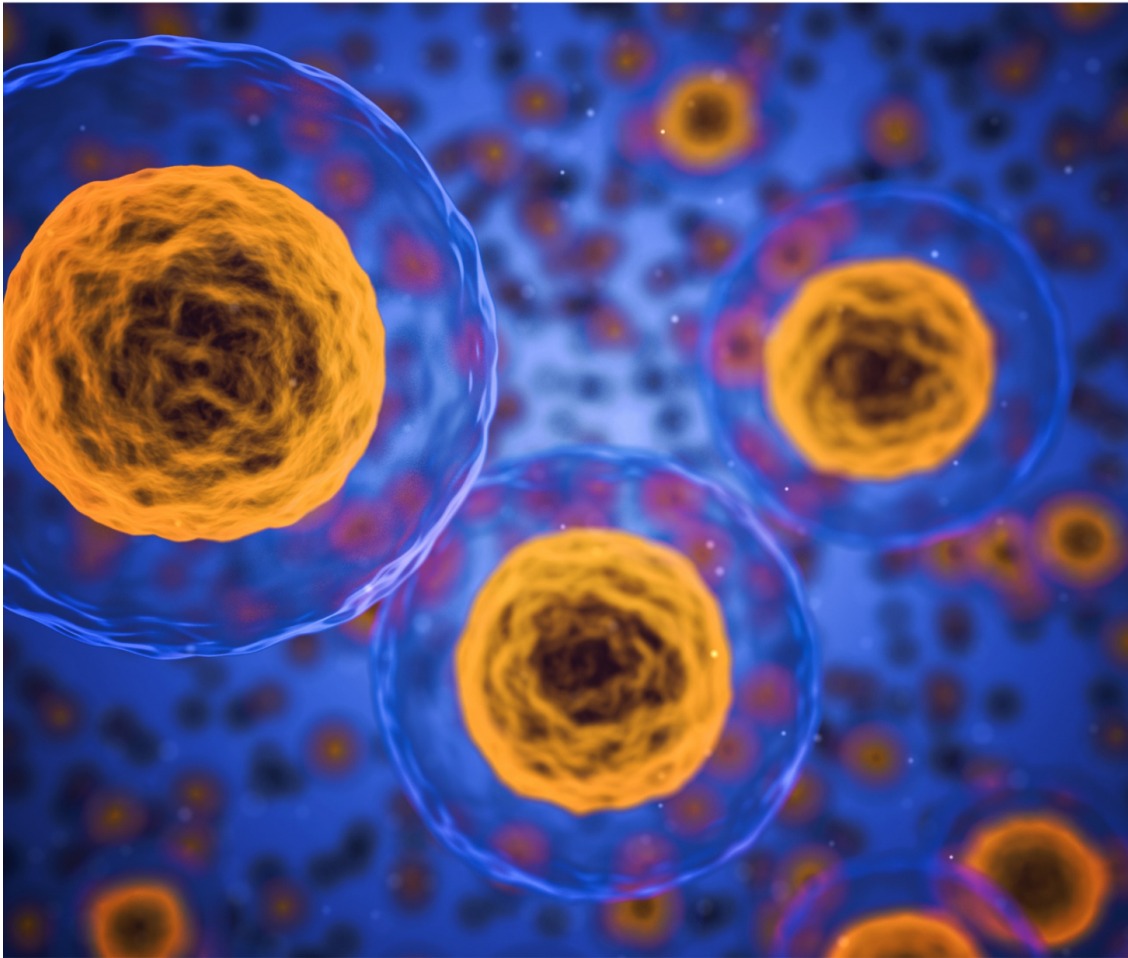


AUTOFÀGIA: EL PROCÉS DESCONEGUT DE DEGRADACIÓ CEL·LULAR



**Rosalind Franklin
2n B de Batxillerat
Curs 2020-2021**

Curs 2020 - 2021

Resum

L'autofàgia és un procés cel·lular molt complex i encara poc conegut, que incorpora la participació d'un elevat nombre de molècules i orgànuls diferents. Es fonamenta en la necessitat quotidiana que tenen les cèl·lules d'eliminar tot allò que no necessiten i que impedeix el seu correcte funcionament, i en el procés que ha de tenir lloc a dins d'aquestes, com a mètode per aconseguir energia en situacions d'estrès prolongades.

Aquest treball de recerca es centra en la investigació de dues proteïnes conegudes (Rab7 i TBC1D15), en la determinació de la relació que existeix entre elles en possibles processos autofàgics i en la investigació de la participació de les macromolècules per separat en el procés de degradació. Per aquesta raó, l'objectiu de l'experiment realitzat és determinar si existeix algun tipus d'interacció entre les proteïnes i en el cas que existeixi, si aquesta pot provocar algun nou canvi o implicació en el transcurs normal d'un procediment autofàgic.

Al llarg del treball s'han utilitzat dues tècniques diferents (immunofluorescència i coimmunoprecipitació) per a intentar demostrar la hipòtesi que proposa la interacció entre TBC1D15 i Rab7. Per a poder realitzar-ho, s'ha fet ús de tres variables comunes en les dues proves i de tres controls presents només en la segona. S'han agafat com a base les dues tècniques anomenades i s'han explicat tots els procediments necessaris per a la obtenció de resultats.

L'anàlisi de resultats que té lloc posteriorment, sembla indicar que existeix la interacció entre les proteïnes anomenades i la participació de TBC1D15 en processos autofàgics. Tot i així, es determina per certes raons, que els resultats no són prou precisos o significatius. En definitiva, és necessari repetir aquests procediments experimentals per a poder constatar la informació ja publicada en altres textos científics en referència a les proteïnes. S'han de seguir investigant tots els detalls que tenen a veure amb l'autofàgia, considerant que és un camp molt especialitzat i que de moment, genera més dubtes que respostes.

Curs 2020 - 2021

Abstract

Autophagy is a very complex and still not very well known cellular process, which involves the participation of a large number of different molecules and organelles. It is based on the daily need of cells to eliminate everything that can cause them problems to work properly, and also on the process that has to take place inside these ones, as a method to obtain energy in prolonged stressful situations.

This research focuses on the investigation of two known proteins (Rab7 and TBC1D15), on the determination of the relationship between them in possible autophagic processes and on the identification of the participation of these macromolecules separately in the degradation process. For this reason, the aim of the experiment is to determine if there is any interaction between the proteins and if so, whether it can cause any change or involvement in the normal course of an autophagic procedure.

Two different techniques (immunofluorescence and coimmunoprecipitation) have been used throughout the project to try to prove the hypothesis proposed. In order to do this, three common variables were used in both tests and three controls were prepared only for the second one. The two named techniques have been taken as a basis and all the procedures we needed to obtain results have been explained.

Subsequent analysis of results seems to indicate that there is an interaction between the named proteins and the involvement of TBC1D15 in autophagic processes. However, it is determined for certain reasons, that the results are not accurate or significant enough. In short, it is necessary to repeat these experimental procedures in order to ascertain the information already published in other scientific texts. All the details that have to do with autophagy should be further investigated, as it is for the moment, a very specialized field which generates more doubts than answers.

ÍNDIX DEL TREBALL

| | |
|--|----|
| 1. Introducció | 6 |
| 2. Justificació | 7 |
| 3. Objectius del treball | 7 |
| MARC TEÒRIC | 9 |
| 1. Introducció a l'autofàgia | 9 |
| 1.1. Christian de Duve i el descobriment del lisosoma | 9 |
| 2. El lisosoma | 11 |
| 2.1 Definició i conceptes bàsics | 11 |
| 2.2 Classificació i formació dels lisosomes | 12 |
| 2.3 Funcions dels lisosomes | 15 |
| 2.4 Patologies relacionades amb els lisosomes i la seva disfuncionalitat | 17 |
| 3. Apoptosi | 21 |
| 3.1 Definició del procés | 21 |
| 3.2 Com es produeix l'apoptosi? | 23 |
| 3.2.1 Les caspases | 23 |
| 3.2.2 Formes d'inducció apoptòtiques | 25 |
| 3.3 Efectes cel·lulars de l'apoptosi | 27 |
| 3.4 Efectes en la formació dels embrions | 28 |
| 3.4.1 Morfogènesi | 28 |
| 3.4.2 Apoptosi com a mecanisme d'estalvi energètic | 29 |
| 3.5 Homeòstasi | 30 |
| 3.6 Malalties i/o patologies relacionades amb l'apoptosi | 30 |
| 4. Autofàgia | 32 |
| 4.1 Yoshinori Ohsumi | 33 |
| 4.2 Tipus d'autofàgia cel·lular | 35 |
| 4.3 Mecanismes d'inducció autofàgica | 37 |
| 4.3.1 Autofàgia selectiva | 38 |

Curs 2020 - 2021

| | |
|---|----|
| 4.3.2 Autofàgia no selectiva | 39 |
| 4.4 Malalties i autofàgia | 40 |
| MARC PRÀCTIC | 42 |
| Introducció | 42 |
| Objectius | 47 |
| Hipòtesi | 48 |
| Variables | 48 |
| 4.1. Variable independent | 50 |
| 4.2. Variables dependents | 50 |
| 4.3. Variables control | 50 |
| 4.4. Grups control | 50 |
| 5. Material i mètodes | 51 |
| 5.1. Preparació | 52 |
| 5.2 Immunofluorescència (dia 4) | 57 |
| 5.3 Coimmunoprecipitació (dia 5) | 60 |
| 5.4 Part final del tractament de les cèl·lules Hek 293T | 61 |
| 6. Resultats | 68 |
| 6.1 Immunofluorescència | 68 |
| 6.2 Coimmunoprecipitació | 70 |
| 7. Anàlisi de resultats | 73 |
| 7.1. Immunofluorescència | 73 |
| 7.2 Coimmunoprecipitació | 75 |
| 8. Conclusions | 77 |
| CONCLUSIONS | 79 |
| Conclusions i valoració del treball | 79 |
| Agraïments | 80 |
| BIBLIOGRAFIA | 81 |
| ANNEXOS | 85 |

Curs 2020 - 2021

| | |
|---|-----|
| Origen i història dels cultius cel·lulars | 87 |
| Tipus de cultius cel·lulars | 95 |
| Avantatges i inconvenients de l'ús de cultius cel·lulars en processos d'investigació | 96 |
| Aplicacions conegudes dels cultius cel·lulars | 99 |
| Protocols de les pràctiques | 100 |



1. Introducció

A partir d'aquest treball de recerca s'ha volgut entrar en el tema de l'autofàgia i de les molècules amb les que es relaciona. S'ha intentat portar a terme una part pràctica útil, utilitzada per a identificar la implicació de certes proteïnes en el procés de degradació i per a mostrar la complexitat mitjançant la qual els processos cel·lulars es regulen.

S'ha intentat fer una relació general entre els coneixements teòrics exposats i la part experimental realitzada. D'aquesta manera s'ha pogut parlar no únicament de processos autofàgics sinó també d'altres reaccions de l'organisme, caracteritzades per assemblar-se en certes característiques als procediments de degradació cel·lular en els que ens hem centrat.

S'ha fet menció dels coneixements que es tenen sobre inducció autofàgica i sobre l'aparició del procés segons les situacions que es donen en cada moment a la cèl·lula. A partir d'això s'ha proposat una hipòtesi, que posteriorment s'ha intentat comprovar per mitjà de tècniques experimentals varies, detallades també en diversos apartats d'aquest projecte.

Curs 2020 - 2021

2. Justificació

L'elecció d'aquest treball va sorgir una mica de forma sobtada.

Feia temps que em plantejava fer un treball de recerca relacionat amb la mort cel·lular provocada per la nicotina del tabac, però sabia que portar a terme una part pràctica que inclogués la participació d'aquesta substància química seria molt difícil.

Durant aquest curs he tingut la sort de participar al programa de Bojos per la Bioquímica, realitzat a la facultat de biologia de la Universitat de Barcelona. Des del programa, em van oferir la possibilitat de realitzar la meua part pràctica als laboratoris de la UB. Per desgràcia, el coronavirus va impedir que això pogués succeir.

Tot i així, el programa em va proporcionar la oportunitat de realitzar la part pràctica al Parc Científic de Barcelona, un lloc que durant l'estiu es va mantenir obert i en el que es donaven les condicions adequades a la situació que s'estava vivint. I així va ser. Allà vaig poder treballar sota la supervisió d'un investigador, que em va recomanar el tema de l'autofàgia, perquè aquest es podia relacionar amb la mort cel·lular tal i com jo desitjava fer.

El fet que es tractés d'un tema nou i relativament poc conegut em causava molta curiositat, i conèixer un dels mètodes que utilitza la cèl·lula per a protegir-se em resultava molt interessant. Així doncs, no vaig dubtar en acceptar la proposta.

3. Objectius del treball

- Comprendre el procés d'autofàgia i la seva implicació a l'hora de participar en un gran nombre de procediments i situacions metabòliques diferents.
- Investigar amb quines molècules es relaciona el procés de degradació i en quin nivell aquestes participen de l'autofàgia.
- Aprendre i entendre els procediments i tècniques de laboratori necessaris per a realitzar una part pràctica adequada, amb l'ús també de cultius cel·lulars.

Curs 2020 - 2021

- Intentar obtenir conclusions adients a un procés cel·lular complex del que encara se'n saben poques coses.
- Arribar al final del treball havent fet una recerca exhaustiva sobre el tema, assolint tots els coneixements que aquest ens pot proporcionar.

MARC TEÒRIC

1. Introducció a l'autofàgia

La paraula autofàgia procedeix dels termes grecs *autos* (un mateix) i *phagein* (menjar), derivant en el seu significat literal de ("menjar-se a un mateix"). El mot va ser formulat per primera vegada pel Premi Nobel Christian de Duve, científic anglès i descobridor del principal component cel·lular implicat en el procés, el lisosoma.

1.1. Christian de Duve i el descobriment del lisosoma

Christian de Duve va néixer a l'octubre del 1917 a Surrey, una petita localitat del sud de Londres. Des de petit, ja mostrava interès pel món científic i per la investigació, tot i que a causa de l'esclat de la segona guerra mundial, va haver de servir per a les forces armades durant un període de temps curt. Durant aquests anys de joventut, va tenir diferents problemes derivats dels conflictes armats de la època, que el van portar a decidir escapar, per a poder reprendre els seus estudis, allò que de veritat li agradava. Després de graduar-se en medicina (1941) i una mica més tard en ciències químiques per la Universitat de Lovaina (Bèlgica), va començar a investigar el mecanisme d'acció de la insulina, que es va convertir al final en el tema principal de la seva tesis doctoral.

Encara que és a Bèlgica a on va passar la major part del temps fent recerca, va mantenir una continuada relació amb l'Institut Rockefeller de Nova York (actualment anomenat Rockefeller University), a on va acabar sent professor i dirigint un nou grup d'investigació cap al 1962.

Curs 2020 - 2021

Allà va ser on va tenir la oportunitat de col·laborar amb Albert Claude, un altre investigador anglès, pioner en les tècniques de fraccionament cel·lular per centrifugació diferencial ¹.

Aquests mètodes van ser els que li van permetre a Duve, separar i concentrar components cel·lulars amb l'objectiu d'analitzar les seves característiques bioquímiques.

Així, es va endinsar en nous aspectes de la investigació cel·lular, que el van conduir a altres enzims i per conseqüència al descobriment d'uns nous orgànuls, els lisosomes (1955).

Les anomenades troballes li van atorgar al 1974 el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina, que va compartir amb Claude i amb un altre científic anomenat George Emil Palade.

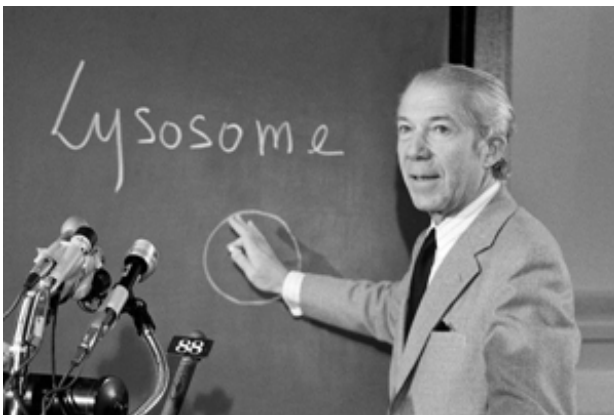


Figura 1. Christian de Duve (1917-2013) durant la investigació que el va portar a descobrir un orgànu vital per al bon funcionament de la cèl·lula.

(Font: <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/descubrimiento-del-lisosoma-y-peroxisoma/> / crèdits: Meyer Liebowitz/The New York Times)

¹ Procés de separació que permet classificar components cel·lulars en funció de la seva mida i densitat: els més grans i densos migren ràpidament cap al fons i sedimenten a velocitats relativament baixes.

Curs 2020 - 2021

Abans de descriure el procés d'autofàgia, cal conèixer l'òrganul principal que el fa possible i un dels processos (apoptosi) que d'una altra forma, també es relaciona directament amb aquest.

2. El lisosoma

2.1 Definició i conceptes bàsics

Els lisosomes són un tipus específic d'òrganul membranós que podem localitzar al citoplasma cel·lular animal ². A dins d'aquests s'hi troben els enzims, les molècules encarregades de realitzar processos metabòlics vitals basats en la degradació i en la hidròlisi de substàncies.

En estat inactiu, els lisosomes presenten una aparença arrugada, aspecte que varia a partir de la seva activació i que dóna lloc a una forma vesicular molt característica i a un augment de mida considerable. El nombre de lisosomes varia en funció del tipus de cèl·lula i de l'activitat cel·lular. Aquesta, permet realitzar el metabolisme ³ o digestió intracel·lular de forma controlada.

Les dues parts més destacables d'aquestes estructures cel·lulars són d'una banda els enzims, que tot i que tenen la mateixa funció, s'especialitzen en la hidròlisi de substàncies diferents (els més comuns són les lipases, les glucosidases, les proteases i les nucleases, que digereixen lípids, carbohidrats, proteïnes i àcids nucleics en aquest ordre) i d'altra banda la membrana lisosòmica, una bicapa lipídica formada en la seva majoria per fosfolípids i proteïnes, que es troben en contacte amb la part interna de l'òrganul formant glucolípid i glucoproteïnes. Aquests compostos interiors són vitals per a la protecció de les nostres unitats funcionals, ja que són els encarregats d'impedir la dispersió dels enzims pel citoplasma, lloc en el que podrien perillar altres òrganuls i/o molècules necessaris per a la cèl·lula. Algunes de les proteïnes actuen també com a transportadors de

² Fluid granulós i fi que ocupa l'àrea existent entre el nucli cel·lular i la membrana plasmàtica.

³ Conjunt de reaccions bioquímiques i processos fisicoquímics que tenen lloc a l'interior de la cèl·lula.

Curs 2020 - 2021

membrana, proporcionant la via a partir de la qual els productes resultants de la digestió passen al citosol ⁴.

La membrana conté alhora una bomba de protons, que utilitza ATP com a font d'energia necessària per a impulsar H^+ internament. Això dona lloc al manteniment del pH àcid propi de la zona interior del lisosoma.

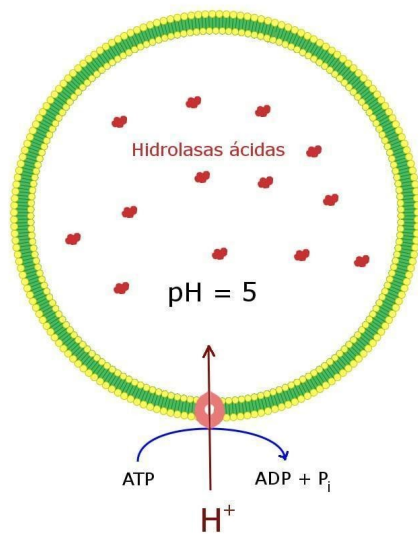


Figura 2. Mostra de l'ús d'ATP com a mètode per a impulsar hidrogenions en direcció a l'interior lisosomal mitjançant proteïnes transportadores de membrana. (Font: https://biologia-geologia.com/biologia2/6921_lisomas.html / crèdits: Alejandro Porto)

2.2 Classificació i formació dels lisosomes

Tot i que sembla que ens referim constantment a una sola estructura, és important tenir en compte l'existència de dos tipus de lisosomes, que es classifiquen segons l'estat de degradació de les molècules que contenen (instant "evolutiu" en el que es troben):

⁴ Líquid constituent de la majoria del fluid intracel·lular, localitzat a dins de les cèl·lules i separat per membranes en diferents compartiments.

Curs 2020 - 2021

- **Lisosomes primaris:** són aquells que s'acaben de formar i que encara no han intervingut en ningun procés de digestió. Provenen de les vesícules de la cara *trans* (cara de sortida) de l'aparell de Golgi⁵.

Els enzims, sintetitzats al reticle endoplasmàtic rugós, viatgen fins al sistema de Golgi, mitjançant transport vesicular⁶. Allà hi pateixen el procés de glicosilació terminal⁷, del qual en resulten amb noves cadenes glucídiques riques en monosacàrids. Els monosacàrids són capaços d'actuar com a marcadors moleculars, dirigint els enzims cap a les rutes lisosòmiques.

El mecanisme de formació dels lisosomes primaris, per tant, és un procés complex que inclou la participació de moltes molècules diferents. Unes són les encarregades de passar per processos de maduració extensos que deriven en la formació de les estructures conegudes del lisosoma. Les altres, són les que proporcionen les hidrolases àcides característiques de l'òrganul. Els nous lisosomes obtinguts, compleixen amb dues funcions bàsiques, que recauen en formar lisosomes secundaris o en excretar el seu contingut enzimàtic directament a l'exterior.

- **Lisosomes secundaris:** són aquells que es formen a partir de la unió entre un lisosoma primari i qualsevol vacúol que requereixi la digestió de molècules orgàniques. Segons el material implicat i l'origen de la vesícula fusionada, reben diferents noms:

A) Fagolisosomes, vacúols digestius o heterofàgics: procedeixen de la unió entre un lisosoma primari i un fagosoma⁸ o pinosoma⁹.

⁵ Sistema encarregat de moltes funcions diferents que van des del transport, maduració, acumulació i secreció de proteïnes fins al desprendiment de petites bossetes (lisosomes o vesícules de secreció d'una altra tipologia) plenes de substàncies.

⁶ Comunicació mediada per vesícules (transporten molècules interiorment o incloses en les seves membranes) que existeix entre molts òrganuls cel·lulars.

⁷ Procés en el que els compostos un carbohidrat a la seva estructura.

⁸ Vesícula citoplasmàtica limitada per una membrana i creada a partir de la invaginació de partícules sòlides de més de 0,5 micròmetres de diàmetre provinents de l'exterior de la cèl·lula.

⁹ Vesícula citoplasmàtica limitada per una membrana i creada a partir de la invaginació de petites partícules, ionitzades en alguns casos.

Curs 2020 - 2021

Es troben per exemple als glòbuls blancs, un conjunt de cèl·lules sanguínies capaces de fagocitar ¹⁰ unes determinades partícules, que després són digerides pels enzims que contenen aquests mateixos glòbuls blancs, executors de la resposta immunitària.

B) Endosomes tardans: procedeixen de la fusió entre un lisosoma primari i una vesícula gran, obtinguda mitjançant el procés d'endocitosi ¹¹ i anomenada endosoma primari.

C) Autofagolisosomes o autolisosomes: procedeixen de la fusió entre un lisosoma primari i alguna part de la cèl·lula, que pel mal funcionament d'aquesta o per necessitats energètiques, serà degradada.

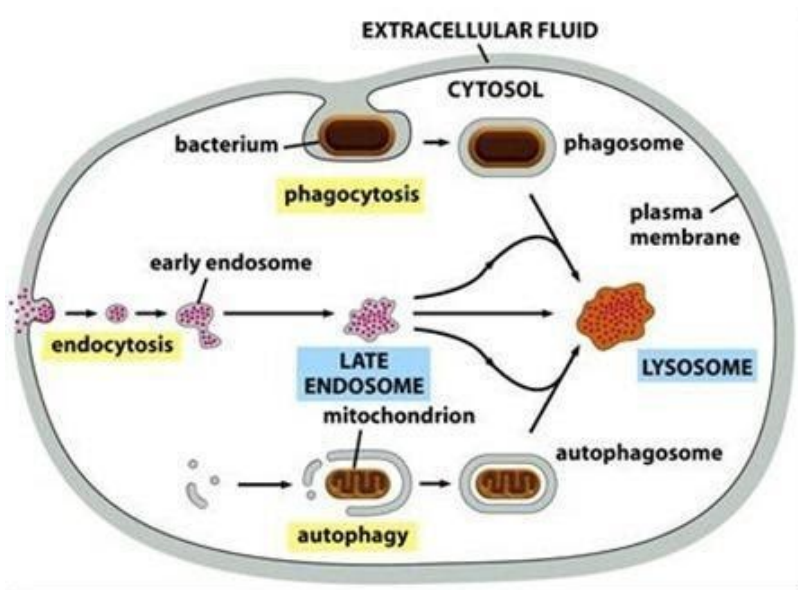


Figura 3. Mostra de les diferents entrades per les que arriba el material que ha de ser degradat a la cèl·lula i que s'unirà al lisosoma per a tal procés (Font:

<https://factslegend.org/55-endocytosis-endosome-facts-homework/>)

¹⁰ Capturar i digerir molècules sòlides a través de la fagocitosi.

¹¹ Mecanisme mitjançant el qual la cèl·lula capta material de l'espai extracel·lular cap al seu interior.

Curs 2020 - 2021

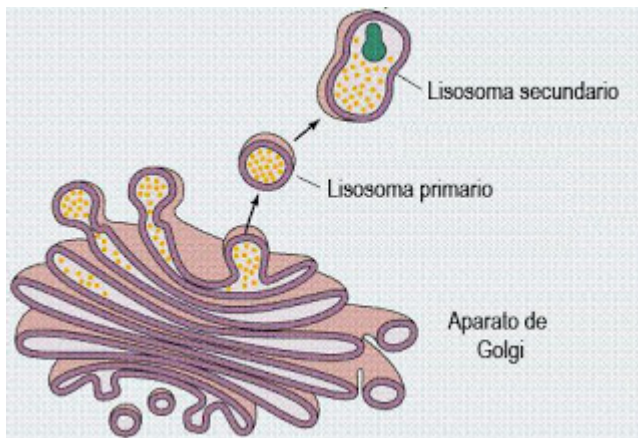


Figura 4. Mostra de l'evolució del lisosoma primari des que es forma fins que s'uneix al material que ha de ser degradat, formant el lisosoma secundari. (Font: <https://www.ecured.cu/Lisosomas>)

Després de formar part de la digestió realitzada pels enzims del lisosoma, el material degradat travessa la membrana de l'òrganul, amb l'objectiu de ser aprofitat per la cèl·lula. El que queda del lisosoma secundari després de l'absorció és un cos residual que conté substàncies de rebuig no digeribles i que per conseqüència només tindran la possibilitat de seguir dos camins. Podran d'una banda ser exocitades i expulsades en direcció a l'exterior de la cèl·lula o bé, es podran anar acumulant al citosol a mesura que la cèl·lula envellaix, arribant a produir a la llarga la mort cel·lular o apoptosi.

2.3 Funcions dels lisosomes

Els lisosomes exerceixen funcions molt importants per a l'organisme, algunes de les quals s'especifiquen a continuació:

A) Degradació de substàncies:

La principal funció dels lisosomes és digerir substàncies. Aquestes, poden provenir de l'exterior de la cèl·lula, o poden estar situades al citoplasma d'aquesta. Les molècules internes, tendeixen a ser components que la cèl·lula ja no precisa i que es poden degradar en unitats inferiors. Amb els lisosomes, es facilita la reducció de la complexitat de les substàncies, amb l'objectiu de que resulti més fàcil la seva eliminació.

Curs 2020 - 2021

Els orgànuls també porten a terme la digestió interna autofàgica, la qual es dona en el cas que la cèl·lula estigui danyada o en situacions extremes d'estrès. Per mitjà d'aquest fenomen, es produeix la formació de vesícules anomenades autofagosomes, que tenen la capacitat de fusionar-se amb els lisosomes i que per conseqüència poden ser tractades amb alt contingut enzimàtic, provinent de l'orgànul anomenat. El resultat de tal degradació pot alliberar unitats simples de compostos, que es reciclaran al citoplasma i que podran fins i tot servir com a nutrients en casos extrems de manca d'aliment.

Tot aquest procés ve determinat de certa manera per la funció que exerceix el lisosoma com a sensor metabòlic. L'orgànul ens indica la seva participació en la percepció de l'estat metabòlic de la cèl·lula i per conseqüència detalla la seva capacitat de reconeixement de l'estat de disponibilitat de recursos cel·lulars que existeix en cada moment. És precisament una falta de recursos detectada, la causa del possible inici d'un procés autofàgic destinat a la obtenció de nutrients.

B) Endocitosi i fagocitosi:

Els lisosomes, tal i com ja hem dit, són capaços d'unir-se i de degradar partícules i molècules que provenen de l'exterior de la cèl·lula. Aquesta incorporació de material, que quedarà posteriorment englobat per porcions de membrana plasmàtica en forma d'invaginacions, i que en tancar-se, quedarà a l'interior cel·lular (sobretot en forma de vesícules) rep el nom d'endocitosi. Un dels tipus d'endocitosi més coneguts, i que es relaciona directament amb els lisosomes, és la fagocitosi. Aquesta esdevé una via pròpia, i ve donada per noves molècules, que seran ingerides o captades a partir de vacúols fagocítics, denominats fagosomes. Aquests tindran la propietat de poder fusionar-se amb els lisosomes i per tant de poder degradar el contingut corresponent. El procediment anomenat, serà un mètode de defensa cel·lular, que permetrà protegir el cos de patògens externs a partir de la seva eliminació, o bé mitjançant l'alliberació d'enzims lisosomals directament al medi extracel·lular o bé a partir de la formació de

Curs 2020 - 2021

vesícules, que seran destruïdes, activant a la vegada la resposta immunològica de l'organisme, com en el cas dels glòbuls blancs o limfòcits.

C) Exocitosi:

Amb l'experiència adquirida durant els últims anys, s'ha intentat demostrar que els lisosomes tenen la capacitat de participar també en un gran nombre de processos d'exocitosi ¹². Es proposa des de fa temps que les cèl·lules eucariotes són capaces d'eliminar les substàncies que per alguna raó no poden ser degradades, i això només seria possible a partir de l'expulsió del material mitjançant la fusió del lisosoma amb la membrana plasmàtica com a mètode per a alliberar el seu contingut a la part exterior de la cèl·lula.

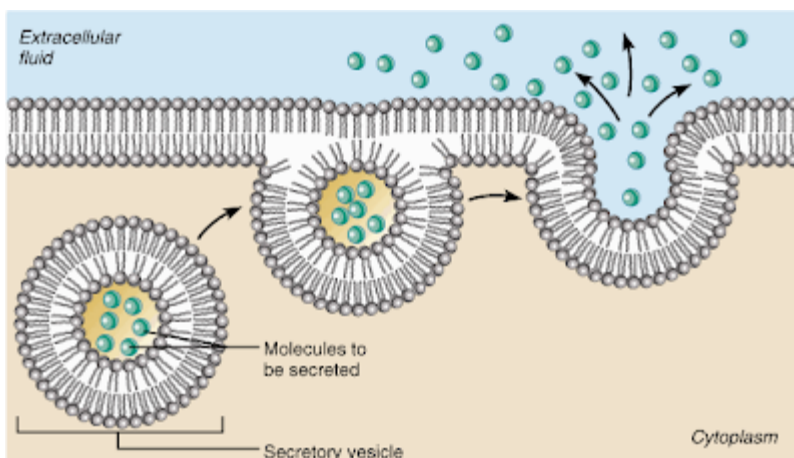


Figura 5. Mostra del procés d'exocitosi cel·lular. (Font:

<https://sites.google.com/site/cienciesdelavida/funcions-cel-lulars/transport>)

2.4 Patologies relacionades amb els lisosomes i la seva disfuncionalitat

Amb el temps s'han anat descobrint un gran nombre de malalties relacionades amb els lisosomes i les seves funcions. Actualment ja es coneixen més de 60 patologies associades a aquests orgànuls, les quals constitueixen un grup variat de trastorns del

¹² Eliminació de substàncies del medi intern de la cèl·lula.

Curs 2020 - 2021

lisosoma determinats de forma genètica (hereditaris) i que per la seva escassa incidència, són catalogats com a malalties minoritàries.

La causa principal d'aquesta alteració ve donada per la impossibilitat que pateix l'organisme de degradar les macromolècules necessàries degut majoritàriament a un defecte funcional d'alguns dels 40 enzims que conté el lisosoma. Aquest mal funcionament, provoca l'acumulació no desitjada de substàncies en òrgans i teixits, amb la conseqüent aparició de problemes com la neurodegeneració, l'activitat metabòlica anormal, la inhibició exagerada del creixement, les deformitats esquelètiques, la disfunció de pulmons, fetge i altres, i en certes situacions, la mort a edats primerenques.

Aquests tipus de desordres anomenats, són progressius, mortals i incurables a la llarga. L'únic tractament específic disponible de moment el constitueixen les teràpies de reemplaçament enzimàtic, les quals consisteixen en l'aplicació de proteïnes recombinants al pacient per via intravenosa cada una o dues setmanes, suplint així la falta o la deficiència del o dels enzims corresponents.

Els diferents grups de malalties lisosòmiques es classifiquen segons l'enzim deficient i el tipus de substància aglomerada.

Els més comuns són:

- Glicogenosis: grup de patologies caracteritzades per defectes enzimàtics que impedeixen la degradació del glicogen i el correcte funcionament del seu metabolisme.

Una de les glicogenosis més conegudes és la de tipus II, també anomenada malaltia de Pompe o deficiència de maltasa àcida:

Curs 2020 - 2021

És un trastorn metabòlic autosòmic ¹³ recessiu ¹⁴ provocat per l'acumulació de glicogen al lisosoma. Això ve donat per la deficiència de l'enzima lisosomal alfa-glucosidasa àcida. Es tracta d'una malaltia muscular molt estranya i debilitant, que afecta tan a nens com a adults i que mentre en la infància es manifesta durant els primers mesos, en etapes més adultes pot aparèixer de forma sobtada, tenint una progressió més lenta. Els pacients o afectats presenten símptomes basats en el dolor muscular sever i en l'aparició de problemes respiratoris complicats. Se sap, a més, que la malaltia es presenta en totes les races però que és sobretot comuna entre la població infantil afroamericana.

- Esfingolipidosis: grup de condicions mèdiques que involucren el metabolisme i l'emmagatzematge anormal de fosfolípids.

Algunes de les malalties que deriven de les esfingolipidosis, que en la seva majoria poden provocar danys cerebrals (discapacitats intel·lectuals) i mort prematura, són la de Krabbe, la de Tay-Sachs, la de Gaucher i la de Niemann-Pick. Aquesta última, per exemple, és un trastorn neurològic, genètic i hereditari. Ve donat per l'acumulació de lípids causada per la falta de l'enzim esfingomielinasa. Sense aquesta substància, l'acumulació anormal de diferents compostos que contenen colesterol i esfingomielina es fa evident en molts teixits de l'organisme, que inclouen com ja hem dit els del sistema nerviós central (encèfal i medul·la espinal) però també el fetge, la melsa i la medul·la òssia.

- Mucopolisacaridosis: grup de malalties metabòliques hereditàries causades per la falta o la disfunció d'enzims necessaris per al processament d'unes molècules anomenades glicosaminoglicans.

¹³ Dit del gen, al·lel o caràcter localitzat en un autosoma (qualsevol cromosoma que no s'identifiqui amb els de tipus sexual).

¹⁴ Es diu d'un caràcter hereditari que tan sols es manifesta si el gen que n'és responsable es troba repetit.

Curs 2020 - 2021

Un dels exemples del grup de malalties de les mucopolisacaridosis és la mucopolisacaridosi tipus 1, també anomenada malaltia de Hurler. Aquesta patologia és una de les més greus d'aquest grup d'afeccions i es caracteritza per l'aparició d'anomalies esquelètiques, deteriorament cognitiu, problemes cardíacs i respiratoris, augment de la mida del fetge i de la melsa, aspectes facials molt determinats i esperança de vida reduïda.

Existeixen altres grups coneguts de malalties de dipòsit lisosomal, com per exemple les lipidosi. Aquestes formen un grup de trastorns metabòlics en els que una gran quantitat de lípids són acumulats en algunes de les cèl·lules del cos, per la falta d'enzims funcionals que serveixin per a degradar-los. Aquests tipus de patologies també poden arribar a produir vòmits, diarrea, distensions abdominals...

La malaltia de Wolman és una de les lipidosi més conegudes i ve donada pel dèficit de l'enzim lipasa àcida (encarregada de degradar triglicèrids), la producció de la qual es troba codificada al braç llarg del cromosoma 10. La falta de l'enzim dona lloc a la manifestació de símptomes notables sobretot durant les primeres setmanes de vida dels nadons. Aquests inclouen vòmits, diarrea, expansió del fetge i de la melsa, distensió abdominal...

Curs 2020 - 2021

Els lisosomes, tot i que no com a funció principal, participen en altres processos cel·lulars, un dels quals ens interessa especialment per la semblança que de primeres presenta amb l'autofàgia. Aquest, rep el nom d'apoptosi.

3. Apoptosi

3.1 Definició del procés

El funcionament de tots els organismes vius es basa en la intenció de trobar un equilibri entre el creixement i la mort cel·lular. Aquest equilibri afavoreix al correcte

Curs 2020 - 2021

desenvolupament de les nostres cèl·lules, aspecte que permet que aquestes portin a terme les seves funcions i que evita l'acumulació d'errors perjudicials en cèl·lules danyades o envellides.

L'apoptosi, també anomenada "mort cel·lular programada", és un procés bioquímic natural, que s'ha conservat evolutivament en la majoria d'espècies i que comporta la mort i la posterior renovació de les cèl·lules d'un organisme.

Aquesta forma d'operar ve codificada dins de la informació genètica de la pròpia cèl·lula, és a dir, ella mateixa de certa forma determina com i quan ha de ser eliminada, en funció de les senyals que rep tan interiorment com per part del que es troba al seu entorn. S'estableix, per tant, un procediment molecular d'autodestrucció.

L'apoptosi, tot i que podria semblar un procediment negatiu per a la cèl·lula, és molt necessària i útil, ja que beneficia a l'organisme en la seva totalitat (pot per exemple permetre que certs òrgans es desenvolupin, com en el cas dels dits durant el procés de desenvolupament dels embrions o també eliminar en altres casos cèl·lules cancerígenes potencials). Per aquesta raó diem que el paper de l'apoptosi és important en molts processos fisiològics ¹⁵ i patològics ¹⁶ dels organismes pluricel·lulars.

Alguns d'aquests procediments poden ser per exemple la morfogènesi ¹⁷ d'òrgans i teixits durant el desenvolupament embrionari, la que permet el manteniment i regeneració de fragments tissulars adults, la que ve donada per la resposta a agents patògens (regulació del sistema immunitari) i la que es produeix com a reacció envers a l'estrès o a una malaltia com el càncer.

D'altra banda però, un error o trastorn en el funcionament dels gens responsables de l'apoptosi podria comportar un conjunt de determinades disfuncions, com és el cas de la transformació i progressió de tumors, entre d'altres.

¹⁵ Processos que tenen a veure amb els òrgans dels éssers vius i el seu funcionament.

¹⁶ Processos relacionats amb l'estudi de la composició, l'estructura i la forma de teixits i òrgans malalts.

¹⁷ Desenvolupament de la forma o de l'estructura d'un organisme o d'una part d'aquest organisme.

Curs 2020 - 2021

3.2 Com es produeix l'apoptosi?

Si l'apoptosi es basa en la idea d'eliminar qualsevol tipus d'error cel·lular, podem afirmar que s'oposa a la mitosi. Per conseqüència, cal conèixer la seva relació amb el cicle cel·lular. El cicle cel·lular consta de quatre fases: la mitosi (M), la fase de control cel·lular (G1), la síntesi d'ADN (S) i la fase de control G2. L'apoptosi, com a mètode de protecció, pot iniciar-se durant la part final de la G1 per a impedir que una cèl·lula danyada comenci la fase de síntesi (així s'aconsegueix que les mutacions no es reproduïen durant la replicació de l'ADN) i durant la G2, amb l'objectiu d'interrompre l'entrada a la mitosi de les cèl·lules que encara no han arribat a la maduresa.

Tot el procés apoptòtic convergeix en un procediment molecular mediat per uns enzims específics i reguladors, que reben el nom de caspases.

3.2.1 Les caspases

Les caspases són enzims ¹⁸ que es sintetitzen i s'alliberen al citosol en forma de procaspases, les mateixes proteïnes en estat inactiu. Aquestes (a partir de la seva activació) són les principals encarregades de degradar tot el contingut que roman a l'interior de la cèl·lula, acció que a continuació conduirà a la seva mort.

Com ja hem dit, es troben a la cèl·lula com a precursors inactius. Aquestes necessiten ser tallades per a iniciar la seva activitat i es caracteritzen per estar distribuïdes en dos grans grups, les denominades iniciadores i les que reben el nom d'executores. Les caspases iniciadores són activades mitjançant un procés d'autoproteòlisi ¹⁹ quan són transportades a compartiments específics. Les executores, d'altra banda, s'activen mitjançant el tall concret que els hi proporcionen les mateixes caspases iniciadores.

¹⁸ Molècula produïda per les cèl·lules vives de l'organisme, que afavoreix i regula les reaccions químiques en els éssers vius:

¹⁹ Destrucció d'un òrgan o d'un teixit per acció d'enzims proteolítics produïts per aquelles mateixes estructures.

Curs 2020 - 2021

Aquestes proteases ²⁰ executores, són les que han de trencar els enllaços peptídics ²¹ finals dels substrats que acaben provocant que de certa manera l'apoptosi acabi de tenir lloc, és a dir, finalitzi.

Les caspases que s'activen inicialment son la 2, la 8, la 9 i la 10, mentre que les efectores són la 3, la 6 i la 7. N'hi ha d'altres que realitzen funcions més concretes, com la 14, que només s'expressa durant el desenvolupament embrionari dels nadons. Dins de les executores, la 3 és una de les més importants, perquè té la capacitat d'activar l'endonucleasa CAD, l'enzim encarregat de degradar la cromatina (forma en què es presenta l'ADN al nucli cel·lular) i d'afectar a la organització del citoesquelet ²², provocant posteriorment el trencament de la cèl·lula en fragments més petits i independents.

L'activació de les primeres caspases produeix una mena de mecanisme cascada que permet que aquestes activin a les següents, donant-se una reacció en cadena i exponencial. Aquest procediment consecutiu, acaba portant a la degradació total de cada un dels components cel·lulars.

²⁰ Enzims encarregats de la hidròlisi de proteïnes.

²¹ Enllaç que uneix dues proteïnes diferents i que es forma entre el grup amino d'un aminoàcid i el grup carboxil del següent.

²² Conjunt tridimensional de proteïnes de proporciona suport intern a les cèl·lules, organitza estructures internes i intervé en fenòmens de transport, tràfic i divisió cel·lular.

Curs 2020 - 2021

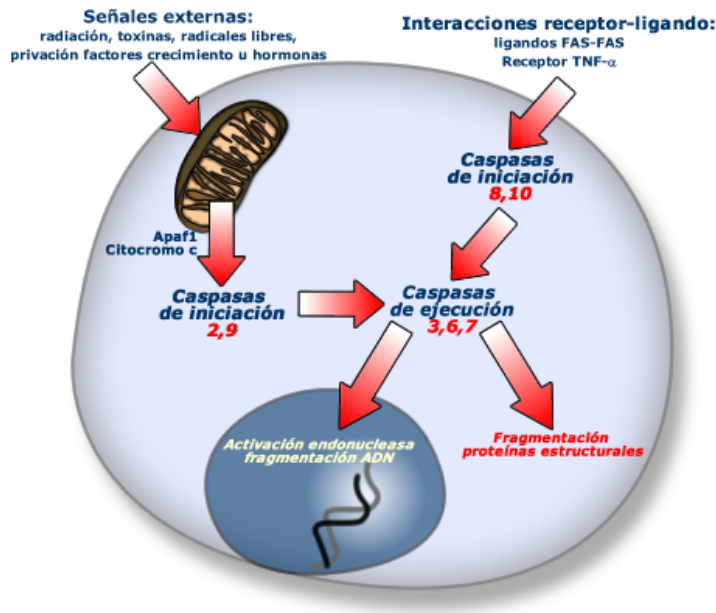


Figura 6. Representació de les caspases més importants implicades en el procés d'apoptosi i per tant en la degradació de tots els components cel·lulars.

(Font: <http://gmot.uib.es/moleculas/caspasas/caspasas.html>)

3.2.2 Formes d'inducció apoptòtiques

- **Receptors. Senyals externes:**

La via d'iniciació de l'apoptosi a partir de senyals externes comença amb l'activació de receptors localitzats a la membrana plasmàtica. Aquests receptors s'anomenen receptors de mort i són membres de la família de receptors coneguts com a TNF (*tumor necrosis factors*). Cada receptor s'activa amb una senyal característica, l'arribada de la qual provoca l'associació de receptors membranosos que a la vegada disparen la captació de proteïnes a la zona interior de la cèl·lula.

Aquestes proteïnes, són capaces d'associar-se amb procaspases, creant un ambient que permet desencadenar l'autoproteòlisi d'aquestes i per conseqüència la conversió a caspases. En el moment en què té lloc cada un d'aquests passos, el procés de degradació es pot considerar activat.

Curs 2020 - 2021

- **Estrès. Senyals internes:**

Aquesta via comporta l'aparició d'una sèrie d'estímuls relacionats amb la desaparició o augment de certes característiques. La falta de factors de supervivència, pot disparar per exemple l'apoptosi, igual també que un increment exagerat sobre les cèl·lules de radiació, temperatura, substàncies tòxiques... Tots aquests canvis en conjunt, poden acabar alterant la membrana interna del mitocondri ²³, donant lloc a l'obertura de porus en la seva estructura, modificant el potencial elèctric d'aquesta i produint l'alliberació de diverses molècules apoptòtiques. Aquestes, conjuntament amb altres compostos, formen nous complexos que poden arribar a activar procaspases, iniciant el procés de degradació.

A més, des del mitocondri també s'alliberen enzims en altres etapes de l'apoptosi, que es dirigeixen al nucli i que provoquen una primera digestió de l'ADN, o proteïnes denominades Bcl, que poden modular, disparar o inhibir el mecanisme d'inici de l'apoptosi, depenent del lloc de la cèl·lula en el que estiguin situades. Les que col·laboren amb l'activació de l'apoptosi tendeixen a trobar-se a la membrana mitocondrial externa, mentre que les que col·laboren amb la inhibició del procés, es perceben al citosol principalment i suposen un perill per a la cèl·lula, ja que un "aturament" de l'apoptosi podria provocar que els errors que pugin sorgir, evolucionin donant lloc a tumors...

- **Apoptosi mediada per limfòcits T citotòxics:**

Els limfòcits T citotòxics ²⁴ són capaços de produir l'apoptosi de certes cèl·lules que han estat infectades per patògens a partir de dos procediments diferents. Un d'ells inclou l'activació dels receptors de mort com a mètode per a activar la successió de passos que dona lloc al "suïcidi" cel·lular. L'altre, es relaciona amb la creació d'un porus en la membrana cel·lular, que permet la introducció d'una molècula capaç d'activar l'apoptosi des del propi citosol.

²³ Orgànel·le del citoplasma responsable de la respiració cel·lular.

²⁴ Cèl·lules que provoquen l'apoptosi cel·lular

Curs 2020 - 2021

Els limfòcits T citotòxics posseeixen uns grànuls que contenen dos tipus de proteïnes molt importants: les perforines i els granzims. El contingut d'aquests grànuls és alliberat quan un limfòcit detecta la presència d'una cèl·lula infectada o quan la reconeix com a tumoral. El procés resumit funciona de la següent manera: la perforina crea un porus a la membrana que permet l'entrada de granzims en direcció al citoplasma. Aquests granzims (n'hi ha de dos tipus) activen diverses procaspases (que per conseqüència esdevenen caspases) i a la vegada el mitocondri, per a que tingui lloc la iniciació del procés apoptòtic.

3.3 Efectes cel·lulars de l'apoptosi

Durant l'apoptosi tenen lloc un gran nombre de canvis diversos que permeten recollir informació relacionada amb com d'avançat pot estar el procés de suïcidi cel·lular, segons les característiques observades. Una de les transformacions més obvies recau en la modificació de la mida de la cèl·lula, tornant-se aquesta més petita a partir d'un encongiment progressiu que té inici ja des que l'apoptosi comença. El citoplasma, d'altra banda, esdevé més dens, els orgànuls comencen a ajuntar-se en petites estructures en forma de paquet i s'adverteix alhora una certa condensació de la cromatina, aspecte que sense dubte esdevé un indicatiu que presenta la imminent mort cel·lular.

A continuació es produeixen elevats plegaments membranosos que permeten que la cèl·lula es divideixi en porcions independents denominades cossos apoptòtics. Aquests, com a unitats autònomes, segueixen mantenint una part de la capa protectora que anteriorment envoltava la cèl·lula en la seva totalitat). Les anomenades porcions són posteriorment fagocitades per macròfags, és a dir, digerides i destruïdes per un tipus de glòbuls blancs pertanyents al nostre sistema immunitari ²⁵. El ràpid reconeixement dels cossos apoptòtics per part dels macròfags es produeix gràcies a receptors de membrana, substàncies que de certa manera actuen com a senyals o marcadors per a guiar les cèl·lules, que els podran detectar de forma específica. Aquests marcadors són

²⁵ Conjunt d'estructures i processos biològics que tenen els organismes per a protegir-se contra les malalties.

Curs 2020 - 2021

normalment el lípid fosfatidilserina, que es situa a la part interna de la membrana, l'anexina I i la calreticulina. La falta de receptors i per conseqüència la inhibició de l'activitat dels macròfags, podria comportar el desencadenament de respostes inflamatòries pel trencament de cossos apoptòtics, que podria derivar conseqüentment en la recuperació de cèl·lules que estaven destinades a morir. Això és perillós en molt aspectes, sobretot tenint en compte que un error en l'apoptosi o més aviat la resistència al procés, pot contribuir a la generació de tumors i/o d'altres patologies.

3.4 Efectes en la formació dels embrions

3.4.1 Morfogènesi

Potser l'exemple clàssic i més comú de la participació de l'apoptosi en la morfogènesi d'un òrgan durant el desenvolupament embrionari és l'eliminació de les membranes interdigitals. Els dits estan inicialment connectats per masses de cèl·lules que després són eliminades, resultant en la forma final que tots coneixem. El procés i les seves característiques varien bastant segons l'espècie. Es pot demostrar amb l'exemple de l'ànec, una tipologia d'animal en la que l'apoptosi és escassa, o amb el de l'amfibi, en el que l'apoptosi proporciona una reorganització del cervell i del sistema digestiu i elimina la cua característica d'altres éssers vius.

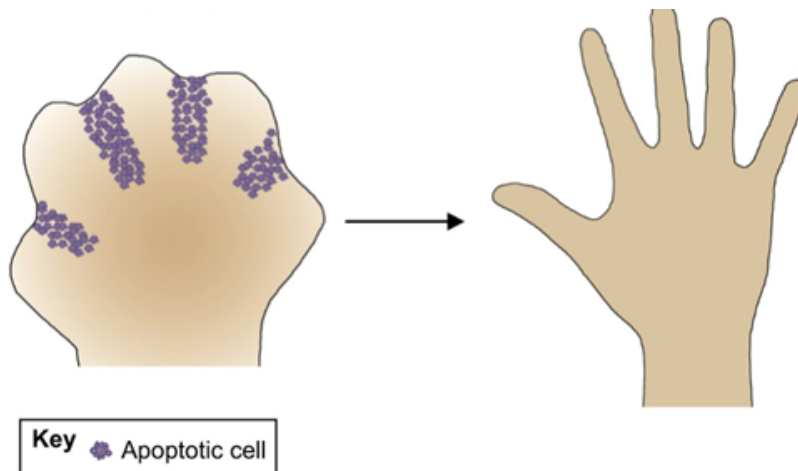


Figura 7. Participació del procés d'apoptosi en la morfogènesi embrionària que permet la pèrdua de les membranes que uneixen els dits durant l'època embrionària, donant com a resultat la formació de les falanges que tots coneixem. (Font: <https://app.emaze.com/@AOZIWZORF#1> / Universidad regional autónoma de los andes "uniandes")

3.4.2 Apoptosi com a mecanisme d'estalvi energètic

S'ha pogut demostrar matemàticament que és menys costós en termes d'informació sobreproduir inicialment elements d'estructura tosca i després eliminar els excessos per a obtenir una forma final més precisa, que no generar l'estructura adequada en un primer moment.

Un exemple d'aquest tipus de processos podria ser el del sistema nerviós. Aquest gasta una quantitat d'informació per a establir connexions inicials simples molt més baixa que la que requeriria per a generar les finals, que ja són definitives. El procés d'apoptosi esdevé bàsic com a mètode per a eliminar les connexions incorrectes i per tant les neurones que no hagin estat capaces d'establir associacions funcionals.

D'aquest tipus de procediments n'hi ha uns quants, tots influenciats pels avantatges que presenta la participació de l'apoptosi com a recurs essencial d'estalvi energètic.

Curs 2020 - 2021

3.5 Homeòstasi

En un organisme adult, la quantitat de cèl·lules que formen part d'un òrgan o teixit han de romandre constants, dins de certs límits concrets. Les cèl·lules de la sang i de la pell, per exemple, són constantment renovades per les seves respectives cèl·lules progenitores. Aquesta mateixa proliferació de noves cèl·lules ha de ser compensada per la mort d'unes altres.

Aquest procés anomenat, rep el nom d'homeòstasi. L'homeòstasi s'aconsegueix en la seva totalitat quan la relació entre la mitosi * i la mort cel·lular es troba en equilibri. Si aquest equilibri es trenca, poden passar dues coses:

- Les cèl·lules es divideixen més ràpid que no pas moren, donant com a resultat el possible desenvolupament d'un tumor.
- Les cèl·lules es divideixen més a poc a poc que no pas moren, produint-se per conseqüència un grau trastorn de pèrdua cel·lular.

Les característiques d'ambdues situacions, independentment de la que sorgeixi com a resultat del trencament de l'equilibri, acaba donant lloc a processos fatals o potencialment perjudicials.

3.6 Malalties i/o patologies relacionades amb l'apoptosi

Les malalties relacionades amb l'apoptosi es divideixen de forma simple en dos grups: el primer tracta les patologies que venen donades per un increment en el nivell de supervivència cel·lular (sovint lligat a la inhibició de l'apoptosi) i el segon les que venen provocades per un increment en la mort cel·lular (per tant lligat a un tipus d'apoptosi hiperactiva).

Malalties associades a la inhibició de l'apoptosi: aquest grup inclou les malalties provocades per l'acumulació excessiva de cèl·lules, deguda a la falta de processos apoptòtics. Algunes de les patologies més destacables són:

Curs 2020 - 2021

1. **Càncer:** s'ha pogut demostrar a partir de l'estudi d'un ampli grup de tumors que l'aparició de cèl·lules cancerígenes respon de forma anòmala a la inducció de l'apoptosi.

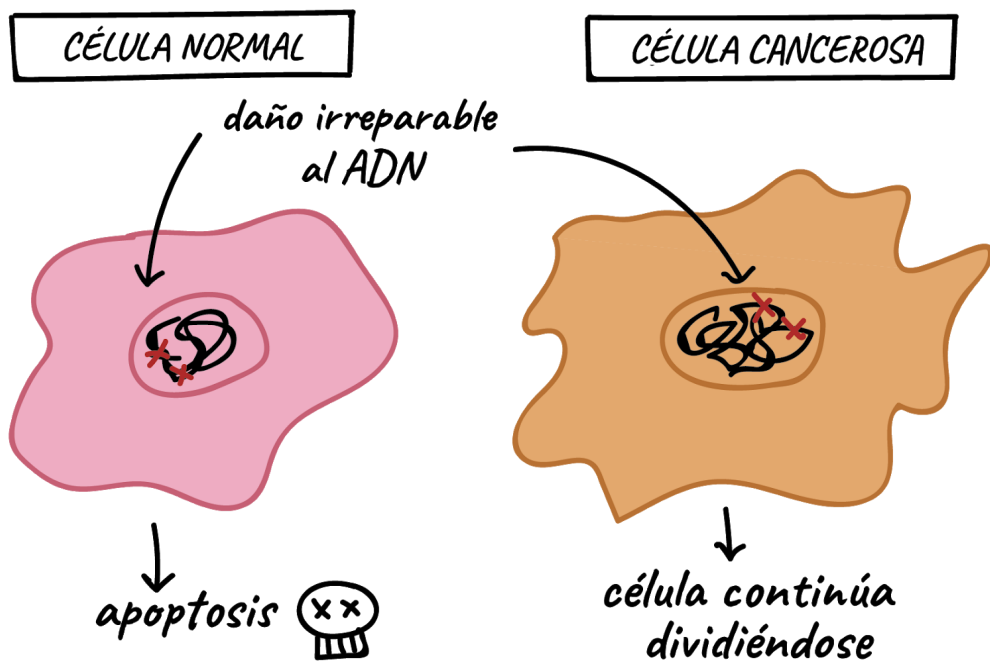


Figura 8. Mostra de la situació que provoca la inhibició de l'apoptosi. (Font: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cancer>)

2. **Autoimmunitat:** Tant en models animals (sobretot ratolins) com en persones s'ha demostrat que moltes malalties autoimmunes s'accionen per mutacions en gens que fan als limfòcits resistents a l'apoptosi.
3. **Infeccions víriques:** Es coneixen diferents virus capaços d'inhibir qualsevol procés apoptòtic que pugui portar a terme la cèl·lula infectada, derivant en la perpetuació de la cèl·lula hoste i per tant en la seva infecció.

Malalties associades a un increment de processos apoptòtics:

1. **Malalties neurodegeneratives:** un ampli grup de malalties neurodegeneratives, entre les que s'inclouen l'Alzheimer, el Parkinson i

Curs 2020 - 2021

l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) per exemple, s'associen amb l'apoptosi selectiva de neurones. Aquesta mort neuronal sembla associar-se a un increment en la susceptibilitat a l'apoptosi que té lloc en aquestes cèl·lules. Com a agents inductors de la mort neuronal s'esmenten defectes mitocondrials i substàncies neurotòxiques, entre d'altres.

2. **Malalties hematològiques:** S'ha detectat que la presència de factors relacionats amb la nutrició alterats o en nivells anormals afavoreix a l'acumulació de formes de cèl·lules sanguínies immadures que no són regulades de forma eficaç.
3. **Apoptosi en malalties amb dany tissular:** en patologies com l'accident vascular cerebral, les cèl·lules que rodejen la zona moren per apoptosi. Aquesta mort cel·lular succeiria com a conseqüència de les alteracions metabòliques que acompanyen al procés isquèmic.

Apoptosi i envelliment:

Durant l'envelliment es produeix una alteració de l'apoptosi en diferents teixits. Mentre en unes es produeix un augment en la quantitat de processos apoptòtics, en altres disminueixen. Per exemple, es produeix augment de l'apoptosi en el múscul esquelètic, en el cardíac i com ja hem dit, en les malalties neurodegeneratives. D'altra banda, les cèl·lules cancerígenes presenten molta més resistència a morir per apoptosi, afavorint al seu desenvolupament a mesura que ens fem grans.

4. Autofàgia

El concepte d'autofàgia es tenia en compte ja des de la dècada dels 60, època en què els investigadors començaven a donar importància a la observació d'un procés que semblava vital per a l'organisme i per al reciclat de les cèl·lules. A poc a poc es van anar coneixent més aspectes en referència al que semblava ser un recurs

Curs 2020 - 2021

necessari per a la protecció de les nostres unitats funcionals, que sovint acumulen toxines, molècules i orgànuls en mal estat.

A partir de noves investigacions, i tot i que la implicació del lisosoma ja era clara gràcies a les aportacions de Christian de Duve, es va poder detallar amb més precisió en què consistia tal procediment, arribant a una conclusió clara: les cèl·lules són capaces de destruir els seus propis continguts, acumulant-los en membranes i enviant les vesícules resultants als lisosomes, els orgànuls encarregats de descompondre tota aquella matèria que impedeix el bon funcionament i rendiment cel·lular.

Aquesta idea, tot i que certa en el seu contingut, va romandre general en característiques fins al 1990, any en què les investigacions amb llevats d'un revolucionari científic japonès, anomenat Yoshinori Ohsumi van donar lloc a la identificació dels gens de l'autofàgia.

4.1 Yoshinori Ohsumi

Yoshinori Ohsumi va néixer al febrer de 1945 al Japó (Fukuoka), lloc en el que va exercir la major part dels seus estudis, que van derivar amb els anys en un doctorat per la universitat de Tokio en biologia cel·lular. Les nombroses experimentacions que va realitzar i els resultats que va obtenir li van permetre adquirir una beca post-doctoral a la Universitat Rockefeller de Nova York. Després d'aconseguir la graduació d'aquests cicles universitaris oficials, que li van permetre assolir competències i un gran nombre d'habilitats relacionades amb la investigació científica, va tornar a la Universitat de Tokio (1977), però aquesta vegada com a investigador associat i com a portador del seu propi grup d'investigació.

Al 1990, i a partir de la utilització de llevats, va descobrir els fonaments de l'autofàgia, el nou paradigma en la comprensió de com se suposava que la cèl·lula reciclava el seu contingut. Tot i que Ohsumi es mantenia actiu en moltes àrees d'investigació, va voler centrar els seus estudis en la degradació de proteïnes a través dels lisosomes, en el cas de les cèl·lules humanes.

Curs 2020 - 2021

Va suposar els llevats com a cèl·lules tractades per la seva poca complexitat, per la seva utilitat com a mètode d'identificació de gens que formen part de les vies cel·lulars complexes i per l'equivalència com a model que es pot relacionar amb les nostres pròpies cèl·lules. Ara bé, aquests mateixos llevats, presentaven certes complicacions, com per exemple la seva reduïda mida, que suposaven un repte per al científic.

Oshumi va formular una hipòtesis, a partir de la qual suposava que si era capaç de pertorbar el procés de degeneració, mentre el mecanisme d'autofàgia seguia actiu, llavors tots els fagosomes s'acumularien a dins de vacúols en molt alta concentració, aspecte que donaria lloc a la possibilitat d'observar aquestes estructures, que podrien ser mínimament visibles a través del microscopi.

Per a impedir la degeneració natural de les substàncies, havia d'utilitzar una branca modificada del llevat, és a dir, que pogués activar el procés d'autofàgia però que no pogués dur-lo a terme. Va decidir per tant cultivar la varietat de llevat mutant que mancava d'enzims de degradació vacuolars i a la vegada estimular el procés d'autofàgia per falta de nutrients (activació que explicarem en un apartat posterior). Els resultats van ser sorprenents, els vacúols no van tardar ni hores en omplir-se de petites vesícules que no s'havien pogut degradar. Aquestes eren autofagosomes, identificació que va acabar de demostrar que tal i com deia Oshumi, existia autofàgia per a cèl·lules de llevat i que va permetre a l'hora, determinar un nou mètode per a caracteritzar i identificar els gens involucrats en el procés.

Va veure poc més tard, que els mecanismes utilitzats per les cèl·lules dels llevats eren pràcticament idèntics als que operen sobre les nostres cèl·lules. Gràcies a Yoshinori Oshumi, que per aquests nous coneixements va rebre el Premi Nobel de medicina al 2016, les eines necessàries per a investigar la importància i la implicació de l'autofàgia en relació a altres malalties i afeccions ja estaven disponibles, per a un públic científic que estava disposat a desenvolupar tot allò que fins al moment havia restat desconegut.

Curs 2020 - 2021

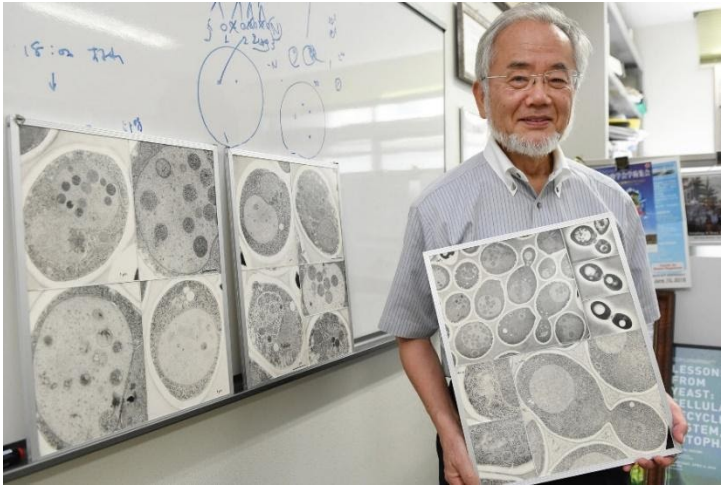


Figura 9. El científic Yoshinori Ohsumi al seu laboratori durant el descobriment i posterior investigació dels gens que donen lloc al procés de l'autofàgia. (Font:

<https://www.nytimes.com/es/2016/10/03/espanol/el-biologo-japones-yoshinori-ohsumi-gana-el-premio-nobel-de-medicina.html> / Crèdits: Akiko Matsushita/Kyodo News, vía Associated Press)

Els descobriments de Christian de Duve i de Yoshinori Ohsumi, van permetre en conjunt recopilar una gran quantitat d'informació, a partir de la qual ja es podia donar una explicació més concreta al fenomen, que podia incloure les causes, i cada un dels participants d'una regulació, que es mostrava imprescindible per a la supervivència de l'organisme.

4.2 Tipus d'autofàgia cel·lular

L'individu ha d'enfrontar-se permanentment a danys cel·lulars i tissulars deguts no solament a senyals que provenen de l'entorn sinó també al deteriorament propi provocat per la maduresa i l'envelliment. Per a combatre tots aquests factors, l'organisme necessita mecanismes, que li puguin permetre desfer-se de les cèl·lules o impedir que es propaguin, com a mètode per a evitar una descendència portadora d'errors i de mutacions que podrien derivar en estats patològics complexos.

Un dels processos alternatius de supervivència cel·lular, que es dona de forma natural i que permet reciclar les parts disfuncionals de les cèl·lules, amb l'objectiu de preservar-les i protegir-les d'amenaques varies, és l'autofàgia.

Curs 2020 - 2021

Aquesta, pot activar-se per diverses raons, entre les quals destaquen l'existència de molècules en mal estat, però també el mal plegament de les proteïnes, un augment exagerat en el nombre d'òrgans cel·lulars, una carència severa i progressiva de nutrients o la hipòxia (estat de deficiència d'oxigen en sang).

A partir de les causes del fenomen, es descriuen quatre tipus d'autofàgia:

- **Macroautofàgia:** es considera la més comuna i per tant la de referència en el cas en què s'utilitzi el terme autofàgia sense especificar. És el procés a partir del qual s'acumulen elements citoplasmàtics en un compartiment independent al lisosoma delimitat per una doble membrana. Aquest departament resultant, rep el nom d'autofagosoma, el qual es fusiona amb el lisosoma, que en degrada el seu contingut i part de la membrana que el resguarda.
- **Microautofàgia:** es tracta d'una forma d'autofàgia en la qual el contingut citoplasmàtic destinat a la degradació és recollit pel lisosoma directament mitjançant les invaginacions membranoses. Aquests propis replegaments interns de la membrana de l'òrganul es desprenen i es situen a l'interior d'aquest, donant lloc a la degeneració del material desitjat, que queda en disposició dels potents enzims lisosòmics.
- **Autofàgia facilitada per xaperones:** procediment mitjançant el qual es degraden proteïnes citoplasmàtiques que són introduïdes als lisosomes individualment. Aquestes biomolècules, s'identifiquen per contenir una seqüència determinada (KFERQ), que és reconeguda per un complex format per la xaperona hsc70 (una altra proteïna que té diverses funcions cel·lulars). Aquest complex, és capaç a l'hora d'interactuar amb un receptor del lisosoma (LAMP-2A), que està format per diverses subunitats, les quals a partir de la intercomunicació, generen una mena de porus, a través del qual passen les molècules a degradar.
- **Crinofàgia:** suposa la fusió de vesícules destinades a la exocitosi (vesícules de secreció) amb el lisosoma.

Curs 2020 - 2021

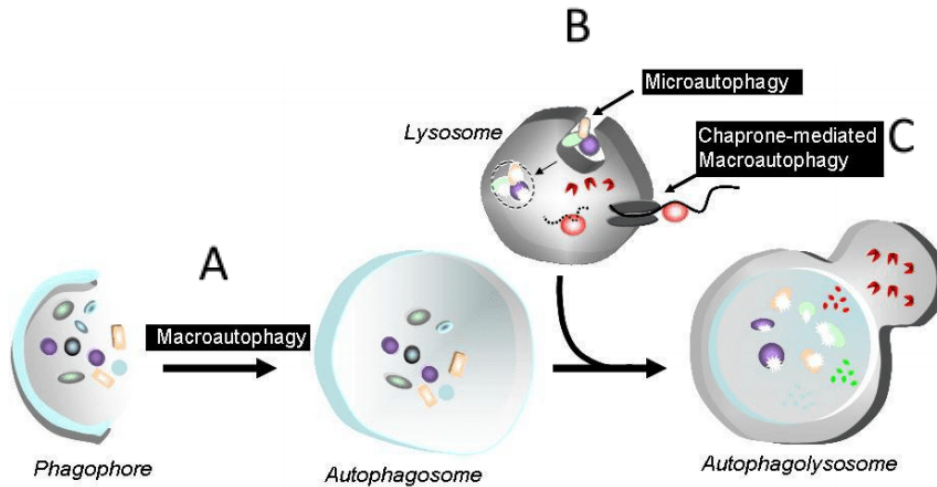


Figura 1 - **Diferents processos autofàgics.** a) Macroautofàgia b) Micoautofàgia c) Autofàgia mediada per chaperones. Adaptado de ("Human autophagy database - HADb", online).

Figura 10. Diferents tipus d'autofàgia: a) Macroautofàgia b) Micoautofàgia c) Autofàgia facilitada per xaperones. (Font: Human autophagy database).

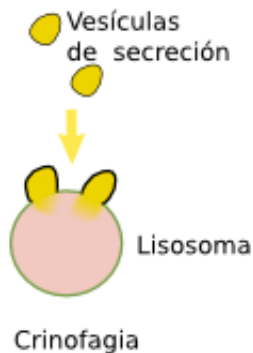


Figura 11. Mostra de com es produeix la crinofàgia per fusió de vesícules destinades a la exocitosis amb el lisosoma. (Font: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/5-autofagia.php>)

4.3 Mecanismes d'inducció autofàgica

Parlàvem anteriorment de situacions que provocaven l'activació de l'autofàgia com a reconeixement d'un comportament cel·lular poc freqüent, donat per exemple per condicions d'estrès com la falta d'aliment i/o factors de creixement, infeccions i hipòxia. Tot i així, és important tenir en compte que sempre existeix també una autofàgia basal, que és la que ens permetrà eliminar els orgànuls i les molècules en mal estat que no puguin fer les seves funcions adequadament. Esdevé el procés per tant, vital per a les cèl·lules animals.

Curs 2020 - 2021

En el cas de les cèl·lules vegetals, el procediment es modifica. A partir de certes investigacions, s'ha aconseguit demostrar que les plantes poden viure sense autofàgia quan es troben en condicions favorables. Per tant, aquesta només té lloc en el moment en què la situació suposa un risc per a la vida de l'ésser viu (manca de nutrients, excés de calor o salinitat) o en el cas en què les funcions normals (envelliment de les fulles, organització de les reserves de midó, germinació del pol·len) es veuen alterades per alguna disfunció major.

El procés d'autofàgia pot incloure dues possibles vessants: es pot trobar en forma selectiva o no selectiva.

4.3.1 Autofàgia selectiva

L'autofàgia selectiva és un procediment molecular definit que tendeix a resultar similar per a la majoria d'estructures que es volen seleccionar i per conseqüència degradar. La tècnica es basa en el marcatge natural del material en disposició a ser reciclat, el qual serà posteriorment reconegut per receptors específics. En el cas de les cèl·lules animals, la senyalització es porta a terme a partir de la ubiquitinació, és a dir, mitjançant l'addició de la proteïna ubiquitina, que actua com si d'una mena d'etiqueta es tractés. L'existència de receptors autofàgics donarà lloc a la reconeixença de les estructures/delimitacions. Aquests destinataris mateixos, esdevenen els encarregats d'interaccionar amb les noves proteïnes que es troben unides al fagòfor (forma inicial que serveix per a englobar les substàncies a degradar i que s'acaba transformant en autofagosoma gràcies a la formació d'una doble membrana limitant). La comunicació que es dona entre les proteïnes del fagòfor i els receptors, permet la unió de la vesícula i de la molècula exacte que es pretén reciclar.

Tot i que és aproximadament el mateix en tots els casos, existeix alguna diferència poc significativa: els orgànuls en general, s'ubiquiten a través dels dominis citosòlics de les proteïnes de les seves pròpies membranes (com a referència

Curs 2020 - 2021

podríem tenir en compte el procés de reciclatge dels mitocondris), però no passa el mateix amb els reticles per exemple, que no es seleccionen per ubiquitinació sinó per proteïnes determinades que expressen en cada una de les seves capes exteriors. Un altre exemple de variació podria ser el dels llevats, que tampoc eliminen orgànuls a través de la ubiquitina, sinó per mitjà de molècules concretes, que són reconegudes per la maquinària autofàgica.

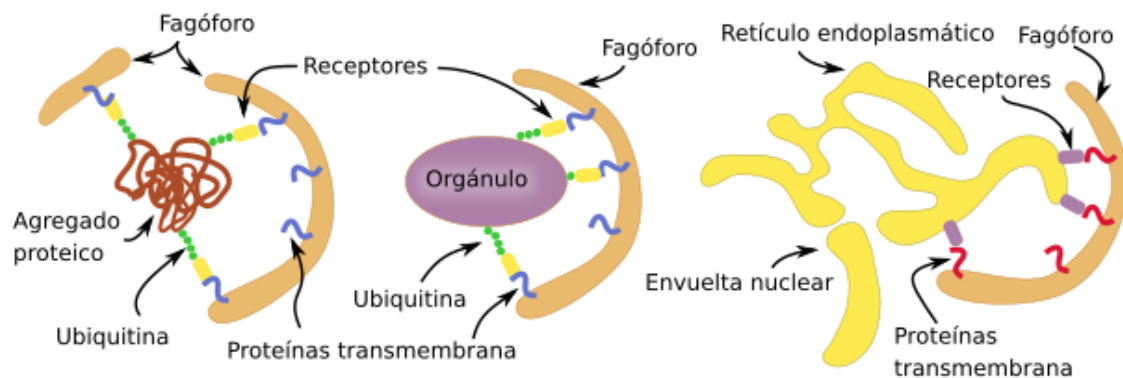


Figura 12. Mostra dels diferents tipus de proteïnes que intervenen en el procés d'autofàgia selectiva en cèl·lules animals.

(Font: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/5-autofagia.php>)

4.3.2 Autofàgia no selectiva

L'autofàgia no selectiva, d'altra banda, comença amb l'activació de membranes cel·lulars, que poden provenir de diferents espais (reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi...). Aquesta activació s'aconsegueix a partir de la síntesi de PIP3 (fosfatidilinositol (3,4,5) – trifosfat), un fosfolípid situat en aquestes pròpies membranes, que atreu a diferents proteïnes, les quals a la vegada provoquen l'evaginació i el desprendiment d'algunes porcions de la capa protectora. Les porcions, donaran lloc a unes estructures denominades fagòfors, que actuaran com a "aïllament" i a la vegada englobant les molècules o orgànuls que a continuació seran degradats. Les membranes inicials del fagòfor, amb el contingut ja en el punt de mira, aniran creixent en extensió i acabaran unint els seus extrems per a formar un compartiment tancat, l'autofagosoma. A les membranes de l'autofagosoma se li

Curs 2020 - 2021

uniran posteriorment proteïnes de tipus SNARE y rab, que possibiliten el reconeixement del lisosoma i la fusió que s'ha de produir amb aquest.

L'autofagosoma, es pot unir directament al lisosoma per a formar l'autofagolisosoma i degradar allò que contingui, o pot fusionar-se amb els endosomes (compartiments citoplasmàtics que funcionen com a transportadors de material), diverses estructures que aporten proteïnes lisosomals i bombes de protons al fagosoma, portant a l'acidificació d'aquest. El producte final s'anomena amfiosoma, el qual és capaç d'unir-se també al lisosoma, permetent la degradació del contingut de l'autofagosoma conjuntament amb la seva membrana interna.

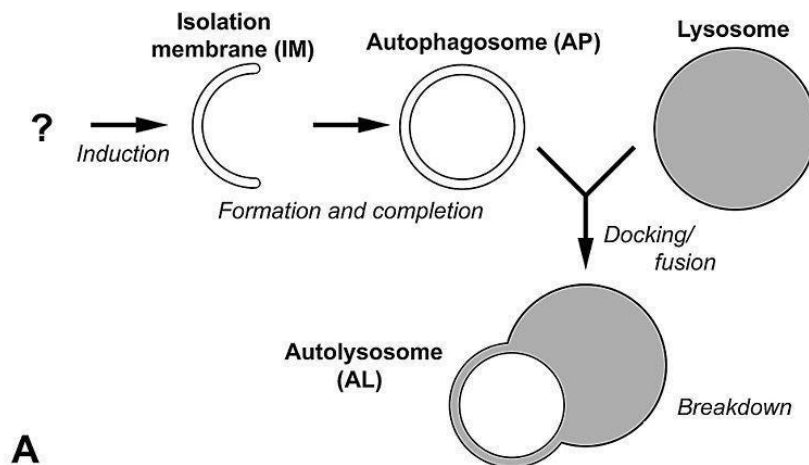


Figura 13. Mostra de la formació de l'autofagosoma i de la posterior unió amb el lisosoma. (Font: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/5-autofagia.php>)

4.4 Malalties i autofàgia

El fet que el tema de l'autofàgia s'estudi des de fa tan poc, provoca que una gran part dels coneixements que fins ara es tenen no es puguin afirmar amb certesa.

Això és exactament el que succeeix amb les malalties relacionades amb l'autofàgia. Es considera que és molt possible que un error o mutació en els gens que codifiquen per

Curs 2020 - 2021

a l'autofàgia pugui provocar l'alteració del funcionament de l'organisme i per conseqüència alteracions en les cèl·lules i el seu estat normal.

Algunes patologies que s'han relacionat amb l'autofàgia de forma poc definida són el càncer, les malalties neurodegeneratives, diversos trastorns pulmonars com la fibrosi quística o l'asma, la diabetis de tipus 2 o la obesitat. Tot i que existeixen certes proves que indiquen l'existència d'aquestes relacions entre el procés de degradació i les malalties, es necessiten més processos experimentals que permetin confirmar i definir la implicació exacta.

MARC PRÀCTIC

1. Introducció:

La idea d'aquest treball és aconseguir relacionar l'autofàgia amb un tipus de part experimental que ens permeti estudiar alguna condició vinculada al procés de degradació explicat.

Com sabem, l'autofàgia és un mecanisme cel·lular de funcionament complex que inclou la participació d'una gran quantitat de proteïnes i orgànuls. Una d'aquestes proteïnes, descrita científicament i essencial per a que tingui lloc el procés és la Rab7.

La proteïna Rab7 forma part d'una gran família de GTP-ases ²⁶, cada una de les quals es troba codificada entre la informació genètica d'una gran quantitat d'espècies diferents (abasten des de llevats fins a mamífers). Aquestes GTP-ases en conjunt arriben a realitzar un nombre exagerat de funcions diferents relacionades sobretot amb el transport de membrana, la formació vesicular, la fusió d'estructures i la selecció i classificació de material en els processos d'endocitosi, exocitosi i autofàgia.

El funcionament de les proteïnes Rab, igual que en el cas de totes les GTP-ases, es basa en una regulació cíclica d'activació i inactivació que depèn de les unions que puguin existir amb GTP ²⁷ (d'aquí el nom GTP-ases) o de la hidròlisi d'aquest. Les GTP-ases es troben en estat actiu quan estan unides a una de les molècules de GTP. La hidròlisi d'aquesta molècula, derivant en GDP, provoca la inactivació de la GTP-asa.

²⁶ Família d'enzims caracteritzada per la capacitat que té d'unir-se a la molècula GTP (guanosina trifosfat) quan ho necessita i per la facilitat amb la que pot hidrolitzar-la quan la seva funció també ho requereix.

²⁷ Nucleòtid trifosfat que realitza una funció similar a la de l'ATP (nucleòtid anomenat adenosina trifosfat que proporciona energia a les cèl·lules per a la realització d'un gran nombre d'activitats diverses), és a dir, que s'utilitza com a "moneda" energètica en diferents procediments cel·lulars. És essencial en certes vies metabòliques, en les que actua com a activador de substrats, igual que l'ATP però de forma més específica.

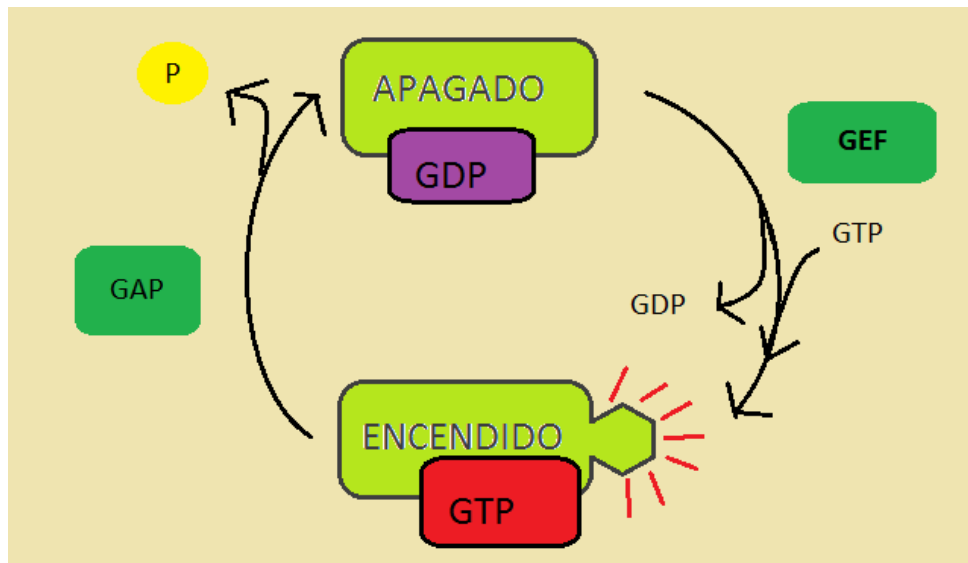


Figura 14. Esquema del funcionament actiu - inactiu de les GTP-ases. (Font: <http://biologicel.blogspot.com/2015/07/interruptores-moleculares-asociados-las.html>)

Cada proteïna Rab que existeix es localitza en compartiments intracel·lulars específics, i en la seva forma activa lligada a GTP, interactua amb un nombre elevat d'altres proteïnes diferents.

Existeixen diferents tipologies de Rab7, tot i que nosaltres ens fixarem en la Rab7a, que actua com a reguladora del transport de vesícules autofàgiques en direcció als lisosomes i com a enllaç que permet la fusió entre l'òrganul i el material que ha de ser degradat.

Curs 2020 - 2021



Figura 15. Mostra de les diferents funcions o processos en els que participa Rab7 general (inclou Rab7a i Rab7b) de forma intracel·lular. (Font: Chua, C.E.; Gan, B.Q.; Tang, B.L. Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011, 68, 3349–3358)

Es coneix també, l'existència d'una altra proteïna anomenada TBC1D15, que sembla poder formar un complex amb Rab7 durant el procés de degradació cel·lular, produint la inactivació d'aquesta mitjançant la facilitació de la hidròlisi de la molècula de GTP, que s'acaba transformant en GDP, alliberant un fòsfor inorgànic i permetent, que la molècula que segueix a Rab7 en el recorregut de reaccions que comporten que tingui lloc l'autofàgia, s'activi. Estudis previs han aconseguit assegurar que TBC1D15 juga un paper molt important en la mitofàgia, una forma selectiva d'autofàgia que degrada mitocondris. És precisament aquesta informació la que va generar tots els dubtes existents sobre la implicació de TBC1D15 en altres processos autofàgics, i és justament la nostra intenció comprovar a partir de procediments experimentals mitjançant cultius de cèl·lules Cos 1 i Hek 293T, si en algun moment, tal i com s'esmenta en certs textos ja publicats, TBC1D15 forma un complex específic amb Rab7.

Curs 2020 - 2021

És a dir, la pregunta que ens fem és: **existeix algun moment del procés autofàgic en el que TBC1D15 i Rab7 interaccionin, formant algun tipus de complex proteic?**

Per a la realització de la part pràctica d'aquest treball hem necessitat utilitzar cultius cel·lulars com a mètode d'estudi experimental, i he trobat necessari fer-ne una explicació.

Els cultius cel·lulars són processos a partir dels quals les cèl·lules (procariotes ²⁸, eucariotes ²⁹ o vegetals) poden cultivar-se en condicions controlades. Tot i que teòricament el nom fa referència a més tipologies cel·lulars, en la pràctica s'utilitza normalment per a parlar del cultiu de cèl·lules aïllades d'eucariotes pluricel·lulars i especialment de cèl·lules animals. Aquests cultius són en definitiva sistemes de cèl·lules extretes d'òrgans o teixits, normals o tumorals, mantinguts en medis de composició química definida i molt específica i en condicions de temperatura, pH, airejament i humitat vigilades. És així com s'assegura la supervivència i la multiplicació d'aquestes unitats, mantenint artificialment les seves funcions metabòliques en el mateix estat en el que es trobaven quan formaven part de l'hoste.

El treball amb cultius cel·lulars es porta a terme ja des de fa molts anys, tot i que el gran canvi s'ha estat notant durant la última dècada, en què gràcies a factors com els medis definits, la disponibilitat d'antibiòtics, les instal·lacions asèptiques (llocs en els que realitzar processos experimentals sense risc de l'existència de patògens que puguin perjudicar les mostres) i els dispositius de cultiu (plaques de Petri ventilades...) s'ha pogut notar un notable avenç en molts aspectes referents a la recerca i a la investigació biomèdica.

Produir cèl·lules en situacions que han de ser perfectament exactes implica un alt nivell de preparació per part dels professionals especialitzats que treballen al laboratori, ja

²⁸ Unitat de vida més bàsica caracteritzada per la falta de nucli cel·lular, aspecte que comporta l'existència de ribosomes més petits i de DNA més simple organitzat en un sol cromosoma circular. Són en la seva majoria bacteris i a vegades poden arribar fins i tot a posseir flagels, cilis o pilis, estructures que els ajuden a moure's o a adherir-se al medi en el que es troben.

²⁹ Cèl·lules caracteritzades per l'existència d'un nucli cel·lular en el que s'emmagatzema el material genètic en forma de múltiples cromosomes i per un elevat contingut en orgànuls units per membranes.

Curs 2020 - 2021

que és necessari saber relacionar i utilitzar pràcticament conceptes bàsics d'esterilitat o de detecció de problemes (requeriments d'un cultiu en particular, estabilitat d'alguns reactius...) i a la vegada aconseguir adquirir material específic i un ambient no contaminat en diverses instal·lacions.

Cada tipologia cel·lular compleix amb certes característiques diferencials, que fan que puguin ser més o menys adequades per a un procediment científic o altre. En el nostre cas, es van utilitzar cèl·lules Cos 1 i cèl·lules Hek 293T.

Les cèl·lules Cos són subcultius cel·lulars semblants a fibroblasts³⁰ derivats de teixits de ronyó de mico verd africà, molt útils sobretot per a processos de transfecció³¹ com el que nosaltres hem de portar a terme (s'explicarà en un apartat posterior). S'utilitzen en aquests procediments de biologia molecular perquè gràcies als trets que les defineixen s'observen molt bé a través del microscopi.

ATCC Number: **CRL-1650**
Designation: **COS-1**

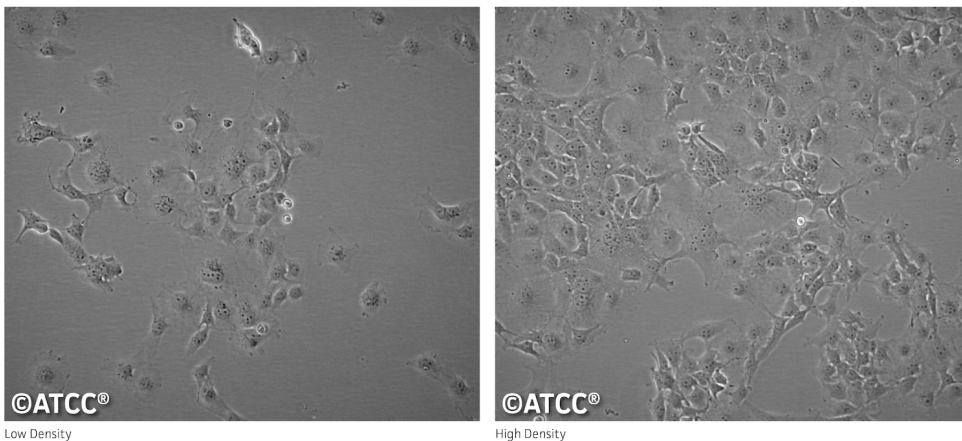


Figura 16. Cèl·lules Cos 1, a l'esquerra en poca quantitat i mostrant una gran proliferació a la dreta.
(Font: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1650.aspx?geocountry=es#characteristic>)

³⁰ Tipus de cèl·lula resident del teixit conjuntiu pròpiament dit, que sintetitza fibres i manté la matriu extracel·lular del teixit de molts animals.

³¹ Introducció de material genètic extern a les cèl·lules eucariotes a partir de plasmidis (petita molècula de DNA circular que sovint es troba en bacteris i a vegades en altres tipus de cèl·lules) o altres eines útils.

Curs 2020 - 2021

Les cèl·lules Hek 293T, d'altra banda, són una línia cel·lular provinent de cèl·lules de ronyó d'embrió humà. Són cèl·lules molt fàcils de cultivar per les condicions en les que han d'estar i es transfecten molt fàcil, raó per la qual s'han utilitzat durant molts anys per a la investigació en biologia cel·lular (en l'àmbit de la indústria biotecnològica per exemple també s'usen per a la producció de virus i proteïnes necessàries per a pràctiques de teràpia gènica).

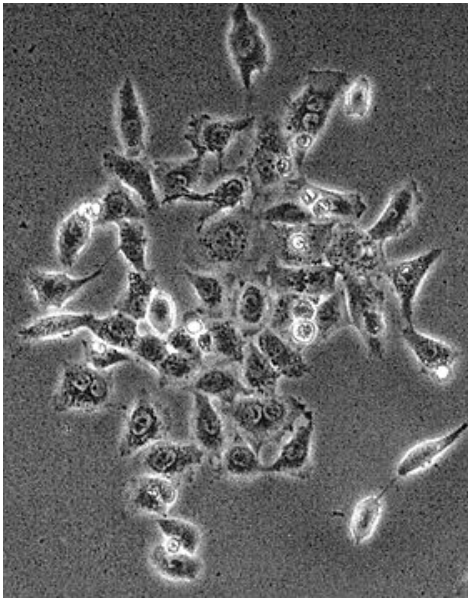


Figura 17. Cèl·lules Hek 293T cultivades durant diversos dies en medis de cultiu estàndard. (Font: EnCor Inc. de Biotecnologia)

2. Objectius

- Entendre amb més exactitud el procediment d'autofàgia cel·lular.
- Comprovar si existeix la implicació de TBC1D15 en el procés d'autofàgia de forma regular.
- Demostrar si és possible la formació d'un complex entre TBC1D15 i Rab7 durant la degradació cel·lular esmentada.
- Conèixer els procediments necessaris per al treball adient amb cultius cel·lulars.

Curs 2020 - 2021

- Comprendre les magnituds que abasta Rab7 com a proteïna implicada en la degradació de molècules i orgànuls cel·lulars.

3. Hipòtesi

Basant-me en els coneixements que es tenen sobre la implicació de la proteïna TBC1D15 en el procés de mitofàgia, un tipus d'autofàgia selectiva i específica per a mitocondris, proposo la següent hipòtesi:

- Potser TBC1D15 també participa en processos d'autofàgia generals i per tant no selectius, formant un complex amb Rab7 i provocant la possible inactivació d'aquesta.

4. Variables

Per a entendre les variables primer cal comprendre el funcionament que es creu que podria tenir TBC1D15 quan s'uneix a Rab7. Ja hem especificat anteriorment, que en diverses publicacions relacionades amb el tema, s'anomena a TBC1D15 com a proteïna inactivadora de Rab7, aspecte que implica la regulació d'algun tipus de procés.

Per a comprovar si això és cert, hem utilitzat per a l'experimentació tres tipus de Rab7, que ens poden proporcionar la informació necessària que desitgem conèixer sobre el procés.

Aquestes rab7 són:

- **Rab7 en estat WT (wild type):** és la tipologia de rab7 en estat natural, és precisament com es troba a dins del nostre cos. Es considera que actua a partir d'un funcionament semblant al d'un interruptor, activant-se i apagant-se segons les necessitats autofàgiques de la cèl·lula.
- **Rab7 en estat constitutivament activat (Rab7 Q67L):** és una tipologia de Rab7 mutant, és a dir, constitueix un tipus de rab7 modificada genèticament amb la intenció que es mantingui funcionant en tot moment, fins i tot si la cèl·lula no

Curs 2020 - 2021

es requereix de cap procés autofàgic concret. Aquesta modificació proporciona el nom de la Rab7 corresponent. El número fa referència a l'aminoàcid mutat, la lletra de l'esquerra a l'aminoàcid ³² inicial de la rab7 WT i la de la dreta al nou aminoàcid proporcionat per a produir el canvi.

- **Rab7 en estat constitutivament inactiu (Rab7 T22N):** esdevé un altre tipus de Rab7 mutant, modificada genèticament amb l'objectiu que romangui disfuncional contínuament, independentment de la situació en la que es trobi la cèl·lula.

Cal especificar que els tres tipus de Rab7 han estat comprats amb la proteïna GFP ³³ unida a la seva estructura i posteriorment afegits a les cèl·lules.

Es compleix la mateixa situació amb cada proteïna TBC1D15, tot i que aquestes es troben unides a un epítot ³⁴ d'una altra proteïna anomenada hemaglutinina (HA). ³⁵

(Es detalla la importància de les dues noves proteïnes anomenades dins de l'apartat 6.2).

La informació donada fins ara ens indica que el tipus de Rab7 utilitzat pot influir en la posterior formació o no d'un complex entre aquesta proteïna i la TBC1D15. Si realment TBC1D15 actua com a inactivador de Rab7, caldrà veure com funciona segons els diferents estats en els que aquesta es troba.

Ara ja tenim les dades necessàries per a redactar les variables adients del procés experimental.

³² Compostos orgànics que s'uneixen a partir d'enllaços peptídics per a formar proteïnes.

³³ Proteïna produïda per la medusa *Aequorea victoria* que emet fluorescència a la zona verda de l'espectre visible.

³⁴ Porció de macromolècula a la que s'uneixen certs anticossos determinats

³⁵ Proteïna reconeguda per anticossos específics útils per al posterior reconeixement de TBC1D15 al llarg de la tècnica d'immunofluorescència.

Curs 2020 - 2021

4.1. Variable independent

La variable independent d'aquest experiment és el tipus de rab7 aplicat a la cèl·lula segons si és WT o està en estat constitutivament activat o inactiu.

4.2. Variables dependents

Existeixen diverses variables dependents relacionades amb l'anterior i que poden variar segons les característiques d'aquesta.

- a) Observació de la interacció entre Rab7 i TBC1D15 a partir de les tècniques d'immunofluorescència i coimmunoprecipitació (ip)
- b) Situació de Rab7 i de TBC1D15 en referència a la posició del lisosoma (tècnica d'immunofluorescència)
- c) Determinació de la influència que podria generar la possible interacció entre TBC1D15 i Rab7 en relació amb processos d'autofàgia.

4.3. Variables control

Durant tota l'execució de la part experimental del treball s'han aplicat els mateixos procediments a totes les condicions per a assegurar que els resultats obtinguts es relacionen directament amb les variables descrites i no amb algun altre tipus de factor que pugui influenciar indirectament. Això ens indica, per tant, que característiques com la temperatura, la pressió, la humitat i altres, a les que han estat sotmeses les cèl·lules, han esdevingut idèntiques.

4.4. Grups control

Aquest experiment ha necessitat l'ús de grups control per a una de les tècniques realitzades i que s'explicarà a l'apartat següent, la coimmunoprecipitació (ip). Han estat requerits 5 controls diferents, utilitzats per a demostrar l'eficàcia i el correcte funcionament de la prova.

Curs 2020 - 2021

Per tal d'assegurar que les beads ³⁶ d'agarosa ³⁷ funcionen adequadament, cal aconseguir 5 plaques control de cèl·lules Hek 293T (són les que realitzen la ip) diferents. Cada una d'elles inclou només una de les condicions a estudiar. És a dir, la primera no conté res, la segona conté només TBC1D15 transfectat, la tercera conté Rab7 en estat WT, la quarta Rab7 en estat constitutivament activat i la cinquena Rab7 en estat constitutivament inactiu. Aquests controls ens permetran valorar si els resultats obtinguts a partir de la prova anomenada són suficientment fiables com per arribar a unes conclusions determinants.

5. Material i mètodes

En aquest apartat s'explicaran els materials més utilitzats i els mètodes o procediments generals necessaris per a realitzar la part pràctica del treball i per tant per a aconseguir comprovar si en un procés autofàgic normal és possible la formació d'un complex entre Rab7 i TBC1D15.

A continuació s'explicarà tot de forma resumida, ja que a l'Annex ja es descriu amb detall el protocol de cada metodologia utilitzada.

Primer però, cal tenir en compte una característica de l'experimentació que encara no hem anomenat. A partir del marc teòric hem definit processos d'autofàgia diversos, alguns produïts per l'existència d'òrgànuls o molècules que no funcionen correctament a dins de la cèl·lula i altres generats per situacions exagerades d'estrès. Les nostres cèl·lules no estan en situació d'estrès, és a dir, es troben ben cuidades i amb tots els nutrients i condicions necessàries per a una correcta conservació dels cultius. Això implica que ens basarem en dues coses per a pensar que tot i que no hi ha situació d'estrès, es produeix autofàgia:

³⁶ Substrats sòlids en forma de microesferes que actuen unint-se a la rab7 a partir d'anticossos específics per a la proteïna durant la ip.

³⁷ Polisacàrid apte per a formar matrius inertes i no tòxiques i molt útil per a un gran nombre de funcions, una de les quals esdevé la de poder fixar molècules com anticossos, antígens i enzims a la seva estructura.

Curs 2020 - 2021

- a) Com ja hem dit, es produeix un tipus d'autofàgia basal que està sempre en funcionament i que no depèn de l'estrès sinó del mal funcionament d'òrgans i/o altres molècules.
- b) També hem esmentat abans que està demostrada científicament la participació de Rab7 en el procés d'autofàgia com a mètode de reconeixement lisosomal, per tant, el més probable és, que en el cas de les cèl·lules que continguin Rab7 en estat constitutivament activat, es produeixi algun tipus de procediment autofàgic. Això es donaria de forma evident perquè de certa manera s'està obligant a cada una de les unitats a comportar-se segons les condicions que implica el funcionament de la proteïna.

El procediment d'aquesta part experimental es basa en l'aplicació de dues tècniques diferents, la primera rep el nom d'immunofluorescència i la segona és la coimmunoprecipitació. És necessari aplicar els dos processos científics, i per separat, perquè tal i com veurem als resultats, ens proporcionen informació diferent (la poca especificitat de la immunofluorescència requereix posar en pràctica la coimmunoprecipitació). Abans d'explicar en què consisteixen, però, caldrà informar sobre les preparacions anteriors.

5.1. Preparació

El nostre objectiu en aquest apartat és explicar els procediments pels que han de passar les cèl·lules que es necessiten per a posteriorment realitzar aquestes dues tècniques que portem esmentant en diferents apartats. Dividirem els passos en dies segons l'ordre que es va seguint al laboratori, independentment del temps que es trigui a realitzar tot el procediment en conjunt.

Dia 1: Passatge de cèl·lules Cos 1 i Hek 293T

Tot el procés comença amb el passatge de cèl·lules Cos 1 i Hek 293T. Les cèl·lules estan en constant divisió i necessiten nodrir-se amb continuïtat. Per conseqüència, arriba un moment en què n'hi ha tantes que es comencen a col·locar les unes a sobre de les

Curs 2020 - 2021

altres, impedit el seu propi creixement i provocant la mort d'algunes d'elles. Perquè això no passi, es porten a terme passatges, amb l'objectiu de separar les cèl·lules i cedir nous medis en els que puguin seguir desenvolupant-se adequadament.

Fer el passatge implica separar les cèl·lules (tant Cos 1 com Hek 293T) de la placa de Petri ³⁸ a la que es troben adherides per a poder realitzar una posterior transfecció de forma més eficaç en una altra placa. Un dels mètodes més comuns per a desenganxar aquestes cèl·lules és el de la tripsinització. La tripsina és un enzim que trenca enllaços peptídics ³⁹ i que per tant permet arreplegar les cèl·lules i situar-les en un nou recipient sense trencar-les. És important que, abans d'afegir la tripsina, aspirem el medi de cultiu, rentem amb PBS ⁴⁰ i tornem a aspirar la resta de líquid restant. Aquest pas és imprescindible per a impedir que certes proteïnes que poden inhibir l'efecte de la tripsina actuïn a la placa, donant lloc a la obtenció de resultats no desitjats.

A continuació només ens falta comptar el nombre de cèl·lules que tenim concentrades (procediment que portem a terme mitjançant l'ús de la càmera de Neubauer, un instrument que s'adapta al microscopi i que facilita la numeració) i sembrar els nous cultius corresponents que es col·loquen novament a la incubadora, on hi troben les condicions adients per a seguir reproduint-se.

³⁸ Instrument de laboratori en forma de recipient rodó de vidre o de plàstic transparent que permet l'aïllament de materials biològics per al seu posterior estudi.

³⁹ Enllaços que permeten la unió entre aminoàcids i que es formen entre un grup amino (-NH₂) d'un d'ells i el grup carboxil (-COOH) d'un altre.

⁴⁰ Solució tampó utilitzada en la investigació biològica i bioquímica per a rentar cèl·lules. Les seves característiques permeten que no es modifiqui ni el funcionament d'aquestes ni el seu perfil d'expressió.

Curs 2020 - 2021



Figura 18. Imatge de les cèl·lules Hek 293T després de ser passades a un nou recipient (passatge cel·lular). (Font: elaboració pròpia)

Dia 2: Transfecció cel·lular

El procés de transfecció cel·lular ens serveix per a introduir el DNA que codifica per les proteïnes que nosaltres estem estudiant a dins de les cèl·lules escollides, és a dir, les Cos 1 i les Hek 293T.

Per a realitzar el procés en el cas de les Hek 293T necessitem 8 eppendorffs (cada un dels quals conté una combinació diferent de fragments de DNA) i 8 plaques diferents amb la mateixa quantitat de cèl·lules, a cada una de les quals s'hi aplica una de les condicions que s'esmenten a continuació. Com ja hem explicat a l'apartat de grups control, el primer eppendorff està buit, el segon conté únicament un fragment de DNA que codifica per TBC1D15, el tercer només el que codifica per a Rab7 en estat WT, el quart el de Rab7 constitutivament activada i el cinquè el de Rab7 constitutivament inactiva. Els tres següents ja no tenen la funció de grups control i es divideixen de la següent manera: el sisè conté un mix entre el fragment que codifica per a TBC1D15 i Rab7 en estat WT, el setè entre el que codifica per a TBC1D15 i Rab7 Q67L i l'últim entre el de TBC1D15 i Rab7 T22N.

Per a afegir aquestes proteïnes a les cèl·lules s'utilitza la tècnica que hem anomenat, un procés que consisteix en inserir material genètic (DNA) que codifica per a la proteïna

Curs 2020 - 2021

d'interès a cada una de les unitats requerides a partir d'un vector determinat. Els nostres vectors s'anomenen Fugene i constitueixen una barreja de lípids especial (aquests també es col·loquen a dins dels eppendorf ⁴¹, conjuntament amb una petita quantitat de medi de cultiu cel·lular i el DNA, com ja hem explicat abans), que forma micel·les, un conjunt de molècules capaces de fusionar-se amb la bicapa lipídica de la cèl·lula i per tant capaces també de cedir el seu material interior per endocitosis. L'alliberació del DNA concentrat a dins de les micel·les permet que aquest es situï a dins del nucli, incorporant cada una de les seves característiques al propi DNA de cada una de les cèl·lules hostes Hek 293T que ja estaven a la placa.

Amb les cèl·lules Cos 1 el procediment és exactament el mateix, modificant simplement un tret diferencial, el fet que no es realitzen grups control. S'utilitzen per tant només tres tipus de barreja aplicades a tres plaques diferents, que compleixen amb les mateixes característiques que la sisena, la setena i la vuitena de les Hek 293T.

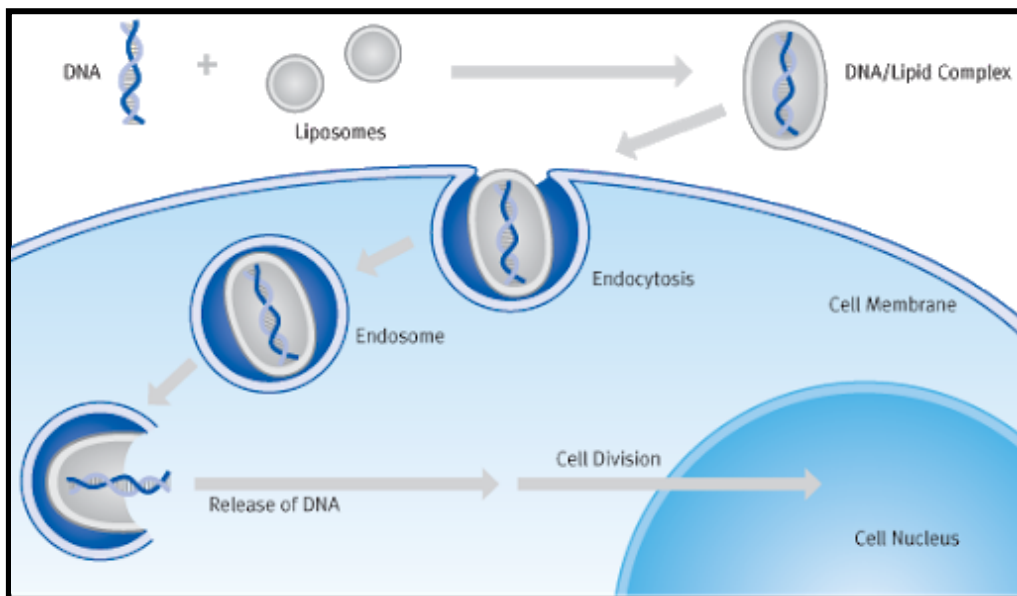


Figura 19. Procés de transfecció mitjançant micel·les lipídiques capaces de fusionar-se amb la membrana de la cèl·lula i de cedir el material genètic al citoplasma. (Font: <http://attendbio.com/transfeccion.html>)

⁴¹ Petit contenidor cilíndric de plàstic que s'utilitza sobretot en biologia molecular i bioquímica per a procediments com la centrifugació o simplement com a contenidor de substàncies diverses.

Curs 2020 - 2021

Dia 3: fixació i lisat

A partir d'aquí el procés al que estan sotmeses les cèl·lules varia. És a dir, mentre les Cos 1 passen pel procés de fixació per a després poder formar part de la tècnica d'immunofluorescència, les Hek 293T passen pel procés de lisat per a posteriorment realitzar la coimmunoprecipitació.

El procés de fixació ens permetrà poder observar correctament les cèl·lules Cos 1 durant la immunofluorescència i es basa principalment en aconseguir que les unitats quedin ben subjectades al vidre en el que es troben. Existeixen diferents tècniques i fixadors per a les cèl·lules, que s'utilitzen sobretot depenent de les característiques d'aquestes.

La nostra fixació de cèl·lules Cos 1 es porta a terme a partir del formaldehid, una substància molt coneguda per la bona preservació que proporciona i per la capacitat d'unió que té amb parts de les proteïnes cel·lulars. Aquesta permet, a partir d'un conjunt elevat de reaccions, que es formin ponts entre les cèl·lules, mètode adient per a que es mantinguin en bon estat i enganxades en tot moment a les plaques.

El lisat o procés de lisi cel·lular, d'altra banda, consisteix en el trencament de les membranes cel·lulars, derivant en la sortida del material intracel·lular. Per a que això sigui possible s'utilitza un buffer ⁴² total format per diverses substàncies.

Les més importants són les que produeixen la lisi en si mateixa. Aquestes (com per exemple el Triton X - 100) tenen característiques molt semblants a les dels detergents i actuen unint-se a la superfície hidrofòbica ⁴³ de la cèl·lula, és a dir, a la barrera de lípids de la membrana, trencant-la mitjançant la formació de micel·les ⁴⁴ i interrompent les interaccions lípid-lípid, lípid-proteïna i proteïna-proteïna. Altres substàncies també

⁴² Solució reguladora basada en la barreja de concentracions relativament elevades d'un àcid i de la seva base conjugada amb la propietat principal de mantenir estable el pH d'una dissolució.

⁴³ Terme que en context fisicoquímic fa referència a aquelles substàncies que són repel·lides per l'aigua i que per tant no es poden unir amb ella.

⁴⁴ Conglomerat de molècules que forma una monocapa biològica formada en la majoria de casos per una part soluble en aigua i per una altra que la repel.

Curs 2020 - 2021

conegudes d'aquests buffers són el glicerol, que proporciona densitat al material, l'apoptinina i la leupeptina ⁴⁵ ...

La sortida del contingut cel·lular que esmentem ens interessa sobretot perquè com a conseqüència del procediment, cada un dels recipients en els que es situaven les cèl·lules, acaba ple de les proteïnes que nosaltres anteriorment havíem volgut incloure, a través del material genètic que les codifica, a dins de les Hek 293T. Aquestes proteïnes, ja totalment formades, s'han obtingut després de la transfecció a partir del procés d'expressió que pateix el DNA de forma natural (basat en les fases de transcripció ⁴⁶ i traducció ⁴⁷).

5.2 Immunofluorescència (dia 4)

La immunofluorescència és una tècnica que té com a objectiu principal la observació d'una proteïna d'interès. Es basa en la tinció de cèl·lules mitjançant anticossos ⁴⁸ específics que actuen contra una proteïna unida a una molècula capaç de donar fluorescència o mitjançant un altre tipus d'anticossos units ells mateixos a les molècules luminescents i capaços de reconèixer l'actuació d'anticossos anteriors.

Les cèl·lules de la nostra part pràctica que realitzen la immunofluorescència són les Cos 1. Aquestes passen per un primer procés anomenat permeabilització i que consisteix en la creació de petits orificis a la membrana cel·lular amb la intenció d'inserir els anticossos necessaris.

⁴⁵ Conjuntament amb l'apoptinina, actua com a inhibidor natural de proteases, els enzims capaços de degradar proteïnes que sovint es desprenen dels lisosomes quan es produeixen processos de lisi cel·lular (recordem que es degraden les membranes lípidiques de la cèl·lula i que el lisosoma també està format per una doble capa de lípids que el protegeix).

⁴⁶ Procés mitjançant el qual les seqüències de DNA són copiades a RNA mitjançant un enzim anomenat RNA polimerasa. Aquest, permet la producció de l'RNA missatger, com a primer pas de la síntesi de proteïnes.

⁴⁷ Procés que converteix una seqüència d'RNA missatger en una cadena d'aminoàcids. Aquests, posteriorment, s'uneixen i formen les proteïnes.

⁴⁸ Glucoproteïnes que es poden trobar de forma soluble a la sang o en altres fluids corporals de vertebrats, capaços d'unir-se específicament amb un determinat antigen.

Curs 2020 - 2021

Les Rab7 no en requereixen de cap tipus, són capaces de produir fluorescència mitjançant la GFP sempre i quan aquesta s'exciti amb la longitud d'ona adequada (ve donada per l'ús del microscopi confocal).

Les TBC1D15 són diferents. Per a obtenir fluorescència per part d'aquestes s'utilitzen dos tipus d'anticossos. El primer actua reconeixent la proteïna Ha (hemaglutinina) i el segon, que com ja hem dit es troba unit a un fluorocrom ⁴⁹, distingeix el primer anticòs.

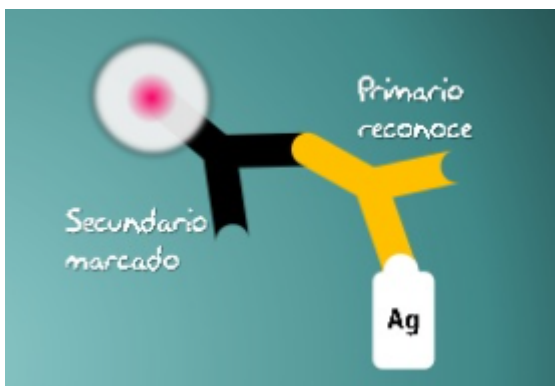


Figura 20. Mostra del funcionament de dos anticossos com a mètode per a estudiar una proteïna durant la immunofluorescència. El primer reconeix la proteïna unida a aquella macromolècula d'interès, el segon (que està marcat amb el fluorocrom) s'uneix al primer. (Font: <https://www.slideshare.net/RicciBW/inmunofluorescencia-31314494/5>)

D'aquestes dues maneres es produeix la llum que es necessita per a observar els resultats que busquem.

⁴⁹ Component que forma part d'una molècula i que fa que aquesta sigui fluorescent.

Curs 2020 - 2021

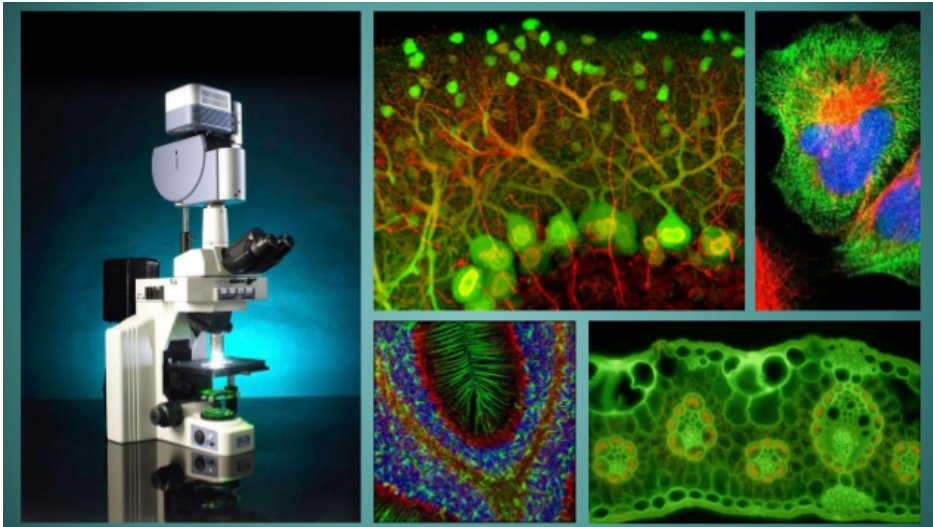


Figura 21. Imatge del microscopi confocal i dels diferents teixits que es poden observar a diferents longituds d'ona (segons el color que es busca) a partir de la tinció amb anticossos de proteïnes específiques. (Font: <https://www.slideshare.net/RicciBW/inmunofluorescencia-31314494/5>)

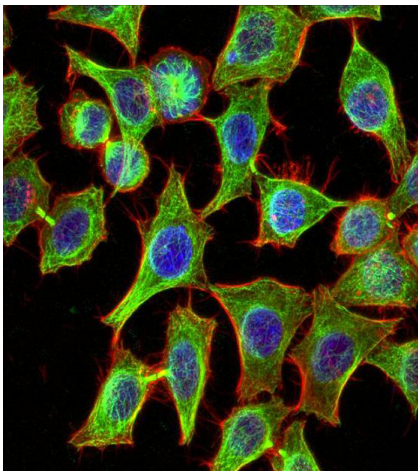


Figura 22. Imatge de cèl·lules HeLa obtinguda mitjançant un microscopi confocal com el de la imatge anterior. (Font: Dr. Francisco Sanz Rodríguez (Universitat Autònoma de Madrid)).

Aquest és l'últim procediment pel que passen les Cos 1, ja que ara ja ens aporten la informació que preteníem recopilar i que ens permetrà saber si algun tipus de Rab7 i TBC1D15 formen complex si es dóna la situació en què s'observen a partir dels resultats, canvis en la situació de TBC1D15 o l'aparició de nous colors que podrien derivar de la superposició de dues proteïnes capaces de captar la llum a longituds d'ona diverses.

Curs 2020 - 2021

5.3 Coimmunoprecipitació (dia 5)

Mentre les cèl·lules Cos 1 realitzen la immunofluorescència, les Hek 293T porten a terme la coimmunoprecipitació.

Aquesta tècnica s'utilitza amb freqüència per a aïllar proteïnes d'interès d'un lisat cel·lular.

En el nostre cas coincideix amb l'ús de les beads d'agarosa, un tipus d'esferes que ja s'expliquen al peu de pàgina dels grups control (5.4) i que hem dit que es troben recobertes d'una tipologia concreta d'anticòs que depèn directament del procediment experimental o de la condició que es vulgui estudiar. L'anticòs utilitzat té una gran afinitat i especificitat per la proteïna diana, i quan es barreja amb la mostra aportada, forma nous complexos, com el que es genera entre l'anti Ha i la proteïna Ha (la que es troba unida de forma exògena⁵⁰ a TBC1D15 ja des del moment de la seva adquisició).

Aquest anticòs del que parlem, assegura la unió de TBC1D15 amb les beads. La tècnica ens permet, a més, que qualsevol molècula unida a la proteïna diana (Ha) s'uneixi directament també a l'anticòs proporcionat. Això ens indica que si la nostra hipòtesi és correcta, amb les beads s'hi troba TBC1D15 unit a la vegada a algun tipus de Rab7.

Tot aquest mètode ens acaba servint per a separar les proteïnes que ens han interessat des del principi de totes les altres que de forma inespecífica s'havien anat quedant a la placa de Petri després de la lisi cel·lular. Obtenim com a resultat, per tant, l'aïllament definitiu de TBC1D15, molècula per a la qual s'han utilitzat anticòs específics, i d'altra banda el possible aïllament d'algun tipus de Rab7, en el cas en que formi complex en algun moment amb TBC1D15.

⁵⁰ Terme que s'utilitza per fer referència a alguna cosa que s'origina i que per tant prové de l'exterior. En aquest cas descriu un procés que no té a veure amb la configuració natural de la cèl·lula.

Curs 2020 - 2021

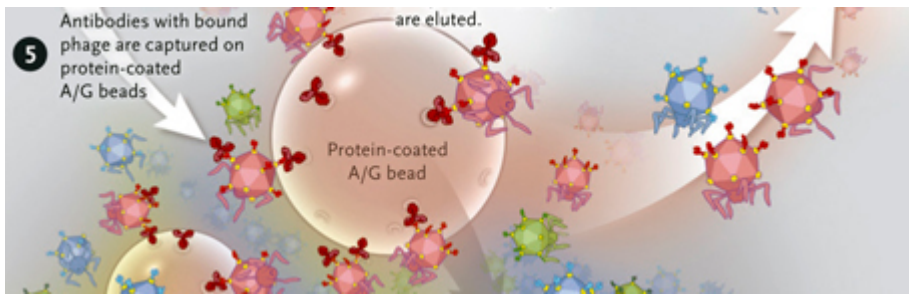


Figura 23. Mostra del procés de coimmunoprecipitació. El cercle vermell primerament exemplifica una de les beads d'agarosa recoberta d'anticòs específic (en el nostre cas per a Ha). Cada una de les petites formes geomètriques del mateix color fa referència a les proteïnes d'interès, els trèvol que sorgeixen d'aquestes representen les altres molècules que puguin estar unides a les TBC1D15 (com podria ser Rab7, si forma complex amb TBC1D15) i la resta d'estructures són les proteïnes alienes que estaven a dins de la cèl·lula i que es barregen i distribueixen per tota la placa de Petri en el moment en què es produeix el lisat de la membrana plasmàtica.

(Font: <https://www.savalnet.cl/cienciaymedicina/progresosmedicos/fagos-para-la-deteccion-de-autoanticuerpos.html>)

Amb l'objectiu d'eliminar totes les proteïnes restants del medi que no volem i que no ens incumbeixen, es fan diferents rentats amb el mateix buffer que utilitzem per a la lisi de la membrana cel·lular, ja que conté algunes molècules capaces d'arrossegar les proteïnes amb facilitat.

5.4 Part final del tractament de les cèl·lules Hek 293T

Per poder veure els resultats de la coimmunoprecipitació i per tant per a comprovar si alguna tipologia de Rab7 realment s'ha quedat enllaçada a TBC1D15 formant un complex específic, cal portar a terme les tres últimes fases de l'experiment, les quals estan estretament relacionades entre elles. Aquestes s'anomenen electroforesi, transferència i Western Blot.

Electroforesi (dia 6)

És molt important tenir en compte que per aconseguir resultats concluent amb el Western Blot, que és l'últim pas, és necessària una electroforesi. Durant el Western, les proteïnes d'interès són arrossegades per anticòs específics per cada una d'elles,

Curs 2020 - 2021

formant per acció pròpia d'aquesta influència una mena de línia o marge grisós. Aquest ens proporciona la informació que necessitem sobre si l'anticòs ha o no detectat la proteïna que buscava.

Si les possibles proteïnes que poden estar en contacte amb TBC1D15 (Rab7 en els seus diferents estats) es mantenen unides a ella, i es realitza el Western Blot sense aplicar cap altre tècnica per a separar-les, no visualitzem res referent a la pregunta que ens fèiem al principi de la part pràctica del treball. La raó és senzilla. L'aplicació de l'anticòs que arrossega a TBC1D15 funciona segur, i per tant es forma la línia de la que parlàvem. Però la de l'anticòs encarregat de tibar de Rab7, no sabem si funciona o no, perquè en lloc de formar una nova línia, es manté al mateix lloc, degut a l'enllaç que existiria entre TBC1D15 i rab7 i que provocaria que aquestes, per força, es moguessin juntes.

La funció de l'electroforèsi és precisament, separar a TBC1D15 de les altres proteïnes a les que pretenem que estigui unida (Rab7).

Això s'aconsegueix per mitjà d'un gel de poliacrilamida ⁵¹ i a partir de l'aplicació d'un camp elèctric. El tipus de gel, permet que la tècnica també es pugui anomenar PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

El procés comença amb la desnaturalització ⁵² de les proteïnes a altes temperatures (aspecte que ja permet una primera separació entre les TBC1D15 i les partícules que puguin estar unides a ella, que nosaltres esperem que siguin Rab7) i amb la formació del gel, que pels seus components, és capaç de generar una mena de matriu amb petits porus pels que després passen les proteïnes.

A continuació es col·loquen les proteïnes (barrejades amb algun colorant indicador que ens permetrà veure la seva posició al final) a dins de diferents pous del propi gel, que

⁵¹ Gran polímer format per la unió d'acrilamides, compostos orgànics que tenen la capacitat de polimeritzar (crear polímers) amb molta facilitat i que proporcionen el medi perfecte per a la separació de proteïnes.

⁵² Situació en la que, per culpa d'algun factor específic com la temperatura, la proteïna perd les seves estructures terciàries i secundàries, quedant com a estructura primària simple.

Curs 2020 - 2021

es creen quan aquest també s'està fent i que esdevenen el lloc base des del qual les molècules es mouen.

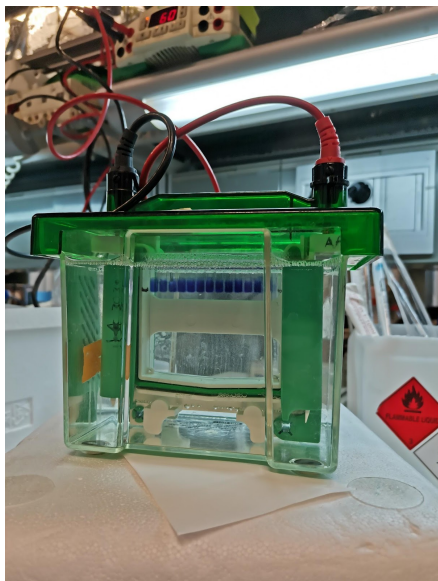


Figura 24. Imatge que mostra la tècnica d'electroforesi i el muntatge que requereix. A partir de la fotografia podem observar les mostres (blaves) en el seu estat anterior al moviment provocat pel camp elèctric, col·locades totes en els seus pous respectius. (Font: elaboració pròpia).

La tècnica es basa principalment en la idea que indica que cada proteïna té un pes molecular diferent i per tant una mida que no coincideix amb la d'un altre tipus de partícules. Les proteïnes de menys massa molecular, és a dir, les més petites, són les que avancen més ràpid i les que tenen més facilitat per a passar entre els porus del gel. Les que pesen més, són més lentes i es troben amb més inconvenients per a poder circular adequadament.

Amb la finalitat que les proteïnes reaccionin amb el camp elèctric i es moguin, es lliguen amb un compost anomenat *sodium dodecyl sulfate* (SDS). Aquest proporciona la càrrega negativa que necessiten les macromolècules per a moure's des de la zona en la que estan en direcció a la part baixa del gel, a la que se li està aplicant una càrrega elèctrica positiva que provoca l'atracció que es requereix per al desplaçament.

Curs 2020 - 2021

Perquè tot el procés funcioni bé, cal també un líquid anomenat *running buffer* (permet la transmissió de l'electricitat a través del gel) i un recipient de plàstic en el que té lloc la major part de la tècnica.

En el moment en què s'observa que les primeres proteïnes de baix pes molecular arriben a la part inferior del gel, s'atura l'electroforesi, que dona com a resultat la separació de les molècules a diferents altures del gel, segons el tipus del que es tracti i la seva magnitud en estat elemental.

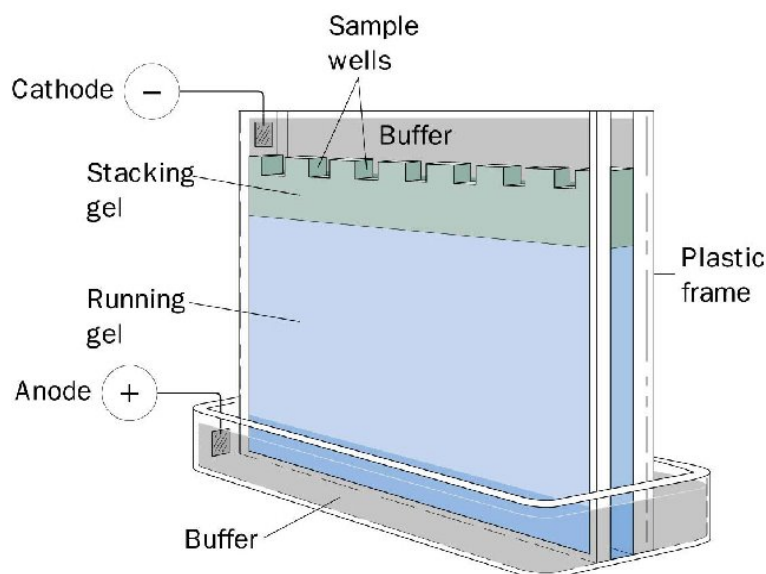
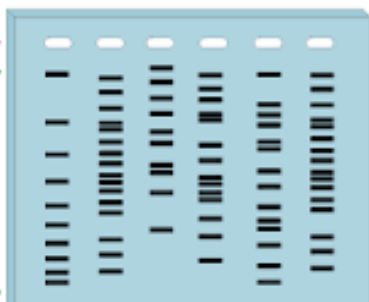


Figura 25. Mostra de cada un dels components necessaris (gel, recipient, corrent elèctric, mostres a analitzar i *running buffer*) per a la realització de l'electroforesi. (Font:

<http://lab-journal.blogspot.com/2006/05/post-cientfico-cultural-ensayos-de.html>)



Imatge 25. Mostra de com es veu el gel de poliacrilamida amb totes les proteïnes situades segons el seu pes molecular, després de l'electroforesi. (Font: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>)

Curs 2020 - 2021

Transferència (dia 7)

Perquè les proteïnes siguin accessibles a la detecció per anticossos del Western Blot, han de ser transferides (d'aquí el nom de la fase) des del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa ⁵³. Això es deu principalment a la fragilitat, a la difícil manipulació i a la poca retenció que presenta el gel envers els anticossos que necessitem per a marcar les proteïnes d'interès.

Tot i que existeixen diferents formes de realitzar la tècnica, nosaltres optem per la electrotransferència. Aquesta és la més comú i la més utilitzada actualment per la gran quantitat de proteïna que permet transferir sense pèrdua de contingut.

El mètode és molt semblant a l'electroforesi, basant-se en l'ús de l'electricitat i d'un tampó de transferència per a portar les proteïnes des del gel cap a la membrana. Per a aconseguir-ho, s'apilen diferents elements, seguint exactament el mateix ordre que s'exposa a continuació i en direcció al pol positiu (ànode) des del pol negatiu (càtode). Components: esponja, diferents papers de filtre amarats en *buffer* de transferència, gel obtingut de l'electroforesi, membrana, papers de filtre molls i esponja novament.

La reacció es pot produir en medi sec o en medi humit. A nosaltres ens interessa el medi humit especialment perquè aquest s'adequa a proteïnes difícils de transferir i a molècules que són molt importants i que s'han de poder anar conservant al llarg del procés. El muntatge de components esmentat, per tant, seguint amb les característiques del medi humit, s'acaba submergint en un compartiment amb més tampó de transferència. Allí és a on, posteriorment, s'aplica la corrent elèctrica que permet el desplaçament de macromolècules, la gran majoria de les quals queden finalment fixades a la membrana.

⁵³ Producte normalment sòlid semblant al cotó que s'utilitza per exemple com a matèria prima en l'elaboració de pintures, tintes i productes similars o com a substrat principal dels tests de diagnòstic ràpid (embaràs) entre d'altres.

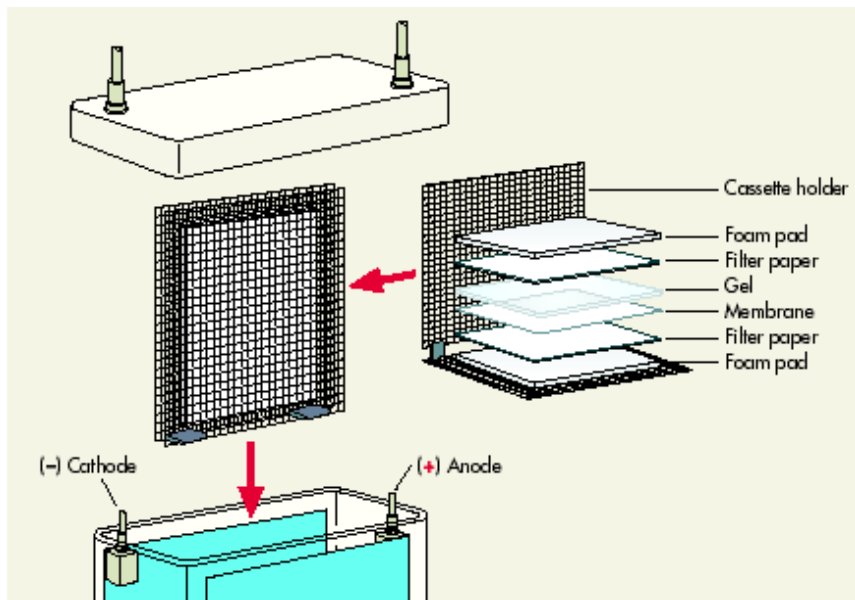


Figura 26. Imatge que mostra l'ordre en què es situen els diferents elements necessaris per a la transferència i que ens permet observar la correcta col·locació del muntatge a dins del compartiment adequat, que posteriorment rep la corrent elèctrica corresponent. (Font: <http://friveroll.github.io/blog/2016/06/06/western-blotting-partii-blotting/> / crèdits: Felipe Riveroll Aguirre)

Western Blot (dia 8)

Per molt que l'electroforesi i la transferència funcionin, seguim sense saber a quines proteïnes fan referència les línies obtingudes a partir del desplaçament de les molècules pel gel.

El problema però, es pot solucionar amb l'ús d'anticossos específics. Cada un d'ells s'encarrega de detectar una proteïna concreta i de permetre'ns comprovar si la molècula que buscàvem es troba o no entre les que estan fixades a la membrana.

El procés que ens permet determinar les proteïnes que conté el fragment de membrana s'anomena Western Blot, i el podríem dividir en quatre fases bàsiques:

- a) **Bloqueig de la membrana:** realitzem incubacions de la membrana en solucions proteiques d'albumina de sèrum boví, de llet en pols o de caseïna amb

Curs 2020 - 2021

l'objectiu d'impedir la unió dels anticossos a la membrana per la inespecificitat que presenta aquesta a l'hora d'enllaçar-se amb qualsevol tipus de proteïna. Les noves molècules aplicades a la solució es col·loquen als espais buits que queden de la membrana després de la transferència, assegurant a la vegada que els anticossos realitzen la funció apropiada.

b) Unió de l'anticòs primari: a continuació ja es poden afegir els anticossos primaris a la solució. Un d'aquests actua contra GFP (la proteïna unida a les tipologies de Rab7 de forma exògena). L'altre actua contra la macromolècula Ha, unida en aquest cas a TBC1D15. Ambdós anticossos provenen de fragments de plasma sanguini animal (el primer és de conill, el segon és de ratolí).

c) Unió de l'anticòs secundari: per a afegir els anticossos secundaris cal fer primer un rentat, que ens permet eliminar els anticossos primaris que no s'hagin pogut unir a les proteïnes diana. Posteriorment s'inclouen a la barreja dos anticossos nous. El primer detecta i s'uneix a un fragment del primer anticòs que detectava les GFP. El segon busca enllaçar-se a una part concreta del primer anticòs que detectava Ha. Cada un d'aquests anticossos prové també d'extracte de plasma sanguini animal (el primer és d'ase i el segon de cabra) i es troba unit a una molècula que emet fluorescència, en aquest cas a longituds d'ona infraroges.

El procés d'introducció d'anticossos primaris i secundaris no és instantani. Aquests necessiten temps per a actuar.

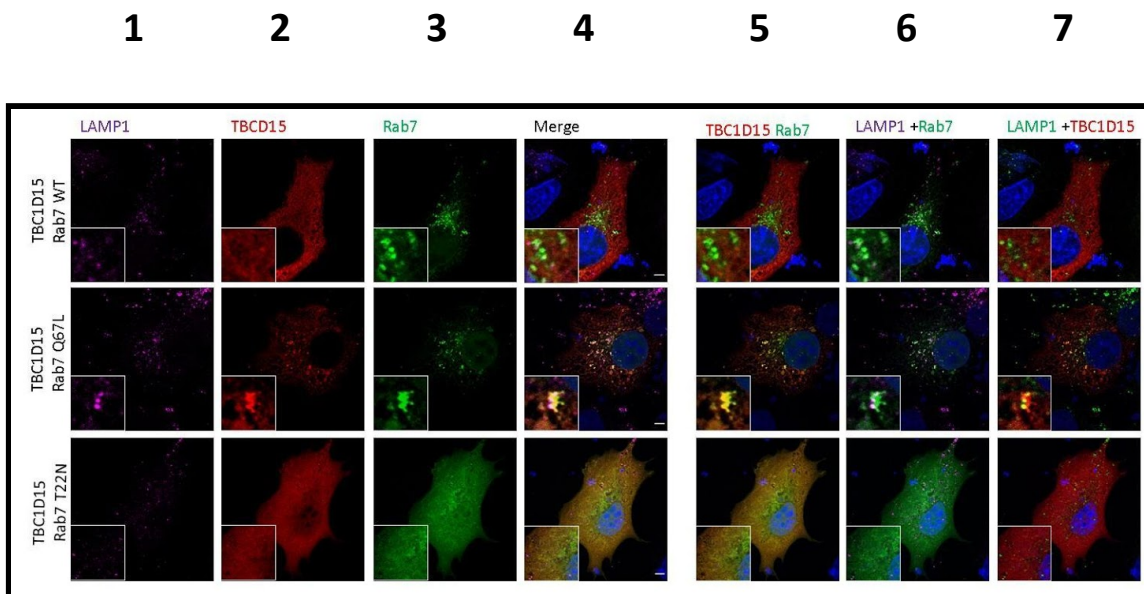
d) Detecció: S'utilitza una màquina especial, encarregada d'excitar les molècules que emeten fluorescència a una longitud d'ona determinada. D'aquesta manera s'obtenen els resultats que s'observen a partir de la imatge del Western Blot de l'apartat 7.2.

6. Resultats

Mitjançant aquest apartat es mostren els resultats obtinguts a partir de la immunofluorescència (en el cas de les cèl·lules Cos 1) i a partir de la coimmunoprecipitació (en el cas de les Hek 293T).

Recordem que la nostra intenció és comprovar si existeix la formació d'algun tipus de complex entre Rab7 i TBC1D15 que es pugui observar en una possible situació autofàgica, que no podem afirmar amb exactitud que tingui lloc, però que es podria intuir en els casos en què Rab7 està activada, ja que es coneix la seva implicació en el procés. Observarem a continuació si les tipologies de Rab7 en estat WT o la dominant negativa es relacionen amb la molècula a estudiar o amb alguna fase autofàgica reconeguda.

6.1 Immunofluorescència



La imatge es llegeix d'esquerra a dreta, per línies i des de dalt.

Cal esmentar abans de detallar els resultats, que es requereix d'un anticòs anomenat Lamp 1 que actua com a marcador de lisosomes. Aquest és necessari principalment

Curs 2020 - 2021

perquè Rab7 funciona, tal i com hem dit a la part teòrica, com a localitzadora d'òrgànuls degradants i com a facilitadora de la formació d'autofagolisosomes.

Les primeres tres imatges de cada línia representen el color que mostren cada un dels components de la immunofluorescència per separat. La quarta imatge de cada línia, d'altra banda, mostra la participació de tots els components junts, segons com es situen en relació al nucli (de color blau a les fotografies).

Color verd = participació de Rab7

Color vermell = situació de TBC1D15

Color lila = indicador de lisosomes

Color blau = nucli

Informació proporcionada per Rab7 WT amb la immunofluorescència:

Per a estudiar la nostra variable ens fixarem en la cinquena imatge de cada línia, que és precisament la que ens interessa perquè mostra només els colors de TBC1D15 i de Rab7. D'aquesta manera podem determinar si la seva situació és propera.

En el primer cas no s'observa la superposició de proteïnes, TBC1D15 es situa al voltant del nucli, és a dir, al citoplasma. Tot i així, s'observa a partir de l'ampliació de la imatge que existeix algun espai en el que es localitza molt de costat amb certes partícules de Rab7. No es percep cap tipus de complex que involucri a Rab7 i a TBC1D15.

Informació proporcionada per Rab7 modificada en estat constitutivament activat:

En aquest cas la proximitat que existeix entre Rab7 i TBC1D15 és òbvia pel canvi de color existent. Aquest indica que les proteïnes estan com a mínim molt juntes i que la fluorescència que generen cada una per separat ha acabat formant una barreja de colors (verd + vermell = groc). Es fa evident la col·localització de Rab7 amb TBC1D15, principalment perquè aquesta última ja no està situada al voltant del nucli com en la primera fotografia descrita. S'observen, a més, petites vesícules liloses que podrien

Curs 2020 - 2021

indicar la presència de lisosomes propers i per conseqüència una possible reacció autofàgica.

Informació proporcionada per Rab7 modificada en estat constitutivament inactiu:

S'observa la situació de TBC1D15 a voltant del nucli formant un patró dispers en el que no té contacte amb Rab7, que d'altra banda, deixa d'estar en forma de vesícules. Tal i com es veu a partir de les imatges i del zoom, ni Rab7 ni TBC1D15 localitzen al mateix lloc, a diferència del que succeeix amb les Rab7 Q67L i les molècules de TBC1D15 que interaccionen amb elles. No es distingeix la formació de cap tipus de complex entre proteïnes.

6.2 Coimmunoprecipitació

La coimmunoprecipitació ens ajuda a comprendre els resultats de la immunofluorescència i a la vegada ens permet ser més precisos a l'hora d'explicar perquè s'ha donat cada cosa, tal i com farem a l'apartat d'anàlisi de resultats.

Els resultats de la coimmunoprecipitació, que s'obtenen gràcies a les tres altres proves posteriors (electroforesi, transferència i Western Blot), s'acompanyen dels del lisat, com a mètode de comparació o ajuda.

Curs 2020 - 2021

1 2 3 4 5 6 7 8

| | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ha -TBC1D15 | - | + | - | - | - | + | + | + |
| GFP-Rab7 WT | - | - | + | - | - | + | - | - |
| GFP-Rab7 Q67L | - | - | - | + | - | - | + | - |
| GFP-Rab7 T22N | - | - | - | - | + | - | - | + |

1 2 3 4 5 6 7 8

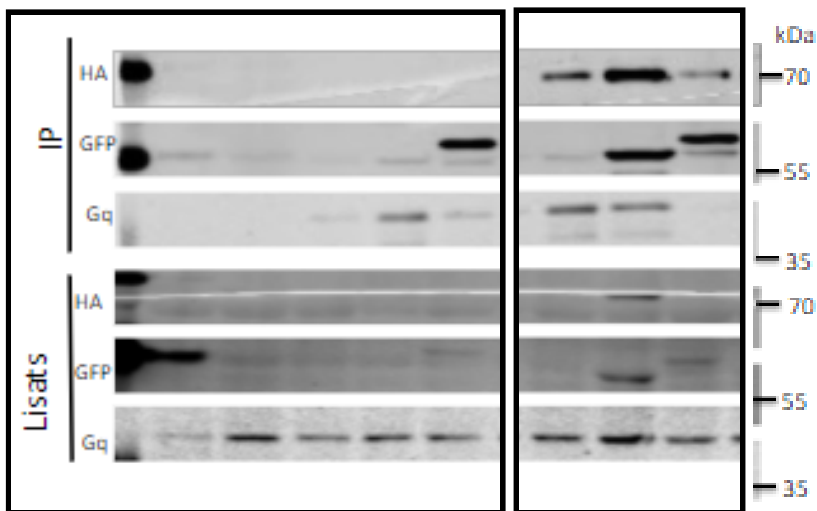


Figura 27. Imatge dels resultats obtinguts mitjançant el revelat dels mostratges aconseguits amb la coimmunoprecipitació (Font: elaboració pròpia)

Els signes positius i negatius de la part superior de la imatge fan referència a les proteïnes que s'havien transfectat en ordre (començant per l'èppendorf 1 i fins al 8).

D'altra banda, cada proteïna detectada pels anticossos primaris i secundaris aplicats amb la tècnica del Western, s'observa a partir de la figura situada a sota de la taula.

Curs 2020 - 2021

Western Blot (està descrit al dibuix com a IP perquè el Western en definitiva és el revelat del resultat de la coimmunoprecipitació):

Els 5 primers carrils del Western, independents dels lisats, són els grups control. El primer, no mostra l'arrossegament de cap tipus de proteïna, tot i que sí que es veu una línia molt suau, que sabem que ha de provenir per força d'un anticòs mal fixat o d'algun altre error comès. Podem fer aquesta afirmació perquè sabem que l'ependorff 1 no contenia material proteic. El segon, que només hauria de contenir TBC1D15, es mostra buit. Aquest resultat ve donat possiblement per l'arrossegament de beads, un problema detallat mitjançant l'apartat 7. Els carrils tres, quatre i cinc, d'altra banda, senyalen la localització de Rab7 WT, de Rab7 en estat constitutivament activat i de Rab7 dominant negativa, cada una situada en una via diferent. Tot i que destaquen les tres tipologies de Rab7 (sobretot en el cas de la negativa), no es detecta presència de TBC1D15.

El carril 6 mostra la presència específica de TBC1D15 conjuntament amb Rab7 WT, el 7 torna a indicar la detecció específica de TBC1D15 amb Rab 7 en estat constitutivament activat i el 8, que ja s'esmentarà a l'anàlisi, també mostra les línies que indiquen que s'ha arrossegat per mitjà d'anticossos a TBC1D15 i a Rab7 en estat constitutivament inactiu. S'observen línies molt més fosques amb la detecció de Rab7 en estat actiu. Això ens indica que es troba en molta més quantitat, igual que TBC1D15 en el mateix carril.

No tindrem en compte les dues línies que fan referència a Gq del Western i de la IP, ja que aquesta és una subunitat de l'anomenada proteïna G, que s'ha inclòs al procés per factors externs però que no influeix en els resultats obtinguts.

Observació dels lisats:

D'on surten les mostres utilitzades per a veure els resultats dels lisats?

Després de la transfecció de les cèl·lules Hek 293T i del lisat de totes aquestes, s'agafen unes quantitats mínimes de cada una de les mostres diferents que hi ha (que

Curs 2020 - 2021

coincideixen amb les de la ip). Aquests petits exemplars són utilitzats per a veure les proteïnes detectades per anticossos de la mateixa manera que amb la coimmunoprecipitació però passant directament a realitzar l'electroforesi, la transferència i el Western (com que no actuen les beads en cap moment, les proteïnes es troben lliures al medi). La resta de lisat cel·lular que queda, és utilitzat a posteriori per a realitzar la coimmunoprecipitació.

La observació dels resultats dels lisats és difícil principalment pel tall que existeix de la línia de TBC1D15 i que es realitza sense voler després de la transferència. A l'apartat següent ja s'expliquen quins són els resultats esperats, però els d'aquestes mostres, pels errors comesos, només ens permeten veure que hi ha detecció de TBC1D15 i de Rab7 activada. Les dues proteïnes baixen pel mateix carril, en quantitats considerables.

7. Anàlisi de resultats

A continuació s'analitzen amb detall els resultats obtinguts per a cada una de les dues proves especificades a l'apartat anterior i s'argumenten els errors que puguin haver tingut lloc.

7.1. Immunofluorescència

Els resultats obtinguts a partir de la immunofluorescència, coincideixen majoritàriament amb la hipòtesi que nosaltres plantejàvem en un principi.

Rab7 en estat WT:

En un primer moment ja observem, que Rab7 en estat WT i TBC1D15 no es troben al mateix lloc. TBC1D15 es manté al citoplasma de forma dispersa, a diferència de Rab7, que es situa en vesícules més aglutinades a prop del nucli.

Curs 2020 - 2021

Tot i així, és possible veure a través de l'ampliació de la imatge, que existeix algun punt de coincidència entre les proteïnes. Aquest indicatiu està relacionat amb l'estat en què es troba Rab7 WT (inactiu o actiu).

De totes maneres la interacció no es pot confirmar, degut a la poca precisió del microscopi confocal utilitzat per a realitzar la prova.

Rab7 en estat constitutivament activat:

S'observa un canvi de posició de TBC1D15 i de Rab7. Aquestes dues passen d'estar separades a superposar-se. Aquesta superposició indica la possible interacció entre Rab7 i TBC1D15.

S'identifica també el marcador lisosomal LAMP 1, a prop de TBC1D15 i Rab7. El fet que TBC1D15 es presenti en forma de vesícules, a prop de LAMP 1 i generant una possible interacció amb Rab7, suggereix la possible participació de TBC1D15 en processos autofàgics.

Tot i així, no es pot confirmar res del que observem, per manca de precisió de la tècnica.

Rab7 en estat constitutivament inactiu:

A partir de la imatge s'observa la predisposició de TBC1D15 a situar-se disgregadament pel citoplasma cel·lular i separada de Rab7. No es pot veure cap canvi representatiu que ens permeti afirmar que existeix interacció entre Rab7 i TBC1D15. La falta del marcador lisosomal LAMP 1, ens indica també que no és possible que s'estigui donant un procés autofàgic.

Anàlisi general:

La informació obtinguda a partir de les tres variables anteriors, sembla equiparar-se a la hipòtesi inicial, que proposava la possible formació d'un complex entre Rab7 i TBC1D15 durant un procés autofàgic i la possible participació de TBC1D15 en autofàgia.

Curs 2020 - 2021

No obstant, la hipòtesi no es pot confirmar, per la falta de precisió de la tècnica utilitzada.

7.2 Coimmunoprecipitació

Anàlisi de grups control:

Els grups control de la coimmunoprecipitació abarquen des del primer carril fins al cinquè. Aquests grups esdevenen una guia important durant tot el procediment per a assegurar que els resultats obtinguts són vàlids.

1. En principi, el carril 1 hauria d'estar buit, ja que el primer eppendorf que seleccionem al principi de la part pràctica no conté cèl·lules transfectades amb proteïnes, sinó simplement cèl·lules en el seu estat normal. Creiem doncs, sense poder afirmar-ho amb seguretat, que el que veiem no és cap tipus de proteïna, sinó un marcador de pes molecular (ens permet saber a quin pes es troba cada línia per a poder indentificar-la com a específica), que a vegades es mou d'un carril a l'altre quan el carreguem durant l'electroforesi.
2. La falta d'una línia que ens indiqui la identificació de TBC1D15 en el segon control, no implica que no existeixi la proteïna sinó que durant els rentats de les beads, les macromolècules es separen, perdent la seva unió amb les microesferes. És a dir, no s'observa el marcatge que s'hauria de veure, perquè possiblement s'ha perdut a base de fer rentats massa exagerats.
3. Tant les deteccions que permeten veure certes línies situades als carrils 3 i 4 com la que identifica en gran quantitat a Rab7 en estat inactiu al 5 són errònies. Són incorrectes perquè per arribar a revelar el Western és necessària la ip, una tècnica que funciona a partir de l'ús d'un anticòs que actua en contra de Ha, la proteïna unida a TBC1D15. Si no existeix TBC1D15 en el control, és impossible que baixin les Rab durant la ip.

Curs 2020 - 2021

Variables dels carrils 6,7,8:

El carril 6 ens mostra la identificació de TBC1D15, que s'observa amb Rab7 en estat WT. Aquesta és una dada de vital importància perquè ens està indicant, que si s'han localitzat les dues proteïnes juntes, és perquè en algun moment han interaccionat, formant un possible complex.

El carril 7 també ens mostra la detecció de TBC1D15 amb Rab7 en estat actiu, indicació que pot suggerir que Rab7 interaccionava amb TBC1D15 durant la coimmunoprecipitació. Si no haguessin interaccionat, Rab7 no formaria part de l'estudi perquè s'hauria perdut conjuntament amb les altres proteïnes no unides a TBC1D15

Aquest carril és el que té més Rab7 i més TBC1D15, degut a la facilitat d'interacció entre Rab7, que sempre està activada, i TBC1D15.

La quantitat de Rab7 que es troba al carril 6 és menor a la que hi ha al carril 7 principalment perquè Rab7 en estat actiu té més possibilitat d'unir-se continuament a proteïnes TBC1D15 que no pas Rab7 en estat WT.

Per últim tenim el carril 8, que presenta TBC1D15 i Rab7 dominant negativa. El que voldríem demostrar és que Rab7 s'inactiva per mitjà de TBC1D15. Segons la nostra hipòtesi, si Rab7 es manté inactiva en tot moment, no interacciona amb TBCD15. Ara bé, el que es veu a la imatge del Western és diferent. La línia negra de marcatge ens indica que si que es possible que Rab7 en estat inactiu s'uneixi i estigui en contacte amb TBC1D15.

Tot i així, la identificació de Rab7 en estat inactiu i de TBC1D15 en aquest cas, es produeix en molta menys quantitat que en el cas de la Rab7 WT o de la que està continuament activada, encara que no ens ho sembli, tenint en compte que la foscor de la línia no es correspon amb el que esperàvem veure.

Per què passa això?

Curs 2020 - 2021

El procés d'autofàgia, tal i com hem dit a partir del nostre marc teòric, es relaciona directament amb la degradació de molts tipus de molècules, algunes de les quals també són Rabs, com la Rab7. Si s'atura el procés d'autofàgia de la cèl·lula de forma definitiva, com passa amb l'aplicació d'una mutant de rab7 que sempre es troba en estat inactiu, no hi ha degradació natural de certes molècules que de tant en tant s'han d'anar reciclant. Això comporta un augment molt elevat del nivell de Rab7, ja que en si mateixa aquesta és una proteïna que també pateix degradació. Aquest augment determina la observació d'una línia més fosca. És a dir, no és que s'uneixi en més quantitat a TBC1D15, sinó que existeix en més quantitat que les altres tipologies.

8. Conclusions

El camp de l'autofàgia i de la degradació cel·lular és un tema molt complex i que actualment genera moltes preguntes, la majoria de les quals encara no tenen resposta. El fet que tot siguin coneixements relativament nous (no es coneixia ben bé com funcionava el procés fins que Yoshinori Ohsumi va presentar les seves troballes), permet que la investigació que es porta a terme en relació a les conseqüències del procés o als seus participants pugui estar subjecta encara a dubtes molt diversos.

Em sembla interessant treballar amb coneixements ja esmentats en altres publicacions, perquè considero que sempre existeix la possibilitat de modificar-los, matitzar-los o ampliar-los.

Les meves conclusions, per tant, es basen en allò que he obtingut i en la relació que li he pogut donar amb el que ja es sabia sobre el tema.

A través dels resultats obtinguts durant aquesta part pràctica he arribat a dues conclusions remarcables, que passo a detallar a continuació.

En primer lloc, cal parlar de la tècnica d'immunofluorescència. Aquesta sembla indicar que existeix interacció entre Rab7, tan en estat actiu com en estat WT, i TBC1D15. Tot i així, no es pot confirmar perquè la prova no esdevé prou precisa. La localització de LAMP 1 com a marcador de lisosomes, conjuntament amb Rab7 activada i TBC1D15,

Curs 2020 - 2021

implica la possible participació de TBC1D15 en processos autofàgics no selectius. No es pot afirmar que aquest procés tingui lloc únicament amb la informació de què disposem. No s'observa cap tipus de possible interacció entre Rab7 en estat inactiu i TBC1D15.

En definitiva, amb la prova de la immunofluorescència, no podem constatar la veracitat de la nostra hipòtesi.

Aquests tipus de procediments científics també ens permeten afirmar que no totes les proves són igual de fiables per arribar a unes determinades conclusions. Cada variable i cada procés afecta de formes diferents als productes experimentals resultants, i aquí és on precisament recau la importància d'utilitzar tècniques diferents i controls adients a la situació.

La coimmunoprecipitació com a segona part del procediment, ens permet observar un dels aspectes esmentats en la hipòtesi. A partir de la prova, es confirma l'existència de la interacció entre Rab7 en estat actiu i TBC1D15 i en menor mesura la que es produeix entre Rab7 en estat WT i TBC1D15 novament.

S'identifica a la vegada un error en els resultats obtinguts de Rab7 en estat constitutivament inactiu. Segons la nostra hipòtesi, no existiria interacció entre Rab7 en estat inactiu i TBC1D15. Tot i així, existeix una explicació possible relacionada amb l'aturament del procés d'autofàgia provocat per la inactivitat de Rab7 i per conseqüència per la impossibilitat de degradar proteïnes. S'obre per tant, un nou debat sobre la possible interacció que hi pugui haver també entre Rab7 inactiva i TBC1D15.

Els errors que s'observen en els controls no ens permeten determinar que tot el que hem obtingut sigui cert tal i com ho hem descrit, per això es considera necessari repetir tot el procediment, amb l'ús de controls verificats.

En resum, els resultats obtinguts ens indiquen aspectes molt similars als de la hipòtesi.

Curs 2020 - 2021

Si els nostres controls haguessin sortit bé en el cas de la segona prova, hauríem pogut afirmar que Rab7 en estat actiu i en estat WT interacciona amb TBC1D15.

D'altra banda, es podria considerar possible la participació de TBC1D15 en processos autofàgics, però aquesta és una variable, que amb les tècniques realitzades, no es pot demostrar.

CONCLUSIONS

1. Conclusions i valoració del treball

Al llarg d'aquest treball hem anat coneixent un gran ventall nou d'aspectes relacionats amb l'autofàgia que desconeixíem. Hem pogut entendre la influència de les proteïnes en moltes de les reaccions que tenen lloc a dins de l'organisme i hem comprovat que el funcionament cel·lular és molt més complex del que sovint ens pensem.

Això queda clar amb la observació de totes les malalties i/o patologies relacionades amb errors genètics que poden presentar les nostres cèl·lules per mutacions...

Hem pogut concloure que les proteïnes TBC1D15 i Rab7 influeixen en el procediment d'autofàgia, per molt que les tècniques utilitzades no ens hagin proporcionat informació més precisa sobre els fets.

Si bé podríem considerar que la nostra hipòtesi es relacionava directament amb els resultats obtinguts, podem afirmar que és necessari repetir tots aquests procediments per arribar a conclusions més concretes.

A nivell personal el treball ha estat un repte. M'he trobat amb certs entrebancs que en definitiva m'han obligat de certa manera a organitzar-me, a treballar bé i a no

Curs 2020 - 2021

rendir-me envers l'obtenció de resultats que potser no s'adequaven en un primer moment al que esperàvem.

Aquest treball m'ha donat la oportunitat de conèixer de més aprop el món científic i la vida de laboratori. Aquesta m'ha acostat molt al camí de la recerca, un món que sense dubte em plantejaré en un futur com a projecte laboral.

He d'acceptar que aquest treball era molt complex. La informació proporcionada no era fàcil de comprendre i molt menys de redactar. Tot i així, estic contenta d'haver après a relacionar conceptes amb facilitat i d'haver aconseguit resumir i explicar processos científics que de primeres podrien semblar intel·ligibles.

En resum, la realització d'aquest treball no només m'ha proporcionat una gran quantitat de coneixements sinó també una nova visió en referència al meu dia a dia que a partir d'ara, aplicaré.

2. Agraïments

M'agradaria donar les gràcies en primer lloc a la tutora d'aquest treball per la seva ajuda indispensable en la realització del projecte.

També m'agradaria agrair la seva col·laboració a en Javier Rubio, investigador del Parc científic de Barcelona, que m'ha permès conèixer el seu laboratori, donant-me la oportunitat de fer una part experimental que sense ell no hauria estat possible.

Voldria valorar també el gran treball que realitza la Fundació Catalunya-La Pedrera i tot l'equip relacionat amb el projecte de Bojos per la Bioquímica. Gràcies a ells vaig començar a acostar-me al món de les ciències i vaig descobrir, que el coneixement i l'estudi són eines primordials no només per a l'educació sinó per a qualsevol aspecte de la vida diària.

Abans de donar per acabat l'apartat em queda donar les gràcies als meus pares, per ser les persones que sempre em donen suport i que no dubten de la meua capacitat

Curs 2020 - 2021

d'aconseguir el que em proposo, fins i tot quan jo mateixa perdo la confiança de cada un dels meus actes. No podria estar més agraïda de tot el que m'han ensenyat i de les lliçons que estic segura que encara em queden per conèixer.

BIBLIOGRAFIA

Guía metabólica (Hospital Sant Joan de Déu), 11 juny 2014,

<https://metabolicas.sidhospitalbarcelona.org/etiquetas/deficiencia-maltasa-acida#:~:text=La%20Glucogenosis%20Tipo%20II%20%2D%20llamada,enzima%20lisosomal%20alfa%2Dglucosidasa%20%C3%A1cida.>

Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD., 2014, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=cell+cultures+review+>.

Alec Forssmann. "El japonés Yoshinori Ohsumi recibe el Premio Nobel de Medicina 2016." *National Geographic España*, 3 10 2016, https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/actualidad/japones-yoshinori-ohsumi-recibe-premio-nobel-medicina-2016_10745

Almudena Porras / Isabel Marzo. "Apoptosis: una forma controlada de muerte celular." mayo 2010,

<https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/289-apoptosis-una-forma-controlada-de-muerte-celular.>

Andrea Ramírez-Sagredo / Larissa Aleman. "Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro." *Scielo*, 26 desembre 2016, https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-85602016000300004.

Ariana Veiga. "Western Blot Introducción y Optimización." 10 abril 2013,

[https://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf.](https://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf)

Curs 2020 - 2021

“Capítulo 1 : Introducción al cultivo celular.” http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf.

Carmen Martha Elinos-Báez / Vilma Maldonado. “Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis.” 26 noviembre 2001, <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2003/gm035h.pdf>.

Carolina perez barreiro. “Cultivos celulares.” *Slideshare*, 26 octubre 2016, <https://es.slideshare.net/carolinaperezbarreir/cultivos-celulares-67681634>.

“Cultivo Celular.” [https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular#:~:text=El%20cultivo%20de%20c%C3%A9lulas%20tuvo,in%20vitro%20\(Freshney%2C%201987](https://www.ecured.cu/Cultivo_Celular#:~:text=El%20cultivo%20de%20c%C3%A9lulas%20tuvo,in%20vitro%20(Freshney%2C%201987).

“Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa.” *Google libros*, <https://books.google.es/books?id=nQ9ZBQAAQBAJ&pg=PA24&lpg=PA24&dq=ross+granville+harrison+aportaciones&source=bl&ots=AorEYDxwiN&sig=ACfU3U1j8WOHGCagFTzQ5MabU13-pMRVWA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewiGwefQtJqAhUL8BQKHtmMCwYQ6AEwB3oECAoQAQ#v=onepage&q&f=false>.

Dani Ribo. *Slideshare*, 31 enero 2013, <https://es.slideshare.net/daniribo/44-els-lisosomes>.

“El ayer y hoy de las técnicas y medios de cultivo celular.” *Ibian technologies*, <https://www.ibiantech.com/el-ayer-y-hoy-de-las-tecnicas-y-medios-de-cultivo-celular/#:~:text=Se%20entiende%20por%20cultivo%20celular,propiedades%20fisiol%C3%B3gicas%2C%20bioqu%C3%ADmicas%20y%20gen%C3%A9ticas>.

Curs 2020 - 2021

“ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.”

<http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/quimicabiologica1/wp-content/uploads/2011/04/SDS-PAGE.pdf>.

“Èlia Riubugent Camps.” *StuDocu*,

<https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/ampliacio-biologia-celular/apuntes/tema-1-cultius-cellulars/2382654/view>.

“Evolución de los Cultivos Celulares.” *Encolombia*,

[https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_evolucion15/#:~:text=Evoluci%C3%B3n%20de%20los%20Cultivos%20Celulares,vitro%20\(Freshney%2C%201987\)](https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_evolucion15/#:~:text=Evoluci%C3%B3n%20de%20los%20Cultivos%20Celulares,vitro%20(Freshney%2C%201987)).

“Fagos para la detección de autoanticuerpos.” *Salvalnet*, 29 juliol 2019,

<https://www.savalnet.cl/cienciaymedicina/progresosmedicos/fagos-para-la-deteccion-de-autoanticuerpos.html>.

“INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR.” <http://servicios.unileon.es/formacion-pas/files/2014/02/Introducci%C3%B3n.pdf>.

JAVIER RAMÍREZ RICARDO. “Descubrimiento del lisosoma y peroxisoma.” *Gobierno de México*, 13 octubre 2020,

<https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/descubrimiento-del-lisosoma-y-peroxisoma/>.

Joel Ricci. “Inmunofluorescencia.” *Slideshare*, 17 febrer 2014,

<https://www.slideshare.net/RicciBW/inmunofluorescencia-31314494/5>.

Jorge Pérez Machado / Alejandro Eliécer Lie Concepción. “Apoptosis, mecanismo de acción.”

<https://www.medigraphic.com/pdfs/revciemedhab/cmh-2012/cmh122o.pdf>.

Curs 2020 - 2021

Karolina Szczesna. "INMUNOFLUORESCENCIA: CAMPO AMPLIO VERSUS CONFOCAL." *Labclinics*, 30 abril 2019,

<https://www.labclinics.com/inmunofluorescencia-campo-amplio-versus-confocal/>.

"La célula. Ampliaciones." *Atlas de histología vegetal y animal*,

<https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/ampliaciones/5-autofagia.php>.

"La Red Beclin 1 Regula La Autofagia Y La Apoptosis."

<https://spa.kyhistotechs.com/beclin-1-network-regulates-autophagy-10210572>.

"LISOSOMAS." *Animales*, <https://www.animales.website/lisosomas/>.

LUIS CARBAJAL RODRIGUEZ. "DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES POR DEPOSITO LISOSOMAL."

http://www.pediatrasyucatan.org.mx/docs/presentaciones/enfermedades_deposito_lisosomal.pdf.

María Castaño, Juan Zapata /. "Cultivos Celulares."

<https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/326742/20784033>.

Marta Miguel Castro / Elena Herrero Martínez. "Desarrollo de las Técnicas de Cultivos Celulares."

<https://www.formacionegs.com/archivos/1325673989.pdf>.

"Método más simple y barato para la fusión celular." *Sólociencia*, <https://www.solociencia.com/biologia/07010502.htm>.

Michael Rivera. "Historia e importancia del cultivo celular." *Slideshare*, 10 2 2012,

<https://es.slideshare.net/uscbio225/historia-cultivo-celular>.

Curs 2020 - 2021

Muñoz-Braceras, Sandra. "The role of VPS13 proteins in autophagy." 2017, <https://digital.csic.es/handle/10261/191036>.

Nahum Montagud Rubio. "Lisomas: qué son, estructura y funciones en la célula." *Psicología y mente*,
<https://psicologiaymente.com/salud/lisosomas>.

Nohra Elsy Beltrán Vargas. Claudia Haydée González de la Rosa. "15Técnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingeniería_de_Tejidos.pdf"
febrero 2016.

"Odyssey® CLx." *Bonsai Lab*, <https://bonsailab.com/producto/proteomica/sistemas-de-imagen/odyssey-clx/>.

"1.3 Cell culture_es." https://www.ucm.es/data/cont/docs/1462-2017-10-18-1.3%20Cell%20culture_es.pdf.

Óscar Jodra. "fundamentos de cultivo celular." 2018,
<http://biociencias.jodra.net/wp-content/uploads/2019/04/Fundamentos-de-cultivo-celular.pdf>.

"Post Científico-Cultural: Ensayos de Retardo de DNA." *LabJournal*, 2 maig 2006,
<http://lab-journal.blogspot.com/2006/05/post-cientifico-cultural-ensayos-de.html>.

R. Ramírez Chamond J. Carracedo Añón / C. Moreno Aguilar / F. Guerra Pasadas. "Apoptosis y enfermedad."
<http://revista.seaic.org/diciembre99/367-374.pdf>.

Sara Fernández. "Cultivos celulares, su potencial para el desarrollo de alimentos funcionales." *Ainia*,
<https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/cultivos-celulares-y-desarrollo-alimentos-funcionales/>.

Curs 2020 - 2021

“Síndrome de Hurler.” *Orphanet*, Marzo 2014, https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=93473.

Sonia López Pérez. “TEMA 1: CULTIUS CEL·LULARS.”

<https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/ampliacio-biologia-cellular/apuntes/tema-1-cultius-cellulars/2421283/view>.

“Técnicas basadas en inmunoprecipitación: purificación de proteínas endógenas mediante cuentas de agarosa.” *Jove*,

<https://www.ijove.com/v/10502?language=Spanish>.

“Ventajas Y Desventajas De Los Cultivos De Tejidos.” 26 octubre 2011,

<http://cultivosdetejidos.blogspot.com/2011/10/ventajas-y-desventajas-de-los-cultivos.html>.

“Yoshinori Ohsumi, Nobel de Medicina por descubrir el mecanismo de la 'autofagia.'” *Heraldo*, 3 10 2016,

<https://www.heraldo.es/noticias/internacional/2016/10/03/el-japones-yoshinori-ohsumi-nobel-medicina-por-descubrir-mecanismo-autofagia-1091571-306.html>.

ANNEXOS

Origen i història dels cultius cel·lulars

L'ús de cultius cel·lulars va començar ja cap al segle XIX, moment en el que va sorgir com a mètode per a l'estudi del comportament de les cèl·lules animals que, d'aquesta manera, es trobaven lliures de les variacions donades a dins de l'organisme i sotmeses a l'experimentació dels laboratoris de l'època. El concepte de mantenir línies de cèl·lules vives extretes de l'organisme va ser descobert gràcies al fisiòleg anglès Sydney Ringer, qui va destacar per la creació i el desenvolupament d'una solució salina que contenia clorur de sodi, calci i magnesi i que era capaç de mantenir latent el cor d'algunes espècies fins a dies després d'haver estat separat de l'ésser viu del que provenia.

No van tardar en aparèixer avenços que canviarien els aspectes formals i teòrics de la definició coneguda de cultiu cel·lular que es tenia en aquell moment. Al 1866, un nou científic de nacionalitat alemanya anomenat Reclinhausen va fer conèixer la possibilitat de mantenir vives cèl·lules sanguínies completament aïllades de la resta del sistema circulatori de les seves fonts d'investigació, els amfibis. Va aconseguir cultius "*in vitro*"⁵⁴ a partir d'un substrat que va donar lloc a la supervivència continuada de les cèl·lules, el plasma sanguini.

Al 1885, Wilhelm Roux va començar el desenvolupament de cultius de cèl·lules de vertebrats a partir de l'extracció d'una porció de medul·la d'embrió de pollastre. Aquest bocí de cordó nerviós es va mantenir durant alguns dies en disposició d'una solució salina tibia que servia com a medi de cultiu. Així va establir el principi dels cultius tissulars.

⁵⁴ En un medi artificial', 'en un laboratori'

Curs 2020 - 2021

Tot i així, va ser Ross Granville Harrison qui, treballant a l'Escola de Medicina de la Universitat Johns Hopkins i amb l'assessorament de Yale, va establir la metodologia del cultiu tissular en una sèrie de publicacions escrites entre 1907 i 1910. Un dels seus primers treballs va ser un article breu però a l'hora crític titulat "Observacions de la fibra nerviosa viva en progrés", en el que va introduir exitosament una nova tècnica, "el cultiu de teixits" que els altres investigadors anomenats ja havien utilitzat en pràctiques anteriors. D'aquesta forma va poder demostrar experimentalment com s'originaven els filaments nerviosos. Va poder observar el creixement dels axons dels neuroblasts i va establir que aquesta prolongació es formava per expansió a partir del cos neuronal i no per fusió d'una cadena de cèl·lules.

Harrison va seguir un procés determinat d'estudi cel·lular basat en tècniques asèptiques treballades amb teixit embrionari del sistema nerviós d'una granota. Aquest es va dipositar en una gota de líquid limfàtic del propi embrió. La substància aquosa va esdevenir un bon medi de cultiu i es va col·locar a sobre d'un cobreobjectes estèril.

El teixit va coagular i va donar lloc a una massa més espessa. Granville va invertir el cobreobjectes sobre un portaobjectes de vidre que posseïa una mena de depressió, creant així un cultiu en gota suspesa, tècnica encara utilitzada per microbiòlegs per a estudiar l'activitat bacteriana. Totes les observacions microscòpiques que va dur a terme van permetre assolir la resolució dels problemes bàsics dels cultius cel·lulars, com el medi de cultiu, la inspecció i/o la contaminació.

Curs 2020 - 2021

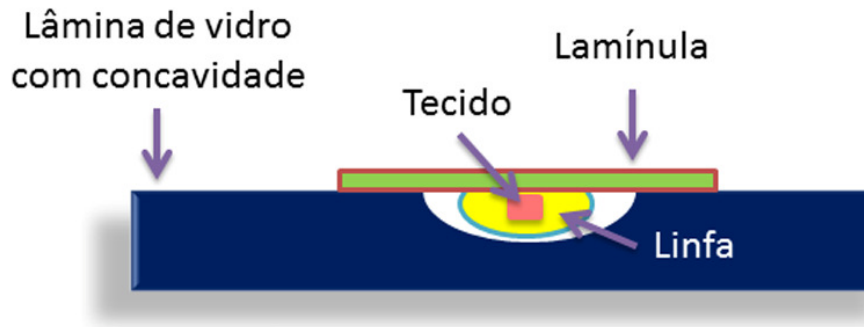


Figura: experiment de Ross Harrison (1907) en el que s'observa el teixit neuronal inclòs en una gota de líquid limfàtic embrionari. (Font:

https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Esquema-mostrando-o-experimento-desenvolvido-por-Ross-Granville-Harrisson_fig1_216764483)

Els avenços mèdics de l'època van comportar l'inici d'estudis relacionats amb mamífers. Aquests van permetre obtenir resultats més adients i més proporcionats al que buscaven per la semblança que comparteixen aquests animals amb els humans. Alexis Carrel va ser un dels primers investigadors en comprendre els beneficis de les noves experimentacions. Cap al 1912, moltes de les tècniques existents ja s'havien perfeccionat i el coneixement necessari per al bon desenvolupament dels mètodes estava a l'abast de molts instituts científics, raó per la qual aquest tema es va anar treballant amb molta facilitat. No va ser d'estranyar per a altres presències del món científic que el propi Carrel presentés 124 treballs dedicats al cultiu específic de teixits. Tot i que la situació havia millorat molt, encara no era possible eliminar

Curs 2020 - 2021

algunes de les notables limitacions que impedièren obtenir els resultats desitjats. La poca visibilitat i la contaminació del medi impossibilitava veure bé el cultiu o el seu creixement. Tot això ho va solucionar Carrel, que en conjunt amb M. Burrows, va afegir als cultius factors de creixement que van permetre millorar la funció nutricional de les cèl·lules en qüestió. El desenvolupament del conegut flascó de Carrel també va ser un aspecte clau, ja que va esdevenir essencial per a evitar les alteracions bacterianes que es produïen habitualment. Això va permetre garantir l'èxit de la propagació cel·lular "*in vitro*".

Entre 1920 i 1940 s'estableixen línies cel·lulars de diversos òrgans d'animals obtingudes mitjançant la constant aplicació de l'ús dels cultius. Una línia cel·lular s'estableix quan es demostra la seva potencialitat de replicar-se indefinidament. Aquestes posseeixen propietats conferides per diferències en la dotació cromosòmica (aneuploidia), característica donada per una transformació genètica (mutació) que tendeix a persistir entre successius passatges o subcultius. Les línies cel·lulars comencen sent cultius generals que, per la raó anomenada anteriorment, aconsegueixen passar el límit de Hayflick ⁵⁵, el moment en que s'hauria de produir la mort cel·lular si el funcionament de cada unitat es donés de forma normal.

Aquestes línies van aportar millores significants per a quasi tots els àmbits científics. Van servir per a trobar noves vacunes, per a investigar malalties i la seva provinença, per a descobrir nous tractaments i per a tractar temes molt poc coneguts.

Les tècniques relacionades amb la supervivència i amb la generació de cultius cel·lulars van avançar molt durant els anys 40 i 50 com a suport per a la recerca en virologia, biomedicina, química... No va ser d'estranyar que el cultiu de cèl·lules animals esdevingués una tècnica (sinònim) rutinària de laboratori durant els anys següents. La utilització de cultius cel·lulars per a la producció de virus va donar lloc a un tipus d'investigació molt centrat en esbrinar l'origen d'aquests, la seva capacitat i velocitat de propagació i la via d'extensió. Al 1913, ja va ser possible demostrar que la verola podia

⁵⁵ Nombre de vegades que una cèl·lula es pot dividir abans d'aturar-se a causa del fet que el telòmer (extre assom del cromosoma) deixa una llargada crítica

Curs 2020 - 2021

sobreviure durant varies setmanes en cultius de teixits de còrnies de conills, i vint anys més tard, s'arribava a una expectant i revolucionària conclusió, que indicava que molts virus a l'hora de multiplicar-se podien causar danys degeneratius als propis cultius cel·lulars, afecció que va rebre el nom d'efecte citopàtic (un conjunt de canvis morfològics que responen a la vegada a canvis fisiològics (processos físics i químics que tenen lloc i/o afecten als éssers vius), de biosíntesis (bloqueig de la producció d'àcids nucleics o proteïnes) o genètics (tenint en compte que els microorganismes produeixen mutacions).

Aquests virus purificats generats a partir dels cultius que existien, van servir per a la creació de vacunes, com en el cas de la Salk, utilitzada per a la lluita en contra de la poliomielitis, malaltia infecciosa que afecta sobretot al sistema nerviós i que es va desenvolupar de forma exagerada sobretot durant el segle XX. La obtenció de la vacuna va ser possible gràcies a l'estudi exhaustiu que van dur a terme John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller y Frederick Chapman Robbins, tres científics guardonats en conjunt amb el Premi Nobel de fisiologia i medicina (1954) pels seus treballs i resultats obtinguts en els camps de la virologia i de la bacteriologia.

Curs 2020 - 2021

Altres avenços importants relacionats amb la tècnica de cultiu cel·lular van tenir lloc al 1949, any en el que Alan Parks va fixar les condicions de congelació dels cultius en nitrogen líquid com a mètode per a evitar la pèrdua de viabilitat cel·lular (proporció de cèl·lules vives y funcionals existents en una població cel·lular que serveix com a marcador predictiu per a un bon funcionament dels futurs teixits).

En molt pocs anys van aparèixer un conjunt d'innombrables innovacions que van aportar nous coneixements per a molts àmbits d'investigació diferents. Es va començar a fer us de les tècniques de tripsinització ⁵⁶, processos utilitzats per a separar les cèl·lules adherents del substrat de cultiu utilitzant tripsina, un enzim proteolític que té com a funció degradar les proteïnes que es troben enganxades a cada un dels recipients en el que es troben. La gran revolució en relació a l'avenç en medis de cultiu, que ja havia millorat mitjanament gràcies a Carrel i a Burrows, va arribar amb Eagle (1955) i amb les seves investigacions sobre les necessitats nutricionals presents en diversos cultius, com va ser en el cas de les cèl·lules HeLa (la primera línia cel·lular humana provinent del càncer d'úter desenvolupat per Henrietta Lacks) o en el cas de les cèl·lules L (de ratolí). A través d'aquests requeriments va definir 28 substàncies essencials per al desenvolupament i manteniment "*in vitro*", sent les més importants la glucosa, els aminoàcids, les vitamines, les sals minerals y les solucions corporals complexes (sèrum) en mínimes quantitats (aproximadament l'1%). Aquestes troballes van permetre donar lloc a dos medis àmpliament coneguts i utilitzats:

- a) El medi basal d'Eagle (MBE), un medi semi-sintètic que conté glucosa, 13 aminoàcids precursors de proteïnes, 8 vitamines, 6 tipus de sals minerals, buffers per al manteniment del pH i del balanç elèctric, sèrum fetal boví (BSF) com a principal portador de factors de creixement i fibronectina, essencial per a l'adhesió, divisió i visibilitat de les cèl·lules.

⁵⁶ Procés utilitzat per a separar cèl·lules adherides a la placa de Petri

Curs 2020 - 2021

- b)** El medi Eagle mínim essencial (EMEM), un medi similar a l'anterior però amb una major concentració d'aminoàcids i vitamines. Amb aquest medi s'obté un millor manteniment de les cèl·lules "*in vitro*", sense necessitat de renovacions o canvis cíclics durant un període bastant llarg de temps.

A part d'aquests medis bàsics, se'n van poder desenvolupar de nous al 1965 gràcies a les aportacions de Ham, el responsable d'introduir els medis de cultiu definits lliures de sèrum, els quals com a novetat oferien la capacitat de mantenir cèl·lules "*in vitro*" de mamífer indefinidament. Durant aquella mateixa època, J.H. Hanks i W.R Earle van donar a conèixer les solucions balancejades (SSB), utilitzades com a mètode per a diluir els nutrients del medi de cultiu i com a solució per a assegurar un pH i una pressió osmòtica amb una valors concrets.

L'aparició i evolució dels primers medis de cultiu químicament definits i l'ús d'antibiòtics com a forma rutinària per a prevenir possibles contaminacions va permetre l'aplicabilitat dels cultius de cèl·lules de vertebrats, cosa que va donar lloc com a conseqüència a la possibilitat de començar a cultivar les primeres cèl·lules d'insectes.

Van anar sorgint noves tècniques i millores que permetien aconseguir resultats amb més facilitat i amb una reducció notable que s'observava sobretot en relació a l'esforç i al temps que requerien les pràctiques a fer. Aquesta nova modernitat va donar lloc a l'ús del mètode de fusió cel·lular (procediment que permet que dues cèl·lules s'uneixin entre si mitjançant el contacte que es pot produir entre les membranes externes citoplasmàtiques), recurs que va establir les bases de la genètica de cèl·lules somàtiques per a l'estudi d'espècies animals (incloent a l'home).

Les aplicacions dels cultius cel·lulars van anar en augment a partir del segle XXI i van permetre poder investigar molts aspectes diferents de la cèl·lula i del seu funcionament. Amb el pas dels anys s'ha pogut anar descobrint informació sobre l'activitat intracel·lular, la interacció ambiental (toxicitat, nutrició...) i entre cèl·lules

Curs 2020 - 2021

(com a conseqüència augmenten els estudis relacionats amb el càncer), la genètica i la toxicologia entre d'altres. Els avenços tecnològics van ser els col·laboradors de tals innovacions i es van convertir en l'eina diària més còmoda per a portar a terme les experimentacions necessàries amb el màxim de control i exactitud possible que puguin oferir la ciència i el valor humà en conjunt.

Tipus de cultius cel·lulars

Quan ens referim a un cultiu cel·lular estem utilitzant un vocabulari molt ampli que no acaba de donar prou informació com per saber d'on s'ha extret o quines característiques el defineixen. Sabem que tractem amb cèl·lules aïllades mantingudes en condicions controlades per a la correcta conservació de les seves propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques, però no sabem si provenen de cultius primaris, de subcultius o de línies cel·lulars establertes.

Cultius primaris: són aquells que per definició provenen directament d'un teixit o òrgan. Les cèl·lules que els formen conserven la morfologia que les caracteritzava quan formaven part de l'hoste del que s'extreuen, tenen cromosomes en nombre diploide ($2n$) i un creixement "*in vitro*" limitat. Aquests tipus de cultius estan formats per cèl·lules properes a les originals, aspecte que permet certes millores relacionades amb l'activitat i la funcionalitat del conjunt d'unitats estructurals. Hi ha d'altra banda certs inconvenients a tenir en compte, com la possible inhibició per contacte (algunes de les cèl·lules deixen de proliferar quan es relacionen entre elles amb freqüència) o la necessitat de desenvolupar la tecnologia adient per al control de qualitat.

Subcultius: els subcultius provenen de cultius primaris, és a dir, esdevenen ressemblats de cèl·lules obtinguts mitjançant la transferència d'algunes o de totes les unitats del cultiu anterior a un nou recipient i per conseqüència a un medi de creixement fresc i renovat. Serveixen sobretot per a expandir el nombre de cèl·lules existents del tipus de cultiu utilitzat en el cas en que sigui necessari per a algun

Curs 2020 - 2021

tipus d'estudi o investigació. La obtenció del subcultiu es tradueix en diferents processos que segueixen un ordre regulat:

- 1) Eliminació del medi de cultiu existent i rentat de les cèl·lules a partir de solucions salines.
- 2) Ús d'un enzim proteolític (normalment la tripsina) com a mètode per a trencar les proteïnes d'unió que mantenen a les cèl·lules superposades en monocapa, és a dir, adherides a un suport sòlid (plàstic o vidre).
- 3) Col·locació del nou medi, el qual conté també sèrum (format per inhibidors de proteases que aturen l'acció dels enzims) i tots els nutrients que necessiten les cèl·lules per a proliferar correctament.
- 4) Dilució i augment exponencial del nombre cel·lular.

Línies cel·lulars: els cultius successius formats a partir de la obtenció inicial de cèl·lules s'anomenen línies cel·lulars. La formació d'aquestes, que és possible gràcies a l'existència d'un cultiu primari anterior, implica o dóna lloc a certes característiques:

- 1) Augment del nombre de cèl·lules obtingudes
- 2) Abundància d'un o dos tipus cel·lulars que depenen sobretot de la taxa de creixement
- 3) Existència d'una població cel·lular cada vegada més uniforme i homogènia
- 4) Conservació de les propietats bàsiques durant diverses generacions

Aquestes línies cel·lulars sovint tenen una vida finita, que es tendeix a perllongar entre vint i cent generacions (segons el tipus de cèl·lula). La superació d'aquest límit comporta l'inici d'una nova etapa que rep el nom de senescència i que provoca la pèrdua de la pròpia capacitat de proliferació cel·lular (que es creu que és deguda a l'escurçament dels telòmers cromosòmics). Aquesta falta de proliferació acaba resultant en la mort de la majoria de cèl·lules existents.

Tot i així, aquesta no és una particularitat en essència. Existeixen certes cèl·lules (com les dels rosegadors o les tumorals) que aconsegueixen evitar la senescència a

Curs 2020 - 2021

partir de processos espontanis (exposicions a radiacions ionitzants o a carcinògens químics) o induccions (infeccions víriques o transfeccions) i que acaben esdevenint el resultat d'un canvi genotípic denominat transformació. És en aquest moment en el que parlem de línies contínues, o immortals, tal i com s'anomenen vulgarment.

Les noves cèl·lules transformades actuaran d'una altra forma i es caracteritzaran per nous trets que les diferenciarien de les seves progenitores.

- 1) Com ja hem dit, esdevindran immortals i es trobaran sotmeses a un creixement molt ràpid i indefinit.
- 2) Perdran qualsevol aspecte o inconvenient que redueixi la velocitat de proliferació (no hi haurà inhibició per contacte ni limitació de densitat...)
- 3) Es convertiran en invasores de teixits i podran donar lloc a l'aparició de tumors
- 4) Seran genèticament inestables i presentaran amb regularitat aberracions cromosòmiques

Avantatges i inconvenients de l'ús de cultius cel·lulars en processos d'investigació

Igual que amb qualsevol procediment científic, és important tenir en compte quins són els avantatges i els inconvenients d'utilitzar cultius cel·lulars com a material d'investigació.

Avantatges:

a) Control

Cal remarcar com ja hem dit anteriorment, que la principal font d'ajuda que proporciona aquest utilitatge de recerca és la possibilitat de controlar les condicions fisiològiques de les cèl·lules i el medi fisicoquímic en el que es troben. Els medis definits (aquells que tenen components coneguts i concentracions exactes) i tots els que estan formats per dissolucions complexes formades alhora per factors hormonals i nutrients indispensables, permeten regular amb més facilitat el

Curs 2020 - 2021

contingut cel·lular i obtenir com a resultat un desenvolupament molt més acurat i un tipus de cultiu més específic.

b) Caracterització i homogeneïtat

Aconseguir mostres homogènies també és una forma d'inspecció que facilita en especial el tractament estadístic dels resultats finals. Una mostra de teixit acabada d'extreure és heterogènia. Ara bé, els subcultius que deriven d'aquesta, amb el temps, passen a ser més homogenis, és a dir, a tenir una morfologia i composició uniformes.

La pressió selectiva de les condicions de cultiu dóna lloc a la situació anterior i a la possible obtenció de rèpliques idèntiques amb característiques que es conservaran durant diverses generacions o de forma indefinida en el cas de les línies cel·lulars.

c) Economia

Amb els cultius s'utilitzen dissolucions de concentracions menors a les que es fan servir en els casos d'animals experimentals, aspecte que conjuntament amb el contacte directe que es pot produir entre la substància (que no pateix cap modificació metabòlica ni dilució) i les cèl·lules permet una disminució considerable del cost dels assaigs clínics i per conseqüència facilita la possibilitat de noves proves o de repeticions sempre i quan els resultats obtinguts no siguin prou útils.

La reducció del volum cel·lular requereix menys quantitat de reactiu, cosa que comporta un estalvi molt alt de part del contingut necessitat per als procediments "*in vivo*".

d) Qüestions ètiques

Els àmbits de la ciència i de la investigació han estat utilitzant durant segles els sacrificis animals com a mètodes d'anàlisi. Tot i que no sempre és possible reemplaçar l'assaig "*in vivo*" (sobretot perquè depèn en major mesura de les característiques de l'estudi), existeix l'alternativa de comptar amb els cultius cel·lulars. Aquests permeten observar i quantificar un elevat nombre de condicions

Curs 2020 - 2021

experimentals, situació que es tradueix en un control molt més precís, en un temps de resposta diferent i en la possibilitat d'adquirir nous recursos que no impliquin l'ús d'altres éssers vius. Tot i que per a obtenir un cultiu primari es necessita amb freqüència l'ús d'un animal com a donador inicial de cèl·lules, és possible evitar-ne la mort de molts altres mitjançant la utilització de cultius secundaris, de línies cel·lulars i d'opcions d'assaigs que ens presenten aquests mètodes.

Inconvenients:

a) Sensibilitat de la tècnica

L'ús dels cultius cel·lulars implica també la necessitat de mantenir estrictes condicions d'asèpsia relacionades amb la rapidesa amb la que molts dels contaminants bacterians podrien perjudicar a la mostra, tenint en compte que el creixement cel·lular és molt més lent que el de diversos fongs, micoplasmes, llevats...

A més, la importància de mantenir a les cèl·lules nodrides a través de les complexes barreges que contenen els medis en els que viuen, fan precis un tipus d'instrumental complet i car que pugui ser utilitzat a la vegada per professionals amb els coneixements adequats.

b) Inestabilitat

Moltes de les línies cel·lulars contínues són inestables, com a conseqüència de la dotació cromosòmica aneuploidia (indica l'existència d'un cromosoma extra o la falta d'alguna d'aquestes estructures). La composició de la població cel·lular pot variar si alguna de les subpoblacions cel·lulars és capaç de créixer de forma lleugerament superior, és a dir, podem trobar diferències significatives en la línia cel·lular d'una generació a la següent.

c) Validesa del model "in vitro"

La certesa dels resultats obtinguts mitjançant l'experimentació amb models "in vitro" és dubtosa, sobretot pel canvi de condicions al que es troben sotmesos.

Curs 2020 - 2021

D'aquesta forma és més difícil extreure conclusions de diversos estudis que possiblement no ens aportaran la mateixa informació que ens donarien els teixits originals dels animals utilitzats per als assaigs científics.

Aplicacions conegudes dels cultius cel·lulars

Els cultius cel·lulars s'utilitzen en una innumerable quantitat de processos científics que abasten molts temes tant de la investigació bàsica (aquella que busca recopilar el màxim d'informació) com de l'aplicada (que té com a objectiu resoldre un problema o plantejament específic).

Els procediments més coneguts que requereixen cultius i que formen part de la investigació bàsica es mouen entre paràmetres bastant diferents que normalment requereixen una alta utilització de cèl·lules. S'acostumen a estudiar fenòmens complexes com l'activitat intracel·lular (transcripció de DNA, síntesis de proteïnes, metabolisme, cicle cel·lular, diferenciació, apoptosi...), el flux intracel·lular de biomolècules (processament d'RNA, moviment d'RNA des del nucli fins al citoplasma, moviment de les proteïnes en direcció a diversos orgànuls...), la genòmica i proteòmica (anàlisi genètic, senescència, expressió gènica...) i l'ecologia cel·lular (estudi del manteniment de la funcionalitat cel·lular i de les necessitats nutricionals, cinètica de la població cel·lular...).

La investigació aplicada d'altra banda es basa en processos experimentals molt més concrets que poden referir-se a àrees com la virologia, la biotecnologia (producció industrial d'hormones, generació d'insulina...), la immunologia, la farmacologia, l'enginyeria de teixits (usos diversos per al tractament de cremades, empelts cartilaginosos...) i la toxicologia (mutacions de fragments d'informació, factors productors del càncer...).

Protocols de les pràctiques

Passatge de cultius:

Passaging Adherent Cells

1. When the cells are 80-90% confluent, remove all medium from the flask/plate.
2. Wash cells once with 10 ml PBS to remove excess medium and serum. Be careful so the cells do not detach while you wash. Serum contains inhibitors of trypsin.
3. Add 1-2 ml of trypsin/versene EDTA to the monolayer and incubate 1 to 5 minutes at room temperature until the cells detach. Check the cells under a microscope and confirm that most of the cells have detached. If cells are still attached, incubate a little longer until most of the cells have detached. The cells will die if they are left too long with trypsin (> 10 min)
4. Add 9 ml of complete medium to stop trypsinization.
5. Briefly pipet the solution up and down to break up clumps of cells.
6. 6. Transfer 1 ml of the 10 ml cell suspension to a new flask/plate with 9 ml fresh complete medium. If you need more concentrated cells, add more of the cell suspension and less of new medium.
7. Incubate flasks/plates in a humidified, 37°C, 5% CO₂ incubator.
8. Repeat step 1-7 as necessary to maintain or expand cells.

Curs 2020 - 2021

Transfecció:

Before you begin

Additional required reagents and supplies

Sterile, serum-free culture medium without additives or supplements
(optional: add 12.5 mM HEPES buffer to serum-free medium)

Plasmid DNA solution (between 0.02 µg/µl and 2.0 µg/µl) in sterile TE (Tris/EDTA) buffer or sterile water.

To prevent spillage, use a 24-well plate as a test tube rack for the FuGENE® 6 Transfection Reagent.

Preparation of cells for transfection

Adherent cells

One day before the transfection experiment, trypsinize, adjust the cell concentration, and plate the cells in the chosen cell-culture vessel. For most cell types, plating 1–3 x 10⁶ cells in a 35-mm culture dish in 2 ml of medium (or a six-well plate) overnight will achieve the desired density of 50–80% confluency. If using culture plates of a different size, adjust the starting volume of FuGENE® 6 Reagent and the starting mass of DNA in proportion to the relative surface area (Table 1).

Suspension cells

Use freshly passaged cells at a concentration of 5 x 10⁴/ml to 1 x 10⁶/ml (2 ml in a 35-mm culture dish or six-well plate). Determine the cell number based on your needs and the cell type to be transfected.

Preparation of FuGENE® 6 Reagent:DNA complex and transfection of cells

Adherent and suspension cells in a 35-mm culture dish

For initial optimization, use FuGENE® 6 Reagent:DNA ratios of 3:1, 3:2, and 6:1 (µl, for FuGENE® 6 Reagent, and µg for DNA, respectively). The preparation of the complex for a single well of a six-well plate, or a 35-mm culture dish, is described below. These ratios will function very well for commonly used adherent cells and suspension cells.

⚠ The FuGENE® 6 Reagent:DNA complex must be prepared in medium that does not contain serum, even if the cells are transfected in the presence of serum.

🔗 For additional optimization tips, go to ***www.roche-applied-science.com/fugene/instructions***

Curs 2020 - 2021

Transferència:

Once the proteins are separated by SDS-PAGE, proteins are transferred from the gel to the membrane by electroblotting utilizing MiniTrasn-blot system (Bio-Rad).

You need **two pieces of 2MM Watman paper** cut in the same size as the gel, **two sponges, one Immobilon-FL PVDF membrane*** cut also in the same size.

- 1- Take the gel out of the glasses and carefully place the gel in a container with the Transfer buffer (100 ml approximately).
- 2- Place also the two watman paper and the membrane in the container.
- 3- Place the plastic holder white and black (with wholes) on the table, open.
- 4- Start the sandwich by placing one sponge. With the help of a pipette placed horizontally, take out the excess of liquid and bubbles.
- 5- Place one piece of 3MM paper on the top of the sponge, and pass the pipette (15 ml or 25 ml) taking out bubbles and liquid.
- 6- Carefully place the gel and again take out bubbles.
- 7- Place the membrane on the top.
- 8- Follow with a piece of 3MM paper and then the sponge. Each time take bubbles out.
- 9- Close the sandwich.
- 10- Place it inside the red-black casting. Be carefully with the orientation. The membrane should be on the side of the positive charge (red side).
- 11- Place everything inside the container with the transfer buffer covering everything.
- 12- Place the cooling chamber inside.
- 13- Run the gel at a constant voltage 75-110V for 90 min.

10xTransfer buffer (1 l) (kept refrigerated)

| | |
|---------------------|--------|
| 25 mM Tris Base | 30.3 g |
| 192 med mer Glycine | 144g |

1xTransfer Buffer (1 l)

100 ml 10x Transfer buffer
 100 ml Methanol*
 7.4 ml 10% SDS**
 H2O to 1L

*Transfer of proteins with the Odyssey system needs the **Immobilon-FL PVDF membrane** and only 10% of methanol in the transfer buffer.
 For chemiluminescence the transfer buffer has 20% of Methanol.

**SDS is optional. Proteins can be transfer with out SDS but SDS helps the transfer of high molecular weight proteins.

The electricity going through the equipment makes the buffer to heat. For that it is necessary or either to run it with the cooling chamber or run it in the cold room.

Curs 2020 - 2021

No s'especifiquen els protocols de la immunofluorescència i de la coimmunoprecipitació perquè es troben detallats a l'apartat de procediment corresponent.

Western Blot:

TBS 10x: 87,66g NaCl; 12.11g Tris; 4ml HCl (pH=8.0)

TBST: TBS 1x + Tween20 0.1% (v:v) (5ml Tween a 5L TBS1x)

Secondary antibodies from Tebu Bio.

1. Once the Western blot has finished, remove the filter and place it in TBS-T.
2. Block the filter with a solution of 1% BSA in TBS-T.
3. Add 5 ml of a solution containing the primary antibody. The dilution will vary with different antibodies but in general is from 1:200 to 1:1000. Incubate the filter with the antibody for at least two hours at room temperature in a rocking platform. It can also be incubated at 4 degrees overnight in a rocking platform, which decrease unspecific binding of the antibody to the filter.
The antibody solution can be kept and re-used for some times. Keep it at 4 degrees for short-term storage or at -20 degrees for long term.
4. Wash the filter with 5 ml of TBS-T 5-10 min in a rocking platform.
5. Repeat the washing step three more times.
6. Add 5 ml of secondary antibody from Odyssey at a dilution of 1:20000 in TBS-T. Be careful use anti-rabbit or anti-mouse depending if the primary antibody is rabbit (polyclonal) or mouse (monoclonal). You can use the Odyssey antibodies red (700) or green (800). Green is always better than red. You can combine two antibodies with the two colors if the are from different spicy.
7. Wash with TBS-T twice 5 min and three times with TBS without Tween (IMPORTANT).
8. You can proceed to the Odyssey scanner.