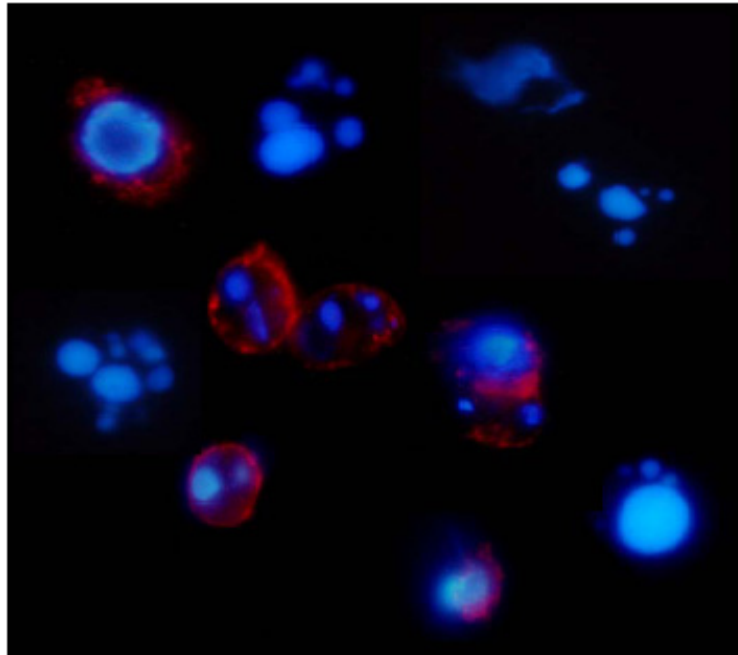


Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides



Silvia Marcé Torra

**Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Líneas y cultivos celulares

Las líneas celulares que se utilizaron para este estudio fueron: **REC-1**, **GRANTA 519**, **NCEB-1** y **JEKO**, todas ellas derivadas de pacientes afectados de linfoma de células del manto; **JVM-2**, derivada de una leucemia prolinfocítica B y **Jurkat**, una línea celular derivada de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T.

Las líneas Jurkat, JVM-2, REC-1 y NCEB-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), 2 mM de L-glutamina y 50 µg/ml de penicilina/estreptomicina. La línea JEKO se suplementó con un 20% de FCS y la línea GRANTA 519 creció en medio DMEM (Gibco BRL, Life Technologies). Las células se mantuvieron en cultivo en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO₂. La línea celular Jurkat se mantuvo a una concentración de 0.2x10⁶ /ml. Las demás líneas se mantuvieron a concentraciones entre 0.5-1x10⁶ /ml. Los cultivos celulares se contaban cada dos o tres días con una cámara de Neubauer y se realizaban lavados periódicos con PBS esterilizado y filtrado. Los pellets de células se resuspendían y resembraban en medio fresco a las concentraciones indicadas.

Todas las manipulaciones de las células fueron realizadas en cabinas de flujo laminar vertical y en condiciones estériles. Todas las diluciones añadidas a los cultivos celulares se esterilizaron usando filtros de 0.22 µm de tamaño de poro (Millex).

2.- Determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad de los cultivos celulares se llevó a cabo cuantificando los residuos de fosfatidilserina a la parte exterior de la membrana celular mediante el marcaje con anexina V- fluoresceína isotiocinato (FITC) (Bender Medsystems). Se lavaron las células (0.25-0.5x10⁶) con tampón de unión a anexina (10 mM HEPES, pH 7.4; 280 mM NaCl; 5 mM CaCl₂) y se resuspendieron en un volumen de 200 µl del mismo tampón, al que se le añadió anexina V-FITC a una concentración de 1 µg/ml para las líneas celulares y 0.5 µg/ml para las células primarias estudiadas. Las células marcadas se incubaron durante 15' a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Se lavaron las células y se resuspendieron con 200 µl del tampón de anexina y se añadió yoduro de propidio (PI) (20 µg/ml), que marca la degradación del DNA, justo en el momento del análisis. 10000 células por muestra fueron adquiridas con el software Cell Quest y analizadas con el Paint-a-gate de un FACScan (Becton Dickinson), y se tomaron como células viables aquellas células anexina -/ PI -.

3.- Detección de micoplasma en los cultivos celulares

La presencia de micoplasmas en los cultivos celulares se controló mediante PCR. Este test se realizó de forma rutinaria en todas las células en cultivo cada 15 días y de forma obligada anterior a su criopreservación y posterior a su descongelación. Como muestra se tomó una pequeña cantidad de cada cultivo celular, se centrifugó y se recogió y guardó el

sobrenadante a -20°C hasta su análisis. Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores fueron:

Mico A: 5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3'

Mico B: 5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G-3'

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa. La aparición de una banda de aproximadamente 500 bp se consideró como resultado positivo.

4.- Obtención de células mononucleares

Las células mononucleares primarias se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica a través de un gradiente de Ficoll/Hypaque. Posterior a la obtención de las células, se criopreservaron en nitrógeno líquido en presencia de un 10% de dimetil sulfóxido y un 20% de FCS hasta el momento de su utilización.

5.- Descongelación y cultivo de células primarias

Las células se descongelaron en RPMI con 10% FCS a 37°C y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante se resuspendieron en medio de cultivo. Posteriormente se incubaron con los fármacos a estudiar a una concentración de $1-5 \times 10^6$ células/ml en tubo, flascón de cultivo o placas según tratamiento. La viabilidad celular posterior a la descongelación, fue determinada por marcaje con anexina V-FITC, como se ha descrito en el apartado 2 de materiales y métodos de esta tesis.

6.- Análisis de proteínas

6.1.- Estudio de proteínas intracelulares por citometría de flujo

Las células ($0.25-0.5 \times 10^5$) se fijaron y permeabilizaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15' a 4°C. Tras la permeabilización se lavaron con Saponina 0.1%, BSA 0.5%. El anticuerpo primario contra las proteínas caspasa-3 activa, Bax y Bak, se añadió a cada condición a la dilución adecuada y se incubó a temperatura ambiente durante 20-30', después de los cuales se realizó otro lavado para incubar con el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína isotiocinato (FITC) durante 20-30' a temperatura ambiente y protegido de la luz. Finalmente, se realizó un último lavado y se analizaron las muestras en un FACScan (Becton Dickinson). 10000 células por muestra fueron adquiridas con el software Cell Quest y analizadas con el Paint-a-gate (Becton Dickinson).

6.2.- Obtención de extractos proteicos totales

Tras los diversos tratamientos a los que fueron sometidas las células, se obtuvo el pellet de células a partir de entre $5-20 \times 10^6$ células, al que se le añadió un tampón de lisis que

contenía Tris-HCl pH 6.8 80 mM, sodium dodecil sulfato (SDS) 2%, glicerol 10%, DTT 0.1 M. Se sonicaron los extractos durante 10".

Para la detección de la proteína hENT2 se realizaron extractos totales obtenidos lisando alrededor de 20×10^6 células con Tris-HCl pH 7.5 10 mM, Tritón X100 0.5%, Leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, Aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 1 mM. Se incubaron los extractos durante 30' en hielo, haciendo vórtex cada 5' aproximadamente. Finalmente se centrifugaron a 14000 rpm, 15' a 4°C, se obtuvo el sobrenadante y se descartó el pellet.

6.3.- Fraccionamiento subcelular: obtención de las fracciones citosólica, mitocondrial y de membrana

Para la detección de proteínas citosólicas, mitocondriales o de membrana de células de LLC-B, que se caracterizan por tener poco citoplasma, se utilizaron tampones de lisado más específicos:

- Obtención de extractos citosólicos: se lavaron las células para obtener el pellet y se lisaron con un tampón de Hepes 25 mM pH 7.5, KCl 100 mM, EGTA 2 mM, Tritón 1%, Aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 1 mM, Leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$. Se dejaron las muestras en hielo durante 20', haciendo vórtex cada 5' aproximadamente. Se centrifugaron los extractos a 2500 rpm, 10' a 4°C y, finalmente, se obtuvo el sobrenadante que contenía la fracción citosólica.
- Obtención de extractos mitocondriales (kit Apo-Alert (Clontech)): partiendo de 50×10^6 células, centrifugamos a 600xg durante 5' a 4°C. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet de células con 1 ml de ice-cold wash buffer 1X. Se centrifugaron las muestras a 600xg, 5' a 4°C y se volvió a decantar el sobrenadante. Se añadió un volumen de Fractionation buffer mix 1X y se incubó 10' en hielo. Se homogenizaron las muestras y se centrifugaron a 700xg, durante 10' a 4°C. El pellet resultante contenía la fracción nuclear, mientras que el sobrenadante se sometió a centrifugación a 10000xg, 25' a 4°C. El sobrenadante contenía la fracción citosólica y el pellet, que se diluyó con 100 μl de Fractionation buffer mix 1X, la fracción mitocondrial.
- Obtención de extractos de membrana: el pellet de células se lisó con Tris-HCl pH 7.5 20 mM, sacarosa 0.3 M, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, Leupeptina 0.01 mg/ml y Aprotinina 0.5%. Se sonicaron las muestras tres veces durante 10" cada vez y se centrifugaron a 14000 rpm, 30' a 4°C. El sobrenadante resultante era la fracción citosólica y los pellets conteniendo la fracción de membranas celulares se volvieron a lisar con un volumen del mismo tampón de lisis conteniendo 3mM EGTA más y 0.15% de Nonidet (NP-40), y se incubaron durante 30' a 4°C. Se volvieron a sonicar las muestras tres veces, 10" cada vez. Se añadió el mismo volumen del primer tampón de lisis y se centrifugaron las muestras a 14000 rpm, 30' a

4°C. Los pellets resultantes fueron lisados, finalmente, con Tris-HCl pH 6.8 80 mM, SDS 2%, glicerol 10% y DTT 0.1 M.

6.4.- Valoración de proteínas y electroforesis en geles de acrilamida

Una vez obtenidos los extractos de proteínas se determinó la concentración proteica de cada condición mediante los métodos Bradford o DC de Bio-Rad, según el tampón de lisis utilizado, leyendo las concentraciones en un espectrofotómetro a 595 o 750 nm, respectivamente. De 50 a 100 µg de proteína se cargaron con un tampón de carga en geles de acrilamida 10-15% dependiendo del tamaño de la proteína a estudiar. La electroforesis se efectuó en cubetas de Bio-Rad a 100 V durante 2-3 horas. Como marcador de peso molecular se utilizó el BenchmarkTM Prestained Protein Ladder (Gibco-BRL, Life Technologies). Las proteínas se electrotransfirieron a membranas PVDF Immobilon-P (Millipore) en un tampón de transferencia compuesto por Tris-HCl 250 mM pH 8.3, glicina 2 M y metanol 20%, a 250 mA durante toda la noche a 4°C.

6.5.- Análisis de proteínas por Western Blot

Las membranas PVDF se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% disuelta en Tris-HCl 20mM, NaCl 150 mM y 0.1% Tween-20 (TBST), durante 1 hora. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en tampón de bloqueo o en TBST con 1% albúmina y 0.5% leche en polvo. Las diluciones, el tiempo de incubación (de una hora a temperatura ambiente a toda la noche a 4°C, según la especificidad del anticuerpo) y los lavados se optimizaron para cada anticuerpo. Tras lavar las membranas para minimizar las uniones inespecíficas, se incubaron con un anticuerpo secundario combinado con horse radish peroxidasa, excitable con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham). La detección de las proteínas se realizó con el analizador de quimioluminiscencia LAS3000 y el software Image Gauge. Las valoraciones densitométricas de cada proteína se determinaron con el software Image Reader.

7.- Anticuerpos para inmunotransferencia y citometría de flujo

	Especie de origen, clon e isótopo	Concentración	Dilución anticuerpo secundario	Técnica	Proveedor
Caspasa-3	pc*, rabbit clon CPP32	1:1000	1:500	WB	BD-Pharmingen
Caspasa-3	pc*, rabbit clon C92-605	1:1000	1:10	Citometría	BD-Pharmingen
Caspasa-8	mc*, mouse Ab-3 (1-3), IgG1	1 µg/ml	1:1000	WB	Oncogene Research
Caspasa-9	pc*, rabbit	1:1000	1:500	WB	New England Biolabs, Inc.
p53	mc*, mouse Ab-2	1:100	1:1000	WB	Oncogene Research
ATM	pc*, rabbit Ab-3, IgG	2 µg/ml	1:500	WB	Oncogene Research
PARP	pc*, rabbit	1:1000	1:500	WB	Roche Diagnostics Mannheim
α-tubulina	mc*, mouse clon DM1A, IgG1κ	1:1000	1:2000	WB	Oncogene Research
Citocromo c	pc*, rabbit	1:100	1:500	WB	Clontech
Bcl-2	mc*, mouse clon 124, IgG1	1:1000	1:1000	WB	DAKO
Bax	pc*, rabbit	1:1000	1:500	WB	BD-Pharmingen
Bax	mc*, mouse clon 6A7, IgG1	1:1000	1:200	Citometría	Trevigen
Bak	mc*, mouse clon TC100, IgG2aκ	1:500	1:200	WB Citometría	Oncogene Research
Bcl-X _L	pc*, rabbit clon H-62, IgG	1:1000	1:500	WB	Sta Cruz Biotechnologies
Mcl-1	pc*, rabbit clon S-19, IgG	1:500	1:500	WB	Sta. Cruz Biotechnologies
XIAP	mc*, mouse 48, IgG1	1:250	1:1000	WB	Transduction Lab
Survivina	pc*, rabbit	1:1000	1:500	WB	Novus Biologicals
hENT1	pc*, rabbit	1:500	1:500	WB	Dr. Pastor (UB)
hENT2	pc*, rabbit	1:1000	1:500	WB	Dr. Pastor (UB)
MTAP	mc*, mouse clon 6.9.5, IgG1	1:1000	1:1000	WB	Salmedix

* pc: policlonal; mc: monoclonal

8.- Determinación de la viabilidad celular tras tratamiento

8.1.- Marcaje por Anexina V/ PI

Tras incubar las células a las condiciones deseadas y el tiempo necesario, se lavaron ($0.25-0.5 \times 10^6$ c) con un tampón de unión a anexina y se analizó la viabilidad celular por el mecanismo descrito en el apartado 2 de esta sección. De igual forma, se tomaron como células viables el porcentaje de células anexina -/ PI -.

8.2.- Detección de pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometría de flujo

$0.25-0.5 \times 10^6$ células se lavaron con PBS y se marcaron con 1 nM 3,3'-diethyloxacarbocianina iodido (DiOC₆[3]) (Molecular Probes) o con 1.5 mM 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodido (JC-1) (Molecular Probes). Se incubaron las muestras marcadas 30' a 37°C y protegidas de la luz. Se volvieron a lavar las muestras con PBS para eliminar el exceso de marcador y se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson). 10000 células por muestra fueron adquiridas con el software Cell Quest. La pérdida de viabilidad celular se determinó como la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). DiOC₆[3] es un fluorocromo que se incorpora en mitocondrias con elevado potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, cuando la mitocondria padece una pérdida de potencial de membrana, se produce una pérdida de este fluorocromo y, consecuentemente, una pérdida de la fluorescencia detectada por citometría de flujo. JC-1 es un marcador catiónico que se acumula en la membrana mitocondrial cuando ésta está intacta, emitiendo una fluorescencia del verde (525 nm) al rojo (590 nm). A elevados potenciales de membrana mitocondrial, JC-1 forma unos agregados llamados J-agregados que emiten en el canal del rojo. A medida que la mitocondria va sufriendo una pérdida de potencial de membrana mitocondrial, se forman menos J-agregados y se pierde intensidad de fluorescencia roja hacia la verde.

8.3.- Ensayos MTT

5×10^5 células primarias y 0.75×10^5 células de líneas celulares se incubaron en placas de 96 pocillos en ausencia o presencia de los fármacos a estudiar, en un volumen final de 100 μ l. Cada condición se incubó por triplicado. Transcurridas 48 horas, se añadió 5 mg/ml de bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT) a cada pocillo y se incubó durante 6 horas las células primarias y 2 horas las líneas celulares. Pasado este tiempo, el precipitado de azul de formazan formado por la oxidación del MTT se disolvió con 100 μ l de isopropanol:HCl 1M (24:1) y se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Bio-Rad). El resultado de esta determinación nos indica la citotoxicidad celular tanto por inhibición de proliferación como por muerte celular.

9.- Detección de la producción de ROS

0.25-0.5x10⁶ células se lavaron con PBS y se marcaron con 2 mM dihidroetidina (DHE) (Molecular Probes). Las muestras se incubaron durante 30' a 37°C y protegidas de la luz. Pasado este tiempo, se volvieron a lavar con PBS y se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson). 10000 células por muestra fueron adquiridas con el software Cell Quest. La producción de radicales libres de oxígeno se determinó como un aumento en el marcaje con DHE. DHE es un compuesto que se convierte en etidio fluorescente por acción de los radicales O₂⁻, generados en la mitocondria.

10.- Determinación del transporte de nucleósidos

El estudio del transporte al interior de las células de LLC-B y LCM se determinó mediante un método de filtración rápida. Las células se lavaron y resuspendieron en un tampón sódico conteniendo un radionucleósido. [5,6-³H]-uridina, [8-³H]-fludarabina y [5-³H]-gemcitabina se usaron a una concentración de 1µM y se incubaron 2 minutos para la uridina y 10 segundos para la fludarabina y la gemcitabina. Tras una centrifugación para separar las células del tampón de incubación se determinó la cantidad de transporte valorando las proteínas presentes en la mezcla transportada con el método Bradford (Bio-Rad). Para tratar de discriminar entre transporte sensible o insensible a NBTI, se preincubaron las células con 1 µM de NBTI.

11.- PCR cuantitativa

11.1.- Determinación de los niveles de expresión de mRNA de los transportadores de nucleósidos

Se obtuvo el RNA de cada línea celular y de los tumores de LCM mediante Ultraspec (Biotek laboratories). El RNA fue tratado con DNAsas para eliminar el DNA contaminante, y 1 µg se retrotranscribió a cDNA. El análisis de la expresión del mRNA de *hENT1*, *hENT2* y *GUS* (β-glucoronidasa), como control endógeno, se determinó mediante PCR cuantitativa con el equipo ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) y los siguientes oligonucleótidos y sonda:

hENT1	<p>Oligonucleótido sentido: 5'-GCA AAG GAG AGG AGC CAA GA-3'</p> <p>Oligonucleótido antisentido: 5'-TTC ATT GGT GGG CTG AGA GTT-3'</p> <p>Sonda: FAM-5'-CAG GCA AAG AGG AAT CTG GAG TTT CAG TCT C-3'-TAMRA</p>
hENT2	<p>Oligonucleótido sentido: 5'-CCC TGG ATC TTG ACC TGG AG-3'</p> <p>Oligonucleótido antisentido: 5'-GGT TTT CCT GGC TTC TGG G-3'</p> <p>Sonda: FAM-5'-AGG AGC CGG AAT CAG AGC CAG ATG A-3'-TAMRA</p>

11.2.- Análisis de la presencia de deleciones de p16 y MTAP

El DNA genómico de las líneas celulares y los tumores de LCM se obtuvo mediante tratamiento con proteinasa K/RNasa y extracción con fenol/cloroformo. Las deleciones de *p16* y *MTAP* se estudiaron mediante PCR cuantitativa con el equipo ABI Prism 7900 (Applied Biosystems). En este caso se usaron dos controles internos, la albúmina y la β -actina. Los valores de normalización de los genes estudiados respecto el gen control deben de estar próximos a 1 en los casos en los que no existe deleción, y próximos a 0 en casos con deleción homocigota. Teniendo en cuenta las posibles fuentes de contaminación por la presencia de células normales en las muestras estudiadas, consideramos como deleciones de *MTAP* o *p16* valores iguales o inferiores a 0.4. Los oligonucleótidos y sonda utilizados para cada caso se muestran a continuación:

p16	Oligonucleótido sentido: 5'-GGC TCT ACA CAA GCT TCC TTT CC-3' Oligonucleótido antisentido: 5'-TCA TGA CCT GCC AGA GAG AAC A-3' Sonda: FAM-5'-CCC CCA CCC TGG CTC TGA CCA-3'-TAMRA
MTAP	Oligonucleótido sentido: 5'-CAT GTG AAT ATC ACT GCC TCC-3' Oligonucleótido antisentido: 5'-CTT CTT TTC TCC TGG GCA GC-3' Sonda: FAM-5'-TGG CCC AGT TTT CTG TTT TAT TAC CAA GAC AT-3'-TAMRA

12.- Inmunohistoquímica

La detección de la expresión de la proteína MTAP por inmunohistoquímica se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal, clon 6.9.5, cedido por Salmedix Inc. (San Diego). Las secciones a teñir fueron desparafinadas mediante técnicas rutinarias. El desenmascaramiento antigénico se obtuvo incubando las secciones tisulares en olla a presión a 120°C durante 3 minutos, seguido de incubación con tripsina durante un minuto a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron tres veces en PBS y se bloqueó la actividad peroxidasa exógena mediante una incubación de 5 minutos con una solución hidrógeno-peróxido. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo primario (20 μ g/mL) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS e incubaron con el polímero del kit de detección EnVision Plus (DAKO) durante 30 minutos más, también a temperatura ambiente. Tras otros tres lavados se pasó a la visualización de la reacción.

La determinación del índice de proliferación también se obtuvo mediante marcaje inmunohistoquímico de Ki67 con la utilización del anticuerpo monoclonal MIB (Immunotech).

13.- Determinación de los niveles de ATP

Se realizó la detección de los niveles de ATP mediante la utilización del kit comercial de luminiscencia de Promega, Cell Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, que se basa en la detección de las células metabólicamente activas. Se incubaron las células en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µl de medio, durante 24 horas. Cada condición se incubó por triplicado. Pasado este tiempo, se traspasaron los 100 µl a tubos de 12mm de diámetro y se les añadió el mismo volumen de Cell Titer-Glo Reagent. Se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente para estabilizar la señal luminiscente y se leyeron en un luminómetro Berthold lumat LB 9507 con un tiempo de integración de 0.5 segundos.

14.- Inmunolocalización de proteínas intracelulares

Tras lavar las células con PBS (0.5×10^6), las fijamos con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) y incubamos a temperatura ambiente (RT) durante 20 min. Volvemos a lavar con PBS y pasamos las células a los cubre-objetos tratados con polilisina, donde las dejamos durante toda la noche para facilitar la fijación de las células sobre los cubres. Aspiramos el sobrenadante y añadimos unos 200 µl de saponina 0.1% - 10% suero de cabra (o FCS) y incubamos durante 10 min a RT. Aspiramos el sobrenadante y incubamos 30 min con 150 µl de una dilución del anticuerpo primario en saponina 0.1% - 10% suero de cabra (o FCS). Pasado el tiempo de incubación, realizamos dos lavados con 1 ml de tampón de lavado (saponina 0.03%), aspiramos el sobrenadante y incubamos con una dilución que contiene el anticuerpo secundario, durante 30 min y protegido de la luz. Finalmente, tras dos nuevos lavados, secamos los cubres y los montamos sobre porta-objetos que contienen 5 µl de medio de montaje Vectashild+0.5 µg/ml PI (yoduro de propidio). Las muestras se analizan inmediatamente en un microscopio de fluorescencia o se guardan a 4°C, protegidas de la luz hasta ser analizadas.