



Facultad de Farmacia y Bioquímica

Autofagia y Maduración Eritropoyética

**Recalde, Gabriela¹ – Moor, Federico¹ – Colombo, María I.^{1,2}
Fader, Claudio M.^{1,2}**

1. *Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Juan Agustín Maza.*

2. *Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo.*

Laboratorio de Investigación básica de la Universidad Juan Agustín Maza.

Mendoza. Argentina. cfader@fcm.uncu.edu.ar

Resumen

La autofagia es un mecanismo por el cual macromoléculas citosólicas e incluso organelas enteras, son secuestradas en estructuras membranosas para su degradación. Ha sido asociada a procesos tan importantes como la diferenciación de los reticulocitos, ya que es necesario el remodelamiento y la eliminación de ciertas estructuras internas. En nuestro laboratorio evaluamos el grado de maduración de las células K562, mediante la medición de los niveles de hemoglobina. Nuestros resultados muestran que frente a distintos inductores de maduración, la estimulación de la maduración con hemina fue la más marcada. Por otro lado determinamos por microscopía confocal la distribución de las proteínas LC3 o Rab11, en células K562 que co-expresaban RFP-LC3 y GFP-Rab11 al ser incubadas en presencia de hemina. Observamos que el tratamiento con hemina generó un agrandamiento de vesículas en los que coexistían ambos marcadores. Para estudiar los posibles cambios moleculares que puede sufrir la proteína LC3 en presencia de un estímulo de maduración, se realizó Western blot de las células K562 GFP-LC3 incubadas en presencia y ausencia de hemina. Como resultado, aquellas células que fueron incubadas en presencia de hemina la banda correspondiente a la proteína LC3 presentaba un peso menor (35Kd) a aquellas que no fueron incubadas en presencia de hemina (42Kd). Esto nos sugiere que frente al estímulo de maduración, la proteína LC3 podría estar siendo clivada para generar un producto de menor peso molecular. Nuestros resultados sugieren que la estimulación de los mecanismos de maduración podría inducir una respuesta autofágica en células K562 que llevaría a una maduración más rápida y eficiente.

Introducción

La autofagia (del griego autos, sí mismo, y phagein, comer) es el proceso de supervivencia que la célula utiliza para aislar y degradar macromoléculas u organelas enteras redundantes o dañadas; las mismas son secuestradas en estructuras membranosas que posteriormente ingresarán a la vía degradativa lisosomal. (Blommaert, et al, 1997; Klionsky, et al, 1999; Shintani, et al, 2004). Este proceso comienza con la prolongación de membranas especializadas del retículo endoplasmático (fagóforo o membrana de aislamiento) que envuelven parte del citoplasma y organelas, y que al entrar en contacto sus extremos y fusionarse, forman una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma. El autofagosoma comienza a madurar por fusión con vesículas provenientes de la vía endocítica (por ejemplo los cuerpos multivesiculares (MVBs)) (Mijaljica, et al, 2006) dando origen al anfisoma o vacuola autofágica intermedia (VAi/d). El anfisoma termina, posteriormente, fusionándose con el lisosoma para degradar su contenido a compuestos más simples, contribuyendo de esta manera a la homeostasis de la célula (Dunn, et al, 1990; Klionsky, et al, 2000; Mortimore, et al, 1996). Diferentes señales extracelulares pueden inducir la activación de la vía autofágica, tales como el ayuno (privación de suero y aminoácidos) o estrés (Mizushima, et al, 2001). La proteína citosólica LC3/Atg8, se ha encontrado asociada a la membrana interna y externa de estructuras autofagosomales, por lo que es un buen marcador de autofagosomas.

En el proceso de endocitosis, los endosomas tardíos pueden sufrir una invaginación hacia el lumen de su membrana endosomal, y por posterior estrangulamiento y corte comienza a acumular en su interior pequeñas vesículas. Estos endosomas son llamados cuerpos

multivesiculares (MVBs) (Johnstone, et al, 1987). Este tipo especial de endosomas puede finalmente fusionarse con el lisosoma degradando las vesículas y proteínas presentes en el MVB (Futter, et al, 2001). Por otro lado, en algunos tipos celulares los MVB son capaces de fusionarse con la membrana plasmática, liberando al espacio extracelular las pequeñas vesículas que contienen en su interior, las cuales por su carácter exocítico se las denomina exosomas (Stoorvogel, et al, 2002; They, et al, 1999).

Tal es el caso de algunas células de la línea eritroide, como los reticulocitos, en las que se ha observado que ciertas proteínas de la membrana plasmática que no son necesarias, como el receptor a transferrina, son internalizadas por endocitosis y luego derivadas a los exosomas (Harding, et al, 1983; Pan, et al, 1983), lo cual ayudaría a la maduración de este tipo celular a glóbulo rojo maduro (Pan, et al, 1985).

La maduración eritropoyética se inicia con la estimulación programada de células madre en médula ósea por factores de crecimiento externos que provocan un equilibrado balance entre el crecimiento celular, la diferenciación y la muerte celular programada. La diferenciación consiste en la disminución del tamaño celular, pérdida del núcleo y de organelas (mitocondrias, ribosomas, etc.) para generar finalmente glóbulos rojos maduros. Las células K562 son una línea celular derivada de pacientes con leucemia mieloide crónica (tienen características eritroides), poseen el cromosoma Philadelphia y pueden ser crecidas en cultivos en suspensión (Johnstone, 1996 3; Lozzio, 1975; Tsiftoglou, 2003). Por otro lado las células K562 han sido muy usadas como modelo de diferenciación, ya que dependiendo de la droga inductora pueden madurar a células de la línea megacariocítica o eritropoyética, siendo hemina uno de los inductores de la eritropoyesis y la maduración eritroide. (Dean, 1983; Tsiftoglou, 1989; Tsiftoglou, 1991). **Material y Método**

Estimulación de la maduración en células K562 y medición de hemoglobina: A fin de estimular la maduración de las células K562, con su consiguiente producción de hemoglobina (Hb), las mismas fueron incubadas en medio de cultivo RPMI con 10% de suero fetal bovino en presencia de distintos inductores de la maduración: 50 μ M de hemina, 10 nM de PMA, 100 μ M de hidroxiurea o 1,4 mM de ácido butírico a 37°C, durante 5 días. Posteriormente las células fueron recolectadas y analizadas. La concentración de Hb producida por la célula se midió analizando la actividad peroxidasa que presenta la Hb, la cual finalmente produce la oxidación de la benzidina, dando una reacción colorimétrica. Esta reacción se realizó sobre un lisado celular, para luego cuantificar por espectrofotometría a 450nm el sobrenadante y directamente sobre un cultivo celular con posterior visualización de la marcación por microscopía óptica.

Detección de LC3 por Western Blot: Se realizó un SDS-PAGE de células K562 sobreexpresando GFP-LC3 de forma estable e incubadas en distintas condiciones. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con un anticuerpo anti-GFP. El revelado de la correspondiente banda se realizó por quimioluminiscencia (Pierce, Tecnolab S.A.).

Detección de anisomas: Las células K562 fueron co-tranfectadas con plásmidos recombinantes para la proteína LC3 fusionada con RFP (red fluorescent protein) y para la proteína Rab11 fusionada con GFP. Posteriormente se incubaron con hemina durante 5 días a 37°C. A continuación, fueron observadas por microscopía de fluorescencia confocal. Obtención y marcación de células de médula ósea (MO) de ratón: Se utilizaron ratones CF1 criados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Cuyo. Éstos fueron sacrificados por dislocación cervical y sometidos a una pequeña cirugía donde se descubrió la región del fémur. Luego se cortó la cabeza del fémur para exponer la MO y con la ayuda de una jeringa de tuberculina se extrajo la MO, la cual fue recolectada en 1ml de buffer PBS. (Protocolo aprobado por CICUAL FCM-UNCuyo).

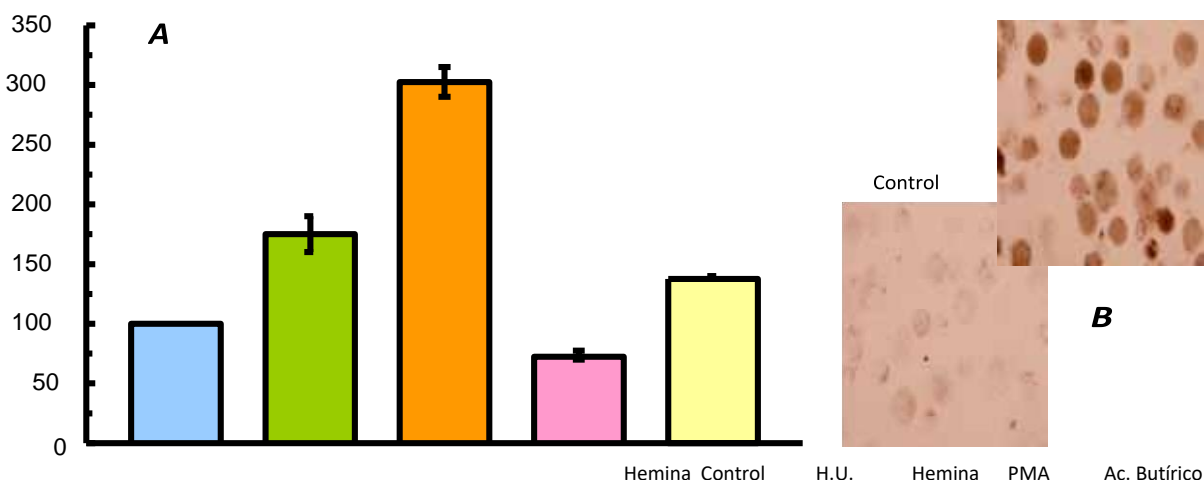
Las células de MO de ratón fueron incubadas con durante 5 días a 37°C en presencia de hemina o rapamicina (inductor farmacológico de la autofagia) durante 2hs. Luego se procedió a la marcación de los autofagolisosomas con monodansilcadaverina (MDC), un compuesto fluorescente que se acumula en vesículas acídicas, específicamente autofagolisosomas, durante 10 minutos a 37°C.

Resultados y discusión

Hemina produce un marcado aumento de los niveles de Hb

La estimulación de la maduración de las células K562, por algunos compuestos, produce un aumento de los niveles de hemoglobina fetal. En nuestro laboratorio evaluamos estos niveles mediante la medición de la autofluorescencia de la hemoglobina o por medición del carácter reductor de la misma frente a compuestos como la benzidina (ver materiales y métodos). Nuestros resultados muestran que frente a distintos inductores de maduración como lo son la hidroxiurea, la hemina, un ester de forbol (PMA) o butirato de sodio, la estimulación de la maduración con hemina fue la más marcada (un aumento del 320%), comparado con el control (células K562 sin estimulación).

Figura 1: Hemina produce un marcado aumento de los niveles de Hb. A: Células K562 incubadas en 100 μ M de Hidroxiurea (H.U.), 50 μ M de Hemina, 10 nM de Ácido forbol ester (PMA) y 1,4 mM de Ácido Butírico a 37 °C durante 5 días. Se midió espectrofotométricamente (450 nm) la producción de Hb por la reacción de la benzidina. B: Visualización de la producción de Hb por reacción colorimétrica de la benzidina.



Hemina produce un aumento del número y tamaño de los anfisomas

Trabajos anteriores de nuestro grupo (Savina, et al, 2005) han demostrado que la proteína Rab11, de la familia de las GTPasas, decora la membrana de una población de MVBs y está involucrada en la formación y liberación de exosomas en células K562 (Savina, et al, 2002). Estos resultados llevaron a identificar a Rab11 como la primera proteína Rab participante del proceso de secreción de exosomas. Determinamos por microscopía confocal la distribución de las proteínas LC3 y Rab11, en células K562 que co-expresaban RFP-LC3 y GFP-Rab11 al ser incubadas en presencia de hemina. Sorprendentemente se observó que en aquellas células que sobreexpresan tanto RFP-LC3 y GFP-Rab11 se generó un agrandamiento de vesículas en los que coexistían ambos marcadores, GFP-Rab11 y RFP-LC3. Estos resultados nos sugieren que la estimulación de la maduración con hemina de las células K562, podría estar activando la vía de formación de los MVBs y la vía autofágica.

Para estudiar los posibles cambios moleculares que puede sufrir la proteína LC3 en presencia de un

estímulo de maduración, se realizó una electroforesis de un lisado de células K562 GFP-LC3, incubadas en presencia y ausencia de hemina, luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con un anticuerpo anti-GFP. Como resultado se obtuvo que en aquellas células que fueron incubadas en presencia de hemina la banda correspondiente a la proteína LC3 presentaba un peso menor (50Kd) a aquellas que no fueron incubadas en presencia de hemina (65Kd). Esto nos sugiere que frente al estímulo de maduración la proteína LC3 podría estar siendo clivada para generar un producto de menor peso molecular. Hemina generó un aumento del tamaño de los autofagosomas en células de médula ósea de ratón Se observó por microscopía confocal que las células presentaban niveles basales de autofagia aumentados en condiciones controles. Además en presencia de rapamicina (inductor farmacológico de la autofagia) hubo un marcado aumento del número y tamaño de los autofagosomas en relación a la situación control, indicando que estas células responden de manera similar a la línea celular K562.

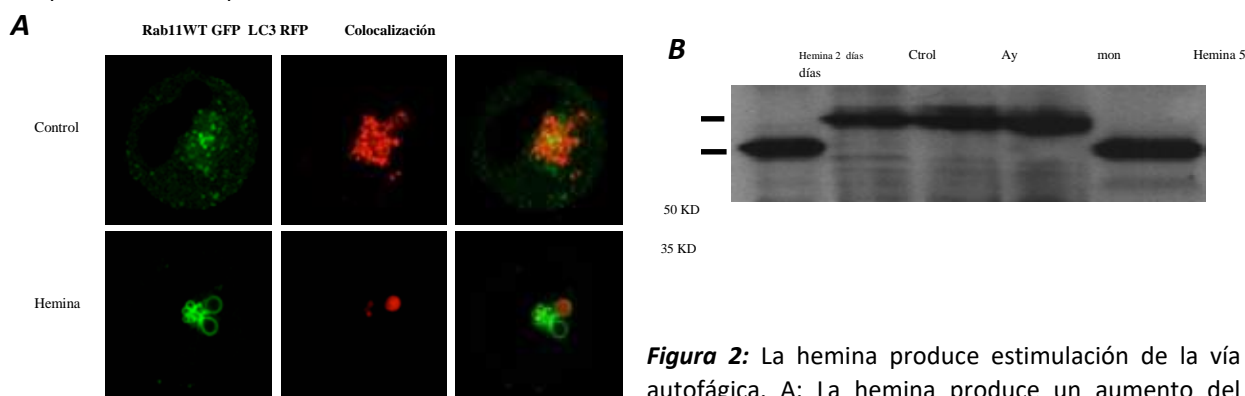


Figura 2: La hemina produce estimulación de la vía autofágica. A: La hemina produce un aumento del número y del tamaño de los anfisomas. . B: Western Blot de células K562 incubadas en distintas condiciones. GFP-LC3 es clivada en células K562 incubadas en presencia de

hemina. Ctlol: control, Ay: ayuno, Mon: monensina (inductor de la autofagia).

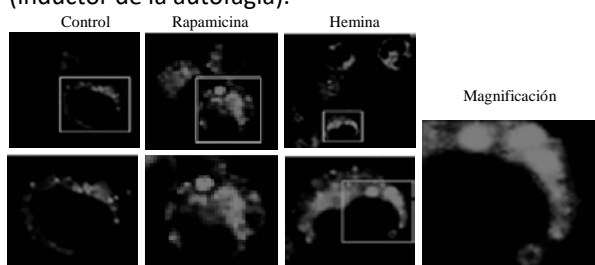


Figura 3: Hemina produce un aumento de los autofagolisosomas en células de MO de ratón. Células de MO de ratón CF1 fueron incubadas en presencia de rapamicina y hemina durante 5 días a 37°C.

Conclusión

La hemina es un buen inductor de la síntesis de Hb en células K562. Ésta genera un aumento de la respuesta autofágica, aumentando tanto el número como el tamaño de las vesículas autofágicas (autofagosomas, anisomas y autofagolisosomas) en células K562 y en MO de ratones CF1. Esto probablemente llevaría a una maduración más rápida y eficiente. El entendimiento y manipulación de la maquinaria molecular que interviene en la maduración eritropoyética y el rol que cumple la autofagia en dicho proceso podría convertirlos en un blanco terapéutico frente enfermedades como la eritroleucemia.

Bibliografía

- Blommaert, E.F.; Krause, U.; Schellens, J.P.; Vreeling-Sindelarova, H. y Meijer, J. 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243: 240-246.
- Dean, A.; Ley, T.J.; Humphries, R.K.; Fordis, M. y Schechter, A. N. 1983. Inducible transcription of five globin genes in K562 human leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80: 5515-5519.
- Dunn, W.A.Jr. 1990. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110: 1935-1945.
- Futter, C.E.; Collinson, L. M.; Backer, J.M. y Hopkins C. R. 2001. Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J. Cell Biol.* 155: 1251-1264.
- Harding, C.; Heuser, J. y Stahl, P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97:329-339.
- Johnstone, R.M. 1996. Cleavage of the transferrin receptor by human granulocytes: differential proteolysis of the exosome-bound TFR. *J. Cell Physiol.* 168:333-345.
- Johnstone, R.M.; Adam, M.; Hammond, J.R.; Orr, L. y Turbide, C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262: 9412-9420.
- Klionsky, D.J. y Emr, S. D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 290: 1717-1721.
- Klionsky, D.J. y Ohsumi Y. 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:1-32.
- Lozzio, C.B. y Lozzio, B. B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45: 321-334.
- Mijaljica, D.; Prescott, M. y Devenish, R.J. 2006. Endoplasmic reticulum and Golgi complex: Contributions to, and turnover by, autophagy. *Traffic.* 7: 1590-1595.
- Mizushima, N.; Yamamoto, A.; Hatano, M.; Kobayashi, Y.; Kabeya, Y.; Suzuki, K.; Tokuhsa, T.; Ohsumi, Y. y Yoshimori, T. 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152: 657-668.
- Mortimore, G.E.; Miotto, G.; Venerando, R y Kadowaki, M. 1996. Autophagy, *Subcell. Biochem.* 27: 93-135.
- Pan, B.T.; Blostein, R. y Johnstone, R. M. 1983. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach, *Biochem. J.* 210:37-47.
- Pan, B.T.; Teng, K.; Wu, C.; Adam, M. y Johnstone, R. M. 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101:942-948.
- Savina, A.; Fader C.M.; Damiani M.T.; Colombo M.I. 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6(2): 131-43
- Savina, A.; Vidal, M. y Colombo, M.I. 2002. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* 115: 2505-2515.
- Shintani T. y Klionsky, D.J. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science*, 306: 990-995.
- Stoorvogel, W.; Kleijmeer, M. J.; Geuze, H. J. y Raposo, G. 2002. The biogenesis and functions of exosomes, *Traffic.* 3: 321-330.
- Thery, C.; Regnault, A.; Garin, J.; Wolfers, J.; Zitvogel, L.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; y Amigorena, S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* 147: 599-610.
- Tsiftoglou A.S.; Pappas I.S. y Vizirianakis I.S. 2003. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther.* 100(3):257-90.
- Tsiftoglou, A.S.; Wong, W.; Robinson, S.H. y Hensold, J. 1989. Hemin increase production of beta-like globin RNA transcripts in human erythroleukemia K-562 cells. *Dev. Genet.* 10:311-317.
- Tsiftoglou, A.S.; Wong, W.; Tsamadou, A. I. y Robinson, S. H. 1991. Cooperative effects of hemin and anthracyclines in promoting terminal erythroid maturation in K562 human erythroleukemia cells. *Exp. Hematol.* 19:928-933.