinas.....	110
6.4.	Condiciones de estabulación de la colonia de ratones	112
7.	MICROSCOPIA.....	112
7.1.	Microscopía de epifluorescencia y confocal	112
7.1.1.	Tratamiento de los cubreobjetos con poli-L-lisina	112
7.1.2.	Inmunofluorescencia	113
7.1.3.	Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia	115
7.1.4.	Procesamiento de imágenes.....	116
8.	CITOMETRÍA DE FLUJO	116
8.1.	Fragmentación nuclear (%subG1).....	116
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	118
	RESULTADOS	119
1.	IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS QUE INTERACTÚAN CON LA CICLINAD3 MEDIANTE SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.....	121
1.1.	Validación previa de la técnica. Experimentos control	121
1.2.	Subclonación de ciclinaD3 (cebo o <i>bait</i>) en el plásmido pGBKT7.....	122
1.3.	Detección de la expresión del cebo	122
1.4.	Análisis de autoactivación del cebo	123
1.5.	Determinación de la titulación de la librería.....	125
1.6.	Apareamiento o <i>mating</i>	125
1.7.	Determinación de la eficiencia del apareamiento	126
1.8.	Candidatos que interactúan positivamente con la ciclinaD3	128
2.	ESTUDIO DE PDIA6 COMO PROTEÍNA DE INTERACCIÓN CON CICLINAD3.....	130
2.1.	Comprobación de la expresión de Pdia6 en levadura	130
2.2.	Transfección de células NIT-1 con Pdia6.....	131
2.3.	Estudio de la interacción entre Pdia6 y ciclinaD3	133
2.4.	Estudio de la localización de Pdia6 en células NIT-1	135
2.5.	Análisis de la expresión de Pdia6	137
3.	ESTUDIO DE STX8 COMO PROTEÍNA DE INTERACCIÓN CON CICLINAD3.....	138
3.1.	Transfección de NIT-1 con Stx8 y análisis de la expresión proteica	138
3.2.	Estudio de la interacción entre Stx8 y ciclinaD3.....	139

3.3. Estudio de la localización de Stx8	140
4. PAPEL DE LA CICLINAD3 Y LA CDK11 EN APOPTOSIS EN LA DIABETES TIPO 1	141
4.1. Determinación de la fragmentación de DNA (subG1).....	142
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE ESTRÉS DE RETÍCULO, VÍA UPR E INFLAMACIÓN	145
6. RESUMEN DE RESULTADOS.....	150
DISCUSIÓN	151
1. Relevancia de la ciclinaD3 en la supervivencia y funcionalidad de la célula β a través de su interacción con Pdia6 y Stx8	153
1.1. Estrés de ER, UPR y Pdia6.....	155
1.2. Stx8, su función y su posible relación con la T1D	159
2. El papel de la Cdk11 en la T1D: importancia de la inflamación, el ER y la vía UPR ...	161
3. Papel antagónico de la ciclinaD3 y la Cdk11.....	163
CONCLUSIONES	165
REFERENCIAS	169
ANEXOS	189
1. ANEXO I. Productos/kits.....	191
2. ANEXO II. Tampones genéricos utilizados	194
3. ANEXO III. Producción de TAQ polimerasa en <i>E.Coli</i>	196
4. ANEXO IV. Mapas e información de los plásmidos utilizados.....	198

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AbA: Aureobasidina A	HBSS: Solución salina equilibrada de Hanks
AD: Dominio de Activación	HDAC: histona desacetilasa
Ade: Adenina	His3: Histidina
APC: Célula presentadora de antígeno	HIP: Hybrid Insulin Peptides
ATF: Factor de transcripción activador	HLA: Antígeno leucocitario humano
ATP: Adenosina trifosfato	IF: Inmunofluorescencia
BCA: Ensayo de ácido bicinconínico	Ig: Inmunoglobulina
BD: Dominio de Unión	IL-1β: Interleuquina 1 beta
BSA: Albumina sérica bovina	IFN-γ: Interferón gamma
CcnD3: CiclinaD3	IRE: Enzima que requiere inositol
CDK: Kinasa dependiente de ciclina	Kan: Kanamicina
cDNA: DNA complementario	Lb: Loading Buffer
cfu: unidad formadora de colonias	LB: Luria-Bertani
CKI: inhibidor de Cdk	LEU2: Leucina
co-IP: Co-Inmunoprecipitación	MCS: Sitio múltiple de clonaje
CTL: linfocitos T citotóxicos	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
CTS: Catarata Shionogi	MHP: Hiperpolarización mitocondrial
DC: célula dendrítica	NK: Natural killer
DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco	NO: óxido nítrico
DMSO: Dimetil sulfóxido	NOD: Non-Obese Diabetic
DNA: Ácido desoxirribonucleico	OD600: Densidad óptica a 600 nm
dNTPs: dinucleótidos trifosfato	OGTT: Test de tolerancia oral a la glucosa
EDTA: Ácido etilendiamina-tetracético	ON: durante la noche (overnight)
eIF: factor de iniciación en eucariota	pb: Pares de bases
ER: Retículo endoplasmático	PBS: Tampón fosfato salino
ERAD: Vía de degradación de ER	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
FPG: glucosa en plasma en ayunas	PDI: Proteína disulfuro isomerasa
G418: Geneticina	PERK: Proteína Kinasa del Retículo Endoplasmático
HW: Hanks' Wallace	PFA: Paraformaldehido
HbA1c: nivel de hemoglobina glicosilada	

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

P/S: Penicilina/estreptomicina

p/v: peso/volumen

qRT-PCR: PCR cuantitativa o a tiempo real

Rb: proteína retinoblastoma

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

ROS: Especies reactivas del oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RT: Temperatura ambiente

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SC: Medio sintético completo

SCID: severe combined immunodeficiency

SD: Medio sintético definido

SDS: Dodecilsulfato sódico

SPF: Exento de patógenos específicos

Stx: Sintaxina

TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnediamina

TCR: Receptor de célula T

TLR: Receptor *Toll-like*

TNF: factor de necrosis tumoral

T_{regs}: linfocitos T reguladores

TRP1: triptófano

TSA: tricostatina A

T1D: Diabetes tipo 1

UAS: upstream activating sequences

UPR: Unfolded Protein Response

Ura3: Uracilo

YPD: Extracto De Levadura Peptona
Dextrosa

YPDA: YPD con Adenina

Y2H: Sistema de Doble híbrido en levaduras

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune multifactorial caracterizada por la activación de linfocitos T autorreactivos y la correspondiente destrucción de las células beta productoras de insulina de los islotes pancreáticos (Pearson et al., 2016). Los pacientes diagnosticados pierden el control de los niveles de glucosa en sangre (glucemia), lo cual produce, por un lado, cetoacidosis y una severa hiperglucemia, por ello requieren administración diaria de insulina subcutánea para poder mantener la normoglucemia; y, por otro lado, pueden experimentar complicaciones graves como retinopatía, nefropatía o enfermedades cardiovasculares (Bluestone et al., 2010).

1.1. Manifestaciones clínicas y diagnósticas

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) estableció los criterios diagnósticos de la diabetes mellitus (American Diabetes Association, 2017). Se considera diabetes cuando uno o más de los siguientes criterios están presentes:

- Niveles de glucosa en plasma en ayunas (FPG) ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l), considerando ayuno la no ingesta calórica durante, al menos, 8 horas.
- Nivel de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) medidos 2 horas después de una carga de glucosa oral de 1.75g por kg de peso (dosis máxima 75g), mediante test de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).
- Nivel de hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol), medida según el ensayo certificado por el Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina (NGSP) (Little and Rohlfing, 2013). Esta prueba mide el nivel medio de glucosa en sangre durante los últimos 3 meses.
- En pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, niveles de glucosa en plasma aleatoria ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/l) .

El cuadro clínico clásico de un paciente con diabetes tipo 1 consiste principalmente en una sed excesiva (polidipsia), micción frecuente (poliuria) y una pérdida repentina de peso.

Los síntomas típicos de la T1D se detallan en la Figura 1.



Figura 1: Síntomas frecuentes de la diabetes tipo 1. Figura extraída y modificada (International Diabetes Federation., 2019).

Por tanto, la enfermedad es diagnosticada cuando existe una concentración elevada de glucosa en sangre en presencia de alguno (o todos) los síntomas que se muestran en la Figura 1. Sin embargo, no siempre es fácil diagnosticar el tipo de diabetes y es necesario realizar otros análisis adicionales como presencia en sangre de autoanticuerpos contra antígenos de los islotes, niveles de péptido C en sangre, etc.

1.2. Epidemiología

La diabetes tipo 1 representa el 5-10% de todos los casos de diabetes mellitus. Actualmente, a nivel global, el número de casos de diabetes tipo 1 entre niños y adolescentes (0-19 años) es de 1 millón y se registran 128.900 nuevos casos cada año (International Diabetes Federation., 2019).

La mayoría de las enfermedades autoinmunes afectan más a mujeres que a hombres, sin embargo esto no ocurre en la diabetes autoinmune. En la población joven, ambos sexos están de igual manera afectados por la enfermedad. Sin embargo, se observa un patrón diferente en las regiones que tienen una mayor incidencia de diabetes (15/100.000), como Finlandia o Cerdeña, con una mayor incidencia por parte del género masculino (68%). Mientras que en las regiones con una menor incidencia de la enfermedad (6.5/100.000), como Israel o Polonia, es el género femenino el que muestra una tasa mayor (88%) (Green et al., 1992; Karvonen et al., 1997).

La incidencia de la enfermedad está sujeta a diversas variaciones geográficas (Figura 2): Finlandia, Canadá o Noruega tienen las tasas más altas, con más de 24 casos nuevos por cada 100.000 personas al año, mientras que en países como China o Venezuela se han descrito las tasas más bajas (menos de 1.5 casos por cada 100.000/año). En Italia, hay una única región -Cerdeña- donde se registra una tasa de incidencia tres veces mayor que en otras partes del país (37.8 casos por cada 100.000/año) (Patterson et al., 2014). En España, con una incidencia intermedia, se contabilizan entre 14 y 24 casos anuales por cada 100.000 habitantes (Borchers et al., 2010).

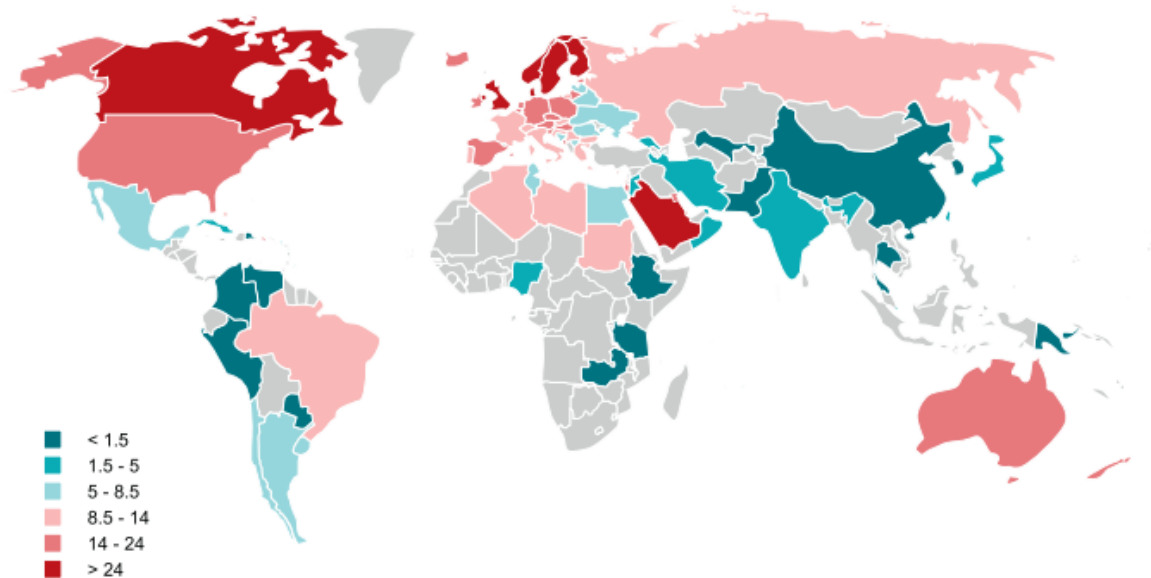


Figura 2: Mapa que muestra las tasas de incidencia de la diabetes tipo 1 en 88 países. La incidencia se expresa por cada 100.000 habitantes/año (Patterson et al., 2014).

Además, la incidencia de la enfermedad también varía por grupos de edad. El inicio tiene lugar normalmente antes de los 30 años, sobre todo en la pubertad (10-14 años), ocurriendo antes en chicas que en chicos.

1.3. Etiología

La diabetes tipo 1 se desarrolla como consecuencia de la combinación de diversos factores: predisposición genética, factores ambientales y epigenéticos (Figura 3).

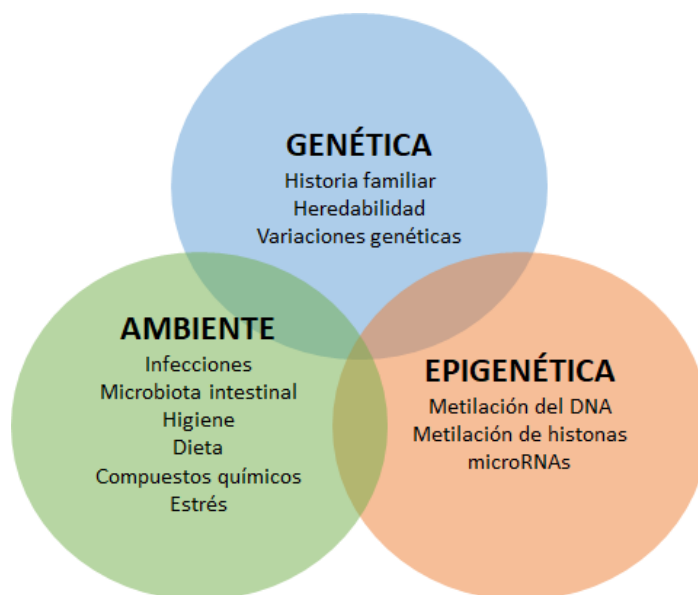


Figura 3. Interacción entre genes, ambiente y epigenética en la diabetes tipo 1. La T1D es una enfermedad multifactorial que se desarrolla como consecuencia de la combinación de factores genéticos (historia familiar, heredabilidad...), ambientales (dieta, infecciones...) y epigenéticos. Figura extraída y adaptada (Jerram et al., 2017).

1.3.1. Factores genéticos

El desarrollo de la T1D está determinado, entre otros factores, por la predisposición genética, tal y como se ha observado en estudios con gemelos monozigóticos y casos familiares de diabetes (Borchers et al., 2010). Por ejemplo, las personas con un pariente de primer grado afectado con diabetes tipo 1 tienen una probabilidad de 1 entre 20 de desarrollar la enfermedad, comparado con el riesgo de la población general que es de 1 entre 300 (Redondo and Eisenbarth, 2002).

En el estudio GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) se identificaron más de 40 loci en el genoma que afectan a la susceptibilidad a la enfermedad (IDDM) (Barrett et al., 2009). Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) explican un 50% de la agregación familiar en la diabetes tipo 1.

IDDM1

El locus de mayor riesgo, IDDM1, está asociado con la región HLA en el cromosoma 6p21 (Figura 4). En particular, el complejo HLA de clase II (DP, DQ y DR) contribuye con un 40% el riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 (Maahs et al., 2010). Los haplotipos con un mayor riesgo son DRB1*0401-DQA1*0301-DQB1*0302 (también llamado DQ8) y DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (también llamado DQ2). Casi un 90% de los pacientes con

1.3.2. Factores ambientales

Tal y como se ha mencionado anteriormente, existe una gran variabilidad entre países en la incidencia de la enfermedad. Además, se ha demostrado que se produce un aumento de esta en poblaciones que se han trasladado de una región con poca incidencia a otra región con una incidencia mayor (Åkerblom and Knip, 1998). Todo ello evidencia la influencia de factores externos en la patogénesis de la enfermedad.

1.3.2.1. Infecciones

Las infecciones microbianas son capaces de inducir respuestas inmunes específicas y autoinmunidad. En este sentido, los virus, como los enterovirus, pueden ser una causa potencial para el desarrollo de la T1D (Rodríguez-Calvo, 2019; Yeung et al., 2011). Otros virus como citomegalovirus (Osame et al., 2007), rotavirus (Honeyman et al., 2014) o el virus de la rubeola (Burgess and Forrest, 2009) también han sido frecuentemente asociados con el inicio de la enfermedad. Aunque el mecanismo que llevan a cabo se desconoce y existen datos heterogéneos y, a veces, contradictorios en la literatura (Coppieters et al., 2012; Rodríguez-Calvo et al., 2016), se han propuesto varias hipótesis:

- **Mimetismo molecular entre antígenos microbianos y antígenos del huésped.** Un ejemplo de mimetismo molecular es el virus coxsackie B4 (CB4V). En las células β , hay una gran expresión de receptores de virus coxsackie, lo cual puede facilitar la infección y contribuir a una mayor persistencia viral (Roep, 2019). Existe una similitud molecular entre la proteína P2C de este virus y el antígeno GAD65 de islote pancreático (Atkinson et al., 1994; Oldstone, 1998).
- **Propagación del epítipo: mecanismo relacionado con infecciones virales.** Una respuesta iniciada contra un autoantígeno puede provocar la liberación de otros antígenos tisulares, activando linfocitos específicos. Conforme evoluciona la respuesta, se observa la aparición de respuestas contra autoantígenos no presentes al inicio, dando lugar a un estado inflamatorio crónico. Este fenómeno explica por qué la enfermedad autoinmune una vez iniciada, puede prolongarse y perpetuarse (Abbas and Lichtman, 2004; Alba et al., 2005).

- Linfocitos T que expresan dos TCRs con especificidades diferentes (Padovan et al., 1995). Aunque no es lo habitual, esto puede suceder debido al reordenamiento de genes de ambos alelos, y supone un riesgo potencial para el desarrollo de la autoinmunidad. Estos linfocitos T con especificidades para autoantígenos y para antígenos virales, pueden responder a antígenos propios cuando se activan durante una infección viral (Alba et al., 2005).
- Asociación entre infecciones virales del tracto respiratorio al inicio de la vida y daños en las células beta, autoinmunidad y desarrollo de diabetes tipo 1, años más tarde, en personas con alto riesgo genético de T1D, probablemente por la intervención de factores genéticos de susceptibilidad (Rasmussen et al., 2011; Beyerlein et al., 2017).

Otros hechos que pueden confirmar esta asociación entre virus y diabetes tipo 1 sería la incidencia estacional de la enfermedad, que coincide con otoño e invierno (Adams, 1926; Maugh, 1975) y la presencia de virus (especialmente coxsackie) en pacientes de T1D recientemente diagnosticados (Banatvala et al., 1985; Rewers and Ludvigsson, 2016).

Contrariamente al papel negativo que desempeñan los virus en humanos, estos pueden tener un efecto positivo en el modelo de ratón NOD (*Non-Obese Diabetic*), el cual presenta características similares a los humanos predispuestos genéticamente a la enfermedad. Se observó que si se inoculaba el virus coxsackie (Tracy et al., 2002) o el herpesvirus (Smith et al., 2007) en ratones NOD jóvenes, desarrollaban una protección a la T1D, reduciendo o retrasando su inicio.

1.3.2.2. Microbiota intestinal

Diversos estudios han demostrado que la microbiota intestinal contribuye al riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 en personas que tienen predisposición genética. Factores como la dieta, el exceso de higiene o los antibióticos influyen a su vez en la composición del microbioma, el cual interacciona con el sistema inmune, moldeándolo. El microbioma también afecta a la permeabilidad intestinal ya que un incremento de la misma ayuda a la entrada de antígenos potencialmente diabetogénicos, lo cual podría suponer el inicio de la autoinmunidad (Figura 5) (Gülden et al., 2015).

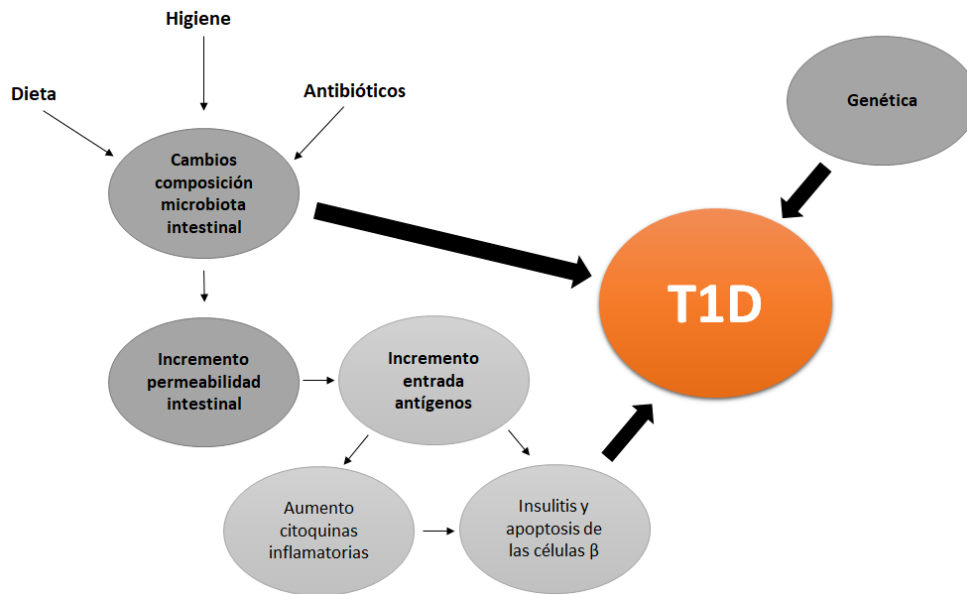


Figura 5. Papel de la microbiota en el riesgo de desarrollar diabetes en individuos genéticamente predispuestos. T1D es una enfermedad multifactorial. La mayoría de los factores ambientales influyen en la composición de la microbiota intestinal, la cual está en estrecha relación con el sistema inmune. Además, la composición también afecta a la permeabilidad intestinal. (Figura extraída y adaptada de Gülden et al., 2015; Jakobsen and Szere day, 2018).

Los pacientes diabéticos de tipo 1 tienen un microbioma intestinal menos estable y menos diverso, en comparación con individuos sanos (Brown et al., 2011; Giongo et al., 2011). En los ratones NOD, el hecho de que la incidencia de diabetes esté influenciada por el ambiente microbiano de las condiciones de estabulación sugiere que la microbiota tiene una función clave en el desarrollo de la enfermedad (Pozzilli et al., 1993). Se realizaron estudios en los cuales se observó que la transmisión de una microbiota sana puede retrasar o incluso frenar el desarrollo de la diabetes (Wen et al., 2008). También se ha evidenciado la relación entre la microbiota y el desarrollo de enfermedades autoinmunes en los efectos metabólicos del trasplante de microbiota fecal (FMT) (Peng et al., 2014).

1.3.2.3. Macrobiota

Se observó que la infección con helmintos (*Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Litomosoides sigmodontis* y *Dirofilaria immitis*) podía prevenir el inicio de la diabetes tipo 1 en ratones NOD si esta infección se producía aproximadamente a las 4 semanas de edad (Cooke et al., 1999). Aunque el mecanismo por el cual se producía esta prevención a la enfermedad tras la infección con helmintos no estaba claro, se observó que esta protección estaba asociada a un cambio hacia una respuesta de tipo Th2, tal y como demostraban la

producción de citoquinas y anticuerpos, y el aumento de células T reguladoras CD4 (+) CD25 (+) FoxP3 (+) (Hübner et al., 2009). Sin embargo, es necesaria una mayor investigación sobre los mecanismos que se llevan a cabo en las infecciones por helmintos y en la modulación que realizan en el inicio de la diabetes, para poder identificar nuevas dianas en la prevención de la enfermedad (Zaccone and Cooke, 2013).

1.3.2.4. Hipótesis de la higiene

La hipótesis de la higiene postula que el incremento en la incidencia de enfermedades autoinmunes y alergias es consecuencia de una disminución de infecciones durante la infancia por una mejora en los hábitos de higiene (Bach, 2002). Se observó que los ratones NOD desarrollan diabetes autoinmune de forma espontánea con unas tasas de incidencia altas cuando están estabulados en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), pero dicha incidencia disminuye considerablemente cuando se encuentran en condiciones convencionales de estabulario (Bach, 2018). Se llevaron a cabo distintas aproximaciones para demostrar la relación causal entre la higiene y el desarrollo de la autoinmunidad, como la administración de bacterias comensales para prevenir el desarrollo de la enfermedad. La administración de probióticos antes del inicio de la diabetes era capaz de prevenir las manifestaciones de la enfermedad (Calcinaro et al., 2005; Matsuzaki et al., 1997).

1.3.2.5. Factores dietéticos

Existen diversos factores dietéticos que se han asociado con el desarrollo de la diabetes autoinmune. Se observó que el amamantamiento podía estar reduciendo el riesgo de diabetes tipo 1 mediante la protección contra infecciones a través de anticuerpos secretores de inmunoglobulina A (Juto, 1985) y la mejora de la respuesta inmune del niño mediante el incremento de la proliferación de células β . Además de proteger contra una respuesta inmune anormal frente a nuevos antígenos en un intestino inmaduro, favorecía la exposición tardía a antígenos extraños de la leche (Frederiksen et al., 2013). Sin embargo, el consumo de leche de vaca en la infancia muestra resultados contradictorios, ya que se observó una disminución del riesgo de padecer diabetes tipo 1 (Rosenbauer et al., 2008), mientras que otros estudios mostraban un incremento del riesgo de autoinmunidad y de desarrollo de la enfermedad (Virtanen et al., 2012, 2000).

Por otro lado, la suplementación con vitamina D al inicio de la vida mostraba un efecto protector, disminuyendo el riesgo de sufrir diabetes años más tarde (Danescu et al., 2009; Hyppönen et al., 2001) y preservando la función de las células β (Li et al., 2009), aunque todavía no hay evidencias suficientes para considerar la vitamina D como una potencial herramienta de prevención.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga influyen en las respuestas inflamatorias, de tal forma que un déficit de ácidos grasos omega-3 puede dar lugar a reacciones inflamatorias. Se observó que un aumento en el consumo de omega-3 en la infancia podía reducir el riesgo de autoinmunidad en niños con predisposición genética a la diabetes autoinmune (Norris et al., 2007).

1.3.2.6. Compuestos químicos

Los mecanismos autoinmunes también pueden desencadenarse debido a toxinas en la comida o el agua que consumimos, sobre todo en aquellos individuos con predisposición genética, provocando la muerte celular de los islotes pancreáticos. Aunque la relación con estas toxinas -nitratos, nitritos y nitrosaminas- todavía no está clara, diversos estudios han mostrado una conexión entre la diabetes tipo 1 y estos compuestos (Benson et al., 2010; Samuelsson et al., 2011).

1.3.2.7. Estrés de la célula beta

Existen una serie de factores que causan un incremento en la demanda de insulina (crecimiento, sobrepeso, pubertad, infecciones, etc.) que podrían tener un papel importante en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Un estrés prolongado del retículo endoplásmico perjudica la síntesis de insulina, provocando apoptosis de la célula β pancreática (Cnop et al., 2012). Se ha observado que, en condiciones de altos niveles de estrés celular, las células β no producen insulina de forma óptima y generan autoantígenos llamados HIP (del inglés, *Hybrid Insulin Peptides*), que son responsables de la pérdida de autotolerancia en la diabetes tipo 1 (DeLong et al., 2016).

1.3.3. Factores epigenéticos

La epigenética se define como cambios heredables en la expresión génica que no alteran la secuencia del DNA (Van Speybroeck, 2002). Las variaciones epigenéticas contribuyen al

desarrollo de muchas enfermedades, incluida la diabetes tipo 1 (Jerram et al., 2017). Estudios recientes en islotes pancreáticos humanos han mostrado enriquecimientos en metilaciones del DNA (mQTL, del inglés *methylation quantitative trait loci*) en genes relacionados con la diabetes autoinmune como HLA, INS o PTPN2, lo cual sugiere un papel relevante de los factores epigenéticos en el desarrollo de la enfermedad, mediante la modificación de la expresión génica y la función de los islotes pancreáticos (Olsson et al., 2014). La importancia de la modificación epigenética del DNA mediante metilación en respuesta a estresores inmunológicos también se analizó en el modelo de ratón NOD. Observaron que estas modificaciones podían ser un mecanismo que estuviera afectando a la expresión de la insulina durante la progresión de la T1D (Rui et al., 2016).

Además, también se ha observado que la inhibición de las histonas desacetilasas reduce la apoptosis producida por citoquinas en las células β pancreáticas, asegurando su bienestar y restaurando la secreción de insulina (Chou et al., 2012). Se utilizó para ello un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) denominado tricostatina A (TSA), en modelo de ratón NOD (Jayaraman, 2018; Peng et al., 2014). Esta modulación epigenética mediante el tratamiento con TSA puede impactar en el proceso de diabetogénesis inhibiendo las células efectoras y/o facilitando la neogénesis de las células beta, es decir, la generación de células beta a partir de precursores poco diferenciados (Figura 6).

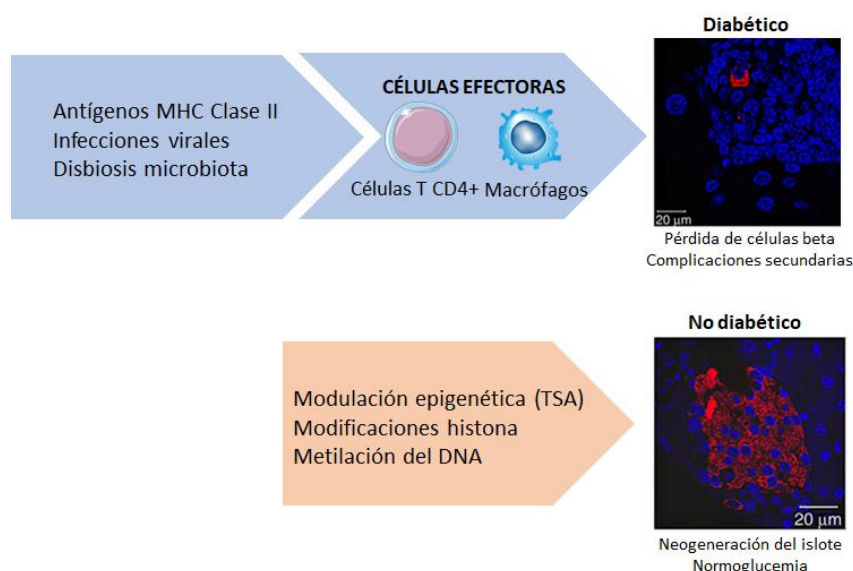


Figura 6: Modelo de los factores que influyen en el desarrollo de la diabetes tipo 1 y mecanismos epigenéticos para su bloqueo mediante tratamiento con TSA. La diabetes autoinmune está influenciada por factores genéticos y ambientales. Los linfocitos T CD4+ activan macrófagos para destruir las células β , que contienen insulina (gránulos rojos en la imagen de microscopía confocal). La modulación epigenética mediante TSA puede impactar en la diabetogénesis facilitando la neogénesis de células β . Existen otros mecanismos epigenéticos como metilación del DNA para prevenir la diabetes. (Figura extraída y adaptada de Jayaraman, 2018).

1.4. Patogénesis de la T1D

Para que se desarrolle la diabetes autoinmune se tienen que dar tres requisitos (Wållberg and Cooke, 2013):

- Los linfocitos se activan para responder frente a las células β pancreáticas.
- La respuesta generada presenta fuertes características proinflamatorias.
- El control regulatorio de las respuestas autoinmunes falla, cronificando la respuesta y desencadenando la destrucción de las células β , lo cual desemboca en T1D.

El inicio y la progresión de la destrucción de las células β pancreáticas todavía no es clara, aunque existen numerosos estudios en modelos animales de T1D que han ayudado a dilucidar los mecanismos que se llevan a cabo en la patogénesis de la enfermedad. Las células β de los islotes pancreáticos liberan autoantígenos que son capturados y presentados por las células presentadoras de antígenos (APCs) -células dendríticas (DCs) o macrófagos- a los linfocitos T CD4+ y CD8+. Éstos se activan en los ganglios linfáticos regionales, proliferan y migran al páncreas. Estas células son esenciales para el desarrollo de la T1D (Christianson et al., 1993).

En condiciones normales, los antígenos serían presentados en el timo y la tolerancia central provocaría anergia o deleción de los linfocitos T autorreactivos, evitando la generación de la respuesta autoinmune. Sin embargo, en los pacientes diabéticos, se produce una desregulación de la tolerancia central, de forma que falla la selección tímica y los linfocitos T autorreactivos escapan sin ser eliminados. Esto puede suceder, por un lado, porque los TCR de los linfocitos T autorreactivos son seleccionados como resultado de una señal de baja afinidad o, por otro lado, porque los antígenos no han sido presentados en el timo (debido a modificaciones postranscripcionales) y llegan a la periferia donde son reconocidos por los linfocitos T (Marrack and Kappler, 2012).

Nuestro sistema inmune adaptativo es el encargado de reorganizar los receptores de los linfocitos de forma aleatoria para generar un repertorio que sea capaz de actuar frente a distintos patógenos. Una de las consecuencias de este proceso es la generación de linfocitos autorreactivos que reconocen elementos de nuestras células como patogénicos (Nagata and Tanaka, 2017).

1.4.1. Papel de los linfocitos T

En la T1D, los linfocitos T CD4+ y CD8+ son los mayores efectores de la respuesta autoinmune dirigida contra las células β pancreáticas. Ambos son necesarios para que se desarrolle la enfermedad ya que provocan la muerte de forma directa e indirecta de las células β (Di Lorenzo et al., 2007).

El fenotipo más abundante que adquieren en la T1D es el de los linfocitos Th1 (Yoon and Jun, 2005), produciendo grandes cantidades de IFN- γ , fomentando así la respuesta inflamatoria y generando respuesta contra los islotes. Esta respuesta aumenta la expresión de MHC de clase I y II, provocando la activación de los macrófagos inactivos, que a su vez secretan citoquinas como IL-1 β y TNF- α , y radicales libres, que son tóxicos para la célula β (Wen et al., 2011). Al inicio, los linfocitos rodean el islote pancreático provocando peri-insulinitis y posteriormente, entran en el islote. La lesión inflamatoria que consiste en la infiltración de células inmunes en los islotes de Langerhans se denomina insulinitis y es un marcador patológico de la T1D (Martinov and Fife, 2019; Pugliese, 2016).

Otro fenotipo adquirido por los linfocitos T, es el de las células T *helper* foliculares (T_{FH}), que son necesarias para la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B contra los antígenos de las células β . La detección de estos anticuerpos en sangre es un biomarcador de la T1D, tal y como postulan estudios recientes (Viisanen et al., 2017).

Una vez activados los linfocitos T CD4+, inducen la destrucción de las células β mediante la activación de los linfocitos T CD8+, que migran a los islotes inflamados, liberando perforina y granzima. Se ha evidenciado el papel de los linfocitos T CD8+ autorreactivos en el desarrollo de la enfermedad mediante estudios histológicos de pacientes recientemente diagnosticados en los que observaron la presencia de infiltración linfocítica de CD8+ (Hänninen et al., 1992). Además, los linfocitos T CD4+ son capaces de convertirse en células citotóxicas (CTL) que pueden eliminar a las células β a través de la inducción de FAS por citoquinas proinflamatorias (Wen et al., 2011). En ratones NOD, se ha visto que la depleción de linfocitos T CD4+ (Mora et al., 1999) y linfocitos T CD8+ (Phillips et al., 2009) así como la inhibición de IFN- γ (Campbell et al., 1991) retrasa o incluso evita el desarrollo de la enfermedad.

1.4.2. Papel de los linfocitos B

Los linfocitos B producen anticuerpos y tienen gran importancia en la T1D porque, al igual que las células dendríticas y los macrófagos, son células presentadoras de antígenos y son necesarias para la progresión de la insulinitis (Silveira et al., 2007; Wong et al., 2004). El papel de los linfocitos B como APCs en la diabetes autoinmune se ha confirmado en estudios realizados en ratones NOD, en los cuales se eliminaban las moléculas MHC de estas células y esto evitaba el desarrollo de la enfermedad (Noorchashm et al., 1999). Estudios recientes han demostrado que los autoanticuerpos funcionan como biomarcadores para la T1D y, además, contribuyen a la predicción del riesgo de padecer la enfermedad (Jia et al., 2020). El esquema global de los mecanismos involucrados en la destrucción de las células β así como los factores que intervienen en la patogénesis de la T1D se detalla en la Figura 7.

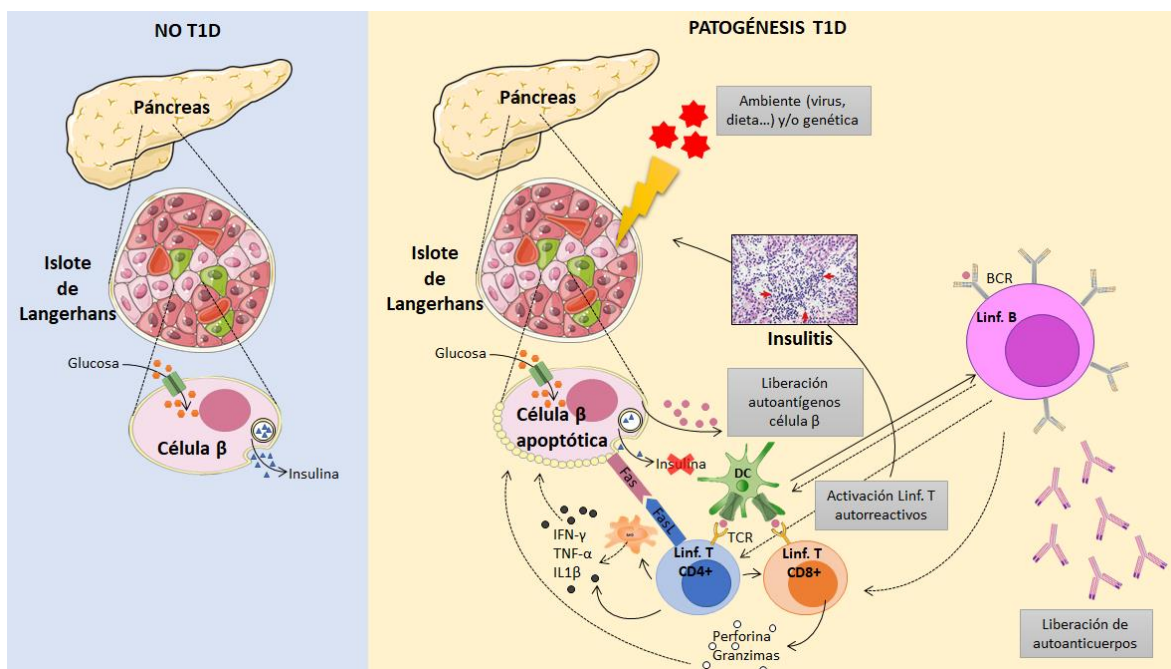


Figura 7. Esquema de las células y factores involucrados en la patogénesis de la T1D. En la destrucción de las células beta pancreáticas están implicados los linfocitos T CD4+ y CD8+, los macrófagos inflamatorios y los linfocitos B, favoreciendo la inflamación y la insulinitis o infiltración linfocítica de los islotes (Katsarou et al., 2017). Los linfocitos T CD8+ liberan perforinas y granzimas, que contribuyen a la apoptosis de la célula β . Se produce también una secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos (IL1 β y TNF- α) y los linfocitos T CD4+ (IFN- γ , IL1 β y TNF- α), que inducen expresión de Fas en la célula beta. Los linfocitos activados expresan FasL y todo esto desemboca en la apoptosis de las células beta. Los linfocitos B secretan autoanticuerpos y presentan los antígenos de la célula beta a los linfocitos T, para potenciar su activación. (Figura original de la autora, creada con Servier Medical Art).

1.5. Estadios de la T1D

La T1D se divide en tres etapas (Figura 8), todas ellas comparten la presencia de autoanticuerpos y pérdida de masa beta progresiva. Estos autoanticuerpos van dirigidos contra tres autoantígenos principales: insulina, GAD65 y antitirosina fosfatasa (IA-2). En la primera fase todavía no se observa hiperglucemia (exceso de glucosa en sangre) ni síntomas asociados, la segunda fase se caracteriza por la presencia de hiperglucemia y en la tercera fase tienen lugar los síntomas agudos, como poliuria o sed excesiva (Katsarou et al., 2017). Aunque el marcador patológico clásico es la insulinitis o infiltración linfocítica de los islotes pancreáticos, los autoanticuerpos y su detección como biomarcadores de la fase presintomática de la enfermedad resultan de gran ayuda para el abordaje de la patogénesis de la T1D (American Diabetes Association, 2008). El hecho de tener dos o más autoanticuerpos dirigidos a antígenos de la célula β es un factor que predispone para el progreso a la fase sintomática (Insel et al., 2015).

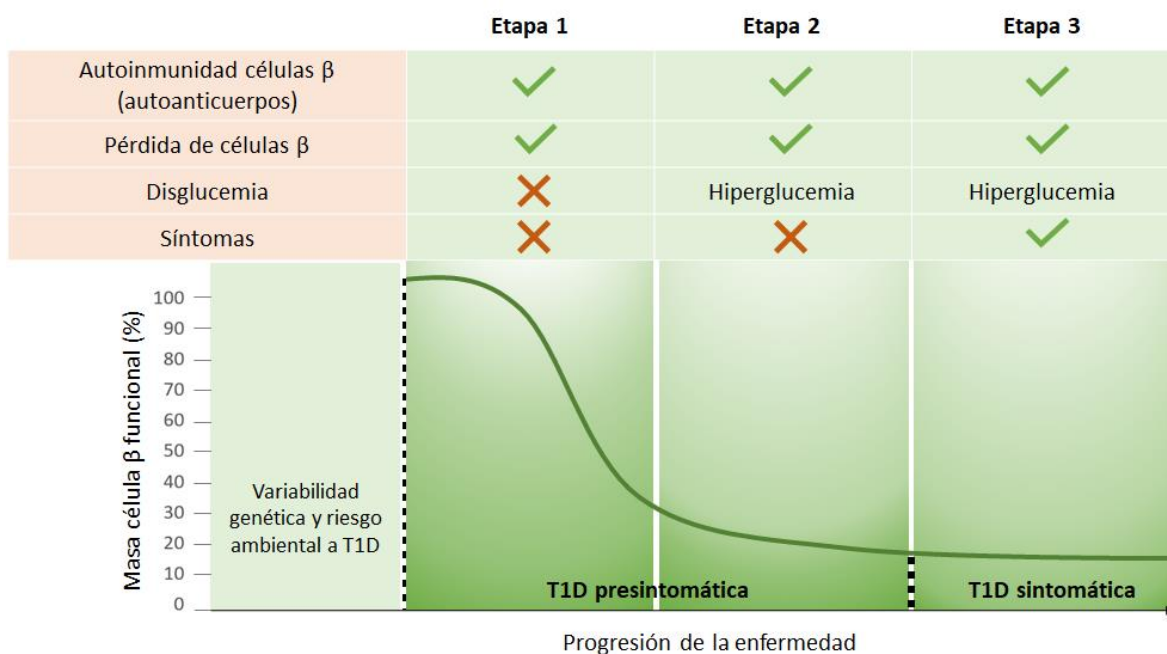


Figura 8. Estadios de la T1D. La enfermedad se puede dividir en tres etapas: la primera está caracterizada por la presencia de autoanticuerpos; en la segunda existen autoanticuerpos e hiperglucemia y los síntomas aparecen en la tercera etapa. (Figura extraída y adaptada de Katsarou et al., 2017).

2. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA VS. AUTOTOLERANCIA

El cuerpo humano está continuamente expuesto a microorganismos y agentes patógenos. El sistema inmune es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citoquinas, cuya función principal es proteger al cuerpo a través de una serie de mecanismos de defensa que evitan el avance de estas infecciones (Parkin and Cohen, 2001). Esta respuesta coordinada y conjunta por parte del organismo frente a sustancias exógenas se denomina respuesta inmunitaria (Abbas and Lichtman, 2004).

Se define tolerancia inmunológica a un antígeno específico como la ausencia de respuesta a dicho antígeno debido a mecanismos programados de no reacción. La tolerancia periférica es la capacidad de bloquear la activación de los linfocitos maduros autorreactivos de forma que no puedan producir una respuesta inmune contra un antígeno concreto.

Es un fenómeno inmunológicamente específico que se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos como la apoptosis (delección clonal), la falta de respuesta o anergia (inactivación sin muerte celular, ausencia de coestimulación antigénica), la ignorancia (los linfocitos T no detectan las células propias de forma adecuada, debido a barreras anatómicas o bien porque las células de los tejidos periféricos no expresan moléculas MHC II, necesarias para el reconocimiento de antígenos) y la supresión de la activación linfocítica (Figura 9).

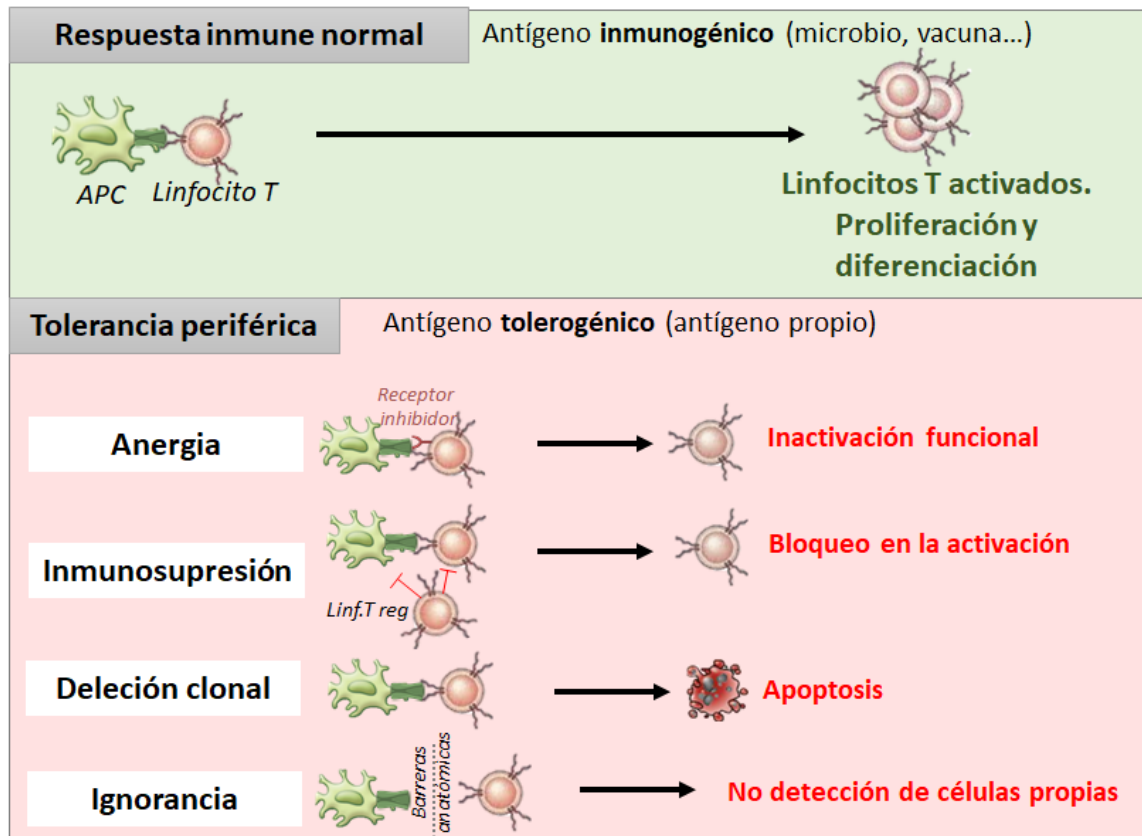


Figura 9: Comparación entre respuesta inmunitaria normal y tolerancia inmunológica. Mecanismos de la tolerancia periférica de los linfocitos T. En una respuesta inmune normal se produce la proliferación y diferenciación de los linfocitos. Sin embargo, cuando un antígeno tolerogénico se encuentra con un linfocito, se producen diferentes mecanismos para evitar la activación de los linfocitos autorreactivos en la periferia como la anergia, la inmunosupresión, la deleción clonal o la ignorancia. (Figura extraída y modificada de Abbas and Lichtman, 2004).

La autotolerancia es la tolerancia fisiológica frente a antígenos propios o autoantígenos, un estado del sistema inmune mediante el cual los individuos no responden a los antígenos propios en condiciones normales. Hay una serie de mecanismos que se encargan del mantenimiento de la autotolerancia en los linfocitos B y T. Cuando estos mecanismos son insuficientes, se desarrolla la autoinmunidad (Abbas and Lichtman, 2004).

2.1. Autoinmunidad

El término autoinmunidad fue inicialmente acuñado por Paul Ehrlich a principios del siglo XX como “horror autotóxico” y se define como una respuesta inmune que produce una reacción contra un antígeno propio. Los elementos clave en este proceso son el reconocimiento de antígenos propios por linfocitos autorreactivos, su activación, y la lesión de los tejidos debido a los linfocitos activados (o efectores) y sus productos (Abbas and Lichtman, 2004).

La autoinmunidad está mediada por una gran variedad de mecanismos celulares y moleculares y es el resultado de múltiples factores, tanto genéticos (complejo mayor de histocompatibilidad, etc.) como ambientales (infecciones, microbioma, etc.) (Figura 10). La combinación de estos factores crea un fenómeno denominado “mosaico de autoinmunidad” que escapa de los mecanismos de tolerancia provocando la pérdida de la autotolerancia y dando lugar al desarrollo de la autoinmunidad (Temajo and Howard, 2014).

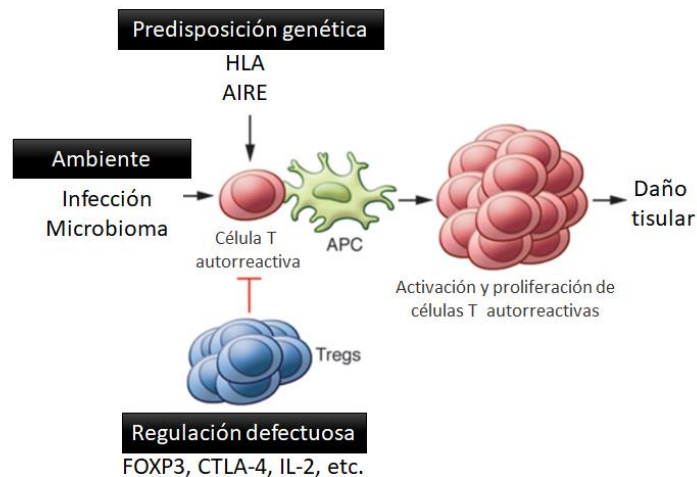


Figura 10: Factores que influyen en el inicio de la autoinmunidad. La susceptibilidad genética como polimorfismos genéticos, los estímulos ambientales como las infecciones o el microbioma y defectos en la regulación los Tregs (anulando su capacidad supresora de linfocitos T autoreactivos) pueden contribuir a la activación y proliferación de linfocitos T autorreactivos, provocando un daño tisular. Figura extraída y adaptada (Rosenblum et al., 2015).

2.1.1. Enfermedades autoinmunes

Las manifestaciones de la autoinmunidad se denominan enfermedades autoinmunes (AIDs, por sus siglas en inglés), y representan un conjunto de diferentes enfermedades que presentan síntomas, ubicaciones y patomecanismos distintos. Sin embargo, en todas ellas, la patología se produce como consecuencia de un fallo en los mecanismos de autotolerancia. La mayoría son multifactoriales, con una compleja etiología y patogénesis que engloba variables tanto genéticas como ambientales (Nagy, 2014).

Otra de las características que es compartida por la mayoría de estas condiciones es la predominancia en el sexo femenino. En enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjogren o el lupus eritomatoso sistémico, más del 80% de los pacientes son mujeres. A pesar de las numerosas hipótesis basadas en la importancia de las hormonas sexuales, el microquimerismo fetal o el papel de los cromosomas sexuales, la causa exacta de esta predisposición todavía es desconocida (Moroni et al., 2012).

Aunque en este trabajo nos centraremos en la T1D, hay más de 80 enfermedades autoinmunes conocidas. Se clasifican en dos grupos, en función de si el efecto es órgano-específico o sistémico. En el primer grupo, la respuesta inmune reacciona específicamente contra autoantígenos que se encuentran en un órgano específico, como ocurre en la diabetes tipo 1 o en la esclerosis múltiple. Sin embargo, las enfermedades autoinmunes sistémicas, como la artritis reumatoide o la psoriasis, atacan a múltiples órganos debido a la distribución sistémica de los autoantígenos diana (Temajo and Howard, 2014).

En la Tabla 1 se detallan ejemplos de distintas enfermedades autoinmunes:

Enfermedad	Autoantígeno	Consecuencias	Modelos animales
Diabetes Mellitus Tipo 1	Antígenos de las células β -pancreáticas	Inflamación islotes pancreáticos; diabetes	Ratón NOD; rata BB
Artritis reumatoide	Factor reumatoide de clase IgM	Artritis y manifestaciones asociadas	Artritis inducida por colágeno
Esclerosis múltiple	Proteína básica de la mielina	Inflamación progresiva del Sistema Nervioso Central y parálisis	EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis)
Enfermedad de Graves	Receptor de TSH	Hipertiroidismo	EAT (experimental autoimmune thyroiditis)
Lupus eritematoso sistémico	Ácidos nucleicos	Glomerulonefritis, lesiones en la piel, artritis	MRL-Fas ^{lpr} , BWF1, BXSB, NZM2410
Miastenia Grave	Receptor de la acetilcolina	Debilidad muscular, parálisis	EAMG (experimental autoimmune myasthenia gravis)
Anemia hemolítica autoinmunitaria	Proteínas de la membrana eritrocítica	Hemólisis y anèmia	NZB

Tabla 1: Ejemplos de enfermedades autoinmunes. Clasificación, mecanismos y ejemplos de modelos animales utilizados para el estudio de cada enfermedad. (Tabla extraída y adaptada de Abbas and Lichtman, 2004 y Kono and Theofilopoulos, 2017).

3. TRATAMIENTO Y TERAPIAS DE LA T1D

El descubrimiento de la insulina por Frederick Banting y Charles Best convirtió la T1D de una enfermedad fatal a crónica, cuyas consecuencias podían tratarse mediante la administración de insulina exógena (Banting et al., 1991). Aunque éste sigue siendo el tratamiento de referencia para la diabetes autoinmune, se han realizado muchos avances tanto en tecnología como en la comprensión de la patogénesis de la enfermedad, que han

dado lugar a innovaciones terapéuticas y terapias farmacológicas emergentes para mejorar el control de la glucosa y prevenir la enfermedad.

3.1. Tratamiento con insulina exógena

Actualmente, la administración exógena de insulina es la principal opción terapéutica para la T1D. Los niveles de glucosa en sangre se monitorizan y la insulina se administra mediante inyecciones o con una bomba. Por un lado, las inyecciones son más baratas y fáciles de usar, pero los pinchazos son muy frecuentes y además, se pueden dar situaciones de hipoglucemia. Por otro lado, las bombas liberan la insulina de una forma más precisa que las inyecciones pero son más caras y pueden causar ganancia de peso y cetoacidosis diabética (American Diabetes Association, 2008).

Las estrategias terapéuticas en las cuales la información de monitorización de glucosa y la liberación de insulina están ligadas, reducen el riesgo de hipoglucemia y suponen un sistema más efectivo de respuesta a glucosa (Bakh et al., 2017). Por ello, existen sistemas de liberación de insulina artificiales que imitan de forma inteligente las funciones pancreáticas y consiguen una administración autorregulada de la insulina (Yu et al., 2016). El problema de estos sistemas radica en la capacidad limitada de carga de insulina. Por este motivo, están desarrollando parches transdérmicos con microagujas cargadas con insulina y una matriz polimérica sensible a glucosa, aunque hasta el momento sólo han sido probado en ratones y minicerdos (Jicheng Yu et al., 2020).

3.2. Terapias de regeneración

3.2.1. Trasplantes

Los trasplantes suponen una solución para los pacientes diabéticos con la desventaja de un requisito fundamental para ello como es la inmunosupresión, para evitar un ataque autoinmune contra el injerto. El trasplante de células β puede venir de la mano de un trasplante de páncreas, de islotes o de células β que hayan sido generadas *in vitro*. La existencia de la amenaza inmunológica de autoinmunidad de por vida hace necesaria la coordinación entre la regeneración de la masa β y una inmunoterapia que suprima la persistente autoinmunidad.

3.2.2. Proliferación endógena de células beta funcionales

Una solución alternativa para evitar la inmunosupresión consistiría en la generación de células productoras de insulina, por ejemplo, a partir de células mesenquimales que son capaces de desarrollar hepatocitos que producen insulina (Beikmohammadi et al., 2019) o bien, a partir de células α expuestas a *glucagón-like péptido 1* (GLP1) (Zhang et al., 2019) o a factores de transcripción como Pdx1 y MafA (Xiao et al., 2018). El tipo celular aplicable tiene que ser sensible a la glucosa y regulable, ya que la secreción incontrolada de insulina es letal.

3.3. Inmunoterapias

3.3.1. Terapias dirigidas a linfocitos T

Se han desarrollado terapias anti-CD3, como el teplizumab, que es una forma humanizada del anticuerpo con un receptor humano Fc mutado que disminuía la activación de los linfocitos T y la inmunogenicidad. La inducción de tolerancia mediante anticuerpos monoclonales anti-CD3 está relacionada con la inducción de Tregs que controlan las respuestas autoinmunes patogénicas.

La unión de anti-CD3 al complejo CD3/TCR da lugar a una modulación antigénica (desaparición de CD3/TCR de la superficie de las células por desprendimiento o internalización, haciendo que los linfocitos T sean ciegos a su antígeno afín). Esta unión de anti-CD3 con CD3/TCR también puede provocar anergia o apoptosis en los linfocitos T. Por un lado, la modulación antigénica y la anergia hacen que los linfocitos sean ignorantes del antígeno, dando lugar a una inmunosupresión transitoria. Por otro lado, la tolerancia inducida por anti-CD3 depende de la apoptosis. Los linfocitos T apoptóticos y los macrófagos producen TGF- β , promoviendo un microambiente tolerogénico. La expresión de TGF- β puede a su vez inducir FoxP3 en células T CD4+, haciéndolas supresoras y provocando la inhibición de las células T efectoras, generando así un fenotipo tolerogénico (Kuhn and Weiner, 2016). El problema del tratamiento era que se iniciaba cuando la masa beta ya era muy insuficiente (Herold et al., 2013).

Otra terapia consiste en administrar bajas dosis de ATG (globulina anti-timocitos) aunque es menos específica que las terapias anti-CD3. ATG es un serum purificado de conejo con

anticuerpos IgG citotóxicos que van dirigidos contra los linfocitos T humanos. El problema es que no va dirigido a un epítipo específico ya que está hecho en conejos inmunizados con timocitos humanos, por tanto, exposiciones repetidas pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad del suero (reacción de hipersensibilidad causada por la formación de inmunocomplejos a partir de proteínas derivadas de una especie animal no humana) (Haller et al., 2018). La terapia con ATG parece ser prometedora y se siguen llevando a cabo estudios para determinar si podría prevenir o retrasar el inicio de la T1D (Haller et al., 2019).

3.3.2. Terapias dirigidas a linfocitos B

La T1D es considerada una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T. Sin embargo, los linfocitos B también llevan a cabo un papel patogénico, con su función como APCs (Mariño et al., 2011). El anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab retrasaba la disminución de péptido C pero este efecto no se prolongaba más de dos años (Pescovitz et al., 2014).

3.3.3. Terapias antígeno-específicas

Este tipo de intervenciones puede suprimir la respuesta autoinmune y revertir la enfermedad en modelos preclínicos (Tang et al., 2004). La estrategia está dirigida a la generación de Tregs específicos de islote, que causen la delección o anergia de los linfocitos T patogénicos, restaurando la tolerancia inmunológica. En este sentido, la liberación sistémica de nanopartículas recubiertas de péptidos relevantes para la T1D junto con MHC de clase I y II han generado Tregs antígeno específicos en ratón NOD, revirtiendo la diabetes (Clemente-Casares et al., 2016). Se observó anergia de linfocitos T e inducción de tolerancia cuando las nanopartículas estaban cargadas con un péptido híbrido de insulina fusionada con cromogranina A (Jamison et al., 2019). Los esfuerzos también van dirigidos a la identificación de TCRs específicos de islote para la generación de Tregs antígeno-específicos mediante herramientas como CRISPR-Cas9 (Safari et al., 2018).

Este tipo de respuestas modulan la respuesta autoinmune de forma específica en los islotes, sin influir en las respuestas contra patógenos. La clave parece estar en la combinación de inmunoterapias, para conseguir un mayor efecto y que éste sea a largo plazo.

4. MODELO NOD DE DIABETES AUTOINMUNE

Aunque cada vez hay una mayor disponibilidad de muestras humanas que permiten un análisis más directo de tejido linfoide y pancreático en diferentes estadios de la enfermedad (Pugliese et al., 2014), es cierto que su utilización para el estudio de la inmunopatología de la T1D sigue presentando numerosas complicaciones, porque no es posible disponer de muestras de individuos vivos diabéticos y porque la disponibilidad de muestras pancreáticas post-mortem es limitada (Oram et al., 2019).

Por este motivo, en los últimos años, se han utilizado dos tipos de modelos animales para el estudio de la diabetes tipo 1 de fácil mantenimiento y manipulación; las ratas *BioBreeding* o BB y los ratones *Non-obese-diabetic* o NOD, los cuales desarrollan diabetes autoinmune de forma espontánea. Ambos comparten multitud de aspectos con la etiopatogenia de la T1D en humanos, similitud en los loci de susceptibilidad e influencia de factores ambientales (Bluestone et al., 2010). En el presente trabajo, se ha utilizado el modelo murino NOD y la línea celular NIT-1 de insulinoma de ratón NOD.

El modelo de ratón NOD fue descubierto por Makino y colaboradores (Makino et al., 1980) durante el desarrollo de un modelo animal para el estudio de cataratas (CTS). Mostraba un inicio abrupto de los síntomas (poliuria, polidipsia, glucosuria, hiperglucemia y pérdida de peso rápida), infiltración linfocítica de los islotes y deficiencia de insulina.

Los ratones hembra de la cepa NOD comienzan a desarrollar infiltración de islotes (insulitis) a las 4-5 semanas de edad y la clínica de la enfermedad aparece normalmente entre las 12 y las 14 semanas, más frecuentemente en hembras que en machos (Figura 11). Las células que infiltran los islotes son linfocitos T (CD4+ y CD8+), células dendríticas, linfocitos B y macrófagos (Yang and Santamaria, 2006).

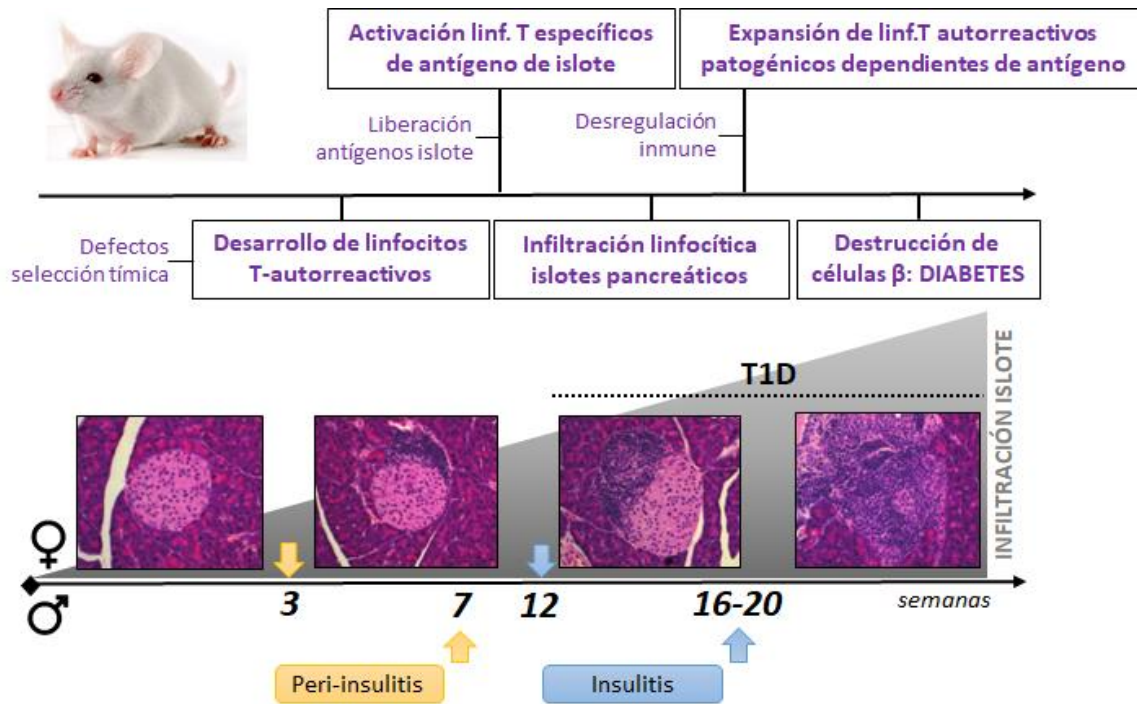


Figura 11: Progresión de la T1D en el modelo de ratón NOD. Diferencias entre hembra y macho en el inicio de la peri-insulitis y la insulitis. Evolución de la respuesta diabetogénica autoinmune en ratón NOD (Yang and Santamaria, 2006). Imágenes correspondientes a la infiltración progresiva de los islotes pancreáticos (Greiner et al., 2014).

Cuando son estabulados en condiciones SPF, dependiendo del animalario, la incidencia de la diabetes autoinmune varía de un 60-95% en hembras, en las cuales se desarrolla más rápido, y un 30-50% en machos. Esta incidencia se reduce considerablemente cuando los animales se encuentran expuestos a un mayor número de patógenos, como ocurre en una sala convencional de estabulario (Bach, 2002; Kikutani and Makino, 1992; Pozzilli et al., 1993).

Entre los factores genéticos de predisposición, la cepa NOD comparte con los humanos alelos de riesgo del MHC de clase II. Los ratones NOD expresan un haplotipo de MHC que es el I-A^{g7}. No expresan el I-E por un fallo en la cadena E α y, por tanto, la única molécula que expresan es I-A (Hattori et al., 1986). I-A^{g7} en lugar de un ácido aspártico en la posición 57, tiene un aminoácido neutro, al igual que el haplotipo humano DQ8 de riesgo (Morel et al., 1988). La presencia de un aminoácido neutro en lugar del aspartato se ha correlacionado con una peor capacidad para unir péptidos autoantigénicos de insulina (Carrasco-Marin et al., 1997; Lee et al., 2001).

Además, las manipulaciones genéticas de este modelo resultan de gran utilidad también para el estudio de otras enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjogren (Lodde

et al., 2006), la tiroiditis autoinmune (Braley-Mullen et al., 1999), la polineuropatía autoinmune periférica (Salomon et al., 2001), la cirrosis biliar primaria (Irie et al., 2006), la cardiomiopatía autoinmune (Elliott et al., 2003) o la sialoadenitis autoinmune (Hjelmervik et al., 2007).

Los ratones NOD/SCID son el resultado de cruzar ratones de la cepa NOD y ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). Los ratones homocigotos para la mutación SCID (mutación en $Prkdc^{scid}$) son deficientes en linfocitos T y B, por tanto, no desarrollan insulinitis ni diabetes autoinmune (Bosma et al., 1983). Estos ratones muestran defectos en la inmunidad innata, como disfunción de las células NK o escasa producción de citoquinas (Belizario, 2009). En este trabajo se han utilizado ratones NOD/SCID para evitar contaminaciones de las preparaciones de islotes con otros tipos celulares que provengan de la infiltración linfocitaria así como para discriminar entre las contribuciones al proceso autoinmune del sistema inmunitario y de la propia célula beta como diana de este.

5. FISIOLÓGÍA DEL ISLOTE PANCREÁTICO

El páncreas es un órgano glandular mixto, constituido por una parte exocrina, con una organización lobular, y una parte endocrina. El tejido exocrino supone la mayoría de la superficie del páncreas y se encuentra rodeando al tejido endocrino, que comprende entre un 1-4% del volumen total pancreático (Rahier et al., 1981).

El páncreas endocrino está formado por agrupaciones celulares denominadas islotes de Langerhans o pancreáticos, constituidos por un 60% de células β (productoras de insulina), un 30% de células α (productoras de glucagón), y un 10% de células δ o épsilon (productoras de somatostatina). También existen células PP (productoras de polipéptido pancreático) y células ϵ (productoras de grelina) distribuidas de forma aleatoria por el islote (Ionescu-Tirgoviste et al., 2015). Cuando se destruye una parte de la masa β , el resto de células β aumentan su actividad para suplir esta pérdida, por ello no se empiezan a detectar síntomas de T1D hasta que la disminución de islotes es muy elevada (Menge et al., 2012)

Sin embargo, la arquitectura de los islotes presenta variaciones entre especies (Figura 12). Por ejemplo, los ratones presentan un núcleo de células beta rodeado por el resto de los tipos celulares endocrinos, mientras que en humanos estas células endocrinas están distribuidas a lo largo del islote de forma aleatoria (Da Silva Xavier, 2018; Kim et al., 2009).

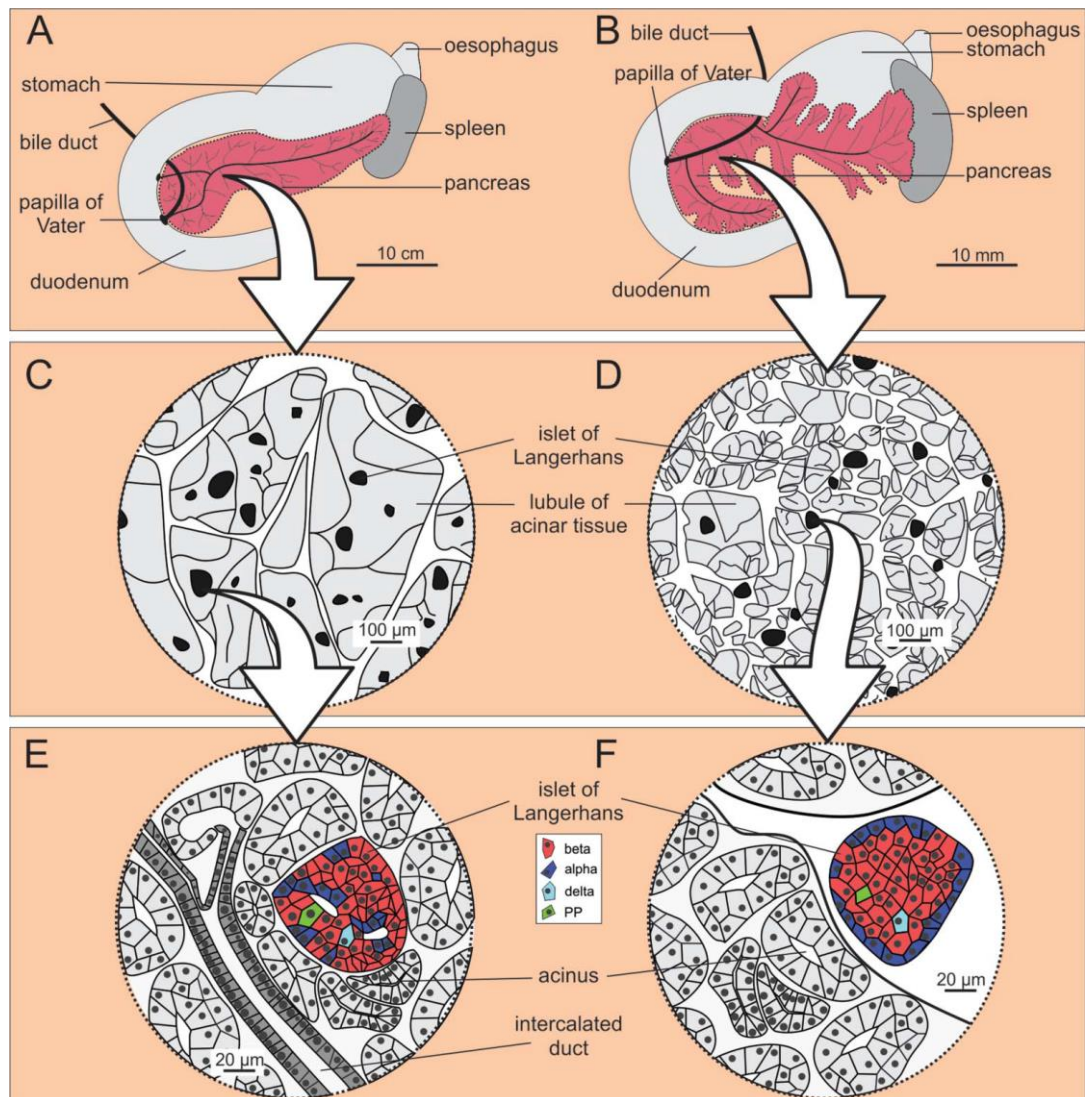


Figura 12. Anatomía macro y microscópica del páncreas humano (A, C y E) y del páncreas de ratón (B, D y F). El páncreas humano presenta unos lóbulos más grandes, mientras que los islotes de Langerhans tienen un tamaño similar en ambos. Sin embargo, la composición celular y la localización de los islotes muestra claras diferencias (Dolenšek et al., 2015).

5.1. Función de la célula beta pancreática

Las células beta son las encargadas de sensar la glucosa y liberar insulina para mantener los niveles de glucosa fisiológicos dentro un rango relativamente estrecho. La insulina, empaquetada en gránulos secretores a concentraciones de 100mM aproximadamente en un complejo formado con zinc, se libera en respuesta a altas concentraciones de glucosa (Rorsman and Renström, 2003). Esta hormona es la encargada de permitir la entrada de glucosa desde la circulación sanguínea a las células del cuerpo donde se convierte en energía. También tiene una función importante en el metabolismo de proteínas y grasas. Por ello, una falta de insulina (insulinopenia) lleva a altos niveles de glucosa (hiperglucemia), que representa un indicador clínico de diabetes.

La glucosa entra en la célula β mediante el transportador GLUT-2. Se metaboliza por la glucólisis y el ciclo de Krebs, generando un incremento del ratio ATP/ADP, lo cual provoca el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (canales KATP) y la consecuente despolarización de la membrana. Esta despolarización abre los canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando así la concentración de calcio intracelular y la estimulación de la secreción de insulina, previamente sintetizada en el retículo endoplasmático y almacenada en vesículas secretoras (Figura 13) (Ashcroft et al., 1984; Wollheim and Sharp, 1981).

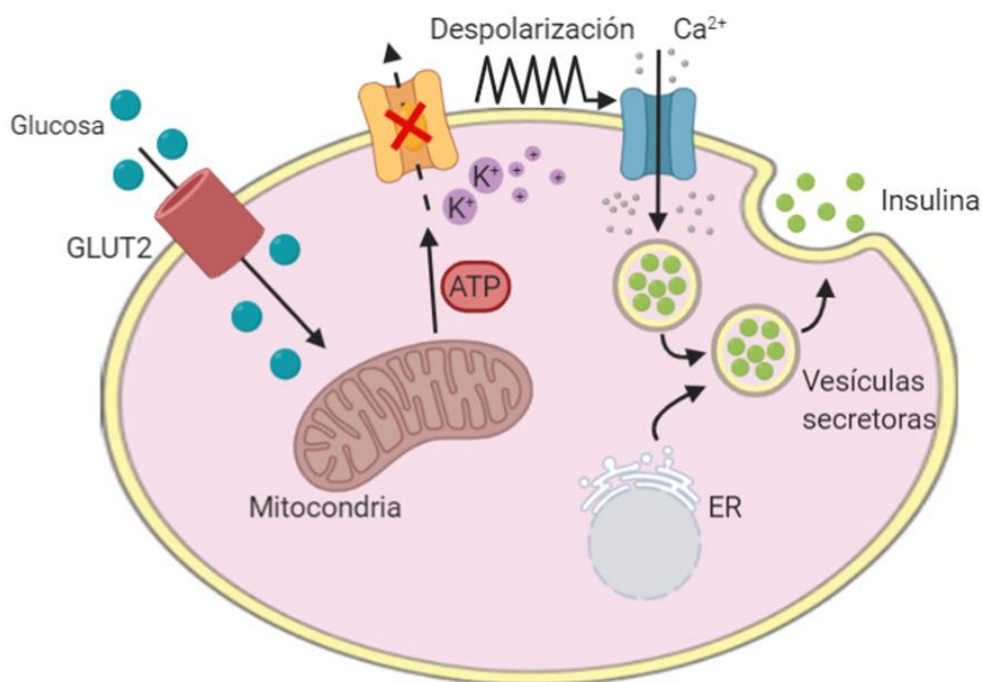


Figura 13: Célula beta pancreática. Entrada de glucosa a la célula mediante el transportador GLUT-2, generación de ATP y cierre de los canales de potasio que causan despolarización de la membrana. Esta despolarización provoca la entrada de iones de calcio y exocitosis de insulina. (Figura original de la autora, creada con BioRender).

5.2. La insulina y su procesamiento

La insulina, una vez secretada, actúa en las células de tejidos como el hígado o los músculos, mediante la interacción con el receptor de insulina de las membranas celulares. La señalización de la insulina (hormona anabólica), provoca, por un lado, la traslocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular de células musculares y adipocitos, promoviendo la entrada de glucosa en las células, como fuente de energía y, por otro lado, la conversión de glucosa en glucógeno (glucogénesis) en el hígado.

Sin embargo, una disminución de la glucosa en sangre (ayuno, ejercicio extremo...) suprime la secreción de insulina por parte de las células β y estimula las células α para que liberen glucagón, que actúa en el hígado promoviendo la producción de glucosa a partir de glucógeno (glucogenólisis) (Zhong, 2013). La insulina tiene, por tanto, la función opuesta al glucagón en la regulación de la glucosa, pero ambas se coordinan para mantener los niveles de glucosa en sangre en un rango de normalidad (Figura 14).

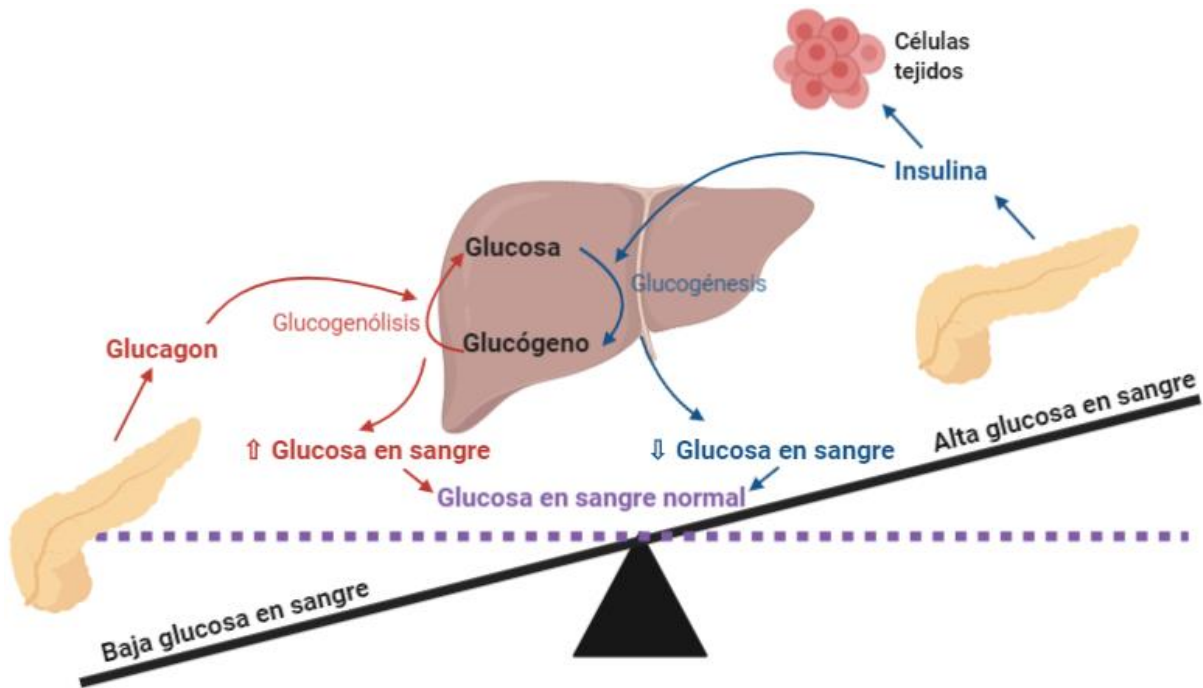


Figura 14: Regulación de la glucosa en el páncreas. Cuando hay un incremento de glucosa en sangre se estimula la secreción de insulina (células β), que aumenta la entrada de glucosa en tejidos como el hígado, el músculo o el tejido adiposo y además, convierte la glucosa en glucógeno en el hígado. De esta forma, los niveles de glucosa en sangre disminuyen, volviendo a valores normales. Sin embargo, cuando la glucosa en sangre disminuye, se estimula la secreción de glucagón (células α) y se produce glucosa a partir de glucógeno, incrementando así la glucosa en sangre. (Figura extraída y adaptada de Zhong, 2013).

La insulina se sintetiza inicialmente como preproinsulina, con un péptido señal en los ribosomas del retículo endoplasmático (ER) rugoso. Posteriormente, se trasloca al lumen del ER donde se convierte en proinsulina mediante la eliminación del péptido señal, y se forman tres puentes disulfuros. La proinsulina se trasloca después al aparato de Golgi y se empaqueta en gránulos secretores cerca de la membrana celular. Allí, la proinsulina es cortada generando insulina y péptido C (Figura 15).

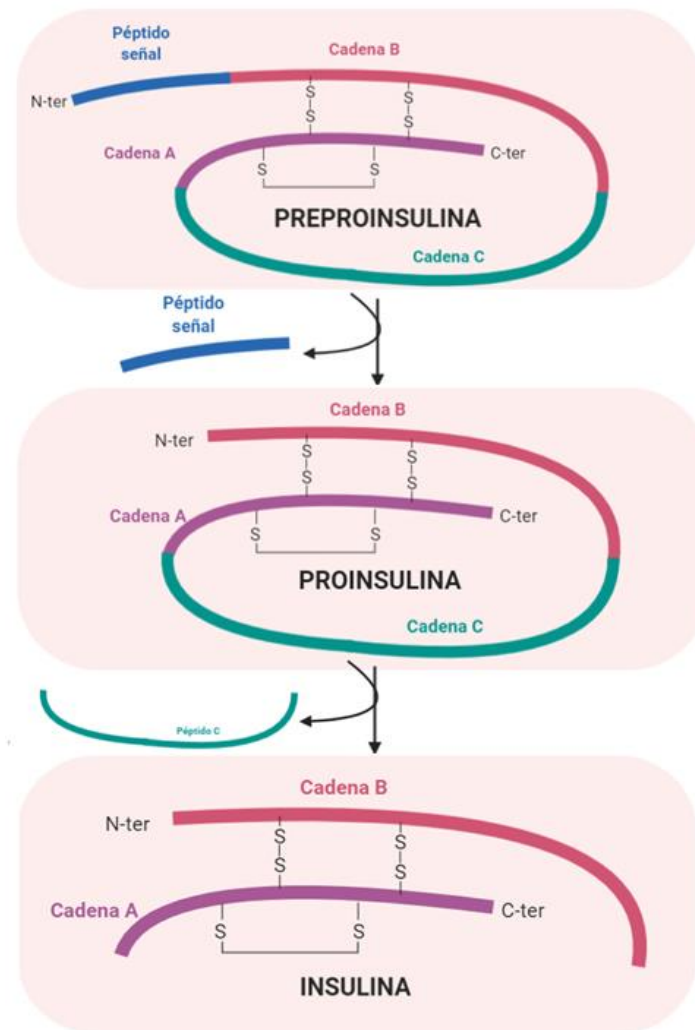


Figura 15: Biosíntesis de insulina en la célula β . La insulina se sintetiza inicialmente como un precursor, preproinsulina, que tiene un péptido señal. Se trasloca al lumen donde se convierte en proinsulina, que es traslocada posteriormente al aparato de Golgi y empaquetada en glándulas secretoras, donde se corta en insulina y péptido C. (Figura original de la autora, creada con BioRender).

5.3. Línea celular NIT-1 de insulinoma de ratón NOD

NIT-1 es una línea de insulinoma derivada del ratón transgénico NOD/Lt, el cual expresa el antígeno T grande del virus SV40, provocando espontáneamente adenomas de célula β . Se utiliza en muchos estudios *in vitro* para la T1D ya que esta línea celular comparte características con la célula β pancreática, como la secreción de insulina estimulada por glucosa (Hamaguchi et al., 1991) y además proviene del fondo genético NOD.

6. INFLAMACIÓN, ESTRÉS Y ACTIVACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA EN LAS CÉLULAS BETA

6.1. Proceso inflamatorio en las células β

La inflamación es una respuesta biológica que se produce como respuesta a una agresión mediada por patógenos o a traumatismos que causan estrés tisular. Esta respuesta debe estar siempre controlada para mantener la integridad del tejido, ya que una resolución defectuosa de la misma incrementa el riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria crónica y/o autoinmune (Medzhitov, 2008).

La T1D es una enfermedad autoinmune en la cual los mediadores inflamatorios de la inmunidad innata y adaptativa tienen gran importancia. La inflamación en la T1D se puede dividir en tres etapas: inducción, amplificación del ataque autoinmune contra las células β pancreáticas y, por último, mantenimiento o resolución de la insulinitis.

En la primera fase, la activación de los PRRs (receptores de reconocimiento de patrones) como Receptores *Toll-like* (TLRs) por ligandos endógenos (DAMPs) o exógenos (PAMPs víricos), inducen la inflamación del islote por la inmunidad innata y la muerte de las células β pancreáticas. En la segunda fase, la amplificación de la insulinitis depende del “diálogo” entre las células inmunitarias y las células β (diana). Se activan macrófagos, NKs y linfocitos T y producen citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-1 β y TNF α , que inducen a su vez la liberación de quimiocinas. Se forma de esta manera un círculo vicioso que provoca una acumulación de macrófagos activados y linfocitos T alrededor (periinsulinitis) y dentro de los islotes (insulinitis), de forma progresiva. En la tercera y última fase, se puede mantener la insulinitis, pero los mediadores inflamatorios continúan teniendo una función importante en la patogénesis: las citoquinas interfieren en la función de las células β y acaban provocando su muerte masiva (T1D), o bien, se resuelve el proceso inflamatorio, mediante la inducción y regeneración de las células β (Eizirik et al., 2009).

Uno de los problemas para el estudio de los mecanismos inflamatorios en la T1D es la inaccesibilidad del tejido en el que ocurren. En muy pocos países es legal obtener biopsias de páncreas, pues ello implica alto riesgo de provocar pancreatitis. Por un lado, los procesos patológicos que se producen al inicio de la enfermedad tienen lugar en el microambiente del islote, el cual sólo representa una pequeña parte del páncreas. Por otro

lado, los mediadores inflamatorios se encuentran a altas concentraciones en los islotes, pero quedan diluidos en la circulación general. Además, el efecto de una citoquina aislada o la combinación de unas pocas es poco informativo, ya que se desestiman los efectos combinatorios de éstas. Una forma de analizar indirectamente la inflamación es mediante estudios de microarrays, a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de individuos sanos que hayan sido expuestas a serum de pacientes diabéticos y así, poder analizar la presencia de factores proinflamatorios en el suero. Sin embargo, esto no da información sobre el efecto en islotes. Muchas de estas citoquinas tienen efectos de corto alcance a nivel del islote (efecto paracrino) (Cabrera et al., 2016).

6.2. Muerte de las células β

La diabetes autoinmune es una enfermedad crónica en la cual la muerte de las células β se produce de forma progresiva a través de meses-años. De hecho, los síntomas clínicos aparecen cuando más del 70% de la masa beta está destruida (Cnop et al., 2005). Aunque la apoptosis es la principal forma de muerte de las células β de estos pacientes (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mauricio and Mandrup-Poulsen, 1998; O'Brien et al., 1997), la necrosis también se ha considerado un mecanismo probable (Eizirik and Darville, 2001; Lightfoot et al., 2012). Existen tres consensos por los cuales la muerte de las células beta en T1D se explica mayoritariamente por apoptosis: la vía extrínseca (interacción Fas-FasL), los linfocitos T citotóxicos o CTLs (perforinas) y la respuesta UPR.

La apoptosis o muerte celular programada fue descrita por Kerr y colaboradores en 1972 (Kerr et al., 1972) como un mecanismo de muerte celular caracterizado por fragmentación nuclear, condensación en la cromatina, fragmentación celular y generación de pequeñas vesículas o cuerpos apoptóticos (Fink and Cookson, 2005). En la insulinitis, las células inmunes producen citoquinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que inducen la apoptosis mediante la activación de genes de la célula β bajo el control de factores de transcripción como NF- κ B y STAT-1 (Figura 16). Por ejemplo, cuando NF- κ B se activa, se produce óxido nítrico (NO) y quimiocinas y disminuyen los niveles de calcio en el retículo endoplasmático. Esto genera un estrés en el retículo endoplasmático y se liberan señales mitocondriales de muerte. Por tanto, la muerte de las células beta durante la insulinitis es el resultado del contacto directo con macrófagos y linfocitos T y/o la exposición a mediadores proinflamatorios liberados por estas células, como las citoquinas, el NO y los radicales libres

del oxígeno (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001). Además, IL-1 β y/o IFN- γ inducen expresión de Fas en la célula β , induciendo apoptosis extrínseca.

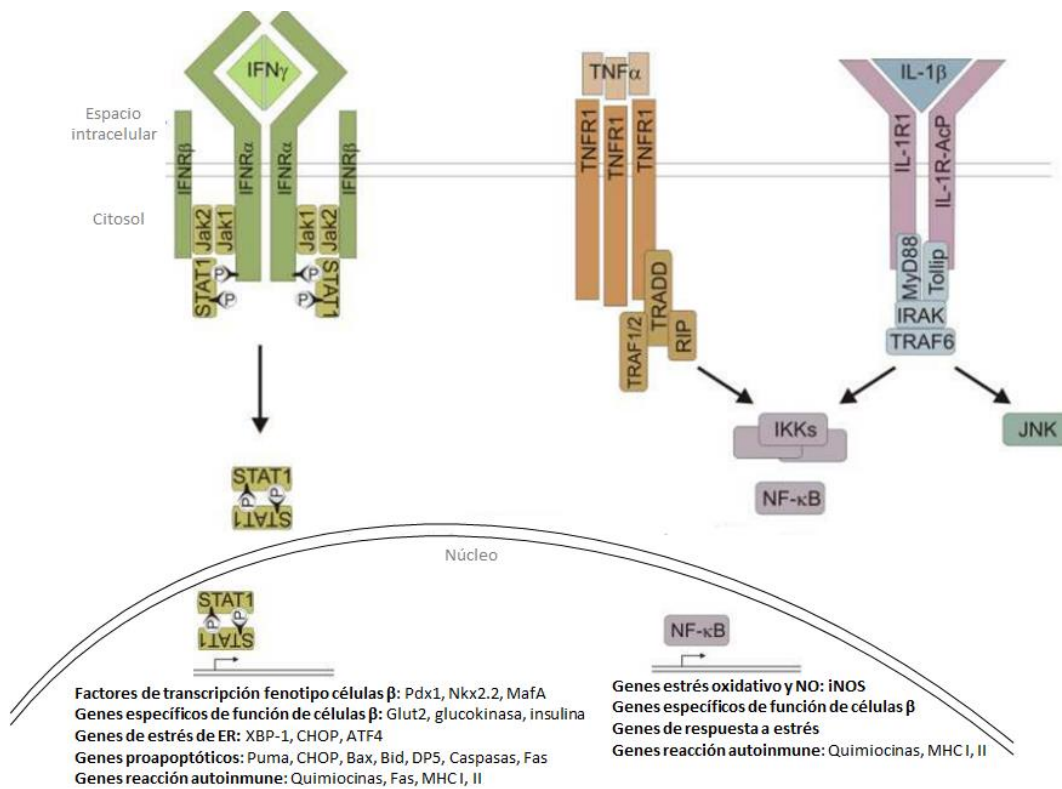


Figura 16: Señalización de citoquinas en células beta pancreáticas. Las citoquinas IFN- γ , IL-1 β y TNF- α producen la activación de los receptores de superficie de las células beta. Se inicia una cascada de señalización que activa STAT1 y NF- κ B. Estos factores de transcripción controlan muchos genes relacionados con la inflamación, las respuestas a estrés, la función de las células beta y la muerte por apoptosis. (Figura extraída y adaptada de Vincenz et al., 2011).

La apoptosis se lleva a cabo mediante la acción de las caspasas, que se activan por dos mecanismos: la vía extrínseca o la vía intrínseca (Figura 17). La vía extrínseca se produce cuando un ligando, como Fas-L, se une a un receptor de muerte de membrana, como Fas; es decir, está causada por un estímulo proapoptótico extracelular. El receptor Fas se une a su ligando Fas-L, induciendo un cambio conformacional que provoca su unión con FADD (*Fas-associated Death Domain*). FADD permite el reclutamiento de la procaspasa 8, formando el complejo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), que procesa la procaspasa 8 a su forma activa, caspasa 8 (iniciadora), que a su vez activa a las caspasas 3 y 7 (ejecutoras), provocando la destrucción de las células beta (Rojas et al., 2018; Wilcox et al., 2016). Sin embargo, la vía intrínseca (o mitocondrial) se produce por un estrés intracelular, como defectos mitóticos, estrés en el retículo endoplasmático o daño en el DNA. Esto genera inestabilidad entre las proteínas de la familia Bcl-2, provocando que las proteínas

proapoptóticas de esta familia (como Bax y Bak) liberen citocromo C de la mitocondria al citosol (Kile, 2009). Para que tenga lugar la oligomerización de APAF-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) es necesaria la presencia de dATP y citocromo C. El citocromo C, una vez liberado de la mitocondria, se une a APAF-1, activándolo. Se forma el apoptosoma, que es un complejo encargado de catalizar la activación de caspasas (Green, 1998) y se activa la caspasa 9, que a su vez, activa las caspasas 3 y 7, induciendo muerte celular (Cain et al., 2000; Galluzzi et al., 2018).

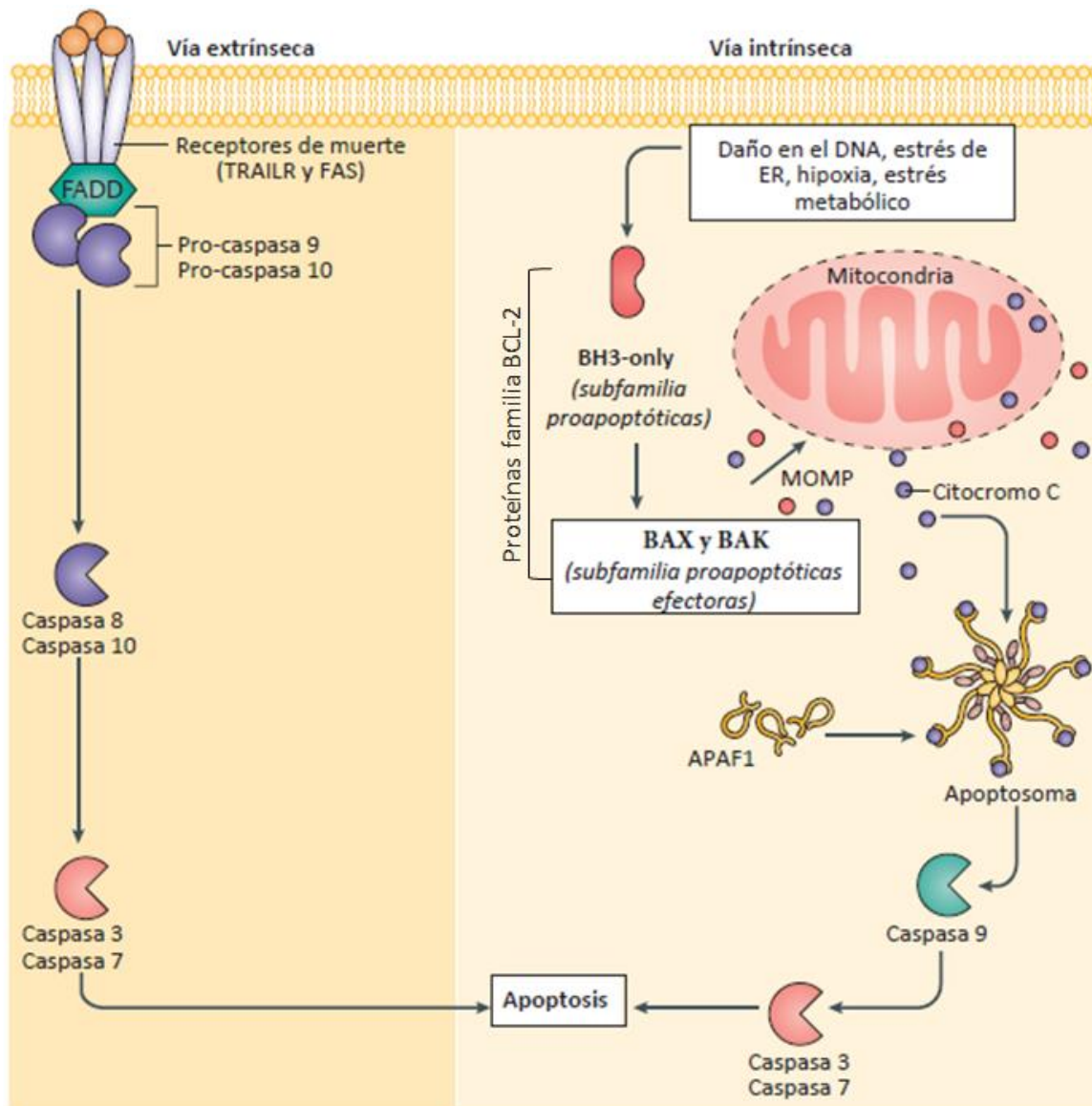


Figura 17: Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. En la vía extrínseca, los receptores (TRAILR o FAS) activan la caspasa 8 y 10, mediante la unión con FADD. Las caspasas 8 y 10 a su vez activan las caspasas efectoras 3 y 7, dando lugar a la apoptosis. En la vía intrínseca tiene gran importancia MOMP (permeabilización de la membrana externa mitocondrial, por sus siglas en inglés), que está regulado por las proteínas de la familia Bcl-2. Un estrés intracelular provoca la activación de las proteínas BH3 (proapoptóticas) de esta familia que liberan señales que activan las proteínas BAX y BAK. Se libera citocromo C al citosol que interactúa con APAF1, formando el apoptosoma, que activa la caspasa 9. Esta caspasa activa las caspasas 3 y 7, desencadenando la apoptosis. (Figura extraída y adaptada de Ichim and Tait, 2016).

6.3. Estrés de retículo

El retículo endoplasmático (ER) consiste en una red membranosa de túbulos, vesículas y cisternas, interconectadas por el citoesqueleto en el citoplasma de las células eucariotas. Entre sus funciones principales, destacan el plegamiento de proteínas, el almacenamiento de calcio intracelular, la regulación redox y el transporte en cisternas de proteínas sintetizadas. Está organizado en dos dominios: el retículo endoplasmático rugoso, responsable de la síntesis proteica; y el retículo endoplasmático liso, encargado de la síntesis de lípidos y esteroides y la regulación de la concentración de calcio (Zhong et al., 2012).

Las células β pancreáticas tienen un ER muy desarrollado para poder secretar las grandes cantidades requeridas de insulina. Por este motivo, estas células son muy vulnerables al estrés de ER (D'Hertog et al., 2010). En la diabetes autoinmune, las células beta son destruidas progresivamente y es la masa beta residual la encargada de compensar la falta de secreción de insulina por la masa beta destruida. Esta acción compensatoria mantiene la normoglucemia en sangre pero sobrecarga al ER, provocando estrés y aumentando a su vez la muerte celular. Además, la exposición de las células β pancreáticas a citoquinas proinflamatorias hace que se acumulen proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático y esto desencadena la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), para restaurar la función del ER (Cardozo et al., 2005; Dogusan et al., 2008). Esta respuesta intenta disminuir el estrés causado en el retículo y restaurar la homeostasis aumentando las proteínas chaperonas del ER y la degradación de las proteínas mal plegadas. Sin embargo, si esta respuesta falla en alcanzar su objetivo (restaurar los niveles normales de proteínas correctamente plegadas), tiene lugar la apoptosis (Eizirik et al., 2008).

En los periodos en los cuales hay un incremento de estrés en las células β , la insulina que se produce se acumula en el ER en una configuración mal plegada. Esto provoca un aumento en la capacidad antigénica de la insulina, que se presenta a las APCs, actuando como autoantígeno (Scheuner and Kaufman, 2008).

6.3.1. Respuesta a proteínas mal plegadas o UPR

La UPR es una respuesta de protección que restaura la función del ER mediante diferentes

mecanismos coordinados (Martínez and Chrispeels, 2003; Travers et al., 2000): disminución de la traducción de proteínas, incremento de la capacidad de plegamiento mediante la sobreexpresión de las chaperonas de ER y degradación de las proteínas mal plegadas activando la vía de degradación de ER (ERAD).

En condiciones normales, la chaperona GRP78 o BiP, se une a tres proteínas sensoras de estrés de ER, que se encuentran en su membrana: PERK (proteína quinasa del retículo endoplasmático), ATF6 (factor de transcripción activador 6) e IRE1 (enzima que requiere inositol 1). La interacción entre BiP y estas proteínas hace que permanezcan en un estado inactivo, y por tanto, la respuesta UPR esté inhibida (Figura 18-A). Sin embargo, cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el ER, BiP se separa de las proteínas sensoras y se une a los residuos hidrofóbicos de las proteínas mal plegadas. En ese punto, cada una de las tres proteínas comienza una cascada de señalización de la respuesta UPR (Figura 18-B):

- PERK oligomeriza y una vez activado fosforila la subunidad α del factor iniciador de la traducción 2 (eIF2 α) para disminuir la traducción de mRNA y la sobrecarga del ER (Harding et al., 2000).
- ATF6 se trasloca al aparato de Golgi donde es cortado. La fracción citosólica de ATF6 se trasloca al núcleo y allí induce la transcripción de nuevas chaperonas para disminuir la acumulación de proteínas mal plegadas (Haze et al., 1999).
- IRE1 dimeriza, se autofosforila y corta XBP-1 (*X-box binding protein 1*), convirtiéndolo en un factor de transcripción activo, que controla los genes relacionados con plegamiento de proteínas y la degradación asociada a ER (ERAD) (Lee et al., 2003).

Si todos estos pasos son insuficientes para restaurar la homeostasis del ER, debido a que el estrés es excesivo o prolongado en el tiempo, se activará la expresión de proteínas proapoptóticas como CHOP (*C/EBP homologous protein*). En condiciones de estrés de ER, CHOP funciona como un activador o como un represor transcripcional. En la vía apoptótica inducida por CHOP, regula la expresión de proteínas proapoptóticas, como la familia BCL2 y esta activación de la vía apoptótica desembocará en la destrucción celular (Gurzov et al., 2009).

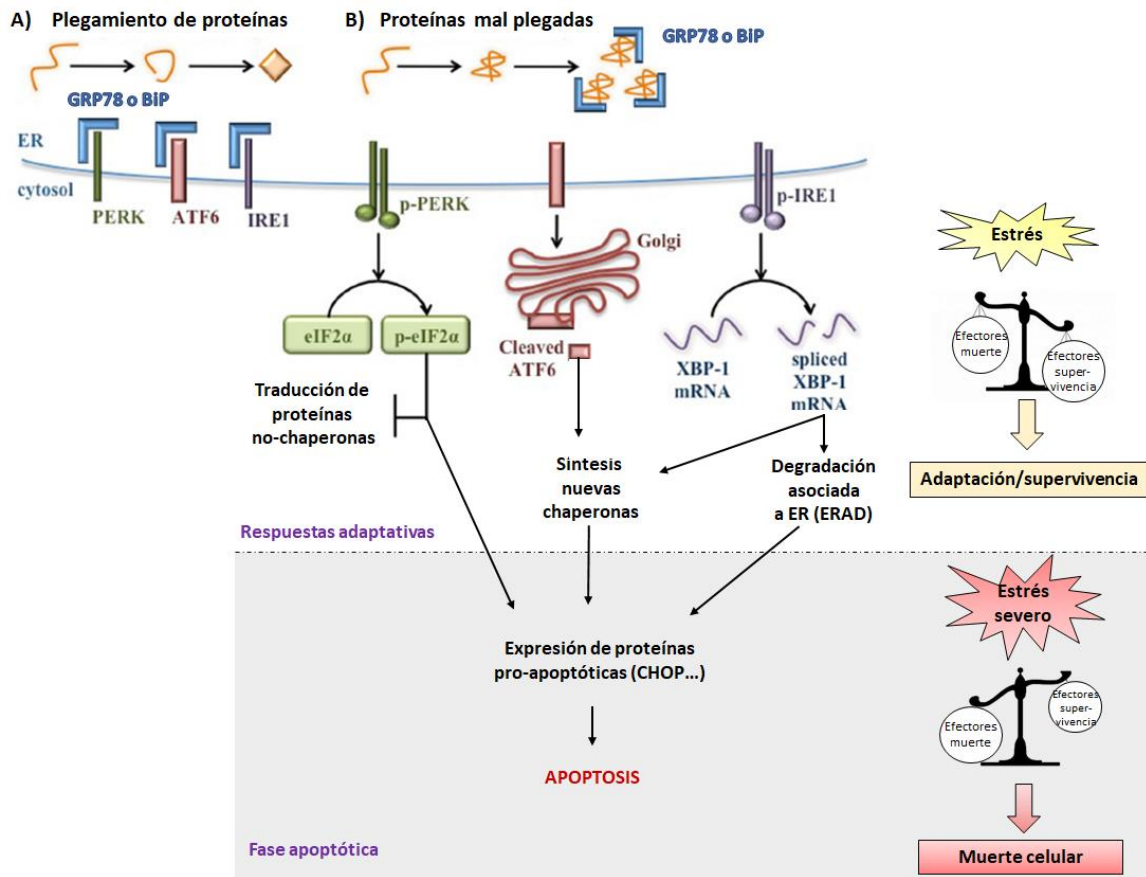


Figura 18: Vías de señalización de la respuesta UPR. Balance entre muerte o supervivencia. A) Cuando las proteínas se pliegan de forma correcta, los sensores de estrés de ER como PERK, ATF6 e IRE1 están unidos a GRP78 o BiP y por tanto, inactivados. **B)** Cuando las proteínas mal plegadas se acumulan en el ER, BiP se une a ellas y los sensores se activan, dando lugar a la señalización de la UPR. PERK activa eIF2 α inhibiendo la traducción de proteínas no-chaperonas. ATF6 se trasloca al Golgi y una vez cortado, aumenta la expresión de chaperonas. IRE1 se autofosforila y corta XBP-1, que regula la expresión de chaperonas y proteínas de la respuesta UPR. Cuando el estrés de ER es muy alto o se prolonga en el tiempo, la respuesta UPR está hiperactivada, y en esta situación se induce la expresión de proteínas proapoptóticas (CHOP), desembocando en apoptosis. (Figura extraída y modificada de Fonseca et al., 2011; Marré et al., 2015).

6.4. Estrés oxidativo

Las reacciones redox son muy importantes para el mantenimiento de la vida, mediante la respiración, el aporte de energía o el metabolismo. La mitocondria es la encargada de generar energía (potencial redox) a través de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa del ADP. Durante este proceso se forman, además de ATP, otros subproductos, como los radicales libres: especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Son moléculas con uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, lo cual los hace inestables y muy reactivos (McCord, 2000).

En la diabetes autoinmune, se produce una liberación exagerada de estos radicales libres

inducida por la activación de macrófagos; y de citoquinas proinflamatorias, que producen la destrucción progresiva de las células beta pancreáticas y contribuyen a la progresión rápida de la enfermedad (Delmastro and Piganelli, 2011). La producción de energía en la mitocondria es esencial para las células beta en su tarea de secretar insulina en respuesta a glucosa. Por ello, la disfunción mitocondrial tanto en las células beta como en las células inmunitarias está involucrada en la patogénesis de la T1D.

Ante un ataque inmunológico, el ROS procedente de las mitocondrias (mtROS) de las células beta provoca daños en estas células. Además, se genera ROS en los linfocitos T CD8+ y CD4+ que inducen a su vez la producción de citoquinas proinflamatorias, así como perforina, granzima y FasL, lo cual provoca la destrucción progresiva de la célula β (Figura 19). La sensibilidad de las células beta a mtROS está asociada con loci de riesgo genético a T1D en humanos y en ratones NOD (Chen et al., 2018).

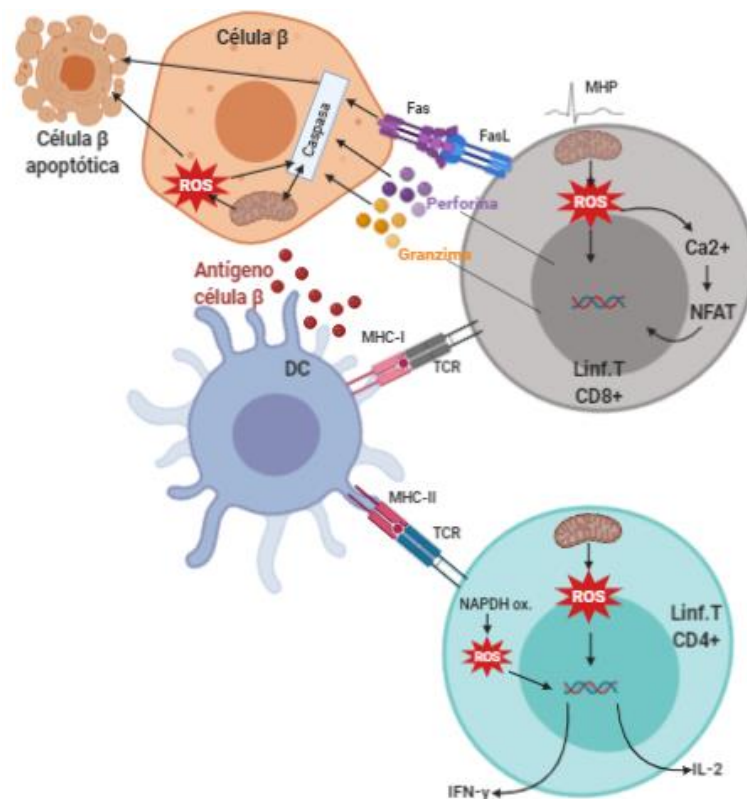


Figura 19. Papel de ROS en las células beta y en la activación de los linfocitos T. Las células dendríticas captan el antígeno de célula beta, lo procesan y lo presentan a los linfocitos CD4+ y CD8+. ROS tiene un papel relevante en la activación de los linfocitos T CD4+ antígeno-específicos, ya que el ROS producido por la mitocondria de estos linfocitos activa el factor nuclear de las células T (NFAT) induciendo la producción de IL-2. A nivel citosólico también se produce ROS a partir de las NADPH oxidasas, induciendo la producción de IFN- γ . Además, la hiperpolarización mitocondrial (MHP) en CD8+ aumenta la generación de ROS, que a su vez estimula el flujo de calcio, lo cual induce la producción de citoquinas proinflamatorias, así como perforina, granzima y FasL; todos ellos factores citotóxicos para las células β , las cuales, a su vez, también generan ROS mitocondrial, aumentando el daño a las células β (Figura original de la autora, creada con BioRender).

Para contrarrestar los efectos de las especies reactivas y neutralizarlas, existen sistemas antioxidantes. Entre los enzimas antioxidantes destacan la glutatión peroxidasa (GPX), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. Sin embargo, la presencia de ellos en el páncreas no es abundante, al contrario de lo que ocurre en el hígado, lo cual hace a los islotes pancreáticos vulnerables a los ROS, en comparación con otros tejidos (Lei and Vatamaniuk, 2011; Lenzen et al., 1996).

Cuando la generación de especies reactivas supera la capacidad de los mecanismos antioxidantes, se produce una condición conocida como estrés oxidativo, el cual se ha relacionado con la citotoxicidad de células β y la patogénesis de la T1D (Rabinovitch, 1992; Ullah et al., 2016).

7. CDK11 Y CICLINAD3 EN LA INFLAMACIÓN DE LA CÉLULA BETA

7.1. El ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos que da lugar al crecimiento celular y la división en dos células hijas. En eucariotas, los dos eventos más importantes son la fase S, en la cual se replican los cromosomas, y la fase M, en la que se segrega este material replicado entre las células que se están dividiendo. La fase S está precedida por una fase o "gap" G_1 , en la cual las células se preparan para la síntesis de DNA y, antes de la fase M, hay una fase G_2 en la cual la célula se prepara para la mitosis. Las células en G_1 pueden también entrar en un estado llamado G_0 , en el cual permanecen en un estado quiescente, sin crecimiento ni proliferación. Estas fases ocurren de forma secuencial y cíclica con el objetivo de duplicar y dividir el material hereditario (Nurse, 1994; Vermeulen et al., 2003).

El ciclo celular en mamíferos está controlado por una subfamilia de kinasas dependientes de ciclina (Cdks), cuya actividad está modulada por activadores (ciclina) e inhibidores (Malumbres and Barbacid, 2009). Los complejos Cdk/ciclina tienen, por tanto, un papel clave en la progresión del ciclo celular: Cdk1, junto con ciclina B2 se encarga de la transición de G_2 a M. Sin embargo, G_1 está regulada por las ciclina de tipo D. Finalmente, otras ciclina (A y E), se unen a Cdk2 y Cdk1 para la transición G_1/S y la progresión durante la fase S (Figura 20) (Sanchez and Dynlacht, 2005).

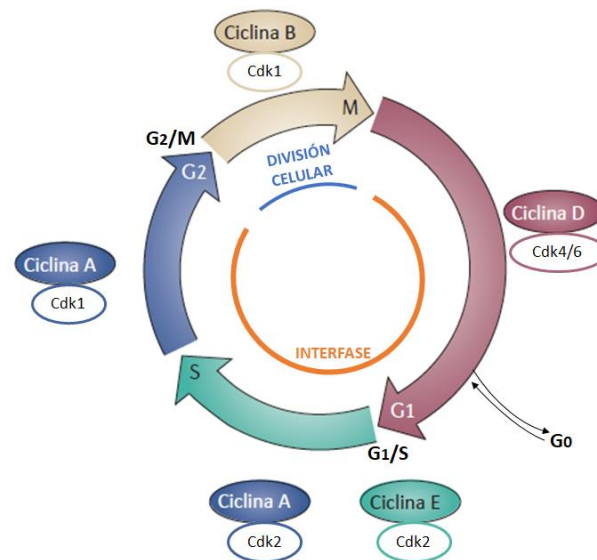


Figura 20: Regulación esquemática de la progresión del ciclo celular mediante los complejos Cdk-ciclina. En la fase S, se produce la replicación del DNA y durante la fase M se rompe la envoltura nuclear y se condensan los cromosomas, segregando las cromátidas hermanas. (Figura extraída y modificada de Moore, 2013).

7.2. La familia de las ciclinas

Las ciclinas son una familia de aproximadamente 30 proteínas que regulan el ciclo celular mediante su unión con las Cdks. En función de la fase en la que se expresan (Figura 21) y de las funciones que llevan a cabo, las ciclinas se dividen en 4 tipos: ciclinas G_1/S (ciclina E), ciclinas S (ciclina A) y ciclinas M (ciclina B), las cuales están relacionadas con el control de los eventos del ciclo; y, las ciclinas G_1 (ciclinas D), que controlan la entrada en el ciclo celular, en respuesta a factores extracelulares o mitógenos. Por tanto, las únicas ciclinas que dependen de señales extracelulares son las de tipo D, mientras que el resto son independientes a ellas (Yang, 2018).

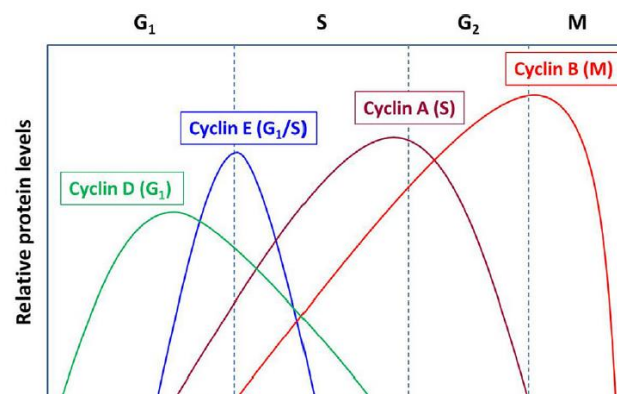


Figura 21: Niveles de expresión de las ciclinas durante las distintas fases del ciclo celular. Los niveles de proteína relativos de ciclina D en ocasiones fluctúan, en función de la presencia o ausencia de mitógenos (Yang, 2018).

Las ciclinas de tipo D (ciclina D1, D2 y D3) son esenciales para la progresión en la fase G1 del ciclo celular. Se unen a Cdk4 y Cdk6, activándolas. Estas kinasas, una vez activas, fosforilan la proteína retinoblastoma (Rb), que se desliga parcialmente de E2F, dejándolo así actuar. El factor de transcripción E2F induce la expresión de los genes implicados en la fase S, provocando así la progresión del ciclo celular (Figura 22) (Coqueret, 2002; Sherr, 1995).

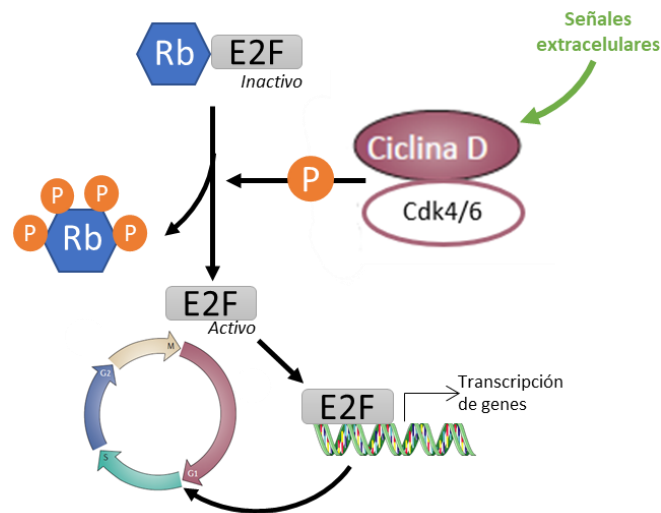


Figura 22: Regulación de la transición G1/S del ciclo celular, mediante el complejo ciclinaD-Cdk4/6. El complejo ciclinaD-Cdk4/6 fosforila la proteína retinoblastoma (Rb), la cual estaba unida al factor de transcripción E2F inhibiendo su actividad transcripcional. Una vez que E2F se libera de Rb, se activa la transcripción de los genes de la fase S, induciendo la progresión del ciclo celular. Figura original de la autora.

7.2.1. La proteína ciclinaD3 y su papel en las células beta

La ciclinaD3 está codificada por el gen *Ccnd3* (humano) y *ccnd3* (ratón) y se comporta como subunidad reguladora de Cdk4 o Cdk6, formando un complejo cuya actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la expresión de *ciclinaD3* se regula a la baja por la inflamación (Figura 23-A y 23-B) en las células endocrinas de islotes pancreáticos NOD atacados por la infiltración linfocitaria. Esta regulación a la baja se producía de forma dosis-dependiente a los niveles de infiltración, existiendo una correlación inversa entre infiltración y expresión de ciclinaD3 (Figura 23-C y 23-D). Este comportamiento, sin embargo, no se observó en las otras ciclinas D. Todo estos datos sugerían una función de la ciclinaD3 en las células β pancreáticas y, por lo tanto, en la diabetes autoinmune (Saavedra-Avila et al., 2014).

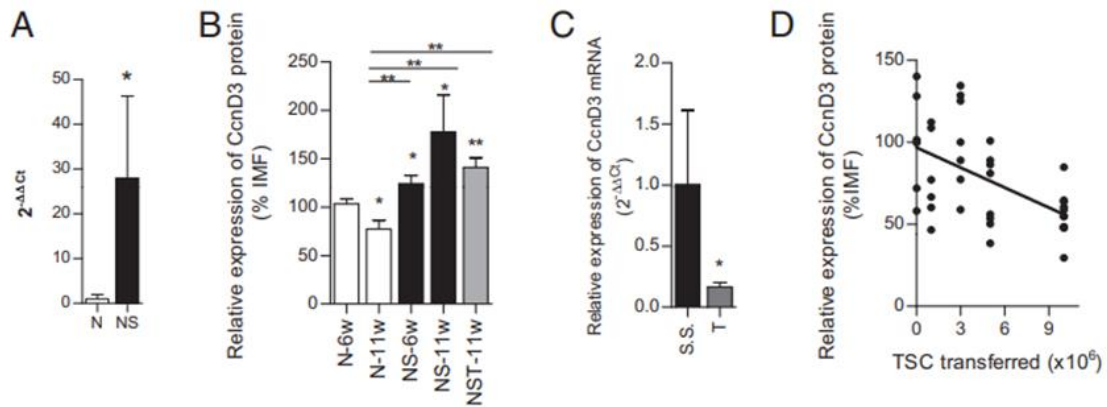


Figura 23. Niveles disminuidos de *ciclinaD3* (mRNA y proteína) en ratón NOD debido a la infiltración de los islotes, de forma dosis-dependiente. A) Expresión de mRNA de *ciclinaD3* por qRT-PCR en células endocrinas, comparando islotes de 11 semanas (prediabéticos) de ratón NOD (N), con infiltración linfocitaria, y ratón NOD/SCID (N/S), sin infiltración. Había una disminución de hasta tres veces en el ratón NOD. **B)** Expresión de proteína ciclinaD3 por citometría de flujo, comparando ratón NOD y NOD/SCID de 6 semanas (infiltración leve) y 11 semanas (infiltración fuerte). También se analizaron NOD/SCID de 11 semanas, a los cuales se les había realizado una transferencia adoptiva de esplenocitos de NOD prediabéticos. **C)** Para confirmar la relación causal entre la infiltración y la disminución de la expresión de ciclinaD3, se hicieron experimentos de transferencia adoptiva de esplenocitos de NOD en ratón NOD/SCID (T) en comparación con ratones NOD/SCID a los cuales se les había inyectado una solución salina (SS) y se analizó la expresión de mRNA de *ciclinaD3* por qRT-PCR. **D)** Se observó que había una correlación inversa entre la expresión de ciclinaD3 y la dosis de esplenocitos de NOD, indicando que los niveles de ciclinaD3 en las células beta están afectados por la infiltración linfocitaria de una manera dosis-dependiente (Saavedra-Avila et al., 2014).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión de ciclinaD3 protege de la apoptosis mientras que la deficiencia de esta proteína provoca un incremento de los niveles de apoptosis que se traducen en una mayor incidencia de la enfermedad (Figura 24).

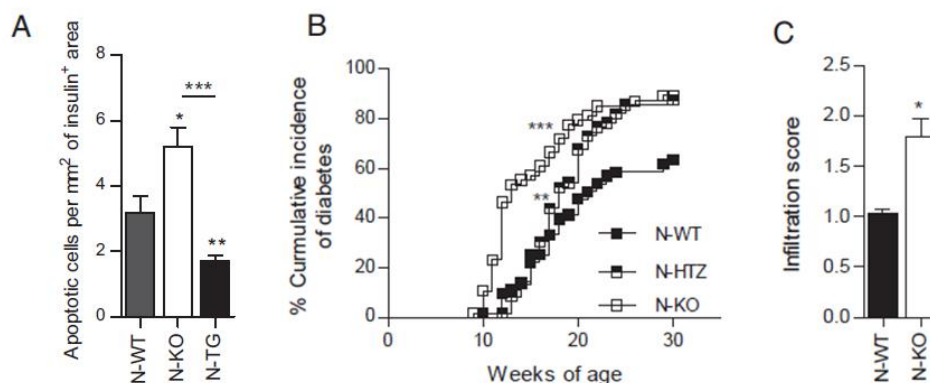


Figura 24. La sobreexpresión de ciclinaD3 protege de la apoptosis y la deficiencia la exacerba, aumentando la incidencia de T1D y la infiltración. A) Ensayo TUNEL como medida de apoptosis tardía realizado en células beta de secciones pancreáticas en ratones NOD de 6 semanas WT (N-WT), KO para ciclinaD3 (N-KO) y transgénico con sobreexpresión de ciclinaD3 (N-TG). **B)** Análisis del porcentaje de incidencia acumulativa de diabetes. El ratón N-KO mostraba una diabetes exacerbada con un inicio más temprano que los demás ratones y una mayor incidencia. **C)** Análisis de la infiltración linfocitaria que mostraba un daño insulínico severo en el ratón KO en comparación con el grupo control (Saavedra-Avila et al., 2014).

7.3. Kinasas Dependientes de Ciclina o Cdks

Las kinasas dependientes de ciclina o Cdks son kinasas serina/treonina que se encargan de llevar a cabo los eventos del ciclo celular en eucariotas y cuya actividad catalítica requiere la interacción con ciclinas e inhibidores de Cdks (CKIs) (Morgan, 1997). Además, tienen una función relevante en procesos como la transcripción, la regulación epigenética o el metabolismo (Lim and Kaldis, 2013).

Existen 20 miembros de la familia de las Cdks, los cuales se dividen principalmente en tres subfamilias relacionadas con el ciclo celular, representadas por Cdk1, Cdk4 y Cdk5; y cinco subfamilias transcripcionales, representadas por Cdk7, Cdk8, Cdk9, Cdk11 y Cdk20 (Figura 25)(Malumbres, 2014).

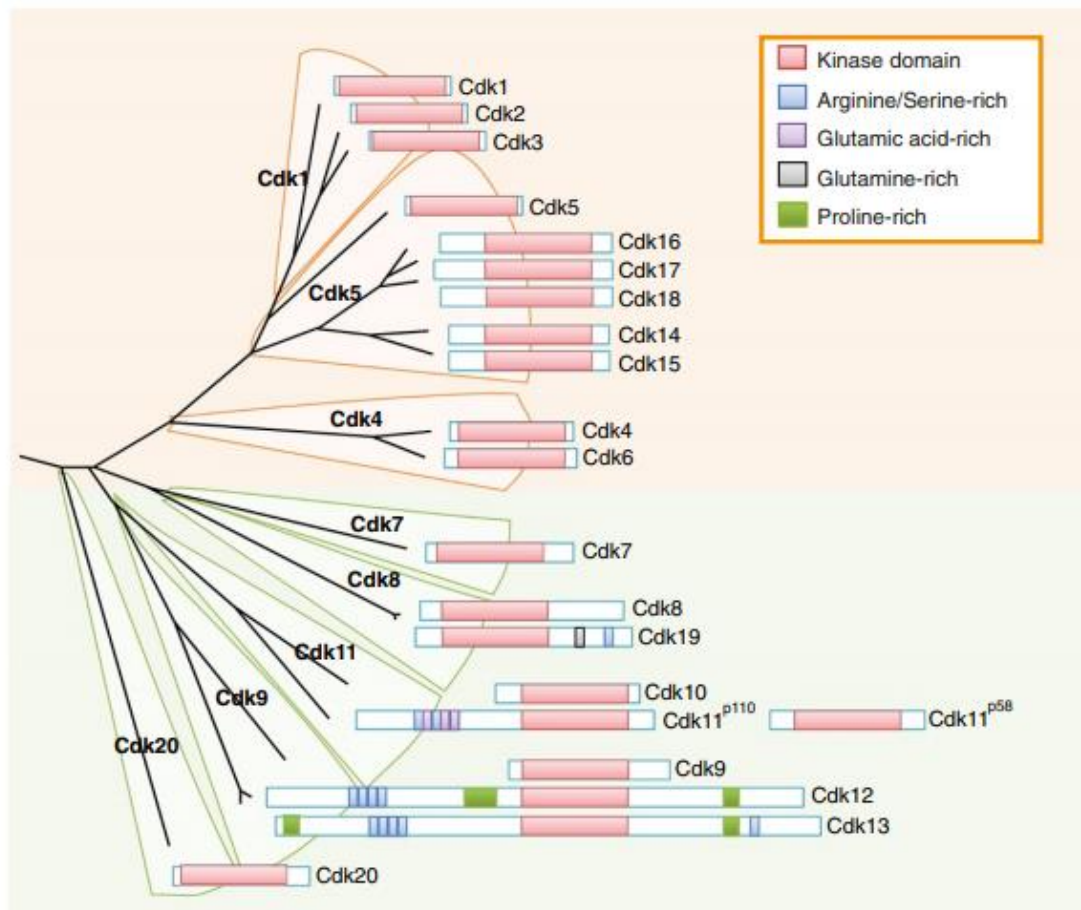


Figura 25: Relación entre las distintas subfamilias de Cdks en mamíferos. Las Cdks se dividen en subfamilias relacionadas con el ciclo celular (color naranja) o con la transcripción (verde). En el caso de la Cdk11 hay dos genes: CDK11 A y B, que codifican para una isoforma larga, Cdk11^{p110} y corta, Cdk11^{p58}, respectivamente (Malumbres, 2014).

7.3.1. La proteína Cdk11 y su papel en las células beta

La Cdk11 es una kinasa del tipo PITSLRE dependiente de ciclina y de expresión ubicua. Tiene dos productos génicos: p58 y p130 en ratón; y p58 y p110 en humanos (Xiang et al., 1994). Mientras que Cdk11^{p110} se expresa durante todas las fases del ciclo celular, Cdk11^{p58} solo lo hace en la mitosis, durante la cual mantiene la cohesión entre las cromátidas hermanas y participa en la citocinesis (Hu et al., 2007).

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que los niveles de expresión de *Cdk11* estaban disminuidos en las células endocrinas pancreáticas de la cepa NOD en la fase previa al debut de T1D (Figura 26-A). Además, esta expresión de Cdk11 está inversamente relacionada con la severidad de la infiltración linfocitaria en los islotes (Figura 26-B). Como la deficiencia de Cdk11 es letal embrionariamente (Li et al., 2004), se comparó la severidad de la T1D en ratones NOD hemideficientes en Cdk11 (N-HTZ) en comparación con ratones NOD WT (N-WT) (Figura 26-C). Se observó que la hemideficiencia en Cdk11 protege de la T1D, a nivel de incidencia y también de insulinitis (Figura 26-D) (Sala Solé, 2016).

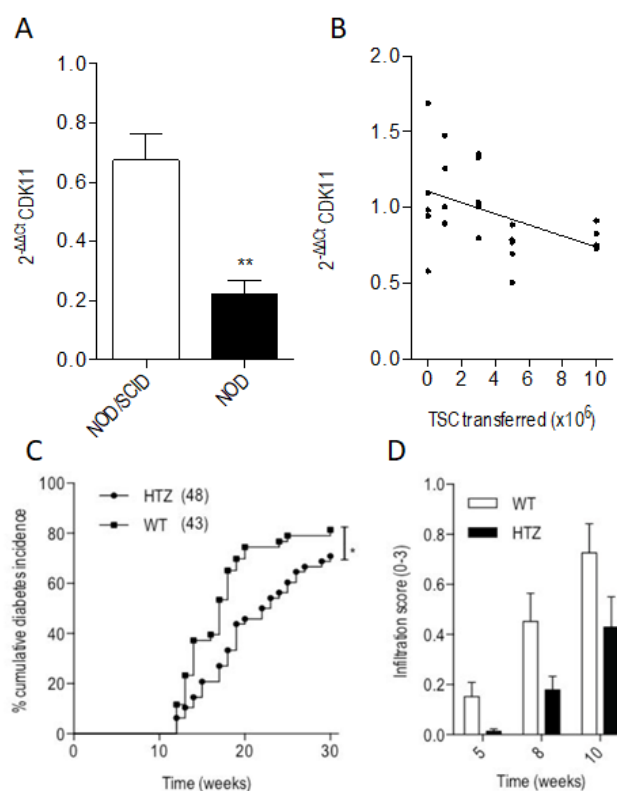


Figura 26. Los niveles de la proteína *Cdk11* están disminuidos en las células beta del ratón NOD. La hemideficiencia de *Cdk11* protege de la diabetes. A) Disminución de los niveles de mRNA de *Cdk11* en las células beta de ratón NOD de 11 semanas, en comparación con NOD/SCID (sin infiltración linfocitaria). **B)** La expresión de Cdk11 está inversamente relacionada con la severidad de la infiltración linfocitaria en los islotes. **C)** Los ratones N-HTZ exhiben una menor incidencia de T1D. **D)** La hemideficiencia en Cdk11 protege de la T1D también a nivel de insulinitis (Sala Solé, 2016).

Se midieron los niveles de apoptosis tardía en ambas cepas NOD para explorar la relación entre la viabilidad de las células beta y la expresión de la proteína Cdk11 y se observó que en los ratones NOD HTZ había una disminución de la apoptosis comparado con la cepa salvaje. (Figura 27-A), evidenciando que la disminución de la expresión de la proteína Cdk11 ejercía un papel protector contra la apoptosis inducida por inflamación, y por tanto, contra el inicio de la T1D. Sin embargo, no había diferencias significativas relativas a la proliferación de las células beta entre ambos genotipos (Figura 27-B), lo cual implicaría que la proteína Cdk11 tiene un papel independiente al ciclo celular en la viabilidad de la célula beta (Sala Solé, 2016).

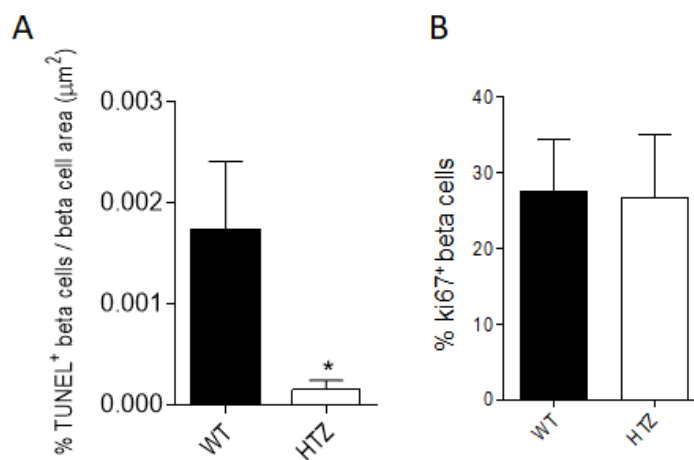


Figura 27. La proteína Cdk11 promueve la apoptosis de las células beta. A) Ensayo TUNEL que muestra una disminución en la apoptosis en los ratones NOD HTZ en comparación con la cepa WT. **B)** No se observan diferencias significativas en los niveles de proliferación de las células beta entre ambos genotipos (Sala Solé, 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La ciclinaD3 es importante para la viabilidad y funcionalidad de las células beta, de una manera independiente de ciclo celular. Nuestra hipótesis es que la ciclinaD3 interactúa con otras proteínas clave para la viabilidad de las células beta, modulando su actividad, lo cual revierte en el incremento del bienestar y la supervivencia de las células beta. Mediante la tecnología de doble híbrido y otras aproximaciones, descubriremos nuevas vías de señalización y nuevas proteínas, que, según nuestra hipótesis, estarán involucradas en mecanismos anti- y pro-apoptóticos, en estrés de retículo u oxidativo, entre otros procesos, pero todas ellas implicadas en la supervivencia de las células beta.

Además, tras observar que la hemidelección de Cdk11 provocaba una disminución de la incidencia de diabetes y protegía a las células beta de la apoptosis inducida por inflamación, sin que su capacidad proliferativa se viera afectada, hipotetizamos que Cdk11 estaba llevando a cabo un papel independiente de ciclo celular en la viabilidad de las células beta y que esta hemideficiencia estaba protegiendo de la apoptosis inducida por citoquinas.

OBJETIVOS

1. Búsqueda de vías de señalización que impliquen a la ciclinaD3 en la viabilidad y supervivencia de las células beta.
 - a. Determinar las interacciones moleculares de ciclinaD3 hasta ahora desconocidas e independientes del ciclo celular mediante la tecnología de Y2H.
 - i. Optimización y puesta a punto de la tecnología Y2H
 - ii. Realización del *screening* a partir de una librería normalizada de cDNAs de ratón
 - iii. Secuenciación de candidatos para la posterior reconfirmación mediante Y2H
 - b. Validar las interacciones positivas mediante dos aproximaciones independientes: co-IP y Nanobit.
 - i. Obtención de cDNAs enteros de los candidatos y transfección en NIT-

- c. Estudio de la colocalización de las proteínas candidatas con la ciclinaD3 mediante inmunofluorescencia.
2. Estudio del papel de Cdk11 en la T1D y su represión como mecanismo de protección contra la apoptosis inducida por inflamación
 - a. Evaluación en islotes del mecanismo de protección de la hemideficiencia de Cdk11 en la apoptosis inducida por citoquinas.
 - b. Análisis de la expresión de los genes relacionados con estrés de retículo.
3. Estudio del rol de Cdk11 como interactor de ciclinaD3 en la prevención de la T1D y la viabilidad de las células beta.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MÉTODOS DE INGENIERÍA GENÉTICA

1.1. Cepas de *E.Coli* utilizadas para subclonación de construcciones

En este trabajo se utilizó *E.Coli* para la subclonación y producción de las diferentes construcciones que después se transformaron en levaduras o se transfectaron en las células NIT-1 (insulinoma murino). La cepa de *E.Coli* utilizada fue XL-Blue1, deficiente en endonucleasas y recombinasas.

1.1.1. Condiciones de cultivo

Esta cepa bacteriana se dejaba crecer en un agitador orbital de calor seco a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) autoclavado (Tabla 2). Cuando era necesario, se añadía al medio la dosis del antibiótico de selección pertinente. Para el crecimiento en placa, se utilizó el mismo medio LB con la misma dosis de antibiótico con 1.5% (p/v) de agar. Las placas se incubaban 24 horas en una estufa a 37°C.

LB		
MEDIO LÍQUIDO	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Triptona	5 g/l
MEDIO CON AGAR	Agar	1.5% (p/v)
En H2O milliQ		
pH 7.5		

Tabla 2: Composición del medio LB líquido y con agar utilizados para el crecimiento de *E.Coli*.

1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen en la Tabla 3. Los mapas y la información relativa a estos plásmidos se detallan en el Anexo IV.

Plásmido	Comentario	Origen
pGBKT7-BD	El vector pGBKT7 expresa proteínas fusionadas a los aminoácidos 1-147 del dominio de unión <i>GAL4</i> . Promotor ADH1 (levadura) y T7. Contiene un epitopo c-Myc y un MCS. Marcador TRP1. Resistencia a Kanamicina.	Clontech
pGADT7-AD	El vector pGADT7 expresa una proteína de interés fusionada al dominio de activación <i>GAL4</i> . Promotor ADH1 (levadura) y T7. Contiene un epitopo hemaglutinina (HA tag) y un MCS. Marcador LEU2. Resistencia a Ampicilina.	Clontech
pCN2-CcnD3	CiclinaD3 de ratón clonada en vector Bluescript SK pCN2. Resistencia a Ampicilina.	M. Roussel
pGBKT7-BD-CcnD3	Inserto ciclinaD3 clonado en vector pGBKT7-BD. Colonia nº1. Crece en SD /-Trp. Resistencia a Kanamicina.	Celia Vived
Gal4 BD Cdk4 (Pcyc2065)	Fragmento 0.9 Kb amplificado de pMmCdk4 con EcoRI y BamHI fue clonado en pGBKT7 opened with EcoRI-BamHI. Resistencia a Kanamicina.	Eloi Gari (IRB Lleida)
pMmCdk4 Plasmid CMVp-Cdk4	Mus musculus <i>cyclin-dependent kinase 4</i> , mRNA (cDNA clon MGC: 54677), Sall-NotI en pCMV-SPORT6. Resistencia a Ampicilina.	Eloi Gari (IRB Lleida)
pGADT7 AD -Cdk4	Cdk4 de ratón clonado en vector pGADT7 AD. Resistencia a ampicilina. Colonia nº13.	Celia Vived
mCDK4-pCMV-3xFlagRfB	mouseCDK4-pCMV10 3xFlag RfB. Resistencia a Ampicilina.	Lluis Fajas (Universidad de Laussane)
Stx8	El gen Stx8 fue clonado en pcDNA3.1+C-eGFP por EcoRI/EcoRV. Resistencia a Ampicilina.	GenScript
Ndufb4	El gen Ndufb4 fue clonado en pcDNA3.1+C-DYK por HindIII/XhoI. Resistencia a Ampicilina.	GenScript
Pdia6	El gen Pdia6 fue clonado en pcDNA3.1+C-Myc por BamHI/XhoI. Resistencia a Ampicilina.	GenScript
XOR (Xdh) en pBluescript	El gen XOR (Xdh) de ratón fue clonado en pBluescript por ClaI y NotI. Resistencia a Ampicilina.	Minako Terao (Ins.Mario Negri, Milán).
pGADT7 AD -Stx8	Stx8, procedente de pcDNA3.1+C-eGFP-Stx8 (GenScript), clonado en el vector pGADT7-AD. Colonia 1. Resistencia a Ampicilina.	Celia Vived
pGADT7 AD -Ndufb4	Ndufb4, procedente de pcDNA3.1+C-DYK-Ndufb4 (GenScript), clonado en el vector pGADT7-AD. Colonia 18. Resistencia a Ampicilina.	Celia Vived
pGADT7 AD -Pdia6	Pdia6, procedente de pcDNA3.1+C-Myc-Pdia6 (GenScript), clonado en el vector pGADT7-AD. Colonia 2. Resistencia a Ampicilina.	Celia Vived
pGADT7 AD -Xdh	Xdh procedente de pBluescript-Xdh (GenScript), clonado en el vector pGADT7-AD. Colonia 1. Resistencia a Ampicilina.	Celia Vived

Tabla 3: Plásmidos utilizados en este estudio

1.3. Purificación de DNA plasmídico en *E.Coli*

Para la purificación del DNA plasmídico a partir de bacterias se utilizaban los métodos de Miniprep, Midiprep y Maxiprep, en orden creciente de volumen de cultivo bacteriano y,

por ende, de DNA obtenido. Estos ensayos están basados en el método de lisis alcalina que libera el DNA plasmídico de las células bacterianas y degrada el RNA. El DNA plasmídico se une selectivamente a la membrana de microfibras de una columna, se purifica mediante una serie de lavados para eliminar la contaminación de otros componentes bacterianos y, finalmente, se utiliza una solución de elución para liberar el DNA plasmídico de la membrana de microfibras. Con este método se elimina la necesidad de extracción con disolventes orgánicos y la precipitación con alcohol.

Material/reactivos

- Kit de purificación de DNA: Miniprep, Midiprep (Geneall, Lisboa, Portugal) o Maxiprep (Qiagen, Hilden, Alemania) según se requiera.
- Medio LB (Anexo II)

Protocolo

- Incubar las bacterias pertenecientes a una colonia del cultivo de *E. Coli* que contiene el plásmido de interés en el volumen correspondiente (Tabla 4) de LB con el antibiótico de selección.

	MINIPREP	MIDIPREP	MAXIPREP
Volumen cultivo inicial	10 ml	50 ml	100 ml
Rendimiento (μg de DNA)	50-100	100-350	500-850

Tabla 4: Volúmenes de cultivo necesarios y rendimiento obtenido de los métodos de purificación de DNA Miniprep, Midiprep y Maxiprep.

- Dejar crecer toda la noche a 37°C, con agitación.
- Seguir el protocolo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1.4. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo las distintas amplificaciones de fragmentos de DNA que se realizaron en este trabajo, se utilizaba la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que actuaran como cebadores de la DNA polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla 5.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Uso
D3CloR	GAATTCGGATCCGCGGCCGCCTACAGGTGAATGGCTGTGAC	Clonar ciclinaD3 en pGBKT7
D3N3	TGCTGTCCATCTGCACGAGA	
D3R1	GACGCAGGACAGGTAGCGATCCAG	
D3A	GAACGTTGTGACGTAGGAGC	Genotipado KO
RIP2	CAAGACTCCAGGGATTTGAGGGA	Genotipado TG
RIP3	ATTTGAGGGACGCTGTGGCTCTT	
RIP-4	CACAGCTATCAGTGGGAACTGTG	
mPDIA6Fw	GAAGATTATCAGGGTGGCAGAACGGGAGAAGC	Subclonación cDNA entero en pGADT7
mPDIA6Rv	CTCGTCCGACCACCATCATAGTCCACAGGAGAC	
mNdufb4Rv	GTCCAGTTTTCTTCCTGGATAAGTCTTTCCTTTC	
mStx8Rv	CTGCTGTTGTCCGATCTCATCAAAAACCCAAAC	
mXDHFw	CTGCCAGCCTGGATCCTTGAAGTGCCTCAGTG	
mXDHRv	CACCCCTCTAGCGGCTCTGTGTGCATGTTCTG	
Y2HD3F	CTGACTGAGAATTCGAGCTGCTGTGTTGCGAGGG	Amplificación inserto ciclinaD3
Y2HD3R	CTGACTGAGGATCCCTACAGGTGAATGGCTGTGA	

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Las condiciones de la reacción dependerán de la medida del DNA a amplificar, así como de las características de los oligonucleótidos. La reacción constaba de las siguientes etapas:

- i. Desnaturalización del DNA: 94 °C durante 0.5-2 minutos.
- ii. Hibridación: La temperatura viene determinada por la T_m de los oligonucleótidos. Se establece que la temperatura = $T_m - 5^\circ\text{C}$. 0.5-2 minutos.
- iii. Extensión: La temperatura aumenta hasta 72°C y la duración viene determinada por la medida del DNA a amplificar (1minuto/kb de DNA).

1.5. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA es una técnica utilizada para visualizar y/o purificar moléculas de DNA en un gel de agarosa, cuyo porcentaje varía en función de la medida del DNA a separar o el objetivo de la electroforesis. En este trabajo, se utilizaba esta técnica tanto para el genotipaje de los ratones utilizados como para la purificación y cuantificación de DNA. El porcentaje de agarosa utilizado para la preparación de los geles era del 1 o 2% dependiendo de la finalidad del experimento. Además, se usaba un marcador de peso molecular de medida conocida para determinar el peso molecular del DNA de interés. Para la visualización de las muestras de DNA, se añadía el agente intercalante del DNA, *SYBR Safe*, debido a la fluorescencia que emite cuando se excita con luz ultravioleta.

Material/reactivos

- Agarosa (50004, Lonza, Basilea, Suiza).
- Intercalante del DNA: *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (S33102, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU).
- Tampón TAE (Tris-Acetato EDTA) 1x a partir de TAE 50x (Anexo II).
- Tampón de carga (Lb5x) (Anexo II).
- Marcador de peso molecular 1Kb *DNA Ladder* (GC-015-003, Genecraft, Colonia, Alemania).

Protocolo

- Pesar la cantidad de agarosa que utilizaremos en función del % del gel que necesitemos preparar.
- Mezclar con Tampón TAE1x y colocar la suspensión en microondas hasta que el calor funde la agarosa y la suspensión adquiere consistencia de gel.
- Añadir intercalante del DNA: *Syber-SAFE*.
- Introducir el gel en la bandeja, añadir el peine con el número de pocillos deseado y dejar que solidifique.
- Una vez que el gel ha solidificado, sumergir la cubeta en TAE 1x y cargar el marcador de pesos moleculares en uno de los pozos.
- Añadir a las muestras el tampón de carga en una proporción 1:5, cargar las muestras en los pozos y dejarlas correr a un voltaje constante de 90V durante 30-35 minutos.
- Para la obtención de la imagen y visualización del DNA utilizar el *Quemidoc XRS* (*BioRad*, Hercules, California, EEUU) y el *software QuantityOne*.

1.6. Digestión con enzimas de restricción

Para la liberación de fragmentos de DNA con extremos adecuados para obtener

construcciones, se utilizaban enzimas de restricción. Los tiempos de digestión, así como el tiempo y la temperatura de inactivación (cuando se requiera), dependían del tipo de enzima utilizado. La cantidad de plásmido utilizada para llevar a cabo la digestión solía ser de 15-20 μg . La eficiencia de la digestión se comprobaba en un gel de agarosa (apartado 1.5, Materiales y Métodos), donde se corría una alícuota de la reacción de digestión y una alícuota del DNA sin digerir de forma adyacente.

En algunos casos, para evitar la religación del plásmido en ausencia de inserto, se defosforilaban los extremos 5' utilizando Fosfatasa Antartic (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EEUU).

Los enzimas utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Enzima de restricción	Diana de restricción	Casa comercial
BamHI	5'-G/GATCC-3'	New England Biolabs
BmtI	5'-GCTAG/C-3'	New England Biolabs
ClaI	5'-AT/CGAT -3'	New England Biolabs
EcoRI	5'-G/AATTC-3'	New England Biolabs
EcoRV	5'-GAT/ATC-3'	New England Biolabs
HindIII	5'-A/AGCTT -3'	Fermentas
NdeI	5'-CA/TATG-3'	New England Biolabs
NheI	5'-G/CTAGC -3'	New England Biolabs
NotI	5'-GC/GGCCGC-3'	New England Biolabs
SmaI	5'-CCC/GGG -3'	New England Biolabs
XbaI	5'-T/CTAGA-3'	New England Biolabs
XhoI	5'-C/TCGAG-3'	New England Biolabs

Tabla 6: Enzimas de restricción utilizados en este trabajo.

1.7. Generación de extremos romos

Cuando un enzima de restricción corta el fragmento de DNA, lo hace con un patrón específico que puede producir extremos cohesivos o extremos romos. Para rellenar extremos cortados con un enzima que deja 5' protuberantes y así convertirlos en romos, se utilizaba Klenow (New England Biolabs). Este enzima es un fragmento de la DNA polimerasa I de *E. Coli*, que carece de actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3' pero retiene la actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5'.

Material/reactivos

- Klenow Fragment (M0210S, New England Biolabs).
- dNTPs 10mM.
- EDTA 0.5M.

Protocolo

- Volumen final = 100 μ l
 - 50 μ l de DNA digerido
 - 2 μ l de *Klenow*
 - 10 μ l de H₂O
 - 5 μ l Tampón *Cutsmart* (New England Biolabs)
 - 33 μ l dNTPs 10mM
- Incubar durante 15 minutos a RT.
- Inactivar añadiendo EDTA a una concentración final de 10 mM y calentar durante 20 minutos a 75°C.

1.8. Purificación de fragmentos de DNA previa a la ligación

Para la purificación de vectores y productos de PCR se utilizaban los kits de Geneall (Lisboa, Portugal): Gel SV y PCR SV. El protocolo de purificación se llevaba a cabo, en ambos casos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.9. Cuantificación con λ DNA *HindIII*

Antes de proceder a la ligación, los fragmentos de DNA y los plásmidos aceptores correspondientes, debían cuantificarse utilizando *Lambda DNA HindIII Marker* (GC-015-008, Genecraft, Colonia, Alemania), que funciona como marcador de peso molecular en geles de agarosa y la intensidad de las bandas da información semicuantitativa de la

cantidad de DNA. Está completamente digerido con la enzima HindIII y se generan 8 fragmentos purificados de DNA cuyo tamaño tiene un rango que va desde los 125 pb a los 23,130 pb.

Los fragmentos de DNA se corrían en paralelo a un volumen determinado de marcador λ HindIII, de forma que intensidades parecidas en las bandas para ligar y las bandas λ HindIII, indicaban la cantidad aproximada de DNA de los fragmentos y plásmidos a ligar.

1.10. Ligación de fragmentos de DNA

A lo largo de este trabajo se llevaron a cabo ligaciones de fragmentos de DNA con el vector de interés. Tanto vector como inserto, fueron previamente digeridos con enzimas de restricción y purificados. El enzima utilizado para la reacción de ligación fue la T4 Ligasa (M0202S, New England Biolabs). La ligación se llevaba a cabo a 16°C durante toda la noche, con una relación molar 1:10 vector:inserto. Se incluía, también, un control negativo de ligación (o plásmido religado) en el cual se sustituía el inserto por el mismo volumen de agua.

Posteriormente, se transformaban las células competentes de *E.Coli* (apartado 1.12, Materiales y Métodos) con el producto de la ligación. De las colonias resultantes se seleccionaba un número significativo de clones y se comprobaban mediante Colony-PCR.

1.11. Análisis de clones positivos para la construcción mediante PCR de colonias o Colony-PCR

Para comprobar que la ligación y la transformación habían funcionado correctamente, se analizaban las colonias resultantes, utilizando oligonucleótidos para amplificar por PCR el fragmento de interés que se deseaba subclonar en el plásmido. Como molde o *template* se usaba el DNA procedente de las colonias.

- La mezcla de la reacción de PCR contenía lo siguiente:

Mezcla de PCR (25 μ l volumen final)	
Agua Milli-Q comercial estéril	18,75 μ l
1x Buffer sin $MgCl_2$ (Stock 10x)	2,5 μ l
200 μ M dNTPs (Stock 10mM)	0,5 μ l
2,5mM $MgCl_2$ (Stock 50mM)	1,25 μ l
1 μ M Primer Fw (Stock 100 μ M)	0,25 μ l
1 μ M Primer Rv (Stock 100 μ M)	0,25 μ l
MQT	0,5 μ l

Tabla 7: Mezcla de la reacción de PCR utilizada para la *Colony-PCR*

- Echar 24 μ l de la mezcla de la reacción de PCR en cada tubo.
- Seleccionar las colonias a partir de la placa de transformación de la ligación. Picar en condiciones estériles cada colonia (con una punta de pipeta estéril por colonia). Por un lado, plaquear en una placa de LB-agar con cuadrícula numerada para poder identificar posteriormente las colonias positivas y, acto seguido, sumergir la misma punta en un tubo de PCR que contuviera ya la mezcla de reacción.
- Seguir el siguiente protocolo de PCR:
 - Desnaturalización: 95°C - 5 minutos
 - Desnaturalización: 95°C - 1 minuto
 - Hibridación: 55°C - 1 minuto
 - Extensión: 72°C – Dependía de la medida del amplicón. Los tiempos de extensión eran de 1 min/Kb DNA. Fragmentos <1Kb=1 minuto
- Finalmente, analizar los productos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa del 1% para comprobar la presencia del amplicón y la medida de este.

} 30 ciclos

1.12. Transformación de los productos de ligación en cepa *E.Coli* XL1-Blue

La transformación es la introducción de DNA exógeno en una bacteria. Para ello, se

preparaban previamente bacterias XL1-Blue susceptibles a la transformación mediante el tratamiento con cloruro de rubidio.

Protocolo obtención bacterias competentes *E.Coli* de la cepa XL1-Blue

Material/reactivos

Todo el material (erlenmeyers, tubos de centrifugación, etc) que entraba en contacto con las bacterias era estéril y de un solo uso en la medida de lo posible. El material no desechable se destinaba exclusivamente a este uso, para evitar contaminaciones con DNA plasmídico.

- Medio LB (sin antibiótico)
- MOPS 100 mM pH 7
- Medio SOB pH 7

SOB	
Bactotripton	2%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl 1M	10 mM
KCl 1M	2,5 mM
Llevar a un volumen de 200 ml y ajustar a pH 7 con NaOH 5N. A continuación ajustar a 245 ml y autoclavar	
Agregar finalmente 2.5 ml de MgSO ₄ 1M (10 mM) y 2.5 ml de MgCl ₂ 1M (10 mM) que deben ser esterilizados antes de ser usados	

Tabla 8: Composición del medio SOB

- Solución TfBI pH 5,8

TfBI	
Acetato de potasio	30 mM
CaCl₂.2H₂O	10 mM
RbCl	100 mM
MnCl₂.4H₂O	50 mM
Glicerol	15%
Ajustar a pH 5,8 con ácido acético y esterilizar por filtración	

Tabla 9: Composición de la solución TfBI

- Solución TfBII

TfBII	
MOPS pH7	10mM
CaCl₂.2H₂O	75mM
RbCl	10mM
Glicerol	15%
Esterilizar por filtración	

Tabla 10: Composición de la solución TfBII

Protocolo

- Sembrar las células en una placa a partir del stock original de glicerol de -80°C. Hacer un pre-inóculo de 10 ml de LB en un tubo Falcon de 50 ml con una colonia (o con 100 µl de bacterias competentes) y crecer ON a 37°C con agitación.
- Inocular 250 ml de SOB con 1 ml del precultivo anterior y crecer a 37°C con agitación hasta una OD_{600nm} de 0.3.
- Pasar el cultivo a tubos *Nalgene* (99434, Rochester, NY, EEUU) de 250ml preenfriados e incubar en hielo durante 10 o 15 min.
- Sedimentar las células por centrifugación utilizando la centrífuga Avanti J-26 XP (Beckman Coulter) a 950-1300 g, con el rotor JA-14 (Beckman) a 4°C durante 10 min y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las células del precipitado en 33 ml de TfBI frío (preenfriado en hielo).
- Incubar en hielo durante 15-30 min.
- Sedimentar las células por centrifugación a 950-1300 g, con el rotor JA-20 (Beckman) a 4°C durante 15 min y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 8 ml totales de TfBII frío (preenfriado en hielo).
- Incubar en hielo durante 15 min.
- En la cámara fría, fraccionar la suspensión celular en alícuotas de 100 µl en tubos *ependorf* 1.5 ml estériles, usando pipetas y puntas preenfriadas a 4°C.

- Congelar en nitrógeno líquido cada alícuota de 100 μ l y almacenar los tubos a -80°C .

Protocolo transformación *E.Coli*

Para introducir el DNA plasmídico de interés en la cepa bacteriana XL1-Blue, se procedía a la transformación utilizando el siguiente protocolo:

- Descongelar 100 μ l de células competentes en hielo.
- Agregar 50-100 ng de DNA plasmídico, o 1-3 μ l de ligación.
- Una vez mezclado el DNA y las bacterias, dejar en hielo durante 20 minutos.
- Realizar un *shock* térmico a 42°C durante 30 segundos.
- Para finalizar este *shock*, incubar durante 2 minutos en hielo.
- Agregar 1 ml de medio LB sin antibiótico e incubar durante 1-2 horas a 37°C en agitación.
- Plaquear diferentes volúmenes de la transformación (50 μ l y 100 μ l) en una placa de LB con el antibiótico correspondiente.
- Incubar la placa a 37°C durante 12-14 horas.

1.13. Análisis del DNA por secuenciación

Para comprobar la secuencia de las construcciones, así como la identidad de los candidatos que interactúan con la ciclinaD3 en los ensayos Y2H, se realizaba la secuenciación de los fragmentos de DNA de interés. Para ello, se diseñaban los oligonucleótidos necesarios que hibridaran con una parte de la secuencia de interés (Tabla 11). La secuenciación se llevaba a cabo en la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), utilizando el método de Sanger.

Oligonucleótidos (secuenciación)	Secuencia (5' - 3')
D3CloR	GAATTCGGATCCGCGGCCGCTACAGGTGAATGGCTGTGAC
D3R1	GACGCAGGACAGGTAGCGATCCAG
Y2H-AD Seq	AGATGGTGCACGATGCACAG
LgBiT Fw Seq	CACTGTAACAGGGACCCTGTG
Sm/LgBiT Rv Seq	GCATCACAAATTTACAAATAAAGC
SmFw Seq	GTTCTATGATGACACAAACCCCGC
AD Seq	AGATGGTGCACGATGCACAG
BD Seq	TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC
T7 Seq	TAATACGACTCACTATAGGG
mPDIA6Fw	GAAGATTATCAGGGTGGCAGAACGGGAGAAGC
mPDIA6Rv	CTCGTCCGACCACCATCATAGTCCACAGGAGAC
mNdufb4Rv	GTCCAGTTTTCTTCTTGATAAGTCTTTCCTTTC
mStx8Rv	CTGCTGTTGTCGGATCTCATCAAACCCAAAC
mXDHFw	CTGCCCAGCCTGGATCCTTGAAGTACTGACCTCAGTG
mXDHRv	CACCCCTCTAGCGGCTCTGTGTGCATGTTCTG

Tabla 11: Oligonucleótidos diseñados en este trabajo para el análisis del DNA por secuenciación.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

2.1. Obtención de muestras

2.1.1. Obtención de lisados celulares de NIT-1

Material/reactivos

- Medio DMEM suplementado (Lonza), 25mM Glucosa.
- Raspador celular (08-100-242, Fisherbrand-ThermoFisher).
- Tampón de lisis no desnaturizante:

Tampón de Lisis No Desnaturizante	
Tris.HCl pH 7.4	25mM
BSA	0.1%
NaCl	150mM
EDTA	1mM
Glicerol	5%
Cocktail inhibidores de proteasas (Thermo Scientific)	1/50

Tabla 12: Composición buffer lisis no desnaturizante utilizado para la lisis celular NIT-1.

Protocolo

- Para la obtención de lisados celulares de insulinoma murino NOD NIT-1, partir de un cultivo celular incubado durante el tiempo necesario a 37°C, en condiciones

estándar de cultivo celular.

- Eliminar el medio de cultivo de las células y lavar con PBS frío dos veces.
- Añadir tampón de lisis no desnaturizante (Tabla 12) (para detectar, por ejemplo, interacciones en ensayos de Co-IP) e incubar las células en hielo durante 5 minutos con agitación periódica manual. Se añade 1 ml tampón de lisis/10 millones de células.
- Despegar las células de la placa de cultivo utilizando un raspador celular (*cell scraper*) en frío y pasarlas a un eppendorf de 1.5 ml en hielo.
- Dejar incubando en una noria (agitación con rotación) durante 15-30 minutos a 4°C.
- Posteriormente, centrifugar a máxima velocidad (17000g) durante 10 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a nuevos tubos en hielo inmediatamente, descartando el precipitado y dejar las muestras en hielo.

2.1.2. Obtención de extractos proteicos en levadura

Para la obtención de extractos proteicos de levadura se llevaba a cabo la lisis con perlas de cristal o *glass beads*. Es un método físico de obtención de proteína total de levadura, que permite romper la pared celular, debido a la fuerza con la que las perlas de cristal golpean las células cuando son sometidas a una fuerte tracción mecánica.

Material/reactivos

- Urea 5M
- Perlas de cristal (Sigma)
- SR4x: 8% SDS en Tris-HCl 0.5M pH6.8
- Tampón de carga de proteínas desnaturizante (Anexo II)

Protocolo

- Incubar los cultivos de levadura hasta llegar a la absorbancia deseada.
- Centrifugar 10 ml de cultivo a 900g durante 5 minutos a 4°C.
- Lavar las células con 1 ml de H₂O MilliQ autoclavada y centrifugar a 13800g durante 2 minutos a 4°C.
- Resuspender el pellet en 15 µl de urea 5M y calentar a 90°C durante 2 minutos.
- Añadir perlas de cristal a la suspensión (3/4 partes del tubo, v/v).
- Con el *Rybolyzer* (Mini-BeadBeater 16 Cell Disrupter, MBB-16, BioSpec, Oklahoma, EEUU), romper de forma mecánica las células en 3 ciclos de 45 segundos a una velocidad 5.5.
- Añadir 50 µl SR1x y mezclar vigorosamente con vortex durante 5 segundos.
- Calentar 2 minutos a 90°C.
- Transferir el lisado a un tubo mediante centrifugación a 17000g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares.
- Recoger el sobrenadante y cuantificar la proteína.
- Preparar la muestra para electroforesis SDS-PAGE:
 - Añadir tampón de carga
 - Hervir durante 5 minutos a 95°C. La muestra está preparada para el análisis por *Western Blot*.

2.1.3. Obtención de lisados celulares de islotes pancreáticos murinos

Materiales y métodos

- Lupa binocular.
- Tijeras, pinzas, pinzas tipo mosquito.

- Jeringuilla de 5 ml y aguja de 30G.
- Solución de digestión: 5 mg Colagenasa P (Roche) en 5 ml HBSS (10-547F, Lonza).
- Pipetas *Pasteur* de plástico.

Protocolo

- Sacrificar los ratones por dislocación cervical y realizar la laparatomía del ratón, localizando el conducto biliar común o colédoco. Al final de este, se encuentra la ampolla de váter, la cual es necesario pinzar para evitar que la colagenasa, una vez inyectada, se dirija hacia la luz intestinal.
- Inyectar 2 ml de colagenasa fría disuelta en HBSS a través del colédoco con una aguja de 30G (canulación del ducto pancreático). Así, la solución enzimática entra en el colédoco infundiéndolo el tejido pancreático. Si la inyección se realiza correctamente, el páncreas se hincha como se puede observar en la Figura 28.

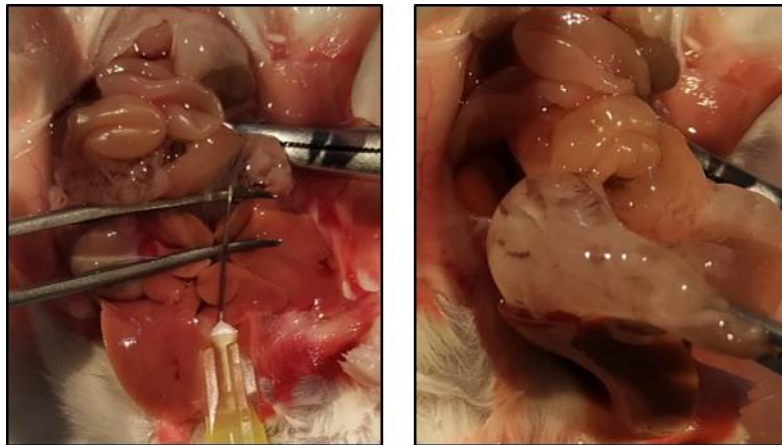


Figura 28: Imágenes de un páncreas hinchado tras la canulación con la solución de colagenasa. Fotografía original de la autora.

- Extraer el páncreas e incubar con 3 ml de solución de digestión durante 7 minutos en un baño a 37°C con agitación ocasional. Disgregar los tejidos mecánicamente utilizando una pipeta *Pasteur* de plástico y parar la digestión añadiendo 45 ml de HBSS-0.5% FBS frío.
- Digerir el páncreas una vez infundido en la solución de digestión para aislar manualmente con lupa binocular los islotes así separados del páncreas exocrino.
- Los tubos que contienen el tejido se mantienen en hielo durante 5 minutos y la capa

de lípidos que queda en el sobrenadante se descarta por decantación hasta dejar aproximadamente 20-25 ml en el tubo.

- Añadir HBSS-0.5% FBS hasta 45 ml y aislar los islotes de forma manual. Colocar los páncreas disgregados en placas de Petri de 10 cm de diámetro y recoger los islotes con una micropipeta bajo una lupa binocular (2x) depositándolos en un tubo con HBSS-0.5% FBS mantenido en hielo durante todo el proceso de aislamiento.
- Utilizar un fondo negro para diferenciar páncreas exocrino de islotes, ya que estos últimos muestran un característico color blanco refringente. Este aislamiento se realiza dos veces: una, a partir de los páncreas disgregados (“pesca”) y una segunda, a partir de lo obtenido en el primer aislamiento (“repesca”). Los tubos con HBSS-0.5% FBS se mantienen en hielo durante todo el procedimiento.

2.2. Métodos de estudio de la expresión de RNA

2.2.1. Extracción de RNA

Material/reactivos

El material fungible desechable utilizado estaba libre de RNAsas y DNAsas, igual que los reactivos empleados.

- Cloroformo (Sigma)
- Trizol (MRC, Ohio, EEUU)
- Isopropanol (Sigma, San Luis, EEUU)
- Etanol (etOH) 75%

Protocolo

- Resuspender las células NIT-1 o los islotes pancreáticos de ratón en 1 ml de Trizol.
- Incubar 5 minutos a RT.
- Añadir 200 µl de cloroformo.

- Agitar 15 segundos vigorosamente.
- Incubar 3 minutos a RT.
- Centrifugar 15 minutos a 12000g a 4°C.
- Pasar la fase acuosa superior a tubos nuevos.
- Añadir 500 µl de isopropanol. Agitar los tubos en vortex.
- Incubar 10 minutos a RT.
- Centrifugar 10 minutos a 12000g a RT.
- Tirar el sobrenadante y lavar el pellet con 1ml de etOH (75%), agitar con vortex y centrifugar 5 minutos a 7500g, a 4°C.
- Aspirar el sobrenadante y dejar evaporar todo el etOH.
- Añadir 20 µl de H₂O comercial libre de RNAsas.
- Incubar a 60°C durante 5 minutos.
- Cuantificar el RNA total mediante NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, EEUU) a 260 nm.

2.2.2. Transcripción reversa y obtención de DNA complementario (cDNA)

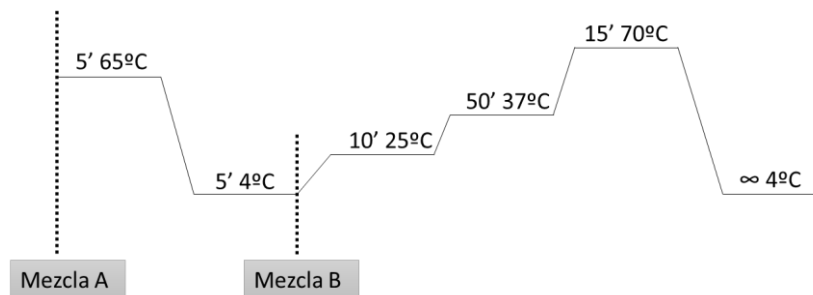
Para poder analizar la expresión génica mediante qRT-PCR es necesaria la síntesis del DNA complementario, a partir del RNA mensajero mediante la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción.

Material/reactivos

Mezcla A (20 μ l volumen final reacción)	Mezcla B (20 μ l volumen final reacción)
0,25 μ l Hexámeros aleatorios (Thermo-Fisher Scientific)	4 μ l Buffer 5x
1 μ l dNTPs 10x (Invitrogen)	2 μ l DTT (Thermo-Fisher Scientific)
	0,5 μ l RNAsa out (Thermo-Fisher Scientific)
	1 μ l Transcriptasa Reversa (Invitrogen)

Tabla 13: Composición de las mezclas A y B utilizadas para la retrotranscripciónProtocolo

- Añadir 1,25 μ l de Mezcla A a cada tubo. Añadir 1 μ g de RNA. Completar el volumen de la reacción hasta 11.25 μ l con agua comercial libre de RNAsas.
- Iniciar la reacción en el termociclador con un paso inicial a 65°C durante 5 minutos y dejar los tubos en hielo durante 5 minutos (Figura 29).

**Figura 29: Esquema de la reacción de retrotranscripción.** Las Mezclas A y B se añaden en los pasos de la reacción que se indican.

- Añadir 7,5 μ l de la Mezcla B, hacer un spin y continuar la transcripción reversa.
- El cDNA obtenido queda a una concentración de 50 ng/ μ l. Se puede conservar a -20°C/-80°C o continuar con el análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa o a tiempo real.

2.2.3. PCR cuantitativa o a tiempo real (qRT-PCR)

Una vez retrotranscrito el RNA en cDNA, se analizó la expresión cuantitativa de los genes de interés mediante Real Time PCR (RT-PCR).

Material/reactivos

- Mezcla de oligonucleótidos (directo o *Forward* + reverso o *Reverse*) 18 μ M.
- Sonda *SYBR Green* (4344463, Thermo Scientific).
- Película selladora *Microseal® 'B' Adhesive Seals Optical* (MSB1001, BioRad).

Protocolo

Para cada muestra de cDNA, se utilizaban 10 ng de cDNA y 900 nM de oligonucleótidos. Se analizaban tres réplicas por cada muestra de cDNA y se realizaba duplicado técnico en las placas de PCR.

- Preparar para cada gen que se quiera analizar una mezcla inicial de 25 μ l, que contenga:
 - 1 μ l de cDNA
 - 2.5 μ l de la Mezcla de oligonucleótidos 18 μ M del gen de interés
 - 21.5 μ l de agua autoclavada
- Dividir esta mezcla en dos pocillos de la placa (duplicado técnico) cargando 10 μ l/pocillo.
- Añadir 10 μ l de sonda SYBR Green en cada pocillo.
- Utilizar la película para cubrir la placa.
- Centrifugar la placa durante 1 minuto.
- Iniciar el programa de PCR en termociclador *Mini-48 well T100™* (BioRad):
 - Choque térmico a 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos
 - 40 ciclos de amplificación y detección:
 - 95 $^{\circ}$ C durante 15 segundos (desnaturalización)
 - 60 $^{\circ}$ C durante 1 minuto (hibridación y elongación)

Los resultados fueron calculados utilizando el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) y se normalizaron con el gen constitutivo o *housekeeping* GAPDH.

- La Tabla 14 muestra las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de qRT-PCR.

Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para RT-PCR		
Gen	Oligonucleótidos	
mBip	for	5'-CAGATCTTCTCCACGGCTTC-3'
	rev	5'-GCAGGAGGAATTCCAGTCAG-3'
mChop	for	5'-CGAAGAGGAAGAATCAAAAACCTT-3'
	rev	5'-GCCCTGGCTCCTCTGTCA-3'
mAtf4	for	5'-AGCAAAACAAGACAGCAGCC-3'
	rev	5'-ACTCTCTTCTTCCCCTTGC-3'
mIL-1 β	for	5'-AATCTATACCTGTCTGTGAATGAAAGAC-3'
	rev	5'-TGGGTATTGCTTGGGATCCA-3'
mGAPDH	for	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	rev	5'-CCTGCTCACCACCTTCTTGA-3'
mPDIA6	for	5'-CAGAACGGGAGAAGCCATTG-3'
	rev	5'-TATCACCTCTGCCCTGCTTT-3'
mStx8	for	5'-GTCGACACGCCAGATAACAC-3'
	rev	5'-TTCCTCGCTTTGCTTCTTCG-3'

Tabla 14. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de Real Time- PCR

2.3. Métodos de estudio de la expresión de proteínas

2.3.1. Cuantificación por BCA

Se determinaba la concentración de proteínas mediante el método de BCA (ensayo de ácido bicinconínico) de Bio-Rad (DC Protein Assay), manteniendo siempre las muestras en hielo.

Material/reactivos

- Placa de 96 pocillos (Corning, Nueva York, EEUU).
- DC™ Protein Assay (BioRad)
- Preparación de la Curva Patrón y un stock de BSA (albúmina de suero bovino).

μg proteína	0	25	75	125	250	500	750	1000	1500	2000
2.82 mg/ml BSA (μL)	0	8.8	26	44	88	177	265	354	531	709
H ₂ O (μL)	1000	991.2	974	956	912	823	735	646	469	291

Tabla 15: Curva patrón de BSA

Protocolo

- Añadir 20 μl de la solución S (solución surfactante) por cada 1 ml de la solución A (solución de tartrato de cobre alcalino). Mezclar con vortex y añadir 25 μl por pocillo.
- Preparar la muestra problema diluyéndola en agua 1/25 (v/v).
- Añadir 5 μl de muestra en los pocillos destinados a las muestras y 5 μl de curva patrón en los pocillos destinados a la curva patrón.
- Añadir 200 μl de la solución B (reactivo folin diluido) a cada pocillo y se agita la placa con cuidado.
- Dejar incubando la placa en oscuridad durante 15 minutos a RT.
- Medir la absorbancia en un lector de placa a 750 nm de longitud de onda. Esta absorbancia es estable durante 1 hora.

2.3.2. Técnicas electroforéticas de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Se utilizaba SDS-PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) para la separación de proteínas según su peso molecular. Los geles se formaban por la polimerización de la acrilamida debido a la acción de un agente entrecruzador, la bisacrilamida, en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se utilizaba el TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato (S_2O_8^-) que se añade en forma de persulfato amónico. La porosidad del gel la determinan el porcentaje de poliacrilamida y bisacrilamida. En la electroforesis, las proteínas son sometidas a un campo eléctrico y se desplazan en función de su peso molecular sobre el soporte de acrilamida gel así formado. Cuando las condiciones son desnaturalizantes (agente reductor y detergente aniónico en el tampón de carga), esta migración asegura la completa desnaturalización de la proteína, es decir, la pérdida de la estructura tridimensional. El agente desnaturalizante empleado es el detergente aniónico sodiododecilsulfato o SDS, el cual se une a las cadenas polipeptídicas confiriendo una carga neta negativa proporcional a la masa de la proteína. Esto hace que todas las proteínas viajen hacia el ánodo y que la migración guarde una relación inversamente proporcional a la masa.

2.3.2.1. Preparación de los geles

Se utilizaba un sistema discontinuo en el cual el primer gel (empaquetador) provocaba un apilamiento de las proteínas en los pocillos y, el segundo gel (separador), separaba las proteínas en función de su carga eléctrica/peso molecular.

Material/reactivos

Para la preparación de los geles se utilizaba el sistema Mini Protean 3 (BioRad). La composición de la mezcla para la polimerización de los geles se detalla en la Tabla 16.

	Empaquetador	Separador
0.5M Tris-HCl pH 6.8	125mM	-
1.5M Tris-HCl pH 8.8	-	375 mM
Acrilamida/Bis acrilamida (30:0,8) (p/p)	5%(v/v)	7.5-12% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
Persulfato amónico	0,005% (p/v)	0,005% (p/v)
TEMED	0,025% (v/v)	0,025% (v/v)

Tabla 16: Composición de los geles utilizados para la electroforesis

Protocolo

- Preparar el gel separador de 1 cm y cuando polimerice, añadir la mezcla del gel empaquetador y el peine para crear los pocillos en el gel.
- Una vez que los geles están polimerizados, cargar las muestras en los pocillos. La cantidad de proteína oscila entre 40-60 μ g, dependiendo del nivel de expresión esperado para cada antígeno.
- Cargar en el primer pocillo un marcador de peso molecular como referencia (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*, 26619, Thermo Fisher Scientific).

2.3.2.2. Características de la migración o *Running*

Material/reactivos

- Tampón de migración pH8.8:

Tampón de migración	
Tris-HCl pH8,8	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1% (p/v)

Tabla 17: Composición del tampón de migración (*Running buffer*)

Protocolo

- Una vez cargadas las muestras en el gel, añadir tampón de migración (Tabla 17) a la cubeta de electroforesis.
- Aplicar una intensidad de corriente constante de 40mA durante 1 hora y media aproximadamente.
- Para normalizar los resultados finales del *Western Blot* por carga de proteína, cuantificar los niveles de un gen constitutivo como la β -actina.

2.3.3. Inmunodetección de proteínas por *Western Blot*

La inmunodetección de proteínas por *Western Blot*, es una técnica que permite la detección de proteínas previamente separadas electroforéticamente y transferidas a una membrana utilizando la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse a sus antígenos formando inmunocomplejos.

2.3.3.1. Transferencia de proteínasMaterial/reactivos

- Tampón de transferencia:

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	480 mM
Glicina	39 mM
SDS	0.0375% (p/v)
Metanol	10% (v/v)

Tabla 18: Composición del tampón de transferencia

- Membranas de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*, GE Healthcare).

Protocolo

- Activar la membrana, eliminando la hidrofobicidad de esta. Incubar en metanol durante 2 minutos, 2 minutos en agua y finalmente, mantener en tampón de transferencia (Tabla 18).
- Una vez finalizada la electroforesis, separar el gel de los cristales y eliminar la sección empaquetadora (los pocillos) de la parte del gel dedicada a la separación.
- Incubar en tampón de transferencia durante 2 minutos.
- Utilizar el sistema húmedo (BioRad) mediante el cual las proteínas de los geles de poliacrilamida son electrotransferidas a una membrana de PVDF. El campo eléctrico

utilizado se orienta perpendicularmente a la superficie del gel, situado en el electrodo negativo (cátodo) permitiendo que las proteínas negativamente cargadas pasen del gel a la membrana, situada entre el gel y el electrodo positivo (ánodo).

- Aplicar una intensidad de corriente de 300 mA durante una hora y media con bloque refrigerador para evitar el sobrecalentamiento. La orientación y colocación específica de los elementos necesarios para la transferencia se detalla en la Figura 30.

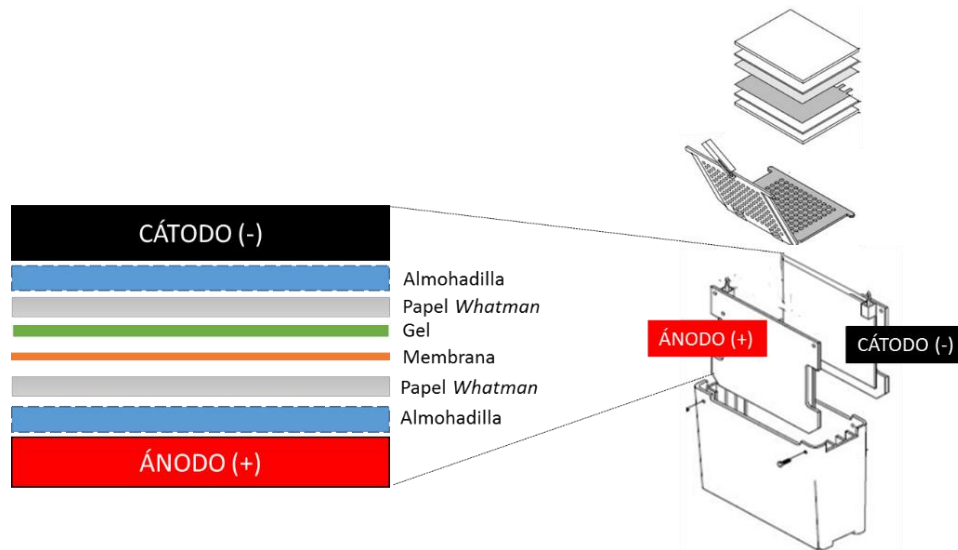


Figura 30: Montaje del sistema húmedo de transferencia. El gel se sitúa próximo al cátodo mientras que la membrana se sitúa cerca del ánodo, permitiendo la transferencia de las proteínas cargadas negativamente hacia el electrodo positivo. Figura modificada basada en *Mini Trans-Blot® Cell* de BioRad.

2.3.3.2. Tinción de geles de SDS-PAGE post-transferencia

Material/reactivos

- Solución colorante y decolorante:

Tinción de geles	
A) Solución colorante	B) Solución decolorante
0.1% Azul de Coomassie	50% Metanol
50% Metanol	10% Ácido acético
10% Ácido acético	

Tabla 19: Soluciones utilizadas para la tinción de geles

Protocolo

- Para comprobar la calidad de la transferencia, realizar la tinción del gel después de la transferencia con Azul de Coomassie (Tabla 19-A), el cual se deja durante toda la noche en solución colorante en agitación.

- Posteriormente, utilizar una solución decolorante (Tabla 19-B) para desteñir el gel hasta que quede transparente (excepto en las zonas con proteínas) y se pueden observar las bandas proteicas de color azul.

2.3.3.3. Inmunodetección de antígenos transferidos a la membrana

Material/reactivos

- Tampón TBST:

Tampón TBST	
Tris-HCl pH 8	20 mM
NaCl	125 mM
Tween-20	0.1% (v/v)

Tabla 20: Composición del tampón TBST

- Solución de bloqueo:

Solución de bloqueo	
Leche	2.5% (p/v)
en tampón TBST	

Tabla 21: Composición de la solución de bloqueo

Protocolo

- Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana, bloquearla mediante una solución rica en proteínas inespecíficas (Tabla 21). Las proteínas de la solución de bloqueo se unen a la membrana en aquellos lugares donde no se han unido las proteínas procedentes de la transferencia. Incubar la membrana en solución de bloqueo durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
- Decantar la solución de bloqueo y sustituir por la solución de inmunodetección, la cual contiene el anticuerpo primario diluido en TBST (Tabla 20). En función del anticuerpo, se puede incubar desde una hora a temperatura ambiente hasta 12 horas a 4°C, en agitación.
- Lavar la membrana 2-3 veces con TBST (Tabla 20) durante 5-10 minutos/cada lavado.

- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario que reconozca inmunoglobulinas de la especie a la cual pertenece el anticuerpo primario (conjugado a peroxidasa de rábano) diluido en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
- Lavar la membrana 2-3 veces con TBST durante 5-10 minutos/cada lavado.
- Incubar la membrana durante 1 minuto con el sustrato (*Clarity Western ECL Substrate*, BioRad).
- Revelar la membrana con el equipo Chemidoc XRS (Bio-Rad). Adquirir, analizar y cuantificar las imágenes mediante el programa *Image Lab Version 4.0.1* (Bio-Rad).

2.3.3.4. Anticuerpos utilizados para *Western Blot*

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Referencia	Tiempo-T ^a de incubación
anti-CiclinaD3	1:500	BD	5082573	ON-4°C
anti-Ndufb4	1:1000	Abcam	ab192243	ON-4°C
anti-Pdia6	1:1000	Abcam	ab11432	ON-4°C
anti-IRS2	1:1000	Abcam	ab134101	ON-4°C
anti-IRS1	1:1000	Abcam	ab52167	ON-4°C
anti-Stx8	1:1000	Santa Cruz	sc-376521	ON-4°C
anti-Xdh	1:1000	Abcam	ab109235	ON-4°C
anti-Flag M2, Clone M2	1:1000	Sigma-Aldrich	F1804	ON-4°C
anti-c-Myc	1:1000	Sigma	M4439	ON-4°C
anti-GFP	1:5000	Clontech	632380	ON-4°C
anti-HA (Clone 3F10)	1:4000	Roche	11867423001	ON-4°C
anti-CREB2 (ATF4)	1:500	Santa Cruz	sc-390063	ON-4°C
anti-Chop	1:1000	Cell Signaling	2895	ON-4°C
anti-β-actina	1:2000	Life technologies	AM4302	1h-RT
anti-Dyk (FG4R)	1:1000	ThermoFisher	MA1-91878	ON-4°C
anti-Myc	1:1000	Biolegend	626801	ON-4°C
anti-Cdk4	1:1000	Sigma	C8218	ON-4°C
anti-GST	1:1000	GE Healthcare	27-4577-50	ON-4°C
Anti-G3PDH	1:7000	P. Moradas-Ferreira (Univ.Oporto)		ON-4°C

Tabla 22: Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo

Anticuerpo secundario	Dilución	Origen	Referencia	Tiempo-T ^a de incubación
anti-Rabbit	1:2000	InmunoStep	1399990164	1h-RT
anti-Goat	1:10000	Jackson	129615	1h-RT
anti-Mouse	1:10000	Jackson	127655	1h-RT

Tabla 23: Anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo

3. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

3.1. Línea NIT-1 de insulinoma murino NOD

La línea celular de insulinoma NIT-1 *wild-type* proviene del ratón transgénico NOD/Lt. Contiene un transgén híbrido con el promotor de la insulina de rata, que promueve la expresión del antígeno T grande del virus SV40 y desarrolla de forma espontánea adenomas de célula beta (Leiter, 1991).

Por otro lado, se obtuvieron tres clones de células NIT-1 deficientes en ciclinaD3 por tecnología CRISPR, mediante la inserción de nucleótidos que introducen cambios en la pauta de lectura, así como sus respectivos controles (Genoway, Lyon, Francia). Los clones NIT-1 control, habían sufrido las mismas manipulaciones que las KO, sin embargo, no incorporaron ninguna mutación en el gen de la ciclinaD3.

El medio de cultivo utilizado para mantener la línea celular fue DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, FBS (inactivado) 10%, penicilina-estreptomicina 1%, 1mM NaPyr y β -mercaptoetanol 5 μ M. La concentración de glucosa para el mantenimiento de la línea era de 25mM. Todos los experimentos de cultivos celulares de NIT-1 se llevaron a cabo incubando las células en una atmósfera húmeda (5% CO₂, 95% humedad relativa y 37 °C).

3.1.1. Transfección de células NIT-1

Material/reactivos

- Metafectene Pro (T0440, Biontexp, Munich, Alemania).
- Solución A: 1 μ g de DNA circular en 100 μ l de PBS.
- Solución B: 6 μ l de Metafectene Pro en 100 μ l de PBS.
- Medio DMEM suplementado.

Protocolo

- Incubar las células hasta alcanzar un 80% de confluencia.
- Mezclar la solución A y B e incubar a temperatura ambiente durante 15-20 min.
- Posteriormente, añadir la solución a las células NIT-1 gota a gota e incubar con la mezcla A+B durante un día y medio a 37°C.
- Utilizar como controles células NIT-1 transfectadas con plásmido vacío (pBSK-Neo o

pcDNA3.1), sin cDNA subclonado y células NIT-1 sin transfectar, respectivamente.

3.1.1.1. Transfección estable

Material/reactivos

- Geneticina (G418) (LM-A4115, Biosera, Nuaille, Francia).
- Medio DMEM suplementado.

Protocolo

- Para la generación de una línea celular transfectante estable, subclonar el transgén de interés en un vector que exprese como marcador de selección, el gen de resistencia a neomicina/geneticina (Recillas-targa, 2006).
- El día tres post-transfección eliminar el medio con la mezcla A+B y dejar que las células se recuperen de la transfección por un periodo de 24 a 72 horas en medio sin selección.
- Una vez pasado este tiempo, cambiar el medio por medio con geneticina para la selección de los clones. Las células NIT-1 transfectadas de forma estable se seleccionan mediante la adición de geneticina a una concentración de 0.4 mg/ml durante 14 días, cambiando el medio cuando es necesario. Después de este tiempo, se obtienen las células que sobreviven y se consideran transfectantes estables.

3.1.1.2. Transfección transitoria

Los métodos de transfección transitoria no seleccionan las células que han integrado el transgén en su núcleo, con lo cual no se tiene control del nivel de expresión de proteínas. Sin embargo, es una técnica rápida y sencilla que, además, evita problemas de toxicidad potencial del cDNA. En este caso, una vez realizada la transfección, las células NIT-1 se mantenían con el medio sin selección (geneticina). La transfección transitoria se utilizó en los experimentos correspondientes a ensayos de interacción proteica del tipo NanoBiT (apartado 5.2., Materiales y Métodos).

3.1.2. Contaje de número de células

Material/reactivos

- Cámara *Neubauer*.
- Solución azul de tripano 0.4% (T8154, Sigma).

Protocolo

- Diluir 10 μl de la suspensión celular en 90 μl de azul de tripano.
- Utilizar 10 μl de esta mezcla para el conteo en un volumen final de conteo de 0.1mm³ por cuadrante unitario.
- Extrapolar el número de células blancas refringentes (viables) obtenido al volumen total correspondiente a la suspensión celular aplicando la siguiente fórmula de recuento celular:

$$[\text{Media del número de células de 3 cuadrantes unitarios} \times 10^4 \times 10 (\text{factor de dilución})] \times \text{volumen de la suspensión} = \text{n}^\circ \text{ total de células}$$

3.2. Cultivo de islotes pancreáticos de ratón

Los islotes de ratones hembra se obtenían mediante la técnica de canulación (apartado 2.13., Materiales y Métodos). Se mantenían a 37°C, a 90% humedad y CO₂ al 5% durante el tiempo requerido según el tipo de tratamiento, utilizando 25-30 islotes por condición.

3.2.1. Inducción de estrés con citoquinas proinflamatorias

Para analizar la fragmentación nuclear o %subG1 (apartado 8.1., Materiales y Métodos) como medida de apoptosis tardía inducida por inflamación, los islotes se exponían a una mezcla o *cocktail* de citoquinas proinflamatorias. Para ello, una vez aislados, los islotes se mantenían en medio DMEM suplementado (Lonza, Basilea, Suiza) con la concentración de glucosa indicada durante 1 hora, previa a la adición de citoquinas. Las citoquinas (100 U/ml IL1 β , 1000 U/ml TNF α y 100 U/ml IFN- γ) se añadían después de este tiempo de recuperación, por periodos de bien 24 horas o 120 horas (5 días) (Thomas et al., 1999).

3.2.2. Inducción de estrés con tapsigargina

Para la inducción de estrés de retículo endoplásmico (ER) se trataban los islotes con tapsigargina (67526-95-8, Sigma), un agente inductor de estrés por depleción de calcio en el retículo endoplásmico (Thomas and Hanley, 1994; Zhang and Ren, 2011). Este compuesto se utilizaba como inductor de ER para el análisis de expresión de genes relacionados con estrés de retículo así como para medir la inducción de apoptosis. Para ello, los islotes se cultivaban en medio DMEM suplementado, a 5mM de glucosa y se añadía 1 μM de tapsigargina durante 24 horas.

4. SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO

4.1. *Saccharomyces cerevisiae*: cepas y condiciones de crecimiento

4.1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Las cepas de *S.cerevisiae* utilizadas se enumeran en la Tabla 24.

Cepa	Genotipo	Comentarios	Origen
Y2HGold	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1UAS–Gal1TATA–His3, GAL2UAS–Gal2TATA–Ade2 URA3 : : MEL1UAS–Mel1TATA AUR1-C MEL1	Derivado de la cepa PJ69-2A (James et al., 1996). (Nguyen, Unpublished)	Clontech
Y187	MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met–, URA3 : : GAL1UAS–Gal1TATA–LacZ, MEL1	(Harper et al., 1993)	Clontech
Y2HGold-pGBKT7-53	Y2HGold [pGBKT7-53]::TRP1	Cepa Y2HGold en la que se inserta el vector pGBKT7-53, que codifica el Gal4 DNA-BD fusionado con p53 murino	Clontech
Y2HGold-pGBKT7-Lam	Y2HGold [pGBKT7-Lam]::TRP1	Cepa Y2HGold en la que se inserta el vector pGBKT7-Lam, que codifica el Gal4 BD fusionado con lamina	Clontech
Y187-pGADT7-T	Y187 [pGADT7-T]::LEU2	Cepa Y187 en la que se inserta el vector pGADT7-T que codifica el Gal4 AD fusionado con el antígeno T SV40	Clontech
Y2HGold-BDCcnD3	Y2HGold [pGBKT7 (CcnD3)]::TRP1	Cepa Y2HGold en la que se inserta ciclinaD3 con el plásmido pGBKT7	Celia Vived
Y2HGold-BDsolo	Y2HGold [pGBKT7]::TRP1	Cepa Y2HGold en la que se inserta el plásmido pGBKT7	Celia Vived
Y187-ADPdia6	Y187 [pGADT7 (Pdia6)]::LEU2	Cepa Y187 en la que se inserta Pdia6 con el plásmido pGADT7	Celia Vived
Y187-ADStx8	Y187 [pGADT7 (Stx8)]::LEU2	Cepa Y187 en la que se inserta Stx8 con el plásmido pGADT7	Celia Vived
Y187-ADXdh	Y187 [pGADT7 (Xdh)]::LEU2	Cepa Y187 en la que se inserta Stx8 con el plásmido pGADT7	Celia Vived
Y187-ADNdfbu4	Y187 [pGADT7 (Ndfbu4)]::LEU2	Cepa Y187 en la que se inserta Stx8 con el plásmido pGADT7	Celia Vived

Tabla 24: Cepas de levadura utilizadas en este estudio para el desarrollo del sistema Y2H.

4.1.2. Condiciones de cultivo de *S.cerevisiae*

Los inóculos de *S.cerevisiae* crecían en medio líquido a una temperatura constante de 30°C, calor seco y en agitación orbital a 170 rpm. La relación $V_{\text{cultivo}}/V_{\text{recipiente}}$ se mantenía siempre

fija a 1:5 para asegurar una buena oxigenación.

Los cultivos de *S.cerevisiae* crecían en distintos medios líquidos como YPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*) con 0.5% y con 2% de glucosa. También en medios sintéticos SC (*Synthetic Complete*) o SD (*Synthetic Defined*), a los cuales se les añadían los suplementos auxotróficos correspondientes en función de los requerimientos de la cepa en cuestión.

Las siguientes tablas detallan la composición de cada uno de los medios líquidos utilizados:

	YPD 0.5%	YPD 2%		SC 2%	SD 2%
Extracto de levadura (%*)	1	1	YNB (yeast nitrogen base) (%)	0.67	0.67
Peptona (%)	2	2	Drop-out (%)	0.132	-
Glucosa (%)	0.5	2	Glucosa (%)	2	2
			pH 6.8		

*Porcentaje expresado en %peso/volumen

Tabla 25: Composición de los medios utilizados para el crecimiento de *S.cerevisiae*.

Se define auxotrofia como la carencia de una ruta metabólica funcional que genera la sustancia de la que depende el auxótrofo. Por ejemplo, una cepa de levadura que carece de una enzima necesaria para la síntesis de un aminoácido, precisa de este en el medio de cultivo para poder crecer. Las auxotrofías se utilizan, por tanto, para suplementar los medios SD y SC (medios mínimos) para actuar de selección de crecimiento. Los aminoácidos (Tabla 26) se preparaban a una concentración 100x y se esterilizaban por calor (autoclave: 20 min, 121°C) o filtración según la termosensibilidad del aminoácido.

Aminoácido	Concentración	Esterilización
Leucina	6 mg/ml	Autoclave (20 min, 121°C), guardar a RT
Histidina	2 mg/ml	Autoclave (20 min, 121°C), guardar a RT
Uracilo	2 mg/ml	Autoclave (20 min, 121°C), guardar a RT
Triptófano	4 mg/ml	Filtrar (Filtro 0.22µm, guardar a 4°C protegido de la luz)
Adenina	4 mg/ml	Autoclave (20 min, 121°C), guardar a RT
Lisina	3 mg/ml	Autoclave (20 min, 121°C), guardar a RT
Metionina	50 mg/ml	Autoclave (20 min, 121°C), guardar a RT

Tabla 26: Aminoácidos utilizados como selección para suplementar los medios de crecimiento.

Drop-out es una mezcla de aminoácidos que contiene alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, inositol, isoleucina, lisina, metionina, ácido para-aminobenzoico, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina. De todos ellos se utiliza una cantidad de 76 mg por litro de medio, excepto el ácido para-aminobenzoico, que requiere sólo 8 mg.

En el caso del crecimiento en medio sólido, se utilizaban los mismos medios descritos con anterioridad (YPD, SD, SC), a los cuales se les añadió agar al 2% (p/v). La franja de tiempo de incubación a 30°C oscilaba entre 3 y 5 días, hasta la formación de colonias visibles.

4.1.3. Transformación de *Sacharomyces Cerevisiae*

Se transformaban las cepas Y2HGold y Y187 con los plásmidos de interés. Durante todo el proceso se trabajaba a temperatura ambiente y en esterilidad. Se utilizó el kit *Yeastmaker Yeast Transformation System*, de *Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech, Kutsasu, Japón).

Material/reactivos

- Medio YPD
- Tampón Acetato de Litio 0.1M/TE 1x, estéril (Clontech)

Tampón AcLi 0.1M/TE 1x (Vfinal = 20 ml)
2 ml AcLi 1M
2 ml TE 10x
16 ml H ₂ O MQ

Tabla 27: Composición del tampón AcLi 0.1M/TE1x para la transformación de *S.cerevisiae*.

- Polietilenglicol 40%/TE 1x/Acetato de Litio 0.1M, estéril (Clontech)

PEG 40%/TE1x/AcLI 0.1M (Vfinal = 5 ml)
0.5 ml AcLi 1M
0.5 ml TE 10X
4 ml PEG 50%

Tabla 28: Composición del tampón PEG 40%/TE1x/AcLI 0.1M para la transformación de *S.cerevisiae*.

Protocolo

- Crecer la cepa *S. cerevisiae* correspondiente en medio YPD + Adenina durante toda la noche, a 30°C con agitación.
- Utilizar 10 ml provenientes de un cultivo exponencial ($OD_{600} = 0.6$).
- Centrifugar 3 minutos a 2800g a RT y lavar el pellet obtenido con H₂O MQ estéril. Pasar a un tubo eppendorf estéril.
- Centrifugar durante 2 minutos a 7168g a RT, descartar el agua y resuspender las células en 1 ml de tampón AcLi/TE.
- Centrifugar a 7168g durante 2 minutos, descartar sobrenadante y resuspender el pellet en 50µl AcLi/TE. Añadir 200 ng de DNA plasmídico y 5µl de portador de DNA o *Carrier* (esperma de salmón). Como control negativo de transformación usar levaduras del mismo fondo genético donde se sustituía el DNA por agua.
- Añadir 300 µl PEG40%/TE/AcLi 0.1M y mezclar bien pero suavemente.
- Incubar 30 minutos a 30°C en agitación suave.
- Realizar un *shock* térmico a 42°C durante 15 minutos.
- Centrifugar las células durante 5 minutos a 1792g a RT y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 1 ml de YPD Plus Medium.
- Plaquear las células en las placas de medio mínimo 2% glucosa en medio de selección; en ausencia de la auxotrofia para la que codifica el plásmido utilizado en la transformación.
- Incubar las placas durante 2 o 3 días a 30°C en la estufa.

4.1.4. Purificación de DNA plasmídico en *S.cerevisiae*

Esta miniprep está basada en el método de la lisis alcalina en *E.Coli* pero utilizando zimoliasa como primera solución.

Material/reactivos

- Medio YPD (Yeast Peptone Dextrose).
- Kit Zymoprep (D2001, Zymoresearch, Irvine, California, EEUU).
- Tampón TE (Tris-EDTA) pH 7.5 (Anexo II)

Protocolo

- Crecer el cultivo celular durante toda la noche a 30°C en YPD.
- Usar 0.5-1 ml del cultivo en tubos *ependorf* de 1.5 ml y centrifugar a 600g durante 2 minutos a RT (temperatura ambiente). Descartar el sobrenadante.
- Añadir 150 µl de tampón de Digestión (kit Zymoprep) a cada pellet.
- Añadir 2 µl de zimoliasa a cada tubo. Resuspender el pellet sacudiendo el tubo con los dedos o haciendo vortex.
- Incubar a 37°C durante 15-60 minutos sin agitación.
- Añadir 150 µl de tampón de Lisis (kit). Mezclar bien manualmente.
- Añadir 150 µl de tampón de Neutralización (kit). Mezclar bien manualmente.
- Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos a RT.
- Transferir los sobrenadantes a tubos nuevos. Añadir 400 µl de isopropanol (2-propanol) a cada tubo. Mezclar bien manualmente.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 8 minutos a RT. Aspirar el sobrenadante. Hacer una centrifugación rápida (*spin*) y eliminar el sobrenadante residual.
- Resuspender el pellet en 35 µl de Tampón TE.
- Utilizar 3-5 µl de este DNA plasmídico para los experimentos de transformación de *E.Coli*.

4.2. Principio del ensayo de Doble Híbrido

El Sistema de Doble Híbrido en levadura (Y2H) se basa en la identificación de la interacción que se produce entre una proteína denominada *bait* o cebo y una proteína *prey* o presa, aprovechando las propiedades de la proteína GAL4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 31). En el presente trabajo, el sistema Y2H utilizado es el optimizado por Clontech, denominado Y2H *Matchmaker*[®] Gold.

La proteína GAL4 es un activador transcripcional requerido para la expresión de genes que codifican enzimas de utilización de galactosa, la cual es convertida en glucosa-6-fosfato (Johnston, 1987). GAL4 consiste en dos dominios: uno N-terminal que se une específicamente a secuencias de DNA (*Binding Domain* o BD) y otro C-terminal que contiene regiones ácidas, necesario para la activación de la transcripción (*Activating Domain* o AD) (Ma and Ptashne, 1987).

La proteína cebo se expresa como fusión de Gal4 DNA-*binding domain* (DNA-BD), mientras que la librería de proteínas presa se expresa fusionada a Gal4 DNA-*activating domain* (DNA-AD) (Chien et al., 1991; Fields and Song, 1989). Cuando ambas proteínas interactúan, DNA-BD y DNA-AD se juntan, activando la transcripción de cuatro genes reporteros independientes: AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1.

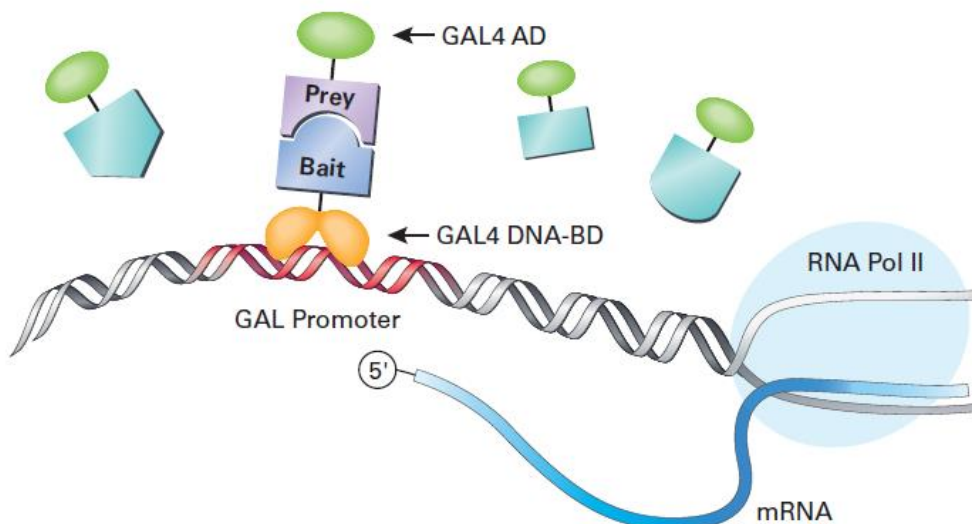


Figura 31: Principio del Sistema de Doble Híbrido. Dos proteínas se expresan de forma separada, una proteína cebo fusionada a un dominio de unión a DNA Gal4 (BD) y otra proteína presa, fusionada al dominio de activación transcripcional Gal4 (AD). Los reporteros se activan sólo en aquellas células que contengan proteínas que interactúen y se unan al promotor GAL. Extraído de *Matchmaker*[®] Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (PT4084-1) (Clontech, n.d.).

4.3. Genes reporteros del Sistema Matchmaker Gold Yeast

AUR1-C: es una versión mutada del gen AUR1, que codifica la enzima inositol fosforilceramida sintasa (IPC sintasa). En condiciones normales, esta enzima es inhibida por Aureobasidina A (AbA), un fármaco altamente tóxico. Sin embargo, existen dos posiciones, His 157 y Phe 158 en la secuencia del gen AUR1 cuyas mutaciones pueden generar enzimas resistentes a la inhibición por AbA (Aeed et al., 2009). Cuando se produce la interacción entre cebo y presa, se activa la transcripción de este gen mutado, confiriendo una fuerte resistencia a AbA (AbA').

HIS3 y ADE2: la cepa Y2HGold utilizada en este ensayo no es capaz de sintetizar histidina ni adenina y, por tanto, no puede crecer en un medio que carezca de estos aminoácidos esenciales. Cuando se produce la interacción entre las dos proteínas, la expresión de HIS3 y ADE2 permite que la célula sintetice histidina y adenina, respectivamente, y pueda crecer en un medio sin estos aminoácidos.

MEL1: codifica la enzima α -galactosidasa. Como resultado de la interacción, MEL1 se expresa y es secretado por la célula. Las colonias de levadura que expresan Mel1 se vuelven azules en presencia de un sustrato cromagénico llamado X- α -Gal.

En la cepa haploide Y2HGold utilizada para expresar la proteína cebo (Figura 32), los cuatro genes reporteros (HIS3, ADE2 y MEL1/AUR1-C) están bajo el control de tres promotores de respuesta a Gal4 distintos (G1, G2 y M1, respectivamente), que solo tienen en común los sitios de unión a proteínas dentro de la región UAS (*upstream activating sequences*) que se unen específicamente a Gal4 DNA-BD. Por tanto, las proteínas de la librería que interactúen con secuencias no compartidas entre los tres promotores no superarán el criterio de selección que incluye los cuatro genes reporteros y de esta forma, se eliminarán los falsos positivos. Cada uno de los promotores contiene la secuencia 17-mer consensus reconocida por Gal4. Esta secuencia es un sitio de unión sintético similar a los sitios de unión que ocurren naturalmente (Giniger and Ptashne, 1988).

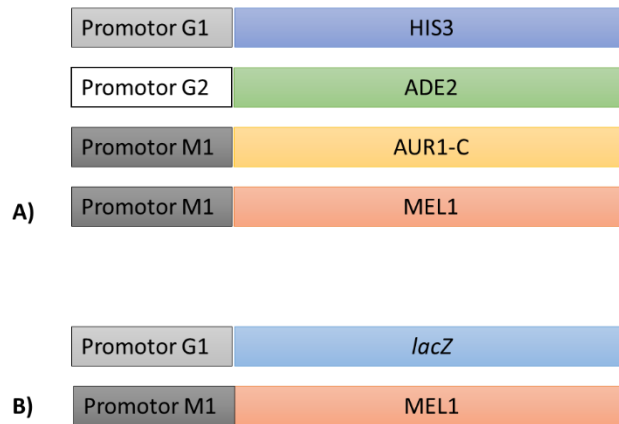


Figura 32: A) Construcciones gen reportero en cepa de levadura Matchmaker Y2HGold (Mating Partner). B) Construcciones gen reportero cepa de levadura Matchmaker Y187 (Library Host Strain). Figura adaptada de Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (PT4084-1) (Clontech, n.d.).

4.4. Subclonación del gen cebo de interés en el plásmido pGBKT7 (Gal4BD)

Nuestra proteína cebo (ciclinaD3) se expresó como fusión con Gal4DNA-BD en la cepa Y2HGold de levadura (630498, Clontech). A tal fin, la ciclinaD3 murina fue subclonada junto al dominio de unión GAL4 del plásmido cebo pGBKT7 (PT3248-5, Clontech). Por otro lado, la librería (comercial) normalizada de cDNAs de ratón (630483, Clontech) contenía los cDNAs subclonados junto al dominio Gal4 AD del plásmido pGADT7 (PT3249-5, Clontech) en la cepa Y187 (630457, Clontech) (Figura 33).

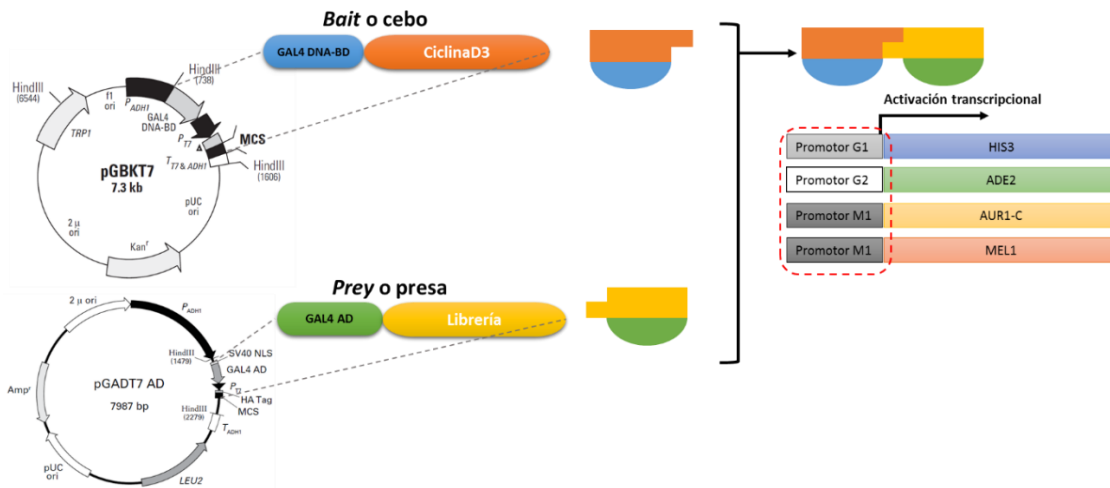


Figura 33: Esquema de las construcciones realizadas para el ensayo de doble híbrido. Figura adaptada de Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (PT4084-1) (Clontech, n.d.).

4.5. Placas de crecimiento utilizadas para ensayos Y2H

Durante el ensayo de doble híbrido las colonias eran crecidas en distintas placas con auxotrofías y condiciones de selección diferentes. Teniendo en cuenta que el término DO (*drop-out*) hace referencia a la eliminación selectiva de nutrientes específicos utilizados

para suplementar el medio mínimo con el objetivo de seleccionar levaduras de genotipos específicos, las soluciones DO carecían de uno (*single dropout*), dos (*double dropout*), tres (*triple dropout*) o cuatro (*quadruple dropout*) nutrientes (aminoácidos o nucleótidos) requeridos por la levadura para crecer en medio SD. Además, se utilizaba Aureobasidina A (Clontech) como antibiótico de selección a una concentración de 200 ng/ml y el sustrato cromagénico X-alpha-Gal (Sigma) a 40 µg/ml. La composición de las placas se especifica en la Tabla 29.

Placas		Auxotrofías	Sustrato	Antibiótico
SDO	Single Dropout	SD/-Trp	-	-
		SD/-Leu	-	-
SDO/X/A	Single Dropout	SD/-Trp o SD/-Leu	X-alpha-Gal (200 ng/ml)	Aureobasidina A (40 µg/ml)
DDO	Double Dropout	SD/-Trp/-Leu	-	-
DDO/X/A	Double Dropout	SD/-Trp/-Leu	X-alpha-Gal (200 ng/ml)	Aureobasidina A (40 µg/ml)
TDO	Triple Dropout	SD/-Trp/-Leu/-His/	-	-
QDO	Quadruple Dropout	SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade	-	-
QDO/X/A	Quadruple Dropout	SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade	X-alpha-Gal (200 ng/ml)	Aureobasidina A (40 µg/ml)

Tabla 29. Composición de las placas de agar con las diferentes auxotrofías y medios de selección para el crecimiento del cultivo de levadura en el ensayo de Y2H.

4.6. Experimentos control

Antes de realizar la criba de la librería para identificar proteínas interactoras con ciclinaD3, era necesario realizar apareamientos control de los haploides. Para ello se transformaban las cepas Y2HGold y Y187 con los plásmidos control que se detallan a continuación:

Control positivo de interacción

La interacción entre pGBKT7-53 (630489, Clontech), que codifica para Gal4 DNA-BD fusionado con p53 murino (Anexo IV), y pGADT7-T (630489, Clontech), que codifica para Gal4 AD fusionado con SV40 antígeno T grande (Anexo IV), en ensayos de Doble Híbrido ha sido anteriormente descrita (Li and Fields, 1993). El apareamiento entre Y2HGold [pGBKT7-53] y Y187 [pGADT7-T] da lugar a células diploides que contienen ambos plásmidos, pudiendo así activar los cuatro genes reporteros mencionados anteriormente. En la Tabla 30 se detallan los medios de selección requeridos para las cepas que contienen el vector con DNA-BD, el vector con AD, o ambos, así como la selección para los diploides que expresan las proteínas que interaccionan.

Cepa [plásmido]	Medio SD	Diana de selección	Fenotipo MEL1
Y2HGold [pGBKT7-53] x	-Leu	pGADT7-T	Blanco
	-Trp	pGBKT7-53	Blanco
	-Leu/-Trp (DDO)	Diploides que contienen pGADT7-T y pGBKT7-53	Blanco
	-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (DDO/X/A)	Diploides que han activado la resistencia a Aureobasidina A y α -Galactosidasa mediante la interacción entre proteínas	Azul
Y187 [pGADT7-T]	-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA (QDO/X/A)	Diploides que han activado la resistencia a Aureobasidina A y α -Galactosidasa, así como HIS3 y ADE2 mediante la interacción entre proteínas. Placas utilizadas al final del cribado Y2H para confirmar interacciones	Azul

Tabla 30: Medios de selección y fenotipos obtenidos en el control positivo de interacción. Medios requeridos para el crecimiento de las cepas Y2HGold y Y187 y para la selección de los diploides que expresan las proteínas que interaccionan.

Control negativo de interacción

Como control negativo de interacción se usaba la interacción entre pGBKT7-Lam, que codifica para Gal4 DNA-BD fusionado con lamina (630489, Clontech) y pGADT7-T. Aunque los diploides para estos vectores crecían en medio SD/-Leu, SD/-Trp y en DDO (SD/-Leu/-Trp) (selección para diploides), no se observaban colonias en DDO con el antibiótico de selección AbA.

Cepa [plásmido]	Medio SD	Diana de selección	Fenotipo MEL1
Y2HGold [pGBKT7-Lam] x	-Leu	pGADT7-T	Blanco
	-Trp	pGBKT7-Lam	Blanco
	-Leu/-Trp (DDO)	Diploides que contienen pGADT7-T y pGBKT7-Lam	Blanco
	-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (DDO/X/A)	Diploides que han activado la resistencia a Aureobasidina A y α -Galactosidasa mediante la interacción entre proteínas	No crecen colonias
Y187 [pGADT7-T]	-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA (QDO/X/A)	Diploides que han activado la resistencia a Aureobasidina A y α -Galactosidasa, así como HIS3 y ADE2 mediante la interacción entre proteínas. Placas utilizadas al final del cribado Y2H para confirmar interacciones	No crecen colonias

Tabla 31: Medios de selección y fenotipos obtenidos en el control negativo de interacción. Medios requeridos para el crecimiento de las cepas Y2HGold y Y187 y para la selección de los diploides que expresan las proteínas que interaccionan.

Material/reactivos

- Placas de agar: SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Leu/-Trp (DDO), SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (DDO/X/A), SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA (QDO/X/A).
- Medio YPD con adenina.

Protocolo

- Transformar cada cepa con el plásmido correspondiente y plaquearlo en el medio que se requiere:

Cepa	Plásmido para la transformación	Medio placa agar
Y2HGold	pGBKT7-53	SD/-Trp
Y2HGold	pGBKT7-Lam	SD/-Trp
Y187	pGADT7-T	SD/-Leu

Tabla 32: Cepas de levadura, plásmidos transformados y medios de crecimiento correspondientes.

- Crecer durante 3 días en una estufa a 30°C.
- Picar una colonia de cada tipo para hacer los apareamientos control:
 - Positivo: Y2HGold [pGBKT7-53] y Y187 [pGADT7-T]
 - Negativo: Y2HGold [pGBKT7-Lam] y Y187 [pGADT7-T]
- Colocar ambas colonias en un tubo eppendorf que contenga 500 μ l de YPD con adenina y mezclar vigorosamente (vortex).
- Incubar con agitación a 200 rpm a 30°C durante 20-24 horas.
- Diluir el cultivo (1/10, 1/100 y 1/1000) y extender 100 μ l de cada una de ellas en las placas de agar mencionadas anteriormente.
- Incubar las placas a 30°C durante 3-5 días.

4.6.1. Análisis de autoactivación del cebo

Para confirmar que el cebo no activaba de forma autónoma los genes reporteros en Y2HGold en ausencia de la proteína presa, se realizaba una prueba de autoactivación. La

cepa Y2HGold se transformaba con 100 ng del plásmido pGBKT7 con el gen cebo de interés (ciclinaD3). Se realizaron diluciones 1/10 y 1/100 de la mezcla de transformación y se extendieron 100 μ l en las siguientes placas: SD/-Trp, SD/-Trp/ X- α -Gal, SD/-Trp/ X- α -Gal/AbA. Se incubaron las placas a 30°C durante 3-5 días.

4.6.2. Análisis de toxicidad del cebo

Para confirmar que la proteína cebo no era tóxica cuando se expresaba en levadura, se realizaron análisis de toxicidad. La cepa Y2HGold se transformó con 100 ng del constructo pGBKT7 con el gen cebo subclonado o con pGBKT7 vacío. Se realizaron diluciones 1/10 y 1/100 de la mezcla de transformación y se extendieron 100 μ l en placas SD/-Trp, que se incubaron a 30°C durante 3-5 días.

4.7. Apareamiento o *mating*

Una vez subclonada la ciclinaD3 en el plásmido cebo y cuando ya se habían realizado todos los experimentos control relativos a autoactivación y toxicidad, se llevó a cabo el siguiente protocolo de apareamiento (Figura 34):

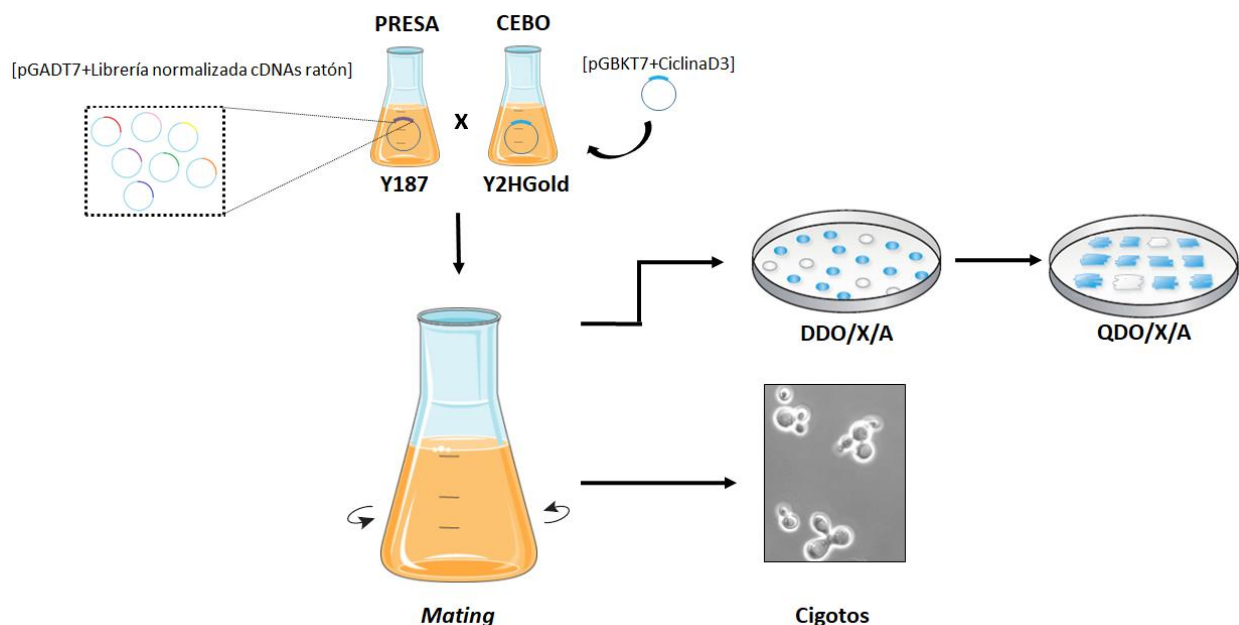


Figura 34: Visión de conjunto del protocolo de apareamiento y cribado de doble híbrido. La ciclinaD3 se expresaba como fusión con Gal4 DNA-BD en la cepa de levadura Y2HGold. La librería normalizada de cDNAs de ratón subclonados en fusión con Gal4 AD, fue proporcionada en la cepa de levadura Y187. Cuando ambos cultivos se mezclan durante toda la noche, se aparean para crear diploides. Las células diploides contienen los cuatro genes reporteros: HIS3, ADE2, MEL1 y AUR1-C, que se inducen en respuesta a las interacciones de doble híbrido entre cebo (ciclinaD3) y presa.

Protocolo

- Preparar un cultivo concentrado de la cepa cebo (Y2HGold [pGBKT7+ciclinaD3]) inoculando una colonia fresca y grande (2-3mm) en 50 ml de medio líquido SD sin triptófano.
- Incubar en agitación (250-270 rpm) a 30°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.8 (16-20 horas).
- Centrifugar a 1000g durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet hasta una densidad celular de $>1 \times 10^8$ células por ml en SD/- Trp (4-5ml).
- Descongelar una alicuota de 1 ml de la cepa con la Librería “Mate & Plate” en un baño a temperatura ambiente. Coger 10 µl en placas de SD/-Leu para realizar la titulación de la librería (apartado 4.8., Materiales y Métodos).
- Combinar 1 ml de la Librería “Mate & Plate” con los 4-5 ml de la cepa cebo obtenidos en el paso 4 y mezclarlo en un erlenmeyer de 2 litros.
- Añadir 45 ml de medio líquido YPD con Adenina, al cual se le añaden 50 µg/ml de kanamicina (YPDA/Kan) para prevenir la contaminación bacterial, ya que el medio YPDA es un medio muy rico y esto incrementa la probabilidad de contaminación.
- Incubar a 30°C durante 20-24 horas, en agitación lenta (30-50 rpm). Una agitación muy vigorosa podría reducir la eficiencia del apareamiento.
- Tras 20 horas, observar una gota del cultivo en un microcopio de contraste de fase (40x) para comprobar la presencia de cigotos. Si no, continuar con el apareamiento durante 4 horas adicionales.
- Centrifugar a 1000 g durante 10 minutos.
- Lavar el erlenmeyer con YPD con adenina (y 50 µg/ml de kanamicina) y utilizarlo para resuspender el pellet de células.
- Centrifugar a 1000 g durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.

- Resuspender el pellet en 10 ml de medio líquido 0.5X YPDA/Kan y medir el volumen total de células y medio (para el posterior cálculo de número de clones chequeados).
- Extender 100 μ l de distintas diluciones (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) del cultivo de apareamiento en placas de agar SD/-Trp, SD/-Leu y SD/-Leu/-Trp (DDO) a 30°C durante 3-5 días.
- Plaquear el resto del cultivo en placas DDO/X/A (200 μ l en cada una), hasta un total de 50-55 placas. Incubar a 30°C durante 3-5 días.
- Calcular el número de clones (diploides) contando las colonias de las placas DDO y determinar la eficiencia del apareamiento.
- Pasar las colonias azules que han crecido en placas DDO/X/A a las placas QDO/X/A (cuadruple dropout).
- Posteriormente, secuenciar las presas de las colonias QDO/X/A (interacciones positivas) para identificar las proteínas candidatas. Una vez identificadas, repetir el ensayo Y2H con las proteínas candidatas (presa) aisladas y confirmar interacción.

4.8. Titulación librería

Para llevar a cabo la titulación de la librería, se llevaba a cabo el siguiente protocolo:

- Descongelar una alícuota de 1 ml de la librería normalizada de cDNA de ratón en un baño de agua a temperatura ambiente.
- Transferir 10 μ l a 1 ml de YPD con adenina (YPDA) en un tubo *ependorf* de 1.5 ml y mezclar con vortex suave (Dilución A; factor de dilución final = 10^{-2}).
- Añadir 10 μ l de esta dilución a 1 ml de YPDA y mezclar con vortex (Dilución B; factor de dilución final = 10^{-4}).
- Añadir 10 μ l de la Dilución A en 50 μ l de YPDA en un tubo *ependorf* de 1.5 ml y mezclar con vortex suave. Extender toda la mezcla en una placa SD/-Leu.
- Extender 50 μ l de la Dilución B en placas SD/-Leu.

- Incubar las placas a 30°C durante 3-5 días.
- Contar el número de colonias en las placas y calcular la titulación.

4.9. Confirmación de candidatos positivos

Una vez que se seleccionaban los candidatos positivos, obtenidos tras el apareamiento y criba del Y2H, se aislaba el DNA plasmídico de la levadura (apartado 4.1.4, Materiales y Métodos) para su posterior transformación en bacteria XL1-Blue y aislamiento del DNA bacteriano o *miniprep*. Este DNA fue enviado a secuenciar para identificar qué proteínas (“presas”) interactuaban positivamente con ciclinaD3.

4.10. Apareamiento a pequeña escala o *small-scale mating*

Para comprobar la interacción obtenida por Y2H, se realizaba un apareamiento a pequeña escala o “small-scale mating” con cada uno de los candidatos obtenidos. Para ello, se llevaba a cabo el siguiente protocolo:

- Picar una colonia de Y2HGold (pGBKT7+ciclinaD3) y otra colonia de Y187 (pGADT7-T + Candidato) y poner ambas en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 0.5 ml de YPD con adenina.
- Mezclar con vortex para resuspender las células.
- Incubar ON a 30°C en agitación (200 rpm).
- Del cultivo de apareamiento sembrar 100 µl en placas: SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp (DDO), DDO/X/A y QDO/X/A.
- Incubar las placas a 30°C durante 3-5 días para permitir a las células diploides que formen colonias visibles.

4.11. Apareamiento con cDNAs enteros de los candidatos

Los genes candidatos que interaccionaban positivamente con la ciclinaD3 en el ensayo de doble híbrido identificados a partir de la librería normalizada de ratón, estaban truncados. Por lo tanto, los cDNAs correspondientes enteros se obtuvieron de GenScript (Nueva Jersey, EEUU) y se subclonaron en Y187 (pGADT7-T). Se repitió el apareamiento con

Y2HGold (pGBKT7+ciclinaD3) para asegurar que la interacción era real también con los cDNAs enteros de los candidatos subclonados en pcDNA3.1.

5. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEICA EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Para la detección de interacción entre proteínas se utilizaban las técnicas que se describen a continuación: coimmunoprecipitación en células NIT-1 (ex vivo) y NanoBiT (in vivo).

5.1. Ensayos de co-inmunoprecipitación (interacción ex vivo)

La inmunoprecipitación es una técnica basada en la unión de una proteína a un anticuerpo específico que la reconoce para la formación de inmunocomplejos. Si esta inmunoprecipitación se realiza en condiciones no desnaturizantes, puede permitir el “arrastre” de otras proteínas unidas a dicha proteína. Para poder separar por gravedad los inmunocomplejos del resto de componentes de la reacción, se utilizaba la proteína G conjugada con agarosa, la cual tiene la capacidad de reconocer y unirse a los anticuerpos, concretamente a las IgG, interactuando con la cadena pesada. De esta forma, se creaba el complejo de alto peso molecular antígeno-anticuerpo-proteínaG-agarosa.

La coimmunoprecipitación (CoIP) es una técnica utilizada normalmente en el estudio de interacciones entre proteínas. Se realiza como una IP, pero se basa en el hecho de que a la proteína precipitada por el anticuerpo están asociadas físicamente otras proteínas que están interaccionando con ella. De ello, se extrapola que ambas proteínas están interaccionando in vivo. Es vital que la lisis celular se realice en condiciones no desnaturizantes para mantener al máximo las interacciones físicas existentes in vivo.

Material/reactivos

- Perlas Proteína G-agarosa (20398, Thermo Scientific)
- PBS 1x (Sigma).

- Tampón de lisis no desnaturizante:

Tampón de Lisis No Desnaturizante	
Tris.HCl pH 7.4	25mM
BSA	0.1%
NP-40	0.5%
NaCl	150mM
EDTA	1mM
Glicerol	5%
Cocktail inhibidores de proteasas (Thermo Scientific)	1/50

Tabla 33: Composición buffer lisis no desnaturizante utilizado para la lisis celular NIT-1.

- Tampón de carga 2x desnaturizante (S3401, Sigma)
- Noria (agitación orbital)

Protocolo co-IP

- Para cada muestra de la Co-IP se utilizaban 50 μ l de resina de Proteína G-agarosa.
- Lavar el volumen final de perlas (en función del número de muestras) de Proteína G-agarosa con PBS 1x (2 veces).
- Añadir 50 μ l de Proteína G-agarosa en *ependorfs* de 1.5ml. Todos estos pasos se llevaban a cabo pipeteando con una punta cortada debido a la viscosidad de la Proteína G-agarosa.
- Añadir 10-50 μ g del anticuerpo de interés (proteínas candidatas obtenidas en Y2H) en los tubos que corresponda.
- Incubar la mezcla anticuerpo-ProteínaG-agarosa 4 horas a 4°C en agitación orbital.
- Centrifugar a 3000 g durante 2 minutos a 4°C y descartar sobrenadante.
- Lavar: añadir 1 ml de Tampón de lisis no desnaturizante.
- Agitar suavemente y centrifugar a 3000 g durante 2 minutos a 4°C (2 veces).
- Añadir 400 μ g de lisado celular.
- Incubar el conjugado lisado-anticuerpo-Proteína G-agarosa a 4°C en agitación orbital ON.

- Centrifugar los tubos y eliminar el sobrenadante. La proteína de interés está específicamente unida al anticuerpo-Proteína G-agarosa.
- Lavar: añadir 1 ml Tampón de lisis, agitar suavemente y centrifugar a 3000 g durante 2 minutos a 4°C (2 veces). De esta manera se eliminan las uniones inespecíficas.
- Eliminar el máximo de lisis buffer de las perlas. El complejo está listo para la elución.

Protocolo elución

Mediante la técnica de elución con tampón SDS, el complejo antígeno-anticuerpo es eluido de la Proteína G-agarosa calentando o hirviendo las muestras con tampón de carga con SDS desnaturizante.

- Añadir 50 µl 2x Tampón de carga con SDS sin DTT e incubar 10 minutos a 50°C.
- Centrifugar a 3000 g durante 2 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y añadir DTT a 100mM.
- Hervir las muestras eluidas durante 5 minutos y analizar por *Western Blot*.

5.2. Tecnología NanoBiT

NanoBiT o “NanoLuciferase Binary Technology” es un sistema de dos subunidades, basado en la luciferasa NanoLuc, que puede utilizarse para la detección intracelular de interacciones entre proteínas. Consiste en dos fragmentos; una subunidad pequeña de 1.3kDa (Small BiT; SmBiT) y una subunidad grande de 18kDa (Large BiT; LgBiT). Estas subunidades se fusionan por separado a proteínas de interés y cuando se expresan estas proteínas de fusión, la interacción entre las proteínas de interés hace que las subunidades LgBiT y SmBiT se aproximen formando un enzima funcional que, en presencia de coelenterazina, que es un agente de detección que contiene el sustrato furimazina, genera una señal luminiscente cuantificable (Figura 35).

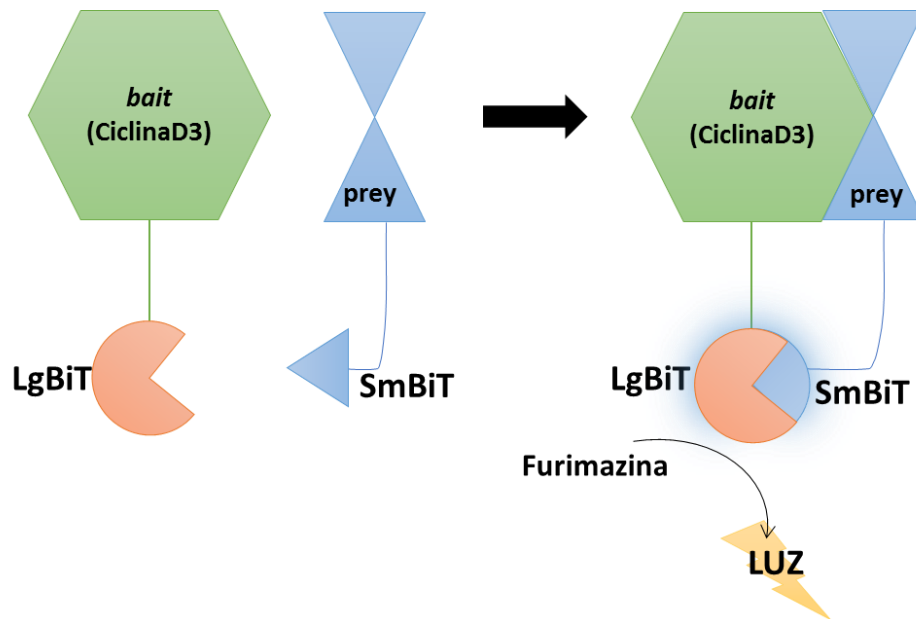


Figura 35: Principio de NanoBiT. La interacción entre la subunidad pequeña y la grande, ambas fusionadas a proteínas de interés, provoca, en presencia del sustrato furimazina, una señal luminiscente.

Material/reactivos

- Medio DMEM 25mM glucosa.
- PBS (Lonza).
- HBSS (Lonza).
- Raspador celular (Fisherbrand-ThermoFisher).
- Placa blanca CELLSTAR® 96W Microplate (M0187, Sigma).
- Coelenterazina (301, NanoLight/Prolume).

Protocolo

- Sembrar 10^6 células NIT-1/pozo en una placa de 6 pocillos e incubar a 37°C y 5% CO_2 .
- Cuando la confluencia de las células sea mayor al 85%, transfectar las células con:
 - 200 ng de DNA en una proporción 1:1 (cebo-presa),
 - 100 ng de YFP para normalizar los datos por fluorescencia
 - Añadir vector vacío (pcDNA3) hasta una cantidad final de DNA de 2 μg .
- Tras 4-5 horas, cambiar totalmente el medio e incubar las células durante toda la noche.
- 24 horas después de la transfección, es recomendable comprobar la eficiencia de la transfección analizando la expresión de YFP con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse DS-Ri2.

- 48 horas después de la transfección, aspirar el medio y lavar las células con 1 ml de PBS calentado previamente.
- Raspar las células con HBSS calentado previamente y transferirlas a un tubo *ependorf*.
- Centrifugar 5 minutos a 1000g a RT.
- Aspirar el sobrenadante y añadir 300 μ l de HBSS calentado previamente. Transferir 100 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de lectura del luminómetro haciendo 3 replicados por condición. Durante todo el procedimiento, evitar la exposición a la luz.
- Medir la señal de fluorescencia de YFP (497 nm excitación; 540 nm emisión) con el lector de placa TECAN infinite M200 utilizando el programa Tecan i-control.
- Después, añadir 25 μ l de coelenterazina a una concentración final de 25 μ M y medir la luminiscencia en el lector de placa inmediatamente.

5.2.1. Subclonación de los cDNAs candidatos en los vectores NanoBiT

Se realizaban distintas construcciones para subclonar, por un lado, la proteína cebo, en este caso la ciclinaD3, en el vector LgBiT (MCS-3) y, por otro lado, los potenciales candidatos de interacción (presa), previamente obtenidos mediante la tecnología Y2H, en el vector SmBiT (MCS-2) (Figura 36). Los vectores MCS-3 y MCS-2 fueron cedidos por el Dr. Francisco Ciruela (UB). Los mapas de los vectores se detallan en el Anexo IV.

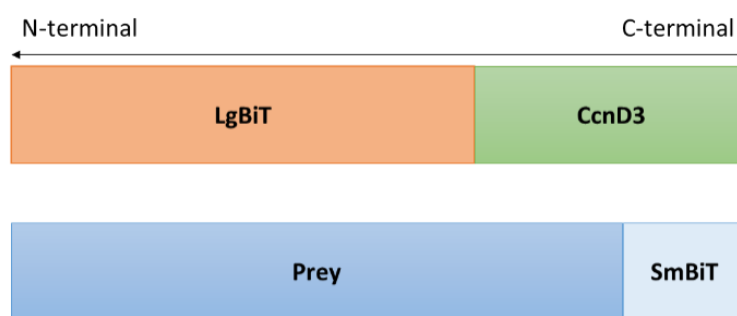


Figura 36: Vectores utilizados para Nanobit. La ciclinaD3 fue clonada en C-terminal, en el vector LgBiT y los potenciales candidatos de interacción obtenidos por Y2H fueron clonados en N-terminal, en el vector SmBiT.

Todos los oligonucleótidos diseñados para la realización de las construcciones de la estrategia NanoBiT y para su posterior secuenciación aparecen detallados en la Tabla 34.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Uso
mD3nanoF	CTGATCTCTCGAGCGAGCTGCTGTGTTGCGAGGGCAC	Secuenciar
mD3nanoR	AGATCAGGAATTCCTACAGGTGAATGGCTGTGACATCTG	Secuenciar
FCcnd3Eco	CGCGGAATTCAGAGCTGCTGTGTTGCGAGGGC	Clonar
RCcnd3Xba	CGCGTCTAGACTACAGGTGAATGGCTGTGAC	Clonar
mPDIA6cloF	CTGATCTGCTAGCATGCGGGTGATCGGCATGGCTCG	Clonar
mPDIA6cloR	GATCAGCCTCGAGCCCAACTCATCCTTCTCCAGGTCATC	Clonar
mNdu-cloF	CCAGATCTGCTAGCATGTCTGGTTCCAAGTATAAGCC	Clonar
mNdu-cloR	CGAGCCAGAATTCCTGTAGGAGATGTTAAATTTTCTGTC	Clonar
mXdh-cloF	CCAGATCTGCTAGCATGACGAGGACAACGGTAGATGAG	Clonar
mXdh-cloR	GTCGGTATCGATGGATCCTCACGGACCAGGATTTACAG	Clonar
mCdk4NanoF	AGATCTGCTAGCATGGCTGCCACTCGATATGAACCCG	Clonar
mCdk4NanoRv	GCACAAGGAGGAAAGCGACGCAGAGGGGAATTCTGCTCGAGC	Clonar
SmFwSeq	GTTCTATGATGACACAAACCCCGC	Secuenciar
Sm/LgBitRvSeq	GCATCACAATTTCAAAATAAAGC	Secuenciar
LgBitFwSeq	CACTGTAACAGGGACCCTGTG	Secuenciar

Tabla 34. Oligonucleótidos diseñados en este trabajo para la estrategia NanoBiT.

Clonación de ciclinaD3 en MCS-3 (LgBiT)

- Se cortó el vector MCS-3 (contiene fragmento LgBiT) con EcoRI y XbaI.
- Se amplificó mediante PCR de alta fidelidad (PfuI, Promega) la ciclinaD3 usando como molde o *template* el plásmido pCN2-CcnD3 (M. Roussel).
- Se clonó la ciclinaD3 sin ATG entre EcoRI y XbaI. El ATG de inicio de ciclinaD3 fue eliminado y para seguir la pauta de lectura de LgBiT se añadió una "A" extra después del sitio de EcoRI. Se generó un codón nuevo TCA en pauta con LgBiT que codifica para una serina.
- Se realizó la ligación de LgBiT y ciclinaD3 (ligación cohesiva).

Clonación de potenciales candidatos de interacción en SmBiT

Todos los candidatos potenciales carecían de codon de parada o de stop.

Candidato 1: Se amplificó PDIA6 mediante PCR de alta fidelidad (PfuI) usando como molde PDIA6 subclonado en pcDNA3.1+ c-Myc. PDIA6 fue clonado con BmtI en 5' y XhoI en 3' eliminando el codón de parada. El producto de PCR se digirió con BmtI y XhoI. Se añadieron dos nucleótidos extras (gg) para mantener la pauta de lectura en SmBiT. El vector MCS-2 se cortó con BmtI y XhoI. Se realizó la ligación para conseguir la construcción quimérica resultante mPDIA6-SmBiT.

Candidato 2: Ndufb4 fue amplificado por PCR de alta fidelidad y fue clonado entre BmtI y EcoRI eliminando el codón de parada. Se añadieron dos nucleótidos extras (gg) para mantener la pauta de lectura en SmBiT. Una vez realizada la ligación, la construcción quimérica mNdufb4-SmBiT estaba en pauta.

Candidato 3: Stx8 de ratón o mStx8 fue obtenida a partir de pCDNA3.1- Stx8-C-eGFP, mediante digestión con BmtI y EcoRV. El vector SmBiT fue cortado con BmtI y EcoRI. Se obtuvo la construcción mStx8-SmBiT en pauta.

Candidato 4: Xdh de ratón fue clonado entre BmtI (cohesivo) y ClaI (hecho romo). El vector MCS-2 fue cortado con BmtI y XhoI (hecho romo). Tras la ligación, se obtuvo la construcción mXdh-SmBiT.

Cdk4 se usó como control positivo de interacción con ciclinaD3. Fue clonado en MCS-2 entre BmtI y EcoRI y fue utilizado como control positivo de la interacción con ciclinaD3.

Las colonias derivadas de las respectivas ligaciones se analizaban por *colony-PCR* y aquellas que resultaban positivas se crecían en escala Miniprep para secuenciar los plásmidos que contenían. Las colonias cuyos plásmidos transformados tenían la secuencia correcta y en pauta de la proteína de fusión, se detallan en la Tabla 35. Los mapas y la información de cada uno de ellos se detallan en el Anexo IV.

Plásmido	Información	Nº de colonia
LgBiT-CiclinaD3	CiclinaD3 clonada en el vector MCS-3 (LgBiT)	5
mPDIA6-SmBiT	mPdia6 clonado en el vector MCS-2 (SmBiT)	6
mNdufb4-SmBiT	mNdufb4 clonado en el vector MCS-2 (SmBiT)	74
mStx8-SmBiT	mStx8 clonado en el vector MCS-2 (SmBiT)	33
mXdh-SmBiT	mXdh clonado en el vector MCS-2 (SmBiT)	5
mCdk4-SmBiT	mCdk4 clonado en el vector MCS-2 (SmBiT)	5

Tabla 35: Construcciones realizadas para la estrategia de NanoBiT.

6. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

6.1. Modelos de ratón con fondo genético NOD

Todos los procedimientos experimentales con animales utilizados durante este estudio fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Lleida, de acuerdo con las regulaciones de experimentación animal europeas y de los

Estados Unidos de América.

Uno de los modelos utilizados para el estudio de diabetes tipo 1 es el modelo NOD (*Non-Obese Diabetic*). Nuestra colonia NOD, denominada NODCHJ, deriva de la colonia del laboratorio de Charles A. Janeway, Jr., sección de Inmunología, del estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Yale.

6.1.1. Deficientes en ciclinaD3

Los ratones homocigotos para la deficiencia en ciclinaD3 fueron originalmente obtenidos en el fondo genético C57BL/6. Se retrocruzaron con el fondo genético NOD durante generaciones sucesivas, genotipando y seleccionando para los alelos Idd (loci de susceptibilidad a diabetes tipo 1) para asegurar el fondo genético NOD (Saavedra-Avila et al., 2014).

6.1.2. Transgénicos para ciclinaD3

Se generaron ratones NOD transgénicos mediante microinyección del constructo RIP-CcnD3-E α en oocitos fecundados de NOD. Este constructo consiste en el promotor de insulina de rata 2 (RIP2) y el cDNA murino de ciclinaD3. Se analizó la inserción del transgén RIP CcnD3 por PCR utilizando los primers RIP2 y DR3 (Tabla 37) (Saavedra-Avila et al., 2014).

6.1.3. Hemideficientes en Cdk11

Las células del blastocisto E3.5 homocigotas para el alelo Cdk11^{p110/p58} nulas no son viables y mueren como consecuencia de la apoptosis inducida por un fallo en la proliferación (Li et al., 2004). Por ello, se obtuvo un KO de Cdk11 parcial en todos los tejidos (manuscrito en preparación).

Los ratones HTZ para Cdk11 en fondo genético mixto 129SvxC57BL/6 fueron proporcionados por la Dra. Jill M. Lahti del hospital St. Jude Children's de Memphis. Se retrocruzaron con el fondo genético NOD durante 15 generaciones sucesivas, seleccionando los alelos Idd de la cepa NOD.

6.2. Modelos de ratón con fondo genético NOD/SCID

Los resultados obtenidos en este estudio se realizaban con ratones hembras del modelo

NOD/SCID, tanto la cepa WT y KO para ciclinaD3, como la cepa transgénica para ciclinaD3 en célula β (RIP-CcnD3) (Saavedra-Avila et al., 2014) (Sicinska et al., 2003). Además, también se realizaban estudios con la cepa WT y hemideficiente (HTZ) para Cdk11 (KO Cdk11 parcial en todos los tejidos) (Li et al., 2004).

La mutación SCID fue introducida en homocigosis en las cepas NOD deficientes en ciclinaD3, TG para ciclinaD3 en la célula beta y hemideficiente para Cdk11, respectivamente. La mutación SCID fue genotipada utilizando el protocolo de PCR recomendado por el laboratorio Jackson (Forward-oIMR803: GGA AAA GAA TTG GTA TCC AC y Reverse-oIMR804: AGT TAT AAC AGC TGG GTT GGC).

6.3. Genotipaje de las distintas cepas murinas

La presencia del transgén y la delección parcial o total del gen en el genoma de los ratones se analizaba mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (apartado 1.4., Materiales y Métodos) utilizando oligonucleótidos específicos.

Material/reactivos

- Bisturí estéril
- Tampón de lisis:

Tampón de lisis	
KCl	50mM
Tris-HCl pH8	50mM
EDTA	2.5mM
NP-40	0.45%
Tween20	0.45%
Agua MQ	

Tabla 36: Composición Tampón de Lisis de biopsias de cola de ratón.

Protocolo

- Obtener la muestra de DNA necesaria para el genotipado: tomar biopsias de las colas de los ratones (cortar 2-3mm de la cola con un bisturí estéril).
- Incubar toda la noche en el baño a 56°C en 250 μ l de Tampón de Lisis (Tabla 36) con 5 μ l de proteinasa K (digestión enzimática) (Invitrogen).

- Al día siguiente, utilizar una alícuota del lisado obtenido para realizar la reacción de PCR. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las reacciones de PCR se recogen en la Tabla 37.

Gen diana	Oligonucleótidos	Secuencia
Deficiencia Cdk11	CPrev	CAAGAGAAGCCTGAGCAAATAG
	Mp70	GAGATACTCTTTACATGCCAACC
Deficiencia CcnD3	D3N3	TGCTGTCCATCTGCACGAGA
	D3A	GAACGTTGTGACGTAGGAGC
	D3G	TCCATCCTGCGATGGCTCAC
Transgénico CcnD3 (RIP-CcnD3)	RIP2	ATTTGAGGGACGCTGTGGGCTCTT
	DR3	GACGCAGGACAGGTAGCGATCCAG

Tabla 37: Oligonucleótidos utilizados para el genotipaje de las distintas cepas murinas utilizadas.

- Realizar las reacciones de amplificación en un volumen final de 25 μ l (Tabla 38) en el termociclador (BioNova G-STORM GS04822) siguiendo los ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación que se recogen en la Tabla 38. El tiempo en cada uno de los pasos, así como el número de ciclos varía en función del tamaño del amplicón de interés.

Master Mix (V _{final} =25 μ l)	Δ Cdk11	Δ CcnD3	TG CcnD3
H ₂ O	18,75 μ l	16 μ l	18,75 μ l
Buffer 10x	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l
DMSO 100%	-	2,5 μ l	-
MgCl ₂ 50mM	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l
dNTPs 10mM	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Primers 100mM	0,25 μ l cada primer	0,25 μ l cada primer	0,25 μ l cada primer
TAQ polimerasa	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
DNA	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Protocolo de PCR	94°C 2'30'', (94°C 40'', 60°C 50'', 72°C 40'') x 39 ciclos + 72°C 10' + 4°C	94°C 3', (94°C 1', 60°C 1', 72°C 1') x 36 ciclos + 72°C 7' + 4°C	(94°C 1', 70°C 30'', 72°C 1') x 30 ciclos + 72°C 6' + 4°C
Tamaño esperado del amplicón	WT: 960 pares de bases HTZ: 320 pares de bases	WT: 250 pares de bases KO: 400 pares de bases	TG: 460 pares de bases

Tabla 38: Composición de la mezcla de reacción de PCR y condiciones de amplificación para el genotipado de las tres modificaciones genéticas.

- Realizar la electroforesis de DNA en un gel de agarosa (apartado 1.5., Materiales y Métodos).

6.4. Condiciones de estabulación de la colonia de ratones

Los animales se mantenían en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Los ratones disponían de pienso autoclavado (Harlan Ibérica) y agua en jaulas microaisladas con presión positiva de aire HEPA, a una temperatura entre 19 y 21°C y 40-60% de humedad, en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Los ratones NOD/SCID se mantenían en un régimen de antibiótico Septrin (trimetoprim 0.24 g/l y sulfametoxazole 1.2 g/l) (UCB Pharma, Bruselas, Bélgica) suministrado a través del agua mediante ciclos semanales alternos de tratamiento.

Todas las manipulaciones de los animales se realizaban en campanas de flujo laminar y todo el material utilizado era previamente esterilizado mediante autoclavado húmedo. Cuando esto no era posible (equipamiento, etc.), se esterilizaba por exposición a SAS-peróxido.

7. MICROSCOPIA

7.1. Microscopía de epifluorescencia y confocal

Una vez que las muestras eran procesadas y montadas, se visualizaban con el microscopio de interés: microscopio de epifluorescencia modelo Olympus BX51 acoplado a una cámara Olympus DP30BW para la captura de las imágenes o microscopio confocal FV1000. Los ajustes que se utilizaron para la captura de las imágenes eran iguales para cada muestra de un mismo experimento.

7.1.1. Tratamiento de los cubreobjetos con poli-L-lisina

La poli-L-Lisina es un compuesto sintético que mejora la adhesión celular mediante el aumento de las cargas positivas en el sustrato del cultivo. No estimula la actividad biológica en las células cultivadas en ella y se utiliza para la adherencia y esparcimiento de líneas celulares.

Material/reactivos

- Cubreobjetos, placa de Petri y pinzas.
- Poli-L-Lisina, [Stock]:10 mg/ml (P6516, Sigma).

Protocolo

- Dejar abierta la caja de cubres y unas pinzas en la campana con la luz ultravioleta durante 10 minutos.
- Repartir los cubres en placas de Petri.
- Añadir poli-L-Lisina ([uso]: 6µl/ml) hasta que cubra bien los cubreobjetos (entre 5-6 ml en placas de 100mm o 3ml en placas de 35mm).
- Dejar 1 hora en la campana.
- Aspirar el contenido y dejar a 4°C hasta su uso (no pueden estar más de 15 días).

7.1.2. Inmunofluorescencia

Se realizaba inmunofluorescencia de células de cultivos para detectar proteínas *in situ* mediante anticuerpos específicos. La proteína marcada se observaba a través de la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario, y, de esta forma, se detectaba su localización. Las células crecían en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos tratados previamente con Poli-L-lisina.

Material/reactivos

- PBS 1x (Sigma).
- Paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 4% en PBS
- Solución de permeabilización: 0.1% Tritón X-100, 1% BSA, disuelto en PBS 1x.
- Solución de bloqueo: 0.1% Tritón X-100, 1% BSA, 1/10 Fc Block, 1/10 Normal Serum de la especie que corresponda, disuelto en PBS 1x.
- Hoechst 33342 (B2261, Sigma).
- Mowiol (Sigma).

Protocolo

La inmunofluorescencia consta de varios pasos, detallados en la Figura 37.

Fijación:

- Quitar el medio de cultivo y lavar con PBS 1x
- Se fija con Paraformaldehído (PFA) al 4% durante 1 hora a 4°C.
- Posteriormente, se aspira el PFA y se deja con PBS 1x a 4°C hasta su uso.

Permeabilización y bloqueo:

- Hacer tres lavados de 10 minutos con PBS 1x.
- Incubar las células durante 30 minutos con la solución de permeabilización.
- Incubar durante 1 hora con la solución de bloqueo.

Inmunodetección:

- Incubar las células durante toda la noche a 4°C y en cámara húmeda, con el anticuerpo primario disuelto en la solución de permeabilización.
- Hacer 3 lavados de 10 minutos con PBS 1x + Tritón al 0.1%.
- Incubar la muestra durante 30 minutos con la solución de bloqueo.
- Incubar durante 1 hora a RT con el anticuerpo secundario disuelto en la solución de permeabilización.
- Hacer 3 lavados de 10 minutos con PBS 1x + Tritón al 0.1% manteniendo la muestra protegida de la luz.
- Teñir núcleo utilizando Hoechst 33342 en una dilución 1/1000 en PBS 1x y dejar 10 minutos a RT en cámara húmeda
- Hacer 3 lavados con PBS 1x

Montaje:

- Añadir 20 µl de Mowiol (Sigma).
- Colocar los cubreobjetos en los portaobjetos manteniendo las células en la parte interna y dejar secar durante 15 minutos a 4°C.
- Obtener imágenes en el microscopio.

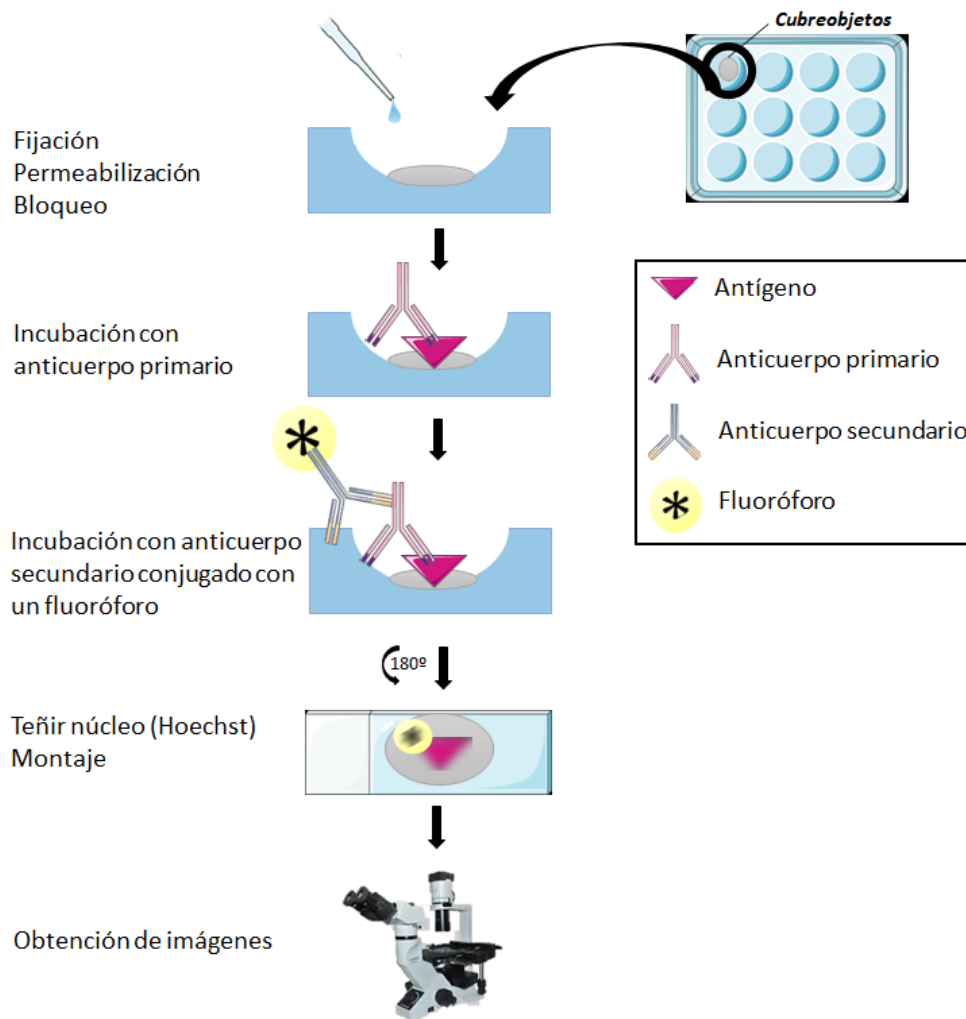


Figura 37: Esquema del protocolo de inmunofluorescencia. El antígeno se incuba sobre un cubreobjetos, donde se realiza la fijación con paraformaldehído, la permeabilización y el bloqueo. Posteriormente, se incuba con el anticuerpo primario y secundario (conjugado con un marcador fluorescente) y se tiñe el núcleo utilizando Hoechst. Finalmente, se monta con Mowiol y se obtienen las imágenes en el microscopio de epifluorescencia. Figura original de la autora.

7.1.3. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Referencia
anti-CiclinaD3	1:100	BD	5082573
anti-DYK	1:1300	ThermoFisher	MA1-91878
anti-Pdia6	1:100	Abcam	ab11432
anti-c-Myc	1:100	Sigma	M4439
anti-Xdh	1:100	Abcam	ab109235

Tabla 39: Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia en este trabajo

Anticuerpo secundario	Dilución	Origen	Referencia
Cy2 Donkey anti-mouse	1:500	Jackson	715-225-150
Cy2 Donkey anti-rabbit	1:500	Jackson	711-225-152
Cy5 Donkey anti-mouse	1:500	Jackson	715-175-151
Cy3 Donkey anti-mouse	1:100	Jackson	715-165-150

Tabla 40: Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia en este trabajo

7.1.4. Procesamiento de imágenes

El análisis y montaje de imágenes de fluorescencia se realizaba mediante el programa Olympus Fluoview 10 – ASW 4.1 y el programa ImageJ (NIH).

8. CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células NIT-1 y los islotes pancreáticos procedentes de ratón fueron analizados por citometría de flujo utilizando el equipo FACS CANTO II (BD).

8.1. Fragmentación nuclear (%subG1)

La apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la contracción celular. La fragmentación nuclear puede ser detectada distinguiendo el contenido de DNA en sub-G₁ (hipoploide) del contenido de DNA normal (haploide). Se utilizaba el método desarrollado por Nicoletti y colaboradores (Nicoletti et al., 1991) y adaptado por Wali y colaboradores (Wali et al., 2015) para estudiar la apoptosis en islotes de ratón, en presencia o ausencia de estímulos de estrés como taspigargina o citoquinas.

Esta técnica utiliza un buffer hipotónico con yoduro de propidio para teñir el DNA nuclear y es posible su excitación con láser 488nm y detección en el espectro rojo del citómetro de flujo usando el filtro BP585/42. La ventaja de este método es que se obtienen resultados cuantitativos y que se recogen hasta 10.000 eventos por muestra, lo cual aumenta la potencia estadística.

Material/reactivos

- DPBS (17-516F, Lonza).
- 0.05% Tripsina-EDTA (1x) (25300062, Life Technologies)
- DMEM suplementado:
 - Sin glucosa (11966025, Gibco) para añadirle 5mM/11mM Glucosa, según requiera el experimento.
 - Con 25mM (4.5g/l) Glucosa (12-604F, Lonza).

- Buffer hipotónico de fragmentación de DNA: 0.1% w/v Triton X-100, 0.1% w/v citrato de sodio.
- Ioduro de Propidio (BD Biosciences).

Protocolo

- Tras el periodo de incubación, recoger los islotes y el medio de cultivo que contiene células muertas flotando de las placas y pasarlos a tubos eppendorf.
- Lavar las placas con PBS 1x para recoger los islotes residuales y transferir este PBS al mismo tubo.
- Centrifugar los islotes a 1000g durante 2 minutos.
- Eliminar el medio cuidadosamente.
- Añadir 300 µl de 0.05% Tripsina-EDTA (1x) y dejar en el baño a 37°C durante 5 minutos.
- Después de 5 minutos, pipetear arriba y abajo 3-5 veces para dispersar islotes en células aisladas.
- Añadir 1 ml de medio DMEM suplementado para parar la actividad de la tripsina.
- Centrifugar las células a 1200g durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 1 ml de medio DMEM suplementado para resuspender las células. Dejar en el incubador a 37°C durante 30 minutos para permitir que las células se recuperen.
- Centrifugar las células a 1200g durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 300 µl de Buffer hipotónico de fragmentación de DNA a las células.
- Añadir 50 µg/ml de Ioduro de Propidio.
- Analizar las células por citometría de flujo (excitación en 488 nm y detección en

585/42nm) para diferenciar entre núcleo hipoploide (fragmentado) y núcleo diploide (intacto). Establecer los parámetros Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) en una escala lineal y PE (ioduro de propidio) en escala logarítmica. Recoger 5000-10000 eventos/muestra.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa GraphPad. Los valores se representan como media de las muestras, con barras de error que corresponden al error estándar de la media, utilizando análisis estadístico t-test o ANOVA, dependiendo del número de variables y grupos experimentales, excepto cuando se indique lo contrario.

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el p-valor era inferior a 0.05. La significación estadística se representa en las gráficas con los valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) .

RESULTADOS

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS QUE INTERACTÚAN CON LA CICLINAD3 MEDIANTE SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

1.1. Validación previa de la técnica. Experimentos control

Las bacterias competentes se transformaron con los plásmidos control : pGBKT7-Lam, pGADT7-T y pGBKT7-53 y se plaqueaban en placas de LB con 50µg/ml del antibiótico de selección correspondiente. Una vez obtenido el DNA mediante la técnica de Maxiprep, este se utilizaba para transformar las cepas de levadura: Y2HGold con pGBKT7-53 y pGBKT7-Lam; y Y187 con pGBKT7-T. Se llevaba a cabo el apareamiento y se plaqueaban 100 µl de las diluciones 1/10, 1/100, y 1/1000 en las distintas placas de agar: SD/-Leu (selección presa), SD/-Trp (selección cebo), DDO (selección zigotos) y DDO/X/A (selección interacción).

Tras 3-5 días de incubación a 30°C se observaba que el control positivo tenía aproximadamente el mismo número de colonias en DDO que en DDO/X/A, siendo estas últimas de color azul. DDO seleccionaba la presencia de ambos plásmidos (diploides/zigotos) y DDO/X/A seleccionaba los plásmidos y también la interacción de las proteínas codificadas por ellos, que activaban los reporteros AbAr y MEL1. Sin embargo, en el control negativo había colonias en DDO, pero no en DDO/X/A (Figura 38). Por lo tanto, el sistema funcionaba ya que no se observó autoactivación de fondo en el control negativo.

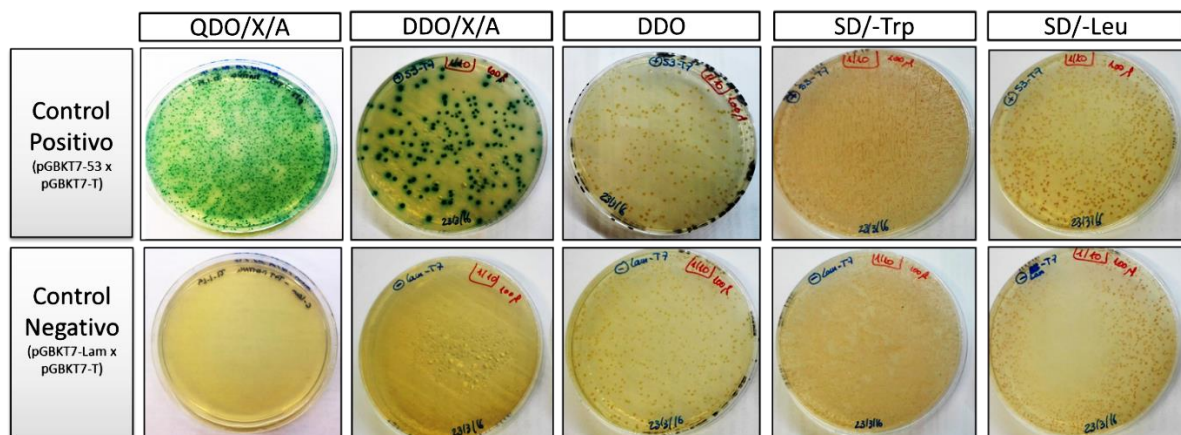


Figura 38: Experimentos control del ensayo de doble híbrido. Colonias obtenidas en los experimentos control de apareamiento o *mating* en las placas de agar con distintas auxotrofías.

1.2. Subclonación de ciclinaD3 (cebo o *bait*) en el plásmido pGBKT7

El plásmido pGBKT7-BD fue digerido con BamHI y EcoRI. El inserto (ciclinaD3, 0.9Kb) fue amplificado a partir del vector RIP-D3Eα (Anexo IV) mediante PCR utilizando la DNA polimerasa de alta fidelidad Pfu (Promega) y los oligonucleótidos Y2HD3F y Y2HD3R (Tabla 5). El producto de ligación fue transformado en células competentes XL1-Blue (*E.Coli*) y se realizó una Colony-PCR para seleccionar aquellas colonias que se habían transformado correctamente, utilizando como control positivo el plásmido pCN2-CcnD3 (Anexo IV). Una vez obtenido el DNA de las colonias positivas mediante Miniprep, se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos T7, D3CloR y D3R1 (Tabla 11) y se obtuvo, finalmente, la construcción pGBKT7-BD-CcnD3 o plásmido cebo (*bait*) (Anexo IV). El plásmido pGBKT7-BD-CcnD3 (colonia 1) se transformó en la cepa de levadura Y2HGold.

1.3. Detección de la expresión del cebo

Para determinar si la proteína cebo se expresaba correctamente en levadura, se obtuvieron lisados proteicos para detectar su expresión mediante *Western Blot*, utilizando los anticuerpos anti-ciclinaD3 (BD) y anti-cMyc (Biolegend). El peso esperado de la banda observada correspondiente a la proteína de fusión (suma entre ciclinaD3 -32kDa- y dominio BD + cola de c-Myc -21kDa-) era de 53kDa. Sin embargo, en los lisados correspondientes a la cepa Y2HGold transformada con pGBKT7-BD no se observó esta banda de 53kDa, ya que no tenían el inserto CcnD3 (ciclinaD3) subclonado en el plásmido (Figura 39).

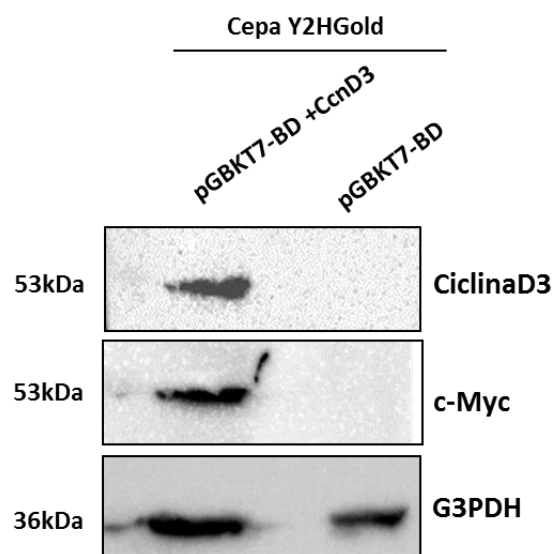


Figura 39: Análisis de la expresión de ciclinaD3 y c-Myc en extractos proteicos de levadura mediante *Western Blot*. Se obtuvieron lisados de la cepa Y2HGold transformada con pGBKT7-BD-CcnD3 y con pGBKT7-BD solo. G3PDH se utilizó como control de carga.

Se utilizó la cepa Y2HGold transformada con el plásmido pGBKT7-53 como control positivo de expresión, ya que expresaba la proteína de 57 kDa p53. Se detectó mediante Western Blot utilizando el anticuerpo anti-cMyc (Figura 40).

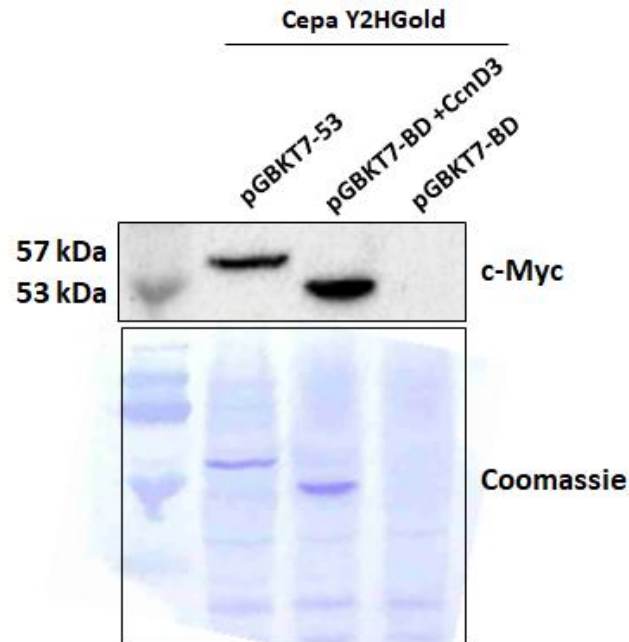


Figura 40: Análisis de la expresión de c-Myc en lisados proteicos de levadura mediante *Western Blot*. La cepa Y2HGold fue transformada con pGBKT7-53, pGBKT7-BD-CcnD3 y pGBKT7-BD vacío. Se muestra la tinción con azul de Coomassie como control de carga.

1.4. Análisis de autoactivación del cebo

Para confirmar que el *cebo* no activaba de forma autónoma los genes reporteros en Y2HGold, en ausencia de la proteína *prey* o presa, se llevaron a cabo análisis de autoactivación. Se transformaron 100 ng de pGBKT7 + CcnD3 en la cepa Y2HGold y se plaquearon 100 μ l de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en SD/-Trp, SDO/X y SDO/X/A. Tras 3-5 días de incubación a 30°C se observaron colonias blancas en las placas SDO y SDO/X, pero no en las placas SDO/X/A (Figura 41), lo cual indica que no existe autoactivación de los genes reporteros en ausencia de interacción.

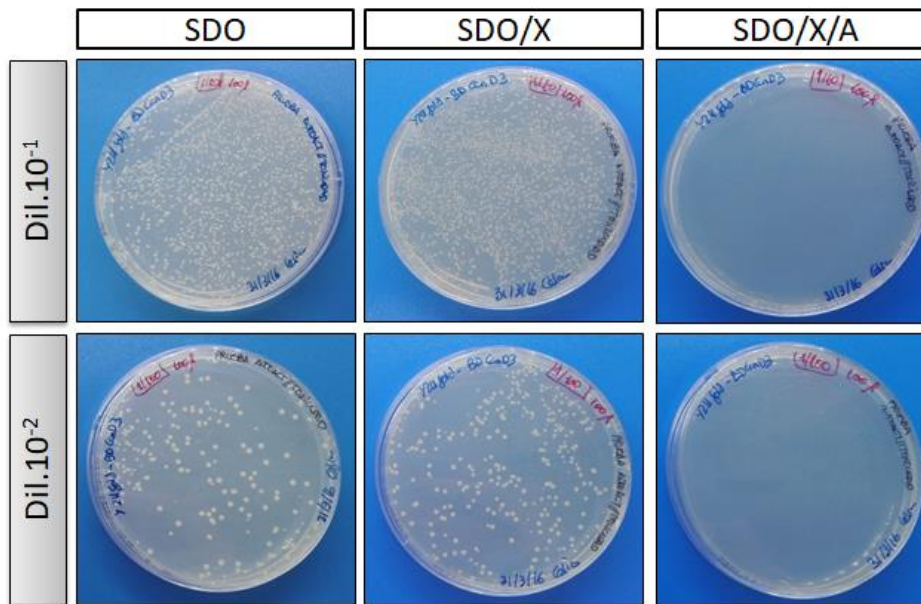


Figura 41: Análisis de autoactivación del cebo. Se transformaron 100 ng de pGBKT7 + CcnD3 en la cepa Y2HGold y se plaquearon 100 μ l de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en SD/-Trp, SDO/X y SDO/X/A.

Para comprobar que el *bait* no resultaba tóxico para las células, se realizó una comparación entre el crecimiento de la cepa Y2HGold, por un lado, transformada con el plásmido pGBKT-BD vacío y, por otro lado, transformada con dicho plásmido con CcnD3. Posteriormente, los cultivos se plaquearon en SD sin triptófano y tras 3-5 días de incubación a 30°C se observó que había crecimiento en ambas placas y, además, las colonias con la ciclinaD3 no tenían un tamaño menor que las colonias con el vector BD solo, sin ciclinaD3, demostrando que el *bait* no era tóxico para la célula (Figura 42).

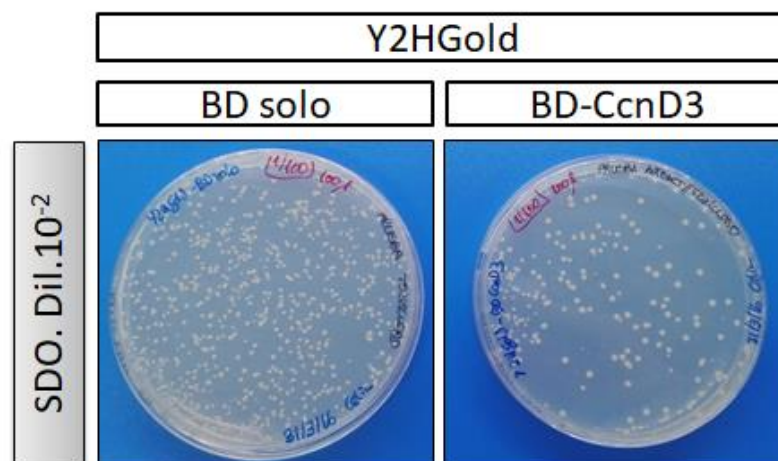


Figura 42: Análisis de toxicidad del cebo. Se comparó el crecimiento de la cepa Y2HGold transformada con BD solo y transformada con BD-CcnD3, en placas SDO.

1.5. Determinación de la titulación de la librería

Se llevó a cabo la titulación de la librería (cfu/ml) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (apartado 4.8., Materiales y Métodos) y contando el número de colonias obtenidas en las placas SD/-Leu tras sucesivas diluciones de la librería (factores de dilución: 10^{-2} y 10^{-4}). Para ello, se utilizó la siguiente fórmula:

Número de colonias	= cfu/ml
Volumen plaqueo (ml) x Factor de dilución	

Se contabilizaron un total de 844 colonias, en los 0.05 ml plaqueados como Dilución B (factor de dilución 10^{-4}). Por tanto, se obtuvo un total de 1.68×10^8 cfu/ml.

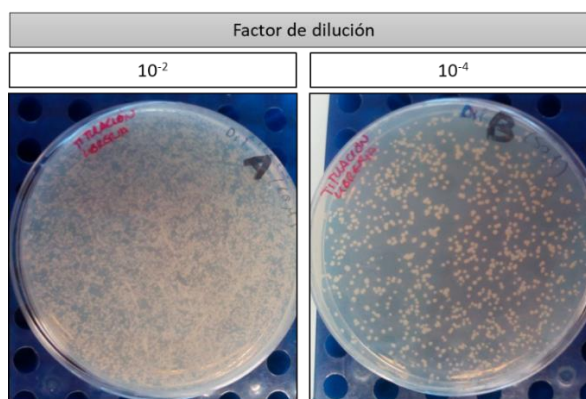


Figura 43: Determinación de la titulación de la librería. Se utilizaron placas SD/-Leu y se realizaron dos diluciones: dilución A (factor de dilución de 10^{-2}) y dilución B (factor de dilución 10^{-4}). Se obtuvo un total de 1.68×10^8 cfu/ml.

1.6. Apareamiento o *mating*

Se llevó a cabo el protocolo de apareamiento descrito en el apartado 4.7., de Materiales y Métodos. Se mezcló la cepa Y187 que contenía la librería normalizada de cDNAs murinos y la cepa Y2HGold con el plásmido cebo (pGBKT7 + CcnD3) y tras 20 horas de incubación a 30°C, se comprobó en el microscopio de contraste de fase (40x) la presencia de zigotos (Figura 44).

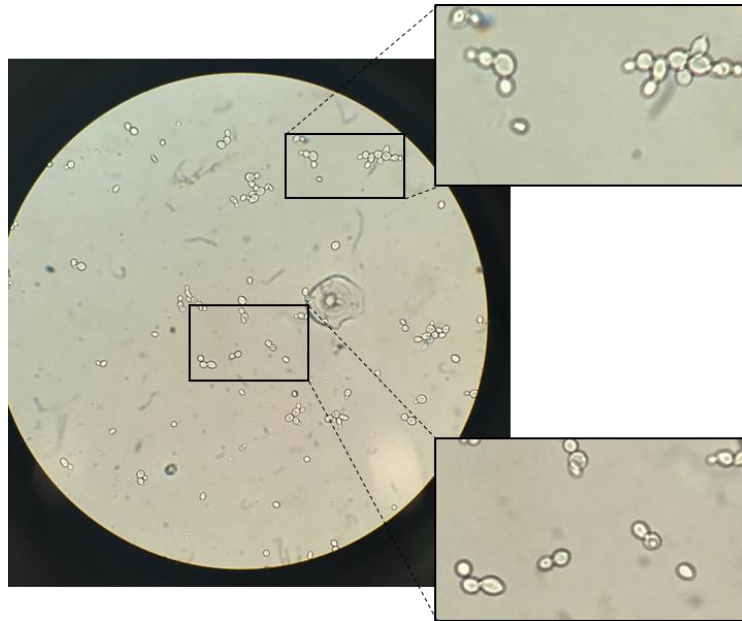


Figura 44: Comprobación de la presencia de zigotos tras el apareamiento. Se realizó el apareamiento entre la cepa Y187-Librería y la cepa Y2HGold- pGBKT7-CcnD3 y se observó al microscopio después de 20 horas de incubación a 30°C.

1.7. Determinación de la eficiencia del apareamiento

Para determinar la eficiencia del apareamiento es necesario calcular la viabilidad, es decir, el número de clones analizados en el cribado (cfu/ml). Para ello, se cuentan las colonias de las placas SD/-Trp (viabilidad del *cebo*), SD/-Leu (viabilidad de la *presa*), y DDO (viabilidad de los diploides), tras 3-5 días de incubación a 30°C (Figura 45).

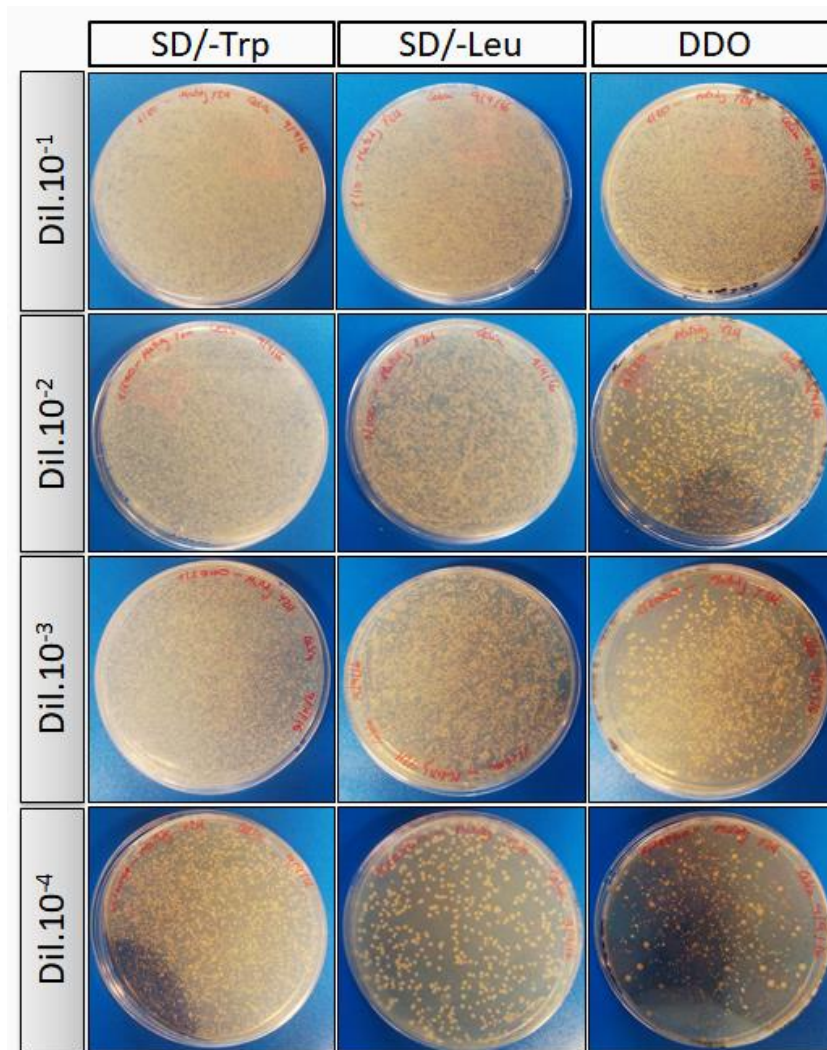


Figura 45: Determinación de la eficiencia del apareamiento. Se obtuvieron colonias en placas SD/-Trp, SD/-Leu y DDO para calcular la viabilidad del *cebo*, de la *presa* y de los diploides, respectivamente. Se realizaron cuatro diluciones diferentes: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .

Los cálculos de viabilidad obtenidos fueron los siguientes:

Viabilidad	cfu/ml
Cebo (SD/-Trp)	2×10^9
Presa (SD/-Leu)	6.53×10^8
Diploides (SD/-Trp/-Leu = DDO)	4×10^7

Tabla 41: Cálculos de viabilidad obtenidos para determinar la eficiencia del apareamiento.

La cepa, cebo o presa, con la menor viabilidad es la limitante para calcular el porcentaje de diploides, y es el dato que se utiliza para calcular la eficiencia del apareamiento, que siempre debe estar entre el 2 y el 10%. En este caso, la cepa presa era la limitante y la eficiencia del apareamiento obtenida fue de 6.2%. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula:

Número de cfu/ml de diploides	—	x 100 = % Diploides
Número de cfu/ml del limitante		

1.8. Candidatos que interactúan positivamente con la ciclinaD3

Las colonias azules obtenidas en DDO/X/A se pasaron a una placa QDO/X/A (Figura 46) y se incubaron durante 3-5 días. Se realizó la extracción del DNA plasmídico de levadura de las colonias azules que crecieron en estas placas (apartado 4.1.4, Materiales y Métodos, Purificación de DNA plasmídico en *S.cerevisiae*) y se realizó la posterior transformación en XL1-Blue, para obtener una miniprep del DNA bacteriano y su correspondiente secuenciación.

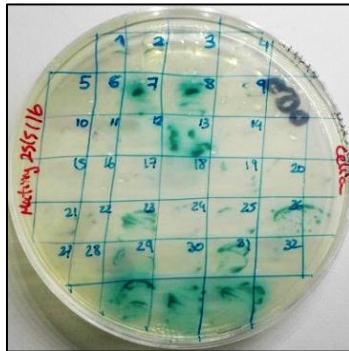


Figura 46: Obtención de candidatos que interactúan potencialmente con ciclinaD3. Ejemplo de placa QDO/X/A en la cual se extendieron las colonias positivas obtenidas previamente en placas DDO/X/A y se incubaron durante 3-5 días para realizar extracción del DNA de las colonias azules.

Se obtuvieron 77 candidatos positivos pertenecientes a familias relacionadas con la ubiquitinización, el transporte de vesículas, vías mitocondriales o chaperonas, de los cuales 12 fueron seleccionados utilizando un criterio de selección basado en el porcentaje de identidad obtenido tras la secuenciación (>80%) y en la función que realizaban, según bibliografía. Entre todos estos candidatos, destacaban Pdia6, Stx8, Ndubf4 y Xdh. Los clones de la librería se clonan siempre de forma aleatoria y muchos de ellos estaban truncados o con la pauta de lectura alterada tras obtenerse la proteína de fusión con Gal4 AD.

Además, diversos estudios demuestran que *S.cerevisiae* es capaz de llevar a cabo un mecanismo de control de la expresión del mRNA denominado Cambio de Pauta Ribosomal Programado o PRF por sus siglas en inglés (*Programmed ribosomal frameshifting*) mediante el cual el ribosoma es guiado hacia un triplete desplazado 1 nucleótido hacia 5' (+1) o hacia 3' (-1), provocando así una recodificación y un cambio en el marco de lectura (Ivanov et al., 2006; Jacobs et al., 2007).

Por ello, para asegurar que las interacciones positivas encontradas en el ensayo de doble híbrido reflejaban interacciones fisiológicas genuinas y no falsos positivos, se decidió utilizar los cDNAs completos no truncados (GenScript) para insertarlos en pauta en el vector pGADT7-AD y comprobar la activación de los genes reporteros, tras la interacción con la ciclinaD3, subclonada en pGBKT-BD. Se transformó, por tanto, la cepa Y187 con el plásmido pGADT7-AD en el cual se habían subclonado los siguientes potenciales candidatos positivos: Xdh, Pdia6, Ndufb4 y Stx8; y se realizó un segundo apareamiento, esta vez a pequeña escala (*small-scale mating*, apartado 4.10., Materiales y Métodos). También se transformó la cepa Y187 con Cdk4 subclonado en el vector AD (Anexo IV), como control positivo de interacción. De esta forma, se comprobó que las proteínas candidatas Xdh, Pdia6, Ndufb4 y Stx8, subclonadas en el vector pGADT7-AD (presa) en la cepa Y187 interaccionaban mediante el sistema de doble híbrido con la ciclinaD3, subclonada en el vector pGBKT-BD (cebo) en la cepa Y2HGold (Figura 47).

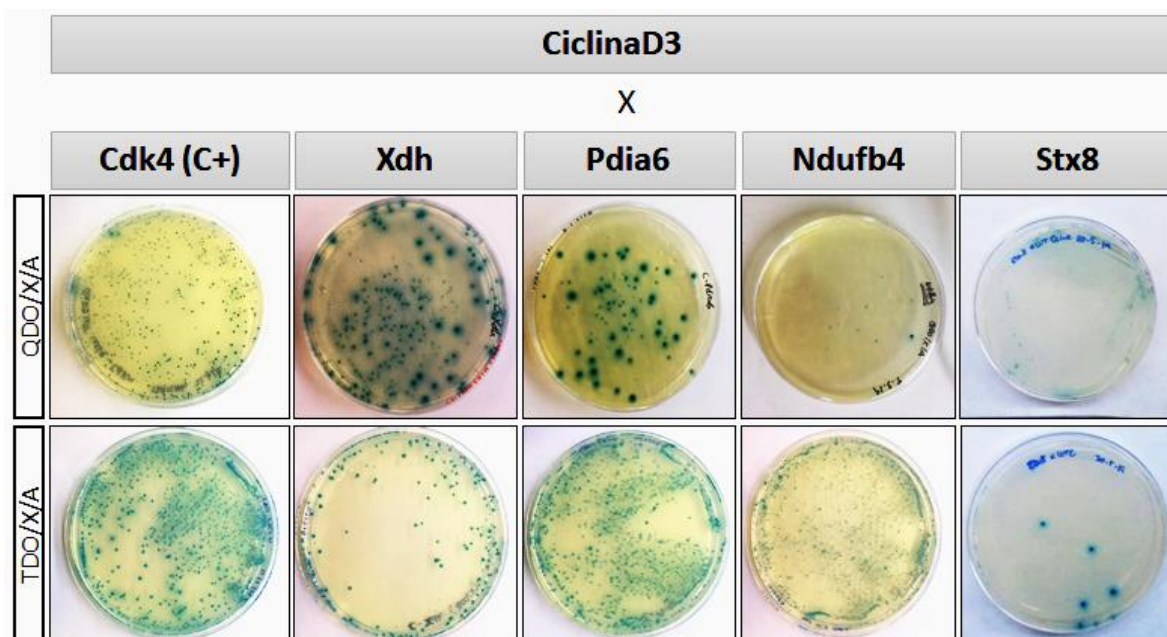


Figura 47: Detección de candidatos que interactúan con ciclinaD3. Placas QDO/X/A (SC/-Leu/-Trp/-His/Ade) y TDO/X/A (SC/-Leu/-Trp/-His), ambas con el sustrato cromagénico X- α -Gal (40 μ g/ml) y Aureobasidina A (200 ng/ml) como antibiótico de selección, obtenidas tras el apareamiento a pequeña escala (*small-scale mating*) entre Y187 (transformado con pGADT7-AD en el cual se subclonaron los candidatos) y Y2HGold (transformado con pGBKT-BD en el cual se subclonó la ciclinaD3). Las proteínas Xdh, Pdia6, Ndufb4 y Stx8 interaccionan con ciclinaD3 en el ensayo de doble híbrido. Cdk4 fue utilizado como control positivo.

2. ESTUDIO DE PDIA6 COMO PROTEÍNA DE INTERACCIÓN CON CICLINAD3

2.1. Comprobación de la expresión de Pdia6 en levadura

Las colonias obtenidas en las placas QDO/X/A se utilizaron para realizar extractos proteicos de levadura y comprobar la expresión de la proteína Pdia6. El peso molecular esperado para la proteína de fusión Pdia6 (48 kDa) junto con el dominio AD (7.98 kDa) era de aproximadamente 55 kDa (Figura 48).

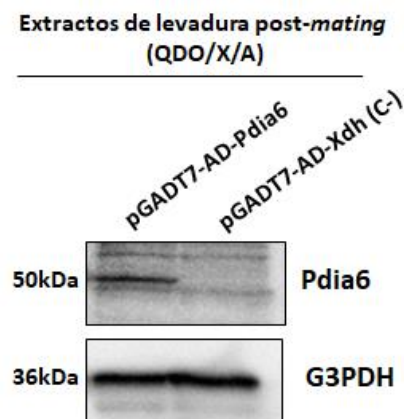


Figura 48: Detección de la expresión de la proteína Pdia6 en extractos de levadura mediante Western Blot. Los extractos se obtuvieron a partir de colonias crecidas en placas QDO/X/A tras el apareamiento (Y187 [pGADT7-AD-Pdia6] x Y2HGGold [pGBKT-BD-ciclinaD3]). G3PDH se utilizó como control de carga.

Para asegurar que la banda detectada era realmente la proteína Pdia6 y no una señal inespecífica, se utilizó el péptido inmunogénico de Pdia6 (DIDLSDVELDDLKDEL) (SC1208, GenScript) como competidor para neutralizar el anticuerpo, incubándolo con un exceso de este péptido (2.5ng/μl) que corresponde al epítipo que es reconocido por el anticuerpo. De esta manera, el anticuerpo que queda unido al péptido ya no está disponible para unirse al epítipo presente en la proteína adherida a la membrana en Western Blot y no se observa banda en el peso esperado (Figura 49).

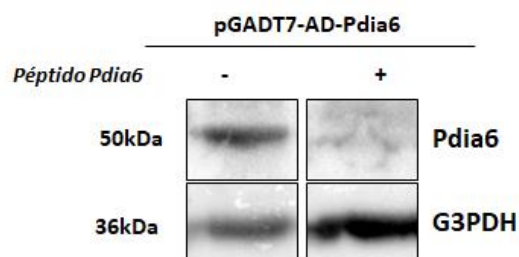


Figura 49: Detección de la expresión de la proteína Pdia6 en extractos de levadura mediante Western Blot, en ausencia y presencia del péptido competidor inmunogénico de Pdia6. La banda correspondiente al peso esperado no aparece en presencia del péptido. G3PDH se utilizó como control de carga.

2.2. Transfección de células NIT-1 con Pdia6

Se realizó la transfección estable de células NIT-1 con el plásmido pcDNA3.1+c-Myc – Pdia6 utilizando Metafectene Pro (Biontex). Se obtuvieron lisados celulares para evaluar la expresión de la proteína (Figura 50-A), comparando células NIT-1 que no habían sido transfectadas, células NIT-1 transfectadas con el plásmido pBSK-Neo (sin ningún inserto de cDNA) con resistencia a neomicina y células NIT-1 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1+c-Myc – Pdia6 (GenScript). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de Pdia6 en las células que habían sido transfectadas con este cDNA en comparación con las células NIT-1 sin transfectar (Figura 50-B).

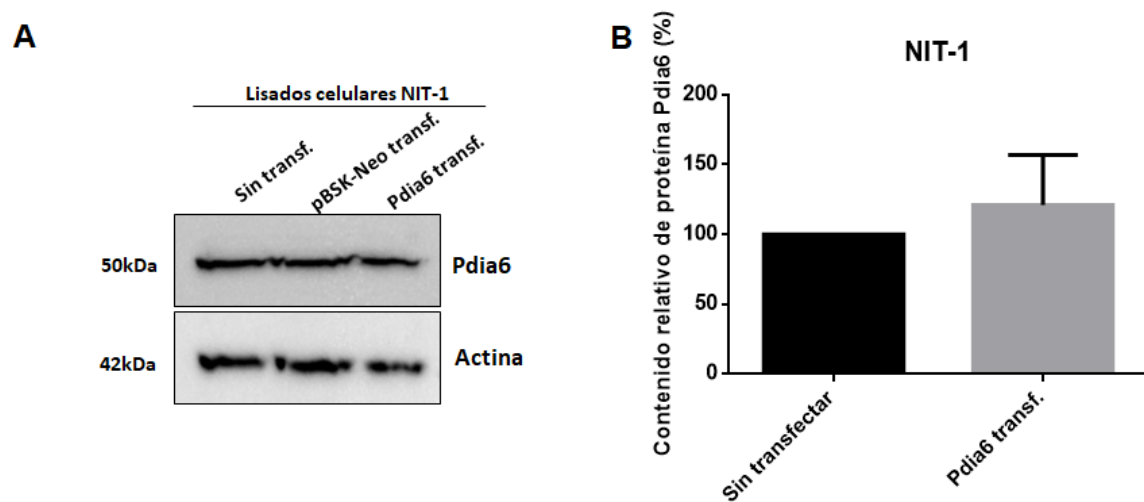


Figura 50. Detección de los niveles de expresión de Pdia6 en lisados celulares de NIT-1. **A)** Western Blot anti-Pdia6 en lisados (60µg) procedentes de células NIT-1 y células transfectadas con pBSK-Neo (sin cDNA) y con pcDNA3.1+c-Myc – Pdia6 (GenScript). Actina se utilizó como control de carga. El Western que se muestra es representativo de los 3 que se hicieron. **B)** Cuantificación de los niveles relativos de Pdia6 normalizados con los niveles de actina (n=3). La prueba estadística utilizada fue Wilcoxon.

Se utilizó de nuevo el péptido inmunogénico de Pdia6 para comprobar que la banda correspondía a la proteína Pdia6 y no se estaban detectando bandas inespecíficas. Tal y como se observa en la Figura 51, en presencia del péptido, baja la intensidad de la banda correspondiente al peso esperado de la proteína Pdia6.

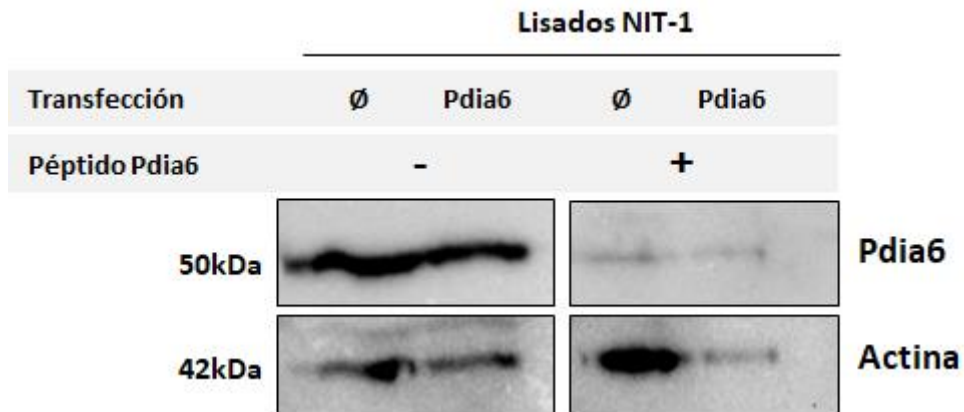


Figura 51: Detección de la expresión de la proteína Pdia6 en lisados NIT-1 mediante Western Blot, en ausencia y presencia del péptido inmunogénico de Pdia6. Se analizaron lisados celulares de NIT-1 sin transfectar y transfectados de forma estable con Pdia6. La banda correspondiente al peso esperado de Pdia6 aparece con menor intensidad en presencia del péptido. Actina se utilizó como control de carga.

Posteriormente, tras observar que no había un incremento significativo de la expresión de Pdia6 en las células NIT-1 transfectadas de forma estable se analizaron los niveles de RNA mediante real-time PCR cuantitativa, normalizando los valores en relación con la expresión de actina y se comprobó que Pdia6 no se sobreexpresaba en las células en las cuales se había realizado la transfección con el plásmido pcDNA3.1+c-Myc – Pdia6, ya que la expresión relativa de mRNA era similar en ambas condiciones (Figura 52).

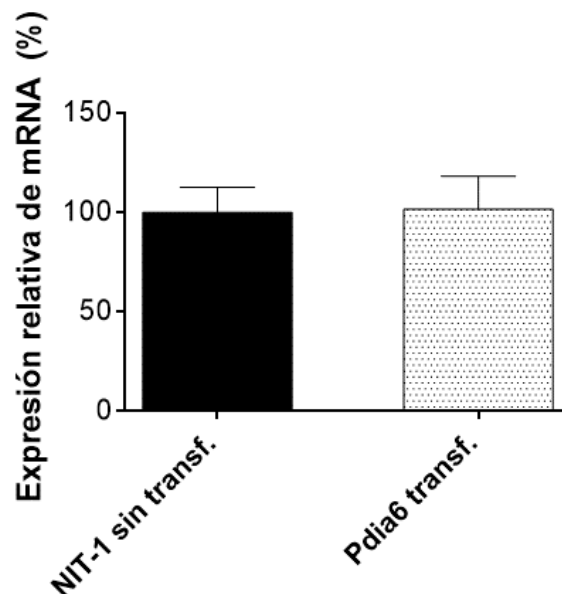


Figura 52: Niveles de expresión relativa de mRNA Pdia6 medidos por RT-PCR. Los niveles se normalizaron por los niveles de expresión de actina y se relativizaron respecto a los valores obtenidos en el control NIT-1 sin transfectar. Se analizaron tres réplicas de cada condición y se hizo duplicado técnico. La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney (n=3).

2.3. Estudio de la interacción entre Pdia6 y ciclinaD3

Una vez confirmada la interacción entre Pdia6 y ciclinaD3 mediante tecnología de doble híbrido en levadura, se procedió a la confirmación mediante coimmunoprecipitación en lisados celulares de NIT-1. Dado que no existían diferencias significativas en los niveles de expresión de la proteína Pdia6 en células transfectadas y células sin transfectar, se utilizaron lisados de células NIT-1 para llevar a cabo los experimentos de inmunoprecipitación.

En primer lugar, Pdia6 fue inmunoprecipitado de los lisados celulares (200 µg) con un anticuerpo anti-Pdia6 y proteína G-Agarosa. Se utilizaron dos tipos de control negativo: lisados con proteína G-agarosa pero sin anticuerpo primario anti-Pdia6 y, la incubación del anticuerpo con la proteína G-agarosa en ausencia de lisado celular. Posteriormente, se llevaron a cabo los ensayos *Western Blot* anti-Pdia6 y anti-ciclinaD3.

Tal y como muestran los resultados (Figura 53), cuando se inmunoprecipitó Pdia6, se detectó la presencia de ciclinaD3 utilizando el anticuerpo anti-ciclinaD3. Como control positivo del *Western Blot* se usaron lisados totales celulares de NIT-1 sin inmunoprecipitar.

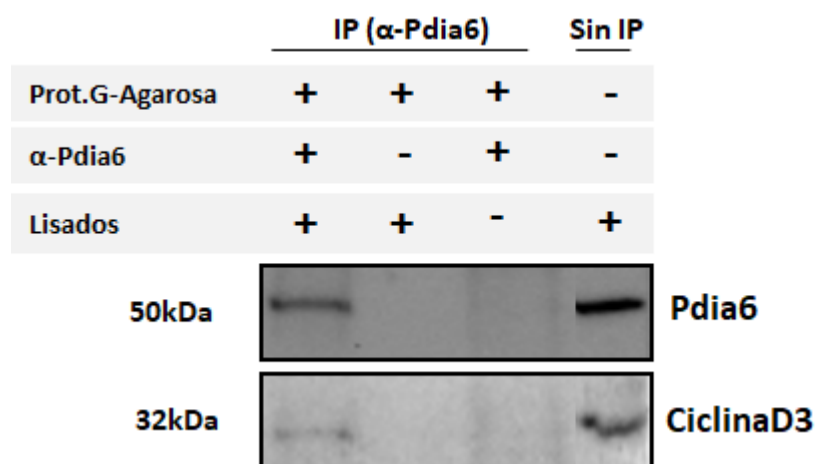


Figura 53. Detección de la interacción entre Pdia6 y ciclinaD3 en lisados celulares NIT-1. Pdia6 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-Pdia6 y Proteína G-agarosa. La inmunoprecipitación sin anticuerpo y sin lisados se utilizó como control negativo y además, se analizaron lisados de NIT-1 sin inmunoprecipitar. La detección de ciclinaD3 se llevó a cabo mediante un *Western Blot* anti-ciclinaD3, utilizando anti-mouse como anticuerpo secundario y la detección de Pdia6 también se realizó mediante *Western Blot* anti-Pdia6 y anticuerpo secundario anti-rabbit (n=3).

Una vez determinada esta interacción mediante doble híbrido en levadura y coimmunoprecipitación en células NIT-1, se usó la técnica de NanoBiT o *NanoLuciferase*

Binary Technology para confirmar esta interacción y determinar las condiciones ambientales que la favorecen. C. Mora subclonó la ciclinaD3 en el vector LgBiT (MCS-3) y Pdia6 en el vector SmBiT (MCS-2). Se utilizó SmBiT (MCS-2)-Cdk4 como control positivo de interacción y SmBiT (MCS-2) vacío como control negativo.

Las células NIT-1 fueron transfectadas de forma transitoria con 200ng de estas construcciones en una proporción 1:1 cebo-presa (ciclinaD3-Pdia6), 100ng de YFP para normalizar los datos por fluorescencia y, además, vector vacío (pcDNA3) hasta una cantidad final de DNA de 2µg. En primer lugar, se analizó la señal de YFP para comprobar la eficiencia de la transfección. Para ello, se obtuvieron imágenes en el microscopio de fluorescencia 24 horas después de la transfección y se confirmó la expresión de YFP en las células NIT-1 transfectadas, en comparación con células NIT-1 sin transfectar (Figura 54).

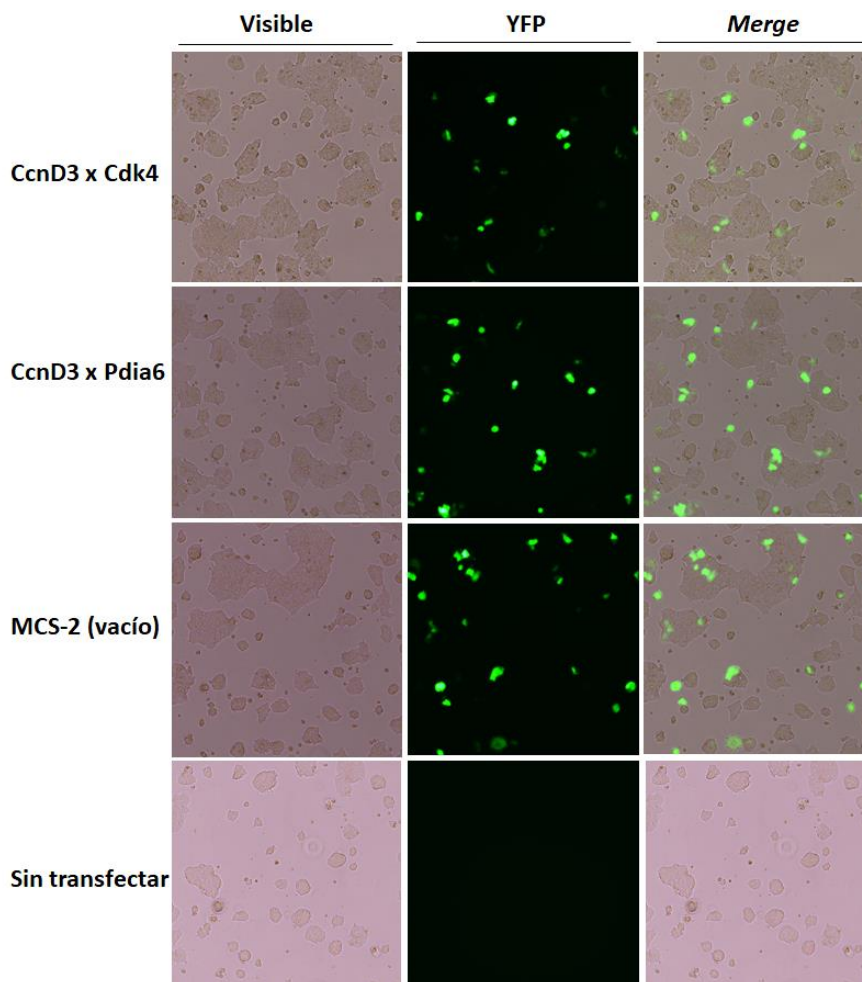


Figura 54. Análisis de la eficiencia de la transfección mediante la expresión de YFP. Se analizó la expresión de YFP 24 horas después de la transfección en células NIT-1 y se obtuvieron imágenes utilizando el microscopio de fluorescencia. Como control negativo se utilizaron células NIT-1 sin transfectar.

En segundo lugar, 48 horas después de la transfección, se midió la señal de fluorescencia de YFP (497 nm excitación; 540 nm emisión) necesaria para normalizar los datos de luminiscencia medidos posteriormente, tras añadir el sustrato (coelenterazina). Ambas mediciones se realizaron con el lector de placa *TECAN infinite M200* utilizando el programa Tecan i-control. Como control positivo se utilizó la interacción entre LgBiT (MCS3)-ciclinaD3 y SmallBiT (MCS2)-Cdk4 y el control negativo utilizado fue SmallBiT (MCS2) vacío. Los datos obtenidos, aunque no son significativos, muestran una tendencia de aumento de la actividad luminiscencia/fluorescencia en la interacción ciclinaD3-Pdia6, comparado con el control negativo (Figura 55).

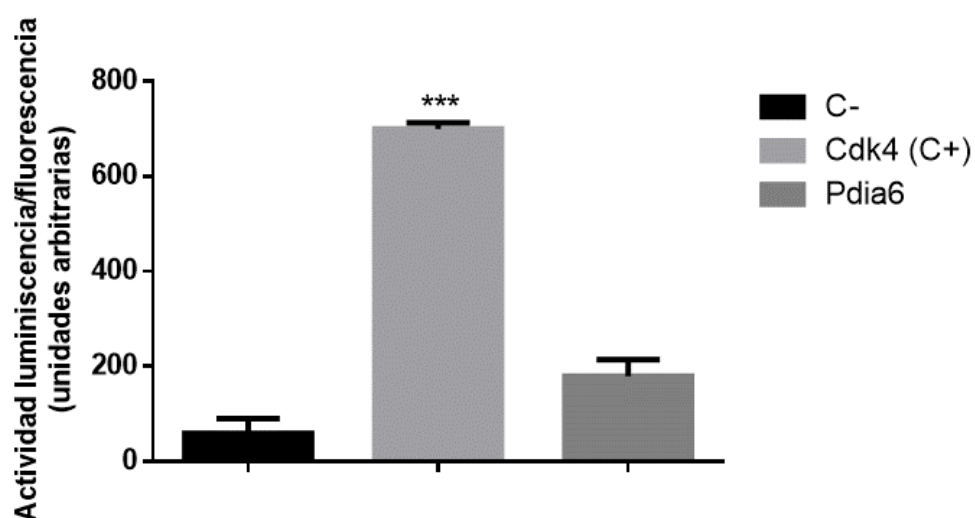


Figura 55. Ensayo de Nanobit para evaluar la actividad de luminiscencia obtenida tras la interacción entre LgBiT (MCS3)-ciclinaD3 y SmallBiT (MCS2)-Pdia6. Los constructos fueron transfectados de forma transitoria en células NIT-1. Los datos de luminiscencia fueron normalizados con los datos de fluorescencia (YFP). Como control positivo se utilizó la interacción entre LgBiT (MCS3)-ciclinaD3 y SmallBiT (MCS2)-Cdk4. El control negativo utilizado fue SmallBiT (MCS2) vacío. La prueba estadística utilizada fue Kruskal-Wallis. Este experimento es representativo de los tres que se realizaron, en los cuales se llevaron a cabo 3 réplicas de cada condición así como duplicado técnico (n=3).

2.4. Estudio de la localización de Pdia6 en células NIT-1

La proteína Pdia6 o proteína disulfuro isomerasa 6 está presente en el retículo endoplasmático de células eucariotas, catalizando el plegamiento proteico (Wilkinson and Gilbert, 2004). Por otro lado, se ha descrito que Pdia6 puede ser también detectada en el citoplasma y en el núcleo en algunos casos, por ejemplo, de células tumorales. Estas localizaciones inusuales de la proteína se han relacionado con su función redox o con su función como activadoras de factores de transcripción o participando en la reparación del DNA (Turano et al., 2002).

En este trabajo, se quiso estudiar la relevancia fisiológica de la interacción entre ciclinaD3 y Pdia6 mediante el análisis de la localización de Pdia6 en células de insulinooma NIT-1 para comprobar si colocalizaba con ciclinaD3. Para ello, se analizó la señal de Pdia6 y ciclinaD3 en células NIT-1 Control y células NIT-1 transfectadas con Pdia6 mediante inmunofluorescencia. Se observó que la señal no mostraba diferencias entre ambos tipos celulares (Figura 56).

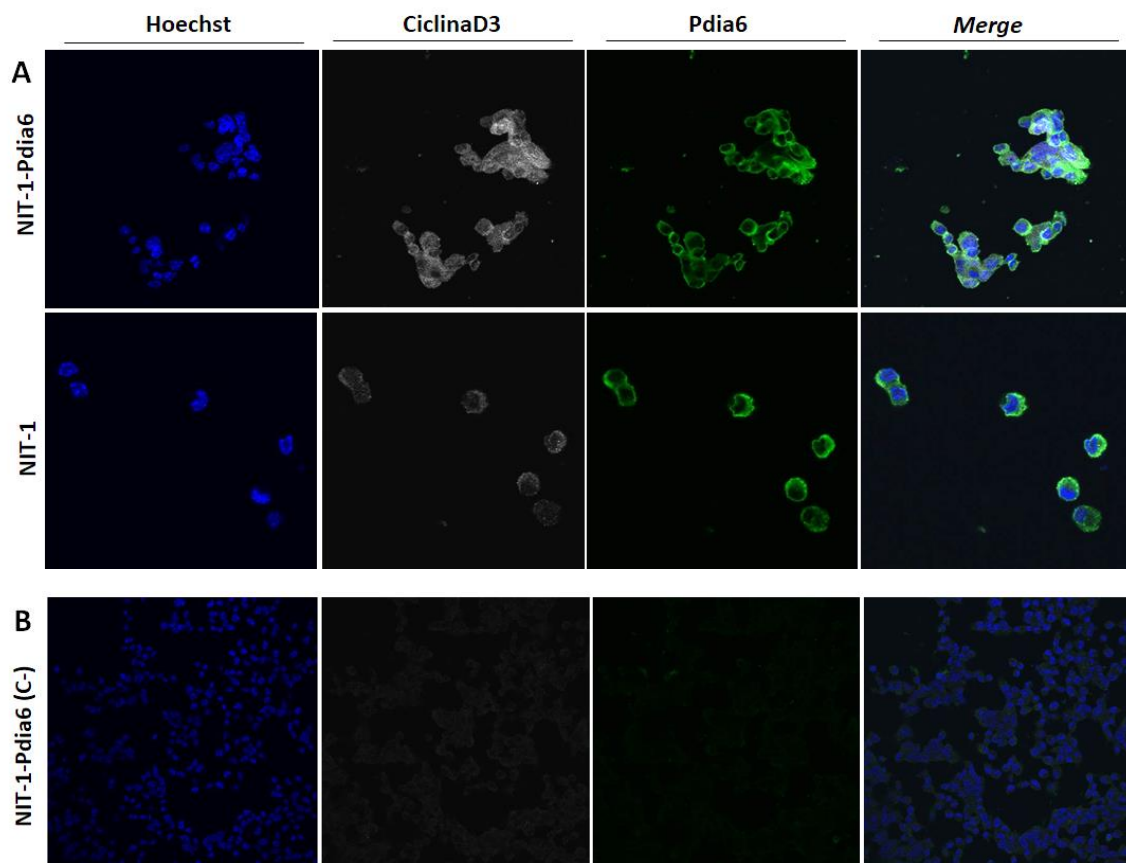


Figura 56. Análisis de la localización de Pdia6 y ciclinaD3 en células NIT-1 transfectadas de forma transitoria con Pdia6 y sin transfectar. Se utilizaron los anticuerpos secundarios Cy2 y Cy5, para Pdia6 y ciclinaD3 respectivamente y se obtuvieron imágenes utilizando el microscopio confocal FV1000 (40x). La imagen Merge corresponde a la superposición de las imágenes Hoechst, ciclinaD3 y Pdia6. **A)** Inmunofluorescencia de Pdia6 y ciclinaD3 utilizando anticuerpos primarios y secundarios. **B)** Control negativo de la inmunofluorescencia sin anticuerpos primarios (20x).

Tal y como muestra la Figura 57, en la cual se ha utilizado el objetivo 60x para tener una imagen ampliada, la señal de Pdia6 muestra un patrón punteado que colocaliza, al menos parcialmente, con la tinción correspondiente a ciclinaD3. Se ha descrito que la ciclinaD3 se puede encontrar tanto en núcleo como en citoplasma, sin embargo, en este caso, el análisis de la localización subcelular de ciclinaD3 es compatible con una presencia predominante

en el citosol. Por otro lado, aunque la bibliografía indica que la principal localización de Pdia6 es el retículo endoplasmático, también es compatible con una localización citosólica, tal y como muestran estos resultados.

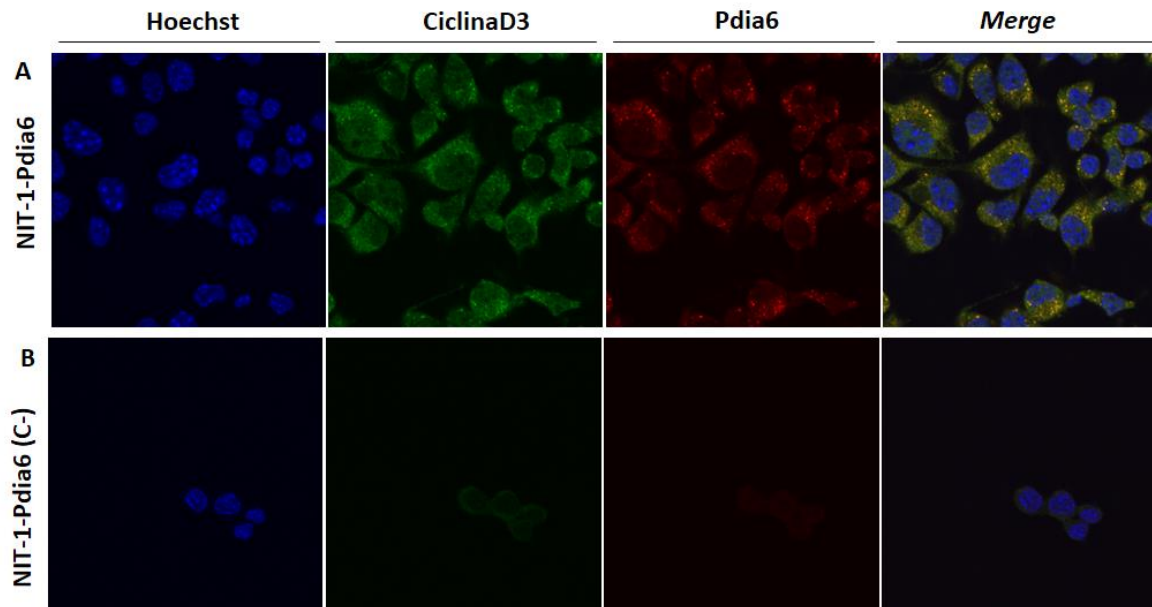


Figura 57. Análisis de la localización de Pdia6 y ciclinaD3 en células NIT-1 transfectadas con Pdia6. Las células se transfectaron de forma transitoria con Pdia6. Se utilizaron los anticuerpos secundarios conjugados con los fluorocromos Cy2 y Cy3: anti-mouse-Cy2 y anti-rabbit-Cy3, para ciclinaD3 y Pdia6 respectivamente. Se obtuvieron imágenes utilizando el microscopio confocal FV1000 (60x). La imagen *Merge* corresponde a la superposición de las imágenes Hoechst, ciclinaD3 y Pdia6. **A)** Inmunofluorescencia de Pdia6 y ciclinaD3 utilizando anticuerpos primarios y secundarios. **B)** Control negativo de la inmunofluorescencia sin anticuerpos primarios.

2.5. Análisis de la expresión de Pdia6

Se analizó la expresión de la proteína Pdia6 en células NIT-1 que eran deficientes para ciclinaD3 (Genoway). Para ello, se llevó a cabo un *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-ciclinaD3, para confirmar la delección y el anticuerpo anti-Pdia6. Tal y como muestra la Figura 58, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la proteína Pdia6 en células NIT-1 KO en comparación con células WT. Por lo tanto, hipotetizamos que ciclinaD3 interactúa con Pdia6 para regular su función sin afectar los niveles de expresión de esta chaperona.

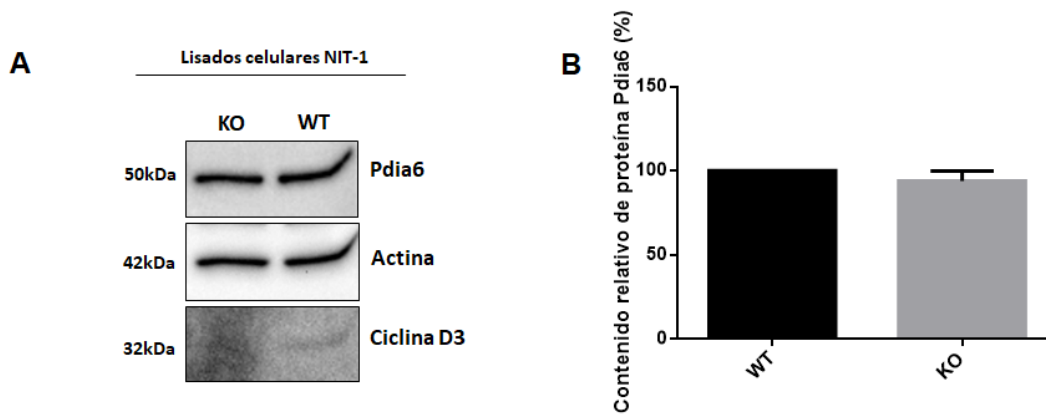


Figura 58: Detección de los niveles de expresión de Pdia6 en lisados celulares de NIT-1 WT y KO para ciclinaD3. A) Western Blot representativo anti-Pdia6 y anti-ciclinaD3 en lisados (60µg) procedentes de células NIT-1 WT (Clon F2N) y KO ciclinaD3 (Clon B4). B) Cuantificación de los niveles relativos de Pdia6 obtenidos por Western Blot y normalizados con los niveles de actina (n=2). La prueba estadística utilizada fue Wilcoxon.

3. ESTUDIO DE STX8 COMO PROTEÍNA DE INTERACCIÓN CON CICLINAD3

3.1. Transfección de NIT-1 con Stx8 y análisis de la expresión proteica

Se utilizó el plásmido pcDNA3.1+c-eGFP – Stx8 (GenScript) para transfectar de forma estable las células NIT-1 y se analizó la expresión de Stx8 utilizando el anticuerpo anti-Stx8, comparando células NIT-1 transfectadas con Stx8 y células sin transfectar. La cuantificación se normalizó con los valores de expresión para actina. Se determinó también la expresión de ciclinaD3 para observar si existían diferencias entre ambos genotipos (Figura 59). El experimento se hizo una única vez, por tanto, sería necesario un incremento de la muestra para confirmar que hay una mayor expresión de ciclinaD3 y Stx8 en las células NIT-1 transfectadas con Stx8.

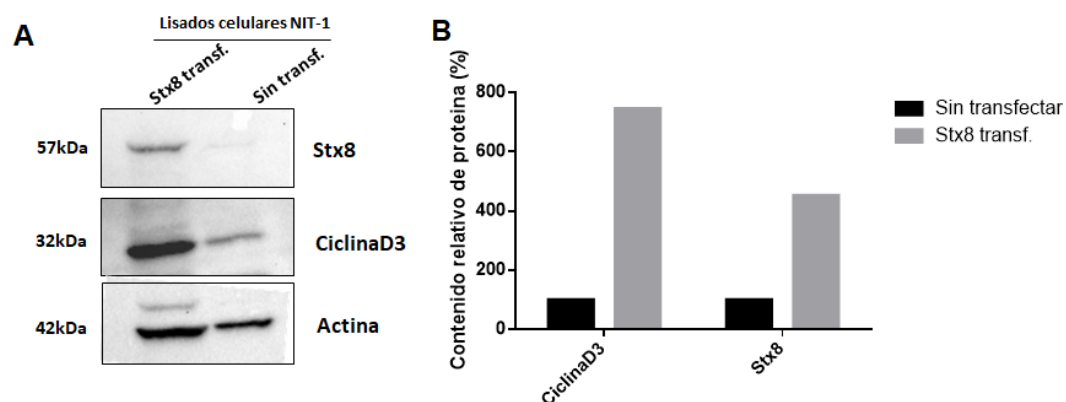


Figura 59: Detección de los niveles de expresión de Stx8 y ciclinaD3 en lisados celulares de NIT-1. A) Western Blot representativo anti-Stx8 y anti-ciclinaD3 en lisados (40µg) procedentes de células NIT-1 sin transfectar y células transfectadas con pcDNA3.1+c-eGFP – Stx8 (GenScript). B) Cuantificación de los niveles de Stx8 y ciclinaD3 obtenidos por Western Blot y normalizados con los niveles de actina (n=1).

Se cuantificó también la expresión de *Stx8* en células transfectadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) y se normalizaron los resultados con la expresión de APRT. Los resultados no mostraron diferencias significativas aunque sí que se observa una tendencia de un aumento de la expresión de *Stx8* en las células que habían sido transfectadas con el plásmido pcDNA3.1+c-eGFP – *Stx8* (Figura 60).

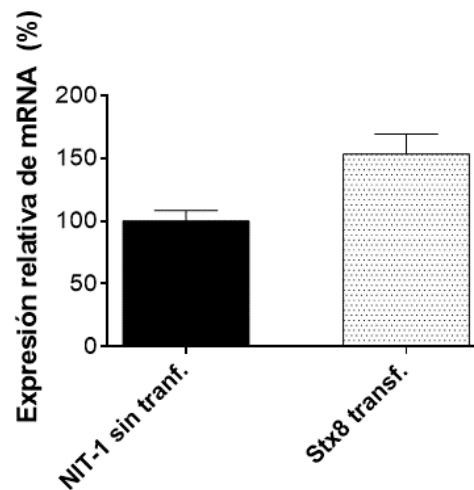


Figura 60. Estudio de la expresión de *Stx8* en lisados de NIT-1 mediante RT-PCR. El gráfico representa los niveles de expresión relativa de mRNA *Stx8* medidos por RT-PCR. Los niveles se normalizaron por los niveles de expresión de APRT y se relativizaron con respecto a los valores obtenidos en el control NIT-1. Se llevaron a cabo 3 réplicas de cada condición así como duplicado técnico (n=3). La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney.

3.2. Estudio de la interacción entre *Stx8* y ciclinaD3

Se llevó a cabo la técnica de NanoBiT para confirmar la interacción entre *Stx8* y ciclinaD3, previamente determinada mediante doble híbrido en levadura. Se subclonó la ciclinaD3 en el vector LgBiT (MCS-3) y *Stx8* en el vector SmBiT (MCS-2). Se utilizó SmBiT (MCS-2)-Cdk4 como control positivo y SmBiT (MCS-2) vacío como control negativo. Las células NIT-1 fueron transfectadas de forma transitoria con estas construcciones.

Los datos obtenidos, aunque no son significativos, muestran una tendencia de aumento de la actividad luminiscencia/fluorescencia en la interacción ciclinaD3-*Stx8*, comparado con el control negativo (Figura 61).

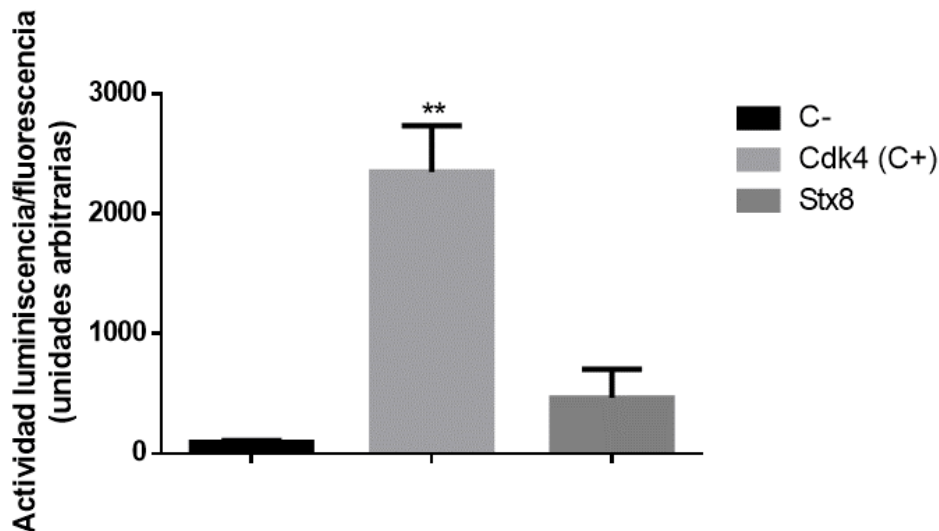


Figura 61. Ensayo de Nanobit para evaluar la actividad de luminiscencia obtenida tras la interacción entre LgBiT (MCS3)-ciclinaD3 y SmallBiT (MCS2)-Stx8. Los constructos fueron transfectados (200 ng) de forma transitoria en células NIT-1. Los datos de luminiscencia fueron normalizados con los datos de fluorescencia (YFP). Como control positivo se utilizó la interacción entre LgBiT (MCS3)-ciclinaD3 y SmallBiT (MCS2)-Cdk4. El control negativo utilizado fue SmallBiT (MCS2) vacío. Este experimento es representativo de los tres que se hicieron (n=3), en los cuales se llevaron a cabo 3 réplicas de cada condición así como duplicado técnico. La prueba estadística utilizada fue Kruskal-Wallis.

3.3. Estudio de la localización de Stx8

La proteína Stx8 o Sintaxina 8 forma parte de complejos SNARE y está implicada en el tráfico vesicular de proteínas que tiene lugar en la vía secretora, posiblemente mediando el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático. Está presente principalmente en endosomas, membrana plasmática, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Por otro lado, se ha descrito que la proteína Stx8 transfectada marcada con un epítipo se localiza de forma diferente de la proteína endógena, lo cual resulta controvertido ya que la mayoría de las proteínas SNARE transfectadas colocalizan con sus equivalentes endógenos (Prekeris et al., 1999).

En este trabajo, se quiso estudiar la relevancia fisiológica de la interacción entre ciclinaD3 y Stx8 mediante el análisis de la localización de Stx8 en células de insulinoma NIT-1 para comprobar si colocalizaba con ciclinaD3. Para ello, se analizaron estas células transfectadas de forma transitoria con pcDNA3.1+c-eGFP–Stx8 (GenScript). En este caso, Stx8 se observa de color verde ya que tiene el marcador GFP clonado y por tanto, para ciclinaD3 se utilizó el anticuerpo secundario Cy3 (rojo). Se ha descrito que la ciclinaD3 puede tener una expresión nuclear y citoplasmática; en estas imágenes vemos colocalización con Stx8 en

algunas de las células. Sin embargo, no todas las células muestran expresión de GFP debido a que la eficiencia de la transfección no fue del 100% (Figura 62).

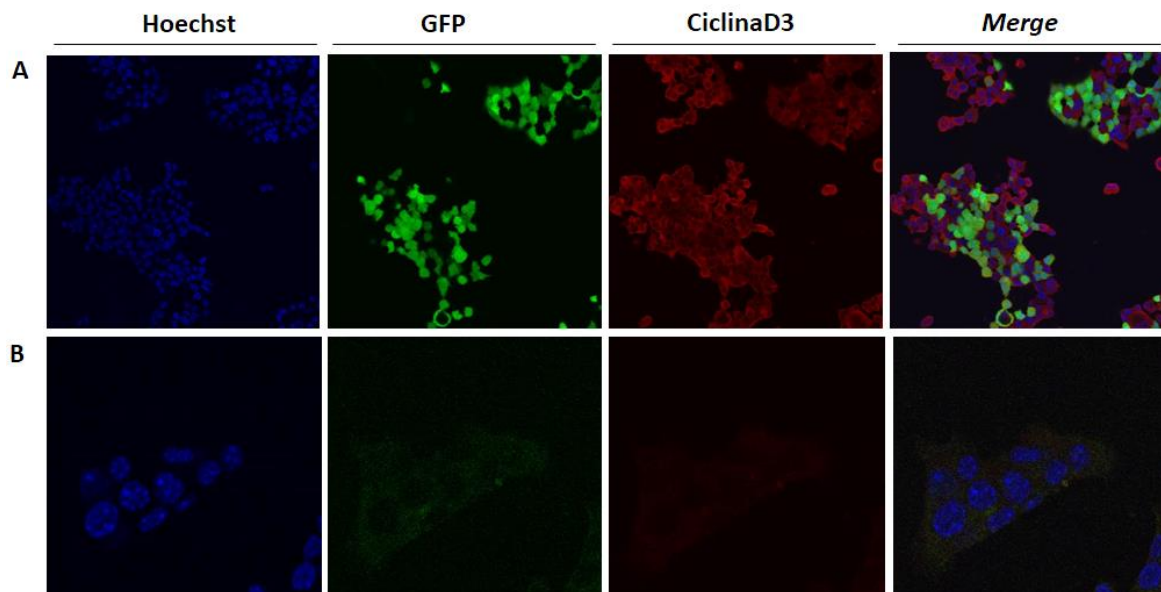


Figura 62. Análisis de la localización de Stx8 y ciclinaD3 en células NIT-1 transfectadas con Stx8. Las células se transfectaron de forma transitoria con pcDNA3.1+c-eGFP – Stx8 (GenScript). Se utilizó el anticuerpo secundario Cy3 para ciclinaD3 y se obtuvieron imágenes utilizando el microscopio confocal (40x). La imagen *Merge* corresponde a la superposición de las imágenes Hoechst, ciclinaD3 y GFP (colocalización). **A)** Inmunofluorescencia de Stx8 y ciclinaD3 utilizando anticuerpos primarios y secundarios. **B)** Control negativo de la inmunofluorescencia sin anticuerpos primarios (60x).

4. PAPEL DE LA CICLINAD3 Y LA CDK11 EN APOPTOSIS EN LA DIABETES TIPO 1

En la diabetes tipo 1, el ambiente inflamatorio perjudica la funcionalidad de las células beta pancreáticas e induce apoptosis. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que la proteína ciclinaD3 prevenía la apoptosis de las células beta y era la única ciclina de tipo D que tenía los niveles disminuidos en células pancreáticas endocrinas debido a la inflamación (Saavedra-Avila et al., 2014).

En este análisis de la expresión diferencial de genes en las células beta pancreáticas en condiciones inflamatorias también se encontró que los niveles de mRNA de *Cdk11*, ligando natural de ciclinaD3, estaban disminuidos en el páncreas endocrino en un modelo de ratón NOD de diabetes tipo 1. Sin embargo, estudios previos realizados por E.Sala han demostrado que la hemideficiencia de *Cdk11* protege de la apoptosis, por tanto, existiría un papel antagónico entre ciclinaD3 y *Cdk11* con relación a su papel en la apoptosis.

Por este motivo, para determinar si Cdk11 está implicada en la apoptosis inducida por inflamación, se cuantificó la apoptosis, por un lado, en ratones NOD/SCID hemideficientes en Cdk11 (HTZ), ya que la deficiencia homocigótica de CDK11 es embrionariamente letal; y por otro lado, en células de insulinooma NIT-1, transfectadas con el plásmido pBSK-Neo, que contenía los transgenes CDK11^{p58} y CDK11^{p130}. Cdk11 es una quinasa dependiente de ciclina con 2 productos génicos: p58 y p130 en ratones y p58 y p110 en humanos (Lahti et al., 1994).

4.1. Determinación de la fragmentación de DNA (subG1)

La cuantificación de la apoptosis fue determinada siguiendo una adaptación del método desarrollado por Nicoletti y colaboradores (Nicoletti et al., 1991; Wali et al., 2015). La fragmentación nuclear es una de las principales características de la apoptosis y puede ser detectada distinguiendo el contenido de DNA en sub-G₁ del contenido de DNA normal. Se analizaron islotes pancreáticos de ratón que habían sido sometidos a un estímulo proinflamatorio mediante un *cocktail* de citoquinas (IFN- γ 100U/ml, TNF- α 1000 U/ml, IL1 β 100U/ml), en periodos de tiempo de 24 horas (estrés agudo) y de 5 días (estrés crónico). Se analizó la fragmentación de DNA como medida de eventos de apoptosis tardía mediante citometría de flujo (Figura 63).

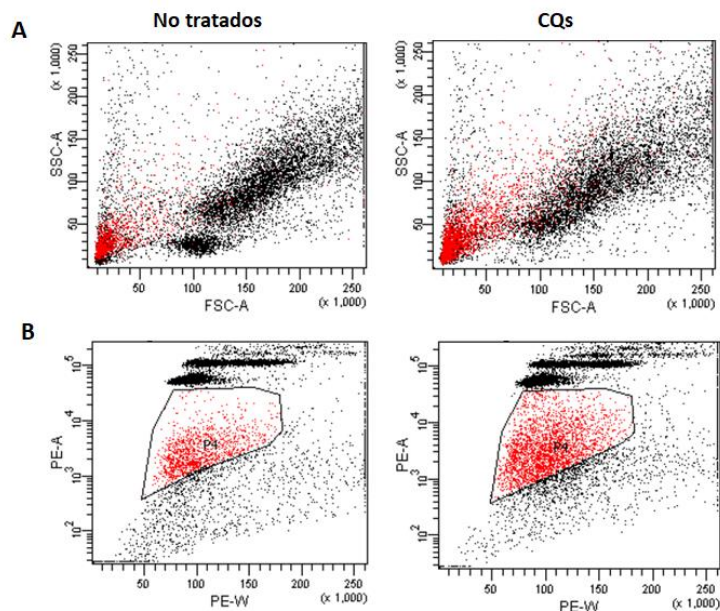


Figura 63. Ejemplo de gráficos de citometría de flujo del ensayo de fragmentación de DNA. Islotes de ratones hembra NS-WT y NS-HTZ se incubaron en presencia o ausencia de citoquinas durante 24 horas o 5 días. La figura muestra ejemplos de A) Dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) y B) PE-W y PE-A. P4 (rojo) corresponde a la region analizada. Se muestran los datos obtenidos en un experimento representativo.

Se analizó el porcentaje de subG1 (%subG1) y se calculó el incremento de subG1 obtenido (% Δ subG1) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \Delta \text{SubG1} = \left[\frac{(\% \text{SubG1 Islotes tratados con CQ}) - (\% \text{SubG1 Islotes Control})}{\% \text{SubG1 Islotes Control}} \right] \times 100$$

Los islotes pancreáticos fueron aislados de ratones hembra de 5 semanas NOD SCID WT (NS-WT) o hemideficientes en Cdk11 (NS-HTZ). En primer lugar, se determinó el nivel de muerte basal (%subG1) que tenían los islotes de manera fisiológica, sin la adición de ningún estímulo apoptótico, tras 24 horas de incubación. Se cultivaron en medio DMEM con 5mM, 11mM y 25mM de glucosa. No se encontraron diferencias significativas entre NS-HTZ y NS-WT en ninguna de las concentraciones de glucosa, por lo que se partía de niveles similares de fragmentación de DNA basal (Figura 64).

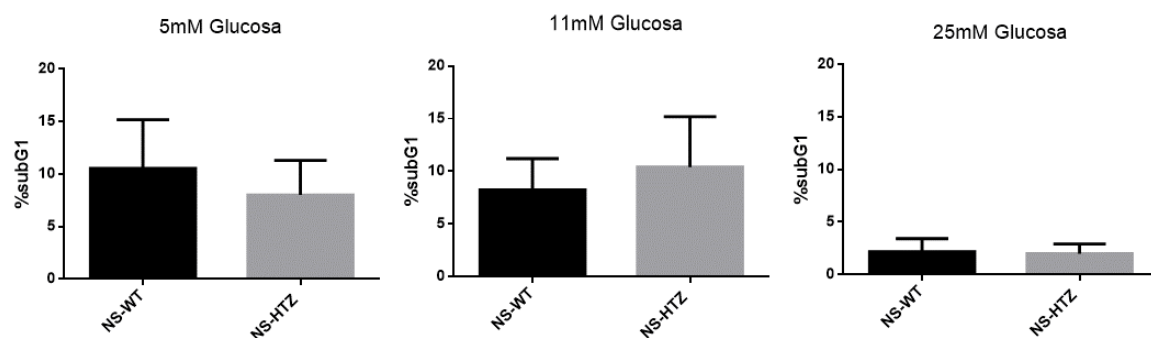


Figura 64: Porcentaje basal de fragmentación de DNA (%subG1). Niveles basales de subG1 en islotes de ratones de 5 semanas NOD SCID WT (NS-WT) y con hemideficiencia de Cdk11 (NS-HTZ), incubados durante 24 horas en DMEM con 5mM de glucosa (n=3), 11 mM (n=6) y 25 mM (n=3). Se utilizaron islotes procedentes de 92 ratones (48 WT y 44 HTZ), repartidos en pocillos (25-30 islotes/pocillo). La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney.

Para confirmar la hipótesis de que la hemideficiencia de Cdk11 protegía de la apoptosis inducida por citoquinas, se incubaron los islotes NS-WT y NS-HTZ en presencia y ausencia de un *cocktail* de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ 100U/ml, TNF- α 1000 U/ml, IL1 β 100U/ml) durante 5 días (estrés crónico). Se determinó la fragmentación de DNA comparando el porcentaje de subG1 obtenido en los islotes incubados con citoquinas con el porcentaje de subG1 de los islotes que no habían sido tratados (%subG1) (Figura 65-A) y se calculó el incremento producido (% Δ subG1) (Figura 65-B). La inducción de apoptosis debida a la exposición de citoquinas fue medida y comparada en ambos grupos experimentales (NS-WT vs. NS-HTZ). Se observó una diferencia significativa en la gráfica correspondiente al incremento de subG1, en la cual los islotes HTZ exhibían un menor nivel

de inducción de apoptosis debido a citoquinas proinflamatorias, lo cual confirmaría el mecanismo protector de la hemideficiencia de Cdk11 frente a la apoptosis.

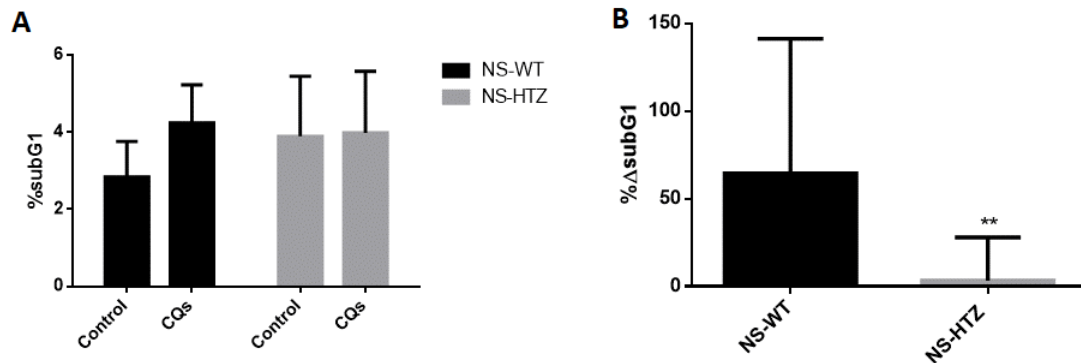


Figura 65: Fragmentación de DNA debido a la incubación con citoquinas (5 días). Islotes de ratones de 5 semanas NOD SCID WT (NS-WT) y con hemideficiencia de Cdk11 (NS-HTZ), incubados en DMEM con 11mM de glucosa. SubG1 muestra el grado de apoptosis tardía. **A)** Porcentaje de fragmentación de DNA (%subG1) comparando islotos control sin tratar e islotos tratados durante 5 días con un *cocktail* de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ 100U/ml, TNF- α 1000 U/ml, IL1 β 100U/ml). **B)** Incremento de la fragmentación de DNA (% Δ subG1) obtenido en los islotos NS-WT y NS-HTZ. Se utilizaron islotos procedentes de 25 ratones (12 WT y 13 HTZ), repartidos en pocillos (25-30 islotos/pocillo). Se hicieron 6 experimentos (n=6) en los cuales se analizaron 3 réplicas por condición. La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney. p<0,05 (*), p<0,01 (**).

Se disminuyó el tiempo de incubación de los islotos con el *cocktail* de citoquinas proinflamatorias reduciéndolo a 24 horas (estrés agudo). Se incubaron en medio DMEM con concentraciones crecientes de glucosa: 5mM, 11mM y 25 mM; y se determinó la fragmentación de DNA (%subG1). La Figura 66 muestra un aumento significativo del porcentaje de subG1 en los islotos WT incubados con citoquinas proinflamatorias, mientras que en los islotos HTZ no se observan diferencias significativas.

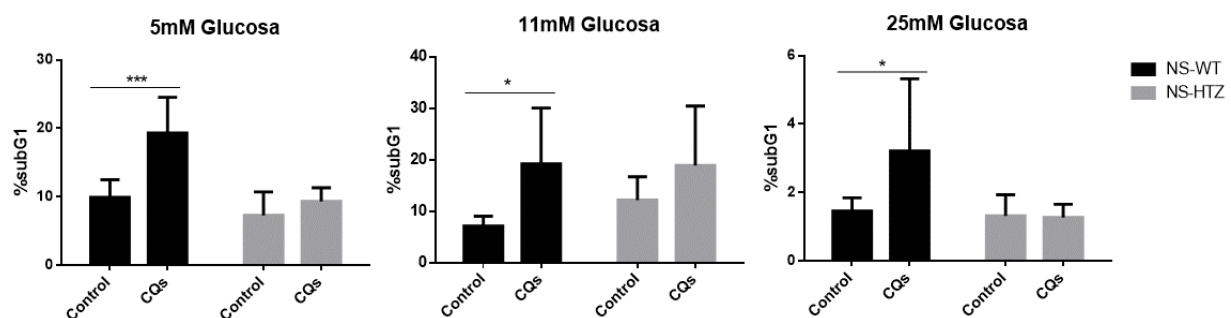


Figura 66: Porcentaje de fragmentación de DNA (%subG1) en islotos NS-WT y NS-HTZ en ausencia y presencia de citoquinas proinflamatorias (24 horas). Porcentaje obtenido en los islotos de ratones de 5 semanas NOD SCID WT (NS-WT) y con hemideficiencia de Cdk11 (NS-HTZ), incubados en DMEM con 5, 11 y 25 mM de glucosa. Comparación entre islotos control e islotos tratados durante 24 horas con un *cocktail* de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ 100U/ml, TNF- α 1000 U/ml, IL1 β 100U/ml). SubG1 muestra el grado de apoptosis tardía. Se utilizaron islotos procedentes de 64 ratones (32 WT y 32 HTZ), repartidos en pocillos (25-30 islotos/pocillo). Se hicieron 3 experimentos (n=3) en los cuales se analizaron un mínimo de 3 réplicas por condición. El análisis estadístico llevado a cabo fue ANOVA bidireccional. p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)

Se analizó también el porcentaje de incremento de subG1 mediante la fórmula mencionada anteriormente, a diferentes concentraciones de glucosa en el medio. Los resultados obtenidos muestran de nuevo el mecanismo protector de la Cdk11, ya que el porcentaje de Δ subG1 en los islotes NS-HTZ era significativamente menor, comparado con los islotes de ratones NS-WT (Figura 67).

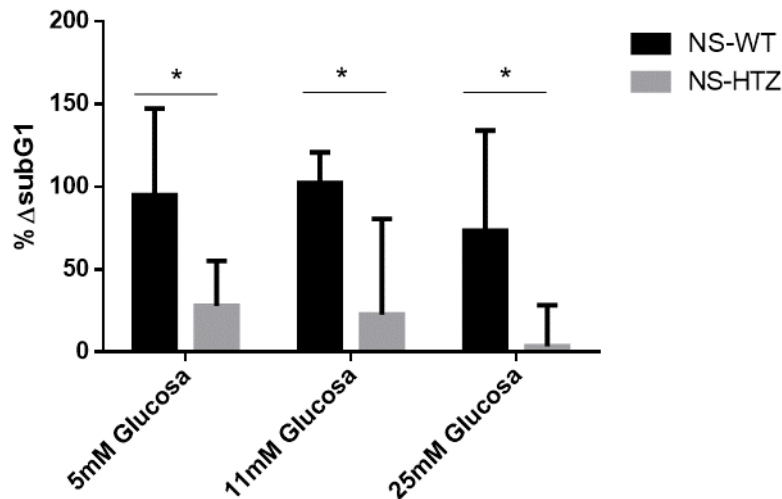


Figura 67: Incremento de fragmentación de DNA (% Δ subG1) debido a la incubación con citoquinas (24 horas). Incremento obtenido en los islotes de ratones de 5 semanas NOD SCID WT (NS-WT) y con hemideficiencia de Cdk11 (NS-HTZ), incubados en DMEM con 5, 11 y 25 mM de glucosa. Para ello, se compararon los islotes tratados durante 24 horas con un *cocktail* de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ 100U/ml, TNF- α 1000 U/ml, IL1 β 100U/ml) y los no tratados. Se utilizaron islotes procedentes de 64 ratones (32 WT y 32 HTZ), repartidos en pocillos (25-30 islotes/pocillo). Se hicieron 3 experimentos (n=3) en los cuales se analizaron un mínimo de 3 réplicas por condición. El análisis estadístico llevado a cabo fue ANOVA bidireccional. p<0,05 (*).

5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE ESTRÉS DE RETÍCULO, VÍA UPR E INFLAMACIÓN

En la diabetes tipo 1, la insulinitis y la hiperglucemia inducen estrés de retículo endoplasmático en las células beta y la activación de *Unfolded Protein Response* (UPR), provocando la apoptosis de las células beta. La inflamación y el estrés de retículo se retroalimentan positivamente, exacerbando la muerte de las células beta. Por otro lado, uno de los candidatos confirmados mediante tecnología de Y2H y otras técnicas como coimmunoprecipitación que interaccionaba con ciclinaD3, era la proteína disulfuro isomerasa 6 o Pdia6, la cual está involucrada directamente en la vía UPR por su actividad como chaperona. Por ello, se analizaron genes relacionados con estrés de retículo e inflamación en células NIT-1 y en islotes pancreáticos de ratón.

Los resultados obtenidos en el análisis de subG1 señalan que la protección ejercida por la hemideficiencia de Cdk11 contra la apoptosis podría estar influyendo frente a un desencadenante proinflamatorio en islotes. Por ello, hipotetizamos que este mecanismo de protección podría ser la inhibición del estrés de retículo endoplásmico (ER) responsable de la muerte de la célula beta.

Para confirmar que la hemideficiencia de Cdk11 estaba inhibiendo la apoptosis inducida por UPR, se cultivaron los islotes pancreáticos de ratones hembra de 5 semanas de edad NOD SCID WT (NS-WT) o hemideficientes en Cdk11 (NS-HTZ) en presencia o ausencia de tapsigargina, un fármaco que induce estrés de retículo endoplásmico. 24 horas después, los islotes fueron recogidos y se extrajo el RNAs de todos los grupos experimentales para cuantificar los niveles de expresión relativa de tres marcadores clave de UPR: BiP (Binding-immunoglobulin protein, una chaperona) (Marhfour et al., 2012a), Atf4 (Activating transcription Factor 4) (Harding et al., 2000) y Chop (Proteína homóloga C/EBP) (Sano and Reed, 2013). ATF4 lleva a la expresión de CHOP, lo cual conduce a apoptosis en UPR terminal. Los resultados se mostraron como incremento (*fold-induction*), obtenido de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Nivel de mRNA de Islotes tratados con tapsigargina (\%)}}{\text{Nivel de mRNA de Islotes sin tratar o Control (\%)}}$$

Se observa una reducción significativa en la inducción de Atf4 y Chop en los islotes NS-HTZ comparado con NS-WT en condiciones de estrés de ER. En NS-HTZ la inducción de ambos factores de transcripción debido al estrés de ER está severamente disminuida, lo cual podría explicar por qué la disminución de la expresión de *Cdk11* podría contribuir a inhibir y retrasar la cinética de la muerte de la célula beta debido al estrés de retículo en diabetes tipo 1. Los niveles de BiP, a pesar de no mostrar diferencias significativas entre ambos grupos, muestran una marcada tendencia a ser más bajos en los islotes NS-HTZ comparado con NS-WT (Figura 68).

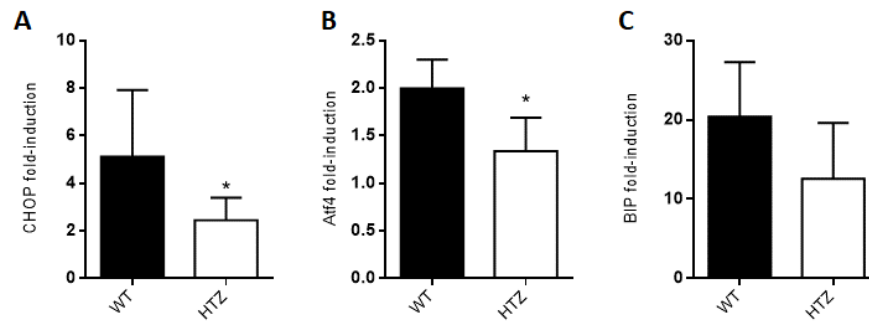


Figura 68: Incremento (n^o veces de inducción) de abundancia de mRNA de A) *CHOP*, B) *ATF4*, C) *BIP* de isletos de ratón NOD SCID de 5-7 semanas, obtenido al incubar los isletos con 1 μ M de taspigargina durante 24h. Comparación entre el incremento producido en isletos WT e isletos HTZ. Los gráficos muestran la cuantificación de los niveles de mRNAs normalizados por los niveles de expresión de *Gapdh*. Se utilizaron isletos procedentes de 17 ratones (8 WT y 9 HTZ), repartidos en pocillos (40-60 isletos/pocillo), incubados en DMEM 11mM Glucosa. Se analizaron un mínimo de 3 réplicas por condición. La prueba estadística utilizada fue Mann-Whitney. $p < 0,05$ (*).

Todo esto, podría confirmar la hipótesis del papel de *Cdk11* en promover la muerte de las células beta, ya que la hemideficiencia de *Cdk11* protegería a las células beta de la apoptosis inhibiendo la expresión de *CHOP* inducida por UPR. Por otro lado, se analizaron también células NIT-1 que habían sido transfectadas con *Cdk11* [p58 CDK11] y [p130 CDK11]; con ciclinaD3 [*CcnD3*]; y con vector pBSK-Neo vacío [pBSK-Neo], como control. En primer lugar, se comprobaron los niveles basales de fragmentación nuclear tras 24 horas de incubación con distintas concentraciones de glucosa (5, 11 y 25mM) (Figura 69). En los resultados obtenidos se observa que las células NIT-1 transfectadas con *Cdk11* mostraban un incremento significativo de la fragmentación de DNA (%subG1) a nivel basal, en comparación con las células NIT-1 control (transfectadas con pBSK-Neo vacío). Sin embargo, las células transfectadas con ciclinaD3 se mantenían en unos niveles similares que las células NIT-1 control.

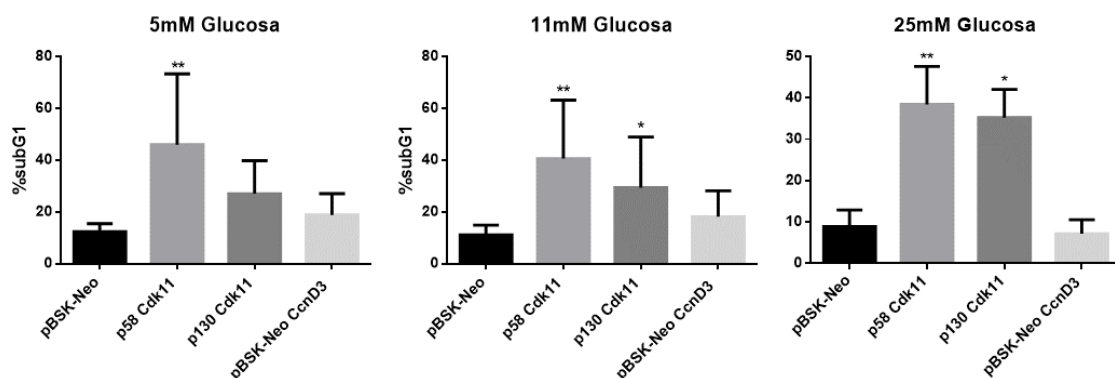


Figura 69: Niveles basales de fragmentación nuclear (%subG1) en células NIT-1 tras 24 horas de incubación. Las células NIT-1 fueron transfectadas con los vectores p58 *Cdk11*, p130 *Cdk11*, pBSK-Neo ciclinaD3 y con vector pBSK-Neo vacío como control. Se incubaron durante 24 horas, con distintas concentraciones de glucosa (5, 11 y 25mM). Se analizó un mínimo de tres réplicas de cada condición, con $0.5-1 \cdot 10^6$ células por pocillo y el experimento se realizó 3 veces ($n=3$). La prueba estadística utilizada fue Kruskal-Wallis. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

En segundo lugar, las células NIT-1 fueron incubadas en presencia y ausencia de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ 100U/ml, IL1 β 500U/ml) durante 24 horas, a diferentes concentraciones de glucosa (5mM, 11mM y 25mM) y se analizó la fragmentación de DNA o %subG1. Los resultados muestran una tendencia por parte de las células transfectadas con p58 Cdk11, las cuales tendrían un mayor porcentaje de fragmentación nuclear comparado con las células NIT-1 control (transfectadas con pBSK-Neo vacío), aunque los resultados no son significativos (Figura 70).

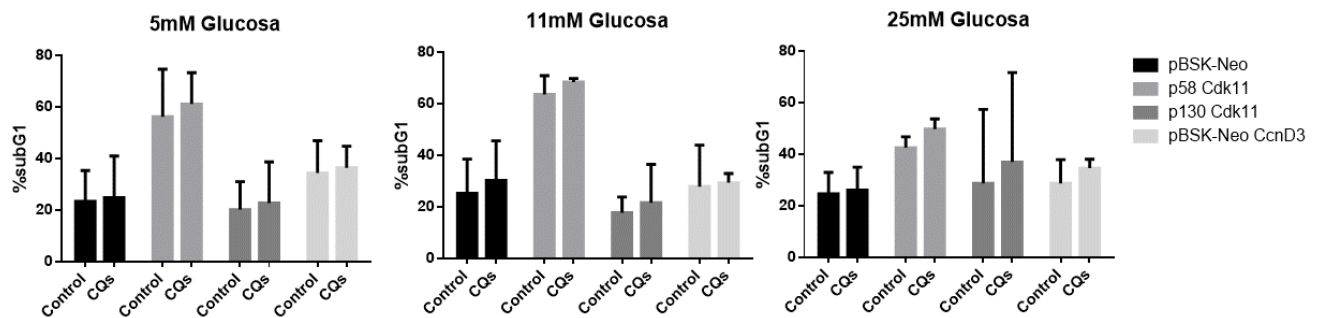


Figura 70: Porcentaje de fragmentación de DNA (%subG1) en células NIT-1 en ausencia y presencia de citoquinas proinflamatorias. Las células NIT-1 fueron transfectadas con los vectores p58 Cdk11, p130 Cdk11, pBSK-Neo ciclinaD3 y con vector pBSK-Neo vacío como control. Se incubaron durante 24 horas, con distintas concentraciones de glucosa (5, 11 y 25mM) y en presencia (CQs) o ausencia (Control) de un *cocktail* de citoquinas proinflamatorias compuesto por IFN- γ 100U/ml e IL1 β 500U/ml. Se analizaron $0.5-1 \cdot 10^6$ células por pocillo y el experimento se realizó 2 veces (n=2). El análisis estadístico llevado a cabo fue ANOVA bidireccional.

Posteriormente, se analizaron genes relacionados con la respuesta UPR, como CHOP, ATF4 y BIP; y con la inflamación, como IL1 β . Cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático, BIP se separa de los sensores del ER, PERK, IRE1 y ATF6, provocando su activación. PERK fosforila eIF2 α , activándolo. ATF4 es un factor de activación de la transcripción que interacciona con la forma activa de eIF2 α promoviendo la expresión de genes que codifican chaperonas, como CHOP y BIP/GRP78. Por tanto, esta acumulación de proteínas mal plegadas (como, por ejemplo, la proinsulina) se almacenan en el retículo endoplasmático provocando la muerte de las células beta debido a la fosforilación de eIF2 α mediada por PERK y la consiguiente inducción transcripcional de ATF4 y de genes proapoptóticos como CHOP (Hotamisligil, 2010; Scheuner et al., 2005).

Diversos estudios han detectado la presencia de marcadores de estrés como CHOP y ATF4 en ratones NOD prediabéticos (Engin et al., 2013; Tersey et al., 2012) y en pacientes con T1D (Marhfour et al., 2012b). Por otro lado, la diabetes tipo 1 es una enfermedad crónica

inflamatoria en la cual las citoquinas proinflamatorias, como la $IL1\alpha$ y la $IL1\beta$, tienen un papel clave como inductores de la inflamación que podría relacionarse de forma significativa con la patogénesis de la enfermedad (Gouda et al., 2018).

Los niveles de mRNA de *CHOP*, *ATF4*, *IL1 β* y *BIP* en las células NIT-1 transfectadas fueron determinados mediante PCR a tiempo real (Figura 71). Había un incremento significativo de los niveles de mRNA de *ATF4* e *IL1 β* en las células transfectadas con p58 Cdk11 y p130 Cdk11, respectivamente. En el caso de *CHOP*, se observa una tendencia similar, aunque los datos no son significativos. Sin embargo, en *BIP* se observa una disminución significativa de los niveles de expresión de mRNA en todos los transfectantes, comparado con el control (células transfectadas con pBSK-Neo vacío), lo cual resulta sorprendente, dado que está descrito que el aumento de ATF4 conllevaría el correspondiente aumento de su actividad transcripcional, y por ende, de la expresión de genes proapoptóticos como CHOP y BIP. En este caso, observamos que en las células transfectadas con p58 Cdk11 existe una inducción de ATF4 pero no de BIP, lo cual supone un dato interesante que debería analizarse en futuros estudios.

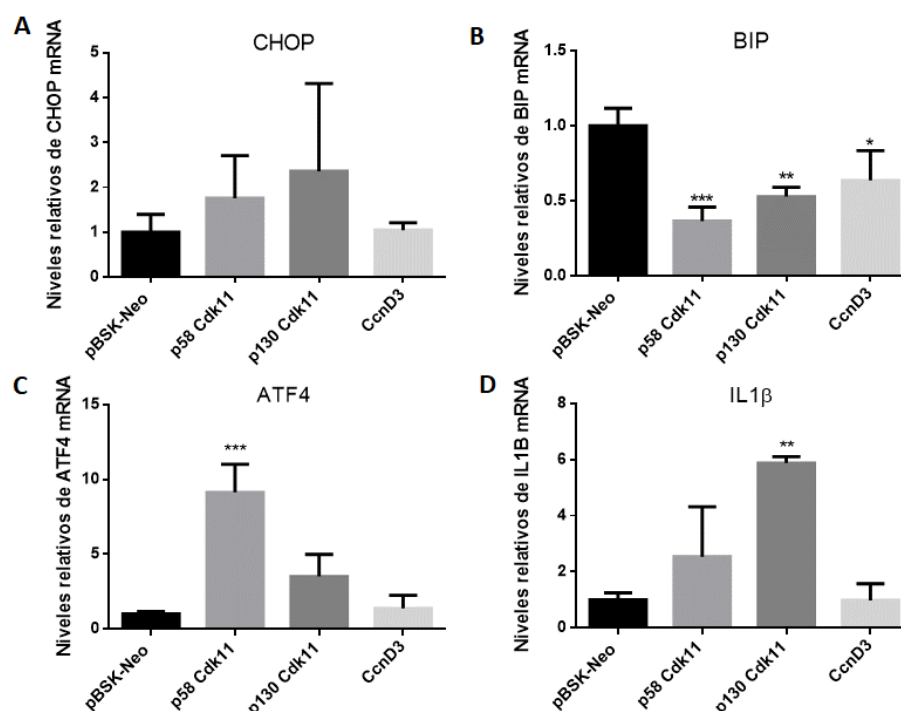


Figura 71: Abundancia de genes relacionados con la vía UPR e inflamación en células NIT-1. Se realizó la extracción de RNA de las células NIT-1 incubadas en DMEM 11mM Glucosa y transfectadas con pBSK-Neo (vector vacío) como control, p58 Cdk11, p130 Cdk11 y CcnD3. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción y análisis de los niveles de mRNA mediante real-time PCR de los genes A) *CHOP*, B) *BIP*, C) *ATF4* y D) *IL1 β* . Se analizaron tres réplicas de cada condición, con $0.5-1 \cdot 10^6$ células por pocillo. El análisis estadístico llevado a cabo fue ANOVA unidireccional. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

6. RESUMEN DE RESULTADOS

- La proteína ciclinaD3 interacciona con la proteína Pdia6, implicada en la respuesta UPR y el estrés de retículo.
- La proteína ciclinaD3 interacciona con la proteína Stx8, implicada en el transporte vesicular intracelular y relacionada con la regulación de GLUT4.
- La proteína Cdk11 provoca apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias.
- La represión de Cdk11 debida a la inflamación previa al debut de la diabetes es un mecanismo de protección contra la apoptosis inducida por inflamación.
- La hemideficiencia de Cdk11 protege a las células beta de la apoptosis y está asociada con la disminución de la expresión de ATF4 y CHOP inducida por UPR.
- La sobreexpresión de Cdk11 aumenta la inflamación y la apoptosis en las células NIT-1 induciendo la expresión de IL1 β y ATF4.
- El efecto proapoptótico de la deficiencia de ciclinaD3 en la célula beta es dominante independientemente de los niveles de Cdk11.
- Cdk11 y CiclinaD3 son dos posibles dianas de intervención terapéutica en la diabetes autoinmune.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Relevancia de la ciclinaD3 en la supervivencia y funcionalidad de la célula β a través de su interacción con Pdia6 y Stx8

La diabetes autoinmune es una enfermedad en la cual los linfocitos autorreactivos provocan la destrucción de las células β productoras de insulina en los islotes pancreáticos. En la T1D, el nicho biológico que rodea las células β así como la actividad del infiltrado linfocítico que invade los islotes provoca grandes alteraciones a nivel molecular en estas células. Dichas alteraciones incluyen inducción de mecanismos proapoptóticos (Watanabe et al., 2012), cambios en el ciclo celular y metabolismo (Andersen et al., 2000) así como procesos necróticos que todavía acentúan más el microambiente proinflamatorio del islote (Hoorens et al., 2001). Todo estos cambios son cruciales en el proceso patogénico, precipitándolo y provocando la muerte de las células β .

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Saavedra-Avila et al., 2014) demostraron que en los islotes del modelo predispuesto genéticamente a la diabetes autoinmune del ratón NOD, los niveles de mRNA de *ciclinaD3* estaban disminuidos de forma dosis-dependiente en las células β debido a la infiltración linfocítica producida por la progresión del ataque autoinmune, siendo la ciclinaD3 la única cuya expresión era reprimida por la inflamación en el modelo NOD. Nuestro laboratorio ha establecido que existe una relación causal directa entre los niveles de expresión de ciclinaD3 y la viabilidad de la célula β .

Se observó que los ratones NOD deficientes de ciclinaD3 desarrollan diabetes autoinmune exacerbada y, además, responden de forma alterada a estímulos con glucosa; sin embargo, los ratones NOD que sobreexpresan ciclinaD3 en la célula β , tienen un fenotipo protegido frente a la T1D, así como mejor respuesta a los estímulos con glucosa. Además, la sobreexpresión de la ciclinaD3 en las células β en los ratones NOD deficientes en ciclinaD3 protegía de la diabetes exacerbada provocada por la deficiencia de ciclinaD3. En células NIT-1, derivadas de insulinoma de ratón NOD, la sobreexpresión de la ciclinaD3 protegía de la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias. Todo esto, convertía a la ciclinaD3 en una molécula clave con una función crucial en la protección de las células β contra la apoptosis inducida por inflamación, de una manera independiente de ciclo celular.

La ciclinaD3 pertenece a la subfamilia de las ciclinas de tipo D y es la subunidad reguladora de Cdk4 o Cdk6, a la cual se une formando un complejo holoenzimático. Está involucrada en la progresión del ciclo celular, concretamente en la transición G1/S. Además de su implicación en el desarrollo del ciclo celular de forma CDK-dependiente, presenta también otras funciones en el control metabólico y en la activación de la transcripción independiente de CDKs (Morgan, 1995). Por tanto, la ciclinaD3 podría estar desempeñando una función hasta ahora desconocida en las células β pancreáticas que explicaría la disminución de los niveles de ciclinaD3 en la diabetes tipo 1 (Aguilar and Fajas, 2010; Lim and Kaldis, 2013).

Por ello, se utilizó tecnología de doble híbrido (Y2H) para identificar proteínas que interactuaran físicamente con la ciclinaD3, y la coimmunoprecipitación, y la tecnología NanoBiT para confirmar dicha interacción en modelos de célula beta pancreática (células NIT-1). Esto permitiría encontrar vías de señalización hasta ahora desconocidas que estuvieran reguladas por la ciclinaD3 de una forma independiente del ciclo celular y, que fueran responsables de la viabilidad de la célula β y, por tanto, pudieran ser útiles como potenciales dianas para la intervención terapéutica en la diabetes autoinmune.

En este trabajo se ha demostrado que la ciclinaD3 interacciona físicamente con las proteínas PDIA6 y Stx8, implicadas en los procesos fisiológicos como respuesta UPR y tráfico vesicular, respectivamente. La célula β pancreática es muy sensible al estrés producido en el retículo, ya que continuamente hay una demanda de síntesis de insulina en función de la glucemia para mantener la homeostasis de glucosa (Scheuner and Kaufman, 2008). Además, en la diabetes autoinmune, las citoquinas proinflamatorias exacerbaban este estrés, el cual, si no se resuelve mediante la respuesta UPR, termina en disfunción celular y apoptosis. La respuesta a proteínas mal plegadas y las citoquinas proinflamatorias inducen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la célula beta, lo cual causa estrés oxidativo y esto puede desembocar en una alteración grave del equilibrio redox, dañando la función mitocondrial. Por otro lado, la regulación de la secreción de la insulina a través del tráfico vesicular explicaría la relevancia de la ciclinaD3 en la fisiología del islote.

1.1. Estrés de ER, UPR y Pdia6

El estrés de retículo endoplasmático inducido por citoquinas es una de las principales causas de muerte de las células beta en la diabetes autoinmune. De hecho, el bloqueo de la vía de señalización UPR en las células beta ha sido uno de los mecanismos utilizados para revertir la T1D en los ratones diabéticos NOD (Morita et al., 2017). Durante el ataque autoinmune, las células beta están expuestas a citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α , IFN γ), especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico, entre otros factores, los cuales inducen muerte celular mediante las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. La combinación de IFN γ e IL-1 β provoca la reducción del Ca²⁺ del ER, el aumento de CHOP y la disminución de las chaperonas del ER (Chan et al., 2011).

La autorreactividad de los linfocitos T que responden contra las células beta durante la T1D no sólo resulta en una destrucción directa de estas células sino que además fomenta que desemboquen en apoptosis de forma autónoma durante la progresión de la enfermedad, debido, entre otras cosas, a la sensibilidad que tienen las células beta a las múltiples formas de estrés de ER causado por proteínas mal plegadas, como la insulina, cuya síntesis está en continua demanda ya que representa aproximadamente el 70% de su producción proteica en las células beta (Atkinson et al., 2011).

El ER es el responsable de que se realice de forma correcta la síntesis, plegamiento y ciertas modificaciones post-traduccionales, que son necesarias para el procesamiento y función proteica posterior, además de funcionar como almacén de Ca²⁺. Cuando hay una alteración de la función del ER por un aumento en la demanda de síntesis proteica o por la acumulación de proteínas mal plegadas, se produce estrés de ER, que puede ser resuelto en un periodo relativamente corto mediante la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR, preservando la viabilidad celular. Sin embargo, cuando el estrés se convierte en crónico y la carga proteica sobrepasa la capacidad de plegamiento del ER, se produce una disfunción celular que desemboca en apoptosis (Pincus et al., 2010).

La UPR consiste en vías de señalización coordinadas que se desencadenan cuando se produce estrés en el ER con el objetivo de restaurar la homeostasis de proteínas. Concretamente, se lleva a cabo mediante la activación de tres principales proteínas de señalización: PERK, ATF6 e IRE1 α (Walter and Ron, 2011). En condiciones normales, estas

proteínas están unidas a BiP, que es una chaperona del ER, lo cual evita que se activen. Sin embargo, cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del ER, BiP se separa de ellas para ayudar al plegamiento de las proteínas.

PERK se activa por autofosforilación cuando existen condiciones de estrés de ER y fosforila el factor de iniciación eucariótico eIF2alpha, favoreciendo la expresión de ATF4 lo cual tiene una acción citoprotectora, induciendo la expresión de genes antioxidantes contra el estrés oxidativo generado en la UPR; y una acción proapoptótica, induciendo la expresión de genes como CHOP (Malhotra and Kaufman, 2007). ATF6 se activa en el Golgi por escisión y regula la síntesis de nuevas chaperonas, como PDIA6 (Vekich et al., 2012).

IRE1 α es una kinasa/endorribonucleasa transmembrana del ER que determina el destino celular en función de la severidad del estrés del ER. Cuando existen condiciones de estrés, los monómeros de IRE1 α de la membrana del ER se autofosforilan y se activan, iniciando el *splicing* del mRNA que codifica el factor de transcripción XBP1 para desencadenar los programas transcripcionales adaptativos de la UPR. La forma activa de XBP1 promueve la expresión de chaperonas y moléculas de ERAD (vía de degradación de las proteínas asociada al ER, por sus siglas en inglés) (Yoshida et al., 2001). Si este estrés no se resuelve, IRE1 α se organiza en complejos oligoméricos, aumentando su estado de activación como RNasa y provocando la degradación de mRNAs involucrados en la homeostasis y la supervivencia de las células beta (RIDD), dando lugar a la apoptosis (Han et al., 2009).

El estrés de retículo endoplasmático induce la expresión de TXNIP (por sus siglas en inglés, proteína que interactúa con la tiorredoxina), la cual actúa como mecanismo regulador negativo de la UPR para disminuir los niveles de XBP1s mediante la activación de PDI (Salvadó et al., 2015). Se ha descrito que los cambios en la actividad de PDI están asociados con el mal plegamiento de las proteínas y el estrés de ER y, además, la proteína TXNIP es una de las proteínas que más se inducen en los pacientes diabéticos (Lee et al., 2014).

Estudios recientes han demostrado que la modulación de la UPR en las células beta pancreáticas de ratones NOD mediante la delección del sensor IRE1 α resulta en una infiltración linfocítica de los islotes sustancialmente reducida. Estos ratones NOD deficientes de IRE1 α muestran una protección a la destrucción autoinmune y a la diabetes tipo 1 (Lee et al., 2020).

La Figura 72 muestra de forma detallada cada una de las vías implicadas en la respuesta UPR nombradas anteriormente. Las tres se desencadenan de forma diferencial en función de la severidad y el tipo de estrés de ER.

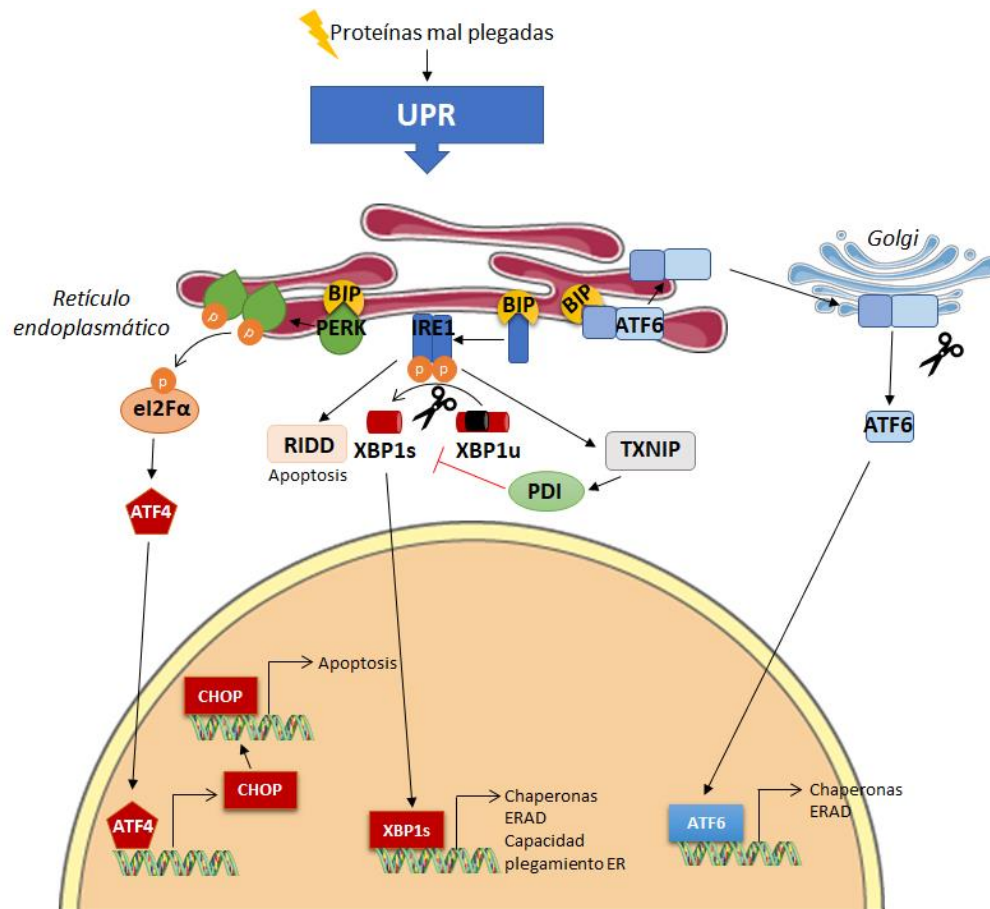


Figura 72. Mecanismos implicados en la vía UPR. En condiciones normales, las proteínas transmembrana IRE1 α , ATF6 y PERK están unidas a BiP (GRP78) y, por tanto, inactivas. Cuando se producen condiciones de estrés, BiP se libera y se activan las tres proteínas transmembrana. Hay otros sensores de UPR y otros mecanismos además de BiP, como por ejemplo, la proteína TXNIP, que regula el estrés de ER mediante la activación de la proteína disulfuro isomerasa o PDI. (Figura adaptada de Salvadó et al., 2015).

Mediante Y2H y coinmunoprecipitación, en este trabajo se ha demostrado que la ciclinaD3 interacciona físicamente con la Proteína Disulfuro Isomerasa 6 (PDIA6), también conocida como P5 o TXNDC7. Además, mediante inmunofluorescencia se ha comprobado que ambas proteínas colocalizan. PDIA6 es una de las más de 20 proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) del ER eucariótico (Hatahet and Ruddock, 2009), cuya función como chaperona resulta clave en el procesamiento de la proinsulina mal plegada en el ER de las células beta (Gorasia et al., 2016). Otro papel importante de PDIA6 en el funcionamiento de las células beta se observa cuando está silenciado en células beta de ratón, ya que éstas muestran una

reducción en la producción de insulina (Eletto et al., 2016). PDIA6 se une a la cisteína 148 del dominio luminal de IRE1 α , limitando su actividad, y manteniendo la señalización UPR en un rango fisiológicamente tolerable (Figura 73). Además, mediante fosforilación se produce un cambio en su actividad, para mantener la proteostasis y atenuar el estrés de ER (Jiaojiao Yu et al., 2020). Se observó que las células con deficiencia de PDIA6 hiperrespondían al estrés de ER, resultando en una sobrerregulación exagerada de los genes diana de la UPR y un incremento de la apoptosis (Eletto et al., 2014).

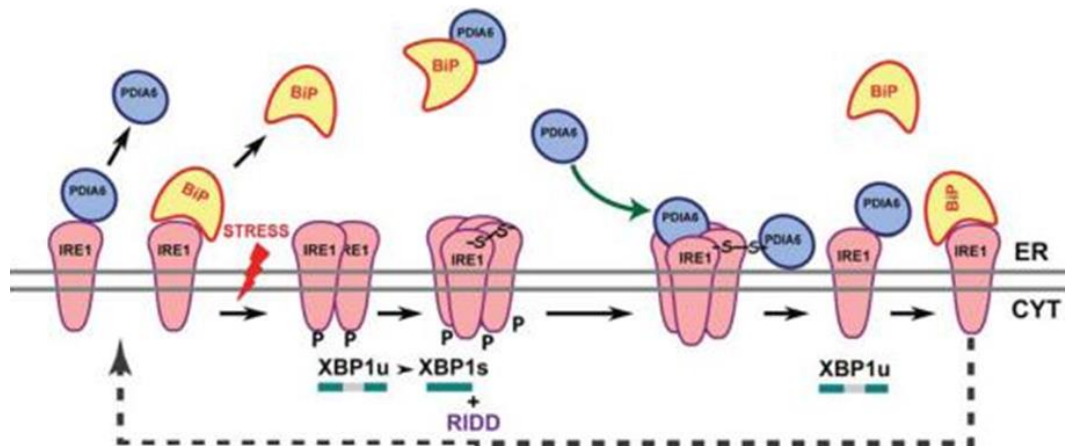


Figura 73: Modelo propuesto de atenuación de IRE1 α mediante PDIA6. El dominio luminal de IRE1 α inactivo está unido a BiP. Una fracción de IRE1 α , sin embargo, está unida independientemente y reversiblemente a PDIA6. Cuando hay un estrés de ER, y BiP se disocia, IRE1 α dimeriza y oligomeriza, convirtiéndose en una quinaasa y una ribonucleasa, provocando la escisión de XBP1. Eletto y colaboradores propusieron que durante esta secuencia de activación, IRE1 α se unía mediante puentes disulfuro en su cisteína 148 luminal. Esto provocaba que IRE1 α activado fuese una diana para PDIA6, la cual provocaba la reducción de los puentes disulfuro, convirtiendo IRE1 α oligomérico de nuevo en su forma monomérica, y así quedaba disponible para otro ciclo de activación. (Figura extraída de Eletto et al., 2014).

La expresión de PDIA6 en islotes pancreáticos de ratón NOD prediabético era menor comparada con los islotes de ratón C57BL/6, indicando la importancia de PDIA6 en la diabetes autoinmune. Una menor expresión de esta proteína, como ocurre en el ratón NOD, produce niveles mayores de proteínas mal plegadas, activación de la UPR y, por tanto, inducción de estrés de ER. La muerte de las células beta se asocia con un incremento de los niveles de estrés oxidativo, de ER, y mitocondrial, así como genes de respuesta a estrés como Chop (Chan et al., 2015; Gorasia et al., 2015; Tersey et al., 2012). Por tanto, defectos intrínsecos en el plegamiento correcto de proteínas, asociados a niveles bajos de PDIA6 en islotes NOD, constituyen uno de los primeros factores que desencadenan el estrés en las células beta, que las hace susceptibles de la disfunción celular y la muerte (Crèvecoeur et al., 2017). La respuesta UPR de las células beta podría participar en la patogénesis de la

diabetes autoinmune, tal y como se ha observado en la detección de desregulación en los marcadores de estrés de ER en los islotes inflamados de ratones (Tersey et al., 2012) y pacientes (Marhfour et al., 2012) con diabetes autoinmune.

Nuestra hipótesis, por tanto, sería que la ciclinaD3, mediante su unión con PDIA6, estaría ejerciendo una acción antiapoptótica en las células beta pancreáticas mediante la regulación de la vía UPR y la inhibición de la apoptosis inducida por estrés de ER, aunque se necesitan más estudios para identificar la función de IRE1 α y del resto de sensores UPR en las diferentes fases de la diabetes autoinmune y así, analizar más en profundidad el papel del estrés de ER de la célula beta y la respuesta UPR en la T1D.

Por otro lado, el papel de PDIA6 en la limitación de la actividad de IRE1 α , para mantener la señalización UPR en un rango fisiológicamente tolerable, sugiere que esta habilidad para modular el estrés de ER podría suponer un tratamiento adyuvante de gran utilidad para las aproximaciones que busquen disminuir la muerte de las células beta producidas por el sistema inmune en los inicios de la T1D.

1.2. Stx8, su función y su posible relación con la T1D

Otra de las proteínas que se ha demostrado en este trabajo mediante Y2H que interacciona con la proteína ciclinaD3 es la syntaxina 8 (Stx8). Las syntaxinas son una familia de proteínas implicadas en el transporte vesicular intracelular (Teng et al., 2001). Concretamente, Stx8 es una proteína necesaria para el transporte desde los endosomas tempranos hasta los endosomas tardíos (Prekeris et al., 1999). Contiene en su mitad C-terminal un dominio helicoidal enrollado (del inglés, *coiled coil*) característico de la superfamilia de proteínas tSNARE (receptores de proteínas de fijación soluble de NSF) (Thoreau et al., 1999), implicadas principalmente en facilitar la fusión de las vesículas con los compartimentos celulares adecuados.

Aunque no se conoce mucho sobre la función fisiológica de Stx8, otras syntaxinas como Stx4 se han relacionado con la regulación de la traslocación de GLUT4 a la membrana y la sensibilidad a la insulina (Maier et al., 2000). Por ejemplo, se observó que la sobreexpresión de Stx4 incrementaba la captación de glucosa mediada por insulina, en el músculo esquelético (Spurlin et al., 2004). El hecho de que Stx8 esté asociada con el endosoma temprano, podría también involucrarlo en la internalización de GLUT4 desde la membrana

plasmática (Bryant and Gould, 2011). Se observó que los pacientes con altos niveles de expresión de Stx8 muestran peores concentraciones de glucosa en plasma, lo cual sugiere que aparentemente, aunque la correlación no implica necesariamente causalidad, la Stx8 estaría involucrada en el desarrollo de la resistencia a insulina (Lancha et al., 2015). Además, observaron que la expresión de Stx8 correlacionaba negativamente con la expresión de GLUT4 en tejido adiposo, lo cual sugería que Stx8 podría estar regulando los niveles de GLUT4. De hecho, otros miembros de la familia de las syntaxinas, como Stx6 y Stx16 regulan el transporte de GLUT4 en adipocitos (Perera et al., 2003; Proctor et al., 2006). Dada la similitud entre los miembros de la familia de las STXs (Bennett et al., 1993) sería plausible que Stx8 estuviera llevando a cabo un papel importante en la regulación del tráfico de GLUT4.

Por otro lado, la obesidad se ha asociado con un incremento de la inflamación del tejido adiposo y sistémico (Catalán et al., 2011). Se observaron niveles de expresión de Stx8 en tejido adiposo visceral que correlacionaba de forma positiva con las concentraciones de proteína C reactiva en plasma. En este sentido, Stx8 podría estar también relacionada con la inflamación crónica asociada a obesidad (Lancha et al., 2015). De hecho, otras syntaxinas como Stx6 se ha relacionado con la promoción de TNF- α en macrófagos activados, lo cual da lugar a la respuesta inflamatoria (Murray et al., 2005).

Estudios recientes han demostrado la importancia de Stx8 en la citotoxicidad de los linfocitos T citotóxicos. Stx8, se localiza principalmente en endosomas tardíos y compartimentos lisosomales, con poca expresión en los compartimentos endosomales tempranos. Observaron que cuando disminuía la expresión de Stx8 mediante siRNA, disminuía también la citotoxicidad y había también menos liberación de perforinas. Todo ello demostraba que Stx8 es necesario para un transporte y clasificación adecuado de las moléculas citotóxicas a los gránulos líticos funcionales a través de la vía endosomal en los linfocitos T citotóxicos humanos (Bhat et al., 2016).

Nuestra hipótesis, por tanto, sería que la interacción de ciclinaD3 con la proteína Stx8 podría estar afectando al tráfico de vesículas que transportan insulina.

2. El papel de la Cdk11 en la T1D: importancia de la inflamación, el ER y la vía UPR

Estudios previos en nuestro grupo mostraron que los niveles de mRNA de la *Cdk11*, que codifica para una kinasa dependiente de ciclina involucrada en procesamiento del RNA, mitosis y apoptosis, estaban disminuidos en condiciones de inflamación del páncreas endocrino en un modelo de ratón NOD de 11 semanas, comparándolo con los niveles observados en muestras de ratones NOD/SCID de la misma edad. Esta disminución seguía un patrón dosis-dependiente de los niveles de infiltración linfocítica de los islotes. Debido a que la delección total de la *Cdk11* era embriológicamente letal, se llevó a cabo la hemidelección de la *Cdk11* en los ratones NOD (HTZ). Nuestro grupo observó que esta hemidelección provocaba la disminución de la incidencia de diabetes y protegía a las células beta de la apoptosis inducida por inflamación, sin que su capacidad proliferativa se viera afectada. Esto implicaba que la *Cdk11* ejercía una acción proapoptótica independiente de ciclo celular en las células beta. La menor incidencia de T1D causada por la hemideficiencia de *Cdk11* en los ratones NOD, no era debida a una menor activación de los efectivos inmunológicos autorreactivos (Sala Solé, 2016).

Por todo ello, para determinar el papel de *Cdk11* en la patogénesis de la diabetes autoinmune y confirmar la hipótesis de que la hemideficiencia de *Cdk11* estuviera protegiendo de la apoptosis inducida por citoquinas, utilizamos hembras del modelo de ratón NOD/SCID hemideficientes en *Cdk11* (NS-HTZ) comparándolas con su respectivo control (NS-WT). El fondo NS fue elegido para evitar la presencia del infiltrado insulítico que existe en el fondo NOD. Se ha descrito previamente que las células beta pancreáticas responden a las citoquinas proinflamatorias de forma dinámica, llevando a cabo cambios profundos en el contexto regulatorio de vías implicadas en la patogénesis de la T1D (Ramos-Rodríguez et al., 2019). Para comprobar la susceptibilidad de las células beta a estímulos proapoptóticos en ambos genotipos, se llevaron a cabo experimentos in vitro en los cuales exponíamos a los islotes pancreáticos a un *cocktail* de citoquinas proinflamatorias (TNF α +IL-1 β +IFN γ). De esta manera, se analizó la fragmentación del DNA (o %subG1) como medida de los eventos apoptóticos tardíos.

Los niveles de apoptosis medidos como fragmentación nuclear o subG1 no mostraban diferencias significativas entre ambos genotipos en los niveles basales, pero sí en el incremento de subG1 (Δ subG1) tras el tratamiento con citoquinas proinflamatorias en un

tiempo de incubación de 5 días (estrés crónico). El ratón NS-HTZ tenía valores significativamente menores de apoptosis, en comparación con el ratón NS-WT. Además, cuando los islotes habían sido tratados con citoquinas proinflamatorias durante un tiempo de 24 horas (estrés agudo), se observó que los ratones NS-HTZ tenían unos niveles de incremento de subG1 significativamente reducidos, es decir, que estaban protegidos contra la apoptosis inducida por citoquinas en comparación con los WT.

Debido a que la inflamación y el estrés de ER son responsables de la mayoría de los fallos en las células beta en T1D, hipotetizamos que el mecanismo protector de la Cdk11 podría ser la inhibición de la muerte de las células beta inducida por estrés de ER. Para comprobar que la hemideficiencia de Cdk11 inhibía la apoptosis inducida por UPR, cultivamos islotes pancreáticos de las cepas NS-WT y NS-HTZ en presencia y ausencia de taspigargina, un agente inductor de estrés de ER, y se cuantificaron los niveles de tres marcadores clave de ER de la vía de señalización UPR como son Bip, Atf4 y Chop.

Los resultados mostraron una reducción significativa en la expresión de Atf4 y Chop en los islotes NS-HTZ comparada con los islotes NS-WT, tras una inducción de estrés de ER con taspigargina. En los islotes NS-HTZ, la inducción de ambos factores de transcripción por estrés de ER se ve gravemente afectada, lo que explica por qué la regulación negativa de Cdk11 contribuiría a inhibir y retrasar la cinética de la muerte de células beta debido al estrés de ER en T1D. En el caso de la expresión de Bip inducida por estrés de ER, aunque no existen diferencias significativas entre ambos grupos, se observa una marcada tendencia en la cual el genotipo NS-HTZ muestra unos niveles más bajos de expresión, comparado con los islotes NS-WT.

Este resultado confirmaría la hipótesis sobre el papel de Cdk11 en promover la muerte de las células beta, ya que la hemideficiencia de Cdk11 protegería las células beta de la apoptosis al inhibir la expresión de CHOP inducida por UPR. Por tanto, Cdk11 podría ser una diana natural en la T1D que está reprimida en las células beta como mecanismo de protección contra la apoptosis inducida por inflamación.

3. Papel antagónico de la ciclinaD3 y la Cdk11

Uno de los objetivos de este estudio era determinar el papel de la Cdk11 en la patogénesis de la T1D así como evaluar la relación entre Cdk11 y ciclinaD3 en la viabilidad de la célula beta, ya que la ciclinaD3 es un ligando natural de Cdk11, promoviendo la viabilidad de la célula beta y además, también está dirigida por la inflamación de las células beta.

Los niveles de mRNA de *Cdk11*, de forma similar a lo que ocurre con la ciclinaD3, están disminuidos en las células beta como consecuencia del ataque autoinmune en la T1D. Sin embargo, mientras que la disminución de la expresión de ciclinaD3 compromete la viabilidad de las células beta, la disminución de la expresión de la Cdk11 protege contra la muerte de las células beta. La deficiencia de ciclinaD3 exacerba la T1D en ratones NOD, mientras que su sobreexpresión protege las células beta de la diabetes. Sin embargo, en ninguna de estas condiciones -deficiencia o sobreexpresión- se observa ningún efecto en la replicación de las células beta (Saavedra-Avila et al., 2014), lo cual sugiere que el papel de la ciclina D3 en las células beta es independiente de Cdk11. Por todo ello, se quiso estudiar la relación existente entre la Cdk11 y la ciclinaD3 y su papel en la viabilidad de las células beta, así como las vías de señalización que llevan a cabo ambas moléculas en estas células. Estudios previos en nuestro laboratorio analizaron ratones NOD deficientes en ciclinaD3 que eran también hemideficientes en Cdk11 (K11HTZ-D3KO) o no (K11WT-D3KO). Observaron que la deficiencia de la ciclinaD3 tenía un efecto dominante en el inicio de la enfermedad y exacerbaba la diabetes en comparación con el ratón NOD WT. Es decir, la hemideficiencia de Cdk11 no mejoraba los efectos de la deficiencia de ciclinaD3. Lo cual podría sugerir que la vía de señalización responsable de la supervivencia de las células beta en la cual está involucrada la ciclinaD3 es independiente de la vía de señalización de Cdk11.

Todo ello, nos hace pensar en el tándem Cdk11/ciclinaD3 como una potencial nueva diana de intervención en la diabetes autoinmune. De esta forma, inhibidores farmacológicos de Cdk11 podrían proteger la muerte de las células beta inducida por inflamación. Además, activadores de vías de señalización de ciclinaD3 independientes del ciclo celular podrían establecer sinergias con los inhibidores de Cdk11 promoviendo la viabilidad de las células beta. Aun así, es necesaria una mayor investigación en la identificación de la relación entre la vía de señalización proapoptótica mediada por Cdk11 y ciclinaD3 en las células beta, para poder diseñar mejores aproximaciones terapéuticas dirigidas a la diabetes autoinmune.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La ciclinaD3 interactúa físicamente con proteínas implicadas en vías de estrés celular, evidenciando una posible función reguladora de la ciclinaD3 en dichas vías.
2. La ciclinaD3 y la Cdk11 tienen un papel antagónico e independiente de ciclo celular, en la supervivencia de las células beta.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2004. Cellular and Molecular Immunology.
- Adams, S.F., 1926. The seasonal variation in the onset of acute diabetes. *Arch. Intern. Med.* **37**, 861.
- Aeed, P.A., Young, C.L., Nagiec, M.M., Elhammer, Å.P., 2009. Inhibition of inositol phosphorylceramide synthase by the cyclic peptide aureobasidin A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 496–504.
- Aguilar, V., Fajas, L., 2010. Cycling through metabolism. *EMBO Mol. Med.* **2**, 338–348.
- Åkerblom, H.K., Knip, M., 1998. Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes. Metab. Rev.* **14**, 31–67.
- Alba, A., Planas, R., Verdaguer, J., Vives-Pi, M., 2005. Viral infections and autoimmune diabetes. *Inmunologia* **24**, 33–43.
- American Diabetes Association, 2017. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* **40**, S11–S24.
- American Diabetes Association, 2008. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **31**, S55–S60.
- Andersen, N.A., Larsen, C.M., Mandrup-Poulsen, T., 2000. TNF α and IFN γ potentiate IL-1 β induced mitogen activated protein kinase activity in rat pancreatic islets of Langerhans. *Diabetologia* **43**, 1389–1396.
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., Ashcroft, S.J.H., 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature* **312**, 446–448.
- Atkinson, M.A., Bluestone, J.A., Eisenbarth, G.S., Hebrok, M., Herold, K.C., Accili, D., Pietropaolo, M., Arvan, P.R., Von Herrath, M., Markel, D.S., Rhodes, C.J., 2011. How Does Type 1 Diabetes Develop?: The Notion of Homicide or -Cell Suicide Revisited. *Diabetes* **60**, 1370–1379.
- Atkinson, M.A., Bowman, M.A., Campbell, L., Darrow, B.L., Kaufman, D.L., Maclaren, N.K., 1994. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **94**, 2125–2129.
- Bach, J.-F., 2018. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 105–120.
- Bach, J.-F., 2002. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N. Engl. J. Med.* **347**, 911–920.
- Bakh, N.A., Cortinas, A.B., Weiss, M.A., Langer, R.S., Anderson, D.G., Gu, Z., Dutta, S., Strano, M.S., 2017. Glucose-responsive insulin by molecular and physical design. *Nat. Chem.* **9**, 937–943.
- Banatvala, J.E., Schernthaner, G., Schober, E., De Silva, L.M., Bryant, J., Borkenstein, M., Brown, D., Menser, M.A., Silink, M., 1985. Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia. *Lancet* **325**, 1409–1412.
- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., Fletcher, A.A., 1991. Pancreatic extracts in the

- treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *CMAJ* **145**, 1281–6.
- Barnett, A.H., Eff, C., Leslie, R.D.G., Pyke, D.A., 1981. Diabetes in identical twins - A study of 200 pairs. *Diabetologia* **20**, 87–93.
- Barrett, J.C., Clayton, D., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J.D., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., Plagnol, V., Pociot, F., Schuilenburg, H., Smyth, D.J., Stevens, H., Todd, J.A., Walker, N.M., Rich, S.S., Genet, N., 2009. Genome-wide association study and meta-analysis finds over 40 loci affect risk of type 1 diabetes HHS Public Access Author manuscript. *Nat Genet* **41**, 703–707.
- Beikmohammadi, L., Bandehpour, M., Hashemi, S.M., Kazemi, B., 2019. Generation of insulin-producing hepatocyte-like cells from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells as an alternative source of islet cells. *J. Cell. Physiol.* **234**, 17326–17336.
- Belizario, J.E., 2009. Immunodeficient Mouse Models: An Overview. *Open Immunol. J.* **2**, 79–85.
- Bennett, M.K., Garcia-Ararrás, J., Elferink, L.A., Peterson, K., Fleming, A.M., Hazuka, C.D., Scheller, R.H., 1993. The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* **74**, 863–873.
- Benson, V.S., VanLeeuwen, J.A., Taylor, J., Somers, G.S., McKinney, P.A., Van Til, L., 2010. Type 1 Diabetes Mellitus and Components in Drinking Water and Diet: A Population-Based, Case-Control Study in Prince Edward Island, Canada. *J. Am. Coll. Nutr.* **29**, 612–624.
- Beyerlein, A., Donnachie, E., Ziegler, A.G., 2017. Infections in Early Life and Development of Celiac Disease. *Am. J. Epidemiol.* **186**, 1277–1280.
- Bhat, S.S., Friedmann, K.S., Knörck, A., Hoxha, C., Leidinger, P., Backes, C., Meese, E., Keller, A., Rettig, J., Hoth, M., Qu, B., Schwarz, E.C., 2016. Syntaxin 8 is required for efficient lytic granule trafficking in cytotoxic T lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 1653–
- Bluestone, J.A., Herold, K., Eisenbarth, G., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**, 1293–1300.
- Borchers, A.T., Uibo, R., Gershwin, M.E., 2010. The geoepidemiology of type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* **9**, A355–A365.
- Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J., 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527–530.
- Braley-Mullen, H., Sharp, G.C., Medling, B., Tang, H., 1999. Spontaneous Autoimmune Thyroiditis in NOD.H-2h4 Mice. *J. Autoimmun.* **12**, 157–165.
- Brown, C.T., Davis-Richardson, A.G., Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A., Triplett, E.W., 2011. Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *PLoS One* **6**, e25792.
- Bryant, N.J., Gould, G.W., 2011. SNARE Proteins Underpin Insulin-Regulated GLUT4 Traffic. *Traffic* **12**, 657–664.
- Burgess, M.A., Forrest, J.M., 2009. Congenital rubella and diabetes mellitus. *Diabetologia* **52**, 369–370.

- Cabrera, S.M., Henschel, A.M., Hessner, M.J., 2016. Innate inflammation in type 1 diabetes. *Transl. Res.* **167**, 214–227.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.-M., Cohen, G.M., 2000. Apaf-1 Oligomerizes into Biologically Active ~700-kDa and Inactive ~1.4-MDa Apoptosome Complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 6067–6070.
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., Corneli, R.B., Ferretti, E., Gulino, A., Grasso, F., De Simone, C., Di Mario, U., Falorni, A., Boirivant, M., Dotta, F., 2005. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* **48**, 1565–1575.
- Campbell, I.L., Kay, T.W., Oxbrow, L., Harrison, L.C., 1991. Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. *J. Clin. Invest.* **87**, 739–742.
- Cardozo, A.K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y.-M., Rasschaert, J., Tonnesen, M., Van Eylen, F., Mandrup-Poulsen, T., Herchuelz, A., Eizirik, D.L., 2005. Cytokines Downregulate the Sarcoendoplasmic Reticulum Pump Ca²⁺ ATPase 2b and Deplete Endoplasmic Reticulum Ca²⁺, Leading to Induction of Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β -Cells. *Diabetes* **54**, 452–461.
- Carrasco-Marin, E., Kanagawa, O., Unanue, E.R., 1997. Insights into the chemistry and biology of the I-Ag7 class II molecule. *Res. Immunol.* **148**, 291–301.
- Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Ramírez, B., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., Gil, M.J., Salvador, J., Frühbeck, G., 2011. Increased Circulating and Visceral Adipose Tissue Expression Levels of YKL-40 in Obesity-Associated Type 2 Diabetes Are Related to Inflammation: Impact of Conventional Weight Loss and Gastric Bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 200–209.
- Chan, J.Y., Cooney, G.J., Biden, T.J., Laybutt, D.R., 2011. Differential regulation of adaptive and apoptotic unfolded protein response signalling by cytokine-induced nitric oxide production in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* **54**, 1766–1776.
- Chan, J.Y., Luzuriaga, J., Maxwell, E.L., West, P.K., Bensellam, M., Laybutt, D.R., 2015. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates β -cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK. *Mol. Cell. Endocrinol.* **413**, 189–201.
- Chen, J., Stimpson, S.E., Fernandez-Bueno, G.A., Mathews, C.E., 2018. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Type 1 Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* **29**, 1361–1372.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S., 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 9578–9582.
- Chou, D.H.-C., Holson, E.B., Wagner, F.F., Tang, A.J., Maglathlin, R.L., Lewis, T.A., Schreiber, S.L., Wagner, B.K., 2012. Inhibition of Histone Deacetylase 3 Protects Beta Cells from Cytokine-Induced Apoptosis. *Chem. Biol.* **19**, 669–673.
- Christianson, S.W., Shultz, L.D., Leiter, E.H., 1993. Adoptive Transfer of Diabetes Into Immunodeficient NOD-scid/scid Mice: Relative Contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T-Cells From Diabetic Versus Prediabetic NOD.NON-Thy-1a Donors. *Diabetes* **42**, 44–55.
- Clemente-Casares, X., Blanco, J., Ambalavanan, P., Yamanouchi, J., Singha, S., Fandos, C., Tsai, S.,

- Wang, J., Garabatos, N., Izquierdo, C., Agrawal, S., Keough, M.B., Yong, V.W., James, E., Moore, A., Yang, Y., Stratmann, T., Serra, P., Santamaria, P., 2016. Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. *Nature* **530**, 434–440.
- Clontech, n.d. Matchmaker[®] Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual 630499, 1–41.
- Cnop, M., Fougère, F., Velloso, L.A., 2012. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* **18**, 59–68.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jorns, A., Lenzen, S., Eizirik, D.L., 2005. Mechanisms of Pancreatic -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. *Diabetes* **54**, S97–S107.
- Cooke, A., Tonks, P., Jones, F.M., O’Shea, H., Hutchings, P., Fulford, A.J.C., 1999. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* **21**, 169–176.
- Coppieters, K.T., Boettler, T., von Herrath, M., 2012. Virus infections in type 1 diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, 1–14.
- Coqueret, O., 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* **299**, 35–55.
- Crèvecoeur, I., Gudmundsdóttir, V., Vig, S., Marques Câmara Sodré, F., D’Hertog, W., Fierro, A.C., Van Lommel, L., Gysemans, C., Marchal, K., Waelkens, E., Schuit, F., Brunak, S., Overbergh, L., Mathieu, C., 2017. Early differences in islets from prediabetic NOD mice: combined microarray and proteomic analysis. *Diabetologia* **60**, 475–489.
- D’Hertog, W., Maris, M., Ferreira, G.B., Verdrengh, E., Lage, K., Hansen, D.A., Cardozo, A.K., Workman, C.T., Moreau, Y., Eizirik, D.L., Waelkens, E., Overbergh, L., Mathieu, C., 2010. Novel Insights into the Global Proteome Responses of Insulin-Producing INS-1E Cells To Different Degrees of Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Proteome Res.* **9**, 5142–5152.
- Da Silva Xavier, G., 2018. The Cells of the Islets of Langerhans. *J. Clin. Med.* **7**, 54.
- Danescu, L.G., Levy, S., Levy, J., 2009. Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine* **35**, 11–17.
- Delmastro, M.M., Piganelli, J.D., 2011. Oxidative Stress and Redox Modulation Potential in Type 1 Diabetes. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 1–15.
- DeLong, T., Wiles, T.A., Baker, R.L., Bradley, B., Barbour, G., Reisdorph, R., Armstrong, M., Powell, R.L., Reisdorph, N., Kumar, N., Elso, C.M., DeNicola, M., Bottino, R., Powers, A.C., Harlan, D.M., Kent, S.C., Mannering, S.I., Haskins, K., 2016. Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science (80-)*. **351**, 711–714.
- Di Lorenzo, T.P., Peakman, M., Roep, B.O., 2007. Translational Mini-Review Series on Type 1 Diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **148**, 1–16.
- Dogusan, Z., Garcia, M., Flamez, D., Alexopoulou, L., Goldman, M., Gysemans, C., Mathieu, C., Libert, C., Eizirik, D.L., Rasschaert, J., 2008. Double-Stranded RNA Induces Pancreatic -Cell Apoptosis by Activation of the Toll-Like Receptor 3 and Interferon Regulatory Factor 3 Pathways. *Diabetes* **57**, 1236–1245.
- Dolenšek, J., Rupnik, M.S., Stožer, A., 2015. Structural similarities and differences between the

- human and the mouse pancreas. *Islets* **7**, e1024405.
- Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., Cnop, M., 2008. The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocr. Rev.* **29**, 42–61.
- Eizirik, D.L., Colli, M.L., Ortis, F., 2009. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* **5**, 219–226.
- Eizirik, D.L., Darville, M.I., 2001. Beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* **50**, S64–S69.
- Eizirik, D.L., Mandrup-Poulsen, T., 2001. A choice of death - the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* **44**, 2115–2133.
- Eletto, Daniela, Eletto, Davide, Boyle, S., Argon, Y., 2016. PDIA6 regulates insulin secretion by selectively inhibiting the RIDD activity of IRE1. *FASEB J.* **30**, 653–665.
- Eletto, Davide, Eletto, Daniela, Dersh, D., Gidalevitz, T., Argon, Y., 2014. Protein Disulfide Isomerase A6 Controls the Decay of IRE1 α Signaling via Disulfide-Dependent Association. *Mol. Cell* **53**, 562–576.
- Elliott, J.F., Liu, J., Yuan, Z.-N., Bautista-Lopez, N., Wallbank, S.L., Suzuki, K., Rayner, D., Nation, P., Robertson, M.A., Liu, G., Kavanagh, K.M., 2003. Autoimmune cardiomyopathy and heart block develop spontaneously in HLA-DQ8 transgenic IA knockout NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13447–13452.
- Engin, F., Yermalovich, A., Nguyen, T., Hummasti, S., Fu, W., Eizirik, D.L., Mathis, D., Hotamisligil, G.S., 2013. Restoration of the Unfolded Protein Response in Pancreatic Cells Protects Mice Against Type 1 Diabetes. *Sci. Transl. Med.* **5**, 211ra156-211ra156.
- Fields, S., Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907–1916.
- Fonseca, S.G., Gromada, J., Urano, F., 2011. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell death. *Trends Endocrinol. Metab.* **7**, 266-74.
- Frederiksen, B., Kroehl, M., Lamb, M.M., Seifert, J., Barriga, K., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., Norris, J.M., 2013. Infant Exposures and Development of Type 1 Diabetes Mellitus. *JAMA Pediatr.* **167**, 808.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.-M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M.,

- Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkenin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541.
- Giniger, E., Ptashne, M., 1988. Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 382–6.
- Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Novelo, L.L., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A., Triplett, E.W., 2011. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J.* **5**, 82–91.
- Gorasia, D.G., Dudek, N.L., Safavi-Hemami, H., Perez, R.A., Schittenhelm, R.B., Saunders, P.M., Wee, S., Mangum, J.E., Hubbard, M.J., Purcell, A.W., 2016. A prominent role of PDIA6 in processing of misfolded proinsulin. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1864**, 715–723.
- Gorasia, D.G., Dudek, N.L., Veith, P.D., Shankar, R., Safavi-Hemami, H., Williamson, N.A., Reynolds, E.C., Hubbard, M.J., Purcell, A.W., 2015. Pancreatic Beta Cells Are Highly Susceptible to Oxidative and ER Stresses during the Development of Diabetes. *J. Proteome Res.* **14**, 688–699.
- Gouda, W., Mageed, L., Abd El Dayem, S.M., Ashour, E., Afify, M., 2018. Evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in type 1 diabetes mellitus. *Bull. Natl. Res. Cent.* **42**, 14.
- Green, A., Gale, E.A.M., Patterson, C.C., 1992. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE study. *Lancet* **339**, 905–909.
- Green, D.R., 1998. Apoptotic Pathways. *Cell* **94**, 695–698.
- Greiner, T.U., Hyötyläinen, T., Knip, M., Bäckhed, F., Orešič, M., 2014. The Gut Microbiota Modulates Glycaemic Control and Serum Metabolite Profiles in Non-Obese Diabetic Mice. *PLoS One* **9**, e110359.
- Gülden, E., Wong, F.S., Wen, L., 2015. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin. Immunol.* **159**, 143–153.
- Gurzov, E.N., Ortis, F., Cunha, D.A., Gosset, G., Li, M., Cardozo, A.K., Eizirik, D.L., 2009. Signaling by IL-1 β +IFN- γ and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Differ.* **16**, 1539–1550.
- Haller, M.J., Long, S.A., Blanchfield, J.L., Schatz, D.A., Skyler, J.S., Krischer, J.P., Bundy, B.N., Geyer,

- S.M., Warnock, M. V., Miller, J.L., Atkinson, M.A., Becker, D.J., Baidal, D.A., DiMeglio, L.A., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Herold, K.C., Marks, J.B., Moran, A., Rodriguez, H., Russell, W.E., Wilson, D.M., Greenbaum, C.J., 2019. Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA 1c , and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data. *Diabetes* **68**, 1267–1276.
- Haller, M.J., Schatz, D.A., Skyler, J.S., Krischer, J.P., Bundy, B.N., Miller, J.L., Atkinson, M.A., Becker, D.J., Baidal, D., DiMeglio, L.A., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Herold, K.C., Marks, J.B., Moran, A., Rodriguez, H., Russell, W., Wilson, D.M., Greenbaum, C.J., 2018. Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin (ATG) Preserves β -Cell Function and Improves HbA 1c in New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **41**, 1917–1925.
- Hamaguchi, K., Gaskins, H.R., Leiter, E.H., 1991. NIT-1, a Pancreatic β -Cell Line Established From a Transgenic NOD/Lt Mouse. *Diabetes* **40**, 842–849.
- Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., Papa, F.R., 2009. IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell* **138**, 562–575.
- Hänninen, A., Jalkanen, S., Salmi, M., Toikkanen, S., Nikolakaros, G., Simell, O., 1992. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **90**, 1901–1910.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D., 2000. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell* **5**, 897–904.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. **75**(4):805-816.
- Hatahet, F., Ruddock, L.W., 2009. Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2807–2850.
- Hattori, M., Buse, J., Jackson, R., Glimcher, L., Dorf, M., Minami, M., Makino, S., Moriwaki, K., Kuzuya, H., Imura, H., Et, A., 1986. The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science*. **231**, 733–735.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999. Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3787–3799.
- Herold, K.C., Gitelman, S.E., Ehlers, M.R., Gottlieb, P.A., Greenbaum, C.J., Hagopian, W., Boyle, K.D., Keyes-Elstein, L., Aggarwal, S., Phippard, D., Sayre, P.H., McNamara, J., Bluestone, J.A., 2013. Teplizumab (Anti-CD3 mAb) Treatment Preserves C-Peptide Responses in Patients With New-Onset Type 1 Diabetes in a Randomized Controlled Trial: Metabolic and Immunologic Features at Baseline Identify a Subgroup of Responders. *Diabetes* **62**, 3766–3774.
- Hjelmervik, T., Lindqvist, A.-K., Petersen, K., Johannesson, M., Stavrum, A.-K., Johansson, Å., Jonsson, R., Holmdahl, R., Bolstad, A., 2007. The influence of the NOD Nss1/Idd5 loci on sialadenitis and gene expression in salivary glands of congenic mice. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R99.
- Honeyman, M.C., Laine, D., Zhan, Y., Londrigan, S., Kirkwood, C., Harrison, L.C., 2014. Rotavirus infection induces transient pancreatic involution and hyperglycemia in weanling mice. *PLoS One* **9**, 1–8.

- Hoorens, A., Stange, G., Pavlovic, D., Pipeleers, D., 2001. Distinction Between Interleukin-1-Induced Necrosis and Apoptosis of Islet Cells. *Diabetes* **50**, 551–557.
- Hotamisligil, G.S., 2010. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell* **140**, 900–917.
- Hu, D., Valentine, M., Kidd, V.J., Lahti, J.M., 2007. CDK11p58 is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *J. Cell Sci.* **120**, 2424–2434.
- Hübner, M.P., Thomas Stocker, J., Mitre, E., 2009. Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3 + regulatory T cells. *Immunology* **127**, 512–522.
- Hyppönen, E., Läärä, E., Reunanen, A., Järvelin, M.-R., Virtanen, S.M., 2001. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* **358**, 1500–1503.
- Ichim, G., Tait, S.W.G., 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 539–548.
- Insel, R.A., Dunne, J.L., Atkinson, M.A., Chiang, J.L., Dabelea, D., Gottlieb, P.A., Greenbaum, C.J., Herold, K.C., Krischer, J.P., Lernmark, Å., Ratner, R.E., Rewers, M.J., Schatz, D.A., Skyler, J.S., Sosenko, J.M., Ziegler, A.-G., 2015. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **38**, 1964–1974.
- International Diabetes Federation., 2019. IDF Diabetes Atlas 9th edn, International Diabetes Federation. Brussels, Belgium.
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P.A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., Militaru, M., 2015. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Sci. Rep.* **5**, 1–14.
- Irie, J., Wu, Y., Wicker, L.S., Rainbow, D., Nalesnik, M.A., Hirsch, R., Peterson, L.B., Leung, P.S.C., Cheng, C., Mackay, I.R., Gershwin, M.E., Ridgway, W.M., 2006. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J. Exp. Med.* **203**, 1209–1219.
- Ivanov, I.P., Gesteland, R.F., Atkins, J.F., 2006. Evolutionary specialization of recoding: Frameshifting in the expression of *S. cerevisiae* antizyme mRNA is via an atypical antizyme shift site but is still + 1. *RNA (New York, N.Y.)* **3**, 332–337.
- Jacobs, J.L., Belew, A.T., Rakauskaite, R., Dinman, J.D., 2007. Identification of functional , endogenous programmed À 1 ribosomal frameshift signals in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* **35**, 165–174.
- Jakobsen, O.A.J., Szereday, L., 2018. The “Three Amigos” lurking behind type 1 diabetes: Hygiene, gut microbiota and viruses. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **65**, 421–438.
- Jamison, B.L., Neef, T., Goodspeed, A., Bradley, B., Baker, R.L., Miller, S.D., Haskins, K., 2019. Nanoparticles Containing an Insulin–ChgA Hybrid Peptide Protect from Transfer of Autoimmune Diabetes by Shifting the Balance between Effector T Cells and Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **203**, 48–57.
- Jayaraman, S., 2018. Type 1 Diabetes and Epigenetics, in: *The Epigenetics of Autoimmunity*. Elsevier, pp. 187–205.

- Jerram, S.T., Dang, M.N., Leslie, R.D., 2017. The Role of Epigenetics in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **17**, 89.
- Jia, X., Gu, Y., High, H., Yu, L., 2020. Islet autoantibodies in disease prediction and pathogenesis. *Diabetol. Int.* **11**, 6–10.
- Johnston, M., 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**, 458–476.
- Juto, P., 1985. Human milk stimulates B cell function. *Arch. Dis. Child.* **60**, 610–613.
- Karvonen, M., Pitkaniemi, M., Pitkaniemi, J., Kohtamäki, K., Tajima, N., Tuomilehto, J., 1997. Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. *Diabetes / Metab. Rev.* **13**, 275–291.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., Jacobsen, L.M., Schatz, D.A., Lernmark, Å., 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17016.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257.
- Kikutani, H., Makino, S., 1992. The Murine Autoimmune Diabetes Model: NOD and Related Strains. **51**, 285–322.
- Kile, B.T., 2009. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 214–217.
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., 2009. Islet Architecture. *Islets* **1**, 129–136.
- Kono, D.H., Theofilopoulos, A.N., 2017. Chapter 19 – Autoimmunity, Tenth Edit. ed, Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. Elsevier Inc.
- Kuhn, C., Weiner, H.L., 2016. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy* **8**, 889–906.
- Lahti, J.M., Grenets, J., Easton, J., Kiddh, V.J., 1994. Molecular Cloning and Expression of Alternatively Spliced PITSLRE Protein Kinase Isoforms * *Int. J. Biol. Chem* **269**, 15786–15794.
- Lancha, A., López-Garrido, S., Rodríguez, A., Catalán, V., Ramírez, B., Valentí, V., Moncada, R., Silva, C., Gil, M.J., Salvador, J., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., 2015. Expression of Syntaxin 8 in Visceral Adipose Tissue Is Increased in Obese Patients with Type 2 Diabetes and Related to Markers of Insulin Resistance and Inflammation. *Arch. Med. Res.* **46**, 47–53.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., 2003. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7448–7459.
- Lee, H., Lee, Y.-S., Harendra, Q., Pietrzak, S., Oktay, H.Z., Schreiber, S., Liao, Y., Sonthalia, S., Ciecko, A.E., Chen, Y.-G., Keles, S., Sridharan, R., Engin, F., 2020. Beta Cell Dedifferentiation Induced by IRE1 α Deletion Prevents Type 1 Diabetes. *Cell Metab.* **31**, 822-836.e5.
- Lee, K.H., Wucherpfennig, K.W., Wiley, D.C., 2001. Structure of a human insulin peptide–HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* **2**, 501–507.
- Lee, S., Min Kim, S., Dotimas, J., Li, L., Feener, E.P., Baldus, S., Myers, R.B., Chutkow, W.A., Patwari,

- P., Yoshioka, J., Lee, R.T., 2014. Thioredoxin-interacting protein regulates protein disulfide isomerases and endoplasmic reticulum stress. *EMBO Mol. Med.* **6**, 732–743.
- Lei, X.G., Vatamaniuk, M.Z., 2011. Two Tales of Antioxidant Enzymes on β Cells and Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 489–503.
- Leiter, E.H., 1991. NIT-1, a Pancreatic p-Cell Line Established From a Transgenic NOD/Lt Mouse **40**, 842–849.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 463–466.
- Li, B., Fields, S., 1993. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957–963.
- Li, T., Inoue, A., Lahti, J.M., Kidd, V.J., 2004. Failure To Proliferate and Mitotic Arrest of CDK11 p110 / p58 -Null Mutant Mice at the Blastocyst Stage of Embryonic Cell Development **24**, 3188–3197.
- Li, X., Liao, L., Yan, X., Huang, G., Lin, J., Lei, M., Wang, X., Zhou, Z., 2009. Protective effects of 1- α -hydroxyvitamin D3 on residual β -cell function in patients with adult-onset latent autoimmune diabetes (LADA). *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **25**, 411–416.
- Lightfoot, Y.L., Chen, J., Mathews, C.E., 2012. Immune-mediated β -cell death in type 1 diabetes: lessons from human β -cell lines. *Eur. J. Clin. Invest.* **42**, 1244–1251.
- Lim, S., Kaldis, P., 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**, 3079–3093.
- Lindbladh, I., Andersson Svärd, A., Lernmark, Å., 2020. Autoimmune (Type 1) Diabetes, in: *The Autoimmune Diseases*. Elsevier, pp. 769–787.
- Little, R.R., Rohlfing, C.L., 2013. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. *Clin. Chim. Acta* **418**, 63–71.
- Lodde, B., Mineshiba, F., Kok, M., Wang, J., Zheng, C., Schmidt, M., Cotrim, A., Kriete, M., Tak, P., Baum, B., 2006. NOD mouse model for Sjögren's syndrome: lack of longitudinal stability. *Oral Dis.* **12**, 566–572.
- Ma, J., Ptashne, M., 1987. A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113–119.
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M., Mayer-Davis, E.J., 2010. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39**, 481–497.
- Maier, V.H., Melvin, D.R., Lister, C.A., Chapman, H., Gould, G.W., Murphy, G.J., 2000. v- and t-SNARE protein expression in models of insulin resistance: normalization of glycemia by rosiglitazone treatment corrects overexpression of cellubrevin, vesicle-associated membrane protein-2, and syntaxin 4 in skeletal muscle of Zucker diabetic fat. *Diabetes* **49**, 618–625.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., Tochino, Y., 1980. Breeding of a Non-Obese, Diabetic Strain of Mice. *Exp. Anim.* **29**, 1–13.
- Malhotra, J.D., Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2277–2294.

- Malumbres, M., 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166.
- Marhfour, I., Lopez, X.M., Lefkaditis, D., Salmon, I., Allagnat, F., Richardson, S.J., Morgan, N.G., Eizirik, D.L., 2012. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* **55**, 2417–2420.
- Mariño, E., Silveira, P.A., Stolp, J., Grey, S.T., 2011. B cell-directed therapies in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* **32**, 287–294.
- Marrack, P., Kappler, J.W., 2012. Do MHCII-Presented Neoantigens Drive Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases? *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007765–a007765.
- Marré, M.L., James, E.A., Piganelli, J.D., 2015. β cell ER stress and the implications for immunogenicity in type 1 diabetes. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 67.
- Martínez, I.M., Chrispeels, M.J., 2003. Genomic Analysis of the Unfolded Protein Response in Arabidopsis Shows Its Connection to Important Cellular Processes. *Plant Cell* **15**, 561–576.
- Martinov, T., Fife, B.T., 2019. Type 1 diabetes pathogenesis and the role of inhibitory receptors in islet tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci. nyas.* **1461**(1):73-103
- Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S., Uchida, K., Kato, I., Hashimoto, S., Yokokura, T., 1997. Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS* **105**, 643–649.
- Maugh, T.H., 1975. Diabetes: Epidemiology suggests a viral connection. *Science* **188**, 347–351.
- Mauricio, D., Mandrup-Poulsen, T., 1998. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* **47**, 1537–1543.
- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652–659.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435.
- Menge, B.A., Breuer, T.G.K., Ritter, P.R., Uhl, W., Schmidt, W.E., Meier, J.J., 2012. Long-term recovery of β -cell function after partial pancreatectomy in humans. *Metabolism* **61**, 620–624.
- Moore, J.D., 2013. In the wrong place at the wrong time: does cyclin mislocalization drive oncogenic transformation? *Nat. Rev. Cancer* **13**, 201–208.
- Mora, C., Wong, F.S., Chang, C.H., Flavell, R.A., 1999. Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice. *J. Immunol.* **162**, 4576–88.
- Morel, P.A., Dorman, J.S., Todd, J.A., McDevitt, H.O., Trucco, M., 1988. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 8111–8115.
- Morgan, D.O., 1997. CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–291.
- Morgan, D.O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131–134.

- Morita, S., Villalta, S.A., Feldman, H.C., Register, A.C., Rosenthal, W., Hoffmann-Petersen, I.T., Mehdizadeh, M., Ghosh, R., Wang, L., Colon-Negron, K., Meza-Acevedo, R., Backes, B.J., Maly, D.J., Bluestone, J.A., Papa, F.R., 2017. Targeting ABL-IRE1 α Signaling Spares ER-Stressed Pancreatic β Cells to Reverse Autoimmune Diabetes. *Cell Metab.* **25**, 883-897.e8.
- Moroni, L., Bianchi, I., Leo, A., 2012. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **11**, A386–A392.
- Murray, R.Z., Wylie, F.G., Khromykh, T., Hume, D.A., Stow, J.L., 2005. Syntaxin 6 and Vti1b Form a Novel SNARE Complex, Which Is Up-regulated in Activated Macrophages to Facilitate Exocytosis of Tumor Necrosis Factor- α . *J. Biol. Chem.* **280**, 10478–10483.
- Nagata, S., Tanaka, M., 2017. Programmed cell death and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 333–340.
- Nagy, Z.A., 2014. Chapter 10 – Autoimmunity, A History of Modern Immunology.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M., Grignani, F., Riccardi, C., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry **139**, 271–279.
- Noble, J.A., Erlich, H.A., 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, 1–15.
- Noorchashm, H., Lieu, Y.K., Noorchashm, N., Rostami, S.Y., Greeley, S.A., Schlachterman, A., Song, H.K., Noto, L.E., Jevnikar, A.M., Barker, C.F., Naji, A., 1999. I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **163**, 743–50.
- Norris, J.M., Yin, X., Lamb, M.M., Barriga, K., Seifert, J., Hoffman, M., Orton, H.D., Barón, A.E., Clare-Salzler, M., Chase, H.P., Szabo, N.J., Erlich, H., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., 2007. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Islet Autoimmunity in Children at Increased Risk for Type 1 Diabetes. *JAMA* **298**, 1420.
- Nurse, P., 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**, 547–550.
- O'Brien, B.A., Harmon, B. V., Cameron, D.P., Allan, D.J., 1997. Apoptosis Is the Mode of -Cell Death Responsible for the Development of IDDM in the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse. *Diabetes* **46**, 750–757.
- Oldstone, M.B.A., 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* **12**, 1255–1265.
- Olsson, A.H., Volkov, P., Bacos, K., Dayeh, T., Hall, E., Nilsson, E.A., Ladenvall, C., Rönn, T., Ling, C., 2014. Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *PLoS Genet.* **10**, e1004735.
- Oram, R.A., Sims, E.K., Evans-Molina, C., 2019. Beta cells in type 1 diabetes: mass and function; sleeping or dead? *Diabetologia* **62**, 567–577.
- Osame, K., Takahashi, Y., Takasawa, H., Watanabe, S., Kishimoto, M., Yasuda, K., Kaburagi, Y., Nakanishi, K., Kajio, H., Noda, M., 2007. Rapid-onset type 1 diabetes associated with cytomegalovirus infection and islet autoantibody synthesis. *Intern. Med.* **46**, 873–877.

- Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Valitutti, S., Acuto, O., Lanzavecchi, A., 1995. Normal T Lymphocytes Can Express Two Different T Cell Receptor/3 Chains: Implications for the Mechanism of Allelic Exclusion. *J. Exp. Med* **181**, 1587–1591.
- Parkin, J., Cohen, B., 2001. An overview of the immune system **357**, 1777–1789.
- Patterson, C., Guariguata, L., Dahlquist, G., Soltész, G., Ogle, G., Silink, M., 2014. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **103**, 161–175.
- Pearson, J.A., Wong, F.S., Wen, L., 2016. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.* **66**, 76–88.
- Peng, J., Narasimhan, S., Marchesi, J.R., Benson, A., Wong, F.S., Wen, L., 2014. Long term effect of gut microbiota transfer on diabetes development. *J. Autoimmun.* **53**, 85–94.
- Perera, H.K.I., Clarke, M., Morris, N.J., Hong, W., Chamberlain, L.H., Gould, G.W., 2003. Syntaxin 6 Regulates Glut4 Trafficking in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2946–2958.
- Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Bundy, B., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., Moran, A., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D.A., Wherrett, D.K., Wilson, D.M., Krischer, J.P., Skyler, J.S., 2014. B-Lymphocyte Depletion With Rituximab and -Cell Function: Two-Year Results. *Diabetes Care* **37**, 453–459.
- Phillips, J.M., Parish, N.M., Bland, C., Sawyer, Y., De La Peña, H., Cooke, A., 2009. Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations. *Rev. Diabet. Stud.* **6**, 97–103.
- Pincus, D., Chevalier, M.W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S.E., El-Samad, H., Walter, P., 2010. BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. *PLoS Biol.* **8**, e1000415.
- Pociot, F., Akolkar, B., Concannon, P., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nierras, C.R., Todd, J.A., Rich, S.S., Nerup, J., 2010. Genetics of type 1 diabetes: What's next? *Diabetes* **59**, 1561–1571.
- Pozzilli, P., Signore, A., Williams, A.J., Beales, P.E., 1993. NOD mouse colonies around the world-- recent facts and figures. *Immunol. Today* **14**, 193–6.
- Prekeris, R., Yang, B., Oorschot, V., Klumperman, J., Scheller, R.H., 1999a. Differential Roles of Syntaxin 7 and Syntaxin 8 in Endosomal Trafficking **10**, 3891–3908.
- Prekeris, R., Yang, B., Oorschot, V., Klumperman, J., Scheller, R.H., 1999b. Differential Roles of Syntaxin 7 and Syntaxin 8 in Endosomal Trafficking. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3891–3908.
- Proctor, K.M., Miller, S.C.M., Bryant, N.J., Gould, G.W., 2006. Syntaxin 16 controls the intracellular sequestration of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 433–438.
- Pugliese, A., 2016. Insulinitis in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **17**, 31–36.
- Pugliese, A., Yang, M., Kusmarteva, I., Heiple, T., Vendrame, F., Wasserfall, C., Rowe, P., Moraski, J.M., Ball, S., Jebson, L., Schatz, D.A., Gianani, R., Burke, G.W., Nierras, C., Staeva, T., Kaddis, J.S., Campbell-Thompson, M., Atkinson, M.A., 2014. The Juvenile Diabetes Research Foundation Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD) Program: goals, operational model and emerging findings. *Pediatr. Diabetes* **15**, 1–9.

- Rabinovitch, A., 1992. Free radicals as mediators of pancreatic islet beta-cell injury in autoimmune diabetes. *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 455–6.
- Rahier, J., Wallon, J., Henquin, J.C., 1981. Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia* **20**, 540–546.
- Ramos-Rodríguez, M., Raurell-Vila, H., Colli, M.L., Alvelos, M.I., Subirana-Granés, M., Juan-Mateu, J., Norris, R., Turatsinze, J.-V., Nakayasu, E.S., Webb-Robertson, B.-J.M., Inshaw, J.R.J., Marchetti, P., Piemonti, L., Esteller, M., Todd, J.A., Metz, T.O., Eizirik, D.L., Pasquali, L., 2019. The impact of proinflammatory cytokines on the β -cell regulatory landscape provides insights into the genetics of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* **51**, 1588–1595.
- Rasmussen, T., Witsø, E., Tapia, G., Stene, L.C., Rønningen, K.S., 2011. Self-reported lower respiratory tract infections and development of islet autoimmunity in children with the type 1 diabetes high-risk HLA genotype: the MIDIA study. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **27**, 834–837.
- Recillas-targa, F., 2006. Multiple Strategies for Gene Transfer , Expression , Knockdown , and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic **34**, 337–338.
- Redondo, M.J., Eisenbarth, G.S., 2002. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* **45**, 605–622.
- Redondo, M.J., Steck, A.K., Pugliese, A., 2018. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **19**, 346–353.
- Rewers, M., Ludvigsson, J., 2016. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* **387**, 2340–2348.
- Rodriguez-Calvo, T., 2019. Enterovirus infection and type 1 diabetes: unraveling the crime scene. *Clin. Exp. Immunol.* **195**, 15–24.
- Rodriguez-Calvo, T., Sabouri, S., Anquetil, F., von Herrath, M.G., 2016. The viral paradigm in type 1 diabetes: Who are the main suspects? *Autoimmun. Rev.* **15**, 964–969.
- Roep, B.O., 2019. A viral link for type 1 diabetes. *Nat. Med.* **25**, 1816–1818.
- Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Martínez, M.S., Olivar, L.C., Nava, M., Tomey, D., Rojas, M., Salazar, J., Garicano, C., Velasco, M., 2018. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *J. Diabetes Res.* **2018**:9601801, 1–19.
- Rorsman, P., Renström, E., 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029–1045.
- Rosenbauer, J., Herzig, P., Giani, G., 2008. Early infant feeding and risk of type 1 diabetes mellitus—a nationwide population-based case–control study in pre-school children. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **24**, 211–222.
- Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., Abbas, A.K., 2015. Mechanisms of human autoimmunity **125**, 2228–2233.
- Rui, J., Deng, S., Lebastchi, J., Clark, P.L., Usmani-Brown, S., Herold, K.C., 2016. Methylation of insulin DNA in response to proinflammatory cytokines during the progression of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetologia* **59**, 1021–1029.

- Saavedra-Avila, N.A., Sengupta, U., Sanchez, B., Sala, E., Haba, L., Stratmann, T., Verdaguer, J., Mauricio, D., Mezquita, B., Ropero, A.B., Nadal, A., Mora, C., 2014. Cyclin D3 promotes pancreatic β -cell fitness and viability in a cell cycle-independent manner and is targeted in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E3405–E3414.
- Safari, F., Farajnia, S., Arya, M., Zarredar, H., Nasrolahi, A., 2018. CRISPR and personalized Treg therapy: new insights into the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **40**, 201–211.
- Sala Solé, E., 2016. La CDK11 i la seva implicació en la mort de la cèl·lula beta pancreàtica en el debut diabètic del ratolí NOD. Universitat de Lleida.
- Salomon, B., Rhee, L., Bour-Jordan, H., Hsin, H., Montag, A., Soliven, B., Arcella, J., Girvin, A.M., Miller, S.D., Bluestone, J.A., 2001. Development of Spontaneous Autoimmune Peripheral Polyneuropathy in B7-2–Deficient Nod Mice. *J. Exp. Med.* **194**, 677–684.
- Salvadó, L., Palomer, X., Barroso, E., Vázquez-Carrera, M., 2015. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 438–448.
- Samuelsson, U., Oikarinen, S., Hyöty, H., Ludvigsson, J., 2011. Low zinc in drinking water is associated with the risk of type 1 diabetes in children. *Pediatr. Diabetes* **12**, 156–164.
- Sanchez, I., Dynlacht, B.D., 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 311–321.
- Sano, R., Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms **1833**, 1–26.
- Scheuner, D., Kaufman, R.J., 2008. The Unfolded Protein Response: A Pathway That Links Insulin Demand with β -Cell Failure and Diabetes. *Endocr. Rev.* **29**, 317–333.
- Scheuner, D., Mierde, D. Vander, Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W.M., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C., Kaufman, R.J., 2005. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* **11**, 757–764.
- Sherr, C.J., 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 187–190.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Cam, L. Le, Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A.A., Levin, S.D., Geng, Y., Boehmer, H. Von, 2003. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias **4**, 451–461.
- Silveira, P., Serreze, D., Grey, S., 2007. Invasion of the killer B's in type 1 diabetes. *Front. Biosci.* **12**, 2183.
- Smith, K.A., Efstathiou, S., Cooke, A., 2007. Murine Gammaherpesvirus-68 Infection Alters Self-Antigen Presentation and Type 1 Diabetes Onset in NOD Mice. *J. Immunol.* **179**, 7325–7333.
- Spurlin, B.A., Park, S.-Y., Nevins, A.K., Kim, J.K., Thurmond, D.C., 2004. Syntaxin 4 Transgenic Mice Exhibit Enhanced Insulin-Mediated Glucose Uptake in Skeletal Muscle. *Diabetes* **53**, 2223–2231.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., Finger, E.B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E.L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., Bluestone, J.A., 2004. In Vitro–expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *J. Exp. Med.* **199**, 1455–1465.

- Temajo, N.O., Howard, N., 2014. The mosaic of environment involvement in autoimmunity: The abrogation of viral latency by stress, a non-infectious environmental agent, is an intrinsic prerequisite prelude before viruses can rank as infectious environmental agents that trigger autoimmune. *Autoimmun. Rev.* **13**, 635–640.
- Teng, F.Y., Wang, Y., Tang, B.L., 2001. The syntaxins. *Genome Biol.* **2**, REVIEWS3012.
- Tersey, S.A., Nishiki, Y., Templin, A.T., Cabrera, S.M., Stull, N.D., Colvin, S.C., Evans-Molina, C., Rickus, J.L., Maier, B., Mirmira, R.G., 2012. Islet β -Cell Endoplasmic Reticulum Stress Precedes the Onset of Type 1 Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse Model. *Diabetes* **61**, 818–827.
- Thomas, D., Hanley, M.R., 1994. Pharmacological Tools for Perturbing Intracellular Calcium Storage, *Methods Cell Biol.* **40**, 65-89.
- Thomas, H.E., Darwiche, R., Corbett, J.A., Kay, T.W.H., Thomas, H.E., Darwiche, R., Corbett, J.A., Kay, T.W.H., 1999. Evidence That β Cell Death in the Nonobese Diabetic Mouse Is Fas Independent. *J. Immunol.* **163**, 1562–1569.
- Thoreau, V., Bergès, T., Callebaut, I., Guillier-Gencik, Z., Gressin, L., Bernheim, A., Karst, F., Mornon, J.-P., Kitzis, A., Chomel, J.-C., 1999. Molecular Cloning, Expression Analysis, and Chromosomal Localization of Human Syntaxin 8 (STX8). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 577–583.
- Tracy, S., Drescher, K.M., Chapman, N.M., Kim, K.-S., Carson, S.D., Pirruccello, S., Lane, P.H., Romero, J.R., Leser, J.S., 2002. Toward Testing the Hypothesis that Group B Coxsackieviruses (CVB) Trigger Insulin-Dependent Diabetes: Inoculating Nonobese Diabetic Mice with CVB Markedly Lowers Diabetes Incidence. *J. Virol.* **76**, 12097–12111.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P., 2000. Functional and Genomic Analyses Reveal an Essential Coordination between the Unfolded Protein Response and ER-Associated Degradation. *Cell* **101**, 249–258.
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A., 2002. Proteins of the PDI Family : Unpredicted Non-ER Locations and Functions **163**, 154–163.
- Ullah, A., Khan, A., Khan, I., 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharm. J.* **24**, 547–553.
- Van Speybroeck, L., 2002. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **981**, 61–81.
- Vekich, J.A., Belmont, P.J., Thuerauf, D.J., Glembotski, C.C., 2012. Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 259–267.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149.
- Viisanen, T., Ihantola, E.-L., Näntö-Salonen, K., Hyöty, H., Nurminen, N., Selvenius, J., Juutilainen, A., Moilanen, L., Pihlajamäki, J., Veijola, R., Toppari, J., Knip, M., Ilonen, J., Kinnunen, T., 2017. Circulating CXCR5 + PD-1 + ICOS + Follicular T Helper Cells Are Increased Close to the Diagnosis of Type 1 Diabetes in Children With Multiple Autoantibodies. *Diabetes* **66**, 437–447.
- Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., O'Brien, T., Samali, A., 2011. Cytokine-Induced Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus, in: *Type 1 Diabetes - Complications*,

Pathogenesis, and Alternative Treatments. InTech.

- Virtanen, S.M., Laara, E., Hypponen, E., Reijonen, H., Rasanen, L., Aro, A., Knip, M., Ilonen, J., Akerblom, H.K., 2000. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes* **49**, 912–917.
- Virtanen, S.M., Nevalainen, J., Kronberg-Kippilä, C., Ahonen, S., Tapanainen, H., Uusitalo, L., Takkinen, H.-M., Niinistö, S., Ovaskainen, M.-L., Kenward, M.G., Veijola, R., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M., 2012. Food consumption and advanced β cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes: a nested case-control design. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 471–478.
- Wali, J.A., Trivedi, P., Kay, T.W., Thomas E., H., 2015. Measuring Death of Pancreatic Beta Cells in Response to Stress and Cytotoxic T Cells. *Stress Responses Methods Protoc.* **1292**, 1–246.
- Wållberg, M., Cooke, A., 2013. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* **34**, 583–591.
- Walter, P., Ron, D., 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* **334**, 1081–1086.
- Wang, Z., Xie, Z., Lu, Q., Chang, C., Zhou, Z., 2017. Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **52**, 273–286.
- Watanabe, A., Nishijima, K. -i., Zhao, S., Zhao, Y., Tanaka, Y., Takemoto, H., Strauss, H.W., Blankenberg, F.G., Tamaki, N., Kuge, Y., 2012. Quantitative Determination of Apoptosis of Pancreatic -Cells in a Murine Model of Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Nucl. Med.* **53**, 1585–1591.
- Wen, L., Green, E.A., Stratmann, T., Panosa, A., Gomis, R., Eynon, E.E., Flavell, R.A., Mezquita, J.A., Mora, C., 2011. In vivo diabetogenic action of CD4+ T lymphocytes requires Fas expression and is independent of IL-1 and IL-18. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1344–1351.
- Wen, L., Ley, R.E., Volchkov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, F.S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., Chervonsky, A. V., 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455**, 1109–1113.
- Wilcox, N.S., Rui, J., Hebrok, M., Herold, K.C., 2016. Life and death of β cells in Type 1 diabetes: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* **71**, 51–58.
- Wilkinson, B., Gilbert, H.F., 2004. Protein disulfide isomerase **1699**, 35–44.
- Wollheim, C.B., Sharp, G.W., 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.* **61**, 914–973.
- Wong, F.S., Wen, L., Tang, M., Ramanathan, M., Visintin, I., Daugherty, J., Hannum, L.G., Janeway, C.A., Shlomchik, M.J., 2004. Investigation of the Role of B-Cells in Type 1 Diabetes in the NOD Mouse. *Diabetes* **53**, 2581–2587.
- Xiang, J., Lahti, J.M., Grenet, J., Easton, J., Kidd, V.J., 1994. Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms. *J. Biol. Chem.* **269**, 15786–94.
- Xiao, X., Guo, P., Shiota, C., Zhang, T., Coudriet, G.M., Fischbach, S., Prasadnan, K., Fusco, J., Ramachandran, S., Witkowski, P., Piganelli, J.D., Gittes, G.K., 2018. Endogenous

- Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy, Reverses Autoimmune Diabetes. *Cell Stem Cell* **22**, 78-90.e4.
- Yang, V.W., 2018. The Cell Cycle, in: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Elsevier, pp. 197–219.
- Yang, Y., Santamaria, P., 2006. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clin. Sci.* **110**, 627–639.
- Yeung, W.C.G., Rawlinson, W.D., Craig, M.E., 2011. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *Bmj* **342**, 421.
- Yoon, J.-W., Jun, H.-S., 2005. Autoimmune Destruction of Pancreatic Beta Cells. *Am. J. Ther.* **12**, 580–591.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* **107**, 881–891.
- Yu, Jiaojiao, Li, T., Liu, Y., Wang, Xi, Zhang, J., Wang, Xi'e, Shi, G., Lou, J., Wang, Likun, Wang, C., Wang, Lei, 2020. Phosphorylation switches protein disulfide isomerase activity to maintain proteostasis and attenuate ER stress. *EMBO J.* **39**, e103841.
- Yu, Jicheng, Wang, J., Zhang, Y., Chen, G., Mao, W., Ye, Y., Kahkoska, A.R., Buse, J.B., Langer, R., Gu, Z., 2020. Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs. *Nat. Biomed. Eng.* **4**, 499-506.
- Yu, J., Zhang, Y., Bomba, H., Gu, Z., 2016. Stimuli-responsive delivery of therapeutics for diabetes treatment. *Bioeng. Transl. Med.* **1**, 323–337.
- Zaccone, P., Cooke, A., 2013. Helminth mediated modulation of Type 1 diabetes (T1D). *Int. J. Parasitol.* **43**, 311–318.
- Zemunik, T., Boraska, V., 2011. Genetics of type 1 diabetes, *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Intech.
- Zhang, Y., Ren, J., 2011. Thapsigargin triggers cardiac contractile dysfunction via NADPH oxidase-mediated mitochondrial dysfunction: Role of Akt dephosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 2172–2184.
- Zhang, Z., Hu, Y., Xu, N., Zhou, W., Yang, L., Chen, R., Yang, R., Sun, J., Chen, H., 2019. A New Way for Beta Cell Neogenesis: Transdifferentiation from Alpha Cells Induced by Glucagon-Like Peptide 1. *J. Diabetes Res.* **2019**, 2583047.
- Zhong, J., 2013. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes, in: *Type 1 Diabetes*. InTech.
- Zhong, J., Rao, X., Xu, J.-F., Yang, P., Wang, C.-Y., 2012. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Autoimmune-Mediated Beta-Cell Destruction in Type 1 Diabetes. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 238980.

ANEXOS

1. ANEXO I. Productos/kits

PRODUCTOS/KITS			
Nombre	Casa comercial	Ciudad, País	Ref.
2-Mercaptoetanol, 14.2M	Fluka	Bucarest, Rumanía	63689
2-Mercaptoetanol, 50mM	Gibco-ThermoFisher	Waltham, Massachusetts, EEUU	31350-010
Acetato de potasio	Sigma	San Luis, EEUU	P1190
Ácido acético glacial	Panreac	Barcelona, España	141008,1211
Ácido aspártico	Sigma	San Luis, EEUU	A7219
Ácido glutámico	Sigma	San Luis, EEUU	G1251
Ácido para-aminobenzoico	Sigma	San Luis, EEUU	A9878
Acrilamida/Bis 30% 29:1	BioRad	California, EEUU	1610156
Adenina	Sigma	San Luis, EEUU	A8751
Agar	CondaLab	Madrid, España	1800
Agarosa	Lonza	Basilea, Suiza	50004
Alanina	Sigma	San Luis, EEUU	A7377
Ampicilina	Applichem	Darmstadt, Alemania	A0839
Arginina	Sigma	San Luis, EEUU	A5131
Asparagina	Sigma	San Luis, EEUU	A0884
Aureobasidina A	Clontech-Takara	Kusatsu, Japón	630499
Azul de tripano	Sigma	San Luis, EEUU	T8154
Bactotripton	Conda	Madrid, España	051235
Cisteína	Sigma	San Luis, EEUU	C7352
Clarity Western ECL Substrate	BioRad	California, EEUU	RPN2106
CleanBlot	Fisher Scientific	Nuevo Hampshire, EEUU	21232
Cloruro de calcio	Sigma	San Luis, EEUU	C2661
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Sigma	San Luis, EEUU	63535
Cloruro de potasio	Panreac	Barcelona, España	131494
Cloruro de rubidio	Sigma	San Luis, EEUU	215260
Cloruro de sodio	Merck	Darmstadt, Alemania	K37767104
Colagenasa P	Roche	Basilea, Suiza	11213857001
Coelenterazina	NanoLight/Prolume	Arizona, EEUU	301
Cocktail inhibidores de proteasas	Thermo Scientific	Massachusetts, EEUU	78441
DC™ Protein Assay	BioRad	California, EEUU	5000116
DMEM 4.5g/l glucosa	Lonza	Basilea, Suiza	12-604F
DMEM sin glucosa	Gibco	Waltham, Massachusetts, EEUU	11966025
DMSO	Sigma	San Luis, EEUU	67-68-5
EDTA	Sigma	San Luis, EEUU	020M-0003
Etanol 100%	Panreac	Barcelona, España	141086
Expin Combo GP mini	Geneall	Lisboa, Portugal	112-102
Expin Gel SV	Geneall	Lisboa, Portugal	102-102
Expin PCR SV	Geneall	Lisboa, Portugal	103-102
Expres Plasmid SV (Midiprep)	Geneall	Lisboa, Portugal	101-226
Expres Plasmid SV (Miniprep)	Geneall	Lisboa, Portugal	101-102
Extracto de levadura	BD	New Jersey, EEUU	7233897
FBS	Biosera	Nuaille, Francia	FB-1280

Fenilalanina	Sigma	San Luis, EEUU	P5482
GelRed	Biotium	Fremont, California, EEUU	41002
Geneticina (G418)	Biosera	Nuaille, Francia	LM-A4115
Glicerol	Sigma	San Luis, EEUU	G6279
Glicina	Sigma	San Luis, EEUU	G7126
Glutamina	Sigma	San Luis, EEUU	G3126
HBSS	Lonza	Basilea, Suiza	10-547F
Histidina	Sigma	San Luis, EEUU	H8125
Hoechst 33342	Sigma	San Luis, EEUU	B2261
Inositol	Sigma	San Luis, EEUU	I7508
Ioduro de propidio	BD Biosciences	California, EEUU	51-66211E
Isoleucina	Sigma	San Luis, EEUU	I2752
Isopropanol	Sigma	San Luis, EEUU	59304
Klenow Large Fragment (DNA Polimerasa I)	New England Biolabs	Ipswich, Massachusetts, EEUU	M0210S
Leucina	Sigma	San Luis, EEUU	L8000
Ligasa T4	New England Biolabs	Ipswich, Massachusetts, EEUU	M0202S
Lisina	Sigma	San Luis, EEUU	L8662
Marcador de peso molecular DNA, 1Kb	Genecraft	Colonia, Alemania	GC-015-003
Marcador de peso molecular DNA, λHindIII	Genecraft	Colonia, Alemania	GC-015-008
Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System	Clontech-Takara	Kusatsu, Japón	630489
Membrana de PVDF	GE Healthcare	Chicago, EEUU	10600023
Metafectene Pro	Biontex	Munich, Alemania	T040
Metanol	Panreac	Barcelona, España	161091
Metionina	Sigma	San Luis, EEUU	M5306
Mowiol	Sigma	San Luis, EEUU	81381
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher	Waltham, Massachusetts, EEUU	26619
Paraformaldehido	Sigma	San Luis, EEUU	P6148
PBS	Lonza	Basilea, Suiza	17-516F
Película selladora Microseal® 'B' Adhesive Seals Optical	BioRad	California, EEUU	MSB1001
Penicilina-Estreptomycin 100x	Cultek/Lonza	Basilea, Suiza	16SV30010
Perlas Proteína G-agarosa	Thermo Scientific	Massachusetts, EEUU	20398
Persulfato de amonio	Sigma	San Luis, EEUU	A3678
Pfu Polimerasa	Promega	Wisconsin, EEUU	M7741
Placa blanca - CELLSTAR® 96W Microplate	Sigma	San Luis, EEUU	M0187
Plasmid Maxi kit (Maxiprep)	Qiagen	Hilden, Alemania	12162
Poli-L-lisina	Sigma	San Luis, EEUU	P6516
Prolina	Sigma	San Luis, EEUU	P5607
Proteína G-agarosa Pierce	Thermo Scientific	Massachusetts, EEUU	20398
Quelitrina	Sigma	San Luis, EEUU	C2932
Raspador Celular	Fisherbrand-ThermoFisher	Waltham, Massachusetts, EEUU	08-100-242
SDS	Sigma	San Luis, EEUU	L4509
Serina	Sigma	San Luis, EEUU	S4500

SYBR-Green	Thermo Scientific	Massachusetts, EEUU	4344463
SYBR-Safe	Invitrogen	Carlsbad, California, EEUU	S33102
Tapsigargina	Sigma	San Luis, EEUU	67526-95-8
TEMED	Sigma	San Luis, EEUU	T9281
Tirosina	Sigma	San Luis, EEUU	T8566
Treonina	Sigma	San Luis, EEUU	T8441
Tripsina-EDTA	Life Technologies	California, EEUU	25300062
Triptófano	Sigma	San Luis, EEUU	T0254
Tris	Serva	Heidelberg, Alemania	37190
Tritón X-100	Sigma	San Luis, EEUU	T8787
Trizol	MRC	Ohio, EEUU	TR118
Tubos centrifugación	Nalgene	Rochester, NY, EEUU	99434
Tween-20	Sigma	San Luis, EEUU	P1379
Kit transformación de levadura (Yeast Transformation System)	Clontech	Kusatsu, Japón	630489
Uracilo	Sigma	San Luis, EEUU	U0750
Valina	Sigma	San Luis, EEUU	V0513
X-α-Gal	Sigma	San Luis, EEUU	16555
Zymoprep Yeast Plasmid	Zymoresearch	Irvine, California, EEUU	D2001

2. ANEXO II. Tampones genéricos utilizados

TAE 50x		
Tris	484 g	
Ácido acético glacial	114.2 ml	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	74.4 g	
pH 8.5		
TAMPÓN DE CARGA PROTEÍNA	4x	5x
Tris/HCl pH 6.8	250mM	375mM
Glicerol	40%	50%
SDS	8%	10%
β -mercaptoetanol	20%	25%
Azul de bromofenol	20%	25%
TAMPÓN DE CARGA DNA	10 ml	
Tris 100mM pH 7.5	1 ml	
Ficoll 400	1.5 g	
Azul de bromofenol	3 mg	
EDTA 0.5M	1 ml	
Xileno cianol	3 mg	
TE pH 7.5		
Tris/HCl Ph 7.5	100mM	
EDTA	10mM	
H2O MQ		
MEDIO LB (bacterias)		
MEDIO LÍQUIDO	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Triptona	5 g/l
MEDIO CON AGAR	Agar	1.5% (p/v)
En H2O milliQ		
pH 7.5		

TAMPÓN DE MIGRACIÓN	
Tris-HCl pH8,8	484 g
Glicina	114.2 ml
SDS	74.4 g
TAMPÓN DE TRANSFERENCIA	
Tris-HCl	480 mM
Glicina	39 mM
SDS	0.0375% (p/v)
Metanol	10% (v/v)
TAMPÓN TBST	
Tris-HCl pH 8	20 mM
NaCl	125 mM
Tween-20	0.1% (v/v)

3. ANEXO III. Producción de TAQ polimerasa en *E.Coli*

La TAQ polimerasa es la enzima necesaria para llevar a cabo las reacciones de PCR. Esta enzima fue producida en el laboratorio.

Material/reactivos

- Todo el material utilizado (erlenmeyers...) era de uso exclusivo para este fin.
- Placa de LB con 50 µg/ml de ampicilina.
- Medio Superbroth:

Medio Superbroth	
Triptona	32g
Extracto de levadura	20g
NaCl	5g
NaOH (1N)	5ml
Agua MQ hasta 1L (pH7)	

Protocolo

- Cultivar bacterias DH5α *E.Coli* en una placa de LB con 50 µg/ml de ampicilina durante toda la noche en el incubador a 37°C.
- Aislar una de las colonias e incubar en 50 ml de medio Superbroth con 200 µg/ml de ampicilina en un erlenmeyer de 250ml durante toda la noche a 37°C en agitación. Medir la densidad óptica OD₆₀₀ en el espectrofotómetro utilizando 1ml de volumen en cubeta de espectrofotómetro.
- Añadir 2 ml de medio en un litro de Superbroth (o el volumen equivalente al OD₆₀₀=0.5).
- Incubar en agitación a 37°C durante 4 horas, hasta una OD₆₀₀ de 0.3.
- Añadir isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4mM
- Incubar en agitación a 37°C durante toda la noche.
- Elevar la temperatura del cultivo a 75°C en un baño de agua y centrifugar las células a 4000 rpm durante 10 minutos.

- Resuspender el pellet celular en 12 ml de tampón A y transferir el volumen a un falcon de 50 ml.

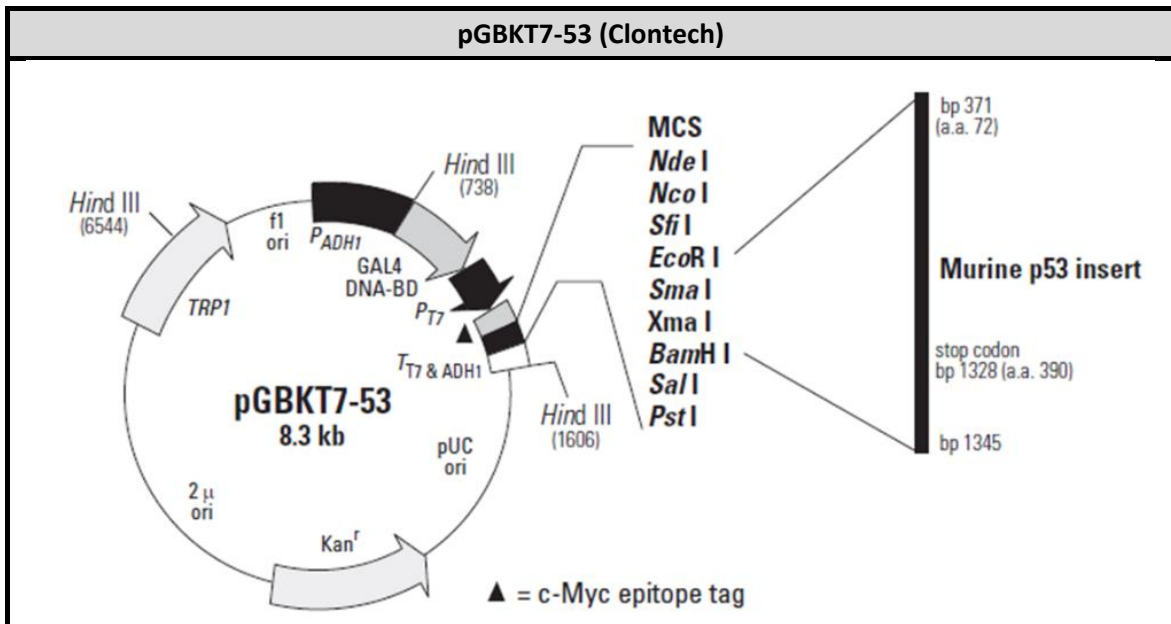
Tampón A (pH 8)	
Tris-HCl	50mM
Glucosa (dextrosa)	50mM
EDTA	1mM

- Añadir 60 mg de lisozima para permitir la rotura de las membranas celulares.
- Incubar durante 15 minutos a RT moviendo el tubo ocasionalmente.
- Añadir 14 ml de tampón B, mezclar por inversión e incubar en un baño con agua durante 1 hora a 75°C, agitándolo de vez en cuando.

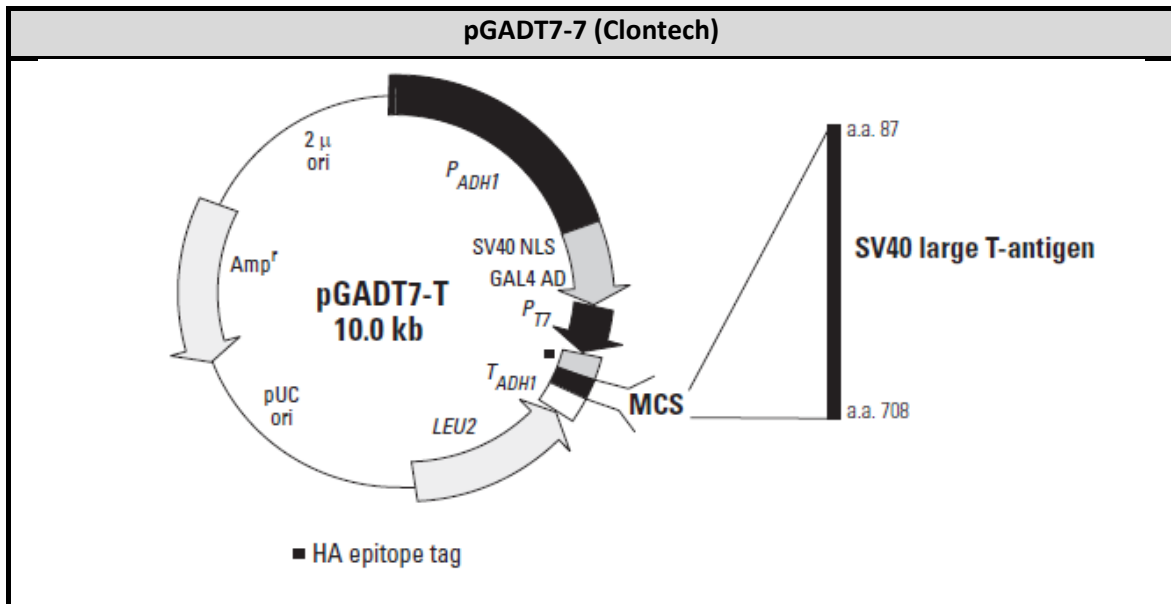
Tampón B (pH 8)	
Tris-HCl	10mM
KCl	50mM
EDTA	1mM
NP-40	1%

- Centrifugar a 12000g durante 40 minutos y recoger el sobrenadante.
- Para conservar de forma correcta la enzima, añadir 1/5 parte de su volumen total de glicerol al 60% y alicuotar en eppendorf de 1.5 ml.
- Guardar a -80°C hasta su uso. Una alícuota de 1.5ml se descongelaba en hielo y se hacían alícuotas de 15-20 µl, que se mantenían a -20°C.

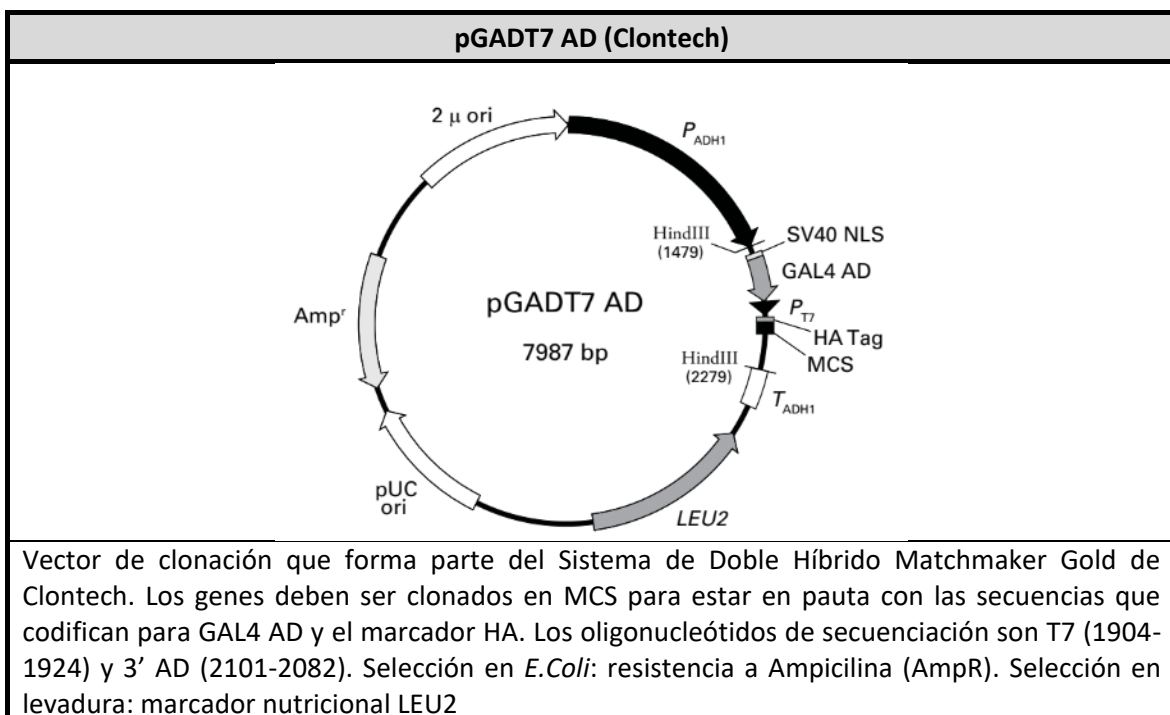
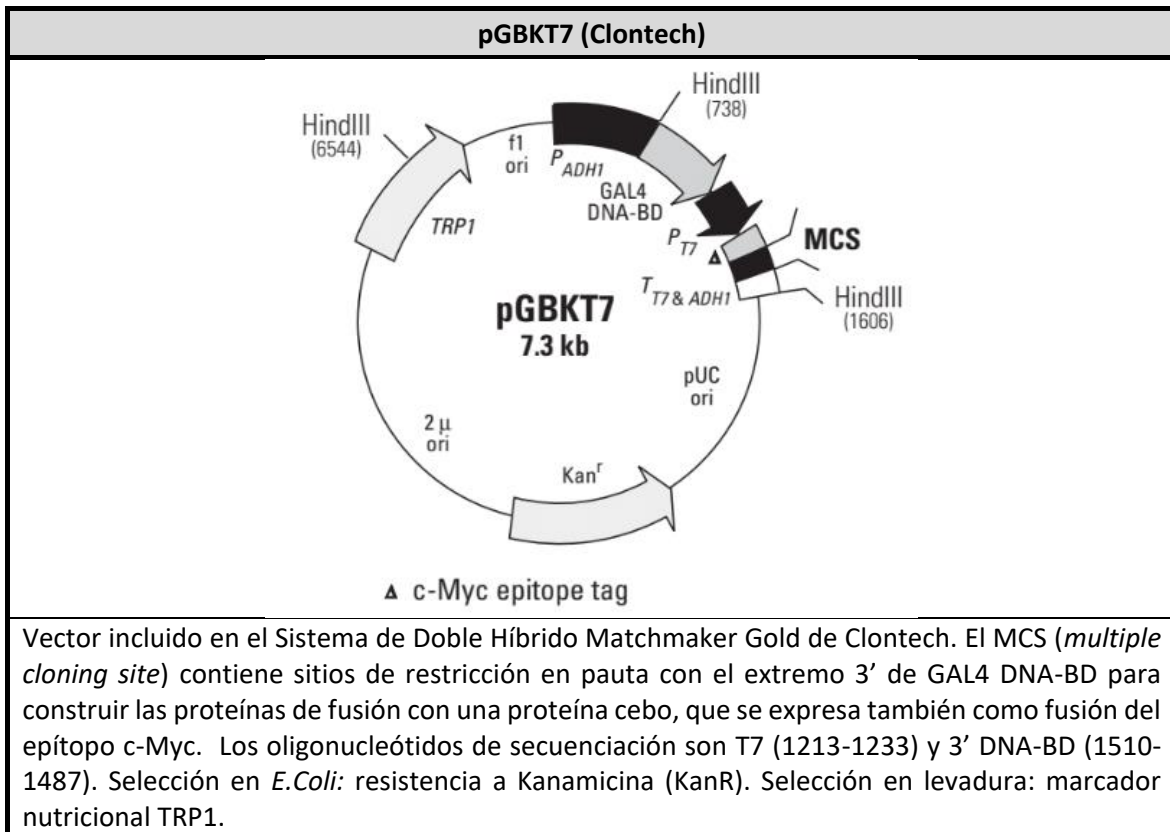
4. ANEXO IV. Mapas e información de los plásmidos utilizados

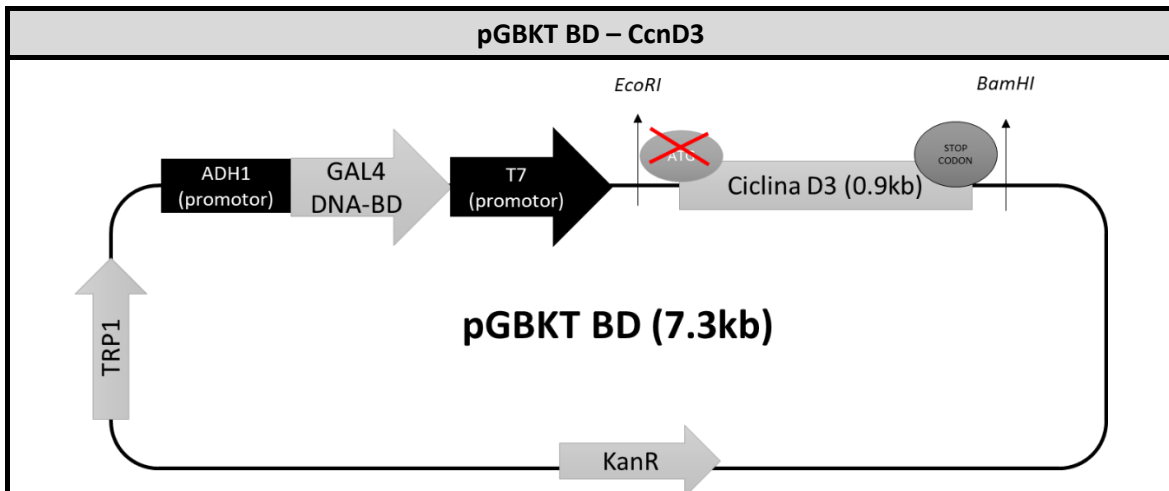


Mapa del plásmido control positivo pGBKT7-53, que codifica para una fusión de la proteína murina p53 y GAL4 DNA-BD. El cDNA de p53 murino (GenBank Accession No. K01700) fue clonado en pGBKT7 entre EcoRI y BamHI. El inserto p53 fue derivado del plásmido descrito por Iwabuchi y colaboradores (Iwabuchi et al., 1993) y modificado por Clontech.

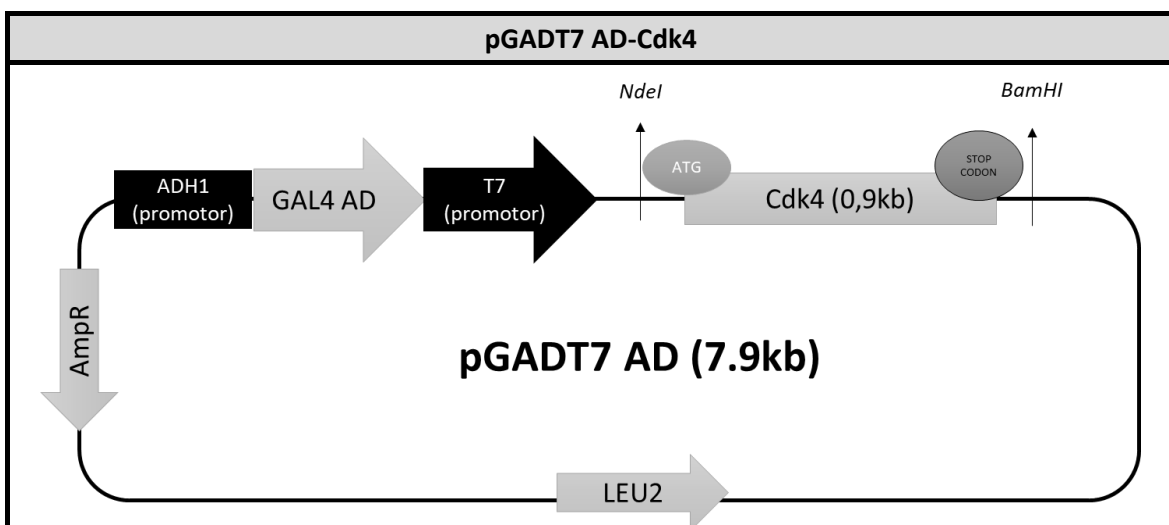


Mapa del plásmido control positivo pGBKT7-T, que codifica para una fusión del SV40 antígeno T grande y GAL4 AD (aa 768-881). El cDNA de SV40 antígeno T grande (GenBank Locus SV4CG), fue derivado del plásmido descrito por Li y Fields (Li and Fields, 1993), clonado en pGADT7 y modificado por Clontech. Extraído de Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (PT4084-1) (Clontech, n.d.).





NM_007632.2 (mouse CyclinD3) en pGBKT7 BD. Se eliminó el ATG de la ciclinaD3 ya que el vector tenía su codon de inicio antes del extremo 5' del promotor (upstream). El inserto proviene de RD3Eα w/o PolyA, mediante Pfu DNA polimerasa utilizando los oligonucleótidos Y2HD3F y Y2HD3R. Vector (pGBKT7 BD) e inserto se cortaron con EcoRI y BamHI. Los oligonucleótidos de secuenciación son T7, D3CloR y D3R1. Selección en *E.Coli*: resistencia a Kanamicina (KanR). Selección en levadura: marcador nutricional TRP1



NM_009870.3(mouse Cdk4) en pGADT7 AD. Vector (pGADT7 AD) se cortó con NdeI y BamHI. El inserto, que proviene de Gal4BD-MmCdk4, se cortó con NdeI y BamHI. Los oligonucleótidos de secuenciación son T7, Cdk4F y ADseq. Selección en *E.Coli*: resistencia a Ampicilina (AmpR). Selección en levadura: marcador nutricional LEU2

