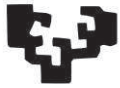
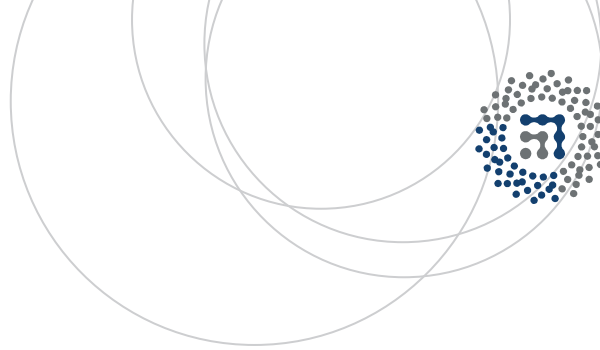


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología molecular

Nukleosidoen gehikuntzaren eragina estres erreplikatiboan eta seneszentzia zelularrean: E2F1^{-/-}/ E2F2^{-/-} makrofagoen kasua

Egilea/Autor:
Svein Achicallende Urcaregui
Zuzendaria/Director/a:
Dr. Ana Maria Zubiaga Elordieta

Table of contents

| | |
|--|----|
| 1. Laburpena | 2 |
| 2. Sarrera | 2 |
| 1.1. Lanaren helburua | 5 |
| 3. Materialak eta metodoak | 5 |
| 3.1. Saguen anduiak eta DKO saguen genotipazioa | 5 |
| 3.2. Zelulen kultiboa eta tratamendua | 6 |
| 3.3. CFSE-Cd11b tindaketa | 7 |
| 3.4. Seneszentziari asoziatuiko β-galaktosidasaren aktibitatea | 8 |
| 3.5. Proteinaren analisisa Western Blot bidez | 9 |
| 4. Emaitzak eta eztabaida | 9 |
| 4.1. WT saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen kultiboaren jarraipena | 9 |
| 4.2. DKO makrofagoek seneszentzia goiztiarra azaltzen dute, DNAREN hipererrepikazioarekin asoziatuik | 11 |
| 4.3. Nukleosido exogenoen adizioak DKO zelulak seneszentzia goiztiarran sartzea sahiesten du, DNA kalteak eragindako erantzunaren aktibazioa ekidinez | 13 |
| 5. Ondorengo analisiak | 15 |
| 6. Esker onak | 16 |
| 7. Erreferentziak | 16 |

1. Laburpena

E2F1 eta E2F2 transkripzio-faktoreek funtzio garrantzitsua dute ziklo zelularren erregulazioan. Sagu *knockout*-etan eginiko saioetan deskribatu da E2F1 eta E2F2 geneen absentsian DNAREN bikoizketa-tasa emendatuta dagoela makrofagoetan, eta ondorioz seneszentzia goiztiarra aktibatuta dagoela zelula hauetan. Seneszentzia horren mekanismoak ez dira ezagutzen, baina uste da DNAREN estres erreplikatioaren eraginez gertatzen dela. Oraintsu argitaratutako lan batzuren arabera, onkogeneek eragindako desegonkortasun genomikoa nukleosido mailaren urritasunagatik sortzen dela proposatu da. Emaitza hauek kontutan harturik, E2F1^{-/-}/E2F2^{-/-} (DKO) makrofagoen kultiboetako nukleosidoak gehitu dizkiet exogenoki, eta zelula hauen proliferazioaren jarraipena egin dut. Nukleosidoekin trataturiko kultiboetan DNAREN kalteen jaitziera eta seneszenziaren saihepena detektatu ditut. Emaitza hauek zera iradokitzen dute, DKO zeluletako seneszentzia goiztiararen arrazoiak DNAREN hiper-erreplikazioak sortutako nukleosidoen urritasuna izan daitekeela.

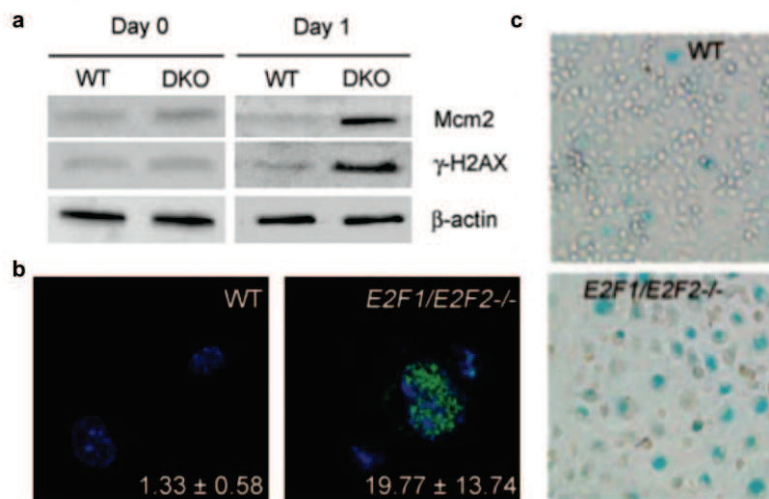
2. Sarrera

Homeostasi kontzeptuak orekan dagoen sistema biologiko baten autoerregulazioa adierazten du, eta organismo baten organo eta ehunen mantentze funtzional eta estrukturalen oinarritzen da, bai zelula zein molekula mailan. Zelula homeostasi hau kolokan jartzen duten hainbat faktore estresagarriren aurrean aurkitzen da, estres erreplikatioa adibidez, eta egoera hauei aurre egiteko beste bidezor batzuk garatu dira eboluzioan zehar. Esaterako, seneszentzia eta apoptosia dira mekanismo hauetariko batzuk, zelulak tumoregenesia deritzon prozesuan sartzea ekiditen dutelarik (Kastan & Bartek *et al.*, 2004; Massagué *et al.*, 2004).

Bidezor horien adibide bat, E2F1 eta E2F2 transkripzio faktoreak aldiberean genetikoki inaktibatuta dituzten saguetan deskribatu da (E2F1^{-/-}/E2F2^{-/-} *double-knockout*, DKO hemendik aurrera). Nahiz eta E2F familiako transkripzio faktoreak, batez ere, ziklo zelularren duten funtzio positiboagatik ezagutuak izan (Lukas *et al.*, 1996; Scheijen *et al.*, 2004), badaude kasu batzuk non proliferazioaren erregulazailerik negatibo moduan lan egiten duten, testuinguru zelularren arabera. E2F1 eta E2F2 transkripzio faktoreen galerak, sagu hauen zelula mota batzuetan DNA-ren hiper-erreplikazioak eragindako fenotipo patologiko berezia eragiten du (Murga *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2008; Pusapati, 2010).

Duela urte batzuk, Ana Zubiagaren ikerketa taldeak, DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoek (bone-marrow-derived macrophages, BMDM) DNA-ren hiper-erreplikazioaren ondorio den proliferazio arina jasaten dutela deskribatu zuten (Iglesias *et. al.*, 2010). Hala, DKO zeluletan, Mcm2 metatzen da, helikasa erreplikatiboaren nukleo katalitikoaren parte den sei proteinetako bat (**1.a. irudia**). Mcm2, E2F faktoreen itu transkripzional zuzen bat da, eta zelularen egoera proliferatiboaren adierzale bat da. Hiper-erreplikazio honen ondorioz, DNA kalteak sortzen dira, eta horrek “DNA kalteak eragindako erantzuna” (DNA damage response, DDR) aktibatzen du. Horren adierazle, DKO zeluletan metatzen den H2AX histona fosforilatua da (γ -H2AX) (**1.a.**, **1.b. irudiak**). γ -H2AX proteinak, ugaztunetan, DNAn kalteak eragindako erantzunaren ondorioz, DNA konpontzeko beharrezko proteinen bilketan lan egiten du.

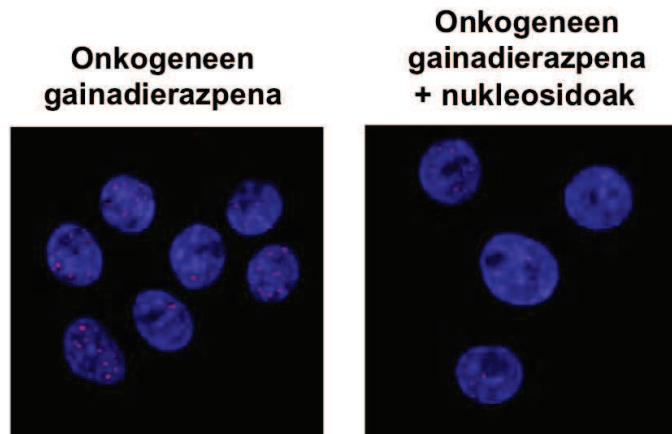
DNA kalteak eragindako desegonkortsun genomikoaren ondorioz, DKO saguen makrofagoak seneszentzia goiztiarrean sartzen dira, ziklo zelularren egoera iraunkor eta aldaezin bat, zeinean zelulek hazkuntza-faktoreekiko sentikortasuna galtzen duten eta bikoizteari uzten dioten (**1.c. irudia**). Beraz, DKO saguen zelula hauetan, E2F1 eta E2F2 transkripzio faktoreak ziklo zelularren erregulatuak negatibo bezala jarduten dute, bien ausentzian zelulek hiper-erreplikazioa jasaten baitute, seneszentzia goiztiarrean sartuz, DNA kalteak eragindako erantzuna aktibatzearen ondorioz.



1. irudia. DKO saguen hezur-muinetik eratorritako makrofagoek jasaten duten hiper-erreplikazioaren ondorioz, DNA kalteak eragindako erantzuan aktibatzen da, γ -H2AX bidez, eta zelulak seneszentzia goiztiarrean sartzen dira. **(a)** DKO zeluletan Mcm2 eta γ -H2AX proteinen adierazpena emendatua dago kultiboaren lehen egunean, zelulen hiper-erreplikazioa eta DNA kalteak eragindako erantzunaren adierazleak direlarik, hurrenez hurren. **(b)** immunofluoreszentzia esperimendu bat, non diren zeluletan γ -H2AX histona fosforilatuen metaketa erakusten

duen. (c) seneszentziari-asoziatu-riko-b-galaktosidasa aktibitatea detektatzeko brutu zen b-gal tinzioa. E2F1/E2F2^{-/-} diren zelula asko urdinez tindatuak daude, seneszentzeak direla adieraziz. (Iglesias *et al.*, 2010, eraldatua).

DKO saguen makrofagoak seneszentzia goiztiarrean sartzea eragiten duen mekanismoa zein den ez jakin arren, badaude aurkikuntza batzuk hipotesi bat jorraztera garamatzatenak. Bester



2. irudia. Onkogeneen gainadierazpenak eragindako γ -H2AX-aren aktibazioa (fluoreszentzia gorria), nukleosido exogenoak gehituz konpondu daiteke (Bester *et al.*, 2011, eraldatua).

biosintesarako beharrezkoak diren geneak ez dira hein berean aktibatzen. Ondorioz, onkogeneen gainadierazpena duten zeluletan nukleosidoen maila jaisten da, eta aldi berean DNA kalteak eragindako erantzuna γ -H2AX bidez aktibatzen da. Erantzun hau, zelulei nukleosido exogenoak gehituz ekidin daiteke (**2. irudia**).

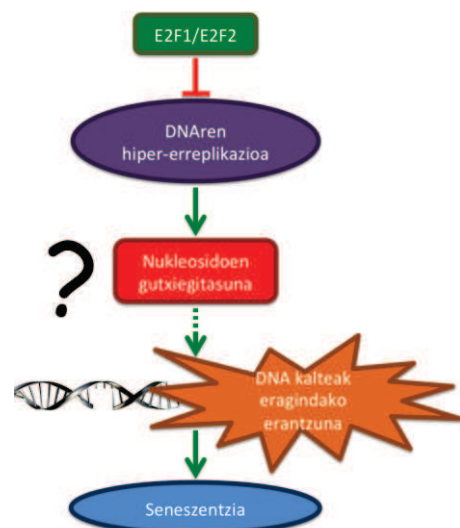
DKO saguen kasuari dagokionez, Iglesias eta bere kideek zera deskribatu dute (Iglesias *et al.*, 2004): nukleosidoen biosintesian jarduten duten geneen adierazpen maila berdintsua da DKO eta WT makrofagoetan. Aldiz, DNAREN bikoizketan jarduten diren geneen adierazpena emendatuta dago DKO zeluletan WT zelulekin alderatuz.

Aurkipeen hauek eta literaturan deskribatutakoak kontutan hartuz, ondoko hipotesia proposatu dut:

DKO saguetako zeluletan gertatzen den DNAREN hiper-errepikazioak nukleosidoen erreserbaren agortzea

lekarke. Honen ondorioz, DNAREN bikoizketa moteldu eta estres erreplikatiboa sortuko

eta bere kideek egindako ikerkuntzek aditzera eman dutenez, onkogeneek eragindako desegonkortasun genomikoa nukleosidoen urritasunaren ondorioa da (Bester *et al.*, 2011). Autore hauek aztertutako sisteman, onkogeneen gainadierazpenak DNAREN hiper-errepikazioa dakar, eta DNAREN bikoizketarako beharrezkoak diren geneen adierazpena emendatzen den bitartean, nukleosidoen



3. irudia. Nukleosidoen gutxiegitasunaren ondorioz, DNA kalteak eragindako erantzunaren ondorioz seneszentzian sartzen dira DKO zelulak (hipotesiaren eskema).

litzateke, γ -H2AX metatuz, eta makrofagoak seneszentzia goiztiarrerantz bultzatuz (**3. irudia**). Exogenoki hornituriko nukleosidoek DNAREN kaltea eragotziko luke eta seneszentzia sahiestu.

2.1 Lanaren helburua

Aurrekari guztiak kontuan hartuz, lan honetan WT eta DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoak nukleosido exogenoen presentzian hasiko dira, ondorengo gauzak gertatzen badira ikusteko asmoz:

- Nukleosido exogenoen presentziak DKO saguen BMDM-etan ematen den DNA kalteak eragindako erantzuna murriztuko du, γ -H2AX maila jaitsiz.
- Nukleosido exogenoen presentziak DKO saguen BMDM-etan ematen den seneszentzia goiztiarra sahiestuko du.

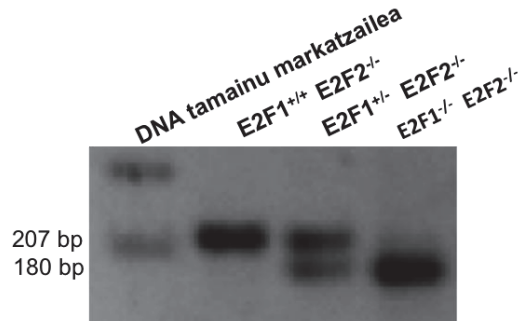
3. Materialak eta metodoak

3.1. Saguen anduiak eta DKO saguen genotipazioa

E2F1^{-/-} eta E2F2^{-/-} saguak 129/Sv x C57BL/6 andui mixtokoak dira, eta errekonbinazio homologoz sortuak izan ziren Michael Greenberg-en laborategian. Gure laborategiko kideen eskutik deskribatuak izan dira (Field *et al.*, 1996; Murga *et al.*, 2001). E2F1/E2F2^{-/-} edo DKO saguak Ana Zubiagaren laborategian sortuak izan dira, E2F2 *knockout* (E2F2^{-/-}) diren saguak, eta E2F1 mutaziorako heterozigoto (E2F1^{+/-}) diren saguak gurutzatuz. Gurutzamendu hau eten gabe mantendu behar da DKO saguak lortzeko, DKO saguak antzuak baitira (Li *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2010).

DKO saguak E2F1 genearekiko *knockout*-ak direla jakiteko, sagu hauen genotipazioa burutu behar da. Honetarako, laborategiko teknikariak lortutako saguen buztanaren biopsia batetik hasita, fenolaren eta kloroformoaren bidezko DNAREN erauzketak egin ziren, literaturan azaldutako protokolo bat erabiliz (Laird *et al.*, 1991). Ondoren, PCR semikuantitatibo bat burutu zen, hiru hasle erabiliz: 5'-GAGGGTTAGGGCTGATGGAT-3', 5'-GAGTCCTCCGAAAGCAGTTG-3' eta 5'-CCAGACGCCACTTGTGTAGC-3'. Lehen hasle biak, E2F1 genearen hirugarren exoian lotzen dira, eta hirugarrena errekonbinazio homologoz txertatutako neomizinen sekuentzia hibridoari lotzen zaio, E2F1 *knockout* saga sortzeko erabilitako bektorea. Alelo basatia anplifikatzean 207 base-paretako zatia lortzen den bitartean, mutatuaren kasuan, 180 base-paretakoa lortzen da (**4. irudia**). Honek ikusteko, %3 agarosa eta %0,01 etidio bromuroa zuen gel batean migratu ziren. Etidio bromuroa DNAREN

helize bikoitzean sartzeko gaitasuna duen eta fluoreszentea den kolorante bat da. Argi ultramoreak kitzikatzean argi laranja emititzen du, anplifikatutako DNA zatiak ikustea baimenduz.



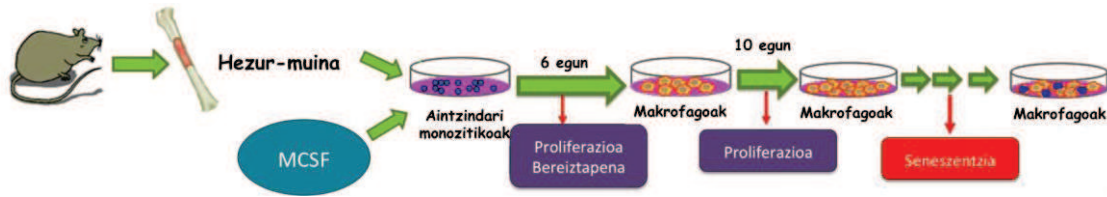
4. irudia. E2F1 aleoen detektziorako PCRa. E2F1^{+/+}/E2F2^{-/-} diren saguak euren artean gurutzatzean DKO (E2F1^{-/-}/E2F2^{-/-}) direnak detektatzeko erabiltzen den PCR-a migratzean agertu daitezkeen banda ezberdinak. Sagu guztiak E2F2 lokuserako homozigoto knockout dira (E2F2^{-/-}), eta ez da horren PCR-rik egiten. Alelo basatia anplifikatzean 207 base pare dituen banda lortzen den biartean, alelo mutatua bada, 180 base paretako banda lortzen da.

3.2. Zelulen kultiboa eta tratamendua

Kultibo zelularra inkubatzaile heze batean burutu zen, %5 CO₂-rekin eta 37°C-tara. Kultibo medioaren osagaiak honako hauek izan ziren: DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium, Gibco-BRL), %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco-RRL) eta 1/100 penizilina/estreptomizina. Kultiboa burutzeko, laborategiko teknikariak hilabete bat eta erdi inguru zuten WT eta DKO saguen femurrak atera zituen. Hezurmuineko zelulak lortzeko, xiringa baten bidez kultibo medioa saguen femurren muintetik sartu zen, bertan zeuden zelulak askatu zirelarik. Lortutako zelulak PBS (phosphate-buffered saline) bidez garbitu ondoren, eritrozitoak lisi hipotonikoaren bidez kendu ziren. Hau burutzeko, zelulak 5 minutuz izotzetan mantendu ziren eritrozitoen lisi tanpoian (NH₄Cl 155 mM; KHCO 10 mM; EDTA 0,1 mM, pH 8). Gero zelulak berriro PBS-tan garbitu ziren eta kultibo medioan bersuspenditu. Kultiboan jarri baino lehen, zelulen kontaketa Neubauer hemozitometroaren bidez burutu zen Trypan Urdina (Invitrogen), gehitu ondoren. Koloregai honek zelula hilak eta biziak desberdintzea baimentzen du.

Hezurmunetik eratorritako makrofagoak (BMDM) *in vitro* lortzeko MCSF (macrophage colony-stimulating factor) izeneko hazkuntz faktorea gehitu behar da kultibora. Hazkuntz faktore hori L929 lerro zelularrak ekoiztutako zitokina bat da, eta beraiek hazitako mediora jariatzen dute. Aitzitik, hezurmuineko zelulei L929 kultiboetatik eratorritako medioa (%20) gehitzen zaie.

Horrela, aintzindari monozitikoaren proliferazioa eta makrofagoaren bereiztapena 6 egunetan zehar bultzatzen da (Liu *et al.*, 1999) (**5. irudia**).



5. irudia. Saguen hezurmuinetik eratorritako aintzindari monozitikoak MCSF-aren presentzian izaten duten proliferazio eta bereiztapenaren eskema (Iglesias-en tesitik eraldatua, 2005).

Aintzindari monozitikoak makrofagoa bereiztatzen doazen heinean, beraien mintzean Cd11b integrina gainadierazten dute (Brackman *et al.*, 1995). Integrina hau aintzindari monozitikoek jasaten duten bereiztapena jarraitzeko erabilgarria da. Behin kultiboan makrofagoak daudela, WT saguetatik eratorritako zelulek beste hamar eguneko proliferatzen jarraitzeko gaitasuna dute, eta hauen bukaeran, zelulak seneszentzian sartzen dira (**5. irudia**). Kultiboko zelulen proliferazioa eta bereiztapena kamara batera akoplatua dagoen fase-contrastedun mikroskopio bat (Leica microsystems DM IL LED) erabiliz aztertu zen.

Erabilitako nukleosido tratamenduari dagokionez, N1X nukleosido kontzentrazioa erabili da, nukleosidoen 100X hasierako kontzentrazioetik hartua (EmbryoMax). 100X hasierako disoluzio honetan nukleosido bakoitzaren kontzentrazioak honako hauek dira: zitidina 0,73 g/L; guanosina 0,85 g/L; uridina 0,73 g/L; adenosina 0,80 g/L; eta timidina 0,24 g/L. Nukleosido exogenorik gabe hasitako kultiboetan, DMSO bolumen bera gehitzen zen, DMSO disolbatzaileak efektu toxikorik ez zuela ziurtatzeko.

3.3. CFSE-CD11b tindaketa

WT saguen hezur-muinetik eratorritako makrofagoen proliferazioa eta bereiztapenaren jarraipena egiteko helburuz, fluxu zitometria analisi bat egitea erabaki nuen, CellTrade™ CFSE Proliferation Kit-a (Life Technologies) erabiliz. Karboxifluoreszeina diazetato sukzinimidil ester izeneko zunda, CFSE bezala ezagutua, zeluletara difusio pasiboan sartzen da, eta kolore zein fluoreszentsia gabea da, zelula barruko aminek azetato taldeak itsasten dizkieten arte, konjugatu fluoreszenteak sortuz. Konplexu hauek zelula barruan geratzen dira mitosi bakoitzean, eta zelula alabei pasatzen zaie, zatiketa bakoitzean CFSE-aren fluoreszentsia erdira jaisten delarik. Propietate hauek direla eta, CFSE tindaketa zelulen proliferazioa aztertzeko metodo egokia da.

CFSE tindaketa burutzeko, $1,5 \times 10^6$ zelula tindatu ziren femurretik atera eta batera, lehenago deskribatu bezala (Infante *et al.*, 2008), eta fabrikatzaileak ezarritako protokoloa jarraituz. PBSaz garbitu ondoren kultibo medioa (MCSF barne) gehitu zitzairen, eta, 12 putzuko plaketan ezarri ziren zelulak. Kultiboak 5 egun iraun zuen, eta egun bakoitzean $2,5 \times 10^5$ zelula hartu ziren, CFSEren analisia burutzeko.

Hezurmuinetik eratorritako kultiboa heterogenoa denez, eta makrofagoak soilik detektatzeko, zelula hauek bereziki adierazten duten mintzeko hartzailea den Cd11b aztertu zen CFSEekin batera. Horretarako, fikoeritrinarekin konjugatutako anti-Cd11b antigorputza erabili zen (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Fluoreszentzia FACSCalibur (Becton & Dickinson) fluxuzko zitometria erabiliz detektatua eta ModFit 3.0 software-a erabiliz analizatua izan zen. Egun bakoitzeko kultiboetan, Cd11b positibo zirenen proliferazio indizea eta belaunaldi bakoitzeko zelula kopurua kalkulatu nuen.

3.4. Seneszentziari asoziatuiko β -galaktosidasaren aktibitatea

Seneszentzia zelularra detektatzeko, zelula seneszenteetan bereziki adierazten den β -galaktosidasa tindatu zen, lehenago deskribatu bezala (Dimri *et al.*, 1995). Nahiz eta seneszentziari asoziatuiko β -galaktosidasaren jatorria eta funtzioa ez jakin, badaude hipotesi batzuk β -galaktosidasa aktibitatea eta lisosomen aktibitate emendatua lotzen dutenak.

Tindaketa burutzeko, WT eta DKO saguen hezur-muineko aintzindari monozitikoak 6 putzutako plaketan kultibatu ziren MCSFa gehiturik. Seigarren egunaren inguruan, fenotipo seneszentea DKO saguetan agertzean, zelulak PBSarekin garbitu, eta %2 formaldehido/%0,2 glutaraldehido-tan 3-5 minutuz fixatu ziren. Berrito garbitu ostean, zelula seneszenteak tindatzeko, zelulak 37°C-tan inkubatu ziren soluzio tindatzailearekin: 5-bromo-4-cloro-3-idozil P3-D-galaktosidasa (X-gal) 1 mg/mL zuen hurrengo tanpoian: 40 mM azido zitriko/sodio fosfato, pH 6; 0,5 mM potasio ferrozianido; 5 mM potasio ferrizianido; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂. β -galaktosidasa adierazten duten zelula seneszenteetan prezipitatu urdin bat sortzen da, inkubatu eta 2-4 ordutara. Tintzio maximoa 7-10 ordu inguruan ematen da, eta argazkiak kamara bati akoplatuta zegoen fase-contrastedun mikroskopioarekin (Leica microsystems DM IL LED) lortu ziren.

3.5. Proteinaren analisa Western Blot bidez

Proteinaren adierazpena aztertzeko, genotipo eta tratamendu bakoitzeko 15×10^6 zelula erabili genituen. Zeluletako proteina erauzi zen ondoko tanpoia erabiliz: 500 mM NaPO_4H pH 7,2; 500 mM EDTA; 500 mM EGTA; 500 mM NaCl; 500 mM NP-40; 100 mM B-Glucofosfato; 100 mM PMSF; 200 mM Na_3VO_4 eta proteasen *cocktail* eta fosfatosen inhibitzaileak (Roche). Erauzitako laginen proteina kontzentrazioa kalkulatzeko DC Protein Assay (Bio-Rad) erabili zen, BSA-z egindako kurba estandar batez baliatuz. Lagin bakoitzeko 20 μg proteina kargatu ziren sodio dodezil sulfato-poliakrilamidazko gelearen kale bakoitzean, akrilamidaren kontzentrazioa %10ekoa (Mcm2 ikuskatzeko) edo %15ekoa (γ -H2AX ikuskatzeko) zelarik. Gero 100 V-tako potentzian migratu ziren, eta nitrozelulosazko mintz batera transferitu, baita 100 V-tara (Bio-Rad). Transferentzia ondo eman zela ziurtatzeko, mintzak Ponceauz tindatu ziren, eta gero TTBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 5% tween 20) erabiliz garbitu. Antigorputza gehitu baino lehen %5 esnea zuen TTBS-tan blokeatu ziren mintzak ordu betez giro tenperaturan. Ondoren, mintzak antigorputz primarioarekin inkubatu ziren gaba osoan zehar. Erabilitako antigorputzak ondoko hauek izan ziren: goat anti-Mcm2 (1:4000 diluitua; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti- γ -H2AX (139. Serinan fosforilatua; 1:1000 diluitua; Upstate, Millipore, Billerica, Ma, USA) eta β -actina karga-kontrol bezala (1:3000 diluitua; Sigma). Antigorputzak 10 mL TTBS-tan inkubatu ziren mintzarekin, %5 esnea (anti-Mcm2 eta anti- β -aktina) edo %3 BSA (anti- γ -H2AX) gehitu ondoren. Inmunokonplexuak ikusteko, peroxidarekin konjugatutako anti-goat, anti-rabbit edo anti-mouse IgG antigorputzak (Santa Cruz) erabili ziren, eta ECL (Santa Cruz) gehituz kimioluminizentzia bidez detektatu ziren proteinak ChemiDoc kamara batean (BioRad).

4. Emaitzak eta Eztabaida

4.1. WT saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen kultiboaren jarraipena.

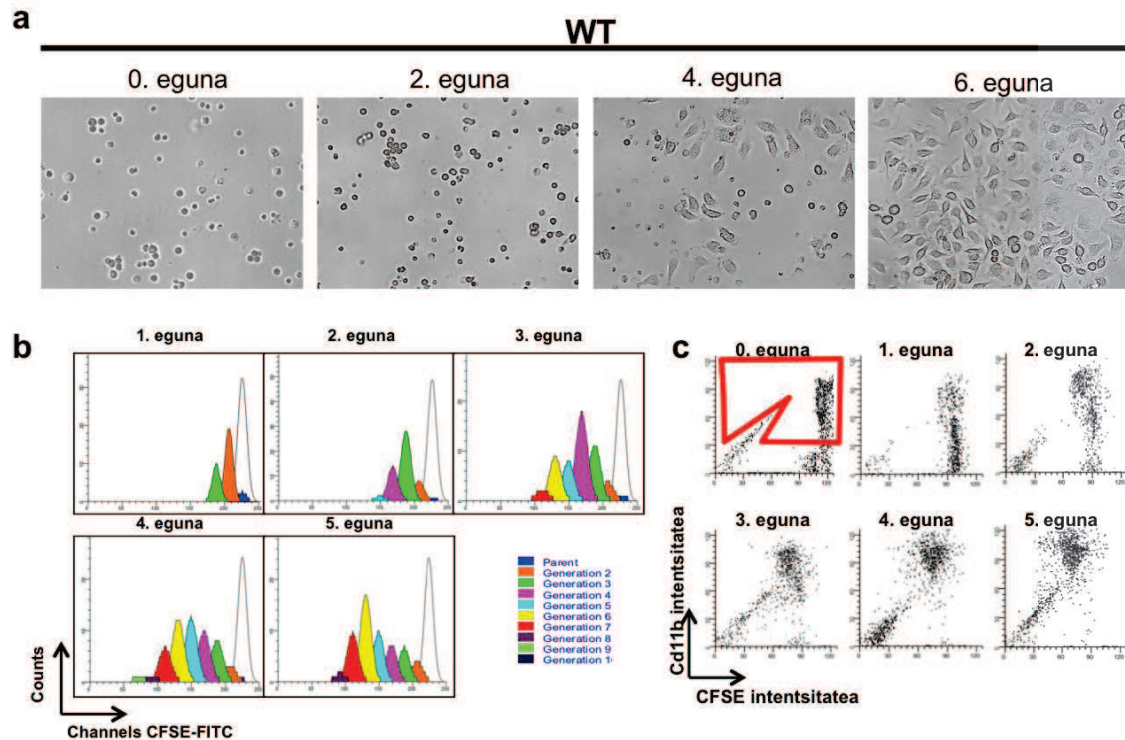
Nukleosidoen tratamendua egin baino lehen, WT saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen (BMDM) kultiboa burutu nuen, nire eskuetan lehenago deskribatutako proliferazio eta bereiztapena gertatzen zela ziurtatzeko (Liu *et al.*, 1999). Helburu honetarako, metodoen atalean azaldutako protokoloa jarraituz WT saguen aintzindari monozitikoek kultiboa burutu nuen.

Zelula hauen proliferazioa eta makrofagorako bereiztapena sei egunetan zehar jarraitu zen fase-kontrastedun mikroskopio baten bidez (**6. irudia**). MCSF hazkuntz faktorea duen medioan aintzindari monozitikoek beraien morfologian aldaketa nabarmenak jasaten dituzte.

Plakeatutako egun berean ateratako argazkietan ikusten denez, aintzindari monozitikoek forma zirkularra daukate eta medioan flotatzen daude. Bigarren egunean, dagoeneko zelula batzuk plakaren hondora itsasten hasiak daude, makrofago izaterako bidean, eta beraien mintzetan lamelipodio izeneko luzapenak agertzen hasten dira. Seigarren egunean, monozitoen aintzindari ia guztiak daude makrofagora bereiztatuak, eta gainontzeko zelula-motak apoptosi bidean daude dagoeneko. WT saguetako makrofagoek egoera honetan beste hamar egunez proliferatzen jarraitzeko gaitasuna dute.

Aintzindari monozitikoak makrofagora bereiztatzeko doazela ziurtatzeko fluxu zitometria teknika erabili zen, CFSE zunda fluoreszentea erabiliz. Zelula zatitzen den bakoitzean, CFSE kontzentrazioa gutxi gorabehera erdira jaisten da, eta zelulen proliferazioa aztertzeko egokia da, belaunaldi bakoitzeko zelula kopurua eta proliferazio indizea (PI) kalkulatzeko baimentzen baitu. Honekin batera, anti-Cd11b-fikoeritrinaren bidezko gainazaleko tindaketa ere burutu zen, makrofagora diferentziatu diren zelulak detektatzeko, Cd11b makrofagoen mintzean adierazten den integrina bat baita (Brackman *et al.*, 1995). BMDM kultiboaren bost egunetan zeharreko jarraipena egin zen (**1.b.**, **1.c. irudiak**).

Proliferazioaren analisisa soilik Cd11b-rako positibo ziren zelulak kontuan hartuz burutu zen (**gorriz markatutako karratua 6.c. irudian**), gainontzekoak ez baitira makrofagoak. Cd11b mintzean zuten zelulen kopurua denboran zehar emendatzen doan heinean, zelulek duten CFSE fluoreszentiaren intentsitatea jaitsiz doa. WT saguak hirugarren egunetik aurrera beraien proliferazio indizea bizkor handitzen dute, hirugarren egunean 3,85 izatetik, bostgarren egunen ia hirukoitza izatera pasatzen baita (PI=9,6). Eraitza hauek mikroskopioarekin lortutakoarekin bat datoz, MCSF-aren presentzian hasitako aintzindari monozitikoak proliferatzen hasten direla egiaztatuz, makrofagora bereiztatzeko doazen heinean.



6. irudia. MCSF-aren presentzian hasitako WT saguen hezur-muinetik eratorritako aintzindari monozitikoaren proliferazioa eta makrofagorako bereiztapena. **(a)** WT saguen hezur-muinetik eratorritako aintzindari monozitikoaren kultiboaren 0, 2, 4 eta 6 egunetako jarraipena, kontraste-fasezko mikroskopia erabiliz. **(b) (c)** CFSE-z tindatutako WT saguen hezur-muinetik eratorritako makrofagoen proliferazioa eta bereiztapenaren bost egunetan zeharreko jarraipena MCSF-aren presentzian, eta gero anti-Cd11b-z tindatua. Cd11b-postitibo diren zelulen populazioa kuadro gorriaren barruan daudenak dira. Kolore gabeko populazioa (parentala) belaunaldi handiena da, eta zatitzen den bakoitzean CFSE intentsitatea jaitsiz doa.

4.2. DKO makrofagoek seneszentzia goiztiarra azaltzen dute, DNAREN hipererrepikazioarekin asoziatuak.

WT saguen hezurmuinetik eratorritako zelulak MCSF-aren presentzian makrofagoa bereiztatu direla frogatu ostean, DKO saguetan deskribatutako fenotipo patologikoa aztertu nahi izan nuen. Honetarako, WT eta DKO saguen kultibo paraleloa burutu nuen, MCSF-aren presentzian, analisi molekular eta biokimikoa burutuz.

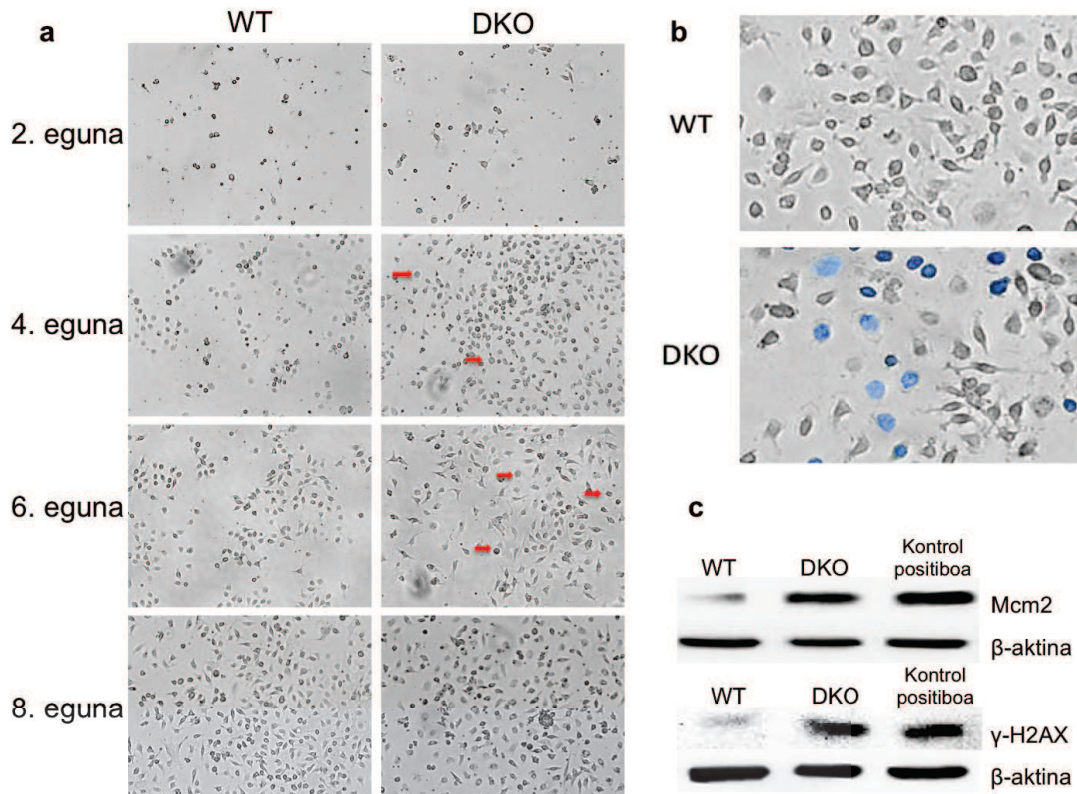
Aurretiko ikerketek deskribatu dutenez, DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoek hipererrepikazioa erakusten dute kultiboaren lehen egunetan, eta ondoren, seneszentzia goiztiar baten sartzen dira, DNA kalteak eragindako erantzunaren ondorioz (Iglesias *et al.*, 2010). Fase-contrastedun mikroskopia bat erabiliz bi kultiboaren argazkiak atera ziren begi bistaz ikusten diren ezberdintasun fenotipikoak aztertzeko (**5.a irudia**). Kultiboko bigarren egunean, baina batez ere, laugarren egunean, ikus daitezke DKO saguen aintzindari monozitikoak WT

saguenak baino askoz azkarrago proliferatzen dutela, plaketan zelula gehiago baitaude. Zelula gehiago izatearen arrazoa Iglesias eta bere kideek azaldutako DNAREN hiper-erreplikazioa da. Azkarrago proliferatzeaz gain, bereiztapena ere azkarrago ematen da DKO saguen aintzindari monozitokoen kasuan, laugarren eguneko argazkietan ikus daitekeenez, zelula fusiforme gehiago baitaude. Seigarren egunean dagoeneko, eta batez ere, zortzigarren egunean, DKO saguetan zelula seneszentek aurki ditzakegu, hauek nukleo borobil handia eta zitoplasma zirkular zapala duten zelulak direlarik (**7.a. irudian gezi gorritz markatuak**). WT saguetan, ordea, nahiz eta zelula seneszente batzuk aurki ditzakegun, hauen proportzioa askoz baxuagoa da.

Jarraian, azken baieztapen hau frogatzeko, hau da, DKO saguen zeluletan seneszentzia hori detektatzeko, seneszentziari-asoziaturiko- β -galaktosidasa tinzioa burutu zen (**7.b. irudia**). Argazkietan ikus daitekeena egiaztatuz WT saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoak tindatu gabe geratzen diren bitartean, DKO zelulak urdinez tindatzen dira, β -galaktosidasa aktibitatea dutela frogatuz, hau da, zelula seneszentek direla.

Azkenik, DKO saguen aintzindari monozitikoetan gertatzen den DNAREN hiper-erreplikazioa proteina mailan detektatzeko, kultiboa hasi eta 24 orduz proteina erausi zen. Hemen, zelularen egoera proliferatiboa aztertzeko, MCM2 proteinaren adierazpena neurtu zen western blot bidez (**7.c. irudia**), proteina hau zelularen egoera proliferatiboaren adierazle bat baita. Argazkietan ikusten zena berretsiz, DKO saguen zeluletan MCM2-aren adierazpena WT saguetan baino askoz handiagoa da, E2F1 eta E2F2 transkripzio faktoreen ausentziak zelulak hiper-errepikatzen daramatela ondorioztatuz.

Kultibo hauetan, γ -H2AX histona fosforilatuen maila ere neurtu zen, bi genotipoetako zeluletan. H2AX, DNA-n kalteren bat dagoenean 139. serinan fosforilatzen den histona bat da, γ -H2AX izena hartuz. Histona fosforilatu hau DNA kalteak eragindako erantzunaren adierazle bezala erabili daiteke. Kultiboa hasi eta 24 orduz, DKO saguetan histona fosforilatu honen adierazpena WT saguen zeluletan baino askoz handiagoa dela baieztatu nuen (**7.c. irudia**). Eraitza guzti hauek kontuan hartuz, lehenago Iglesias eta bere kideek deskribatu bezala, DKO saguen hezurmuinetik eratorritako aintzindari monozitikoek, MCSF-aren presentzian makrofagoa proliferatzen eta bereiztatzen doazen heinean izaten duten hiper-erreplikazioaren ondorioz, zelulak seneszentzia goiztiarrean sartzen dira. Honi asoziaturik, DNA kalteak eragindako erantzuna aktibatzen da.



7. irudia. DKO aintzindari monozitikoek MCSF-aren presentzian jasaten duten hiper-erreplikazioaren ondorioz, seneszentzia goiztiarrean sartzen dira, DNA kalteak eragindako erantzuna aktibatzen baita. **(a)** WT eta DKO saguen BMDM kultiboaren jarraipena, 2, 4, 6 eta 8 egunetan ateratako argazkien bidez. DKO zelula seneszentzeak gezi gorri markatuak daude. **(b)** MCSF-aren presentzian hasitako WT eta DKO saguen zeluletan seneszentziari-asoziaturiko-β-galaktosidaza tintziora burutu zen, zelula seneszentzeak detektatzeko. **(c)** Mcm2 eta γ-H2AX proteinen adierazpenaren neurketa western blot bidez. Proteina zelula kultiboa hasi eta 24 ordutara erauzi zen, eta kontrol endogeno bezala β-aktina erabili zen. Kontrol positibo bezala HEK293 zeluletatik erauzitako proteina erabili zen bi kasuetan.

4.3. Nukleosido exogenoen adizioak DKO zelulak seneszentzia goiztiarrean sartzea sahiesten du, DNA kalteak eragindako erantzunaren aktibazioa ekidinez.

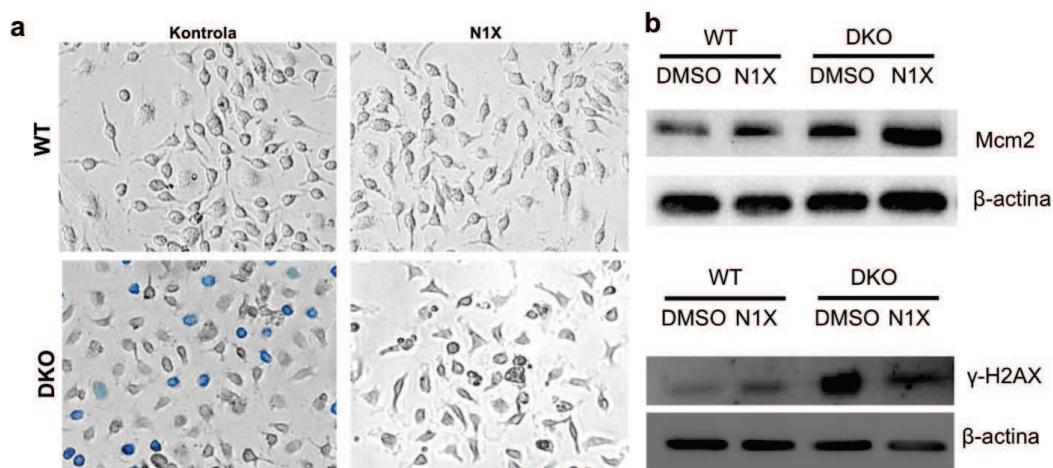
Nik behatutako DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen fenotipoa lehenago deskribatutako fenotipo patologikoarekin bat datorrela ziurtatu ondoren, eta nire hipotesia frogatzeko asmoz, WT eta DKO saguen hezurmuineko aintzindari monozitikoek kultiboetan nukleosidoak (N1X kontzentrazioan) gehitu nituen.

Aztertutako lehen gauza, DKO saguen BMDM-etan ematen den seneszentzia nukleosido urritasunak eragina denentz izan zen. Honetarako, seneszentziari-asoziaturiko β-galaktosidasa aktibitatea neurtu zen, metodoetan azaldutako β-gal tintziora burutuz **(8.a. irudia)**. Fase-contrastedun mikroskopioari esker, kultiboko seigarren egunean lortutako argazkietan ikusten

denez, WT zeluletan ez da ikusten seneszentziarik, nukleosidoen ausentzian zein presentzian. DKO zeluletan, ordea, nukleosido gabeko zeluletan seneszentzia ikusten den bitartean, nukleosidoen presentzian hasi direnetan ez da ikusten zelula seneszentzerik. Beraz, badirudi nukleosido exogenoen presentzian DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoetan ematen den seneszentzia goiztiarra sahiesten dela.

Ondoren, kultiboa hasi eta 24 ordutara zelulen proteina erauzi zen, lehenago aztertutako Mcm2 eta γ -H2AX proteinen adierazpena aztertzeko asmoz (**8.b. irudia**). Mcm2 proteinari dagokionez, nukleosidoen presentziak honen adierazpena emendatzen du bi genotipo ezberdinetako zeluletan. Beraz, nukleosido exogenoak zelulen kultibo mediora gehitzeak, zelulak gehiago proliferatzera eramaten ditu. Ondoren, γ -H2AX proteinen metaketa begiratu zen, nukleosido exogenoak gehitzeak DKO zeluletan honen aktibazioa ekiditen duen ikusteko. Garrantzitsuki, γ -H2AX histona fosforilatuaren adierazpena jaisten da nukleosido exogenoen presentzian hasitako DKO zeluletan.

Datu hauek kontuan hartuz, badirudi DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen kultiboan ematen den DNAREN hiper-erreplikazioaren ondoriozko DNA kalteak eragindako erantzuna, eta ondoren ematen den seneszentzia goiztiarra, egoera hiper-erreplikatiboaren ondorioz nukleosidoen erreserba amaitzen delako dela, zelulak nukleosido exogenoen presentzian hasteak, seneszentzia eta DDRa ekiditen baitu.



8. irudia. Nukleosido exogenoen presentziak DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen seneszentzia sahiesten du, Mcm2-aren adierazpena emendatuz, eta DNA kalteak eragindako erantzuna aktibatzea ekidinez (γ -H2AX-en adierazpena jaitziz). **(a)** Nukleosido exogenoen presentzian (N1X) edo ausentzian (DMSO) hasitako WT eta DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoen seneszentziari-asoziaturiko- β -galaktosidasa aktibitatea detektatzeko β -gal tinzioaren argazkiak. DKO zeluletan ematen den seneszentzia goiztiarra ez da ematen nukleosido exogenoak gehitzean. **(b)** Kutiboa hasi eta 24 ordutara erauzitako proteinen analisi, western blot

bidez. Nukleosidoen tratamenduak DKO saguetan Mcm2 proteinaren gainadierazoena aregotzen du, eta DNA kalteak eragindako erantzuna ekiditen du, γ -H2AX-en adierzpena jaitsiz.

Laburbilduz, emaitza hauek, MCSF duen kultibo medioan hasitako DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoek jasaten duten DDRa eta seneszentzia goiztiarra nukleosido exogenoen bidez ekidin daitekeela frogatzen dute (**8.a. irudia**). Nukleosido exogenoek DKO zeluletako DNAREN hiper-erreplikazioa areagotzen duten arren (Mcm2-ren adierazpena igoz), zelulak ez dira nukleosidoen erreserba gabe gelditzen, eta beraz, ez da estres erreplikatorik gertatzen. Ondorioz, γ -H2AX histona fosforilatu eta DNA kalteak eragindako erantzunaren markatzailearen adierazpena jaisten da (**8.b. irudia**), eta seneszentzia sahiesten da.

5. Ondorengo analisiak

Esperimentu honen ondorengo pausua, ikusten diren emaitzak dosi dependenteak direla frogatzea izango litzateke. Honetarako, WT eta DKO saguen hezurmuinetik eratorritako aintzindari monozitikoak MCSF duen medioan hasiko nituzke, nukleosido exogenoen kontzentrazio ezberdinen presentzian. Honi esker, nukleosido exogenoen kontzentrazio ezberdinek zeluletan duten eragina neurtu ahal izango nuke, kontzentrazio optimoa aurkitzeaz gain. Gainera, seneszentziari asoziatutako β -galaktosidasa aktibitatea eta proteinen adierazpena behatzeaz gain, CFSE-Cd11b bidezko proliferazio eta bereiztapenaren jarraipena egin beharko litzateke, aldaketak dauden detektatzeko.

Ondoren, DKO saguen zelula mota ezberdinekin emaitza berdinak lortzen direnentz ikusiko nuke. Adibidez, odoleko T-linfozito edo B-linfozitoen kultibo primarioak burutuko nituzke, nukleosido exogenoen ausentzian eta presentzian hasiz. DKO saguetatik eratorritako zelula mota hauetan ere hezurmuinetik eratorritako makrofagoetan agertzen diren fenotipo patologikoen antzekoak agertzen direnez, zelula mota egokiak lirateke nukleosido exogenoen presentziak DKO zeluletako patologiak konpontzeko gai direla frogatzeko.

Beste esperimentu mota interesgarri bat, nukleosidoen biosintesian jarduten duen generen bat gainadieraztea izango litzateke. Adibidez, Rrm2 proteina (ribonukleotido-difosfato erreduktasaren M2 subunitatea) nukleosidoen biosintesian lan egiten duen proteina bat da, eta proteina hau kodetzen duen genearen transfekzio bat burutuz, nukleosido endogenoen erreserba handitzea espero nuke. Honela, zuzenean frogatuko nuke nukleosidoak agortzearen arrazoia direla DKO saguen zeluletan agertzen diren fenotipo patologikoak.

Jarraian, nukleosido exogenoek *in vitro* funtzionatzen dutela ikusteaz gain, *in vivo* egindako esperimendu bat burutuko nuke. Honetarako, WT (kontrol moduan) eta DKO saguei injekzio intraperitoneal baten bidez, nukleosido ezberdinen kontzentrazio ezberdinak sartuko nizkieke, organo eta ehun ezberdinetan dituzte patologiak (Iglesias, 2004; Iglesias, 2010) konpontzeko edo arintzeko gai direnentz ikusteko. Adibidez, DKO saguek diabetesa garatzen dute, are exokrinoaren atrofia sufritzen baitute estres erreplikatiboa dela eta, eta interesgarria izango litzateke nukleosido exogenoek hau konpontzeko gai diren behatzea.

6. Ondorioak

- Nukleosido exogenoek DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoetan gertatzen den seneszentzia goiztiarra sahiesten dute.
- Nukleosido exogenoek DKO saguen hezurmuinetik eratorritako makrofagoetan ematen den hiper-erreplikazioa areagotzen dute, baina nukleosidoen dosi extra horrek estres erreplikatiboa ekiditen du, DNA kalteak eragindako erantzuna saihestuz.

7. Esker onak

Lan hau burutzen lagundu didaten guztiei eskerrak ematea gustatuko litzaidake, bereziki Ainhoa Iglesias irakasleari eta laborategiko teknikaria den Naiara Zorrila-ri, laborategian eman didaten laguntzarengatik. Baita laborategi burua den Ana Zubiaga irakasleari, nire gradu amaierako lana laborategi honetan burutzeko aukera emategatik. Azkenik, laborategiko kide guztiak (Asier, Jon, Jone, Aintzane, Marta, Maria) eskertzea nahi nuke, laborategian eta lanaren prestaketan eskeini didaten laguntza guztiarengatik.

8. Erreferentziak

- Bester, A. C., Roninger, M., Oren, Y. S., Im, M. M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach D. S. and Kerem, B. 2011. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell*, vol. 145, no. 3, pp. 435-446.
- Brackman, D., Lund-Johansen, F., Aarskog, D. 1995. Expression of leukocyte differentiation antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3: comparison with the maturation of normal monocytic and granulocytic bone marrow cells. *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 58, no. 5, pp. 547-555.

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 20, pp. 9363-9367.
- Field, S. J., Tsai, F. Y., Kuo, F., Zubiaga, A. M., Kaelin, W. G. Jr., Livingston, D. M., Orkin, S. H. and Greenberg, M. E. 1996. E2F1 function in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell*, vol. 85, pp. 549-561.
- Iglesias, A., Murga, M., Laresgoiti, U., Skoudy, A., Bernales, I., Fullaondo, A., Moreno, B., Lloreta, J., Field, S.J., Real, F.X., Zubiaga, A.M. 2004. Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 10, pp. 1398-1407.
- Iglesias-Ara, A., Zenarruzabeitia, O., Fernandez-Rueda, J., Sanchez-Tillo, E., Field, S.J., Celada, A., Zubiaga, A.M. 2010. Accelerated DNA replication in E2F1- and E2F2-deficient macrophages leads to induction of the DNA damage response and p21(CIP1)-dependent senescence. *Oncogene*, vol. 29, no. 41, pp. 5579-5590.
- Infante, A., Laresgoiti, U., Fernandez-Rueda, J., Fullaondo, A., Galan, J., Diaz-Uriarte, R., Malumbres, M., Field, S.J., Zubiaga, A.M. 2008. E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence. *Cell Cycle*, vol. 7, no. 24, pp. 3915-3927.
- Kastan, M.B., Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 316-323.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, vol. 19, no. 15, pp. 4293.
- Li, F.X., Zhu, J.W., Tessem, J.S., Beilke, J., Varella-Garcia, M., Jensen, J., Hogan, C.J., DeGregori, J. 2003. The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 22, pp. 12935-12940.
- Liu, Q., VanHoy, R.W., Zhou, J.H., Dantzer, R., Freund, G.G., Kelley, K.W. 1999. Elevated cyclin E levels, inactive retinoblastoma protein, and suppression of the p27(KIP1) inhibitor characterize early development of promyeloid cells into macrophages. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 9, pp. 6229-6239.
- Lukas, J., Peterson, B.O., Holn, K., Bartek, J. and Helin, K. 1996. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16^{INK4A}-mediated growth suppression. *Molecular Cell Biology*, vol. 16, pp. 1047-1057.
- Massague, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 298-306.
- Murga, M., Fernandez-Capetillo, O., Field, S.J., Moreno, B., R-Borlado, L., Fujiwara, Y., Balomenos, D., Vicario, A., Carrera, A.C., Orkin, S.H., Greenberg, M.E. and Zubiaga, A.M. 2001. Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity*, vol. 15, pp. 959-970.
- Pusapati, R. V., Weaks, R. L., Rounbehler, R. J., McArthur, M. J. and Johnson, D. G. 2010 E2F2 suppresses Myc-induced proliferation and tumorigenesis. *Molecular Carcinogenesis*, vol. 49, no. 2, pp. 152-156.
- Scheijen, B., Bronk, M., van der Meer, T., De Jong, D. and Bernards, R. 2004. High incidence of thymic epithelial tumors in E2F2 transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 10476-10483.