



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio de las interacciones entre proteínas anti- y proapoptóticas de la familia Bcl-2 en células vivas mediante BiFC

Autor/es

Inés Serrano Sevilla

Director/es

Isabel Marzo Rubio
José Alberto Carrodegua Villar

Facultad de Ciencias / Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
2014

Índice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS	2
2.1.1. Vías de señalización de la apoptosis.....	2
2.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2.....	3
2.1.3. Modelos de activación de Bax y Bak.....	4
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1. BIFC (Complementación de Fluorescencia Bimolecular).....	7
4.2. CULTIVOS CELULARES.....	7
4.2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares.	7
4.2.2. Contaje y determinación de la viabilidad celular.	8
4.2.3. Congelación de las líneas celulares.....	8
4.3. CLONAJE DE LA FUSIÓN PUMA-VC EN EL VECTOR pIND	9
4.3.1. Diseño de oligonucleótidos.....	9
4.3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).	10
4.3.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.	10
4.3.4. Purificación de fragmentos de DNA.....	11
4.3.5. Cuantificación de DNA.....	11
4.3.6. Digestión de plásmidos e insertos de DNA.	11
4.3.7. Ligación inserto-plásmido.....	12
4.3.8. Transformación de E.coli por choque térmico.	12
4.3.9. Miniprep.	13
4.4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.....	13
4.5. ENSAYO DE INDUCCIÓN CON PONASTERONA.....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Electroforesis de comprobación de PCR: inserto PUMA VC amplificado a partir de pBiFC.....	16
5.2. Comprobación del plásmido pIND tras la transformación (digestión, electroforesis y secuenciación).....	17
5.3. Selección con antibióticos de las líneas estables HeLa Bcl-X _L PUMA VC y HeLa Mcl-1 PUMA VC.....	18
5.4. Ensayo de inducción con ponasterona	20
6. CONCLUSIONES	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. RESUMEN

La proteína PUMA ha sido propuesta como un importante regulador en la vía mitocondrial de la apoptosis. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual PUMA y otras proteínas sólo-BH3 regulan la apoptosis, especialmente cómo activan a las proteínas Bax y Bak, es todavía controvertido. Estudios previos han analizado las interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 *in vitro*. En este estudio, mediante la técnica BiFC, fuimos capaces de crear dos líneas celulares estables de HeLa con PUMA y Bcl-x_L y con PUMA y Mcl-1 con el fin de investigar las interacciones entre estas proteínas apoptóticas y antiapoptóticas directamente en células humanas vivas. Nuestros resultados indican que estas interacciones también se producen en células vivas, siendo más fuerte la interacción entre PUMA y Bcl-x_L que entre PUMA y Mcl-1.

p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) has been proposed as an important regulator in the mitochondrial pathway of apoptosis. However, the molecular mechanism through which PUMA and other BH3-only proteins regulate apoptosis, especially how they activate Bax and Bak proteins is still controversial. Previous studies have analyzed the interactions between protein members of the Bcl-2 family *in vitro*. In this study, by using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) technique we were able to create two HeLa stable cell lines with PUMA and Bcl-x_L and with PUMA and Mcl-1 in order to investigate the interactions between these proapoptotic and antiapoptotic proteins directly in living human cells. Our results show that these interactions also take place in living cells, with the interaction between PUMA and Bcl-x_L being stronger than between PUMA and Mcl-1.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS

La “muerte celular programada” o apoptosis hace referencia a situaciones en las cuales las células activan un programa letal que se encuentra codificado en el genoma, que en un momento preciso, selecciona determinadas células para morir.

La apoptosis tiene funciones muy importantes, como la eliminación de células dañadas o infectadas por un virus, la regulación del sistema inmunitario, el desarrollo de tejidos, la homeostasis... (Elmore, 2007). Una desregulación de la apoptosis puede dar lugar al desarrollo de cáncer, al alterarse el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular.

Durante la apoptosis el DNA cromosómico es fragmentado y la cromatina se condensa. Los orgánulos celulares no sufren modificaciones estructurales importantes y la membrana se mantiene intacta hasta las últimas etapas del proceso de muerte. A continuación, la célula encoge y se rompe en fragmentos envueltos por membrana denominados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por células vecinas sin causar inflamación (Cooper et al., 2010).

2.1.1. Vías de señalización de la apoptosis.

Existen dos vías de señalización de la apoptosis: extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca responde al estímulo de los “ligandos mortales” (Fulda et al., 2006), reconocidos por receptores de membrana de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Por otra parte, la vía intrínseca es estimulada por el estrés celular, que puede deberse a múltiples causas: daños al DNA, infecciones virales, agotamiento de factores de crecimiento... (Cooper et al., 2010). La vía intrínseca se caracteriza también por la intervención de las proteínas de la familia Bcl-2, que regulan la permeabilización de las mitocondrias, la liberación al citosol de factores proapoptóticos como el citocromo C y la activación de la caspasa 9. Precisamente este trabajo se basa en el estudio de las interacciones entre varias proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2: PUMA, Bcl-x_L y Mcl-1.

2.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 se encargan de regular la fase de inducción de la apoptosis por la vía intrínseca, controlando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la fase posterior de activación de caspasas. Esta familia incluye miembros anti- y proapoptóticos que comparten al menos uno de los cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1 a BH4) (Vela et al., 2013). No es la cantidad absoluta, sino el balance entre las proteínas pro- y antiapoptóticas lo que determina si se va a iniciar o no la apoptosis (Sosa, 2012).

Las proteínas Bcl-2 se pueden clasificar en 3 grupos, atendiendo a su estructura y función:

- **Proteínas antiapoptóticas:** frenan la apoptosis impidiendo la formación de los poros mitocondriales y la liberación de citocromo c al citosol. Casi todas presentan los cuatro dominios BH. Destacan las proteínas Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w y Bfl-1/A.
- **Proteínas proapoptóticas multidominio:** presentan en su estructura los dominios BH1, BH2 y BH3 y en condiciones normales se encuentran en forma de monómeros inactivos. Las más estudiadas son Bak y Bax. Al ser activadas oligomerizan para generar poros en la membrana mitocondrial externa, permitiendo la salida de citocromo C. Sin embargo, las interacciones que ocurren entre las proteínas de la familia Bcl-2 y el mecanismo por el que Bak y Bax se activan son cuestiones que continúan siendo controvertidas. En el siguiente apartado se explican los modelos de activación propuestos.
- **Proteínas proapoptóticas “sólo-BH3”:** las proteínas de este grupo sólo comparten con el resto de miembros de la familia el dominio BH3. Las proteínas principales son Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, PUMA y Noxa. Controlan, mediante interacciones con los miembros antiapoptóticos, la activación de las proteínas efectoras Bax y Bak para que lleven a cabo la permeabilización de las membranas mitocondriales.

Se considera que PUMA es la proteína que media de manera principal la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño en el DNA. La expresión de PUMA es baja en condiciones normales, pero se induce rápidamente en respuesta a diferentes situaciones de estrés celular. PUMA es dirigida a la mitocondria por un dominio hidrofóbico en su extremo C-terminal (Nakano et al., 2001).

2.1.3. Modelos de activación de Bax y Bak.

Todavía no se ha conseguido esclarecer por completo el mecanismo molecular de la apoptosis mitocondrial. Inicialmente se propusieron dos modelos (Figura 1) mediante los cuales las proteínas Bak y Bax (proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2) se activan para llevar a cabo la permeabilización de la mitocondria. Según el **modelo indirecto**, Bax y Bak permanecen bloqueadas por proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, que son desplazadas por proteínas sólo-BH3 cuando se inicia la apoptosis. El **modelo directo** clasifica las proteínas sólo-BH3 en dos grupos: sensibilizadoras (por ejemplo Bad y Bik), cuya expresión es inducida por el estímulo apoptótico, que se unen a las proteínas antiapoptóticas, quedando así Bak y Bax libres; y activadoras (PUMA, Bim y Bid), que se unen y activan directamente a Bak y a Bax, una vez que las proteínas antiapoptóticas las liberan. Según este modelo, las proteínas antiapoptóticas presentarían una mayor afinidad por las proteínas sensibilizadoras que por las activadoras y por Bak y Bax (Villunger et al., 2011).

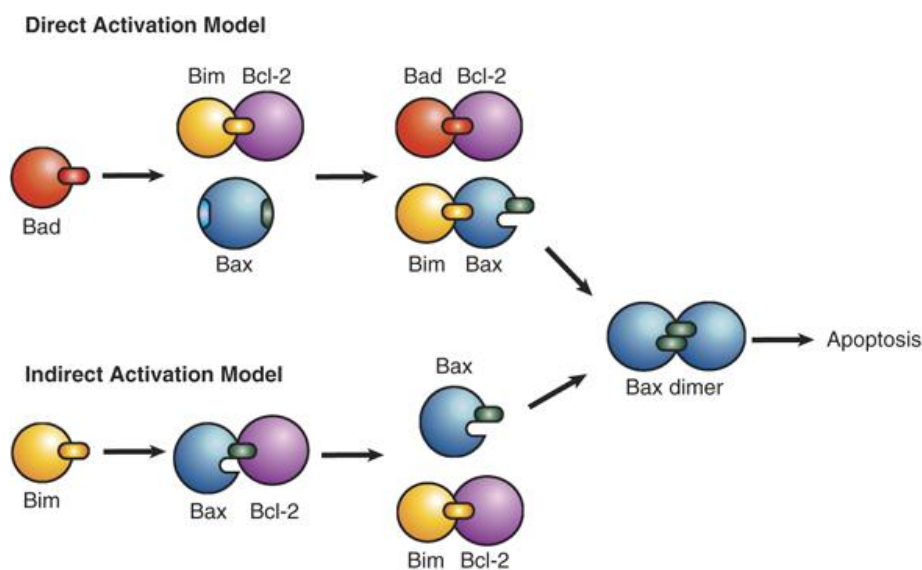


Figura 1. Modelos directo e indirecto de activación de Bax y Bak. Bim representa a las proteínas sólo-BH3 activadoras, entre las que se encuentra PUMA.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La mayoría de los trabajos publicados que abordan el estudio de interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 están basados en técnicas *in vitro* y usan péptidos derivados del dominio BH3 de estas proteínas, no las proteínas enteras. Recientemente se ha demostrado en este laboratorio, mediante la técnica de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC) en células intactas, la existencia de interacción directa entre PUMA, Bim o Noxa y Bak/Bax (Vela et al., 2013). Los resultados descritos por Vela *et al.* concuerdan con un modelo mixto de activación Bak/Bax (Figura 2), que reúne las características de los modelos directo e indirecto.

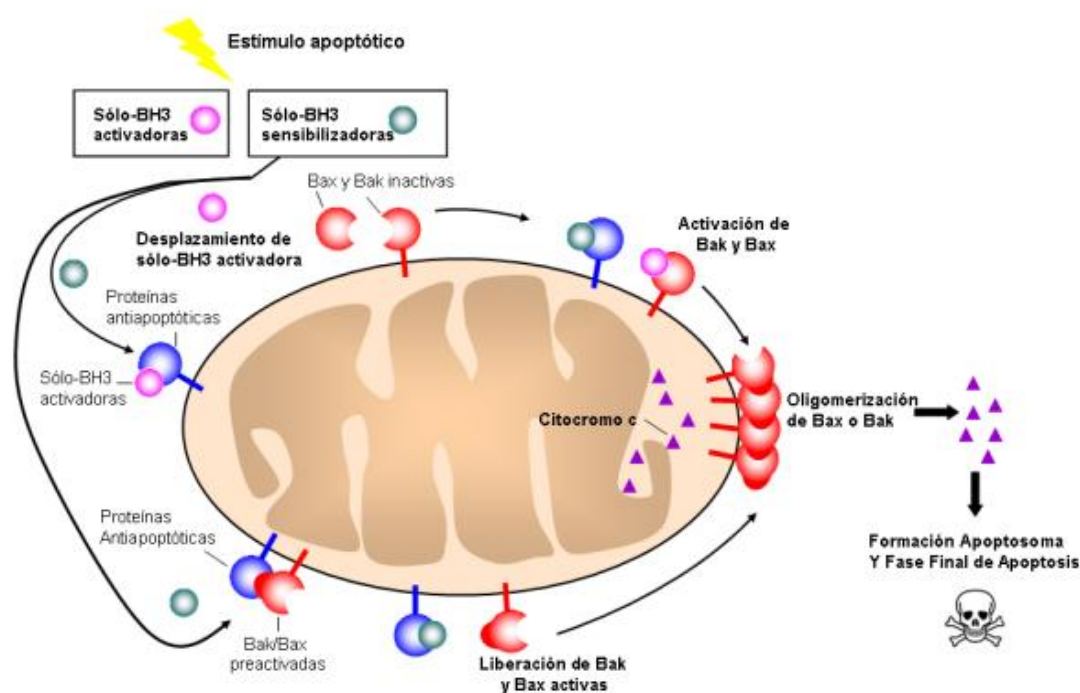


Figura 2. Modelo mixto de activación de Bak y Bax. La inducción o activación de proteínas "sólo-BH3" por determinados estímulos apoptóticos libera de su unión con miembros antiapoptóticos a moléculas de Bak y Bax preactivadas y a proteínas "sólo-BH3" activadoras. Las moléculas de proteínas "sólo-BH3" activadoras van a poder activar a más moléculas de Bak y Bax mediante interacción directa con ellas.

Otros estudios anteriores del laboratorio confirmaron asimismo la interacción entre PUMA y Bcl-x_L y entre PUMA y Mcl-1. En estos estudios se cotransfectaron dos vectores pBiFC al mismo tiempo, uno con PUMA y otro con Bcl-x_L o Mcl-1 y en los días siguientes se analizaron las interacciones. Este tipo de transfección se denomina transitoria porque el ADN exógeno se mantiene en la célula en forma extracromosómica y se expresa sólo durante un tiempo de entre 1 y 5 días. Después de este tiempo la expresión disminuye y se pierde porque el ADN termina degradándose.

La novedad de este trabajo con respecto a los anteriores consiste en realizar el estudio de las interacciones no sólo *in vivo*, sino mediante una mayor aproximación a lo que realmente ocurre durante la apoptosis. Las proteínas proapoptóticas, como PUMA, presentan niveles de expresión basal muy bajos. La llegada del estímulo apoptótico es lo que induce un aumento en su expresión. La transfección con plásmidos pBiFC no era un método muy representativo porque estos plásmidos no se integran en el genoma y son de expresión constitutiva. En cambio, el plásmido pIND sí que tiene la capacidad de integrarse y además puede ser inducido mediante la adición de ponasterona. Esto nos permite integrar el cDNA de PUMA en el genoma y simular el estímulo apoptótico mediante la inducción con ponasterona. Por otro lado, las proteínas antiapoptóticas Bcl-x_L y Mcl-1 sí que se expresan constitutivamente en ausencia de estímulo apoptótico y se establecieron previamente (Oscar Gonzalo) líneas estables que sobreexpresaban las fusiones VN- Bcl-x_L o VC-Mcl-1 utilizando el vector retroviral pBABE, que incluye un promotor constitutivo, para integrar su cDNA en el genoma.

Sobre estas líneas se planteó llevar a cabo la transfección con el vector pIND que contiene la proteína de fusión proapoptótica PUMA VC para la generación de nuevas líneas celulares estables con las proteínas de fusión pro- y antiapoptóticas integradas en el genoma.

Los objetivos concretos del trabajo han sido:

- Clonaje de la proteína de fusión proapoptótica PUMA VC en el vector inducible pIND.
- Transfección de células HeLa Mcl-1 y HeLa Bcl-x_L con pIND-PUMA VC y selección con antibióticos.
- Inducción de pIND-PUMA VC con ponasterona.
- Estudio de las interacciones entre PUMA y las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-x_L mediante microscopía de fluorescencia, con las líneas celulares y vectores indicados en los puntos anteriores.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. BiFC (Complementación de Fluorescencia Bimolecular)

La Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC) permite la visualización directa de las interacciones de proteínas en las células vivas. Se basa en la asociación entre dos fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente cuando se aproximan entre sí por una interacción entre las proteínas fusionadas a los fragmentos (Kerppola, 2008). Cada proteína lleva fusionado uno de los fragmentos de la proteína fluorescente, que por sí solos no emiten fluorescencia. Si realmente hay interacción entre las dos proteínas objeto de estudio, los fragmentos de la proteína fluorescente estarán lo suficientemente próximos como para interactuar y emitir fluorescencia. Además, esta técnica permite estudiar interacciones débiles o transitorias, difícilmente detectadas por otras técnicas. Sin embargo, una de sus limitaciones es la irreversibilidad de las interacciones una vez que se forma el complejo entre los dos fragmentos de la proteína fluorescente. Por ello, esta técnica no es apropiada para estudiar la dinámica de las interacciones.

En este caso se ha elegido la proteína Venus como proteína fluorescente. Su fragmento N-terminal (VN) ha sido fusionado tanto delante de la proteína Bcl-x_L como de Mcl-1. El fragmento C-terminal de Venus (VC) ha sido fusionado detrás de la proteína PUMA. De esta forma se obtienen tres proteínas quiméricas: VN Bcl-X_L, VN Mcl-1 y PUMA VC.

4.2. CULTIVOS CELULARES

4.2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares.

La línea celular con la que se ha trabajado ha sido la línea HeLa (adenocarcinoma de cérvix), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, USA). También se han utilizado las nuevas líneas estables HeLa Bcl-x_L y HeLa Mcl-1 para, a partir de ellas, crear las líneas estables HeLa Bcl-x_L PUMA VC y HeLa Mcl-1 PUMA VC.

Al tratarse de células adherentes, se cultivó en medio DMEM (GIBCO) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma), L-glutamina (GIBCO) 2mM y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomicina, 100µg/ml, PAN Biotech GmbH, Madrid).

Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado (Heraeus Cell, Alemania), a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂.

Todas las manipulaciones con las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar, España) y en condiciones estériles. El material usado, de vidrio y plástico, se esterilizó previamente en un autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta, España) durante 20 minutos.

4.2.2. Contaje y determinación de la viabilidad celular.

Esta técnica se basa en la utilización de un compuesto coloreado, el Trypan Blue, para medir la viabilidad celular. Este compuesto no es permeable en células cuya membrana está intacta (células viables) y sí es capaz de penetrar en las células muertas que tienen la membrana celular dañada. Así pues, en el microscopio óptico se observan las células muertas teñidas de azul y las vivas de un color blanco-amarillento brillante.

Para el contaje se mezclaron 50 µl de suspensión celular, previamente homogeneizada, y 50 µl del colorante azul Trypan (Sigma, Madrid) que se depositaron sobre una cámara Neubauer y se observaron al microscopio óptico (Optiphot, Nikon).

Cálculo de la densidad celular:
$$\frac{n^{\circ} \text{ células viables} \times \text{dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

4.2.3. Congelación de las líneas celulares.

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en N₂ líquido. Se congelaron aproximadamente 5 x 10⁶ células en 500µl de medio completo suplementado con 10% de DMSO (Sigma, Madrid).

4.3. CLONAJE DE LA FUSIÓN PUMA-VC EN EL VECTOR pIND

4.3.1. Diseño de oligonucleótidos.

Gracias a trabajos previos, disponíamos del plásmido pBiFC con la proteína de fusión PUMA VC insertada. Nuestro objetivo era amplificar esta proteína utilizando como DNA molde el plásmido BiFC y clonarla en el plásmido inducible pIND. Las secuencias de los plásmidos pBiFC PUMA VC y pIND se incluyen en los Anexos I y II, respectivamente.

Los oligonucleótidos para la PCR de amplificación fueron diseñados con ayuda del programa Oligo 7. Para el clonaje se eligieron las enzimas de restricción Eco RI y Xba I (TAKARA), tras asegurarnos de que sus secuencias de restricción no estaban presentes en la secuencia de la proteína. En el oligonucleótido directo no hizo falta añadir la secuencia de restricción de Eco RI porque ya estaba incluida en el plásmido pBiFC, justo antes del comienzo de PUMA (con dos guaninas entre ellas para que el marco de lectura fuese el correcto). En el oligonucleótido reverso sí que fue necesario añadir la secuencia de restricción de Xba I. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes:

PUMA VC DIRECTO: 5' GAC TCG **GAA TTC** **GGA TGG CCC GCG CAC GCC** AG 3'

PUMA VC REVERSO: 5' GAC TCG **TCT AGA** **TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG** AG 3'

<i>rojo</i>	<i>sitios de restricción</i>	<i>azul</i>	<i>inicio de la proteína PUMA VC</i>
<i>morado</i>	<i>nucleótidos para completar el marco de lectura</i>	<i>verde</i>	<i>final de la proteína PUMA VC</i>
<i>negro</i>	<i>Bases aleatorias para facilitar la unión de la enzima de restricción</i>		

Se compraron los oligonucleótidos liofilizados, por lo que se preparó una alícuota a 10µM disolviéndolos con Agua MilliQ.

4.3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).

Con los oligonucleótidos diseñados según el apartado anterior y utilizando como molde el plásmido pBiFC se amplificó el cDNA de la proteína de fusión PUMA VC.

En esta PCR es muy importante no introducir mutaciones porque la secuencia que se amplifica es con la que se va a trabajar durante todo el proyecto. Por ello se utilizó una enzima de alta fidelidad: AccuPrime™ Pfx SuperMix (Invitrogen).

Se preparó la mezcla de reacción utilizando 100 ng de pBiFC, los oligonucleótidos directo e indirecto a 0,2 μM, AccuPrime™ Pfx SuperMix y H₂O milliQ estéril.

Se llevó a cabo la PCR según el siguiente programa:

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Hot Start	95 °C	5'	1
Desnaturalización	95 °C	30''	35
Hibridación	66,5°C	30''	
Extensión	72°C	1'	
Extensión final	72°C	7'	1

4.3.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

El gel de agarosa al 10% se preparó fundiendo 0,3 g de agarosa (Sigma) en 30 ml de tampón. Se utilizó el tampón TAE (Tampón Tris-Acetato EDTA, Gibco) cuando después de la electroforesis la muestra debía ser purificada y reutilizada. Sin embargo, cuando la muestra sólo se iba a analizar pero no a reutilizar se utilizó el tampón TBE (0,045 M Tris-borato, 1 mM de EDTA). A esta mezcla se añadió SYBR-safe (1:10000, Invitrogen) para teñir el DNA y se vertió en los moldes para su gelificación.

A la muestra de DNA se añadió el tampón de carga 10X (Takara). Se utilizaron los marcadores de peso molecular de 1 Kb y de 100 pb (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 90 V, 400 mA, durante 30 minutos. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad).

En los geles de purificación, la muestra era cargada en dos pocillos: en uno se cargaba una pequeña cantidad (unos 5 μL), que sería expuesta a la radiación ultravioleta para determinar la altura de la banda de interés, mientras que en el otro se cargaba el resto de la muestra, cuya banda sería recortada a la altura indicada por el otro carril sin necesidad de ser expuesta a la radiación ultravioleta, evitando así las posibles alteraciones y mutaciones del DNA.

4.3.4. Purificación de fragmentos de DNA.

Para la purificación de DNA tras una electroforesis, se recortó con un bisturí estéril la banda de DNA de interés y se utilizó el Kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Amersham).

En los casos de purificación de DNA tras una PCR o una digestión se utilizó directamente el mismo kit citado anteriormente.

4.3.5. Cuantificación de DNA.

La medición de la concentración de DNA de la muestra se realizó mediante alícuotas de 2 μL en el espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare, Amersham).

4.3.6. Digestión de plásmidos e insertos de DNA.

Es necesario digerir tanto el plásmido como el producto de PCR a insertar para generar los extremos complementarios que se unirán durante la ligación.

Las enzimas de restricción utilizadas para este propósito fueron: 1.5 U/ μL de EcoRI (Takara) y 1.5 U/ μL de XbaI (Takara). También se utilizaron el Tampón de Digestión M 10X (Takara), que es el tampón óptimo para la combinación de estas enzimas, BSA 10X (Takara) (necesaria para XbaI) y 12 μL del DNA a digerir (PUMA VC o plásmido pIND), en un volumen final de 20 μL .

Para minimizar la llamada “actividad estrella” de EcoRI (puede cortar inespecíficamente si se deja actuar demasiado tiempo), primero se añadió XbaI y se incubó 1 hora y media a 37°C y después se añadió EcoRI, dejando la digestión otra hora y media a 37°C.

Una vez completada la digestión, se llevó a cabo la purificación y cuantificación (ver apartados anteriores) tanto de los plásmidos linearizados como de los insertos para proceder a la ligación de los mismos.

Más adelante, se volvió a utilizar la técnica de digestión para comprobar que el plásmido pIND había integrado bien el inserto, tras su amplificación en bacterias *E. coli*. En este caso se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI (15U/ μ L) y Bgl II (10U/ μ L), cuyas secuencias de restricción delimitan la secuencia de PUMA (sin el linker ni el fragmento de Venus). Las proporciones de los reactivos en la mezcla de digestión fueron las utilizadas anteriormente, pero en un volumen final de 10 μ L.

4.3.7. Ligación inserto-plásmido.

La relación molar de vector:inserto empleada fue de 1:5. Partiendo de 100 ng de vector pIND se calculó la cantidad necesaria de inserto PUMA VC (100 ng). Además se añadió Tampón de T4 DNA ligasa 10X (Thermo), 0.2 μ L de T4 DNA ligasa (Thermo) y H₂O milliQ estéril hasta 20 μ l. Se dejó incubar la mezcla de ligación una hora a 22°C.

4.3.8. Transformación de E.coli por choque térmico.

Nos interesa introducir el vector con el inserto en células bacterianas para que se replique y así obtener gran cantidad de copias en poco tiempo.

Se descongeló una alícuota de bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue en hielo. Se les añadió la mezcla de ligación y se les aplicó el choque térmico:

- 20 minutos en hielo
- 1 minuto y 30 segundos en el baño húmedo a 42 °C
- 2 minutos en hielo

Después se diluyó cada alícuota con 1 ml de LB estéril (preparado a partir de: triptona (Scharlau), extracto de levaduras (Scharlau) y NaCl (Sigma)) y se incubaron 15 minutos a 37° en la estufa. Se centrifugó el tubo durante 5 minutos a 2500 rpm, se descartó parte del sobrenadante y se resuspendieron las bacterias ya transformadas para sembrarse en una

placa Petri de LB-agar con Ampicilina (el vector pIND incluye un gen de resistencia a Ampicilina). Las placas se incubaron a 37° C en la estufa durante 24 horas.

Una vez hubieron crecido las colonias en la placa, se seleccionaron 4 de ellas, se picaron con un asa de cultivo esterilizada y se transfirió cada una a un tubo estéril con 10 ml de LB suplementado con 20 µL de Ampicilina (Sigma). La suspensión bacteriana se incubó a 37° C durante 16 horas en el agitador orbital.

4.3.9. Miniprep.

Para extraer y aislar el plásmido de las bacterias transformadas, se siguieron las instrucciones del Kit NucleoSpin Plasmid EasyPure (GE Healthcare, Amersham). El volumen de cultivo de partida fue de 3 ml y la elución final se realizó con 50 µl del Tampón de Elución del Kit.

4.4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

La transfección con pIND PUMA VC se llevó a cabo en dos líneas celulares estables:

1. HeLa Bcl-X_L
2. HeLa Mcl-1

El proceso se desarrolló en tres etapas:

1. **Siembra de células.** En una placa de 12 pocillos se sembraron cuatro pocillos con 10⁵ células HeLa Bcl-X_L en cada uno, y otros cuatro con células HeLa Mcl-1. Se utilizó 1 mL por pocillo de medio OPTIMEM (Gibco) sin antibióticos para evitar la posible toxicidad inducida por éstos al aumentar la permeabilidad de las células durante la transfección. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.
2. **Transfección.** Se utilizó LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), reactivo basado en lípidos catiónicos. Las relaciones de las cantidades utilizadas, anteriormente optimizadas, fueron:

10⁵ células (sembradas 24h antes) → transfección de 300 ng de cada vector

1 µg DNA transfectado → 3 µL Lipofectamina

Los vectores transfectados fueron pIND PUMA VC y pVgRXR. Este último codifica las proteínas necesarias para la inducción de pIND: VgEcR y RXR. Estas proteínas forman el complejo activador de la transcripción que se une al elemento de respuesta E/GRE del pIND. Sin embargo, para el inicio de la transcripción es necesaria la molécula coactivadora ponasterona A (Figura 3).

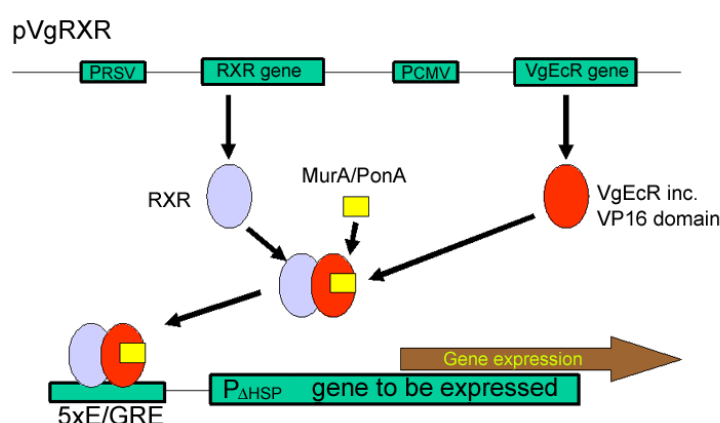


Figura 3. Sistema de pVgRXR para la inducción de la transcripción de pIND.

Se mezclaron los vectores con la Lipofectamina en 200 µL de medio OPTIMEM y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió la mezcla de transfección a uno de los pocillos sembrados el día anterior (uno de HeLa Bcl-x_L y otro de HeLa Mcl-1).

3. **Selección con antibióticos.** Nuestro objetivo era crear una línea estable de células HeLa Bcl-x_L PUMA VC y otra de HeLa Mcl-1 PUMA VC. EL vector pIND lleva un gen de resistencia a Geneticina, mientras que el vector pVgRXR aporta resistencia a Zeocina. Para ello, se suplementó el medio con estos dos antibióticos con el fin de seleccionar las células que hayan incorporado ambos vectores, ya que el resto de células morirán.

Se añadió antibiótico en los cuatro pocillos de cada línea celular: uno de ellos contenía las células transfectadas y los otros tres sin transfectar fueron utilizados como control para determinar en qué momento los antibióticos llegaban a matar a todas las células. De esta manera, consideramos que en el momento en que las células de los pocillos no

transfectados estuvieran todas muertas, las células que continuaran vivas en el pocillo de las transfectadas debían haber incorporado en su genoma los vectores pIND y pVgRXXR.

En un control se añadió Geneticina a 500µg/ml (GIBCO), en otro Zeocina a 300µg/ml (Invitrogen) y en el tercero, ambos.

4.5. ENSAYO DE INDUCCIÓN CON PONAISTERONA

Paralelamente a la selección con antibióticos, que requiere un periodo de entre dos y tres semanas, se transfectaron células HeLa Bcl-x_L y HeLa Mcl-1 con pIND PUMA VC. En este caso, además de los vectores pIND y pVgRXXR, también se transfectó el plásmido transitorio pAL2-myc. Este último plásmido contiene el cDNA de la Proteína Fluorescente Roja (mRFP), la cual se expresa y emite fluorescencia en las células transfectadas. De esta forma se puede estimar la eficiencia de la transfección.

En una placa de 48 pocillos se sembraron 2 pocillos con 2,5x10⁴ células HeLa Bcl-x_L y otros 2 con HeLa Mcl-1 a la misma densidad. Todos fueron transfectados con los vectores 24h después. En experimentos anteriores se había observado una alta mortalidad celular al transfectar con proteínas proapoptóticas (Vela, 2012). La pérdida acelerada de la integridad celular dificultaba la visualización de los complejos formados por BiFC. Para retardar el proceso de apoptosis, las células fueron tratadas con el inhibidor general de caspasas, zVAD-fmk (40µM). Además, para evitar que los niveles de expresión fueran muy elevados y se produjeran interacciones no específicas, se redujo la cantidad de vectores transfectados a la mitad (ahora 1,5 µg/10⁶ células).

En este ensayo, las células se trataron con la molécula inductora del sistema pVgRXXR/ pIND: ponasterona A (Sigma). Para cada línea celular, en uno de los pocillos se añadió ponasterona 10 µM y en el otro no (control negativo), el mismo día que se realizó la transfección.

Durante una semana se hizo un seguimiento de las células con el microscopio de fluorescencia para ver la evolución de la transfección, de la inducción de pIND, y de las interacciones proteicas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Electroforesis de comprobación de PCR: inserto PUMA VC amplificado a partir de pBiFC.

El cDNA de la fusión PUMA-VC tiene un tamaño de 929 pb. Por lo tanto, la PCR con los oligonucleótidos diseñados para extraer este cDNA del vector pBiFC debería producir un fragmento de dicho tamaño. Tras la PCR se analizó el producto mediante electroforesis (Figura 4).

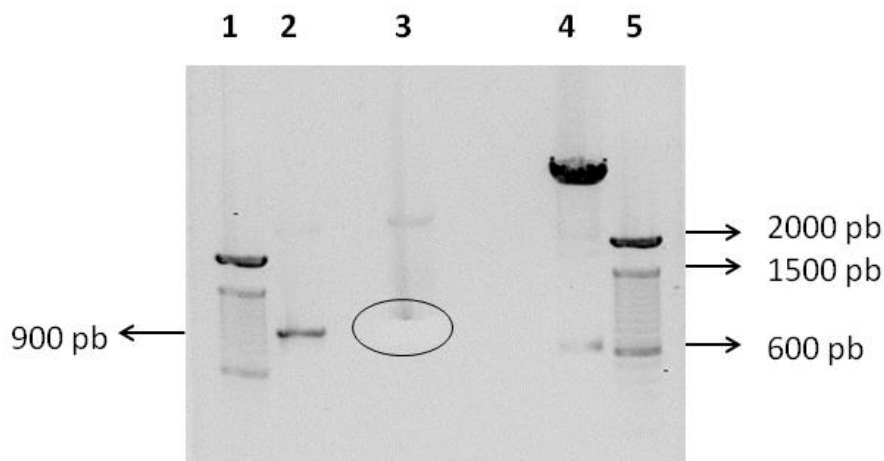


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos resultantes de PCR o de digestión. (1,5) Marcador de peso molecular 100 pb; (2) PUMA VC amplificada a partir de pBiFC (5 µL); (3) PUMA VC amplificada a partir de pBiFC (20 µL), banda recortada; (4) digestión de pBiFC con EcoRI y BglII.

La banda del cDNA de la proteína de fusión PUMA VC correspondía al peso molecular esperado: 900 pb. Se continuó con los siguientes pasos: recortar y purificar la banda (en esta foto la banda de interés ya había sido recortada).

Asimismo, para comprobar que no estaba alterado el tamaño de PUMA en el DNA molde, se realizó una digestión de pBiFC PUMA VC con las enzimas de restricción EcoRI (corta al inicio de la secuencia de PUMA) y BglII (corta al final de PUMA). Tras la electroforesis se observan dos bandas: la superior corresponde al plásmido digerido (aproximadamente 4000 pb) y la inferior al fragmento de PUMA digerido, de 600 pb (según lo esperado).

5.2. Comprobación del plásmido pIND tras la transformación (digestión, electroforesis y secuenciación).

Tras la ligación, es importante comprobar que el plásmido ha integrado bien el inserto antes de continuar con los siguientes experimentos. Se comprueba mediante dos procedimientos independientes:

- 1) Primero en el laboratorio, mediante la digestión y electroforesis del plásmido, para verificar que el peso molecular del inserto, del plásmido y de la suma de los dos (fracción sin digerir) es el esperado.

Se aisló el plásmido pIND de cuatro colonias bacterianas independientes. Para la digestión se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y Bgl II, cuyas secuencias de restricción delimitan la secuencia de PUMA (sin el linker ni el fragmento de Venus), y los productos se cargaron en un gel de agarosa. El peso esperado para PUMA corresponde a 600pb y para el resto del plásmido pIND a unas 5Kb.

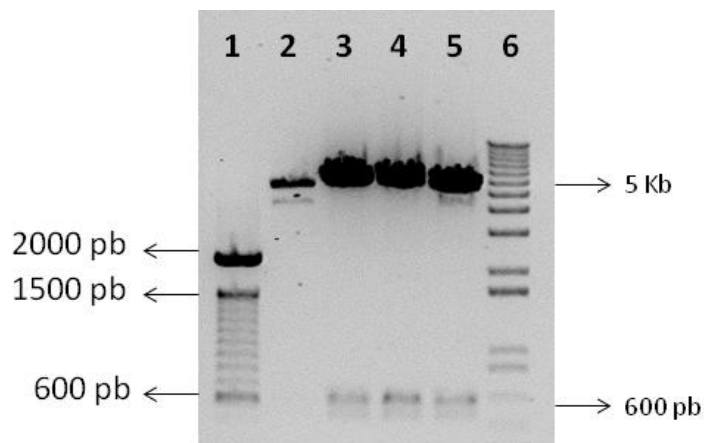


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión de pIND con EcoRI y BglII tras la transformación. (1) Marcador de peso molecular 100 pb; (2) Colonia 1; (3) Colonia 2; (4) Colonia 3; (5) Colonia 4; (6) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Como se observa en la Figura 5, la colonia 1 no contenía el inserto (no presenta la banda de 600 pb).

Las colonias 2, 3 y 4 presentan una banda de unas 5 Kb que corresponde al plásmido pIND digerido, y una banda de 600 pb que corresponde al fragmento PUMA digerido.

- 2) Mediante secuenciación para verificar que no hay errores en la secuencia. Una vez comprobado que el plásmido contenía un inserto del tamaño adecuado, se envió el plásmido pIND aislado de las colonias 2, 3 y 4, junto con los oligonucleótidos iniciales directo y reverso, al servicio de secuenciación del CNIO (Madrid). Las

secuencias de PUMA VC recibidas del Servicio de Secuenciación del CNIO se incluyen en el Anexo III.

El análisis de estas secuencias reveló que el inserto de la colonia 3 presenta algunas mutaciones y bases desplazadas. En la colonia 2 se detectaron errores en la región inicial de PUMA. La secuencia de la colonia 4 incluye el cDNA de PUMA VC completo y sin mutaciones. Se eligió esta colonia para proseguir los experimentos.

5.3. Selección con antibióticos de las líneas estables HeLa Bcl-x_L PUMA VC y HeLa Mcl-1 PUMA VC

Tras la transfección de las líneas celulares HeLa Bcl-x_L y HeLa Mcl-1 con los vectores pIND y pVgR XR, se inició la transfección de las células transfectadas mediante la adición de los antibióticos Geneticina y Zeocina. El final de este proceso viene dado por la eliminación total de las células control no transfectadas. La evolución del proceso se muestra en las Figuras 6 y 7.

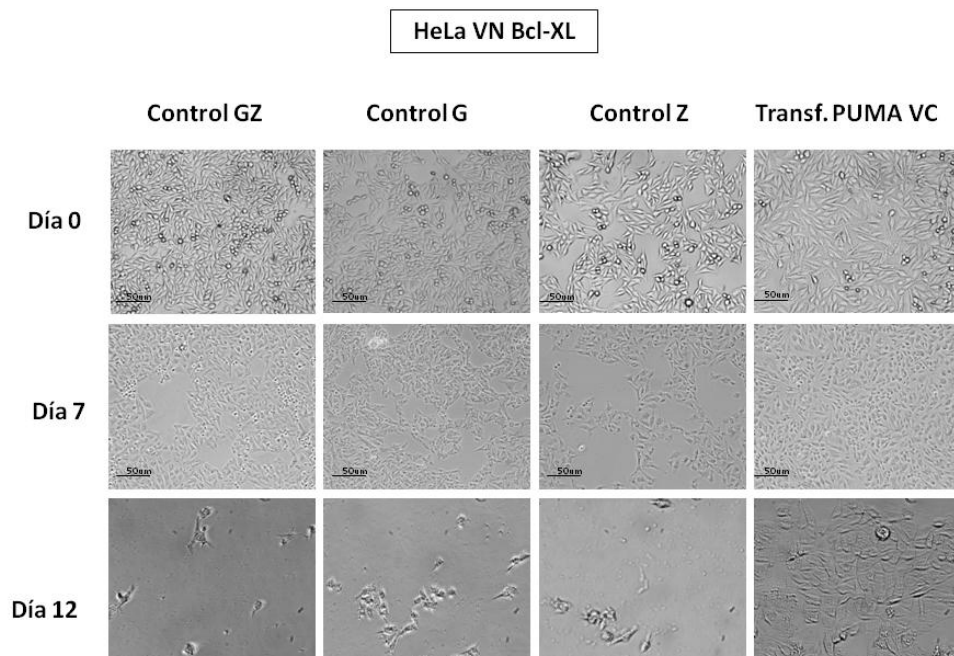


Figura 6. Evolución de la selección con antibióticos tras la transfección de la línea HeLa VN Bcl-XL con los vectores pIND-PUMA-VC y pVgR XR. G: Geneticina (500 µg/mL), Z: Zeocina (300 µg/mL).

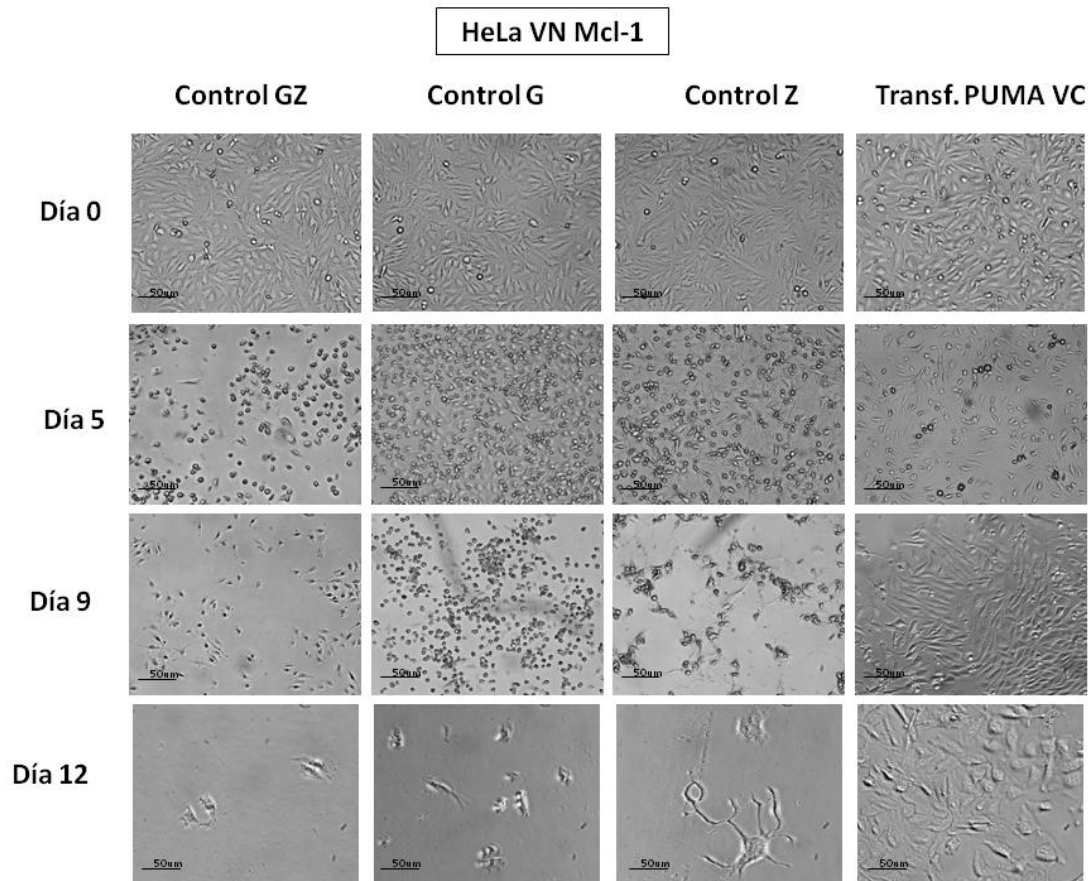


Figura 7. Evolución de la selección con antibióticos tras la transfección de la línea HeLa VN Mcl-1 con los vectores pIND-PUMA-VC y pVgRXR. G: Geneticina (500 µg/mL), Z: Zeocina (300 µg/mL).

Conforme pasan los días se observa un aumento en la muerte celular. Los antibióticos van haciendo efecto y las células que no han sido transfectadas con ambos plásmidos mueren debido a su sensibilidad a uno o a los dos antibióticos. También se puede apreciar que en el pocillo transfectado quedan más células viables que en los pocillos control, lo que sugiere la presencia de células transfectadas resistentes a los antibióticos.

En cuanto a la morfología, destaca la diferencia entre las células HeLa Mcl-1 y las células HeLa Bcl-xL: las primeras son más redondeadas, menos planas, y menos definidas. Cabe mencionar que las células bajo el efecto de Zeocina aumentan de tamaño y generan largas prolongaciones. Sin embargo, en los pocillos tratados con Geneticina, se observan algunas células más pequeñas y más oscuras, débilmente adheridas, que desaparecen al cambiar el medio de cultivo. El tratamiento con Zeocina a 300 µg/mL provoca una mayor tasa de muerte celular que el tratamiento con Geneticina a 500 µg/mL.

Tras 12 días de tratamiento con antibióticos, en los pocillos transfectados quedaban gran cantidad de células, mientras que en los pocillos control quedaban muy pocas células y su morfología indicaba que estaban muertas o a punto de morir. Al cambiar el medio de cultivo estas células fueron eliminadas, finalizando así el proceso de selección con antibióticos. De esta forma se aseguró que las células viables del pocillo transfectado, resistentes al tratamiento, realmente habían integrado los vectores pIND-PUMA-VC y pVgRXR en su genoma. Después se procedió a la expansión del cultivo, se congeló una alícuota y se conservó en N₂ líquido.

5.4. Ensayo de inducción con ponasterona

De forma paralela a la selección con antibióticos, se realizó una transfección transitoria para verificar si el sistema de transfección e inducción con ponasterona funcionaba correctamente.

Los posibles complejos entre Mcl-1 o Bcl-x_L con PUMA se analizaron mediante microscopía de fluorescencia tras la transfección transitoria con los vectores pAL2-myc, que codifica la mRFP, pIND-PUMA-VC y pVgRXR e inducción con ponasterona. Los resultados a las 48 h tras la inducción de la línea HeLa Mcl-1 PUMA se muestran en la Figura 8 y a las 72 h tras la inducción de la línea HeLa Bcl-x_L PUMA en la Figura 9.

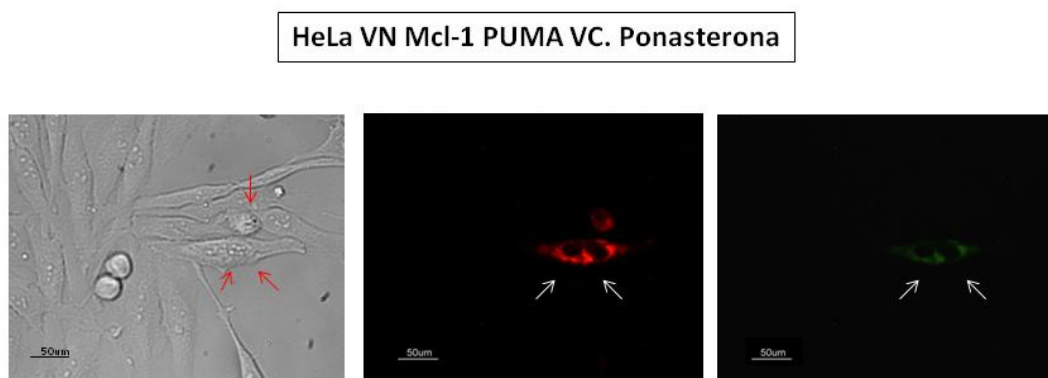


Figura 8. Análisis de los complejos proteicos formados entre Mcl-1 y PUMA mediante microscopía de fluorescencia a las 48 h de la inducción con ponasterona a 10 µM. Panel izquierdo visualizado con microscopía de campo claro, paneles central y derecho visualizados con microscopía de fluorescencia.

HeLa VN Bcl-xL PUMA VC. Ponasterona

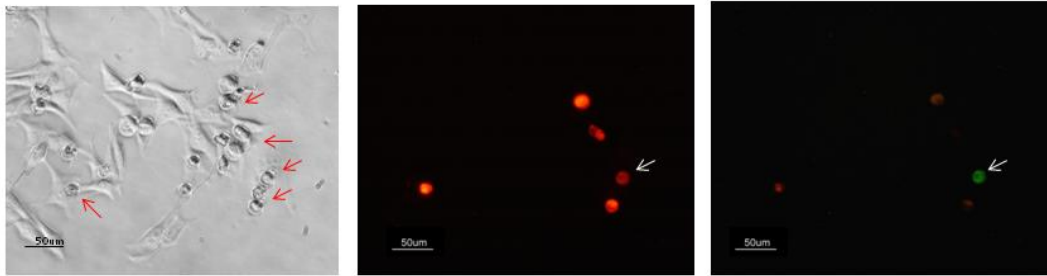


Figura 9. Análisis de los complejos proteicos formados entre Bcl-XL y Puma mediante microscopía de fluorescencia a las 72 h de la inducción con ponasterona.

A las 48h se veía fluorescencia, tanto roja como verde, en muy pocas células. La fluorescencia roja (RFP) indicaba las células que habían sido transfectadas. Si además también emitían fluorescencia verde, significaba que en esas células se estaba produciendo la interacción entre PUMA y las proteínas antiapoptóticas. El pequeño porcentaje de células con fluorescencia roja indicaba una baja eficiencia de transfección. Con respecto a la escasez de fluorescencia verde, de entre las pocas células transfectadas sólo había algún caso aislado que emitiera fluorescencia verde. Nos inclinamos a pensar que la concentración de ponasterona elegida (10 μM) todavía no era la concentración óptima para la inducción de pIND. Además, no todas las células son inducidas al mismo tiempo ni mantienen la fluorescencia indefinidamente. A las 48h se visualizaban verdes las células inducidas más tempranamente, mientras que después de un tiempo esta fluorescencia desaparecía, una vez que la célula moría, y aparecían nuevas células verdes recientemente inducidas. A las 72h se observó una mayor cantidad tanto de células transfectadas (rojas) como de interacciones proteicas (verdes). Aun así, la eficiencia de la transfección y de la inducción seguía siendo bastante baja. Durante los días siguientes no se volvió a observar un aumento de células transfectadas, deduciendo así que la tasa de transfección ya había alcanzado su máximo.

También se advirtió que generalmente las células que presentaban una fluorescencia verde más intensa, en cambio emitían una fluorescencia roja más débil. Una explicación a este hecho podría ser que cuando las células experimentan la apoptosis, la fluorescencia verde es intensa porque la proteína proapoptótica PUMA se sobreexpresa y las interacciones entre PUMA y las proteínas antiapoptóticas son muy fuertes, con el fin de estimular la respuesta apoptótica. Por el contrario, disminuiría la expresión y, por tanto, la fluorescencia de RFP, así

como de otras proteínas no implicadas en la apoptosis, ya que estas proteínas resultarían innecesarias.

Y viceversa, cuando la intensidad de la fluorescencia roja era muy elevada, la fluorescencia verde era débil. Siguiendo con la explicación anterior, esto sugeriría que estas células se encuentran en un estado temprano de apoptosis, en el que las proteínas proapoptóticas comienzan a expresarse y a interactuar con las antiapoptóticas pero todavía a bajos niveles, mientras que la transcripción del conjunto de proteínas celulares continúa activa.

Por otro lado, se observó que la fluorescencia verde era más intensa en las células HeLa Bcl-x_L (Fig 9) que en las HeLa Mcl-1 (Fig 8). Este resultado corrobora estudios anteriores que afirman que existe una mayor interacción de PUMA con Bcl-x_L que con Mcl-1 (Vela et al., 2013). Además, la mayoría de las células HeLa Bcl-x_L verdes presentaban un tamaño pequeño y una morfología redondeada (Fig 9), características de un estado celular apoptótico, mientras que generalmente las células HeLa Mcl-1 verdes presentaban un tamaño mayor y una morfología más alargada y geométrica (Fig 8), rasgos indicativos de la viabilidad de la célula. Estas observaciones podrían apoyar el modelo indirecto de activación de Bax y Bak: la gran afinidad de PUMA por Bcl-x_L conduciría a una rápida formación del complejo, liberándose las proteínas Bax y Bak preactivadas, que desencadenarían el proceso de apoptosis. La menor afinidad de PUMA por Mcl-1 induciría una formación del complejo más lenta y este retraso en el inicio de la apoptosis proporcionaría el tiempo suficiente para observar la célula verde en un estado preapoptótico.

En cuanto a la localización de los complejos formados, éstos deberían situarse en la membrana mitocondrial ya que tanto Mcl-1 como Bcl-x_L y PUMA son proteínas transmembrana mitocondriales (Perciavalle, 2012; Edlich, 2011; Yu, 2008). Por lo tanto, la fluorescencia verde debería mostrar una distribución punteada. Sin embargo, la microscopía de fluorescencia convencional no permite realizar este análisis porque superpone todos los planos de la célula y no proporciona imágenes con suficiente resolución. Para ello, es necesaria la microscopía confocal, que permite enfocar únicamente un plano determinado de la célula (Morales, 2012).

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se han generado líneas celulares estables con varios genes exógenos integrados en el genoma de células HeLa. Los genes insertados codifican proteínas proapoptóticas (PUMA) y antiapoptóticas (Bcl-x_L y Mcl-1) de la familia Bcl-2 para el análisis de sus interacciones en células vivas mediante la técnica BiFC. Los resultados obtenidos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La técnica BiFC permite la visualización de interacciones, muchas de ellas débiles y transitorias, entre proteínas de la familia Bcl-2 en un contexto celular.
2. La integración de los genes de las proteínas objeto de estudio en el genoma de la célula permite el mantenimiento de éstos de forma estable.
3. Al generar una línea celular estable con proteínas proapoptóticas es importante mantener su expresión reprimida hasta el momento deseado para preservar la viabilidad celular.
4. El sistema de transfección e integración de plásmidos inducibles (en este caso pIND) permite la sobreexpresión controlada de las proteínas en el momento deseado. Es necesario optimizar el sistema de transfección para elevar la tasa de transfección, así como el sistema de inducción con ponasterona para lograr una mayor sobreexpresión de las proteínas.
5. El sistema inducible pIND/ponasterona permite la detección de interacciones entre PUMA y Bcl-x_L y entre PUMA y Mcl-1 en células intactas.
6. Las interacciones Bcl-x_L/PUMA son más fuertes que las interacciones Mcl-1/PUMA.
7. Una vez generada la línea celular estable, se podrán analizar las interacciones proteicas mediante microscopía de fluorescencia convencional, microscopía confocal o citometría de flujo.

In this work we have generated stable cell lines with several exogenous genes integrated into the genome of HeLa cells. The inserted genes encoding proapoptotic proteins (PUMA) and antiapoptotic (Bcl-x_L and Mcl-1) Bcl-2 family for the analysis in intact cells of their interactions by BiFC technique. The results have allowed us to reach the following conclusions:

- 1. The BiFC technique permits visualization of interactions, many of them weak and transient, between proteins of the Bcl-2 family in a cellular context.**
- 2. Integrating studied protein genes in the genome of the cell allows their stable maintenance.**
- 3. When generating a stable cell line with proapoptotic proteins is important to maintain their expression repressed until the desired moment to preserve cell viability.**
- 4. Transfection and integration of inducible plasmids (pIND in this case) allows a controlled protein overexpression at the desired moment. It is necessary to optimize the transfection system to increase the rate of transfection, as well as the Ponasterone induction system for higher protein overexpression.**
- 5. Interactions between PUMA and Bcl-x_L and between PUMA and Mcl-1 can be detected in intact cells using the ponasterone inducible system.**
- 6. PUMA interacts more strongly with Bcl-x_L than with Mcl-1.**
- 7. After generation of a stable cell line, protein interactions may be analyzed by conventional fluorescence microscopy, confocal microscopy or flow cytometry.**

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper, G. M., and Hausman, R. E. (2010) *La célula*. Madrid: Marbán Libros, 693-705
2. Elmore, S. 2007. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology. 35:495-516
3. Frank Edlich, Soojay Banerjee, Motoshi Suzuki, Megan M. Cleland, Damien Arnoult, Chunxin Wang et al. (2011) *Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol*. Cell 145(1): 104–116
4. Kerppola, T. K. (2008) *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells*. Annu Rev Biophys 37, 465-487
5. Morales, M.D. (2012) *Uso de la fluorescencia y la microscopía confocal en la investigación científica*. SEBBM
6. Perciavalle R.M., Stewart D.P., Koss B., Lynch J., Milasta S., Bathina M., et al. (2012) *Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration*. Nat Cell Biol. 14(6):575-83
7. Sosa, R. D. (2012) *Apoptosis*. Facultad de Medicina. UNNE
8. Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J, Marzo, I. (2013) *Direct Interaction of Bax and Bak Proteins with Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins in Living Cells Revealed by Fluorescence Complementation*. J Biol Chem 288, 4935–4946
9. Villunger, A., Labi, V., Bouillet, P., Adams, J., and Strasser, A. (2011) *Multimodal Interaction with BCL-2 Family Proteins Underlies the Proapoptotic Activity of PUMA BH3*. Cell Death Differ 18, 1545-1546
10. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59
11. Yu J. and Zhang L. (2008). *PUMA, a potent killer with or without p53*. Oncogene 27 Suppl 1:S71-83
12. Zhang, Y., Xing, D., and Liu, L. (2009) *PUMA Promotes Bax Translocation by Both Directly Interacting with Bax and by Competitive Binding to Bcl-XL during UV-induced Apoptosis*. Molecular Biology of the Cell 20, 3077–3087
13. Fulda, S. and Debatin K-M. (2006) *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene 25, 4798-4811
14. Nakano, K. and Vousden, K. H. (2001) *PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53*. Molecular Cell, Vol. 7, 683–694