

SILENCIAMIENTO DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE RIÑÓN HUMANO HEK-293T, MEDIANTE LA TÉCNICA DEL ARN DE INTERFERENCIA

Gene silencing of glucose-6-phosphate dehydrogenase in renal carcinoma cells HEK -293T, by RNA interference

Beatriz GUTIÉRREZ

Juan P. BOLAÑOS

Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG). Universidad de Salamanca – CSIC, Zacarías González 2, 37007 Salamanca (España) Teléfono: (+34) 923 294 907 (extensión 5467)

Correo-e: bgutierrezeugenio@gmail.com

Correo-e: jbolanos@usal.es

RESUMEN: El papel de la ruta de las pentosas fosfato, así como su contribución total en la glucólisis son a día de hoy todavía una incógnita. Tras haberse descubierto recientemente una relación directa entre una sobre-expresión de dicha ruta y la proliferación de diversos tumores malignos, clarificar ambas cuestiones ha cobrado especial importancia en la lucha contra el cáncer. En este estudio se ha realizado el silenciamiento de la enzima que cataliza la primera reacción de dicha ruta, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, por medio del ARN de interferencia y utilizando como línea celular células de carcinoma de riñón humano HEK-293T. La medición de la repercusión del silenciamiento se ha realizado mediante la medida de lactato ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)/24h, utilizándose células con el gen de la luciferasa silenciado como grupo control. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto una notoria disminución de la producción de lactato en las células con la enzima silenciada: $2.73 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/24h en comparación con $7.81 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/24h en el grupo control; lo que

nos lleva a la conclusión de que la ruta de las pentosas fosfato contribuye de manera muy significativa en la producción de piruvato por medio de la glucólisis.

Palabras clave: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; ruta de las pentosas fosfato; glucólisis.

ABSTRACT: The role of pentose-phosphate pathway and its involvement in glycolysis is nowadays still unknown. Recent findings have shown a direct relationship between the over-expression of this pathway and the uncontrolled proliferation of different malignant tumours. Clarifying the importance of this pathway has therefore become an important key in the fight against cancer. This study has silenced the gene of the enzyme which catalyses the first reaction of this pathway, glucose-6-phosphate dehydrogenase, by RNA interference in human renal carcinoma cells HEK-293T. The effect of silencing this gene was controlled by measuring lactate ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)/24h, using cells with the luciferase gene silenced as the control group. The results from this study show an important decrease in the production of lactate in cells with the silenced enzyme: $2,73 \mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/24h compared to $7,81 \mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/24h in the control group. This decrease clearly shows how the pentose-phosphate pathway highly contributes to the production of pyruvate through the glycolysis.

Key words: Pentose-phosphate pathway; glucose-6-phosphate dehydrogenase; glycolysis.

INTRODUCCIÓN

La glucosa es considerada la principal fuente de energía de la célula. La glucosa se oxida mayoritariamente por la vía de la glucólisis generando piruvato, que entra en el ciclo del ácido cítrico produciendo en último término ATP. La glucosa puede también almacenarse en forma de otras moléculas como glucógeno; así como sufrir una oxidación por la vía de la ruta de las pentosas fosfato generando NADPH de carácter reductor y ribosa-5-fosfato, precursor de nucleótidos, coenzimas y ácidos nucleicos.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es la enzima encargada de catalizar la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato y tiene acción reductora al convertir NADP^+ en NADPH.

Debido a la producción de NADPH, esencial en la detoxificación celular, y de ribosa-5-fosfato, precursor esencial de ácidos nucleicos; la ruta de las pentosas

fosfato desarrolla un papel crítico en la regulación del crecimiento en células cancerígenas, habiéndose encontrado relación directa entre altos niveles de la G6PDH y diversos cánceres.

La ruta de las pentosas fosfato se divide en dos fases, la primera es la fase oxidativa que convierte la glucosa-6-fosfato en CO₂, ribulosa-5-fosfato y NADPH. Durante la segunda fase o fase no oxidativa, tras una secuencia de diferentes reacciones, se produce gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato, que pueden «reciclarse» y entrar de nuevo en la glucólisis.

La verdadera contribución de la ruta de las pentosas fosfato en la glucólisis es todavía una incógnita y el objetivo de este trabajo de fin de grado será contribuir a elucidar en la medida de lo posible su importancia.

OBJETIVOS

Construcción de un plásmido capaz de producir el silenciamiento de la enzima Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

El objetivo final será la comparación del piruvato (medido en μmol lactato) obtenido en nuestras células con el obtenido en las células control; con el fin de analizar en futuros estudios la repercusión del silenciamiento de dicha enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica utilizada será el ARN de interferencia.

Este mecanismo se basa en suprimir la expresión de un gen mediante la introducción de un plásmido con una secuencia nucleotídica específica. Este plásmido da lugar a un ARN de doble cadena pequeño que provoca a término la degradación del ARNm que codifica para nuestra proteína y la supresión de la traducción.

La primera fase del trabajo será crear el plásmido capaz de silenciar a la G6PDH, y la segunda fase será realizar la transfección en células HEK 293T para posteriormente medir el lactato y compararlo con las células control.

FASE 1- BIOLOGÍA MOLECULAR

Amplificación y purificación de plásmido pSUPER-Neo-GFP

Se utilizarán bacterias de la cepa *Escherichia coli* DH 5x con el plásmido pSUPER-Neo-GFP. Este plásmido cuenta con la región «Neo», gracias a la cual el plásmido tiene resistencia a la ampicilina; y la región «EGFP», lugar del gen de marcaje que al transfectar las células eucarióticas dará lugar a la expresión

de una proteína verde fluorescente que facilitará comprobar la efectividad de la transfección.

Se añade al medio el antibiótico ampicilina, asegurando de esta manera el crecimiento de las bacterias que hayan incorporado el plásmido y por tanto expresado el gen de resistencia a dicho antibiótico.

Inoculación de las bacterias con un asa de platino al medio 2YT + Ampicilina, incubación durante una noche en agitación a 37°C.

Tras pasadas 24h se realiza la extracción y purificación del ADN mediante el protocolo Midiprep® (kit wizard). A continuación se realiza la medida de la concentración de nuestro plásmido con espectrofotómetro (NanoDrop®): 1.6 µg/mL.

Análisis de restricción

Se realizará un análisis de restricción para confirmar que se ha amplificado el plásmido correcto. Este análisis consistirá en someter al plásmido a digestión con unas enzimas denominadas «enzimas de restricción» que reconocen una secuencia característica de nucleótidos y cortan el ADN en ese punto exacto. Se generarán fragmentos de tamaños característicos que se podrán reconocer gracias a la posterior electroforesis. Si los fragmentos son de los tamaños esperados, se confirmará la amplificación del plásmido correcto.

La elección de las enzimas (*Pst*I y *Pvu*II) ha sido en base a que generan fragmentos de tamaños muy diferentes que permitirán diferenciarlos fácilmente en la posterior electroforesis. .

Tras realizar la digestión (37°C, 1h), se procederá a la electroforesis. Para ello se preparará también una solución-marcador (tampón de carga, H₂O y marcador 1 kB *DNA ladder*) que se introducirá a ambos lados de las muestras de plásmidos.

Preparación del gel de agarosa

Agarosa al 0.8% y TAE (tris-acetato de EDTA), someter a alta temperatura hasta disolución completa de la agarosa.

Añadir MidoriGreen® y colocarlo en la placa de electroforesis junto con los peines que al solidificar la disolución formarán los pocillos en los que se colocarán las muestras. Cargar los pocillos con las muestras y esperar 1h30min a que la electroforesis se realice.

Los resultados del análisis nos confirman la amplificación del plásmido correcto.

Linealización del plásmido

Digestión del plásmido con las enzimas *HindIII* y *BglII*.

- Mezcla de los reactivos:

H₂O libre de nucleasas, ADN, buffer tango, enzima *BglII* y enzima *HindIII*.

- Incubación a 37°C durante 2h.

Para linealizar el plásmido se han elegido enzimas de un mismo polylinker (pequeño segmento de ADN que contiene numerosos lugares de reconocimiento de diferentes enzimas de restricción). Esta vez el objetivo es digerir el plásmido por dos lugares que estén muy próximos, para introducir en ese pequeño fragmento de ADN que estamos cortando los oligos específicos que silenciarán la G6PDH.

Desfosforilación

- Mezcla de reactivos: *Dephosphorylation buffer, alkaline phosphate*, H₂O libre de nucleasas.
- Incubación 15' a 37°C, después incubación 10' a 75°C.

Electroforesis

Agarosa Sigma® 0,8%, TAE. 60 voltios.

Tras la electroforesis, con una espátula recortar el fragmento de gel en el que está nuestro plásmido, recogerlo en un eppendorf y realizar la purificación del ADN.

Purificación del plásmido

Se realiza la purificación del plásmido (cantidad de plásmido obtenida del gel: 702 mg), y a continuación se guarda el ADN purificado a -20°C, no sin antes medir la concentración del plásmido (7.66 µg/µl).

Ligación de los oligos con el plásmido

Anillamiento de los oligos, fosforilación de los oligos y ligamiento en pSUPER.

Transformación de las bacterias

La transformación es el término con el que nos referimos a la entrada del material genético exógeno del plásmido en la bacteria.

- Procedimiento:
 - Baño de hielo seco (CO₂) y etanol de las células competentes
 - Añadir el plásmido, someter a 42°C, 45", hielo 2'
 - Añadir medio LB, agitación 37°C, 225 rpm 1h
 - Siembra con el asa de platino en placas con medio LB + ampicilina. Invertir la placa e incubar toda la noche a 37°C.
- Comprobación de placas

Al comprobar las placas se aprecian colonias grandes (las deseadas) y colonias más pequeñas. Estas últimas puede que sean de otras bacterias no deseadas; esto puede ser debido a que la ampicilina estuviera algo degradada y haya habido bacterias que hayan adaptado su metabolismo y hayan desarrollado cierta resistencia. Se eligen las colonias más grandes y más alejadas de las colonias pequeñas, en total seleccionamos 8 colonias.

- Amplificación

Siembra de las 8 colonias en un eppendorf con medio LB y ampicilina. Incubación toda la noche a 37°C en agitación.

EXTRACCIÓN DEL ADN de las bacterias mediante el procedimiento MidiPrep® y posterior purificación. Se medirá también la concentración de ADN de cada una de mis colonias.

Análisis de restricción

Esta vez el análisis de restricción se realizará con las enzimas de restricción *EcoR1* y *HindIII* y las 8 colonias. Tras realizar la electroforesis, se selecciona la colonia 5 como colonia principal.

Amplificación

Se realizará una amplificación de la colonia 5, a continuación se extraerá el ADN y se purificará.

Se medirá la concentración del plásmido (2272,85 ng/μl) y a continuación se procederá a su congelación.

Análisis de restricción

Se realizará un último análisis de restricción antes de proceder al cultivo de células para confirmar que el plásmido amplificado es el deseado.

Agarosa al 3% y *DNA ladder* de 100 pb (para diferenciar mejor las bandas). Se utilizarán *EcoR1* y *HindIII* como en el anterior análisis de restricción.

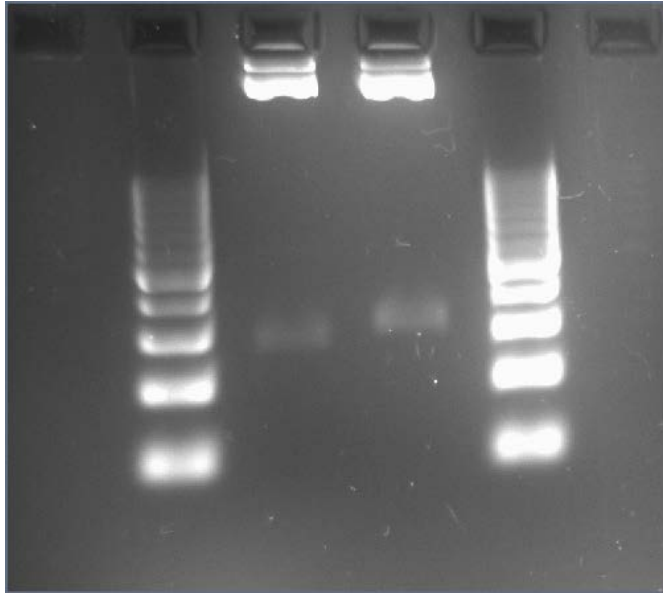


FIGURA 1. En esta imagen se observa claramente la diferencia de bandas respecto al plásmido original y al plásmido que hemos construido. La diferencia de bandas se debe a que nuestro plásmido construido debería haber incorporado nuestros oligos, siendo por tanto de mayor peso molecular y desplazándose más lentamente por el gel de agarosa: visualización de la banda en una zona superior. Esta electroforesis nos confirma la construcción del plásmido, y nos permite continuar hacia la segunda fase del experimento.

FASE 2 - CULTIVOS CELULARES

Las células de carcinoma de riñón humano HEK-293T serán la línea celular utilizada. Estas células cuentan con un rápido crecimiento y fácil mantenimiento, así como con un % muy alto de eficiencia de transfección, razón por la cual se elegirán para el experimento.

Se realizará el cultivo de células 293T humanas durante 3 semanas. El procedimiento a seguir será siempre el mismo, realizándose cada 48 horas y utilizando como reactivos PBS, tripsina, suero fetal y medio DMEM.

Transfección de las células HEK 293T

El término transfección se refiere a la introducción de ácidos nucleicos en células eucarióticas mediante un método que no sea relacionado con virus. El gran problema que se plantea a la hora de realizar una transfección es que se debe introducir ADN, cargado negativamente, en células con una membrana cargada también negativamente. Para ello, se utilizará el PEI (polietilenimina), un polímero sintético catiónico que opsoniza el ADN y permite la entrada en la célula, al interactuar sus cargas positivas con las negativas del ADN.

Se pasarán las células a 6 placas de 20 cm² y se añadirá el reactivo polilisina. De las 6 placas, 3 de ellas se transfectarán con un plásmido que silencia el gen de la luciferasa, y se utilizarán como control; las otras 3 se transfectarán con el plásmido que silencia el gen de la G6PDH.

El gen de la luciferasa es un gen que no se expresa en las células humanas, por lo que su silenciamiento no tendrá repercusiones fisiológicas en nuestras células.

Procedimiento:

- Mezcla de 1.5mL de mezcla ADN + OPTIMEM con 1.5mL de mezcla de PEI + OPTIMEM. Vórtex e incubación 10' a RT.
- Lavado de las células con PBS (2x).
- Añadir 1mL de la mezcla ADN-PEI a cada placa con células.
- Añadir a cada placa 1.5mL de medio OPTIMEM. Agitación suave e incubación en estufa (1h).
- Reemplazar la mezcla de transfección con medio de cultivo (DMEM + 10% SF).

Determinación de L(+)-lactato:

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato a lactato, consumiéndose NADH y formándose NAD⁺. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de aparición del NADH, medido a 340 nm. El tampón (conteniendo hidracina) desplaza la reacción, debido a que la hidracina secuestra el piruvato y por la ley de masas la reacción se favorece.

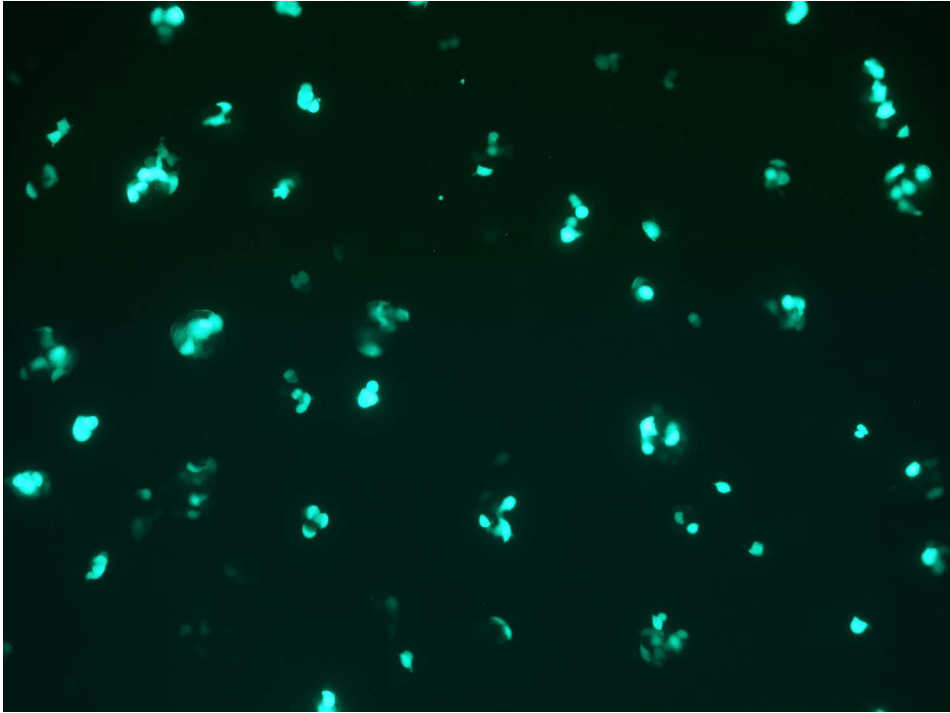


FIGURA 2. Aspecto de las células 293T transfectadas al microscopio de fluorescencia. Se observa que la transfección ha sido correcta y que las células 293T han expresado el plásmido deseado, ya que si no no habrían desarrollado la fluorescencia.

Procedimiento:

Mezcla enzimática: 6 mL tampón (glicina-hidracina- EDTA (0.5M-1M-2mM), pH ajustado hasta 9.5 y agua), 6 mg NAD⁺, 40 μ L LDH.

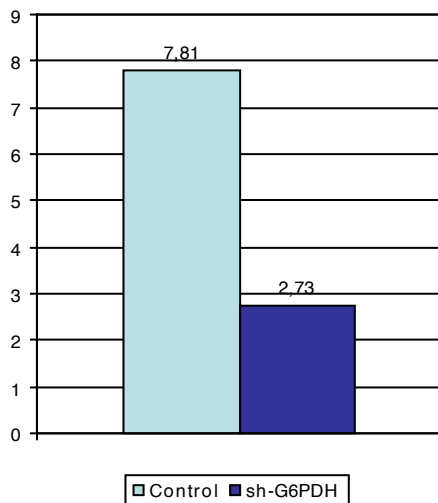
Antes de proceder a la determinación del lactato se realiza una desproteíni- zación con el fin de precipitar las proteínas y que de esta manera no interfieran en la medida:

- Ácido perclórico (HClO₄) al 2%, neutralización con KOH y vórtex.

En cada pocillo se añadirán 150 μ L de mezcla enzimática, 120 μ L de agua y 30 μ L de muestra.

Leer absorbancia a 340 nm a tiempo 0 y después de 40-60'.

RESULTADOS



	Abs.	Abs-B	LAC (µMOL/ML)/24H	LAC (µMOL/MG)/24H		SEM
Controles	2,73	2,05	3,290	10,66		
	2,68	2,00	3,215	10,41		
	2,13	1,45	2,332	7,55	7,81	0,09
	2,19	1,51	2,424	7,85		
	2,18	1,50	2,417	7,83		
	2,21	1,53	2,467	7,99		
sh-G6PDH	0,83	0,15	0,245	0,79		
	0,80	0,12	0,197	0,64		
	1,29	0,61	0,986	3,19	2,73	0,21
	1,25	0,57	0,924	2,99		
	1,14	0,46	0,740	2,40		
	1,13	0,45	0,719	2,33		

FIGURA 3. Absorbancias y producción de lactato en las células controles y en las células en las que se ha producido el silenciamiento de la G6PDH. Se han realizado 2 medidas de cada placa, por lo que de 6 placas se han obtenido 12 mediciones. Se han descartado los valores de la primera placa control y de la primera placa sh-G6PDH; ya que claramente han sufrido algún error de manipulación.

Tras la medida de lactato, se observa de manera muy clara que la producción de lactato de las células transfectadas con el plásmido shG6PDH es notoriamente menor que las células control; lo que es signo de que el plásmido pSuper-neo-GFP ha silenciado efectivamente la enzima G6PDH.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Esta reducción de la producción de lactato en las células con la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa silenciada sugiere que la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y la ruta de las pentosas fosfato contribuyen de manera significativa a la producción de piruvato por medio de la glucólisis.

Esta hipótesis será objeto de posteriores investigaciones que comenzarán próximamente en el Instituto de Biología Funcional y Genómica de Salamanca.

BIBLIOGRAFÍA

- AKINC, A., THOMAS, M., KLIBANOV, A. M. y LANGER, R.: Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med.* 2004; 7(5): 657-663.
- BOUZIER-SORE, A. K. y BOLAÑOS, J. P.: Uncertainties in pentose-phosphate pathway flux assessment underestimate its contribution to neuronal glucose consumption: relevance for neurodegeneration and aging. *Front in Aging Neurosci.* 2015; 19(7):89.
- DALLAS, A. y VLASSOV, A. V.: RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit.* 2006; 12(4): RA67-74.
- JIANG, P., DU, W. y WU, M.: Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell.* 2014; 5(8):592-602.
- KLETZIEN, R. F., HARRIS, P. K. y FOELLM, L. A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a «housekeeping» enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* 1994; 8(2):174-81.
- NELSON, D. y COX, M.: Principios de bioquímica Lehninger. 4ª ed. Barcelona: Omega; 1995.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P., FERNÁNDEZ, E. y BOLAÑOS, J. P.: Underestimation of the pentose-phosphate pathway in intact primary neurons as revealed by metabolic flux analysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33(12):1843-5.
- RUDOLPH, C., LAUSIER, J., NAUNDORF, S., MÜLLER, R. H. y ROSENECKER, J.: In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med.* 2000; 2(4): 269-78.
- SEN, G. L. y BLAU, H. M.: A brief history of RNAi: the silence of the genes. *Faseb J.* 2006; 20(9):1293-9.
- STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., WAMELINK, M. M., CAMPBELL, K., CHEUNG, E. *et al.*: The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2014; 90(3):927-963.
- THOMAS, P. y SMART, T. G.: HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005; 51(3):187-200.

