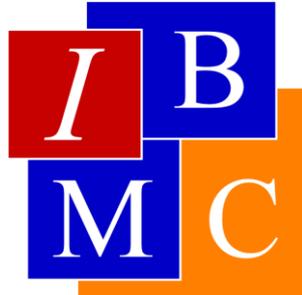


Universidad Miguel Hernández de Elche
Instituto de Biología Molecular y Celular



TRABAJO DE
FIN DE GRADO

ASOCIACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA
RESISTENCIA A RADIOTERAPIA Y GENES IMPLICADOS EN
LA DIVISIÓN ASIMÉTRICA DE CÉLULAS MADRE
TUMORALES

TUTORES:

Miguel Saceda Sánchez

María del Pilar García Morales

Esther Vílchez Gálvez

Grado en Biotecnología, 2011 – 2016

Facultad de Ciencias Experimentales



ÍNDICE

1. Abreviaturas y acrónimos	3
2. Resumen	4
3. Introducción	5
3.1.Cáncer	6
3.2.Glioblastoma	6
3.3.Células madre, división asimétrica y cáncer	7
3.4.SOCS y resistencia a radioterapia	8
4. Antecedentes y objetivos	9
5. Materiales y métodos	12
5.1.Cultivos primarios	13
5.2.Citometría de flujo	13
5.3.Uso de anillos de clonaje	15
5.4.Transfección de siRNA	16
5.5.Irradiación celular	17
5.6.Aislamiento de RNA	17
5.7.Retrotranscripción	18
5.8.PCR cuantitativa a tiempo real	19
5.9.Análisis estadístico	21
6. Resultados	21
7. Discusión	31
8. Conclusiones	34
9. Proyecciones futuras	35
10. Bibliografía	36

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico complementario)

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

mRNA: Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)

siRNA: Interfering ribonucleic acid (ácido ribonucleico interferente)

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

TRIM2: Tripartite motif containing 2

PCR: Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

RAP2A: Member of RAS oncogene family

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

MLLT4: Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4

SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1

SOCS3: Supresor of cytokine signaling 3

HGUE: Hospital General Universitario de Elche

GB: Glioblastoma

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

C_i: Concentración inicial

wt: wild type

Gy: Gray

NTC: Non template control

PBS: tampón fosfato salino

Dr.: Doctor

Dra.: Doctora

CSIC: Consejo superior de investigaciones científicas

2. RESUMEN

En el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio de algunos genes homólogos en humanos relacionados con el proceso de división celular asimétrica de células madre neurales en *Drosophila melanogaster* y su posible papel en glioblastoma multiforme. En concreto hemos establecido una conexión entre los niveles de expresión de estos genes y la adquisición de resistencia a la radioterapia.

Los genes que se han estudiado han sido MLLT4, TRIM2 y RAP2A. Los resultados obtenidos revelan que TRIM2 y RAP2A aumentan su expresión en respuesta a la irradiación en cultivos primarios de glioblastoma obtenidos a partir de los aspirados quirúrgicos de los pacientes operados en el Hospital General Universitario de Elche. Interesantemente también se observa que al obtener poblaciones clonales radorresistentes mediante irradiación secuencial del cultivo primario HGUE-GB-39, dichas poblaciones muestran un incremento significativo en la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4.

Experimentos realizados en paralelo para obtener un segundo modelo de resistencia, mediante la utilización de siRNAs contra SOCS1 y SOCS3 (genes relacionados con la radorresistencia en trabajos previos), mostraron que la inhibición de la expresión de estos genes en el cultivo HGUE-GB-39 correlacionaba con la adquisición de radorresistencia y con un aumento en la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4.

Los resultados obtenidos sugieren que RAP2A, TRIM2 y MLLT4 pueden jugar algún papel en la adquisición de radorresistencia en glioblastoma.

Palabras clave: glioblastoma, células madre, células madre tumorales, división asimétrica, radorresistencia

ABSTRACT

In this work we have studied several homologous human genes related to genes involved in neural asymmetric cell division in *Drosophila melanogaster* and their putative role in multiform glioblastoma. In particular we have established a relationship between the expression levels of those genes and radiotherapy resistance acquisition.

The studied genes are MLLT4, TRIM2 and RAP2A. Our results indicate that expression of TRIM2 and RAP2A increase after irradiation of glioblastoma primary cultures obtained from surgical washes of glioblastoma patients at the Hospital General Universitario de Elche. Interestingly, we have also observed that isolated clonal populations resistant to radiotherapy obtained through sequential radiation of the primary culture HGUE-GB-39, show a significant increase in RAP2A, TRIM2 and MLLT4 expression.

Experiments performed in parallel in order to obtain a different resistance model, through transient transfection with specific siRNAs for SOCS1 and SOCS3 (genes previously reported to be related to radorresistance), indicate that inhibition of SOCS1 and SOCS3 expression in HGUE-GB-39, correlates with radorresistance acquisition as well as with an increase in RAP2, TRIM2 and MLLT4 expression.

Our results suggest that RAP2A, TRIM2 and MLLT4 may play some role in radorresistance acquisition in glioblastoma.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cáncer

El **cáncer** se puede considerar un conjunto de enfermedades en las que se produce una proliferación celular descontrolada en un órgano determinado.

Las células tumorales han sufrido alteraciones genéticas y epigenéticas que les confieren propiedades que las diferencian de las células normales. Entre estas propiedades características encontramos que las células tumorales poseen la capacidad de:

- Dividirse sin control, originando estructuras celulares desorganizadas.
- Ser capaces de evadir el proceso de apoptosis.
- No responder a señales de inhibición de crecimiento.
- Invadir otros tejidos provocando metástasis.

Estas características las adquieren como consecuencia de alteraciones en diferentes tipos de genes que controlan determinados procesos celulares, tales como proliferación, diferenciación o reparación de DNA, además de a factores ambientales y epigenéticos [1].

Dentro del proceso general conocido como cáncer, encontramos diferentes tipos según el tejido que se vea afectado. En este caso, nuestro interés se centra en el **glioblastoma multiforme**.

3.2. Glioblastoma multiforme

El glioblastoma multiforme es el tipo de **tumor cerebral** más común, y el que cursa con una mayor agresividad y un índice más alto de mortalidad. El tratamiento actual de este tipo de neoplasia se basa en la extracción quirúrgica del mismo y en el posterior tratamiento con radioterapia y quimioterapia aunque, a pesar de estos tratamientos, los pacientes con esta patología no tienen un buen pronóstico. Para minimizar este mal pronóstico, la extracción del tumor debe de ser lo más radical posible con el fin de eliminar la mayor parte de éste ya que suele presentar ramificaciones o localizarse en sitios de difícil acceso haciendo imposible su completa extracción. Es también muy importante evitar los daños neurológicos permanentes que puedan afectar a la calidad de vida del paciente. El tratamiento con radioterapia fraccionada (60Gy en 6 semanas) y quimioterapia (uso del agente citostático temozolamida), posterior a la escisión quirúrgica, aún no ha podido ser sustituido por otro más eficaz y específico, aunque en los últimos años la investigación en

terapias alternativas en glioblastoma está avanzando considerablemente, focalizando los estudios en el hallazgo de marcadores moleculares que permitan, en un futuro, una terapia dirigida [2,14]. Además, es importante para este trabajo de fin de grado que diversos estudios apoyen que este tipo de tumor puede tener su origen en células madre tumorales [20-22].

3.3. Células madre, división asimétrica y cáncer.

En los últimos años se ha realizado un gran avance en el estudio de las células madre que se caracterizan por tener la capacidad de “auto-regenerarse” perpetuando así su existencia y, al mismo tiempo, producir células diferenciadas. Esta capacidad de las células madre se da gracias a la **división asimétrica** que les permite generar simultáneamente una célula madre y una célula primordial que dará lugar por diferenciación a los diferentes tipos celulares derivados de ese tipo de célula madre específico del tejido correspondiente del organismo (Figura 01) [3].

El estudio de la desregulación de la división asimétrica por mutaciones de determinados genes regulatorios, llevó a la proposición de la **hipótesis de las células madre tumorales** mediante su estudio en diferentes modelos animales de experimentación, generando así una conexión entre la división asimétrica de células madre y la tumorigénesis. La hipótesis de las células madre sostiene que las células madre normales pueden desembocar en células madre cancerosas responsables de la generación de tumores en humanos. De forma alternativa, también se propone que una pequeña población de células tumorales normales, adquieren las características de células madre produciendo así la formación del tumor (Figura 01) [3,4,20]. Es importante mencionar que según esta teoría, las denominadas células madre tumorales serían las responsables de la adquisición de resistencia a los tratamientos y la adquisición de las capacidades invasivas de los tumores [3,4].

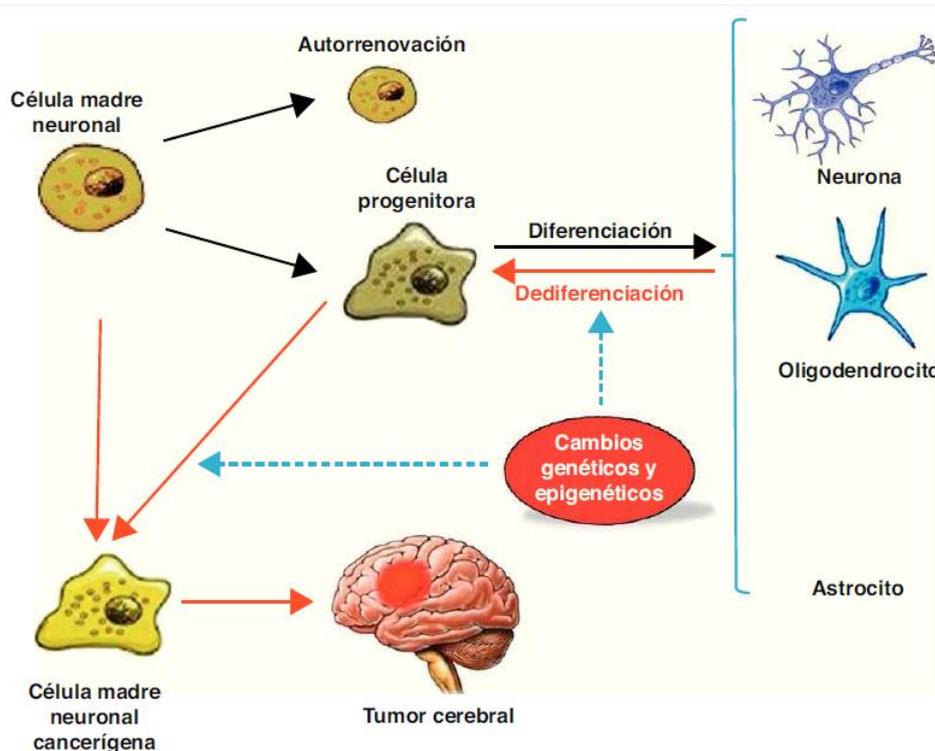


Figura 01: Representación esquemática de la división asimétrica llevada a cabo por células madre normales y el proceso mediante el cual se pueden generar las células madre tumorales [20]

En *Drosophila melanogaster* y *Caneorhabditis elegans*, se han realizado numerosos estudios sobre la división asimétrica de estas células madre y se ha podido comprobar que la desregulación producida en estas células puede generar la formación de tumores. Es importante mencionar que los genes cuya desregulación en estos animales producía la generación de tumores, poseen homólogos en vertebrados [3] y aunque la función de dichos genes en vertebrados no está del todo clara, sí que se ha demostrado la importancia de algunos de ellos en la carcinogénesis en humanos [4,8-11].

El grupo de investigación en el que he desarrollado este trabajo fin de grado, mantiene una colaboración con el grupo de la Dra. Ana Carmena del CSIC centrada en determinar si los homólogos en humanos de genes identificados como importantes en la división asimétrica de las células madre neurales en *Drosophila melanogaster* tienen alguna relevancia en diferentes modelos celulares de cáncer en humanos. En concreto en este trabajo de fin de grado, he estudiado si varios genes identificados por su capacidad de interacción con la proteína "Canoe" (cuyo homólogo en humanos es MLLT4) en células madre neurales de *Drosophila melanogaster*, pudieran tener algún papel en la adquisición de resistencia a la radioterapia en glioblastomas humanos (Figura 02).

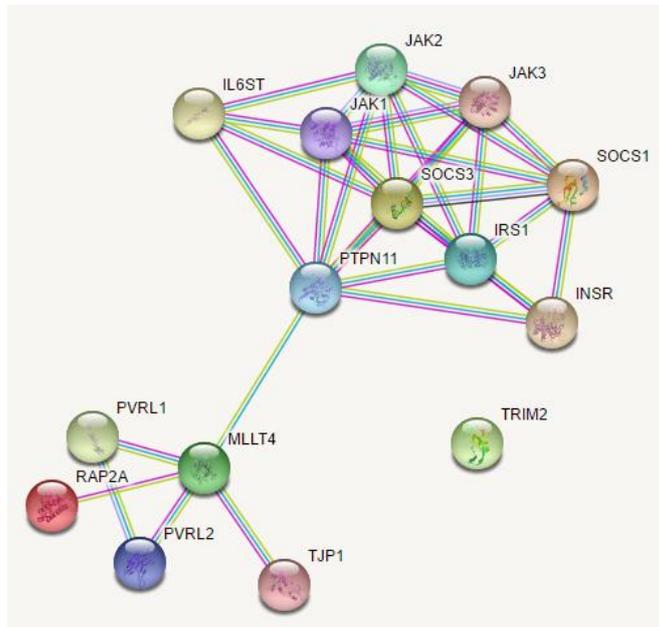


Figura 02: interacción entre proteínas identificadas en procesos de división asimétrica (MLLT4) de células madre y proteínas identificadas en resistencia a radioterapia (SOCS1 y SOCS3) realizada mediante la utilización de la base de datos “string-db.org”

3.4. SOCS y resistencia a radioterapia.

La familia de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas SOCS, se expresan en células del sistema inmune y en células del sistema nervioso central [15]. Se ha visto que desempeñan un papel importante en la resistencia a radioterapia, concretamente nos vamos a centrar en SOCS1 y SOCS3. Si estos genes se ven alterados, las vías de transducción de señales no se ejecutan correctamente lo cual puede desembocar en el desarrollo de glioblastoma multiforme [6]. Estudiando el patrón de metilación de estos genes se observó que la metilación de sus promotores producía una bajada de expresión de SOCS1 y SOCS3 en comparación con las muestras de glioblastoma no metiladas. Estos estudios mostraron por una parte la regulación epigenética de estos genes por metilación del promotor y por otra parte mostraron que existía una relación entre los niveles de expresión de estos genes y la adquisición de radioresistencia en glioblastoma [5,6].

Dado que teóricamente la adquisición de radioresistencia debe implicar a las células madre tumorales y que SOCS1 y SOCS3 parecen tener algún papel en la adquisición de esta resistencia, nos preguntamos si existiría relación entre SOCS1 y SOCS3 y los genes identificados por la Dra. Carmena en el interactoma de Canoe y si esta relación jugaba un papel en la adquisición de la resistencia a la radioterapia en los pacientes con glioblastoma.

4. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El equipo de investigación de la Dra. Ana Carmena del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, identificó mediante un interactoma con el gen “Canoe” de *Drosophila melanogaster* varios genes implicados en la división celular asimétrica.

Muchos de los genes que identificó presentan homólogos en humanos y concretamente para el gen Canoe, su homólogo en humanos es Afadin (AF-6) el cual se nombra posteriormente como MLLT4 [7]. Afadin está implicado en diversas funciones de regulación de procesos celulares además de desempeñar un papel importante en diferentes tipos de tumores como por ejemplo el cáncer de mama o de colon [7,8,9,10]. El gen Canoe desempeña diversas funciones en la división celular asimétrica de neuroblastos en *Drosophila melanogaster* y además tiene capacidad supresora de tumores en este modelo animal [7,12,13].

Por esta razón y en colaboración con la Dra. Carmena se inició en nuestro laboratorio el estudio de la expresión de dichos genes en modelos celulares de diferentes tipos de tumores. Estos estudios contribuyeron a un trabajo de fin de grado anterior centrado en identificar modelos celulares de cáncer en los que la expresión de estos genes siguiera patrones que sugirieran su posible papel como genes supresores y/u oncogenes.

Dentro del TFG mencionado, algunos de los genes homólogos en humanos de los genes identificados por la Dra. Carmena, fueron analizados en colaboración con el Dr. Víctor Barberá del Hospital General Universitario de Elche mediante un array en el que comparaba la expresión de éstos en siete pacientes de glioblastoma, comparando su expresión con la observada en cerebro normal. Los resultados de este array se muestran a continuación (Figura 03).

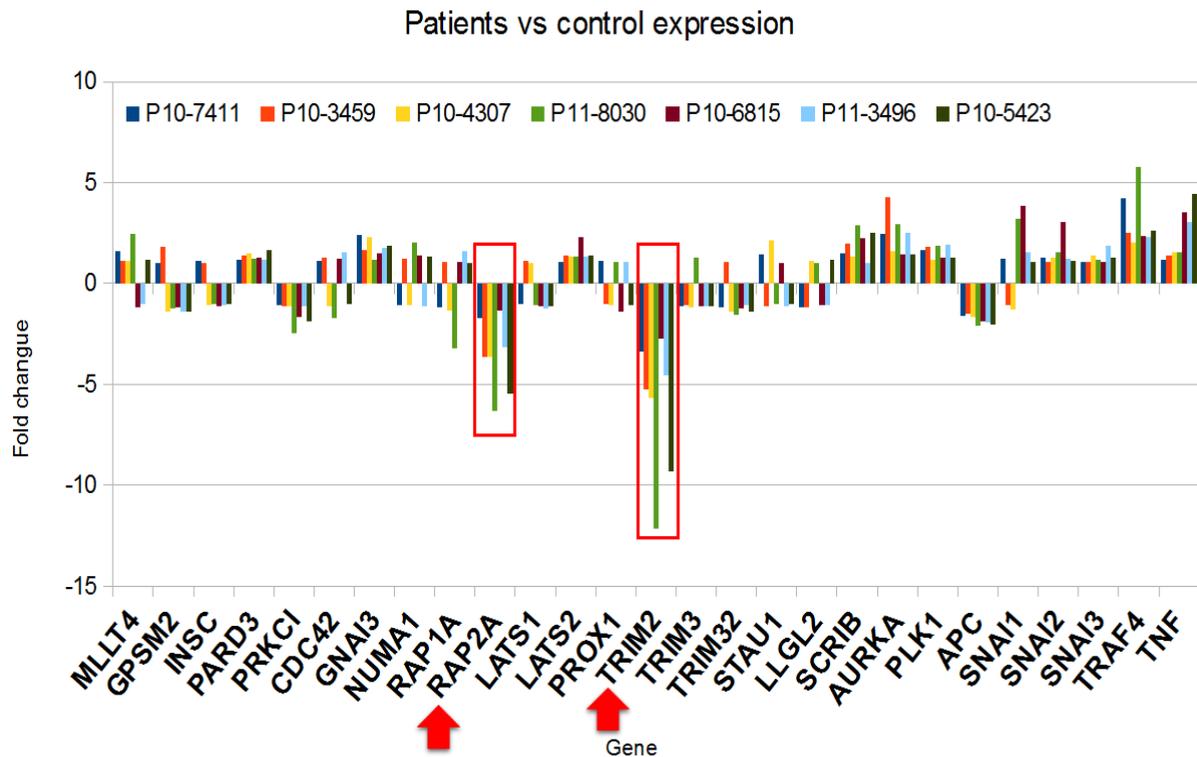


Figura 03: Expresión de varios genes en 7 pacientes con glioblastoma multiforme. Dichos genes presentan homología con genes que intervienen en la división celular asimétrica de *Drosophila melanogaster*. Los resultados han sido proporcionados por el Dr. Barberá. Los patrones de expresión se representan comparándolos con los obtenidos en muestras de cerebro no tumoral.

Llama la atención que la expresión de RAP2A y TRIM2 en los siete pacientes analizados, se encuentra muy por debajo del valor de expresión en cerebro normal, lo cual sugiere que éstos puedan jugar un papel importante en glioblastoma ya que presentan un patrón de expresión similar al que cabría esperar en un gen supresor de tumores.

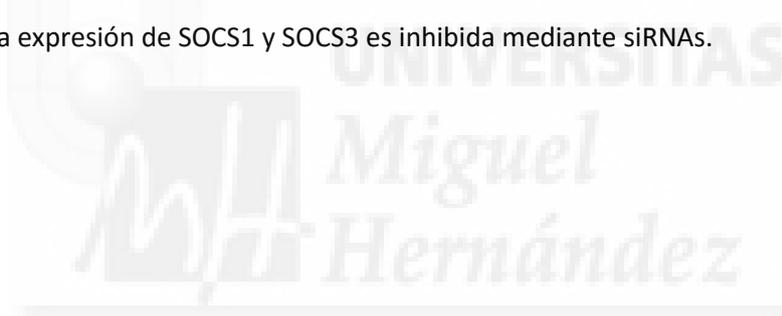
En base a estos resultados, y en colaboración con los equipos de investigación ya mencionados, procedimos en el presente trabajo, al análisis de RAP2A y TRIM2 (junto con MLLT4 que es a partir del cual se forma el interactoma por el equipo de la Dra. Carmena).

Además, resulta interesante la opción de poder relacionar la división asimétrica de células madre con la posible resistencia a radioterapia que se ha observado en algunos genes como son SOC1 y SOCS3. Esta hipótesis surgió gracias a la investigación doctoral que está llevando a cabo uno de los miembros de este equipo de investigación, M^a Paz Ventero donde se está llevando a cabo el estudio de SOCS1 y SOCS3 como genes implicados en la resistencia a radioterapia [5,6].

Conforme a los antecedentes nombrados y los estudios existentes, se ha planteado la **hipótesis** de que genes homólogos en humanos de genes que intervienen en la división asimétrica de células madre en *Drosophila melanogaster*, pueden desempeñar, junto con genes implicados en la adquisición de radioresistencia, un papel importante en glioblastoma pudiendo establecer una relación entre ambos.

Los **objetivos** que se plantean en este trabajo son los siguientes:

1. Caracterizar la expresión génica de los genes MLLT4, TRIM2 y RAP2A en cultivos primarios de glioblastoma mediante estudios de PCR cuantitativa a tiempo real.
2. Estudiar el efecto de la radioterapia sobre la expresión génica de los genes MLLT4, TRIM2 y RAP2A mediante la irradiación celular de cultivos primarios de glioblastoma y los posteriores estudios de PCR cuantitativa a tiempo real.
3. Comprobar que SOCS1 y SOCS3 están implicados en la resistencia a radioterapia mediante ensayos de generación de resistencia y citometría de flujo.
4. Determinar la expresión génica de MLLT4, TRIM2 y RAP2A por PCR cuantitativa a tiempo real, cuando la expresión de SOCS1 y SOCS3 es inhibida mediante siRNAs.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivos primarios

El trabajo que se detalla en el presente documento se ha realizado sobre los cultivos primarios de glioblastoma HGUE-GB-16, HGUE-GB-17, HGUE-GB-18, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-41 obtenidos en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE) a partir de las células tumorales aisladas de los lavados quirúrgicos durante la rescisión del tumor.

Dichos cultivos primarios son mantenidos en cultivo celular a 37°C con un 5% de CO₂ en medio DMEM/F-12 (1:1) (1x) + glutaMAX (Gibco) suplementado con FBS (Fetal Bovine Serum) al 10% y 1% de antibiótico (penicilina (50U/ml) y estreptomina (50µg/ml)). Células de estos cultivos en diferentes pases desde el establecimiento del cultivo son criopreservadas en condiciones vitales. Esta criopreservación se realiza para poder diferenciar entre características de las células en cultivo presentes en el paciente en el momento de la intervención quirúrgica y características celulares adquiridas durante su adaptación a los cultivos celulares.

5.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite diferenciar poblaciones celulares presentes en una muestra en función de su capacidad de incorporar un marcador fluorescente. En este trabajo la utilizamos para determinar el grado de resistencia a la radioterapia de los diferentes cultivos primarios celulares y de clones celulares obtenidos a partir de ellos. El proceso que se sigue para realizar un ensayo de citometría de flujo es el siguiente:

En primer lugar se realiza una siembra de aproximadamente 250.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos y se incuban dichas placas durante 24 horas a 37°C con un 5% de CO₂ para permitir que las células se adhieran a la superficie de la placa y comiencen a dividirse.

Transcurrido este periodo de tiempo, se retira el medio de los pocillos en los que se encuentran las células y se añade un volumen aproximado de 13ml de PBS 1x ya que debe estar completamente lleno para que la irradiación sea efectiva y uniforme por todo el pocillo. Se irradian con el equipo "electron linear accelerator VARIANT 2100C (CLINAC 2100C) y dicho proceso se realiza en el Servicio de Oncología Radioterápica del HGUE.

Tras irradiar, se retira el PBS y se añade medio fresco, se incuban (en las condiciones de medio, temperatura y CO₂ antes mencionadas) durante el tiempo estimado (en este caso durante 24 horas) tras ser irradiadas. A continuación se retira y reserva el medio de los pocillos (ya que en éste se encuentran las células que han perdido la capacidad de adherirse a la superficie plástica y que se presupone que no han resistido la radiación).

Una vez retirado y reservado el medio en el que se encontraban las células, se añade a cada pocillo 500 µl de tripsina (0.05% tripsin-EDTA (1X) (Gibco) para que las células adheridas a la superficie del pocillo se despeguen y posteriormente la tripsina se neutraliza con 2ml de medio DEMEM/F-12 (1:1) (1X) + glutaMAX, añadiendo también el medio anteriormente reservado de cada uno de los pocillos, para así disponer de todas las células presentes en el pocillo, tanto las que mantuvieron la adhesión al plástico tras la irradiación como las que perdieron dicha propiedad.

El volumen contenido en cada pocillo, se trasvasa a un tubo de centrifuga, se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm y temperatura ambiente en la centrifuga "Multifuge 3SR+ (Thermo Scientific)", reservamos el pellet celular y descartamos el sobrenadante. Al pellet seco se le añade 1ml de etanol al 75% en PBS (Phosphate-buffered saline) con el fin de fijar las células y éstas deben permanecer en etanol un mínimo de una hora (alternativamente las células pueden ser conservadas en estas condiciones a -20°C hasta el momento en el que se vaya a realizar la citometría de flujo).

Una vez que las células han sido fijadas, se vuelven a centrifugar 5min a 1000rpm a temperatura ambiente y el pellet seco se resuspende con 0.5ml de una mezcla en PBS que contiene Triton x-100 (0.5%), Ribonucleasa libre de DNasa (25µg/µl) y el agente intercalante de DNA yoduro de propidio (25µg/µl). Se dejan incubando durante 30 minutos en oscuridad con el fin de que las células incorporen el marcaje. Esto posteriormente nos permitirá separar las células en el citómetro de flujo en función de su contenido en DNA, lo que nos permitirá la detección de la fase del ciclo celular en la que se encuentra cada una de las células de la muestra analizada.

Una vez analizada la muestra en el citómetro de flujo, éste genera una gráfica en la que se representa la cantidad de ADN frente al número de células dependiendo de la intensidad de fluorescencia emitida por el yoduro de propidio. Al excitar la muestra (480nm), se produce una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de DNA que hay por célula por lo que según en la fase del ciclo celular en la que se encuentre cada célula, la intensidad será mayor o menor. En el caso en el que las células se encuentren en la fase G₁ en la que aún no se ha producido la duplicación del material genético (2n), la intensidad de fluorescencia será la mitad que en el caso de las células que se encuentran en fase G₂+M en las que ya se ha replicado el material genético (4n). Además, las células que se encuentran en la fase S (síntesis), emiten una señal de fluorescencia

intermedia entre la emitida entre las dos fases anteriores. Por último, las células que se encuentran en fase subG₁, se corresponden con aquellas que han muerto y que poseen el DNA fragmentado; esta fase es detectada gracias a la baja intensidad de fluorescencia que emiten.

5.3. Uso de anillos de clonaje

Para este proceso se ha hecho uso del kit "Cloning cylinders, polystyrene" de Sigma-Aldrich en el que especifica el protocolo a seguir para la obtención de poblaciones clonales.

Para nuestro trabajo, se aislaron clones en virtud de su resistencia a la radiación; por tanto el primer paso es sembrar las células muy diluidas en una placa para que haya el espacio máximo entre ellas. Seguidamente se someten dichas células (procedentes del cultivo primario HGUE-GB-39) a sesiones continuas semanales de 7Gy hasta alcanzar una radiación acumulada de 45Gy.

Una vez finalizadas las sesiones de irradiación, se observa tras un tiempo en cultivo el crecimiento incipiente de poblaciones clonales resistentes a la radiación. Se marcan las zonas donde están creciendo estos clones, se elimina el medio de cultivo y sobre ellos se ponen los anillos de clonaje estériles y que tienen sus bordes tratados con vaselina para permitir que se adhieran al plástico sin medio y sellar el espacio alrededor de los clones, dentro de éstos se deposita tripsina para que las células se desprendan de la superficie de la placa y éstas son sembradas en pocillos de una placa de 24 pocillos; una vez confluentes, se siembran en pocillos de una placa de 6 pocillos y posteriormente se cultivan en frascos de cultivo. De esta forma se obtuvieron 10 clones resistentes procedentes de HGUE-GB-39.

Previo al uso de los anillos de clonaje se deben realizar los siguientes pasos: se deposita sobre una placa de Petri de vidrio vaselina, que se esteriliza mediante autoclavado. A continuación se posa el anillo de clonaje sobre la vaselina estéril y se presiona levemente para que ésta quede adherida a la superficie inferior del anillo de clonaje que se encuentra en contacto. De esta forma, el anillo ya puede ser utilizado para ser depositado sobre las poblaciones clonales y sellarlas.

Una vez obtenidos los clones resistentes, estos se han sometido a sesiones de radiación de entre 5 y 7 Gy (una por semana) para mantener la resistencia.

5.4. Transfección de siRNA

Mediante la transfección de siRNA se pretende modificar la expresión de alguno de los genes de interés objeto de estudio. En este caso se ha realizado para los genes SOCS1 y SOCS3. Básicamente este ensayo consiste en la introducción dentro de la célula de un RNA de interferencia específico para el gen cuya expresión queremos anular, mediante un complejo formado entre el siRNA y una molécula llamada lipofectamina (Lipofectamine RNAiMAX Reagent de la marca Invitrogen) que es la responsable de que el siRNA pueda atravesar la membrana celular.

El procedimiento de esta técnica consiste en los siguientes pasos:

En primer lugar se realiza una siembra de células en una placa de 6 pocillos con una densidad aproximada de 250.000 células por pocillo. Se incuban a 37°C con un 5% de CO₂ durante 24 horas tras las cuales se realiza el proceso de transfección para el cual se requiere:

Preparación en tubos de 15ml del volumen necesario de siRNA (5nm) + Opti-MEM (1X) (Reduced Serum Medium de la marca Gibco). El volumen final de dicha mezcla es 250µl por muestra, el volumen de siRNA es 2,5µl y los 247.5µl restantes de Opti-MEM (1X). Esta mezcla se realiza en tres tubos diferentes ya que la necesitaremos con siNS (siRNA inespecífico que sirve como control), siSOCS1 e siSOCS3. Se dejan reposar 5 minutos.

Paralelamente se prepara otro tubo con la mezcla de lipofectamina (5 µl/muestra) + Opti-MEM (245 µl /muestra). La mezcla se deja reposar 5 minutos.

Transcurridos 5 minutos, se añade a cada uno de los tubos con siRNA, 250µl de la mezcla de lipofectamina, dejándolo reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se formen los complejos de interferencia (siRNA + lipofectamina).

Transcurridos estos 30 minutos, se retira el medio de los pocillos donde se encuentran las células sembradas del día anterior, se añade medio nuevo DEMEM F12 con FBS al 10% pero sin antibiótico y se añade a cada pocillo 500 µl del siRNA que convenga.

Transcurridas 24 horas en cultivo en las condiciones de temperatura y CO₂ antes mencionadas, se realizan en los pocillos dos tipos de determinaciones. Por un lado utilizamos algunos pocillos como control del efecto de los siRNAs sobre la expresión del RNA mensajero de interés, en estos pocillos se procede a la lisis celular con buffer RLT (como se explica más adelante) para una posterior extracción y análisis de RNA. El resto de pocillos se someten a irradiación a la intensidad deseada para determinar si los cultivos han adquirido algún grado de resistencia a la radioterapia por acción de los siRNAs contra SOCS1 y SOCS3.

5.5. Irradiación celular

Para irradiar los cultivos primarios, se realiza un cultivo de éstos en placas de 6 pocillos y en cada pocillo se siembran 200.000 células aproximadamente.

Una vez sembradas las muestras que sean de interés, se incuban a 37°C y 5% de CO₂ para permitir su crecimiento y que estén a un grado de confluencia adecuado a la hora de ser irradiadas. A continuación, las muestras se irradian en la Unidad de Radioterapia del Hospital General Universitario de Elche con el equipo “electron linear accelerator VARIANT 2100C (CLINAC 2100C).

5.6. Aislamiento de RNA

La extracción de RNA se ha llevado a cabo mediante la adición de buffer de lisis RLT + β-mercaptoetanol del kit comercial “RNase-Free DNase Set (QIAGEN)”, tras retirar el medio de cultivo. El kit de extracción utiliza columnas de elución con membranas de sílica-gel en las que queda adsorbido el RNA. Este proceso se realiza en el equipo QIAcube (QIAGEN) disponible en la Unidad de Investigación del Hospital General Universitar de Elche. Durante el proceso de extracción del RNA, se añade DNasa en tampón RDD comercial “RNase-Free DNase Set (QIAGEN)” (12,5% de DNasa) para digerir el DNA presente en la muestra.

La composición del buffer RLT es propiedad de la casa comercial RNeasy kit; sin embargo, se sabe que contiene una alta concentración de guanidine isothiocyanate que ayuda a que el RNA se una a las membranas de sílica-gel que contienen las columnas de esta misma casa comercial. De igual modo, la composición del buffer RDD es propiedad de esta misma casa comercial aunque la función de este buffer es asegurar una buena digestión de DNA y que el RNA permanezca unido a la columna.

5.7. Retrotranscripción

Una vez realizada la extracción de RNA de la muestra de interés, se procede a la retrotranscripción de éste para la obtención de cDNA, consistiendo ésta en el siguiente procedimiento:

En primer lugar, se procede a la cuantificación de mRNA que se ha extraído ya que es necesaria una cantidad mínima de éste de 0.5 o 1µg (ya que habrá muestras en las que se haya extraído más o menos RNA). Esta cuantificación se lleva a cabo mediante medidas espectrofotométricas en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Como resultado de esta cuantificación,

obtenemos un valor de concentración en ng/ μ l, el índice de pureza 260/280 (cuyo valor óptimo ha de encontrarse entre 1.8 y 2.2) y una gráfica en la cual el pico máximo debe encontrarse en 260nm ya que la presencia de otro máximo a otra longitud de onda sería indicativo de contaminación (ya sea por DNA si el máximo se encontrara cercano al valor de 230nm o por proteínas si el máximo se encontrara cercano a 280nm).

Una vez obtenida la concentración y comprobando que la pureza de la muestra es la adecuada, se procede al cálculo del volumen necesario de la muestra de RNA para la obtención de una concentración común en todas las muestras de 0.5 o 1 μ g. En primer lugar se realiza una conversión del valor de la concentración obtenida de RNA de ng/ μ l a μ g/ μ l lo cual permite calcular el volumen en μ l necesario para alcanzar la concentración deseada. Este volumen se resta a un volumen de 10 μ l que es el volumen de agua restante en el que se va a diluir.

A continuación se debe preparar el volumen necesario de RT master mix necesario para que cada muestra posea un volumen de 10 μ l de ésta. Para ello se utiliza el kit de Applied Biosystems "High Capacity cDNA Reverse Transcription" y se sigue el protocolo del fabricante en el cual se utilizan:

- a) 10x RT Buffer _____ 2 μ l
- b) 25x dNTP Mix (100mM) ____ 0.8 μ l
- c) 10x RT Random Primers ____ 2 μ l
- d) Reverse Transcriptase _____ 1 μ l
- e) RNase Inhibitors _____ 1 μ l
- f) Nuclease free wáter _____ 3.2 μ l

NOTA: tanto las muestras de RNA como los componentes de la RT master mix deben mantenerse en frío en todo momento para no comprometer la estabilidad de éstos.

El volumen final que cada muestra debe poseer es de 20 μ l de los cuales 10 μ l son de RT master mix y los 10 μ l restantes se corresponden con el RNA diluido en el volumen correspondiente de agua.

Por último, se introduce la muestra en el termociclador "G-STORM", se introduce el ciclo de retrotranscripción deseado y una vez finalizado el proceso, se conserva la muestra de cDNA a -20°C.

El ciclo utilizado en este proceso consta de 3 etapas en las que se produce la retrotranscripción de mRNA a cDNA y una cuarta etapa en la que las muestras se conservan a baja temperatura para no alterar sus propiedades:

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
T (°C)	25	37	85	10
T (min)	10	120	5	∞

En la etapa 4 del ciclo de retrotranscripción, el símbolo “∞” quiere decir que los tubos de PCR en los que se ha llevado a cabo la reacción de interés, se mantienen a la temperatura de 10°C durante el tiempo en el que se tarda en retirar dichos tubos para su utilización o conservación de cDNA a la temperatura de -20°C.

5.8. PCR cuantitativa en tiempo real.

Tras el aislamiento de RNA y la retrotranscripción de éste, se procede a realizar una PCR cuantitativa a tiempo real en el equipo de Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System y para la cual se necesita el cDNA anteriormente obtenido.

La PCR cuantitativa a tiempo real permite la amplificación de la muestra de cDNA y su detección de forma visual conforme se da el proceso. Esta técnica se basa en la utilización de sondas marcadas con fluoróforos que permiten la visualización de la amplificación mediante un equipo capaz de medir señales fluorescentes. Esta técnica está basada en el principio de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), en el que las sondas están marcadas por los extremos, en uno de ellos se encuentra un fluoróforo y en el otro extremo se encuentra un atenuador; por tanto, cuando ambos están cercanos, el atenuador no permite que el equipo detecte la señal fluorescente, pero cuando éstos se alejan, la señal fluorescente es suficiente para ser detectada por el equipo.

El proceso para llevar a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real es el siguiente:

En primer lugar se procede a medir la concentración de cDNA obtenida tras la retrotranscripción, para ello se vuelve a hacer uso del equipo espectrofotométrico Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y según la concentración obtenida, se debe hacer una dilución para que la concentración final sea aproximadamente de 200 ng/μl.

Una vez diluido el cDNA, se reserva y se procede al cálculo y preparación de una mezcla compuesta por:

- Master mix (TaqMan, Gene Expression Master Mix) ____ 10 μl/pocillo
- Assay del gen objeto de estudio _____ 1 μl/pocillo
- Agua estéril _____ 5 μl/pocillo

El ensayo se realiza se realiza por triplicados.

No hay que olvidar tener en cuenta que se deben realizar controles en la misma placa para que el ensayo sea fiable. Por tanto, se debe realizar un control negativo NTC (Non Template Control) de cada assay utilizado, en el cual se emplea H₂O en lugar de cDNA; y un control positivo en el que se utiliza un assay de un gen que se expresa constitutivamente sin que su expresión se vea afectada por los tratamientos empleados, en este caso se trata del gen GAPDH. A continuación se detalla la información de los assays (todos ellos TaqMan Gene Expression Assays) utilizados en el presente trabajo:

- a) GAPDH: hu GAPDH, VIC-MGB, 4326317E-1001033 de Applied Biosystems
- b) RAP2A: Hs00702699 s1 RAP2A de Applied Biosystems
- c) TRIM2: Hs00984472 m1 MLLT4 FAM de Applied Biosystems
- d) MLLT4: Hs00991875 m1 TRIM2 de Applied Biosystems
- e) SOCS1: Hs00705164 s1 SOCS1 de Applied Biosystems
- f) SOCS3: Hs02330328 s1 SOCS3 de Applied Biosystems

NOTA: En el caso del assay de GAPDH, es suficiente un volumen de 0.5µl/pocillo.

Una vez se ha preparado el volumen de la mezcla necesaria para cada assay y se tienen las muestras de cDNA diluidas correctamente, se procede a plaquear las muestras considerando que en cada pocillo debe haber 16µl de la mezcla del assay correspondiente y 4µl de cDNA de la muestra de interés.

Una vez finalizado este proceso, se da un pulso a la placa en la centrífuga "RT6000B (Sorvall)", se pone una tapa sobre ésta para evitar la evaporación de la muestra durante el proceso y se introduce en el equipo donde se lleva a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real del modelo ya especificado anteriormente.

Una vez finalizado el proceso, se genera un archivo "Excel" con los datos necesarios que se han de procesar para obtener los resultados. En este documento se expresan los valores de C_T (Threshold Cycle) el cual expresa el ciclo de amplificación en el que se ha superado el umbral mínimo de fluorescencia (que normalmente es establecido por el programa) y que por tanto que nos permite calcular la expresión del gen, normalizando mediante la comparación de estos valores de C_T de nuestros genes con los valores de nuestro gen de referencia, en este caso y como se ha indicado anteriormente, los valores de C_T obtenidos de GAPDH.

Con estos valores y haciendo uso de la siguiente fórmula, se pudieron calcular los valores de concentración inicial de cada gen:

$$C_i = 2^{(-\Delta C_T)}$$

Siendo,

- C_i : concentración inicial
- ΔC_T : C_T (gen estudiado) - : C_T (GAPDH)

5.9. Análisis estadístico

Este trabajo de fin de grado es fundamentalmente de carácter cualitativo, más que cuantitativo. No obstante, en algunos de los resultados obtenidos hemos procedido a determinar si las diferencias en las medias de los valores entre los controles y los tratados eran significativas. Para estos casos hemos utilizado la T-student de comparación de medias.



6. RESULTADOS

En primer lugar, se realizó una comparación de la expresión génica de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 en diferentes cultivos primarios de glioblastoma proporcionados por el HGUE para caracterizar la expresión de estos genes en glioblastoma (OBJETIVO 01). Es importante destacar que todos los valores de expresión génica representados gráficamente en este documento se encuentran normalizados con los valores de expresión constitutiva que posee GAPDH.

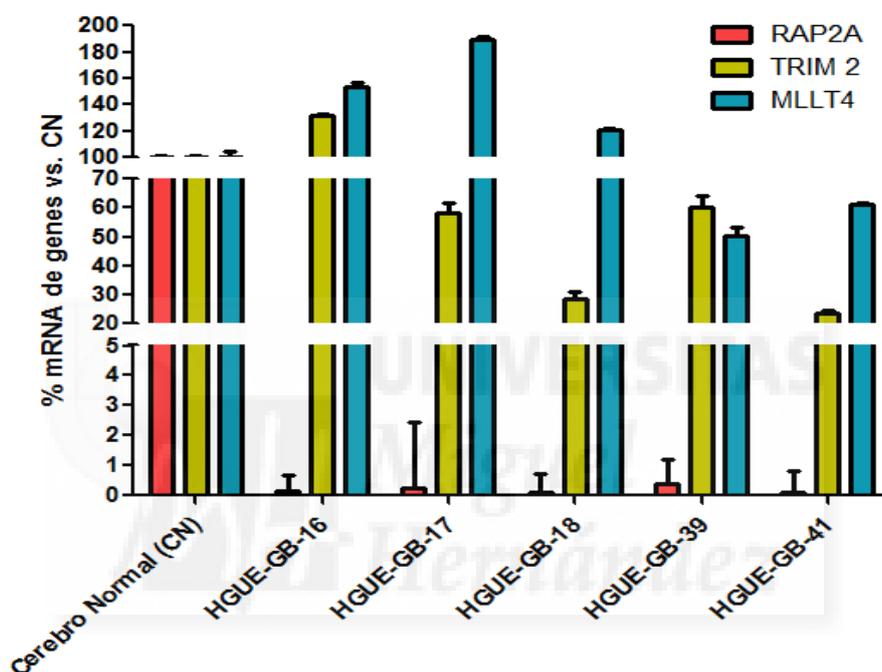


Figura 04: Representación de la expresión génica en tanto por ciento (%) de RAP2A (en rojo), TRIM2 (en verde) y MLLT4 (en azul) en diferentes cultivos primarios comparada con su expresión en cerebro normal. En el caso de RAP2A la expresión en cultivos primarios es sustancialmente menor que en cerebro normal. Respecto a TRIM2, la expresión en cultivos primarios es algo menor que en el cerebro normal, de forma general. Por último, en el caso de MLLT4 la expresión es variable según el cultivo primario al que nos referimos.

Una vez comprobada la expresión que tiene cada gen en diferentes cultivos primarios de glioblastoma (Figura 04), se procede al estudio del efecto que sobre la expresión de los genes estudiados pueda tener la realización de pases en los cultivos primarios para la conservación de los mismos y a la comparación de la expresión de éstos en los cultivos, con la expresión que poseen en cerebro normal.

En cuanto a RAP2A se observa que en cerebro normal la expresión es mucho más alta que en los cultivos primarios y que la realización de pases desde tempranos a tardíos, no modifica la expresión de éste sustancialmente (Figura 05).

Diferencia de expresión de RAP2A en Cerebro normal y cultivo primario HGUE-GB-39

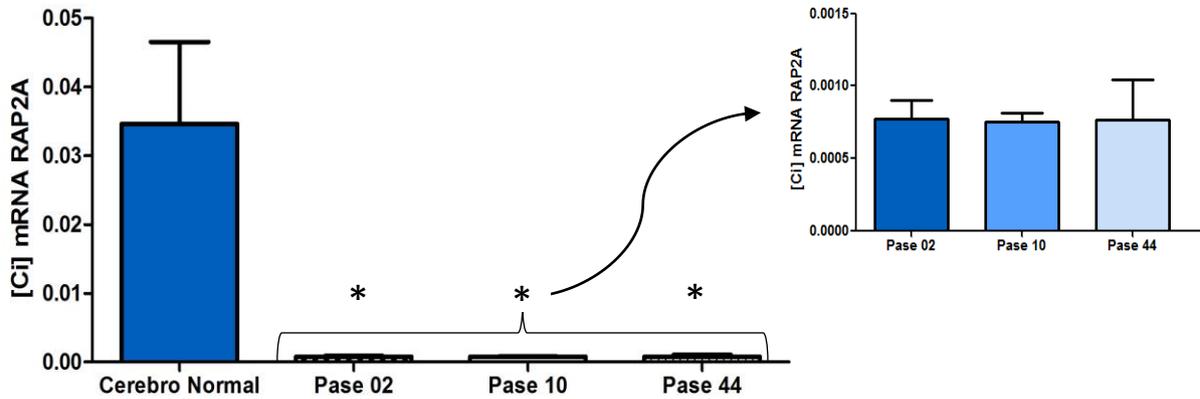


Figura 05: comparación de la expresión génica de RAP2A en cerebro normal y en diferentes pases del cultivo primario HGUE-GB-39. (*: $p < 0.05$)

En cuanto a TRIM2 se observa que en cerebro normal la expresión es también más alta que en los cultivos primarios. En este caso, al comparar entre sí los datos de expresión de los diferentes pases del cultivo primario HGUE-GB-39, sí se observa una bajada significativa de la expresión conforme se aumenta el número de pases. Sin embargo, la gran diferencia entre la expresión en los cultivos primarios comparada con la expresión en cerebro normal, resta significado a esta diferencia de expresión entre pases debido a la diferencia existente (Figura 06).

Diferencia de expresión de TRIM2 en Cerebro normal y cultivo primario HGUE-GB-39

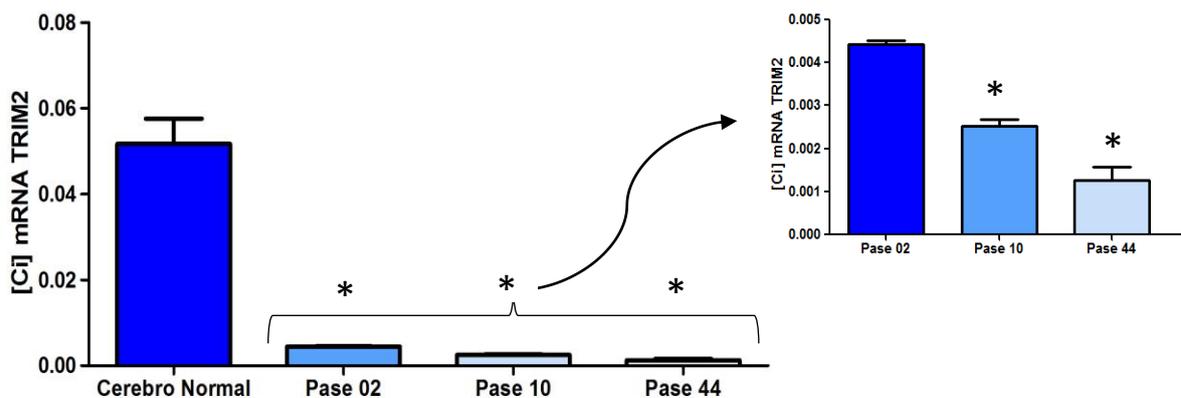


Figura 06: comparación de la expresión génica de TRIM2 en cerebro normal y en diferentes pases del cultivo primario HGUE-GB-39. (*: $p < 0.05$)

En cuanto a MLLT4 se observa que la expresión de éste va descendiendo con el aumento de los pases de forma más acusada en comparación con la expresión de cerebro normal, comparándolo con el caso de TRIM2 (Figura 07).

Diferencia de expresión de MLLT4 en Cerebro normal y cultivo primario HGUE-GB-39

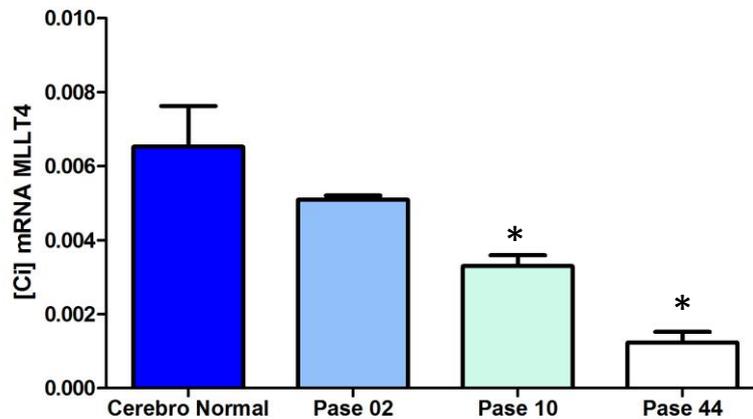


Figura 07: comparación de la expresión génica de MLLT4 en cerebro normal y en diferentes pases del cultivo primario HGUE-GB-39. (*: $p < 0.05$)

A continuación, y puesto que uno de los objetivos es observar el efecto de la radiación en RAP2A, TRIM2 y MLLT4 para intentar dilucidar el papel de estos genes en glioblastoma, se estudió el efecto de la radiación sobre la expresión de estos genes. Esta determinación se realizó tras una única exposición a 7Gy, y adicionalmente, se determinó tras la acumulación de exposiciones a 7Gy con una periodicidad semanal. La determinación tras varias exposiciones a 7Gy es especialmente relevante porque la población se va enriqueciendo en células capaces de sobrevivir a los efectos de la radiación.

En cuanto a RAP2A, si se realiza una comparación entre el cultivo celular sin irradiar e irradiado con una intensidad de 7Gy, se observa un leve aumento de la expresión; sin embargo, con siguientes sesiones de irradiación, la expresión de RAP2A se mantiene a niveles similares al cultivo celular del que vienen (wild type, wt). Por tanto, en este caso se puede sugerir que la radiación o acumulación de ésta no afecta a la expresión de RAP2A sustancialmente (Figura 08).

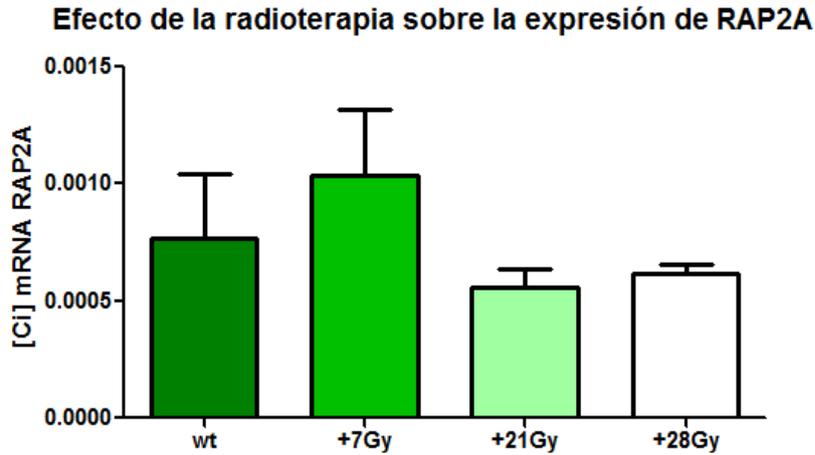


Figura 08: comparación de la expresión génica de RAP2A en el cultivo primario HGUE-GB-39 sin irradiar (wt), irradiado una sola vez con 7Gy, irradiado en varias ocasiones hasta alcanzar un valor de irradiación final de 21Gy y por último, irradiado en varias ocasiones hasta alcanzar un valor de irradiación final de 28Gy.

En cuanto a TRIM2, si se realiza una comparación entre el cultivo celular sin irradiar e irradiado (tanto una primera vez como volviéndolo a irradiar acumulando dicho efecto), se observa que la expresión de TRIM2 aumenta con el aumento de la intensidad de la radiación en comparación con los niveles de expresión del cultivo wild type (Figura 09).

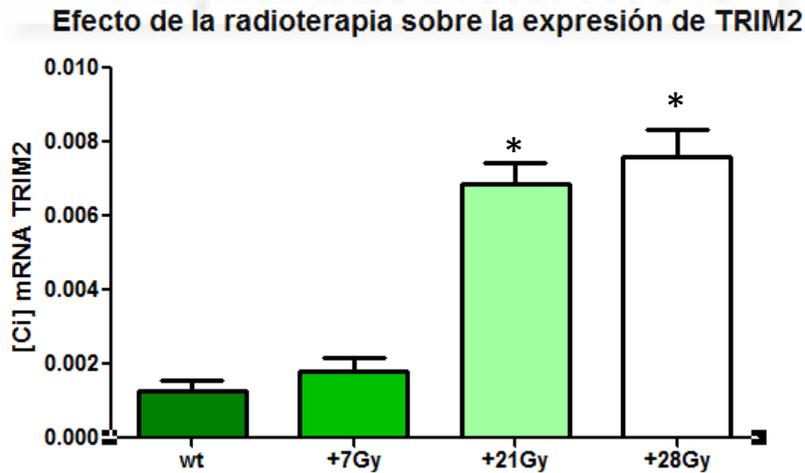


Figura 09: comparación de la expresión génica de TRIM2 en el cultivo primario HGUE-GB-39 sin irradiar (wt), irradiado una sola vez con 7Gy, irradiado en varias ocasiones hasta alcanzar un valor de irradiación final de 21Gy y por último, irradiado en varias ocasiones hasta alcanzar un valor de irradiación final de 28Gy. (*: $p < 0.05$)

En cuanto a MLLT4, se observa un comportamiento muy similar al de TRIM2 (Figura 10).

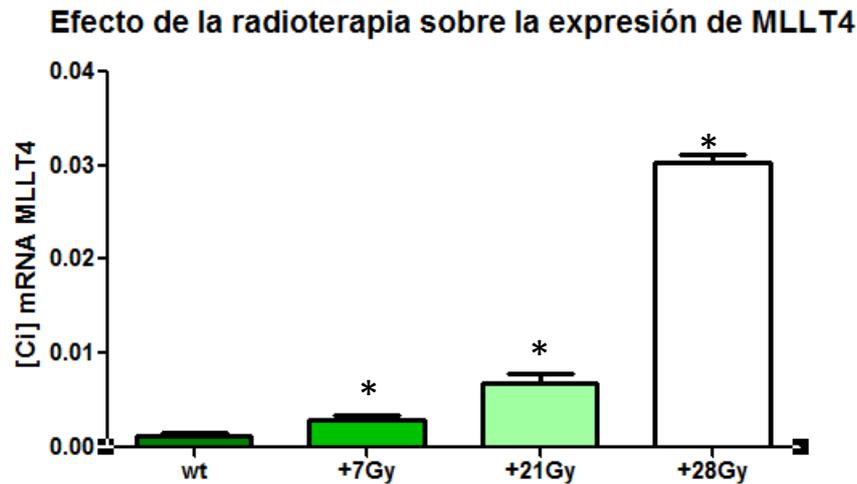


Figura 10: comparación de la expresión génica de MLLT4 en el cultivo primario HGUE-GB-39 sin irradiar (wt), irradiado una sola vez con 7Gy, irradiado en varias ocasiones hasta alcanzar un valor de irradiación final de 21Gy y por último, irradiado en varias ocasiones hasta alcanzar un valor de irradiación final de 28Gy. (*: $p < 0.05$)

Dado que uno de nuestros objetivos es determinar si existe relación entre la resistencia a la radioterapia y la expresión de genes relacionados con la división celular asimétrica de las células madre, necesitábamos generar modelos de estudios resistentes a la radioterapia en los que poder observar si se producían cambios en la expresión de nuestros genes de interés. Para ello se aislaron clones resistentes a la radiación a partir del cultivo celular HGUE-GB-39 y se observó la expresión de RAP2A, TRIM2, MLLT4, SOCS1 y SOCS3. La incorporación de estos dos últimos genes al estudio que se está realizando es interesante porque ambos han sido relacionados con la resistencia a la radioterapia y el estudio de los mismos simultáneamente con el estudio de los genes relacionados con la división asimétrica de las células madre, podría relacionar la resistencia a la radioterapia y la división asimétrica de células madre. Además, se realizó una transfección de siRNA, modificando la expresión de SOCS1 y SOCS3 para observar, por un lado si esta inhibición de la expresión de estos genes nos generaba un segundo modelo de resistencia y qué efecto tienen estas modificaciones sobre la expresión de los genes RAP2A, TRIM2 y MLLT4.

A continuación se muestra la variación de la expresión de SOCS1 y SOCS3 en los ensayos de transfección con siRNA y en clones resistentes procedentes del cultivo celular HGUE-GB-39 (Figuras 11 y 12).

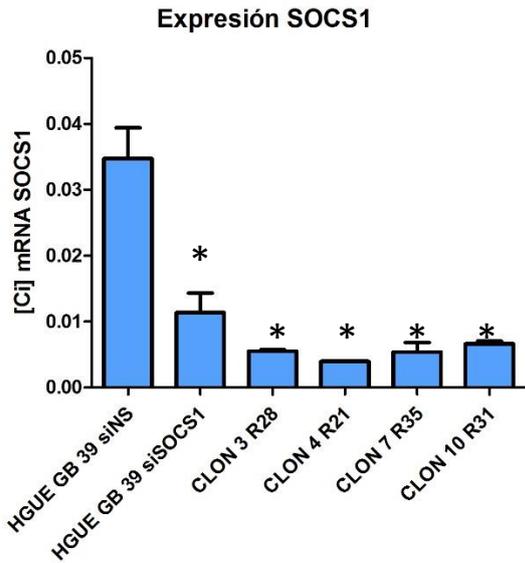


Figura 11: Comparación del nivel de expresión de 4 clones resistentes generados a partir del cultivo primario HGUE-GB-39 y comparación con la expresión de SOCS1 en el estudio realizado con siRNA. (*: $p < 0.05$)

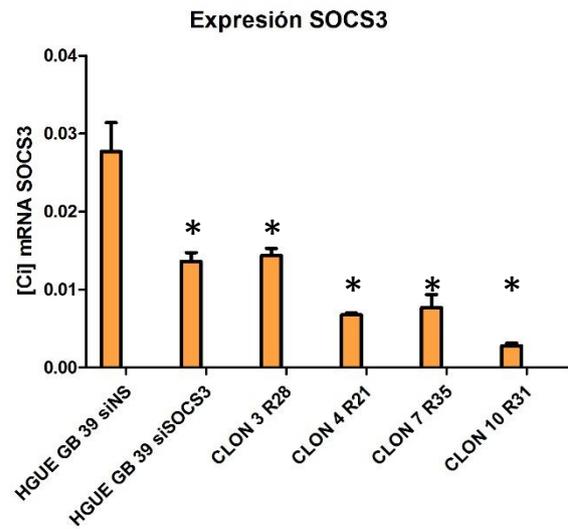


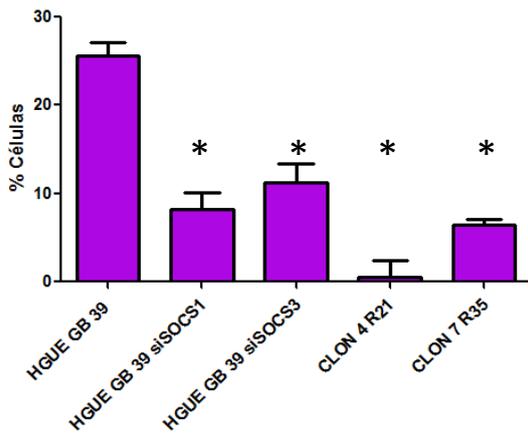
Figura 12: Comparación del nivel de expresión de 4 clones resistentes generados a partir del cultivo primario HGUE-GB-39 y comparación con la expresión de SOCS3 en el estudio realizado con siRNA. (*: $p < 0.05$)

Si se hace una comparación entre el nivel de expresión basal de SOCS1 y SOCS3 en HGUE-GB-39 transfectado con un siRNA no específico (siNS) y HGUE-GB-39 transfectado con siRNAs específicos para SOCS1 (siSOCS1) y SOCS3 (siSOCS3) se observa que en la transfección se ha generado un modelo con una bajada de expresión de SOCS1 y SOCS3, similar a la observada en los clones resistentes, aunque en éstos se observe menor expresión que en los ensayos con siRNA.

Este comportamiento, referente a SOCS1, sólo se consiguió parcialmente con SOCS3 ya que la bajada de expresión de SOCS3 mediante siRNA no es tan acusada como en el caso de SOCS1.

Para establecer una relación causa-efecto de la variación de expresión de SOCS1 y SOCS3 con la resistencia a radioterapia se procedió a la realización de estudios mediante citometría de flujo en cultivos primarios, clones resistentes y cultivos en los que se inhibió la expresión de SOCS1 y SOCS3 (Figuras 13 y 14).

Fase G₂+M ciclo celular en ensayo de citometría de flujo



Ensayo citometría de flujo

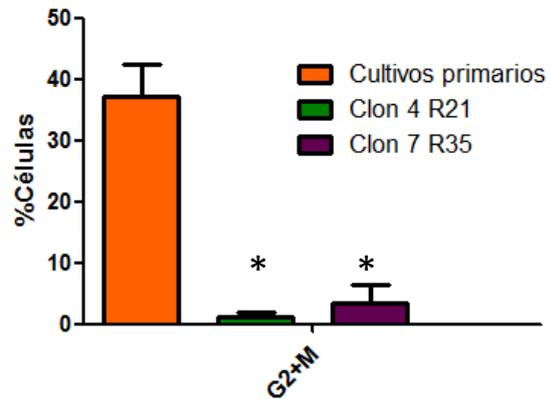


Figura 13: Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran en fase G₂+M del ciclo celular determinadas por citometría de flujo tras 24 horas después de ser irradiadas con 7Gy. Comparación de este porcentaje entre el cultivo celular wild type (HGUE-GB-39) y los resultados obtenidos del ensayo de inhibición mediante siRNA de SOCS1 y SOCS3. Un menor % de células en esta fase del ciclo celular significa que la muestra es más resistente al tratamiento recibido. (*: $p < 0.05$)

Figura 14: Representación gráfica del porcentaje de células que se encuentran en fase G₂+M del ciclo celular determinadas por citometría de flujo tras 24 horas después de ser irradiadas con 7Gy. Comparación de este porcentaje entre el valor medio de células presentes en diferentes cultivos primarios de glioblastoma y los resultados obtenidos del ensayo de inhibición mediante siRNA de SOCS1 y SOCS3. Un menor % de células en esta fase del ciclo celular significa que la muestra es más resistente al tratamiento recibido. (*: $p < 0.05$)

Tras una exposición a 7Gy y 24 horas de incubación, el efecto de la radiación sobre las células de glioblastoma es fundamentalmente un bloqueo del ciclo celular con acumulación de células en la fase G₂+M del ciclo celular, estas células retenidas en dicha fase mueren posteriormente y aparecen en la fase subG₁, pero esta muerte celular sólo se observa si se realiza la citometría de flujo más allá de las 24 horas utilizadas en estos experimentos. Por tanto, el grado de acumulación de células en la fase G₂+M en estos experimentos es inversamente proporcional a la resistencia al tratamiento radioterápico si nos fijamos en los resultados obtenidos de citometría de flujo, en la fase G₂+M del ciclo celular referente a HGUE-GB-39, el porcentaje de células aquí presentes es significativamente mayor que en los clones. Esto, junto con los niveles de expresión obtenidos de SOCS1 y SOCS3, lleva a la conclusión de que las células de glioblastoma que llevan aparejada una bajada en la expresión de estos genes, son más resistentes a la radioterapia. Además, no sólo se observa esta diferencia de expresión en los clones comparada con el cultivo primario HGUE-GB-39, sino también con el valor medio de expresión génica de SOCS1 y SOCS3 de diferentes cultivos primarios de glioblastoma. Por

tanto, estos resultados nos permiten sugerir que los clones son más resistentes a la radioterapia que los cultivos primarios. (Figura 15)

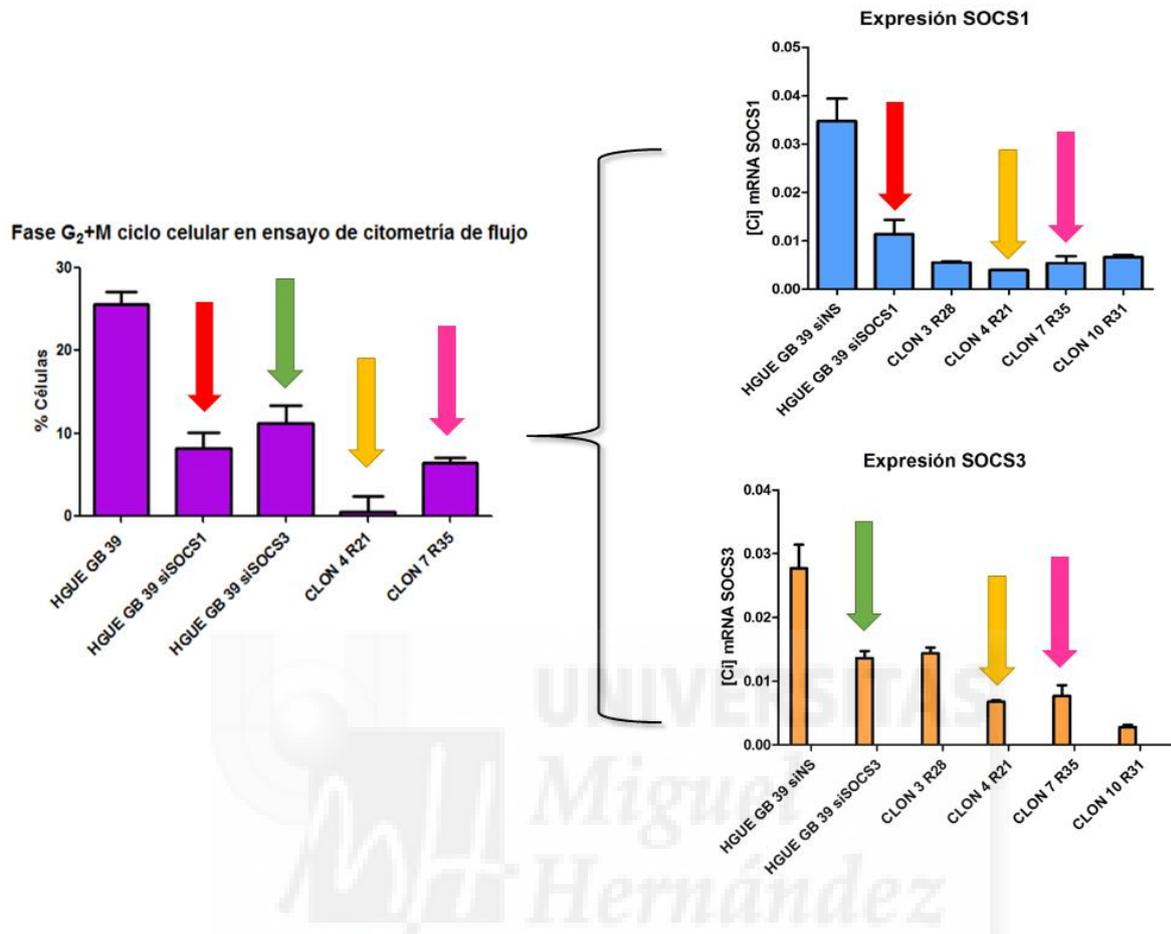


Figura 15: Relación entre los niveles de expresión de SOCS1 y SOCS3 en el ensayo de siRNA y en clones, con el correspondiente porcentaje de células obtenidas mediante citometría de flujo en cada muestra. Mediante esta comparación se puede observar una relación entre la bajada de expresión de SOCS1 (especialmente) y SOCS3 (en menor medida) y la resistencia a radioterapia.

En cuanto al nivel de resistencia inducido en los cultivos transfectados con siRNA, inhibiendo la expresión de SOCS1 y SOCS3, se asemeja a la resistencia a radioterapia obtenida en los clones. Cuando se realizó el análisis del nivel de expresión de SOCS1 y SOCS3 en los cultivos transfectados, se observó una bajada de la expresión de estos genes aunque sin llegar a niveles tan bajos como los obtenidos en los clones; este hecho concuerda con que la resistencia sea algo menor que en clones pero mayor que en el cultivo primario del que proceden.

Una vez realizados estos análisis en la expresión de SOCS1 y SOCS3 y comprobada que una bajada en su expresión genera mayor resistencia a la radioterapia, se procede al análisis del nivel de

expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 tanto en clones resistentes como en aquellas muestras en las que se ha modificado la expresión de SOCS1 y SOCS3 mediante siRNA.

Fijándonos en la expresión de RAP2A al modificar la expresión de SOCS1 y SOCS3, se observa un comportamiento de este gen completamente contrario al de SOCS1 y SOCS3 al ser éstos inhibidos, RAP2A aumenta su expresión (Figura 16). Por tanto, cabe la posibilidad de que SOCS1 y SOCS3 estuvieran regulando la expresión de RAP2A.

Además, este aumento en la expresión de RAP2A también se observa en los clones resistentes 4 y 7 de forma proporcional a la disminución que presentan éstos de SOCS1 y SOCS3.

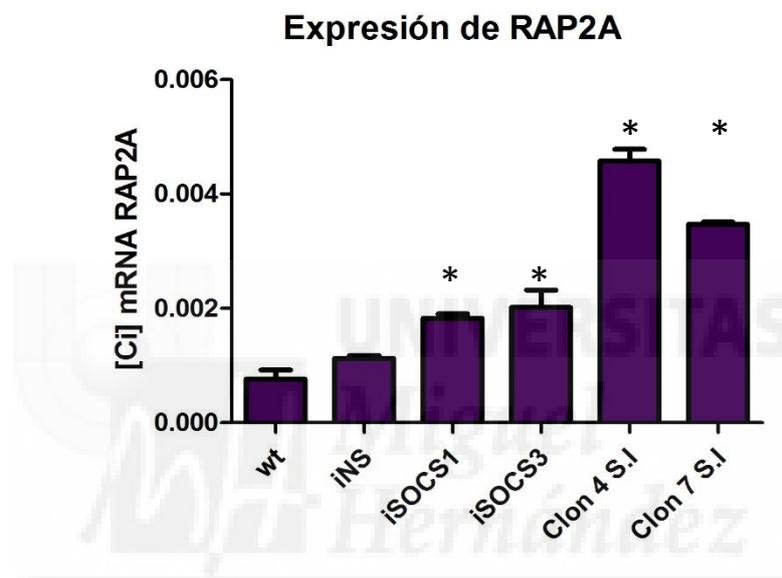


Figura 16: comparación de la expresión génica de RAP2A en el cultivo primario HGUE-GB-39 sin irradiar (wt), alterando la expresión de SOCS1 y SOCS3 (siSOCS1 y siSOCS3, respectivamente) utilizando como control siNS. Comparación de la expresión en clones resistentes frente al cultivo primario del que provienen (wt). (*: $p < 0.05$)

El comportamiento observado en la expresión de RAP2A cuando la expresión de SOCS1 y SOCS3 es inhibida mediante siRNA, se repite en la expresión de TRIM2 (Figura 17) y MLLT4 (Figura 18).

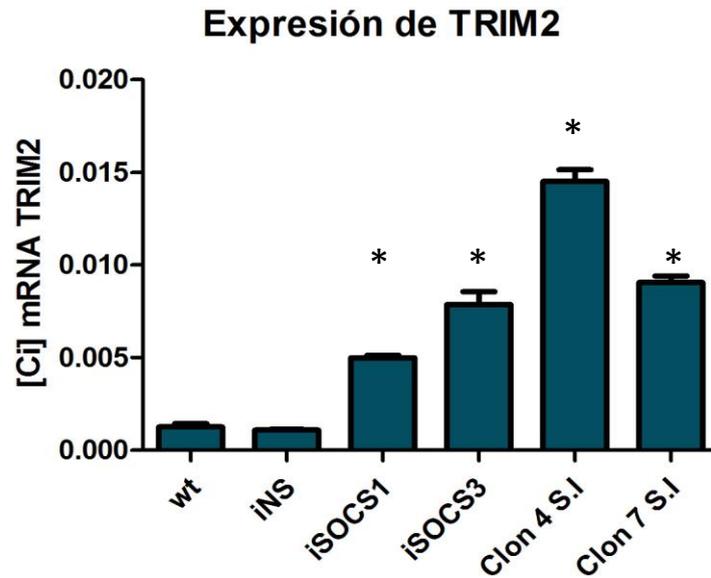


Figura 17: comparación de la expresión génica de TRIM2 en el cultivo primario HGUE-GB-39 sin irradiar (wt), alterando la expresión de SOCS1 y SOCS3 (siSOCS1 y siSOCS3, respectivamente) utilizando como control siNS. Comparación de la expresión en clones resistentes frente al cultivo primario del que provienen (wt). (*: $p < 0.05$)

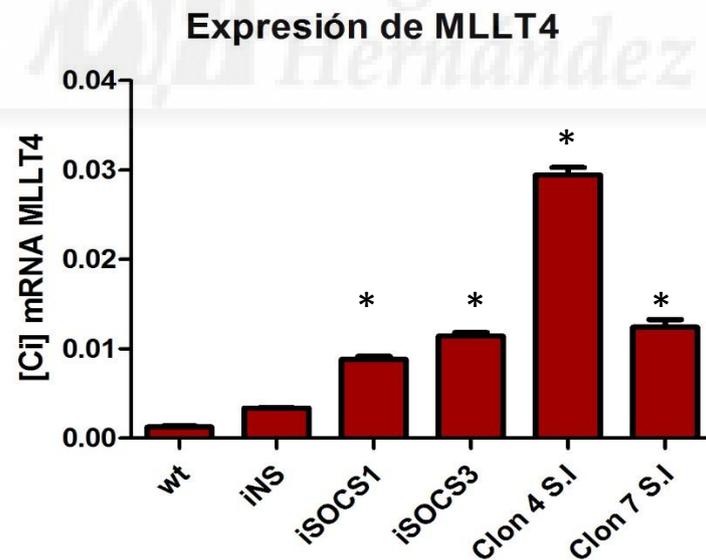


Figura 18: comparación de la expresión génica de MLLT4 en el cultivo primario HGUE-GB-39 sin irradiar (wt), alterando la expresión de SOCS1 y SOCS3 (siSOCS1 y siSOCS3, respectivamente) utilizando como control siNS. Comparación de la expresión en clones resistentes frente al cultivo primario del que provienen (wt). (*: $p < 0.05$)

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo es, evaluar la posible implicación de los genes homólogos en humanos de genes relacionados con la división asimétrica de células madre neurales en *Drosophila melanogaster* en la adquisición de radiorresistencia en cultivos primarios de glioblastoma.

Para la realización de este objetivo hemos partido de la demostración de la existencia de células madre tumorales en el glioblastoma [20-22], los datos publicados que sugieren que las células madre tumorales participan en los fenómenos de adquisición de resistencia a los diferentes tratamientos oncológicos en otros tipos de tumores [4,23] y de la colaboración de nuestro grupo con el dirigido por la Dra. Ana Carmena del CSIC en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández (UMH). Mediante la batería de ensayos realizados, hemos intentado comprobar si existe una relación causa-efecto entre genes que probablemente están implicados en procesos de generación de resistencia a radioterapia en diferentes tipos de tumores [5,6,16-18] y genes homólogos de genes que en *Drosophila melanogaster* se ha visto que intervienen en la regulación de procesos de división asimétrica de células madre [7].

Para conseguir este objetivo, lo primero que se realizó fue la caracterización de la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 (genes implicados en la división asimétrica de células madre en *Drosophila melanogaster*) en cultivos primarios de glioblastoma en comparación con la expresión de éstos en cerebro normal. Los resultados obtenidos muestran que MLLT4 se expresa más en los cultivos primarios de glioblastoma que en cerebro normal, aunque los niveles de expresión de este gen entre los diferentes cultivos primarios es muy dispar y en el array mostrado en la Figura 03 de los antecedentes, se observa que no sufre una gran variación al comparar la expresión entre los pacientes de glioblastoma y el cerebro normal. Los casos de TRIM2 y especialmente RAP2A son muy diferentes. En ambos casos el array mostró que los pacientes de glioblastoma expresan mucho menos estos genes de lo que se expresan en cerebro normal. En los análisis realizados en los cultivos primarios, esta pérdida de expresión en glioblastoma se observa de nuevo (Figuras 04, 05, 06) y especialmente con RAP2A se observa una práctica pérdida de expresión en los cultivos comparados con el cerebro normal. Estos datos de expresión podrían indicar que TRIM2 en menor medida, pero especialmente RAP2A podría actuar como gen supresor en glioblastomas, este papel de gen supresor de RAP2A ha sido previamente observado en otro tipo de tumores [19].

Una vez observada la diferencia de expresión que existe de estos genes frente al cerebro normal, se procedió al estudio del efecto de la radioterapia sobre la expresión de los mismos. Se pudo comprobar que los niveles de expresión génica de TRIM2 y MLLT4, aumentan cuando los cultivos son irradiados secuencialmente, así no hay un aumento significativo tras una única irradiación de 7Gy, pero si las células supervivientes son irradiadas de nuevo en múltiplos de 7Gy se observa cómo la expresión de TRIM2 y MLLT4 aumenta significativamente (Figuras 09, 10). Este dato puede ser relevante, ya que la irradiación secuencial es un método de selección de las células tumorales que van adquiriendo resistencia al tratamiento radioterápico. Esta selección, si tenemos en cuenta la teoría de las células madre tumorales y su hipotetizada participación en la adquisición de la resistencia a los tratamientos de los tumores, conllevaría un aumento en las células madre tumorales presentes y un aumento en las divisiones asimétricas en el cultivo. El aumento de la expresión de genes relacionados con la división asimétrica de células madre en este contexto sería lógico. Sin embargo, en el caso de RAP2A no se pudo establecer una relación entre la diferencia de expresión génica y el efecto a la radioterapia porque no se observaron diferencias significativas en ella.

Una vez se caracterizó la expresión de estos genes tanto en cultivos primarios de glioblastoma como en respuesta a la radiación, se procedió a determinar la expresión de los genes SOCS1 y SOCS3, que han sido relacionados con la adquisición de resistencia a la radioterapia [5,6], tanto en cultivo primario como en modelos de resistencia que se generaron para poder estudiar posteriormente la expresión génica de SOCS1 y SOCS3 y su posible relación con la resistencia a radioterapia.

En primer lugar y partiendo del cultivo primario HGUE-GB-39 se llevó a cabo la obtención de poblaciones clonales del mismo resistentes a la radioterapia y en todas ellas se observó un valor de expresión génica de SOCS1 y SOCS3 menor que en el cultivo parental o wild type a partir del cual se generaron (Figura 11, 12). La resistencia a la radioterapia de estos clones fue determinada por citometría de flujo para estudiar los efectos de la radioterapia sobre el ciclo celular de estas poblaciones (Figura 13, 14).

En base a estos resultados que indicaban que la adquisición de radorresistencia se asociaba con una disminución en la expresión de SOCS1 y SOCS3, decidimos inhibir la expresión de estos genes artificialmente con siRNAs en el cultivo parental HGUE-GB-39 y determinar si la simple disminución de la expresión de estos genes era condición necesaria y suficiente para obtener radorresistencia en el cultivo. La transfección con siRNA contra los genes SOCS1 y SOCS3, en HGUE-GB-39 consiguió disminuir la expresión de SOCS1 en un alto porcentaje (67.3%), sin embargo en el caso de SOCS3 dicha bajada de expresión solo se consiguió parcialmente. Por último, para comprobar que esta modificación de la expresión resultaba en la resistencia a la radioterapia, se realizó un análisis de

estas muestras mediante citometría de flujo (Figura 13, 14), obteniendo que la disminución de SOCS1 producía una adquisición de resistencia a radioterapia similar a la obtenida en los experimentos de aislamiento de los clones resistentes antes mencionados. Interesantemente y aunque el siRNA de SOCS3 solo funcionó parcialmente, se observó que esta disminución fue suficiente para que el cultivo HGUE-GB-39 adquiriera un cierto grado de resistencia a la radioterapia.

Una vez se conoce el comportamiento de estos cinco genes, tres de ellos implicados en la división asimétrica de células madre y los otros dos restantes con un papel en la resistencia a radioterapia en casos de glioblastoma multiforme, se procedió al análisis de la expresión de los genes implicados en la división asimétrica en los modelos de resistencia generados para poder estudiar el efecto que poseen SOCS1 y SOCS3 sobre la expresión de los genes RAP2A, TRIM2 y MLLT4.

Se ha podido comprobar que tanto en el caso de RAP2A como de TRIM2 y MLLT4, la expresión de éstos sufre un aumento pronunciado en el caso de los clones resistentes, de tal manera que una bajada en la expresión de SOCS1 y SOCS3 podría implicar un aumento de RAP2A, TRIM2 y MLLT4. Esto se confirma por segunda vez con los resultados obtenidos en las muestras transfectadas con siRNAs para SOCS1 y SOCS3, en las que se baja la expresión de ambos y, de nuevo, la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 aumenta. Además, se observa que según disminuya más o menos la expresión de SOCS1 y SOCS3, la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 aumenta en un grado proporcional. Estos datos sugieren que genes relacionados con la radiorresistencia, como son SOCS1 y SOCS3 pueden regular la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 y que esta regulación podría estar relacionada con la participación de células madre tumorales de glioblastoma en la adquisición de la radiorresistencia.

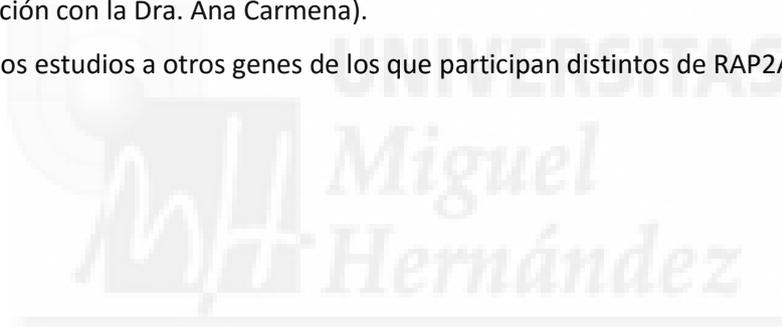
8. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se han podido obtener a partir del análisis de los resultados obtenidos y comentados con anterioridad son:

1. La expresión de MLLT4 en los cultivos primarios es variable, siendo mayor que en cerebro normal en algunos de los cultivos y menor o igual en otros.
2. La expresión de RAP2A es mucho menor en los cultivos primarios analizados que en cerebro normal y la expresión de éste no se ve afectada por el mantenimiento en el tiempo de los cultivos primarios.
3. La expresión de TRIM2 es menor en la mayoría de cultivos primarios analizados que en cerebro normal y la expresión de éste va disminuyendo con los pases aunque al comparar con el nivel de expresión en cerebro normal, esta disminución no es significativa.
4. La expresión génica de RAP2A no se ve afectada por su exposición a radioterapia. Sin embargo en el caso de TRIM2 y MLLT4, la radiación produce un aumento de la expresión génica de éstos. Además, las células que se han irradiado semanalmente y que han sobrevivido, presentan mayor aumento de la expresión génica tanto en el caso de TRIM2 como de MLLT4.
5. Se ha conseguido establecer una relación causa-efecto entre la expresión de SOCS1 y SOCS3 y la resistencia a radioterapia: una menor expresión de estos genes supone una mayor resistencia a radioterapia.
6. Se ha estudiado el nivel de expresión de los genes RAP2A, TRIM2 y MLLT4 en los modelos resistentes a radioterapia generados (clones resistentes y muestras transfectadas con siRNA) obteniendo en los tres casos un aumento de expresión génica proporcional a la bajada de expresión de SOCS1 y SOCS3 en estos modelos, respecto al wild type (HGUE-GB-39).

9. PROYECCIONES FUTURAS

1. Realizar ensayos de transfección de siRNAs dirigidos a modificar la expresión de RAP2A, MLLT4 y TRIM2 y estudiar qué ocurre con la expresión de SOCS1 y SOCS3 y el grado de resistencia a radioterapia.
2. Determinar la expresión de RAP2A, TRIM2 y MLLT4 en los cultivos primarios y en los clones resistentes tras aislar las células madre tumorales mediante nanopartículas magnéticas unidas al anticuerpo contra CD-133.
3. Determinar si la irradiación de los cultivos primarios y/o la inhibición de la expresión de SOCS1 y SOCS3 con siRNAs, conlleva un aumento en los cultivos primarios de células madre tumorales aislables con las nanopartículas CD-133.
4. Generar cultivos de neuroesferas con las células aisladas con las nanopartículas CD-133 y estudiar la participación de estos genes en las divisiones celulares asimétricas (Objetivo en colaboración con la Dra. Ana Carmena).
5. Ampliar los estudios a otros genes de los que participan distintos de RAP2A, TRIM2 y MLLT4.



10. BIBLIOGRAFÍA

- [1]- Instituto nacional del cáncer (www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es)
- [2]- C. Von Neubeck, A. Seidlitz, H. H. Kitzler, B. Beuthien-Baumanni, M. Krause. "Glioblastoma multiforme: emerging treatments and stratification markers beyond new drugs". British Institute of Radiology (2015)
- [3]- Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Science (IMBA), Dr. Bohr-Gasse. "Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology" Nat Rev Mol Cell Biol. 11(12):849-860
- [4]- Tannishtha Reya, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke, Irving L. Weissman. "Stem cells, cancer, and cancer stem cells". Nature, Vol. 414 (2001)
- [5]- Mauricio Martini, Roberto Pallini, Giuseppe Luongo, Tonia Cenci, Corrado Lucantoni, Luigi Maria LaRROCA. "Prognostic relevance of SOCS3 hypermethylation in patients with glioblastoma multiforme". International Journal of Cancer, Vol. 123 (2008)
- [6]- Hong Zhou, Rika Miki, Mervi Eeva, Francesca M. Fike, David Seligson, Lu Yang, Akihiko Yoshimura, Michael A. Teitell, Christina A.M. Jamieson, Nicholas A. Cacalano. "Reciprocal regulation of SOCS1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme". Human Cancer Biology Vol. 13 (2007)
- [7]- Kenji Mandai, Yoshiyuki Rikitake, Yohei Shimono, Yoshimi Takai. "Afadin/AF-6 and Canoe: Roles in Cell Adhesion and Beyond" Progress in Molecular Biology and Translational Science (ELSEVIER) Vol. 116 (2013)
- [8]- A. Letessier, S. Garrido-Urbani, C. Ginestier, G. Fournier, B. Esterni, F. Monville, J. Adélaïde, J. Geneix, L. Xerri, P. Dubreuil, P. Viens, E. Charafe-Jauffret, J. Jacquemier, D. Birnbaum, M. Lopez, M. Chaffanet. "Correlated break at PARK2/FRA6E and loss of AF-6/Afadin protein expression are associated with poor outcome in breast cancer". Oncogene 26, 298-307 (2007)
- [9]- G. Fournier, O. Cabaud, E. Josselin, A. Chaix, J. Adélaïde, D. Isnardon, A. Restouin, R. Castellano, P. Dubreuil, M. Chaffanet, D. Birnbaum, M Lopez. "Loss of AF6/Afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth". Oncogene 30, 3862-3874 (2011)

[10]- Yamamoto T, Mori T, Sawada M, Matsushima H, Ito F, Akiyama M, Kitawaki J. "Loss of AF-6/Afadin induces cell invasion, suppresses the formation of glandular structures and might be a predictive marker of resistance to chemotherapy in endometrial cancer". Yamamoto et al.; licensee BioMed Central (2015)

[11]- Sun TT, Wang Y, Cheng H, Xiao HZ, Xiang JJ, Zhang JT, Yu SB, Martin TA, Ye L, Tsang LL, Jiang WG, Xiaohua J, Chan HC. "Disrupted interaction between CFTR and AF-6/afadin aggravates malignant phenotypes of colon cancer". *Biochimica et biophysica acta (BBA) – Molecular Cell Research*, vol. 1843 (2014)

[12]- Carmena A, Makarova A, Speicher S. "The Rap1-Rgl-Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation". *JCB* vol.195 nº4 553-562 (2011)

[13]- Speicher S, Fischer A, Knoblich J, Carmena A. "The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors". *Current Biology*, vol.18 (2008)

[14] - Kaja Urbańska, Justyna Sokołowska, Maciej Szmids, Paweł Sysa. "Glioblastoma multiforme – an overview". *Contemporary Oncology* 18(5): 307-312 (2014)

[15]- Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. "SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity". *Trends in Immunology*, vol.30 (2009)

[16]- Guanghua Li, Jianbo Xu, Zhao Wang, Yujie Yuan, Yin Li, Shirong Cai, Yulong H. " Low expression of SOCS-1 and SOCS-3 is a poor prognostic indicator for gastric cancer patients". *J. Cancer Res Clin Oncol* (2014) 141:443-452

[17]- Jochen K. Lennerz, Karl Hoffmann, Anna-Maria Buzols, Davor Lessel, Claudia Welke, Nele Rütter, Andreas Viardot, Peter Möller. "Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma". *Oncotarget*, Vol.6, Nº30 (2015)

[18]- Moon-Hong Kim, Moon-Sun Kim, Wonwoo Kim, Mi Ae Kang, Nicholas A. Cacalano, Soon-Beom Kang, Young-Joo Shin, Jae-Hong Jeong. "Suppressor of cytokine signaling (SOCS) genes are silenced by DNA hypermethylation and histone deacetylation and regulate response to radiotherapy in cervical cancer cells". *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0123133 (2015)

[19]- Yukti Choudhury, Felix Chang Tay, Dang Hoang Lam, Edwin Sandanaraj, Carol Tang, Beng-Ti Ang, Shu Wang. "Attenuated adenosine-to-inosine editing of microRNA-376a* promotes invasiveness of glioblastoma cells". *The journal of clinical investigation*, vol. 122, nº 11 (2012)

[20]- I.A Matos Rojas, D. Bertholdo, M. Castillo. "Células madre: implicaciones en el desarrollo de tumores cerebrales" *Radiología*, 54(3):221-230, Vol.54, Nº3 (2012)

[21]- Pragathi Achanta, Neda I Sedora Roman, Alfredo Quiñones-Hinojosa. "Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment". *Anticancer Agents Med Chem*. 10(2):121-130 (2010)

[22]- Sheila K. Singh, Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, Peter B. Dirks. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors". *Cancer Research*, Vol. 63, (2003)

[23]- Kirandeep Sekhon, Nathan Bucay, Shahana Majid, Rajvir Dahiya, Sharanjot Saini. "MicroRNAs and epithelial.mesenchymal transition in prostate cancer" *Oncotarget*, PMID: 27588490 (2016)

