

Uva

Estudio de la expresión de Apolipoproteína D en células de astrocitoma humano. Un gen supresor de tumores peculiar.

Viktor Yordanov Zlatkov

Tutores: D. Sánchez y M. D. Ganfornina.

Trabajo de Fin de Grado
Facultad de Medicina
31/05/2017



ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Objetivos.....	6
4. Materiales y Métodos.....	6
5. Resultados.....	10
6. Discusión	13
7. Conclusiones.....	15
Bibliografía.....	16

1. RESUMEN

Las modificaciones epigenéticas son fundamentales para la diferenciación celular tanto en el periodo embrionario como en la edad adulta. Estas modificaciones incluyen la metilación del DNA y modificaciones en la acetilación de las histonas. La combinación de ambos fenómenos permite mantener un equilibrio en la expresión génica de nuestras células. Pero en ciertas ocasiones, como en la oncogénesis, este equilibrio se rompe, apareciendo represión en los genes supresores de tumores por medio de hipermetilación y una sobreexpresión de proto-oncogenes gracias a su hipometilación. Uno de estos genes que en el seno de los tejidos neoplásicos sufre una regulación a la baja es APOD. Un gen que codifica para una lipocalina a la que se le atribuyen múltiples funciones antioxidantes y antiproliferativas.

En este trabajo se quiso estudiar la expresión del gen APOD en un cultivo celular de astrocitoma humano (1321N1) y ver si en condiciones basales el gen está reprimido a expensas de hipermetilación y cómo varía su expresión ante el estrés oxidativo (un inductor conocido de la transcripción de APOD).

Mediante el uso de un agente desmetilante se demostró que, en efecto, el gen APOD en condiciones basales está regulado a la baja en esta línea celular. Pudimos observar además que el estrés oxidativo genera un cambio en la distribución intracelular de ApoD hacia organelas de pequeño tamaño. Por último, pero no por ello menos relevante, se observó un importante incremento en la transcripción de APOD en condiciones de escasez nutricional. Esto último hace sospechar que este incremento en los niveles de ApoD pudiera tener que ver con el papel antiproliferativo de dicha proteína, razón por la cual se le ha incluido en el grupo de genes supresores de tumores.

2. INTRODUCCIÓN

Todas las células de nuestro cuerpo poseen la misma información genética, pero sin embargo expresan solo una mínima parte de dicho genoma, la que necesitan para sobrevivir y cumplir su función en cada momento. Este control sobre qué genes son expresados y cuáles no, es llevado a cabo por la epigenética, modificaciones en la estructura química del DNA y las histonas que cambian la conformación de la cromatina, impidiendo o facilitando su transcripción (3,6). Una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas es la metilación del DNA, que suele asociar deacetilación de las histonas provocando condensación cromatínica y el consecuente silenciamiento de los genes. La metilación del DNA es llevada a cabo por las metiltransferasas del DNA (DNMT) tras la replicación (6). Estas modificaciones epigenéticas son heredables y reversibles. Esto último ha permitido la aparición de terapias epigenéticas, empleando agentes desmetilantes como el 2'-deoxy-5-azacytidine (DAC) (6,7).

Las anomalías en la metilación del DNA (epimutaciones) contribuyen a la tumorigénesis por medio del silenciamiento de genes supresores de tumores y la activación de proto-oncogenes (3). Esto se ha descrito en el carcinoma renal de células claras, en el que existe una hipermetilación del gen supresor de tumores VHL; también en las leucemias agudas, en las que suele haber hipermetilación del gen p53 (7).

Los agentes desmetilantes como el DAC se emplean para revertir estas epimutaciones y evitar la progresión tumoral, pero también han servido para desenmascarar nuevos genes supresores de tumores (5). Uno de estos genes que parece estar reprimido en diversas estirpes de células neoplásicas es el gen de la Apolipoproteína D (ApoD). El descenso en la expresión de ApoD en las células de cáncer colorectal se ha asociado a una menor supervivencia de los pacientes (4). Los astrocitomas de alto grado, como el glioblastoma multiforme, tienen silenciada la expresión del gen APOD mientras que los de bajo grado la siguen conservando. ApoD se asocia a una baja proliferación celular y por esto ha sido propuesto como marcador de buen pronóstico para los tumores cerebrales (5).

ApoD es una lipocalina conocida por su función citoprotectora en situaciones de estrés oxidativo. Dentro del sistema nervioso central, ApoD se encuentra en astrocitos protoplásmicos y oligodendrocitos, mientras que algunas neuronas producen ApoD tan solo durante el periodo embrionario (1). La transcripción del gen APOD depende de p73 y p63, ambos activados por la vía de señalización JNK en respuesta a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS)(2, 4). Se ha visto que ApoD juega un papel importante en reparar las membranas celulares que han sufrido peroxidación lipídica, permitiendo mejorar la función de ciertas organelas como los lisosomas (8).

Las células cancerosas tienen una actividad metabólica incrementada, acompañada de una alta producción de ROS. En concreto el radical hidroxilo (OH^\cdot) produce una gran variedad de lesiones en el DNA, desde cambios de base, deleciones, rotura de doble cadena y reordenamientos cromosómicos (6). Todo lo anterior está en la base de la progresión tumoral. Como el principal estímulo de la transcripción de ApoD es el estrés oxidativo; es de esperar que en los tejidos tumorales ApoD se sobre-exprese, pero eso no es siempre así. De hecho como ya se ha comentado, cuanto más desdiferenciado sea el tumor, menor es la transcripción del gen APOD.

¿La regulación a la baja de la expresión de ApoD es consecuencia de la progresión tumoral o es una de las causas de la misma? Ambas respuestas pueden ser igual de válidas. Los análisis empleando agentes desmetilantes en diferentes estirpes tumorales arrojan unos resultados similares: ApoD parece estar regulada a la baja por modificaciones epigenéticas propias de la tumorigénesis.

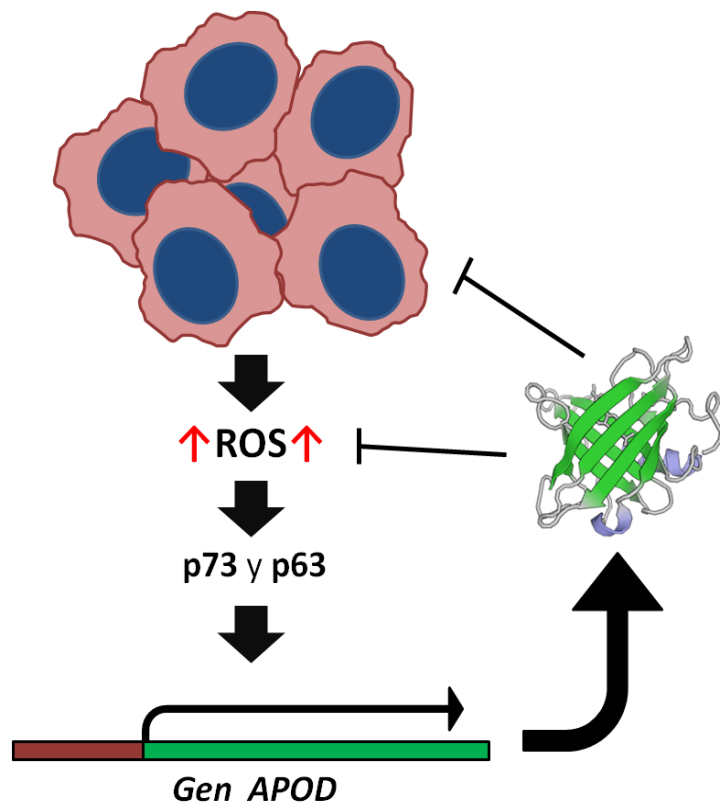


Figura 1 La actividad metabólica incrementada de las células tumorales genera Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que por medio de la vía JNK activa a los factores de transcripción p73 y p63. Esto resulta en un aumento de los niveles intracelulares de ApoD que reduce los niveles de ROS y a su vez frena la proliferación celular.

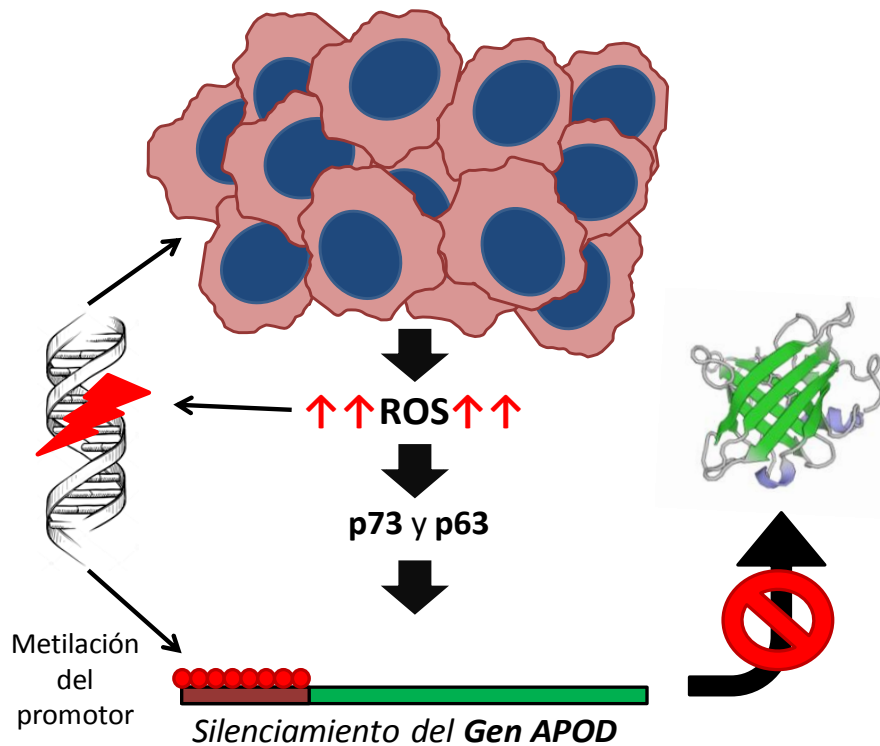


Figura 2 Los altos niveles de ROS secundarios a la progresión tumoral lesionan el DNA produciendo mutaciones, epimutaciones y reordenamientos que a su vez propician la progresión tumoral. En algún momento de todo este proceso el gen APOD sufre un silenciamiento de su expresión, esto se traduce en el descenso de los niveles intracelulares de ApoD.

3. OBJETIVOS

Plantear una serie de experimentos destinados a cuantificar el mRNA de ApoD y la cantidad de proteína presentes en la línea celular de astrocitoma humano 1321N1. Todo ello con el fin de estudiar la distribución intracelular de la proteína y el grado de transcripción del gen en condiciones de estrés oxidativo y empleando agentes desmetilantes.

El objetivo es saber cómo es la expresión de ApoD en estas células tumorales, cómo contribuye el estrés oxidativo a incrementar la transcripción de dicha proteína y ver si el empleo de agentes desmetilantes como el DAC tiene algún efecto sobre la expresión proteica. Si esto último resultase cierto, podemos deducir que en condiciones basales el promotor de APOD se encuentra metilado en estas células.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares:

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en la línea celular de astrocitoma humano 1321N1. Las células se cultivan en medio DMEM con 1g/L de Glucosa con rojo fenol, 10% suero bovino fetal (FBS), 1% L-Glutamina y 1%P/S/A (Penicilina/Estreptomina/Anfotericina B). Las células se mantienen en un incubador a 37°C con 5% CO₂. Se les cambia el medio de cultivo dos veces a la semana y se realiza un pase una vez alcanzada la confluencia celular.

Estudio de expresión génica por medio de PCR cuantitativa:

Día 1: En 5 placas de Petri Nunc® se sembraron células 1321N1 en dos medios diferentes: una con DMEM 1g/L de Glucosa al 10%FBS y las cuatro restantes con DMEM 4,5g/L de Glucosa al 0%FBS. Las células se obtuvieron de un frasco de 75cc y en cada placa se sembraron aproximadamente 1.300.000 células en 10ml de medio. Las células se mantuvieron en el incubador a 37°C hasta el día siguiente.

Día 2: Las placas con los medios al 0% de FBS van a recibir un tratamiento de estrés oxidativo (Paraquat, PQ), agente desmetilante DAC o una combinación de ambas (DAC+PQ).

Para el tratamiento oxidante se preparó una disolución de 500 μ M de PQ, y para el tratamiento desmetilante una disolución de 1 μ M de DAC.



Figura 3 Representación esquemática de las placas de Petri con los correspondientes tratamientos.

Hay dos placas de control (Ctrl), una de medio con 10% FBS, situación en la que están las células en su frasco de mantenimiento, y otro con 0%FBS para comparar los diferentes tratamientos con este. Son necesarios estos dos controles porque de por sí el cambio de 10% a 0% de FBS produce un descenso marcado de la proliferación celular y una alteración en la distribución celular de ApoD y su expresión génica.

Este tratamiento se mantuvo durante 24h.

Día 3: Se retiran todos los medios de cultivo con sus correspondientes tratamientos utilizando una pipeta serológica. A continuación se administra 1ml de Qiazol® para lisar las células y obtener un homogeneizado celular que se recoge en tubos de Eppendorf de 1,5ml.

De los homogeneizados celulares nos interesa obtener el RNA, y para ello se empleó un protocolo de extracción.

Una vez extraído, se procedió a cuantificar la cantidad de RNA midiendo la absorbancia a 260nm utilizando el NANODrop. A su vez se realizó una

electroforesis en gel de agarosa para ver de forma cualitativa la integridad de los distintos tipos de RNA.

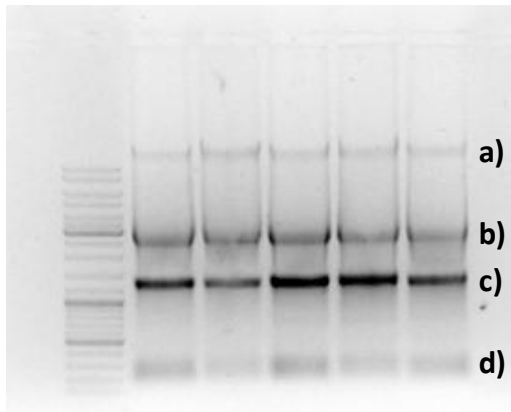


Figura 4 Electroforesis de los homogeneizados celulares en gel de agarosa tras el protocolo de extracción de RNA. La banda **a)** corresponde a restos de DNA genómico, la banda **b)** al rRNA 28S, la **c)** al rRNA 16S y la **d)** es una combinación del rRNA 5S, tRNA y miRNA. El mRNA al tener tamaños diferentes ocupa el espacio entre estas bandas bien definidas, creando un fondo difuminado.

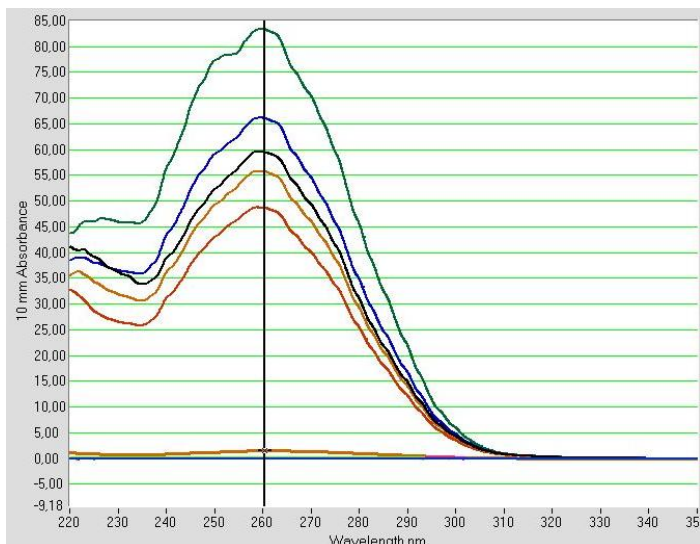


Figura 5 Cuantificación del RNA midiendo la absorbancia a 260 nm empleando el NANODrop. A mayor pico, más RNA.

A continuación se realizó una transcripción reversa (RT) a partir de las muestras de RNA para obtener el cDNA que va a ser el sustrato de la PCR cuantitativa (qPCR).

RT-qPCR: Antes de proceder a amplificar en tiempo real las muestras de cDNA se realizó una recta patrón para el gen de L18 (proteína ribosomal que se expresa de forma ubicua y nos sirve para normalizar la transcripción de nuestro gen de interés) y otra para el gen de ApoD (gen de interés). La pendiente de la recta define la eficiencia de la amplificación y debe ser la misma para ambos genes.

Una vez garantizada la eficiencia de la prueba se procede a amplificar HApoD y H-L18 a partir del cDNA empleando SYBERGREEN como agente intercalante fluorescente y los cebadores “forward” y “reverse” respectivos.

Estudio de la expresión proteica de ApoD:

Se emplearon dos placas con 4 pocillos cada una. En cada pocillo se colocó un cubreobjetos circular que fue tratado con poli-L-lisina para permitir la adhesión posterior de las células. Las células se cultivaron en 500µl de medio DMEM 10%FBS durante 24h. Se siembran unas 75.000 células por pocillo. Tras estas 24h se retiraron los medios de cultivo y se realizó un lavado con tampón fosfato-salino (PBS) previa aplicación de los tratamientos con PQ, DAC y PQ+DAC.

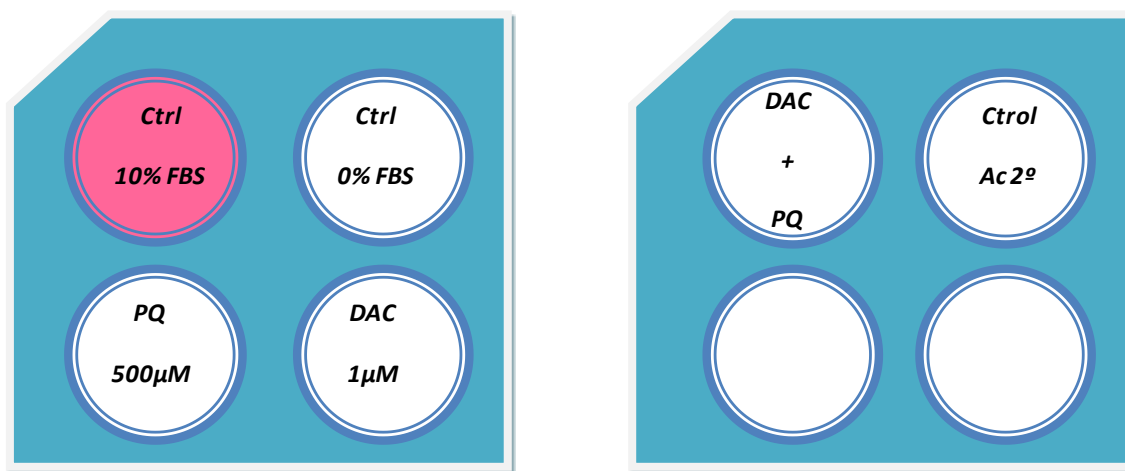


Figura 6 Representación esquemática de las placas de cuatro pocillos con los respectivos tratamientos, incluyendo el control de anticuerpo secundario (Ctrl Ac2º).

A las 24h se retiró el tratamiento y se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 15 minutos.

Immunocitoquímica: Las células se permeabilizaron empleando Tween-20 al 0,1% y bloquearon empleando Suero de Cabra. Se empleó el anticuerpo primario Rb-anti-HApoD (dilución 1:1000). Las células fueron incubadas ~20 horas a 4°C. Tras lavados repetidos con PBS se añadió el anticuerpo secundario G-anti-Rb-Alexa488 (dilución 1:1000) durante una hora a temperatura ambiente.

Los cubreobjetos con las células se montaron sobre portaobjetos empleando VECTASHield como agente antiblanqueo.

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i equipado con una cámara digital DsRi1) empleando filtros barrera para DAPI y FITC para visualizar los núcleos celulares y el marcaje de ApoD, respectivamente.

Las imágenes fueron procesadas empleando el programa FIJI, realizando un análisis posterior de:

- a) Número de partículas ApoD-positivas por célula.
- b) Comparación del área de las partículas entre las distintas condiciones experimentales.
- c) Comparación de la intensidad de fluorescencia entre condiciones experimentales.

Dicho análisis se realizó empleando el programa estadístico SIGMAplot.

5. RESULTADOS

Distribución intracelular de ApoD y cómo esta se ve influenciada por las distintas condiciones experimentales.

El primer análisis estadístico que se hizo fue el del área de las partículas marcadas con el anticuerpo de ApoD. Los resultados se muestran en la figura 8.

Existe una gran variabilidad intercelular en el tamaño de las partículas ApoD-positivas en los controles y con agentes desmetilantes (apreciándose una importante dispersión de los valores de las áreas). Se aprecia un descenso de dicha variabilidad, con partículas de tamaño significativamente ($p < 0.05$) más pequeño en las células sometidas a estrés oxidativo y las que recibieron una terapia combinada (agente desmetilante y estrés oxidativo) en comparación con el control.

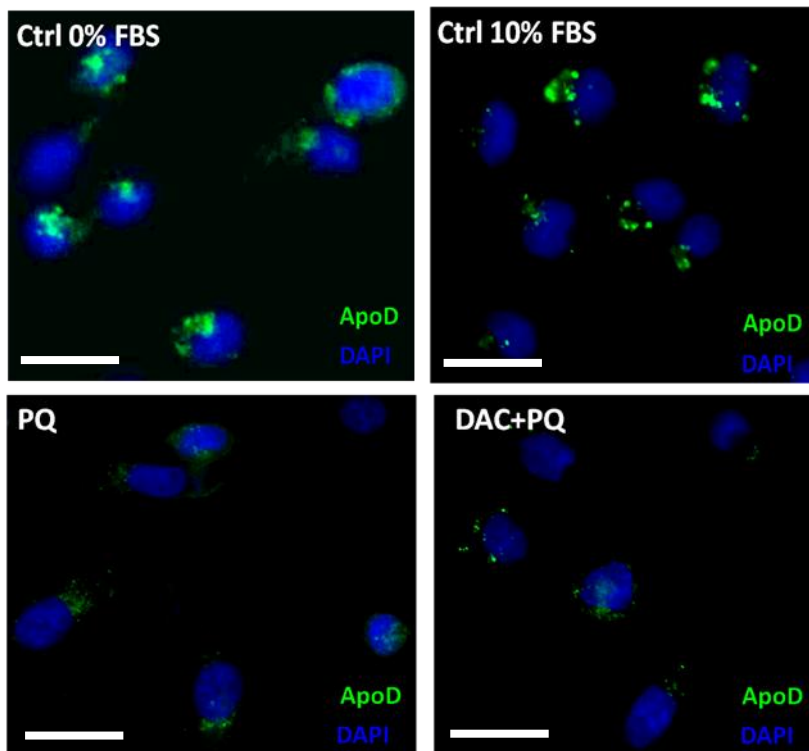


Figura 7 Imágenes de inmunocitoquímica. Empleando filtros barrera para DAPI y FITC para visualizar los núcleos celulares (en azul) y el marcaje de ApoD, respectivamente (en verde).

Barras de calibración: 20 μ m.

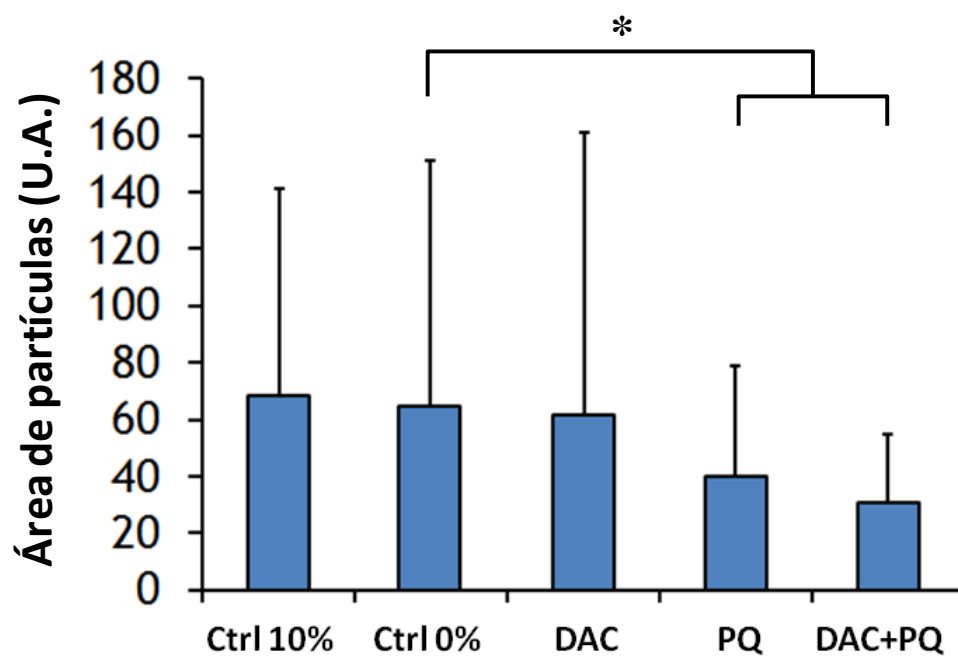


Figura 8 Gráfico que representa las medianas \pm DE de las áreas de las partículas ApoD-positivas. N=4 experimentos y se analizaron 45 campos de microscopía. Se han marcado con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La intensidad de la fluorescencia de las partículas ApoD-positivas se correlaciona directamente con la cantidad de proteína presente en dichas organelas (Figura 9).

Se observa una marcada diferencia entre la cantidad de proteína presente en las células cultivadas con 10% de FBS y las que no, apreciándose un descenso significativo de la intensidad de fluorescencia en estas últimas. A su vez existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control al 0% de FBS y las células tratadas con la terapia combinada, apreciándose mucha menos fluorescencia en estas últimas.

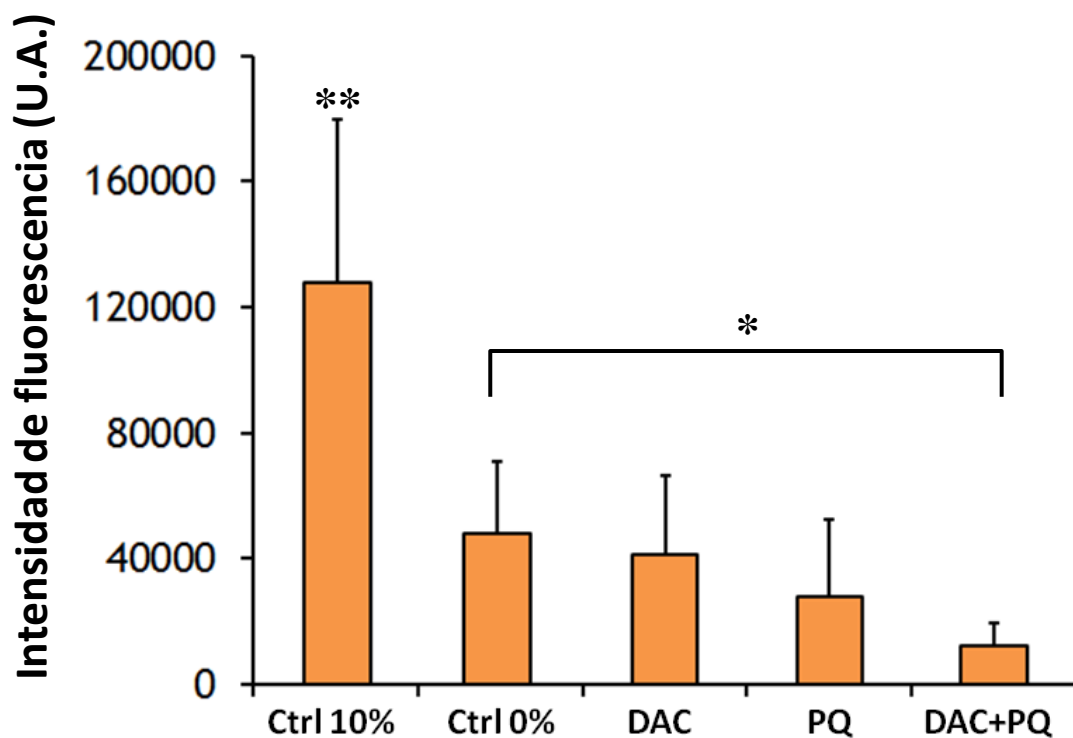


Figura 9 Gráfico que representa las medianas de las intensidades de fluorescencia de las partículas ApoD-positivas \pm DE. N=4 experimentos y se analizaron 45 campos de microscopía óptica. Se indican con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.05$.

La expresión del gen APOD parece estar regulada a la baja por mecanismos epigenéticos.

En la figura 10 se aprecian los resultados de la cuantificación del mRNA de ApoD en las distintas condiciones experimentales con respecto al control 0%FBS.

Al contrario de lo esperado, en condiciones de estrés oxidativo no se aprecian cambios significativos en la transcripción de ApoD. Por otra parte, el tratamiento desmetilante con DAC logró un incremento del mRNA en cerca de un 60% respecto al control. La combinación de la desmetilación y el estrés oxidativo nos da una condición intermedia con un aumento del mRNA de un 20% respecto al control.

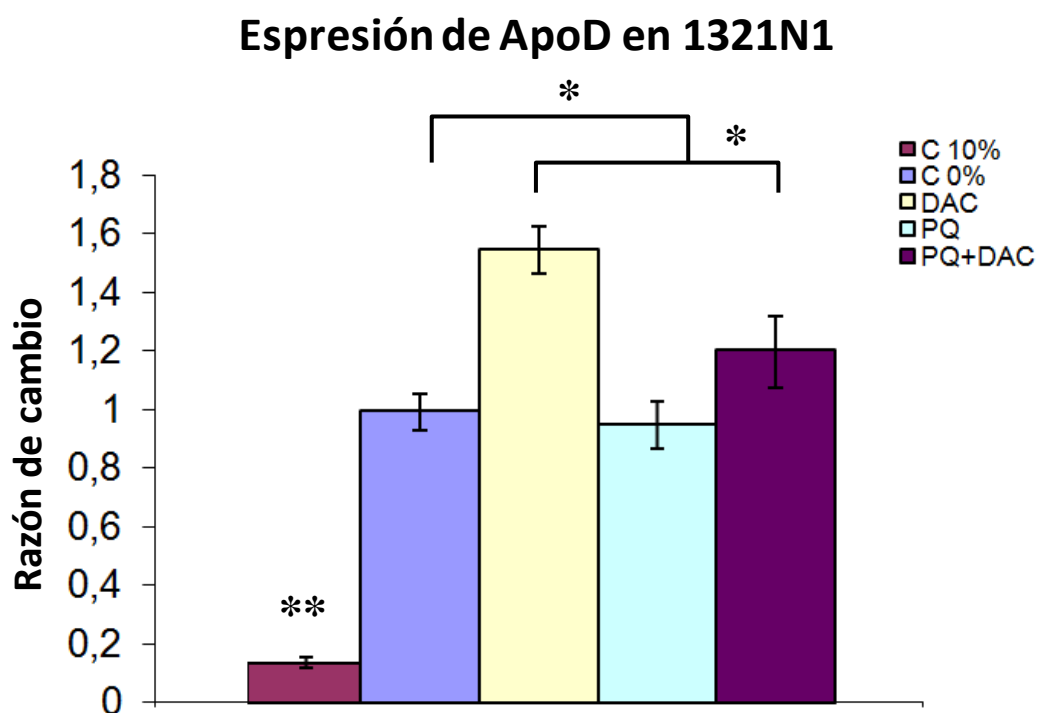


Figura 10 La gráfica representa la razón de cambio del mRNA entre las distintas condiciones experimentales. N=3 experimentos. Se representan mediante un asterisco las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

6. DISCUSIÓN

Si comparamos las gráficas de expresión proteica con las de la transcripción del mRNA encontramos ciertas disparidades. Es llamativo ver que las células

cultivadas en un medio con 10% de FBS, es decir, con abundantes nutrientes, presentan una importante cantidad de ApoD a nivel intracelular a pesar de tener prácticamente reprimida la transcripción del gen. El paso a un medio con un 0% de FBS aumenta la transcripción del gen de ApoD. Aunque la intensidad de fluorescencia dependiente de ApoD desciende drásticamente, la distribución intracelular no varía, encontrándose ApoD en organelas de gran tamaño. Esto nos evidencia que el paso a un ambiente pobre en nutrientes es otro estímulo más para inducir la transcripción del gen APOD. Esto último puede estar en relación con el papel antiproliferativo de ApoD, ya que en condiciones de escasez nutricional hay un descenso importante de la división celular.

En un principio, si observamos los niveles de mRNA en condiciones de estrés oxidativo vemos que no hay cambios significativos con respecto al control. ¿Cómo es esto posible si ApoD tiene como principal inductor de su transcripción al propio estrés oxidativo? La respuesta puede estar en que el gen de ApoD es un gen de respuesta aguda ante el estrés, produciendo un incremento de su transcripción en las primeras 6h con un posterior descenso en los niveles de mRNA (2).

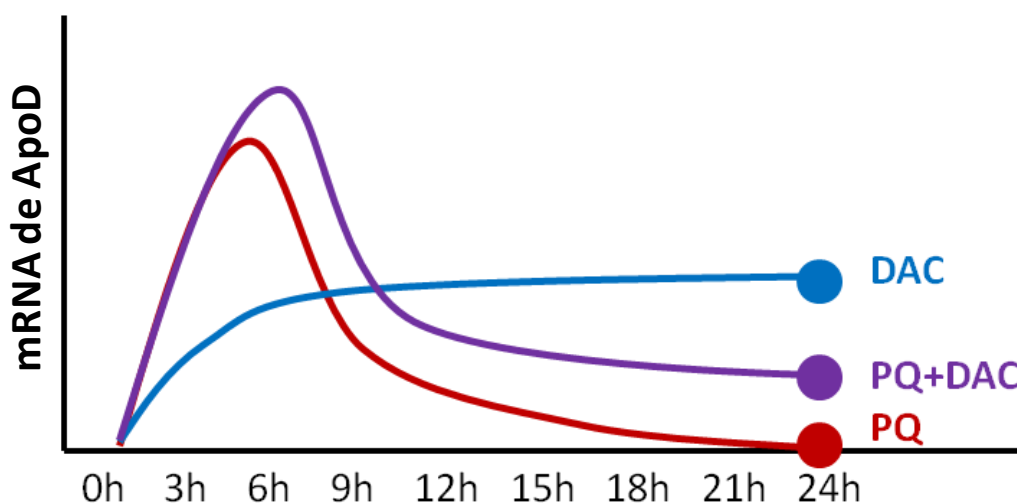


Figura 11 Los niveles de mRNA de ApoD alcanzan un pico aproximado a las 6h del tratamiento con PQ (Bajo-Grañeras R, Glia 2011). Como la transcripción del gen se normaliza antes de las 24h, no observamos diferencias con respecto al control.

La qPCR se realizó a las 24h de haberse realizado el tratamiento y por tanto los niveles de mRNA se encontrarían en un rango similar a la condición de

control. El estrés oxidativo produce una distribución diferente de la proteína a nivel subcelular, con tendencia a que ApoD se dirija a organelas de pequeño tamaño en forma de un punteado difuso. Estudios recientes han demostrado que bajo dichas condiciones de estrés oxidativo ApoD se dirige al compartimento lisosomal, donde tiene un papel importante en evitar la peroxidación lipídica de dichas organelas (8). La mala función lisosomal puede tener un efecto deletéreo a nivel de las rutas de la autofagia, siendo esta la base de muchas enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson.

El tratamiento con el agente desmetilante DAC produce un importante aumento de los niveles de mRNA a las 24h. Esto hace sospechar que el gen en condiciones basales tiene cierta represión mediada por la metilación de su promotor. Esto se ha visto en otras líneas celulares, como HT-29 de cáncer colorectal. Mientras el estrés oxidativo cambiaba la redistribución intracelular de la proteína hacia organelas de menor tamaño, el agente desmetilante no produce cambios en la distribución proteica. Esto es así porque ApoD se dirige a los lisosomas solo cuando estos experimentan lesión en su membrana.

La combinación de ambos tratamientos se observa una cantidad de mRNA intermedia entre la que hay con los tratamientos por separado. Y como era de esperar, la distribución proteica subcelular se dirige a organelas de menor tamaño, demostrándose así que hace falta la presencia de ROS para que ApoD cambie su distribución.

7. CONCLUSIONES

Se pueden resumir en tres puntos principales:

1. En condiciones basales el gen de APOD se encuentra regulado a la baja por mecanismos epigenéticos.
2. El estrés oxidativo moviliza ApoD hacia organelas de menor tamaño, en especial hacia los lisosomas lesionados por ROS.
3. El ambiente pobre en nutrientes es un estímulo más para la transcripción del gen APOD y probablemente tenga que ver con el papel antiproliferativo de ApoD.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell*. 2008 Aug;7(4):506–15.
2. Bajo-Grañeras R, Ganfornina MD, Martín-Tejedor E, Sanchez D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia*. 2011 Oct 1;59(10):1551–66.
3. Hagemann S, Heil O, Lyko F, Brueckner B. Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS ONE*. 2011 Mar 7;6(3):e17388.
4. Bajo-Grañeras R, Crespo-Sanjuan J, García-Centeno RM, Garrote-Adrados JA, Gutierrez G, García-Tejeiro M, et al. Expression and potential role of apolipoprotein D on the death-survival balance of human colorectal cancer cells under oxidative stress conditions. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Jun;28(6):751–66.
5. van den Boom J, Wolter M, Blaschke B, Knobbe CB, Reifenberger G. Identification of novel genes associated with astrocytoma progression using suppression subtractive hybridization and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Int J Cancer*. 2006 Nov 15;119(10):2330–8.
6. Donkena KV, Young CYF, Tindall DJ. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol Int*. 2010;2010:302051.
7. Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2002 Dec;2(6):485–95.
8. Pascua-Maestro R, Diez-Hermano S, Lillo C, Ganfornina MD, Sanchez D. Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new

mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress.
PLoS Genet. 2017 Feb;13(2):e1006603.