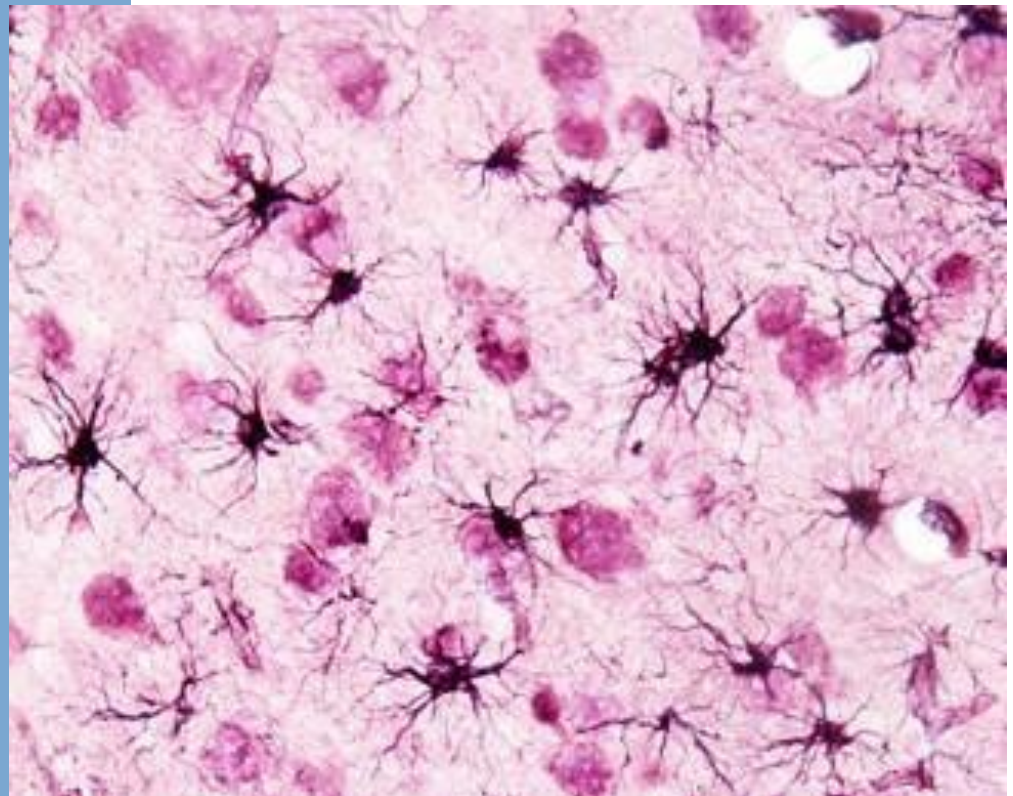


ESTUDIO DE LAS VÍAS IRE1 Y PERK EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LPS



Laura Barroso Pecero

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

ESTUDIO DE LAS VÍAS IRE1 Y PERK EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LPS

Laura Barroso Pecero

5-07-2017. Aula 2.1. Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica

Tutor: Diego Ruano Caballero

Trabajo experimental

Resumen

Una de las múltiples funciones del retículo endoplasmático (RE) es la de plegamiento de proteínas. Ciertos factores influyen en el correcto funcionamiento del mismo como pueden ser el estrés, la baja concentración de glucosa, los agentes tóxicos, las radiaciones etc. Como consecuencia de dichas alteraciones estas proteínas pueden acumularse mal plegadas activando una vía celular conocida como respuesta a proteínas mal plegadas ó UPR de sus siglas en inglés, Unfolded Protein Response, la cual está mediada por tres proteínas transmembranas las cuales activan a tres vías distintas: PERK, IRE1 α y ATF6 α , cuya función principal es la de restaurar la homeostasis del retículo endoplásmico.

Por otro lado, la autofagia es un proceso catabólico de degradación de proteínas y orgánulos dañados, que promueve la supervivencia celular, la cual se activa en ciertas situaciones como por ejemplo durante un proceso inflamatorio, y puede ser activada por diferentes vías de señalización en función del agente estresante o situación metabólica en la que se encuentre la célula.

En este trabajo, se estudia la implicación de dos vías de la UPR en la activación de la autofagia inducida por el lipopolisacárido (LPS). Para ello inhibimos, por un lado, la vía de PERK y por otro la vía de IRE1 α en presencia de LPS y analizamos la expresión de ciertos marcadores autofágicos como LC3-I, LC3-II y p62.

Palabras claves: UPR, LPS, inflamación, LC3, p62.

INDICE

1. Introducción	4
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos	
Línea celular y medio de cultivo	10
Aislamiento de ARN	11
Aislamiento de proteínas totales.....	13
Western Blot.....	14
RT-PCR	17
4. Resultados y Discusión	21
5. Conclusión	27
6. Bibliografía.....	28

1. Introducción

Respuesta a proteínas mal plegadas.

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo presente en el citoplasma de la célula sensible al estrés celular, está compuesto por vesículas interconectadas entre sí, siendo su función principal la de crear una red de canales para el transporte de material intracelular, y en él tienen lugar numerosas reacciones enzimáticas. Además de esta función general está implicado en el plegamiento de proteínas, síntesis de fosfolípidos, colesterol etc.

Alteraciones en los procesos homeostáticos, como el estrés, disminución de la concentración de glucosa en la sangre, agentes tóxicos y/o radiaciones, entre otras provocan un enlentecimiento del plegamiento de las proteínas, pudiendo acumularse las mismas, mal plegadas o desplegadas dando lugar a estrés de retículo.

Dicha acumulación activa una vía celular conocida como respuesta a proteínas mal plegadas o UPR de sus siglas en inglés (Unfolded Protein Response) cuyo objetivo principal es el de restaurar la homeostasis del RE. Esta vía actúa a tres niveles: deteniendo la síntesis de proteínas, estimulando la síntesis de chaperonas que ayudan al buen plegamiento de las proteínas y eliminando las proteínas mal plegadas. Sin embargo, si el estrés persiste y la UPR no es capaz de mantener la homeostasis, se activa la llamada UPR terminal conduciendo a la apoptosis.

La activación de la UPR está mediada por tres proteínas transmembranas las cuales activan a tres vías distintas: PERK, IRE1 y ATF6. Estas vías se mantienen inhibidas al estar unidas a la chaperona Grp78, sin embargo una acumulación de proteínas mal plegadas provoca la disociación de Grp78 y como consecuencia la activación de las proteínas transmembranas. Podemos encontrar un esquema general sobre la activación de la UPR en la figura 1. A continuación nos centramos en cada una de ellas.

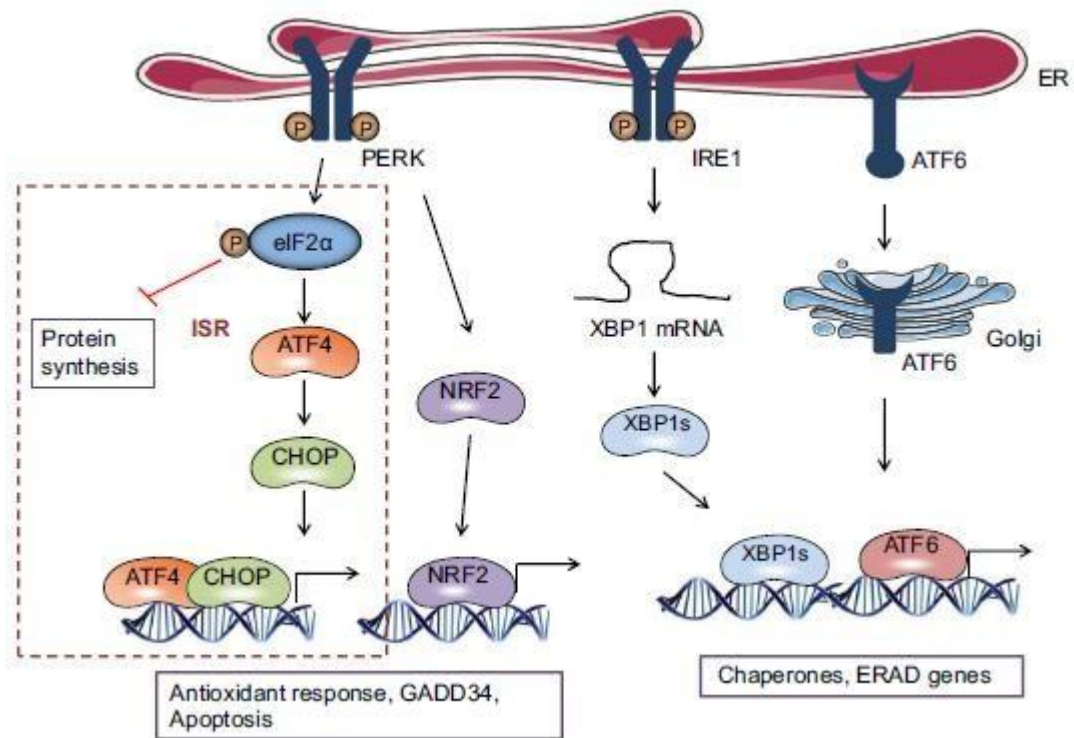


Figura 1. Esquema general de la activación de la UPR. Tomado de Iurlaro y Muñoz-Pinedo, 2015.

Vía de PERK.

Tras la disociación de Grp78, PERK se dimeriza y autofosforila, activándose. A continuación fosforila al factor de elongación eIF2 α el cual inhibe la síntesis de proteínas disminuyendo la cantidad de las mismas dentro del RE. Solo ciertos ARNm ven aumentada su traducción entre los que destaca el ARNm de ATF4, la proteína ATF4 a su vez actúa como factor de transcripción de GADD34 favoreciendo la homeostasis (Endres, Reinhardt, 2013).

Por otro lado, en condiciones de estrés continuado induce la muerte celular al favorecer la transcripción de los factores de transcripción CHOP y Noxa, activando también proteínas pro-apoptóticas como Bak y Bax.

El bloqueo de la síntesis de proteínas no puede mantenerse por mucho tiempo por ello GADD34 posee una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1, provocando la desfosforilación del factor de elongación eIF2 α restaurando la traducción del ARNm.

(Grootjans et al., 2016). Es necesario aclarar que la activación de CHOP sólo se lleva a cabo en situaciones de estrés crónico que conducirían a la muerte celular.

Por otro lado tras la autofosforilación de PERK se activa Nrf2 el cual induce una respuesta antioxidante.

Vía de IRE1 α .

IRE1 α , tras la disociación con Grp78 se dimeriza y autofosforila, posee actividad ARNasa eliminando un intrón del ARNm de Xbp1 favoreciendo su síntesis. La proteína XBP1 procesada (XBP1p) es un factor de transcripción que se trasloca al núcleo donde induce la expresión de ciertas chaperonas y otras enzimas que mejoran las funciones del RE, entre ellas la capacidad de plegamiento (Iurlaro y Muñoz-Pinedo, 2015). También activa la vía de degradación asociada al RE, ERAD, cuyo papel es el de asegurar que las proteínas mal plegadas pasen al citosol y sean degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma (Grootjans et al., 2016)

Sin embargo, un estrés crónico en el RE hiperactiva a IRE1 α , lo que provoca la degradación de otros ARN diferentes a XBP1 promoviendo la inflamación y la muerte celular (Grootjans et al., 2016).

Vía de ATF6 α .

ATF6 α , tras la liberación de Grp78, es transportado al aparato de Golgi donde es procesado secuencialmente por las proteasas site-1 y site-2, liberando un factor de transcripción que regula la expresión de CHOP, XBP1 y ERAD aumentando la capacidad de plegamiento y mejorando la función del RE (Liu et al., 2015)

Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico de degradación de orgánulos celulares y proteínas dañadas que promueve la supervivencia celular.

Esta engloba tres procesos diferentes, los cuales podemos encontrarlos esquematizados en la figura 2: la microautofagia la cual implica que el contenido citoplasmático que va a degradarse sea directamente englobado por el lisosoma. La macroautofagia, comúnmente denominada autofagia, que a diferencia de la anterior forma unas vesículas de doble membrana citosólicas que secuestran el contenido citoplasmático, estas vesículas se fusionan con el lisosoma para llevar a cabo la degradación (Levine y Kroemer, 2008). Y la autofagia mediada por chaperonas.

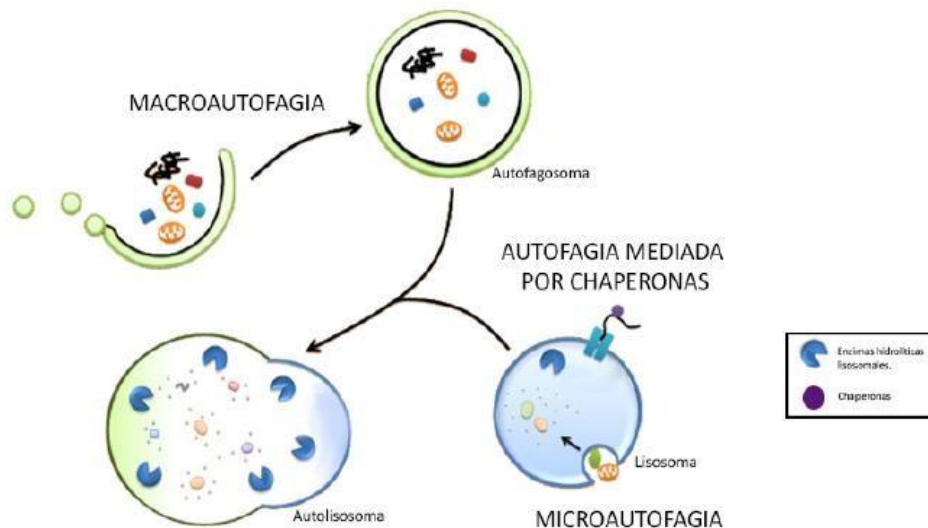


Figura 2. Esquema sobre los diferentes tipos de autofagia

La autofagia es un proceso no selectivo que cuenta con la participación de más de 30 proteínas diferentes, esta aumenta la supervivencia celular al degradar los orgánulos y proteínas dañadas. Sin embargo, también puede relacionarse con la muerte celular cuando tiene lugar de forma masiva la degradación de componentes esenciales para la célula. A pesar de ello no constituye un mecanismo suicida sino un intento de adaptación al estrés. (Pattingre et al., 2005)

Formación del fagosoma

La formación del fagosoma consta de diferentes etapas: 1) Nucleación y formación de la vesícula inicial 2) Elongación 3) Formación del autofagosoma 4) Fusión con el lisosoma 5) Degradación del contenido citoplasmático.

El complejo Atg1 (ULK1/2) es el encargado de inducir la formación de la vesícula inicial con una doble membrana, llamada fagóforo. Para llevar a cabo la nucleación son necesarios ciertos componentes proteicos los cuales son reclutados gracias a la participación del complejo Beclina-1, PI3K Clase II entre otros. Dichos complejos están regulados de formas distintas. Por un lado, existen moduladores positivos como Atg14L o Ambra1 que inducen la formación del autofagosoma. Por otro lado, BCL-2 y BCL-X, nombrados anteriormente, actúan como moduladores negativos, al interactuar con BECLINA1 inhiben su actividad. (Kang et al, 2011)

Una vez formado el fagóforo, se produce la captación de otros componentes entre ellos las proteínas de la familia LC3 las cuales se cree que participan en la elongación del fagóforo. Los diferentes miembros de la familia de LC3 pueden variar en concentración, siendo la transformación de LC3-I en LC3-II el proceso más estudiado para la cuantificación de los niveles de autofagia. Dicha conversión tiene lugar al conjugarse LC3-I (forma no lipídica) con fosfatidiletanolamina originando LC3-II. Muchas proteínas interactúan con LC3 actuando como adaptadoras entre ciertas estructuras como por ejemplo orgánulos dañados y las vesículas autofágicas, entre las que se encuentran p62, estudiada posteriormente en dicho trabajo.

La maduración del fagóforo tiene lugar gracias a la proteína LC3-II, originándose el autofagosoma el cual secuestra el material citoplasmático a degradar, este autofagosoma se fusiona con el lisosoma que posee enzimas hidrolíticas dando lugar al autofagolisosoma encargado de la degradación del material. Los productos de degradación generados son devueltos al citoplasma donde se reutilizan para la formación de nuevas proteínas. (Maciel y Cabrera, 2016). En la figura 3 se representa un esquema de las etapas de la autofagia.

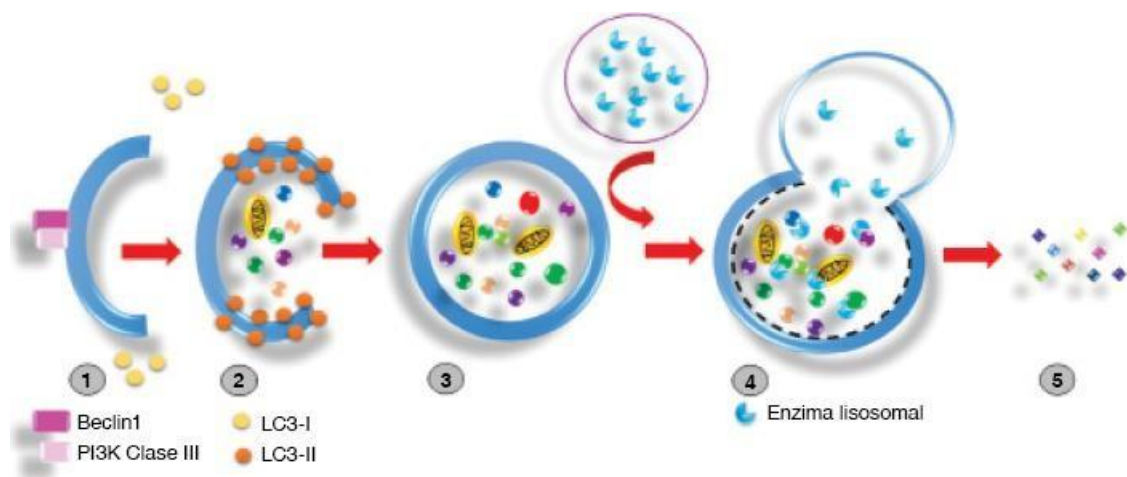


Figura 3: Etapas de la autofagia. Tomada de Maciel y Cabrera, 2016.

Actualmente se ha encontrado una relación entre la activación de la autofagia y la UPR.

A nivel de la vía PERK, la fosforilación del factor de elongación eIF2 α es necesaria para activar la autofagia mediada por poliagregados de poliglutamina. (Kouroko et al., 2007). Por otro lado, ATF4 actúa aumentando la expresión de LC3, componente imprescindible para la formación del autofagosoma. (Milani et al., 2009). Otro componente de esta vía es CHOP participando en la activación de la autofagia y en la disminución de los niveles de proteínas anti-apoptóticas como BCL-2.

Con respecto a la vía IRE1 α , se ha visto que el ER producido por agentes como la tunicamicina o thapsigargina activan la autofagia viéndose potenciada la vía IRE1 α (Ogata et al., 2006)

Inflamación.

La inflamación es un proceso inespecífico de defensa que se pone en marcha ante un agente lesivo como puede ser un virus, bacterias, hongos, traumatismos, agentes necróticos, etc. La respuesta inflamatoria podríamos dividirla en las siguientes fases.

En primer lugar se produce la liberación de mediadores de la inflamación sintetizados en los mastocitos como la histamina la cual actúa sobre los receptores H1 produciendo vasodilatación y aumento de la permeabilidad. Por otro lado, enzimas proteolíticas inductoras de la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulantes

de las terminaciones nerviosas del dolor. La heparina, inhibidora de la coagulación favoreciendo la llegada de distintas células al foco de inflamación. Prostaglandinas entre la que destacamos la PGE2 que produce vasodilatación y dolor, tromboxanos, leucotrienos etc.

A continuación, estas moléculas liberadas llegan al foco de la inflamación y atraen a otras moléculas y células inmunes las cuales reparan el tejido dañado. Sin embargo, a pesar de que el proceso inflamatorio sea un proceso de protección, en ciertas ocasiones esta respuesta se mantiene en el tiempo de manera excesiva, y tras numerosos intentos de reparación se produce una fibrotización del tejido, proliferación de vasos, infiltraciones celulares, dando lugar a un proceso de inflamación crónica. La inflamación crónica está asociada a un gran número de patologías infecciosas, metabólicas, pulmonares, cánceres y enfermedades neurodegenerativas.

Como se comenta anteriormente existe una relación entre la UPR y la activación de la autofagia, sin embargo esta relación se mantiene en los procesos inflamatorios.

2. Objetivos

Evaluar la importancia de la activación de la autofagia al inhibir las vías IRE1 α y PERK en una línea celular N13 de origen microglial.

3. Materiales y Métodos

Línea celular y medio de cultivo

Reactivos

- Células N13 de origen microglial
- RPMI
- Glutamina
- Estreptomycin + Penicilina
- Suero fetal bovino
- Lipopolisacárido (LPS)
- SFT083010 (TOCRIS). Inhibidor químico de la endonucleasa IRE1 α de la vía IRE1

- GSK2606414 (TOCRIS). Inhibidor químico de la enzima PERK de la vía de PERK.

Procedimiento

En este trabajo se han utilizado células N13 de origen microglial, cultivadas a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO₂, en el medio estándar para esta línea celular recogido en la tabla 1.

Se cultivaron en una placa doce pocillos con una concentración de células inicial de células/pocillo. Se pusieron cuatro pocillos control, cuatro con LPS, dos pocillos con LPS más el inhibidor de la vía IRE1 α (IRE1 α i) y otros dos con LPS más el inhibidor de la vía PERK (PERKi). Utilizando las concentraciones de 0.5 μ g/ml, 5 μ M y 1 μ M correspondientemente. Posteriormente se juntaron dos a dos.

Tabla 1. Medio de cultivo estándar para la línea celular N13.

Medios	Volumen
RPMI	500 ml
Glutamina	5 ml
Estreptomicina + Penicilina	5 ml
Suero fetal bovino	50 ml

Los inhibidores se añadieron a tiempo 0, a las 2 horas se añadió el LPS y tras 5 horas de tratamiento combinado se recogieron las células lo que suma un total de 7 horas de tratamiento.

A continuación se llevó a cabo la extracción del ARN y proteínas.

Aislamiento de ARN

Reactivos

- Tripure® Bioline
- Cloroformo

- Glicógeno
- Isopropanol
- Etanol absoluto
- Agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% (p/v)

Fundamento

El método empleado se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso se lleva a cabo usando el reactivo Tripure®. Este reactivo mantiene la integridad del ARN durante la lisis celular, contiene tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnaturaliza las proteínas, incluyendo las proteasas, ADNasas y ARNasas.

Procedimiento

Para extraer el ARN de la forma más adecuada, hay que disminuir la actividad ribonucleasa al mínimo posible en los primeros pasos, siendo importante que los reactivos y el material de trabajo estén libres de ARNasa.

El proceso comienza añadiendo 0.20 mL de cloroformo por cada mL de Tripure, vorteándose la muestra durante 15 segundos aproximadamente. A continuación incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la disociación completa de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente centrifugamos a 12000g a 4°C durante 15 minutos, obteniendo una disolución trifásica, la fase superior acuosa corresponde al ARN, siendo la interfase y la fase inferior orgánica el ADN y proteínas. Pasamos la fase acuosa, a otro eppendorf y añadimos 0.75 mL de isopropanol y 0.6 µL de glicógeno por cada mL inicial de Tripure, agitamos y congelamos los tubos a -20°C de 1 a 3 días para que precipite el ARN.

Una vez pasado este tiempo, dejamos los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación centrifugamos a 12000g a 4°C durante 10 minutos donde podemos observar el pellet que corresponde al ARN, lavamos dicho pellet con 1 mL de etanol al 75% para poder separarlo, volvemos a centrifugar a 12000g a 4°C

durante 5 minutos y por último eliminamos el sobrenadante, dejando secar el pellet, ARN, abierto en una campana. Una vez esté seco introducimos el eppendorf inmediatamente en hielo añadiendo 50 μ L de agua con DEPC.

Una vez obtenido el ARN realizamos la retrotranscripción, proceso por el cual obtenemos el ADN complementario, ADNc, usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit y partiendo de una muestra de 4 μ g de ARN.

Aislamiento de proteínas totales

Reactivos

- Etanol 100%
- Solución de guanidina 0.3 M en etanol al 95% (v/v)
- Solución 4% SDS, 8 M urea, en 40 mM Tris-HCl pH 7.5

Fundamento

A partir de la solución trifásica obtenida anteriormente en la purificación del ARN, podemos también aislar proteínas y ADN genómico. Estas proteínas al estar desnaturalizadas solo podemos usarlas para estudios en western-blot.

Procedimiento

Usando la fase intermedia y fase orgánica procedemos a la extracción de proteínas totales. Primero se lleva a cabo la precipitación del ADN para evitar la contaminación de las proteínas, para ello añadimos 0.3 mL de etanol al 100% por cada mL usado de Tripure, tapamos el tubo y lo invertimos varias veces para mezclarlo. A continuación incubamos la muestra durante 2-3 minutos a temperatura ambiente para permitir que el ADN precipite. Se centrifuga la muestra a 2000g durante 5 minutos a 4°C. Pasamos el sobrenadante el cual contiene las proteínas a un tubo nuevo y añadimos 1.5 mL de isopropanol por mL de Tripure, se agita el tubo invirtiéndolo varias veces y se deja incubar 10-15 minutos a temperatura ambiente para que las proteínas

precipiten. A continuación centrifugamos a 12000g a 4°C durante 10 minutos y descartamos el sobrenadante.

Lavamos el precipitado con una solución de guanidina 0.3 M en 95% (v/v) de etanol utilizando de dicha solución 2 mL por cada mL de Tripure, agitamos fuertemente y dejamos 20 minutos a temperatura ambiente en agitación, para después centrifugar a 7500g durante 5 minutos a 4°C. Este proceso se repite dos veces más y luego se realiza un último lavado similar con 2ml de etanol absoluto por mL de Tripure utilizado, para eliminar los restos de guanidina. Finalmente, dejamos secar el precipitado bajo una lámpara unos 10 minutos hasta que se evapore todo el alcohol.

Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspende en urea 8 M - SDS 4% tamponado con Tris-HCl pH 7.5. Para ello, adicionamos 500 µl de este tampón por cada mL inicial de Tripure utilizado y se deja incubando toda la noche en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se procede a la determinación de la cantidad de proteína por el método de Micro-Lowry. Las proteínas solubilizadas se congelan en diferentes alícuotas a -40°C hasta su uso.

Western Blot (WB)

Reactivos

- Acrilamida al 40% (p/v) en agua.
- N,N'-metilén-bis-acrilamida al 1% (p/v) en agua.
- Tampón para gel de corrido (4x): SDS al 0.4% en 1.5M Tris-HCl, pH 8.4.
- Tampón para gel de empaque (2x): SDS al 0.2% en 0.25M Tris-HCl, pH 6.8.
- Tetrametiletiléndiamina TEMED.
- Persulfato Amónico al 5% (p/v) en agua, PSA.
- n-Butanol.
- Tampón de glicina para electroforesis: 0.19 M glicina, SDS 0.1% (p/v) en 25mM Tris-HCl, pH 8.4.
- Tampón de transferencia: 0.19 M glicina, 20% (v/v) metanol, 0.005% SDS en 25mM Tris-HCL, pH 8.4
- Membrana de PVDF, 0.45 micras de diámetro de poro

- Leche desnatada (Bio-Rad) al 5% en TPBS
- Anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano
- Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate

Fundamento

Los geles de poliacrilamida, PAGE, constituyen el soporte de elección a la hora de llevar a cabo la separación de las proteínas presentes en una muestra en función de su tamaño. Este PAGE gracias al detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) dispersa los agregados proteicos y desnaturaliza las proteínas lo que nos asegura que al estar cargadas negativamente podemos diferenciarlas exclusivamente en función de su tamaño.

Procedimiento

Para la preparación del gel usamos el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), que nos permite preparar nuestros geles a la concentración deseada y con el número de pocillos que sean necesarios según las condiciones de cada experimento.

Para llevar a cabo una PAGE-SDS las proteínas deben estar preparadas con un tampón específico que contiene SDS al 2.3%, β -mercaptoetanol al 10%, glicerol al 20% y azul de bromofenol al 0.005% en tampón 10 mM Tris-HCl a pH 6.8. Por otro lado, preparamos el soporte en gel, por el que migrarán las proteínas durante la electroforesis, combinando los reactivos descritos en el apartado anterior.

En este caso hemos preparado un gel de glicina al 14% cuya composición viene detallada en la tabla 2A, dicho gel lleva un stacking de glicina al 4% recogida su composición en la tabla 2B. Hemos usado 6 pocillos en los cuales se han cargado 10 μ L de una mezcla de 30 μ L de muestras más 10 μ L de tampón 8x.

Tabla 2A. Composición para un running gel de glicina al 14%.

Medios	Volumen
Bis/Acrilamida 40%	1.75 mL
Running Buffer	1.25 mL
Agua	1.92 mL
SDS 10%	50 µL
PSA 5%	10 µL
TEMED	10 µL

Tabla 2B. Composición para dos stacking gel de glicina al 4%.

Medios	Volumen
Bis/Acrilamida 40%	0.5 mL
Stacking Buffer	1.26 mL
Agua	3.18 mL
SDS 10%	25 µL
PSA 5%	10 µL
TEMED	5 µL

La electroforesis se lleva a cabo en tampón 25 mM Tris-HCl a pH 8.4 con 0.19 M Glicina y SDS al 0.1% (p/v), sometiéndola a un voltaje constante de 90 V hasta pasar el stacking y de 120 V a partir del mismo.

Una vez finalizada la electroforesis, transferimos las proteínas retenidas a una membrana de PVDF previamente activada con metanol. Este sistema nos permite realizar la transferencia sumergiendo la membrana en el tampón indicado, a 310 mA constantes durante una hora. A continuación la bloqueamos con leche al 5% en TPBS entre 30 minutos y 1 hora a T^a ambiente. Tras el bloqueo se incuba la membrana con el anticuerpo primario en TPBS durante toda la noche a 4°C. La concentración de cada anticuerpo empleado se detalla en la tabla 3.

Al día siguiente, retiramos el exceso de anticuerpo con tres lavados de 5 minutos de TPBS e incubamos la membrana con el anticuerpo secundario durante una hora a Tª ambiente.

Tabla 3. Anticuerpos empleados para las técnicas de Western Blot.

Proteína/ Antígeno diana	Especie huésped	Dilución trabajo	Banda Reconocida
LC3	Conejo	1/1000	14 kDa 16 kDa
p62	Conejo	1/1000	60 kDa
Beta-actina	Ratón	1/10000	42 kDa
Anti-rabbit	Cabra	1/10000	-
Anti-mouse	Caballo	1/10000	-

Tras la hora de incubación con el anticuerpo secundario volvemos a repetir el proceso de lavado para retirar el exceso de anticuerpo secundario. Para visualizar las proteínas marcadas usamos el reactivo Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate que contiene el sustrato de la peroxidasa, y mediante el sistema de captación IQ LAS 4000 MINI GOLD recogemos la señal quimioluminiscente.

RT-PCR

Reactivos

- Eagle Taq 2X
- TaqMan Gene Expression Assay® 20X (Applied Biosystems)
- Agua destilada y autoclavada

Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy utilizada para la cuantificación de pequeñas cantidades de ARNm obtenido mediante retrotranscripción.

El sistema ABI-Prism 7900 de Applied Biosystems el cual hemos usado es capaz de detectar fluorescencia entre 500 nm y 660 nm. Para la cuantificación de la expresión del ARNm hemos usado sondas Taqman, las cuales son sondas de hibridación específicas, es decir, permiten la detección exclusiva del producto específico. Estas son oligonucleótidos de 20-24 bases de longitud, que se unen complementariamente a una secuencia interna dentro del fragmento de ADN amplificado. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador (reporter) y en el extremo 3' con un aceptor o sustancia absorbente (quencher), que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Mientras que la sonda esté intacta no se detecta fluorescencia ya que la energía se transfiere del fluoróforo de baja longitud de onda en un extremo (reporter) al fluoróforo de alta longitud de onda en el otro extremo (quencher), apantallando la fluorescencia de baja longitud de onda. Cuando la Taq-polimerasa alcanza la sonda, su actividad exonucleasa 5'-3' libera al fluoróforo donador, permitiendo el aumento de la fluorescencia. Esta fluorescencia es captada por el lector. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado. Finalmente la enzima hidroliza el resto de la sonda completando la copia de la secuencia diana. En la figura 4 queda reflejado el funcionamiento de una sonda Taqman.

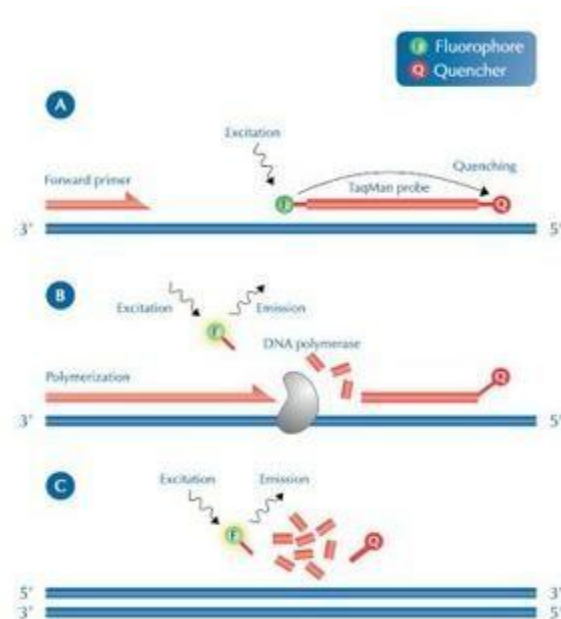


Figura 4. Representación esquemática del funcionamiento de una sonda Taqman.

A mayor número de copias iniciales, antes se detectará un aumento significativo en la fluorescencia. Este punto se define como ciclo threshold (Ct). Para la cuantificación de los niveles de ADNc, se ha utilizado el método de comparación de Ct usando GAPDH como gen de referencia. Los valores de Ct fueron calculados con el software proporcionado por Applied Biosystems (SDS 1.7).

Procedimiento

Para llevar a cabo la RT-PCR Real Time, utilizando sondas Taqman, preparamos la mezcla de reacción siguiendo los volúmenes recogidos en la tabla 4. El vial 20X TaqMan® Gene Expresión Assay, contiene los cebadores específicos y una sonda Taqman. Las condiciones óptimas para la PCR se obtuvieron usando como molde 1 µl de ADNc. Una vez preparada la mezcla de reacción, introducimos la placa en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, programado como se indica en la tabla 5. El análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software. Las sondas Taqman de ratón que han sido utilizadas en este caso son LC3, p62, Grp78 y GAPDH.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción de RT-PCR por pocillo

Componentes de la reacción	Volumen
Eagle Taq (2x)	10 µL
TaqMan® Gene Expression Assay (20x)	1 µL
ADNc	1 µL
Agua MilliQ	8 µL
Volumen final	20 µL

Tabla 5. Condiciones de la PCR siguiendo el protocolo de Applied Biosystems.

Tiempo y Temperatura			
Pasos iniciales		Desnaturalización	Hibridación/Elongación
Mantener	Mantener	Ciclo	
Activación de la Taq 2 min a 50°C	Desnaturalización 10 min 95°C	15 seg 95°C	1 min 60°C

4. Resultados y discusión

Para realizar este trabajo utilizamos cuatro muestras distintas, un grupo de células control, un grupo de células expuestas al agente de estrés de RE LPS, por otro lado un grupo de células con LPS más un inhibidor químico de la vía IRE1 α y otro incubado con LPS más un inhibidor químico de la vía PERK.

Vamos a estudiar mediante western-blot el marcador LC3-II respecto a LC3-I, ya que se supone que este participa en la elongación del autofosoma inicial, siendo el estudio de LC3 uno de los más utilizados para la evaluación experimental de la autofagia (Tanida I et al., 2004). Además, se midieron los niveles de p62, proteína que interacciona con LC3-II y ubiquitina, permitiendo la introducción de proteínas poliubiquitinadas en el interior del autofosoma para su degradación. Este marcador, p62, se ha identificado como un sustrato específico degradado a través de la ruta autofágica (Komatsu, Ichimura, 2010)

En primer lugar, analizamos los niveles de autofagia, como queda reflejado en la figura 6 podemos observar que la razón LC3-II/LC3-I aumenta con respecto a la situación control lo que nos lleva a pensar en una mayor presencia de vesículas autofágicas.

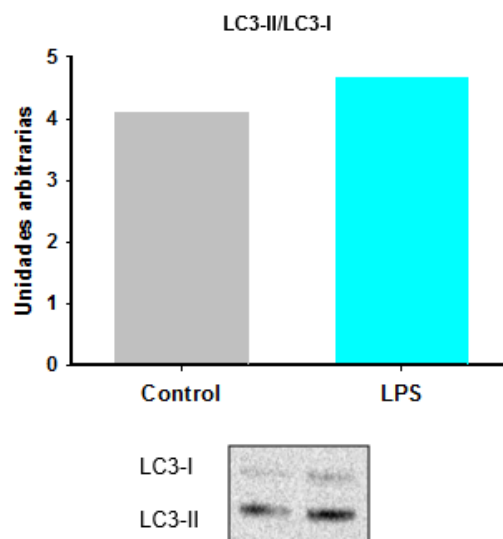


Figura 6. Razón LC3-II/ LC3-I en ausencia y presencia de LPS. En la gráfica se representa la expresión de la razón LC3-II/LC3-I obtenida de los western blot. En la parte inferior el western representativo de LC3-I y LC3-II.

Centrándonos en el marcador p62 vemos como en la figura 7 este se acumula al incubar a las células con LPS con respecto a la situación control, lo que apoyaría el aumento de la actividad autofágica.

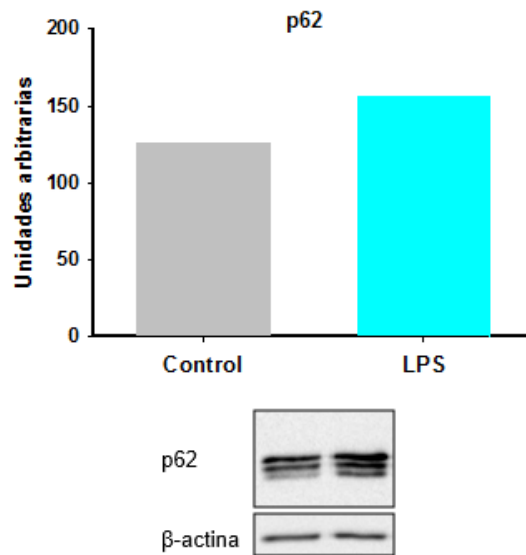


Figura 7. Expresión de p62 en ausencia y presencia de LPS. En la gráfica se representa la expresión de p62 obtenida de los western blot normalizada con β -actina. En la parte inferior el wester representativo de p62 y de β -actina.

Análisis de la inhibición de la vía de IRE1 α

Tras estudiar el efecto de LPS, nos centramos en el efecto que provoca el inhibidor químico de la actividad endonucleasa de IRE1 α SFT083010.

Como podemos observar en la figura 8, al bloquear la vía de IRE1 α la razón LC3-II/LC3-I se ve disminuida, lo que indicaría una menor actividad autofágica. No obstante, la disminución de la razón LC3-II/LC3-I podría ser interpretada también como un aumento del flujo autofágico. Para comprobar este punto tendríamos que realizar estudios de flujo autofágico.

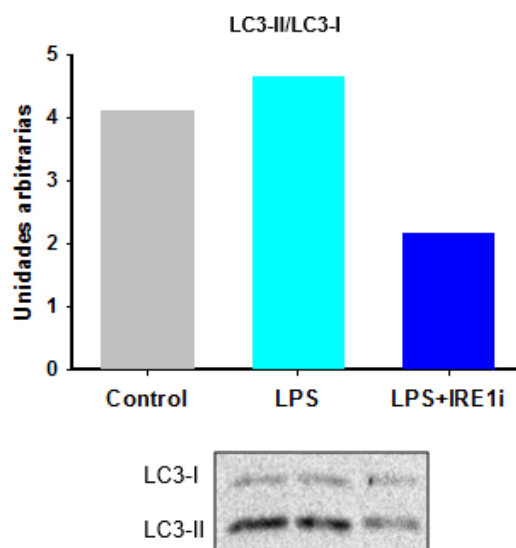


Figura 8. Efecto de la inhibición de la vía IRE1 α sobre la activación de la autofagia inducida por LPS. En la gráfica se representa la expresión de la razón LC3-II/LC3-I obtenida de los western blot tanto para LPS como para LPS+IRE1 α i. En la parte inferior el western representativo de LC3-I y LC3-II.

En segundo lugar analizamos el marcador p62, como queda reflejado en la figura 9 en presencia de LPS + IRE1 α i. En este caso, la expresión de esta proteína no se vio afectada por la inhibición de esta vía. Este resultado apoyaría el hecho de que la inhibición de la vía IRE1 α disminuiría la actividad autofágica inducida por LPS, puesto que si se produjera un aumento de la actividad como se comenta anteriormente, los niveles de p62 deberían de verse disminuidos.

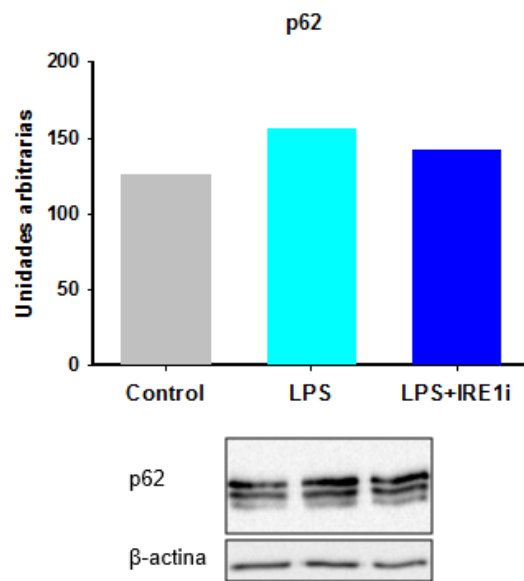


Figura 9. Representación IRE1i + LPS. Marcador p62. En la gráfica se representa la expresión de p62 obtenida de los western blot normalizada con β -actina. En la parte inferior el wester representativo de p62 y de β -actina.

Análisis de la inhibición de la vía de PERK

Por último, para estudiar el papel de esta vía en la activación de la autofagia inducida por LPS utilizamos el inhibidor químico de PERK GSK2606414.

Como podemos observar en la figura 10 al inhibir la vía de PERK se observa un aumento de la razón LC3-II/LC3-I, lo que sugiere un aumento de la actividad autofágica.

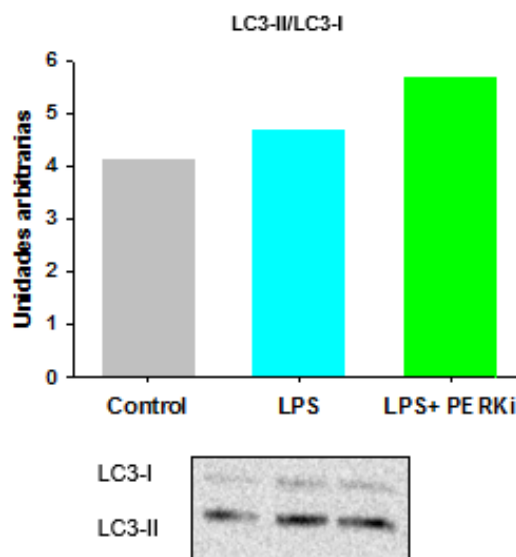


Figura 10. Representación PERKi + LPS. Marcador LC3-II/LC3-I. En la gráfica se representa la expresión de la razón LC3-II/LC3-I obtenida de los western blot tanto para LPS como para LPS+PERKi. En la parte inferior el western representativo de LC3-I y LC3-II.

Por último analizamos el marcador p62. En la figura 11 se observa que la inhibición de la vía PERK disminuye el contenido de p62. Esta disminución podría estar indicando una mayor degradación de esta proteína a través de la vía autofágica que como sugieren los resultados de la razón LC3-II/LC3-I se vería aumentada.

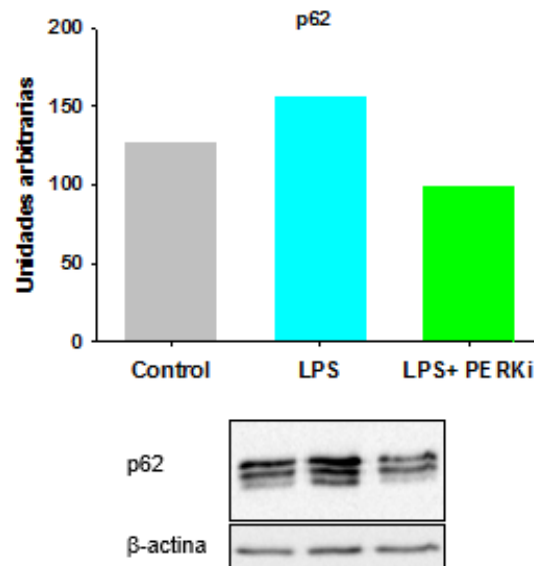


Figura 11. Representación PERKi + LPS. Marcador p62. En la gráfica se representa la expresión de p62 obtenida de los western blot normalizada con β -actina. En la parte inferior el wester representativo de p62 y de β -actina.

5. Conclusión

A pesar de que el estudio realizado se ha visto limitado por los recursos, los resultados parecen indicar que **tanto la vía de IRE1 α como la vía de PERK juegan un papel activo en la activación de la autofagia inducida por LPS**. En este sentido, la vía de IRE1 α , ejercería un efecto positivo sobre la activación, mientras que la vía de PERK ejercería un efecto negativo.

Este comportamiento contrario entre ambas vías puede tener un significado fisiológico en el sentido de que la autofagia es un proceso catabólico que debe de estar muy bien controlado, puesto que una activación masiva o sostenida en el tiempo de la autofagia puede llevar a la muerte celular.

6. Bibliografía

1. Endres K, Reinhardt S. ER-stress in Alzheimer's disease: turning the scale?. *Am J Neurodegener Dis.* 2013; 2(4): 247-65.
2. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(8): 469-84
3. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol.* 2010; 32(4): 431-36.
4. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 2016; 283(14): 2640-52.
5. Kang YJ, Lu MK, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011; 18(4): 571-80
6. Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H et al. ER stress (PERK/eIFalpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 2007; 14(2): 230-9.
7. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132(1): 27-42.
8. Liu Z, Lv Y, Guan G, Wang J. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis.* 2015; 6(7): 1-10.
9. Maciel M, Cabrera S. El papel de la autofagia en enfermedades pulmonares. *Neumol Cir Torax.* 2016; 75(3): 227-36.
10. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D et al. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res.* 2009; 69(10): 4415-23.
11. Ogata M, Hino SL, Saito A, Morikawa K, Kando S, Kanemoto S etc al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(24): 9220-31.
12. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; 122(6): 927-39.
13. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36(12): 2503-18.

