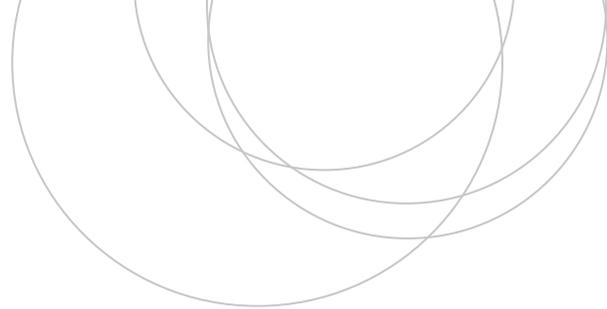




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Bioteknologiako Gradua / Grado en Biotecnología

Estudio del comportamiento de vesículas en autofagia: el caso de LC3B y LC3C

Egilea/Autor/a:
David Bermejillo Aroca
Zuzendaria/Director/a:
Asier Etxaniz Iriondo
Kozuzendaria/Codirector/a:
Ruth Montes Burgos

© 2023, David Bermejillo Aroca

Leioa, 2023ko ekainaren 23a /Leioa, 23 de junio de 2023

Índice

1. Introducción.....	1
2. Hipótesis y objetivos.....	5
3. Materiales y métodos.....	5
3.1 Cultivos celulares.....	5
3.2 Inducción de la autofagia.....	5
3.3 Western Blot.....	6
3.4 Ensayos de transfección.....	7
3.5 Análisis de la autofagia por microscopía confocal.....	8
4. Resultados.....	8
4.1 Los tratamientos de ayuno inducen la autofagia en células HEK293.....	8
4.2 Las células HEK293 se transfectan correctamente con Lipofectamina 2000.....	10
4.3 Las vesículas de LC3C muestran características distintas a las de LC3B.....	11
4.4 Las vesículas de LC3C forman acumulaciones y no fusionan con lisosomas.....	13
4.5 La autofagia por ayuno induce la formación de vesículas de RFP-LC3B.....	14
4.6 La sobreexpresión de LC3C excluye a LC3B de unirse a las vesículas.....	15
5. Discusión.....	16
6. Conclusiones y perspectivas futuras.....	18
7. Bibliografía.....	19

Resumen

La autofagia es un proceso celular conservado entre los eucariotas por el cual los componentes celulares son dirigidos hacia los lisosomas para su degradación, a través de una estructura de doble membrana llamada autofagosoma. Para la formación de esta estructura es necesario que proteínas de la familia ATG8 se unan covalentemente a la membrana. En este estudio, se comparan las características y el comportamiento de las vesículas formadas por dos proteínas de esta familia: LC3B y LC3C. Para ello, se han determinado las condiciones que inducen la autofagia por Western Blot y se han analizado las características y la dinámica de las vesículas por microscopía confocal, para lo cual se han utilizado células transfectadas con las proteínas recombinantes GFP-LC3C, GFP-LC3B y RFP-LC3B. Los resultados del estudio apuntan a que existen diferencias entre las vesículas formadas por las dos proteínas, no solo a nivel morfológico (cantidad y tamaño) sino también en cuanto a la dinámica y la fusión con lisosomas.

1. Introducción

La autofagia (del griego auto-, “a sí mismo” y phago, “comer”) es un proceso biológico conservado entre los eucariotas que permite la degradación regulada de material celular innecesario o no funcional, o para la obtención de energía en situaciones de ayuno. Para ello, un fagóforo (estructuras membranosas que pueden derivar de distintos orgánulos celulares) se extiende alrededor de la estructura que quiere ser degradada hasta que se fusionan sus extremos, encerrando el contenido citoplasmático y formando un autofagosoma (AP). Este autofagosoma es una estructura de doble membrana que dirige la carga que contiene en su interior hacia los lisosomas para fusionarse con ellos y que se dé la degradación (Nakatogawa, 2020) (**Figura 1**).

Las funciones principales de la autofagia son el reciclaje de los componentes celulares y la protección de la célula frente al ayuno, obteniendo nutrientes de los componentes degradados. Además, se ha visto que la autofagia está relacionada con la degradación de agregados proteicos asociados a diferentes enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y en la protección frente a ciertas enfermedades infecciosas o cáncer (Klionsky et al., 2021).

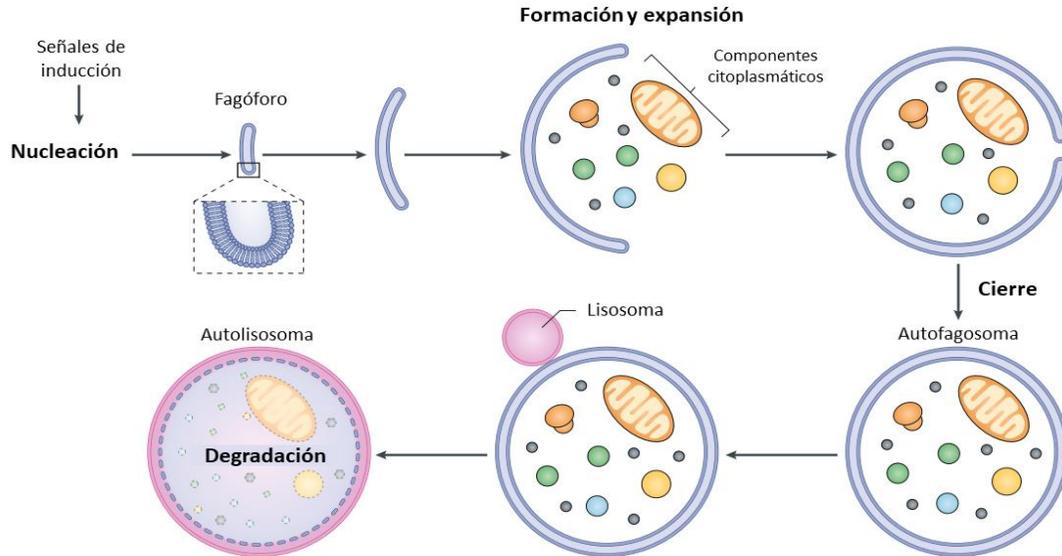


Figura 1. Mecanismo autofágico. Tras la activación por señales inductoras de autofagia, el fagóforo se organiza alrededor del contenido citoplasmático que va a ser degradado. Este fagóforo se va expandiendo hasta formar el autofagosoma. Este se fusiona posteriormente con los lisosomas, produciéndose la degradación de los componentes de su interior. Adaptado de Nakatogawa (2020).

Para la formación del autofagosoma se requieren aproximadamente 20 genes, llamados genes relacionados con la autofagia (ATG por sus siglas en inglés). Dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina (UBL) participan en la elongación, ensamblaje y cierre del AP. Estos son el sistema ATG12 y el sistema ATG8. En mamíferos, este último cuenta con 6 homólogos, divididos en dos familias: LC3 y GABARAP. Sin embargo, se suele utilizar el homólogo de levaduras (ATG8) para referirse a la familia completa (LC3/GABARAP). El mecanismo de estos sistemas fue descrito en detalle por Mizushima (2020) (**Figura 2**). En el sistema ATG12, la glicina más próxima al C-terminal de la proteína ATG12 se une a ATG7 en una reacción dependiente de ATP. A continuación, se une al enzima ATG10, la cual provoca que ATG12 se una a un residuo de lisina de ATG5. Finalmente, dos conjugados ATG12-ATG5 forman un complejo con el dímero ATG16 (ATG16L1 en el caso de humanos). Este complejo actúa de una manera parecida a las ubiquitin-ligasas E3 en el sistema ATG8. En el otro sistema, la proteína ATG8 recibe un corte en el extremo C-terminal catalizado por ATG4 para dejar expuesto un residuo de glicina. Esta ATG8 procesada se activa uniéndose primero a ATG7 (compartida con el sistema ATG12) y después a ATG3. Finalmente, ATG8 se une de forma covalente a la cabeza de una fosfatidiletanolamina (PE), presente en la membrana del autofagosoma. El conjugado ATG12-ATG5 promueve la formación de ATG8-PE.

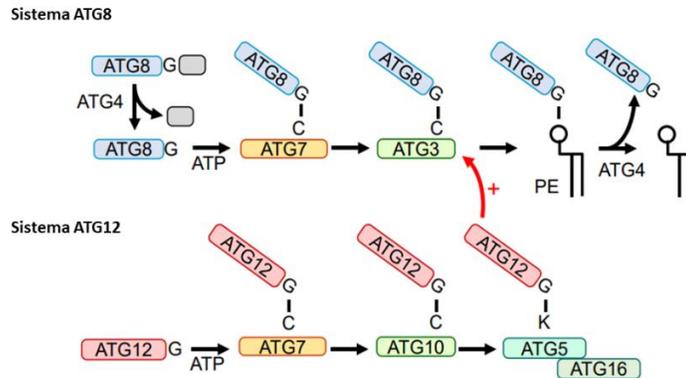


Figura 2. Sistemas de conjugación ATG8 y ATG12. Adaptado de Mizushima (2020).

Estos sistemas de conjugación también están implicados en otros procesos como el tráfico intracelular, fagocitosis o en la defensa frente a infecciones bacterianas o víricas. Esto sugiere que la conjugación de ATG8 a membranas parece ser una señal de que esas vesículas tienen que ser dirigidas al lisosoma para fusionarse con ellas y degradar su carga (Martens y Fracchiolla, 2020).

Existen diferentes técnicas para detectar la activación de la autofagia en una célula. Una de las más utilizadas es la detección de LC3/GABARAP conjugada con PE (LC3/GABARAP-II) por inmunotransferencia (Yoshii y Mizushima, 2017). La lipidación de LC3 es uno de los marcadores más utilizados ya que la cantidad de LC3-II refleja la cantidad de autofagosomas y de estructuras relacionadas con la autofagia. Hay que tener en cuenta que un aumento en LC3-II puede darse por un aumento en el nivel de autofagia o por la inhibición de la degradación de autofagosomas. Otra técnica consiste en la detección de puntos fluorescentes en células transfectadas con GFP-LC3 por microscopía de fluorescencia (Yoshii y Mizushima, 2017). Para determinar el flujo autofágico se cuentan los puntos en presencia de un inhibidor de la fusión con lisosomas y se comparan con los puntos en ausencia de inhibidor. La diferencia es el número de autofagosomas que habrían sido degradados en ese periodo de tiempo.

Como ya se ha mencionado, existen distintos ortólogos de ATG8 en mamíferos: LC3A, LC3B y LC3C (pertenecientes a la subfamilia LC3) y GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2/GATE-16 (pertenecientes a la familia GABARAP). Todos ellos son muy similares estructuralmente y el mecanismo de conjugación a PE es el mismo en todos los casos (puesto que en todos los casos participan los mismos enzimas descritos anteriormente). Sin embargo, también presentan ciertas diferencias entre ellos, principalmente los distintos niveles de expresión dependiendo del tejido

celular o la baja similitud que presentan en la secuencia de aminoácidos de las hélices alfa que se encuentran en el extremo N-terminal (Wesch et al., 2008).

Aunque se ha visto que el mecanismo autofágico puede funcionar en ausencia de ATG8, el funcionamiento se vuelve deficiente, produciéndose fallos en la formación, tamaño (más pequeños) y cierre de los autofagosomas, por lo que existe el consenso de que esta familia de proteínas juega un papel crucial en este proceso (Nguyen y Lazarou, 2022). Por lo tanto, puede ser de gran interés estudiar las funciones y las características de estas proteínas con el objetivo de diseñar fármacos para regular este proceso implicado en tantas enfermedades.

LC3B y LC3C son dos integrantes de la familia que presentan grandes similitudes entre ellas. Ambas tienen estructura globular y son muy similares en tamaño y estructura (125 aa y 14,7 kDa para LC3B y 147 aa y 16,8 kDa para LC3C). Además, ambas se encuentran repartidas de forma homogénea por el citosol cuando no están lipidadas (Wesch et al., 2008).

Sin embargo, LC3C es la integrante menos estudiada de la familia, debido a que su expresión es reducida en varios tejidos, los anticuerpos comerciales actuales no son muy específicos y que, a diferencia del resto de las ATG8, la proteína lipitada corre de forma similar a la no-lipitada en los geles de SDS-PAGE, lo cual dificulta mucho su cuantificación. A pesar de ello, se ha visto que tiene funciones específicas diferentes al resto de la familia, como puede ser una función antibacteriana en la xenofagia (von Muhlinen et al., 2012) y una función importante en la regulación del cáncer renal (Bell et al., 2019). Además, parte de su estructura difiere con la del resto de la familia, aunque sean muy similares en secuencia (Wesch et al., 2020). Nuestro grupo ha visto recientemente que LC3C presenta funciones distintas a LC3A y LC3B en mitofagia (Iriondo et al., 2022), y nuestros experimentos *in vitro* han mostrado que tiene una mayor capacidad de fusionar vesículas que las otras proteínas LC3 (Ballesteros et al., 2022).

Entender las diferencias en la función de estas dos proteínas, tan parecidas en secuencia (70% de similitud), puede permitir entender mejor la manera en que funcionan las proteínas de toda la familia e identificar regiones importantes para la función de la proteína que podrían ser diana de fármacos futuros.

Para ello, teniendo en cuenta que nuestras líneas celulares presentan una LC3C endógena indetectable, se transfectaron las células con LC3C fusionada al marcador fluorescente GFP y, tras

la inducción de la autofagia, se compararon las vesículas formadas con aquellas que aparecían en células transfectadas con LC3B fusionada al mismo marcador fluorescente.

2. Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta las diferencias que presenta la proteína LC3C con el resto de su familia, la hipótesis de partida es que los autofagosomas que contienen en su mayoría LC3C tienen características y funciones diferentes a los autofagosomas canónicos, los cuales contienen en su mayoría LC3B. Para contrastar esta hipótesis se realizarán experimentos de Western Blot y de microscopía confocal, mediante los cuales se desarrollarán los distintos objetivos de este proyecto:

- Identificar las condiciones en las cuales se activa la autofagia no selectiva en células HEK293.
- Optimizar las condiciones de transfección en células HEK293 con el plásmido GFP-LC3C para analizar su comportamiento y formación de vesículas en condiciones de autofagia.
- Comparar la actividad de LC3B y LC3C transfectadas en células HEK293, comparando la formación de vesículas y sus características.
- Analizar la colocalización de las vesículas formadas por GFP-LC3C y RFP-LC3B.

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

La línea celular HEK-293 (ATCC; CRL-1573) se cultivó a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en medio de cultivo DMEM (Sigma; D6429) suplementado con un 10% de FBS (Gibco; 10270106) y con 0,1 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma; 4333). La incubación se realizó en frascos de 75 y 175 cm² (Sarstedt). Con el objetivo de mantener una densidad celular entorno al 60-80%, se realizaron diluciones 1/10 de las células cada 2-3 días. Las células se separaron de los frascos utilizando tripsina (Gibco; 25300062). El recuento de células se realizó con un contador automático (BioRad TC20), realizando cada medición dos veces para mejorar la precisión.

3.2 Inducción de la autofagia

La autofagia se indujo por ayuno. Para los experimentos de inmunotransferencia, se sembraron las células en placas de 6 pocillos (Sarstedt) a una densidad celular de 400.000 células/pocillo. Se

realizaron dos tratamientos distintos para inducir la autofagia por ayuno: medio DMEN sin el suplemento de FBS y medio EBSS (Sigma; E3024), un medio con escasos nutrientes utilizado comúnmente para activar este tipo de autofagia. A cada tratamiento se le añadió la variable de presencia o ausencia de bafilomicina A₁ (Sigma; SML1661-.1ML) a 100 nM, la cual bloquea el flujo autofágico. A los tratamientos sin bafilomicina se les añadió la cantidad correspondiente de DMSO para compensar los efectos del medio en el que se encuentra la bafilomicina. 24h después de la siembra, las células se lavaron dos veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 80mM, KH₂PO₄ 7 mM, pH 7,4) y se realizó el tratamiento correspondiente durante 2h.

Para los experimentos de microscopía confocal se utilizó la misma metodología solo que las células se sembraron en placas para microscopía de 8 pocillos de 1 cm² (Ibidi, 80826) a una densidad celular de 40.000 células/pocillo y solo se realizó el tratamiento con EBSS, con los correspondientes controles.

3.3 Western Blot

Se analizó la expresión y la lipidación de LC3B por un ensayo de inmunotransferencia. Durante el proceso los lisados celulares se mantuvieron en hielo a 4°C. Tras realizar los tratamientos, las células fueron lisadas añadiendo a cada pocillo 100 µL de tampón de lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific Inc.; 89900) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, 11836170001). Se rasparon las células utilizando un rascador desechable (Sarstedt) y se dejaron incubando 15 min a 4°C en un agitador orbital ThermoMixer (Eppendorf AG, Alemania). Finalmente, se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 10 min para eliminar los restos celulares y se recogió el sobrenadante.

Se realizó un ensayo colorimétrico de BCA (Thermo Fisher Scientific Inc.; 23225) para determinar la concentración de proteína de cada muestra. La absorbancia de las muestras a 562 nm se midió en un lector de placas automático.

Se añadió el volumen necesario para cargar 10 µg de proteína de cada muestra a un gel de poliacrilamida al 15%, precalentado a 100°C durante 5 min y suplementado con Loading Buffer para desnaturalizar la muestra. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE a 90 V para el gel de carga y a 130 V para el gel de resolución. Se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF (Amersham; 10600021), activada previamente con metanol, utilizando el Trans-Blot Turbo

Transfer System (Bio-Rad; 1704150). Después, se bloquearon las membranas durante 1h con leche en polvo al 5% en tampón TBST (Tris Buffer Saline con Tween: NaCl 150 mM, Tris-HC 125 mM, KCl 2 mM, Tween-20 al 1%, pH 7,4) y se incubó durante 16h a 4°C con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-LC3B (Abcam; ab51520) (1:1000) en tampón TBST con leche al 1%. Se lavó la membrana 3 veces durante 5 min con TBST y se incubó durante 1h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo unido a una peroxidasa de rábano (Abcam; ab6721) (1:5000) en TBST con leche al 1%. Como control de carga, se detectó la expresión de GAPDH utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GAPDH (SantaCruz Biotechnology; sc-47724) (1:1000). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (Abcam; ab6789).

Para el revelado de las bandas se utilizó el sustrato Immobilon Forte Western HRP (Millipore; WBLUF0100). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un iBright FL1500 Imager (Thermo Fisher Scientific Inc.)

3.4 Ensayos de transfección

Las células se transfectaron de forma transitoria utilizando tres plásmidos distintos para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Se utilizaron los plásmidos GFP-LC3C, GFP-LC3B (pHAGENeGFP LC3C y pHAGENeGFP LC3B, ambos cedidos por el laboratorio del Dr. Behrends) y RFP-LC3B (Addgene, #21075). La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.; 11668019) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el medio Opti-MEN (Thermo Fisher Scientific Inc.; 11058021) para realizar las diluciones de ADN y de Lipofectamina. Para realizar la transfección se añadió la mezcla de Opti-MEN sobre el medio en el que se encontrasen las células, se dejó incubar 4h a 37°C y se cambió el medio por medio completo fresco.

Se realizó un ensayo para determinar las condiciones óptimas de transfección para cada plásmido, variando el volumen de Lipofectamina 2000 (1, 1,5 y 2,5 μ L por pocillo) y la cantidad de ADN plásmídico (0,5 y 1 μ g por pocillo). Se sembraron las células en una placa de 24 pocillos (Sarstedt) a una densidad celular de 40.000 cel/pocillo y se incubaron en medio DMEN completo por 24h. Se realizó en tratamiento de transfección mencionado anteriormente y se dejó incubar durante 24h. Los resultados de la transfección se analizaron con el sistema ZOE fluorescent cell imager (Bio-Rad).

Para los experimentos de microscopía confocal se utilizaron las condiciones óptimas de ADN y Lipofectamina determinadas en el ensayo de transfección, adaptando las cantidades a las placas para microscopía de 8 pocillos. 24-48h después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se fijaron añadiendo 200 μ L/pocillo de paraformaldehído al 4% durante 15 min. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se guardaron a 4°C hasta su observación.

3.5 Análisis de la autofagia por microscopía confocal

Una vez fijadas las células, se observaron las señales de GFP y RFP utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y se obtuvieron las imágenes utilizando el software LAS AF. Se utilizaron longitudes de onda de 488 y 543 nm para la excitación de GFP y RFP respectivamente. La emisión fue detectada en el rango de 500-530 nm para GFP y entre 580-640 para RFP. Los parámetros para la captura de imágenes (potencia del láser, ganancia del receptor...) se mantuvieron constantes para todas las muestras. Las imágenes se obtuvieron con una lente de 60 aumentos, aunque se utilizó la ampliación digital del software para adquirir una única célula por foto, facilitando así el análisis posterior. Para determinar el número, tamaño y área total de las vesículas se aplicó una señal umbral parecida a todas las imágenes para filtrar únicamente la señal de las vesículas presentes en el citosol y analizar sus características con la función “Analyze particles” del software Fiji (Image J).

Para la captura de imágenes de células vivas, se añadió la sonda LysoTracker Red (ThermoFisher, L7528), la cual marca los compartimentos ácidos de la célula. Antes de realizar el experimento, se incubaron las células con la sonda a 100 nM durante 45 min y posteriormente se lavaron tres veces con PBS, dejándolas en medio DMEN completo al final. Se adquirieron los videos durante 30 minutos, obteniendo una imagen cada 30 segundos.

4. Resultados

4.1 Los tratamientos de ayuno inducen la autofagia en células HEK293

El primer paso para poder llevar a cabo los posteriores experimentos fue comprobar las condiciones que inducen la autofagia en células HEK293. Se decidió trabajar con esta línea celular porque se ha utilizado en varios estudios sobre autofagia. Esta se determinó analizando la lipidación de la LC3B endógena mediante un ensayo de Western Blot (**Figura 3**). La autofagia se indujo por ayuno,

para lo cual las células se sometieron a un tratamiento de 2h en medio sin suero (DMEN sin FBS) y en medio con escasos nutrientes (EBSS). Se eligió aplicar directamente 2h de tratamiento ya que esta activación ya ha sido descrita en anteriores trabajos (Musiwaro et al., 2013). También se realizó un control en medio completo para determinar el flujo autofágico basal. Todos los tratamientos se realizaron también en presencia de bafilomicina, la cual bloquea el flujo autofágico impidiendo que las vesículas autofágicas se unan a los lisosomas, lo cual permite analizar el flujo autofágico que se ha producido durante el tratamiento, puesto que se evita la degradación de LC3B. Se observan dos bandas cercanas a 17kDa, las cuales corresponden a LC3B libre (LC3B-I) y a LC3B lipitada (LC3B-II). A pesar de que esta última tiene un mayor peso molecular, tiene una movilidad electroforética mayor debido a su hidrofobicidad. Se observa cómo en todos los tratamientos se produce un aumento en el grosor de la banda de LC3B-II, lo cual refleja un aumento en la autofagia. Como era de esperar, en los casos con bafilomicina es donde se observa una mayor cantidad de LC3B-II debido a la acumulación de vesículas.

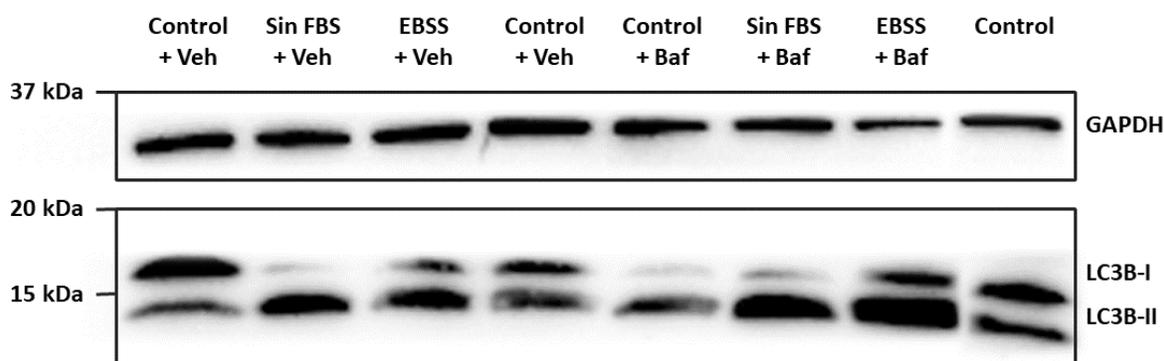


Figura 3. Inducción de la autofagia por ayuno en células HEK293. Western Blot de los lisados de células tras someterlas durante 2h a distintos tratamientos: medio DMEN completo (control), medio DMEN sin suero (sin FBS) y medio escaso en nutrientes (EBSS). Se agregó bafilomicina 100 nM en los casos correspondientes (+ Baf). A los tratamientos sin bafilomicina se les añadió un vehículo, en este caso DMSO (+ Veh). El GAPDH se utilizó como control de carga.

En vista de los resultados, se considera que tanto el tratamiento sin FBS como el EBSS son aptos para activar la autofagia. Se seleccionó el tratamiento con EBSS para los posteriores experimentos ya que es el que presenta una mayor acumulación de LC3B-II.

4.2 Las células HEK293 se transfectan correctamente utilizando Lipofectamina 2000

Antes de poder realizar los experimentos de microscopía confocal, fue necesario poner a punto las condiciones de transfección de los plásmidos GFP-LC3C, GFP-LC3B y RFP-LC3B en las células HEK293 (**Figura 4**). Todos plásmidos se insertaron y expresaron correctamente, aunque RFP-LC3B presenta una mayor expresión. Se observó que la lipofectamina resulta bastante tóxica para las células, ya que se observaron bastantes células redondeadas con conformaciones claramente apoptóticas, sobre todo en los pocillos con mayor concentración ($> 1,5 \mu\text{L}$). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de ADN. Por lo tanto, se decidió reducir la cantidad utilizada de ADN a $0,5 \mu\text{g/pocillo}$ y la de lipofectamina a $0,5 \mu\text{L/pocillo}$ en posteriores experimentos.

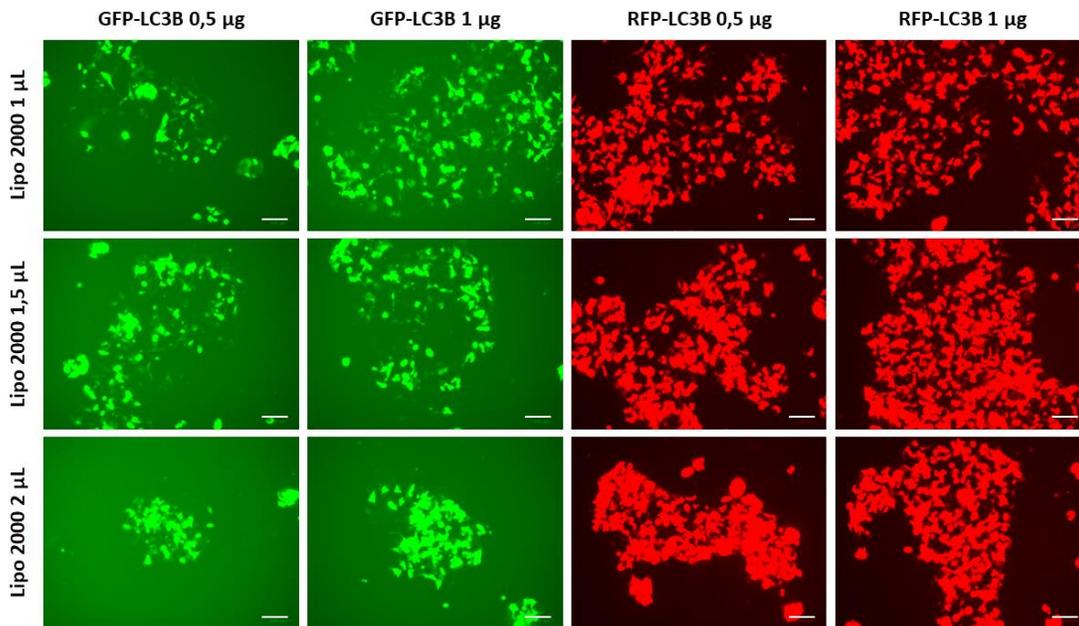


Figura 4. Puesta a punto de las condiciones de transfección. Imágenes representativas de células HEK293 24h después de la transfección con plásmidos de GFP-LC3B y RFP-LC3B a distintas concentraciones de ADN ($\mu\text{g/pocillo}$) y Lipofectamina 2000 ($\mu\text{L/pocillo}$). Los resultados obtenidos con el plásmido GFP-LC3C fueron prácticamente idénticos a los de GFP-LC3B, pero no se muestran por falta de espacio. Barra de escala = $100 \mu\text{m}$.

También se intentó poner a punto las condiciones para la transfección conjunta de RFP-LC3B y GFP-LC3C con el objetivo de poder analizar la colocalización de estas dos proteínas. No se

consiguió ninguna condición con unos resultados parecidos a los de cada plásmido por separado, pero la condición de 1 $\mu\text{g/pocillo}$ de ADN (relación 1:1 de GFP-LC3C y RFP-LC3B) y de 0,5 $\mu\text{L/pocillo}$ de Lipofectamina permitieron tener una cantidad mínima de células co-transfectadas para realizar el experimento de colocalización.

4.3 Las vesículas de LC3C muestran características distintas a las de LC3B

Una vez optimizadas las condiciones, se transfectaron células HEK293 con GFP-LC3B y GFP-LC3C y se sometieron a los tratamientos de ayuno anteriormente mencionados con el objetivo de inducir la autofagia y testar la hipótesis de que la naturaleza de las vesículas formadas por cada proteína es diferente. Para ello, se tomaron imágenes de cada tratamiento (**Figura 5**) y se analizaron tres parámetros: número de vesículas por célula, área total que ocupan esas vesículas dentro de la célula y tamaño medio de cada vesícula (**Figura 6**).

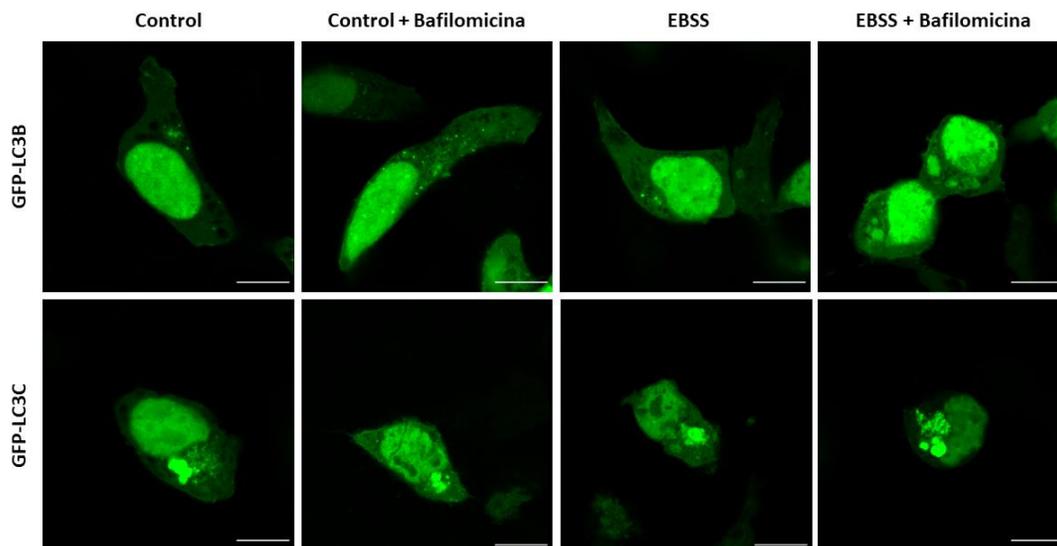


Figura 5. Diferencias en la formación de vesículas por LC3B y LC3C. Imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK293 transfectadas con GFP-LC3B y GFP-LC3C tras un tratamiento de 2h en medio completo (control) y en condiciones de ayuno (EBSS), con y sin bafilomicina (100 nM). Barra de escala = 10 μm .

Tanto en las muestras de LC3B como en las de LC3C se observa una gran variabilidad celular. Por un lado, se observan una gran cantidad de células con forma redondeada, las cuales reflejan el estado apoptótico y dañado de las mismas. Por otro lado, también se observa una amplia

variabilidad en el nivel de expresión de las proteínas, debido principalmente a la transfección transitoria. Algunas llegaban a saturar la señal del microscopio debido a la alta expresión. Ninguna de estas células, ni las células dañadas fueron tenidas en cuenta para el análisis y por ello no se muestran en las imágenes. Se observa también en todos los casos una acumulación de la proteína transfectada en el núcleo, lo cual ya había sido observado en otros trabajos (Dou et al., 2015) y no ha sido cuantificado como vesícula.

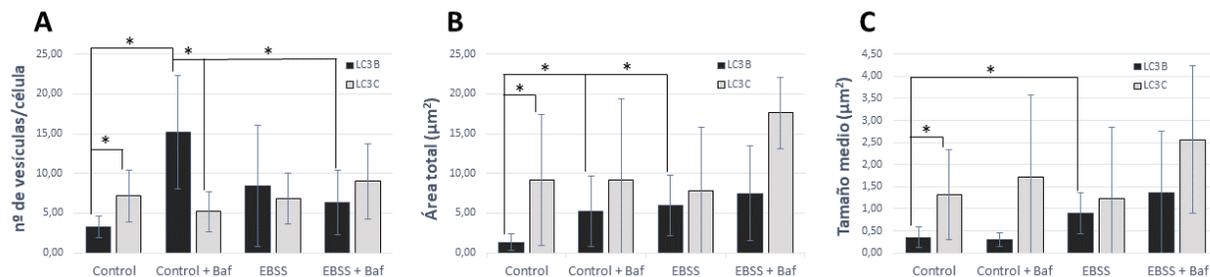


Figura 6. Diferencias en la caracterización de las vesículas de LC3B y LC3C. Análisis de las vesículas formadas por LC3B (barras negras) y LC3C (barras grises) en células HEK293 tras un tratamiento de 2h en medio completo (control) y en condiciones de ayuno (EBSS), con y sin bafilomicina. (A) Número medio de vesículas por célula. (B) Área media de todas las vesículas de una célula. (C) Tamaño medio de las vesículas formadas. Se midieron 10 – 15 células por condición. Los * indican una diferencia significativa ($p < 0,05$).

Se observan diferencias significativas en las vesículas formadas por ambas proteínas. En condiciones basales, LC3C forma un mayor número de vesículas que LC3B (Figura 6.A), que además son de mayor tamaño (Figura 6.C) y ocupan una mayor área dentro de la célula (Figura 6.B). No está claro si el número de vesículas de GFP-LC3C aumenta en condiciones de ayuno, aunque sí se ha visto que en el tratamiento de EBSS+Baf el tamaño medio y el área que ocupan las vesículas aumentan (Figuras 6.B y 6.C), a pesar de que las diferencias con el control no llegan a ser significativas debido al número reducido de muestras. Por lo tanto, a falta de un experimento con un mayor número de réplicas, podemos afirmar que LC3C participa en el proceso de formación de vesículas autofágicas, aunque parece que el mecanismo o la morfología de las vesículas es diferente a la de LC3B.

Cabe destacar que en el caso de LC3B no se observa un aumento en el número de vesículas en la condición de EBSS+Baf, aunque este aumento sí se observa en el Control+Baf. Teniendo en cuenta

que en este tratamiento se observaron un mayor número de células con forma redondeada y de pequeño tamaño, se puede deducir que presenta una toxicidad muy elevada que interfiere con los procesos de autofagia. Sin embargo, estos resultados no se observan en los experimentos de Western Blot (en los que se observaron las células antes de lisarlas), por lo que la toxicidad puede deberse a la combinación de la transfección con el tratamiento de ayuno.

Finalmente, se ha observado que en algunas de las células transfectadas con GFP-LC3C aparece una acumulación de vesículas en la región perinuclear, como puede observarse en la imagen del tratamiento de EBSS+Baf de la **Figura 5**. Este tipo de acumulaciones no se observan en las células con GFP-LC3B, por lo que se decidió profundizar más en el análisis de este fenotipo.

4.4 Las vesículas de LC3C forman acumulaciones perinucleares y no fusionan con lisosomas

Para analizar más en profundidad la morfología de las vesículas formadas con GFP-LC3C se realizó un experimento en el que las células transfectadas se incubaron con la sonda LysoTracker Red, la cual marca en color rojo los compartimentos acídicos de las células como los lisosomas. Se realizó una captura de imágenes de células vivas durante 30 min sacando una foto cada 30 s con el objetivo de monitorizar la dinámica de las vesículas y observar si existían eventos de fusión con lisosomas como es de esperar en vesículas autofágicas normales (**Figura 7**).

Como se ha mencionado anteriormente, se observaron dos fenotipos en la población celular (**Figura 7.A**). En uno de ellos se observa una clara acumulación de vesículas de tamaño medio y grande en la zona perinuclear. El otro fenotipo presenta vesículas de tamaño medio repartidas por el citoplasma, similar a lo que ocurre con LC3B pero con una mayor cantidad de vesículas.

En el fenotipo sin acumulación se observa que las vesículas se comportan de manera dinámica, desplazándose por el citoplasma y fusionándose con los lisosomas (**Figuras 7.B y 7.C**), mostrando el comportamiento esperable de un autofagolisosoma típico. Podemos deducir, por lo tanto, que este tipo de vesículas se comportan de forma similar a las ya descritas con LC3B.

En contraposición, el fenotipo con acumulación perinuclear presenta vesículas mucho menos dinámicas y que no parecen interactuar mucho con los lisosomas. Sin embargo, este se trata de un experimento piloto y sería necesario realizar más ensayos para poder sacar algún tipo de conclusiones.

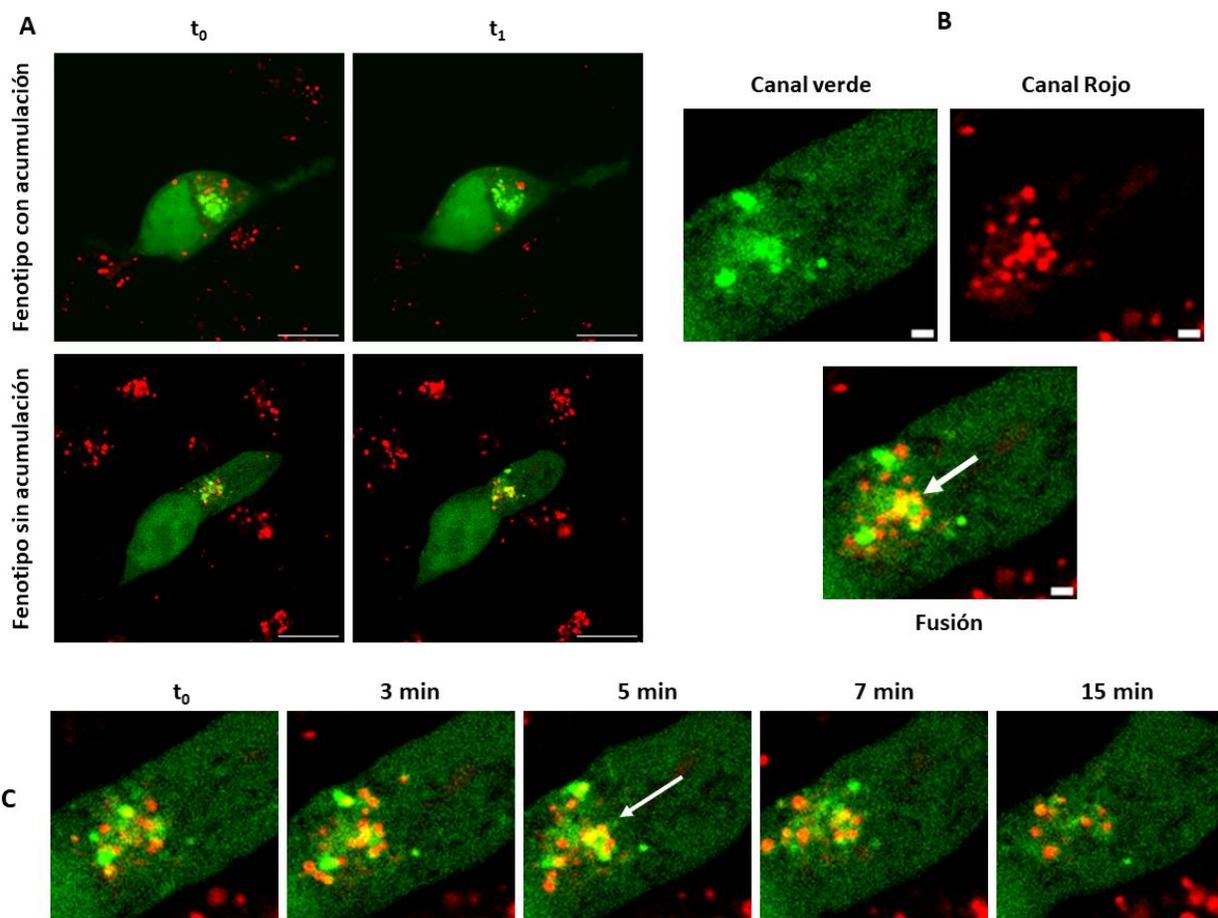


Figura 7. Análisis de la dinámica de las vesículas de LC3C-GFP. (A) Imágenes representativas de los dos fenotipos de vesículas de LC3C tomadas a distintos tiempos en un experimento de captura de imágenes de células vivas. Se muestran las vesículas de GFP-LC3C (verde) y los lisosomas marcados con la sonda LysoTracker Red (rojo). Barra de escala = 10 μm . (B) Ampliación de las vesículas con el fenotipo sin acumulación. Barra de escala = 1 μm . (C) Imágenes del fenotipo sin acumulación a distintos tiempos que muestran la interacción dinámica de vesículas de LC3C con lisosomas. Las flechas indican la colocalización (amarillo) de vesículas con lisosomas.

4.5 La autofagia por ayuno induce la formación de vesículas de RFP-LC3B

Posteriormente, como control para el posterior experimento de colocalización, se transfectaron células HEK293 con el plásmido RFP-LC3B y se sometieron a las mismas condiciones que en los experimentos anteriores con el fin de comprobar el comportamiento de esta proteína en condiciones de autofagia inducidas por ayuno (**Figura 8**).

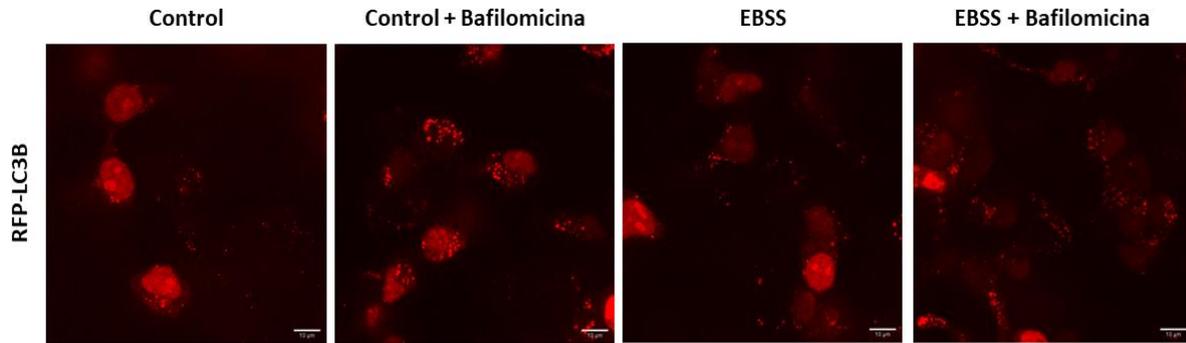


Figura 8. Aumento del número de vesículas por los tratamientos de ayuno. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de células HEK293 transfectadas con RFP-LC3B tras un tratamiento de 2h en medio completo (control) y en condiciones de ayuno (EBSS), con y sin bafilomicina. Barra de escala = 10 μ m.

Se observó que RFP-LC3B se comporta de manera esperada, produciéndose un aumento en la acumulación de vesículas en condiciones de autofagia inducida por ayuno (EBSS). También se observa una mayor acumulación de las vesículas en los tratamientos con bafilomicina, lo cual es esperable debido al bloqueo del flujo autofágico.

4.6 La sobreexpresión de LC3C excluye a LC3B de unirse a las vesículas

Una vez analizadas las características de LC3B y LC3C por separado, se decidió realizar un ensayo en el que se transfectaron las células con ambos plásmidos (RFP-LC3B y GFP-LC3C) para observar su comportamiento en paralelo y detectar si existe colocalización entre ellas (**Figura 9**).

En el caso de GFP-LC3C vuelve a observarse la acumulación perinuclear de vesículas. El tamaño y la cantidad de vesículas en los tratamientos donde el flujo autofágico está bloqueado aumentan, de forma similar a lo observado en los experimentos anteriores. Sin embargo, apenas se observan vesículas de RFP-LC3B en ninguno de los tratamientos y, en las pocas en las que aparecen, no colocalizan en absoluto con las de LC3C. Se puede deducir la correcta expresión del plásmido de RFP-LC3B por la intensa señal del núcleo, equiparable a la señal que puede tener LC3C. Por lo tanto, la ausencia de vesículas de LC3B no puede atribuirse a una reducción en la expresión del plásmido. En base a estos resultados, podríamos deducir que la sobreexpresión de LC3C excluye a LC3B de unirse a las vesículas y de que LC3B no forma parte de las acumulaciones de vesículas perinucleares observadas con LC3C, aunque serían necesarios más ensayos para poder sacar conclusiones al respecto.

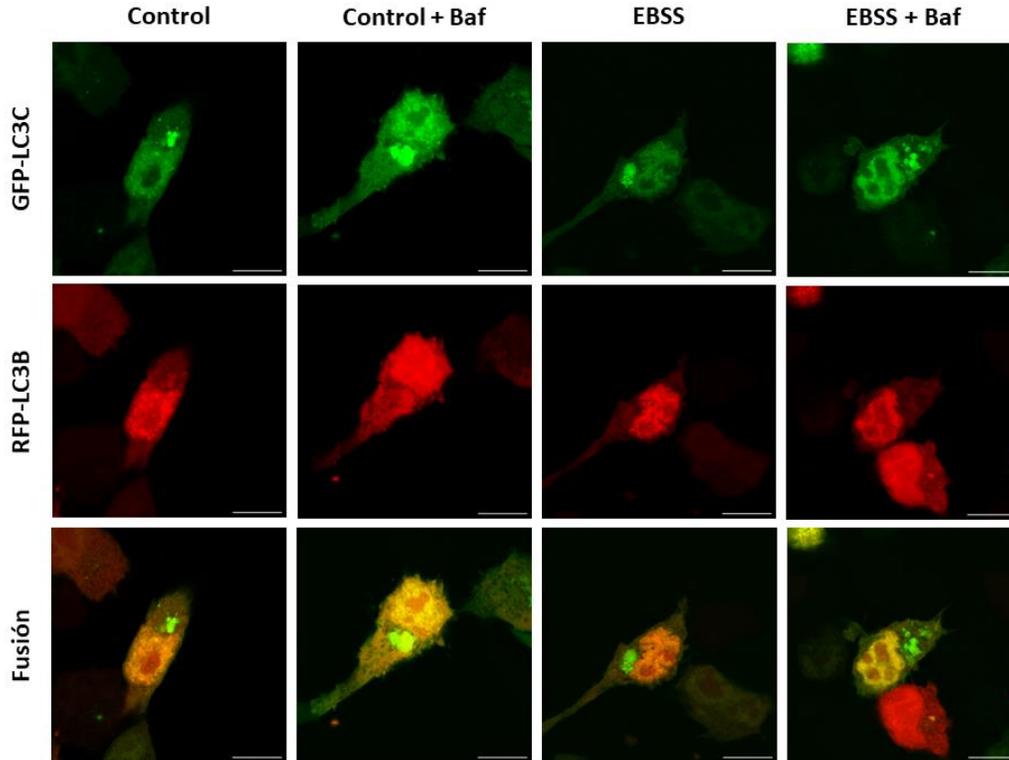


Figura 9. Ausencia de colocalización entre vesículas GFP-LC3C y RFP-LC3B. Imágenes de microscopía confocal de células HEK293 transfectadas con RFP-LC3B (rojo) y GFP-LC3C (verde) tras un tratamiento de 2h en medio completo (control) y en condiciones de ayuno (EBSS), con y sin bafilomicina (100 nM). Las imágenes son representativas de la población celular en cada condición. Barra de escala = 10 μ m.

5. Discusión

Los resultados de este trabajo aportan datos novedosos que ayudan a mejorar el conocimiento sobre el mecanismo autofágico y la función que tienen las distintas proteínas LC3 en el mismo.

Por un lado, dejan claro que, tras la inducción de la autofagia, existe una diferencia entre la cantidad de vesículas de LC3B y LC3C que se forman, así como en el tamaño de las mismas (**Figura 6**). Esto concuerda con la hipótesis de que estas dos proteínas forman autofagosomas distintos, con funciones diferentes. Además, esta observación podría explicar resultados previos en los que también se ha visto que LC3C tiene funciones diferentes a LC3B (Bell et al., 2019; von Muhlinen et al., 2012).

Por otro lado, en muchas de las células transfectadas con GFP-LC3C se ha observado un interesante fenotipo, caracterizado por presentar una acumulación perinuclear de vesículas. Los videos

obtenidos muestran que estas acumulaciones, a pesar de ser muy poco dinámicas, parecen estar formadas por diferentes vesículas. Para prevenir errores en el análisis posterior y evitar que las acumulaciones de vesículas de LC3C sean tomadas como una única vesícula en lugar de como varias, en la caracterización de este tipo de eventos los parámetros “área total” y “tamaño medio” de la **Figura 6** resultaron más fiables que el parámetro “número de vesículas”. Serán necesarios futuros experimentos para determinar si este fenómeno es relevante desde un punto de vista fisiológico o si es un efecto producido por la sobreexpresión y la consecuente aparición de concentraciones elevadas de proteína tras la transfección. Uno de los experimentos que permiten discernir entre estas dos situaciones sería llevar a cabo un estudio comparativo con el mutante no lipidable LC3C G126A, el cual ya ha sido utilizado por el grupo de investigación en trabajos anteriores (Iriando et al., 2020); como método para descartar que este tipo de vesículas sean en realidad agregados de proteína causados por la sobreexpresión.

Además, también es necesario repetir los experimentos con un mayor número de réplicas para poder sacar resultados más concluyentes, ya que en los datos obtenidos se observa una gran variabilidad y error, debido en parte a que la toxicidad de la transfección hizo que la cantidad de células disponibles fuese menor de lo esperado y que muchas se descartasen por mostrar una morfología apoptótica o dañada. En este sentido, la transfección transitoria parece no ser la más adecuada para realizar estos estudios, ya que se obtiene una gran variabilidad en los fenotipos celulares y en la cantidad de proteína expresada, lo cual dificulta mucho el análisis posterior de los datos. Esto además también impide la automatización del proceso para realizar un análisis a gran escala, ya que es necesario aplicar un umbral de señal diferente para cada célula. También hay que tener en cuenta la gran toxicidad que induce la transfección por lipofectamina, pudiendo ser la causa de que el mecanismo autofágico no haya funcionado como se espera en la condición de EBSS + Baf. Este método de transfección se ha utilizado habitualmente con las células HeLa, aunque sería recomendable optimizarlo en experimentos que impliquen la utilización de células HEK293. Una forma sería realizar un tratamiento previo con bafilomicina 30 minutos antes de añadir el EBSS para intentar obtener un mayor efecto, o probar un tiempo de incubación menor (1h) y menos tóxico para las células. También se podrían utilizar otros métodos, como el fosfato de calcio, aunque sin duda, la mejor solución sería generar clones estables para cada una de las proteínas, que permitan realizar estos estudios de forma más adecuada.

Atendiendo al experimento de colocalización, los resultados refuerzan la hipótesis de trabajo inicial. Se observa que en todos los casos la sobreexpresión de LC3C bloquea la formación de vesículas con LC3B (**Figura 9**). Esto podría sugerir que en células HEK293 existe una preferencia en la formación de autofagosomas con LC3C sobre los más típicos con LC3B, tanto en condiciones basales como en condiciones de autofagia inducida por ayuno. Sin embargo, en caso de que, como se ha comentado anteriormente, la acumulación perinuclear de vesículas de LC3C estuviera debida a la transfección y acumulación de proteína no lipidada, podría ser que esta bloquease el mecanismo autofágico e impidiese la formación de vesículas con LC3B a través de una vía no fisiológica. Tampoco se puede descartar la idea de que las vesículas observadas no sean autofagosomas, ya que se ha visto que proteínas de la familia ATG8 también pueden estar implicadas en otras rutas celulares que no implican la activación de la autofagia (Martens y Fracchiolla, 2020). Por lo tanto, serían necesarios más experimentos para poder sacar conclusiones al respecto.

Finalmente, se observa que los resultados obtenidos en este experimento están en concordancia con lo encontrado por Iriondo et al. (2022), donde vieron que LC3C se comporta de manera diferente a LC3B en mitofagia, aunque en el mencionado trabajo, en el que se transfectaron células SH-SY5Y (glioblastoma) con GFP-LC3C, solo se cuantificó el número de vesículas. Además, en este trabajo no se hace mención a la acumulación perinuclear de vesículas observada en este estudio, por lo que se puede deducir que LC3C se comporta de forma diferente dependiendo del tipo celular. Ensayos recientes que comparan la actividad fusogénica de estas proteínas *in vitro* muestran también que existe una clara diferencia entre LC3C y el resto de LC3 (Ballesteros, 2022 e Iriondo, 2023), lo que puede explicar su diferente comportamiento dentro de la célula.

6. Conclusiones y perspectivas futuras

En este trabajo se ha conseguido demostrar que las células HEK293 muestran una clara activación de la autofagia tras dos horas de tratamiento en condiciones de ayuno. También se ha observado que las vesículas de LC3C muestran un comportamiento y morfología diferentes a las formadas por LC3B en condiciones basales en células HEK293. Los experimentos de colocalización sugieren que existe una preferencia en la formación de vesículas de LC3C sobre LC3B, aunque se necesitan más ensayos para sacar conclusiones robustas. Finalmente, se ha observado que las vesículas de LC3C se fusionan con los lisosomas de forma esperable en un autofagosoma, pero muestran una acumulación perinuclear que no presentan las vesículas de LC3B. Sin embargo, son necesarios más

experimentos para confirmar que esta acumulación realmente tiene una relevancia fisiológica y que no es producto de la propia transfección.

Por otra parte, los resultados de este trabajo dan pie a la realización de nuevos experimentos para seguir profundizando en las diferencias que presentan las vesículas formadas por estas proteínas. Por un lado, sería necesario repetir los experimentos con mutantes que expresen las proteínas de manera estable, para evitar la elevada variación provocada por la transfección transitoria. También sería interesante analizar la colocalización de LC3C con otros marcadores intracelulares para comprobar si las vesículas detectadas están implicadas en la formación del autofagosoma o tienen alguna otra función. Finalmente, sería de gran interés poder relacionar las diferencias observadas con diferentes enfermedades, comprobando la expresión de LC3C en enfermedades relacionadas con la autofagia.

7. Bibliografía

Ballesteros U, Etxaniz A, Iriando MN, Varela YR, Lázaro M, Viguera AR, Montes LR, Valle M, Goñi FM, Alonso A. Autophagy protein LC3C binding to phospholipid and interaction with lipid membranes. *Int J Biol Macromol*. 2022 Jul 1;212:432-441. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.129.

Bell ES, Coelho PP, Ratcliffe CDH, Rajadurai CV, Peschard P, Vaillancourt R, Zuo D, Park M. LC3C-Mediated Autophagy Selectively Regulates the Met RTK and HGF-Stimulated Migration and Invasion. *Cell Rep*. 2019 Dec 17;29(12):4053-4068.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.063.

Chang C, Jensen LE, Hurley JH. Autophagosome biogenesis comes out of the black box. *Nat Cell Biol*. 2021 May;23(5):450-456. doi: 10.1038/s41556-021-00669-y.

Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan JA, Zhu J, Ivanov A, Capell BC, Drake AM, Shah PP, Catanzaro JM, Ricketts MD, Lamark T, Adam SA, Marmorstein R, Zong WX, Johansen T, Goldman RD, Adams PD, Berger SL. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*. 2015 Nov 5;527(7576):105-9. doi: 10.1038/nature15548.

Iriando MN, Etxaniz A, Varela YR, Ballesteros U, Hervás JH, Montes LR, Goñi FM, Alonso A. LC3 subfamily in cardiolipin-mediated mitophagy: a comparison of the LC3A, LC3B and LC3C homologs. *Autophagy*. 2022 Dec;18(12):2985-3003. doi: 10.1080/15548627.2022.2062111.

Iriondo MN, Etxaniz A, Varela YR, Ballesteros U, Lázaro M, Valle M, Fracchiolla D, Martens S, Montes LR, Goñi FM, Alonso A. Effect of ATG12-ATG5-ATG16L1 autophagy E3-like complex on the ability of LC3/GABARAP proteins to induce vesicle tethering and fusion. *Cell Mol Life Sci.* 2023 Feb 2;80(2):56. doi: 10.1007/s00018-023-04704-z.

Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK. Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* 2021 Oct 1;40(19):e108863. doi: 10.15252/embj.2021108863.

Lystad AH, Simonsen A. Mechanisms and Pathophysiological Roles of the ATG8 Conjugation Machinery. *Cells.* 2019 Aug 25;8(9):973. doi: 10.3390/cells8090973.

Martens S, Fracchiolla D. Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discov.* 2020 May 5;6:23. doi: 10.1038/s41421-020-0155-1.

Mizushima N. The ATG conjugation systems in autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2020 Apr;63:1-10. doi: 10.1016/j.ceb.2019.12.001.

Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy.* 2013 Sep;9(9):1407-17. doi: 10.4161/auto.25455.

Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Aug;21(8):439-458. doi: 10.1038/s41580-020-0241-0.

Nguyen TN, Lazarou M. A unifying model for the role of the ATG8 system in autophagy. *J Cell Sci.* 2022 Jun 1;135(11):jcs258997. doi: 10.1242/jcs.258997.

von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, Foeglein Á, Bloor S, Rutherford TJ, Freund SM, Komander D, Randow F. LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell.* 2012 Nov 9;48(3):329-42. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.024.

Wesch N, Kirkin V, Rogov VV. Atg8-Family Proteins-Structural Features and Molecular Interactions in Autophagy and Beyond. *Cells.* 2020 Sep 1;9(9):2008. doi: 10.3390/cells9092008.

Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 28;18(9):1865. doi: 10.3390/ijms18091865.