



INSTITUTE  
FOR RESEARCH  
IN BIOMEDICINE

# PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA MITOFUSINA 2 (MFN2) EN LA INMORTALIZACIÓN Y TRASFORMACIÓN CELULAR

TRABAJO DE FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

---

Idoia Páramo Castillejo

Tutor académico: María del Carmen Portillo Guisado

En cooperación con: Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)

Supervisor: Juan Pablo Muñoz, Antonio Zorzano, Laboratorio Enfermedades  
Metabólicas y Mitocondria.

Septiembre de 2020

Yo, Idoia Páramo Castillejo ,con DNI 72840227D, soy concedora de la guía de prevención del plagio de la URV “*Prevenió, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017)” (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 30 de agosto de 2020



(signatura)

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>- 7 -</b>
2.1. Mitofusina 2 (Mfn2).....	- 8 -
2.2. Mfn2 y cáncer .....	- 9 -
2.3. Inmortalización y transformación de células humanas .....	- 11 -
Hipótesis de trabajo .....	- 14 -
Objetivos.....	- 14 -
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>- 15 -</b>
3.1. Cultivo celular .....	- 15 -
3.1.1. Células humanas:.....	- 15 -
3.1.2. Células de ratón:.....	- 16 -
3.2. Western Blot .....	- 16 -
3.3. Plásmidos utilizados.....	- 17 -
3.4. Transducción adenoviral de la proteína CRE-GFP .....	- 17 -
3.5. Producción de vectores retrovirales y lentivirales.....	- 18 -
3.6. Microscopía.....	- 18 -
3.7. Análisis de la proliferación celular .....	- 19 -
3.8. Análisis estadístico.....	- 19 -
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>- 20 -</b>
4.1. Generación de líneas inmortales de ratón LoxP Mfn2, mediante la expresión retroviral de la proteína SV40L.....	- 20 -
4.2. Generación de líneas inmortales humanas mediante la sobreexpresión retroviral de la transcriptasa de la telomerasa (hTERT). .....	- 21 -
4.3. Generación de líneas transformadas humanas mediante la sobreexpresión retroviral de SV40L o Ras G12V en fibroblastos humanos inmortalizados. ....	- 22 -
4.4. Detección de la proteína Mfn2 en fibroblasto de humano y ratón inmortalizados. ....	- 23 -
4.5. Detección de la proteína Mfn2 en fibroblasto de humano inmortalizados y transformados. -	25 -
4.6. Generación de fibroblasto knockout de ratón mediante la transducción adenoviral de la enzima Cre. ....	- 26 -
4.7. Generación de líneas de fibroblastos humanos knockdown para Mfn2 usando un vector lentiviral que contiene un shRNA dirigido al mRNA de Mfn2. ....	- 27 -
4.8. Detección de otras proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y el ciclo de Krebs, entre fibroblasto de humano y ratón inmortalizados.....	- 29 -

<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>6. PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>7. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>9. AUTOEVALUACIÓN .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>10. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA .....</b>	<b>- 39 -</b>
10.1. Protocolos .....	- 39 -
10.2. Figuras.....	- 47 -

## 1. RESUMEN

La Mitofusina 2 (Mfn2) es una GTPasa de la membrana externa mitocondrial, clave en el proceso de fusión mitocondrial; cuya deficiencia se ha asociado con algunos tipos de cáncer. Durante el proceso de biogénesis del cáncer se originan un conjunto de cambios de expresión génica, epigenéticos y metabólicos en la célula que conducen a la inmortalización y transformación celular.

Los cambios metabólicos originados en el proceso de inmortalización y transformación celular incrementan la utilización de aminoácidos, lípidos y glucosa por diferentes rutas metabólicas, a través de mecanismos de reprogramación metabólica celular. Mfn2 parece jugar un papel relevante en la reprogramación metabólica. Nuestro laboratorio ha demostrado que la pérdida de función de Mfn2 conduce a un incremento en la utilización de aminoácidos, tales como glutamina y cistina, por la célula.

En este proyecto nos interesa investigar en que paso del proceso de inmortalización y/o transformación celular, la proteína mitocondrial Mfn2 jugaría un papel relevante para conducir a un cambio metabólico requerido para sostener la proliferación celular. Con este fin, generamos una serie de líneas celulares inmortales a partir de cultivos primarios de piel de ratón y humano adulto.

Los resultados de este trabajo mostraron que la inmortalización de fibroblastos parentales de humano y ratón, produce un cambio fenotípico, caracterizado por; la disminución del tamaño celular, la formación de grupos de células, y el aumento de la proliferación. Interesantemente, la inmortalización de fibroblastos humanos parentales mediante la expresión de SV40L o Ras G12V, produce un aumento de la expresión de la proteína Mfn2. Similares resultados fueron observados en los fibroblastos de ratón inmortalizadas con SV40L.

Para investigar la participación de Mfn2 en el proceso de inmortalización, generamos células humanas knockdown en la expresión de la proteína Mfn2, utilizando un vector lentiviral que expresan un shRNA dirigido al mRNA de Mfn2. Nuestros estudios con cristal violeta mostraron que el silenciamiento de Mfn2 en células inmortales promueve la proliferación celular, indicando que esta proteína podría estar involucrada en potenciar el proceso de transformación celular.

Por otra parte, durante la inmortalización con SV40L, se incrementa la expresión de proteínas involucradas en el ciclo de Krebs, tal como la subunidad C de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHC), y en el metabolismo de aminoácidos, como la asparagina sintetasa (ASNS), cuyos genes son activados durante la reprogramación metabólica de aminoácidos.

Palabras clave: telomerasa, oncogenes, senescencia replicativa, reprogramación metabólica, fibroblasto

## 2. INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos cuyas funciones están asociadas con funciones esenciales para mantener la viabilidad celular; entre ellas, la síntesis de ATP, lípidos e intermediarios del ciclo de Krebs necesarios para la biosíntesis de aminoácidos<sup>1</sup>. En la célula, la red mitocondrial es continuamente remodelada a través del balance entre la fusión y fisión mitocondrial. Así, la morfología mitocondrial varía desde esferas individuales a tubos largos interconectados<sup>2</sup>.

La fisión mitocondrial implica la fragmentación de una mitocondria en dos entidades separadas, y es un proceso que involucra la membrana externa mitocondrial (OMM). El proceso de fisión mitocondrial no solo es un mecanismo para dar origen a nuevas mitocondrias, sino que su activación también se ha asociado con la disfunción mitocondrial que ocurre en algunas patologías. Una disminución de la respiración y potencial mitocondrial conduce a la inducción de la fisión mitocondrial como un mecanismo celular para el control de calidad mitocondrial. A través de este mecanismo se eliminan mitocondrias dañadas por alteraciones en el DNA mitocondrial o por la acumulación de estrés oxidativo.

Las proteínas responsables del proceso de fisión mitocondrial son:<sup>1</sup>

- La proteína citosólica Drp1, la cual mediante la directa interacción con el factor de fisión mitocondrial (Mff), Mid51 y Mid49 localizados en la OMM promueve la fisión de las mitocondrias.

Por otro lado, en la fusión mitocondrial se produce la unión de mitocondrias para formar una red mitocondrial elongada. Una red fusionada y continua está relacionada con una mayor producción de adenosín trifosfato (ATP), debido al acoplamiento optimizado de la cadena respiratoria mitocondrial; además, la fusión mitocondrial permite la mantención y estabilidad del DNA mitocondrial.

La fusión mitocondrial es un proceso único que involucra tanto la membrana externa mitocondrial (OMM) como la membrana interna mitocondrial (IMM), que deben ser reorganizadas de manera coordinada para mantener la integridad del organelo. Este proceso está mediado por:<sup>1</sup>

- Las GTPasas de la OMM Mitofusina 1 (Mfn1) y Mitofusina 2 (Mfn2), responsables de la fusión de la OMM, las cuales a través de un mecanismo de *tethering* (interacción entre dos membranas, mediada por factores de anclaje, que interactúan con ambas membranas) de proteínas permiten el acercamiento y fusión de las membranas mitocondriales externas.

- La GTPasa OPA1 (Optic atrophy 1), que media la fusión de la IMM.

El grupo de investigación donde he realizado el TFG ha demostrado que Mfn2 modula la utilización de glucosa. Además, pacientes con enfermedades metabólicas muestran una disminución en la expresión de esta proteína.<sup>3</sup> Nuestro interés es investigar como Mfn2 modula el metabolismo celular y, como los cambios de expresión de esta proteína modulan el metabolismo en diferentes modelos celulares.

## 2.1. Mitofusina 2 (Mfn2)

En mamíferos, la mitofusina 2 (Mfn2), y su homóloga la Mitofusina 1 (Mfn1), pertenecen a la familia de GTPasas transmembrana mitocondriales. Estas proteínas fueron caracterizadas por primera vez en *Drosophila melanogaster*, y en eucariotas, esta familia proteica tiene homólogos desde levaduras hasta humanos, con propiedades estructurales conservadas a lo largo de las diferentes especies.<sup>2</sup>

### Estructura de la proteína Mfn2

La Mfn2 es una proteína que se compone de 757 aminoácidos y es expresada de manera ubicua (se expresa en todos los tejidos). Su estructura contiene un dominio citosólico GTPasa largo en el extremo N-terminal, seguido de un dominio hélice superenrollada (HR1), una región rica en prolina (PR), dos dominios transmembrana (TM) secuenciales que atraviesan la OMM y un segundo dominio HR2 citosólico en el extremo C-terminal (Figura 1).<sup>4</sup>

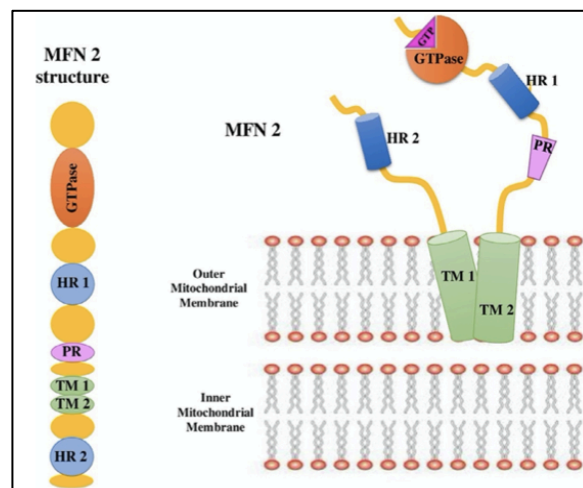


Figura 1. Estructura de la Mitofusina 2 (Mfn2).

### Funciones (Mfn2)

La Mfn2 además de tener un rol importante en la fusión mitocondrial, como se ha explicado anteriormente, posee distintas funciones:

1. Regulación del metabolismo energético y la abundancia de ROS. Mfn2 modula la respiración en células de cultivo en tejidos *in vivo*. La pérdida de función de Mfn2 ha sido asociada con un bajo potencial de la membrana mitocondrial, reducción del consumo de oxígeno, inhibición de la oxidación de glucosa, piruvato y ácidos grasos; y baja actividad enzimática de los complejos I, II, III y V de la cadena respiratoria. Además, la ausencia de Mfn2 está asociada a un aumento de los niveles de ROS.<sup>2,5</sup>
2. Mfn2 es un regulador clave en los lugares de contacto entre el retículo endoplasmático (ER) y mitocondria. Se proporciona así la base física para la intercomunicación entre estos organelos en la señalización del Ca<sup>2+</sup>. La sobreexpresión de Mfn2 induce apoptosis, lo que se ha relacionado con un contacto mitocondria-ER y transferencia de Ca<sup>2+</sup> excesivo.<sup>1, 6</sup>
3. Mfn2 regula la señalización de insulina. La pérdida de función de Mfn2 reduce el consumo de glucosa por los tejidos, aumenta los niveles de insulina en plasma e incrementa la resistencia a insulina en los tejidos, alterando la capacidad celular para responder a la insulina. En pacientes con Diabetes tipo II y Obesidad la expresión de Mfn2 se ve reducida.<sup>1, 7</sup>
4. Mfn2 está implicada en la autofagia y el control de calidad mitocondrial. La autofagia es esencial para el mantenimiento de la masa y función muscular, y disminuye durante el envejecimiento. El envejecimiento los niveles proteicos de Mfn2 se ve reducidos y esta alteración está asociada con una disminución de la autofagia.<sup>3, 8</sup>

## **2.2. Mfn2 y cáncer**

La alteración de la mitocondria causa múltiples enfermedades; normalmente, debido a deficiencias en la creación de energía en las células afectadas. Algunas de estas enfermedades son: LHON, MELAS, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 2A, Obesidad o Diabetes tipo II; y han sido asociadas con alteraciones en la expresión o mutaciones en el gen de Mfn2.

Asimismo, los desordenes mitocondriales pueden causar cáncer. Las células cancerosas están normalmente en un estado de estrés oxidativo crónico y metabólico. En cáncer de mama, bajo condiciones de prolongado estrés metabólico, se ha observado una reducción de Mfn2. Además, clínicamente, se ha correlacionado una

menor expresión de Mfn2 con más tumores de mama malignos; lo que apoya la propuesta del rol de Mfn2 como supresor de tumores.<sup>10</sup>

Varios mecanismos podrían justificar el rol de Mfn2 en el desarrollo y progresión de enfermedades neoplásicas:

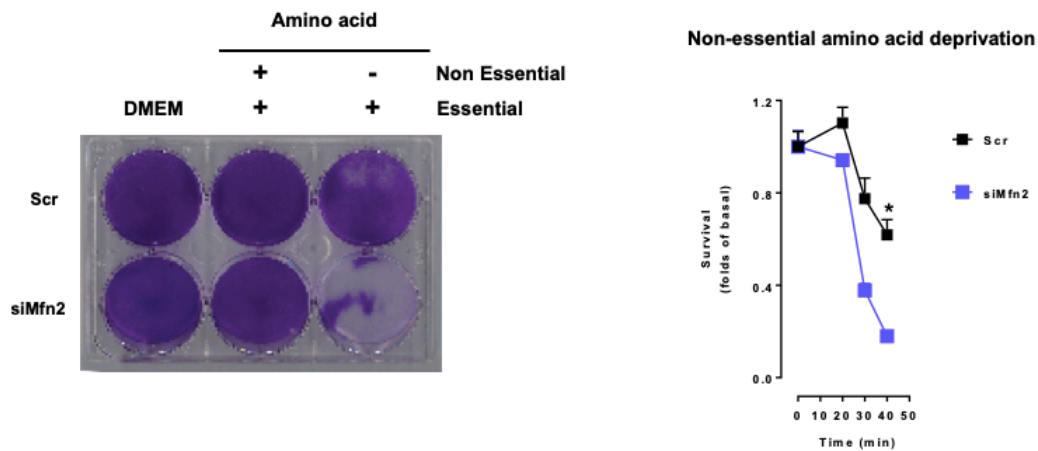
La mitocondria juega un papel central en la apoptosis, por lo que cualquier modificación en el sistema de fusión mitocondrial cambia la percepción de la mitocondria a los estímulos apoptóticos. Además, la proteína Mfn2 interactúa con componentes de la familia proapoptótica bcl-2, más concretamente con Bax y Bak. De hecho, se ha descrito que Mfn2 colocaliza con Bax, sugiriendo una acción de control en la apoptosis.

También se ha demostrado que la inhibición de Mfn2 aumenta la sensibilidad a apoptosis, mientras que la sobreexpresión de Mfn2 causa una suspensión de la respuesta apoptótica. Así, se cree que Mfn2 podría bloquear la proliferación y provocar apoptosis de una forma dependiente de la dosis y el tiempo.<sup>4</sup>

Por otro lado, Mfn2 tiene un rol fundamental en la regulación del calcio. Y varios resultados demuestran la habilidad de las células tumorales para influenciar la señalización de  $Ca^{2+}$  intracelular, promoviendo su proliferación y supervivencia. Además, la acción de Mfn2 en el flujo de  $Ca^{2+}$  podría ser relevante en el proceso de metástasis, debido a que  $Ca^{2+}$  es uno de los principales reguladores de la migración celular.<sup>4</sup>

Recientes estudios han demostrado que el silenciamiento de Mfn2 promueve la proliferación en cáncer de vejiga y metástasis; mediante la regulación de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.<sup>9</sup> Estos resultados indican que Mfn2 es un supresor de tumores candidato en cáncer de vejiga, y podría ser explorado como objetivo para potenciales tratamientos clínicos.<sup>10</sup>

En muchos tipos de cáncer se observan grandes alteraciones en la morfología mitocondrial, tales como fragmentación mitocondria y disminución el número de crestas mitocondriales, que han sido asociadas con cambios en el metabolismo de las células cancerosas. Entre los cambios en el metabolismo, se observan cambios de fosforilación oxidativa mitocondrial a glucólisis, efecto Warburg. En células de mioblasto C2C12 en las cuales se ha silenciado la expresión Mfn2, ocurre un cambio de metabolismo para un incremento en la utilización de aminoácidos, específicamente cistina y glutamina, y esto puede contribuir como parte del mecanismos asociado cáncer (Figura 2).



**Figura 2. Células knockdown para Mfn2 requieren aminoácidos para la supervivencia y proliferación.** A) Tinción cristal violeta de células de mioblasto C2C12 en las cuales se ha silenciado la expresión de Mfn2. La supervivencia celular se analizó después de 30 horas en ausencia de aminoácidos no esenciales. B) Curso temporal de la supervivencia celular de células en las cuales se ha silenciado la expresión de Mfn2. Scr; células control que expresan un shRNA Scrambler; siMfn2: células que expresan un shRNA Mfn2.

### 2.3. Inmortalización y transformación de células humanas

Uno de los muchos fenotipos que caracterizan a las células malignas es la habilidad de ignorar los mecanismos intrínsecos y extrínsecos que normalmente regulan el crecimiento celular.

Los fibroblastos humanos normales, *in vitro*, se dividen un número limitado de veces antes de entrar en un estado irreversible, denominado senescencia replicativa, en el que se detiene la proliferación, pero permanecen metabólicamente activos.<sup>11</sup>

Varias líneas de investigación identifican tres vías moleculares como reguladores críticos de la senescencia replicativa. Estos reguladores incluyen el mantenimiento de los telómeros y las vías de las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB.

#### Mantenimiento de telómeros

Los telómeros, son nucleoproteínas que constituyen el final de los cromosomas, y protegen a los cromosomas del reconocimiento de la maquinaria de reparación del DNA y otros daños. Estos se van acortando de manera constante en las progresivas divisiones celulares en células humanas. Este acortamiento se debe a que el DNA telomérico no se copia por completo en las divisiones celulares y a que la enzima responsable de mantenimiento de los telómeros, la telomerasa, está estrechamente reprimida en la mayoría de células somáticas humanas. En contraste, la mayoría de

células inmortalizadas humanas expresan telomerasa, y la longitud de los telómeros se mantiene estable.

La telomerasa es una ribonucleoproteína compuesta por una subunidad de RNA, hTERC, que es expresada de manera ubicua; y una subunidad catalítica que es una proteína transcriptasa inversa, hTERT; cuya expresión está correlacionada con la actividad telomerasa en células inmortales, como se ha descrito anteriormente.

La expresión ectópica de hTERT en fibroblastos humanos pre-senescentes confiere actividad telomerasa, lo que resulta en un alargamiento o estabilización de los telómeros, permitiendo que estas células sobrevivan a la senescencia replicativa. La sobreexpresión de hTERT ha sido ampliamente usada en la literatura como una herramienta para generar células humanas inmortales, sin que se originen alteraciones del cariotipo o un fenotipo de tumoral.

#### Proteínas supresoras de tumores y reguladores del ciclo celular

Aunque el mantenimiento de los telómeros tiene un rol importante en la senescencia replicativa, se ha reconocido que las vías supresoras de tumores p53 y pRB juegan un papel importante regulando el inicio de la senescencia replicativa.

Por ejemplo, la expresión de la proteína SV40LT (Simian Virus Large T oncoprotein), en células presenescentes, que inactiva ambas vías de supresión de tumores (pRB y p53), permite que estas células sobrevivan a la senescencia replicativa. Aunque estas células continúan reprimiendo hTERT y los telómeros se acortan con la proliferación celular.

En contraste con células que expresan telomerasa, las células en las que las vías pRB y p53 han sido perturbadas no son inmortales, pero atraviesan la senescencia replicativa, hasta llegar a una segunda barrera proliferativa, denominada crisis celular. La crisis celular se distingue de la senescencia en que la muerte celular ocurre en presencia de división celular. La crisis ocurre debido al acortamiento crítico de los telómeros que han perdido su habilidad de proteger a los cromosomas, en el contexto de la pérdida de p53.

Apoyando esta hipótesis, las células inmortales que han sobrevivido la crisis, presentan longitudes teloméricas estabilizadas, sugiriendo que solo las células que mantienen longitudes teloméricas estables sobreviven. De este modo, la sobreexpresión de hTERT mas SV40L es utilizada como un modelo de immortalización de células humanas, en el

cual se produce la inhibición de la senescencia replicativa e activación de la fase S del ciclo celular.

Es importante destacar que las células inmortales que han atravesado la crisis no son células transformadas, y fallan en la producción de tumores, aunque presenten anormalidades cromosómicas y alteraciones en la función de las vías supresoras de tumores pRB y p53.<sup>12</sup> Entendiéndose como célula transformada, aquella que ha sufrido una reprogramación celular, provocando una proliferación descontrolada, con la habilidad de producir tumores.

Así, se sabe que la adquisición del estado inmortal es requerida, pero no suficiente, para la transformación celular con oncogenes. La introducción de pares de oncogenes como *myc* y *ras* a cultivos celulares primarios de roedores lleva a una transformación celular directa. Por otro lado, en fibroblastos humanos la expresión de *myc* y *ras* induce cambios en la morfología celular, pero falla en la producción de tumores, y finalmente entra en un estado de retención de la proliferación.

Las células de ratones, al contrario que en la mayoría de células humanas, expresan actividad telomerasa detectable, y se observa que los telómeros se mantienen mucho más tiempo que en humanos. Estas observaciones sugieren que en la esperanza de vida replicativa de ratones no está limitada por la longitud de los telómeros.

Por lo tanto, los oncogenes que transforman fibroblastos murinos a células transformadas fallan a la hora de transformar células humanas, debido a la pérdida de los telómeros, que limita la esperanza de vida replicativa de estas.<sup>11</sup>

Se ha demostrado que la coexpresión de hTERT junto con SV40 y el alelo oncogénico Hras, permite la transformación de células humanas, confirmando el rol de la telomerasa en la transformación de células humanas.<sup>13</sup>

La generación de líneas celulares inmortalizadas y/o transformadas a partir de cultivos primarios (parentales) presenta varias ventajas:

- Las líneas celulares obtenidas provienen de cultivos primarios de tejidos adulto, los cuales son tejidos terminalmente diferenciados.
- Las células humanas inmortalizadas y /o transformadas mediante la transducción de hTERT, SV40L y Ras G12V permiten estudiar la biogénesis del cáncer usando la

expresión de factores proteicos que se han visto involucrados en la formación de tumores.

- La producción de líneas celulares inmortales y/o transformadas a partir del cultivo primario de origen parental permite estudios moleculares de células con el mismo background genético. Esto es una gran ventaja en comparación a modelos celulares utilizados rutinariamente; ya que en la mayor parte de los casos no se conoce con precisión célula parental de donde provienen estas líneas tumorales.
- El mismo origen parental de estas líneas celulares permite analizar a través del tiempo los cambios genómicos, de expresión génica o epigenética que se originan durante la transformación y/o immortalización de una célula parental.

El presente TFG tiene como objetivo investigar los cambios mitocondriales y metabólicos que se originan durante el proceso de immortalización y transformación celular. Para ello generamos una serie de líneas celulares inmortales a partir de cultivos primarios de piel de ratón y humano adulto. Nuestra meta es investigar en que paso del proceso de immortalización y/o transformación la proteína mitocondrial Mfn2 jugaría un papel relevante para conducir a un cambio metabólico celular requerido para sostener la proliferación de estas células.

### **Hipótesis de trabajo**

La pérdida de función de Mfn2 favorece la immortalización y/o transformación celular.

### **Objetivos**

1. Generar líneas celulares immortalizadas y/o transformadas mediante la traducción retroviral de hTERT, SV40L y Ras G12V.
2. Determinar en qué etapa de la immortalización/transformación celular disminuyen los niveles de expresión de Mfn2. Para ello se analizarán los cambios en la expresión de Mfn2 y otras proteínas del metabolismo que participan en la dinámica mitocondrial mediante Western blot en los distintos modelos celulares generados.
3. Analizar la participación de Mfn2 en la proliferación celular. Con este objetivo, se silenciará la expresión del gen de Mfn2 en los modelos celulares mencionados previamente utilizando shRNA (short harpin RNA) dirigido al gen de Mfn2.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo celular

Se generaron líneas celulares inmortalizadas/transformadas a partir de cultivo primario de fibroblasto de piel de humano y de ratón adulto (Figura 3).

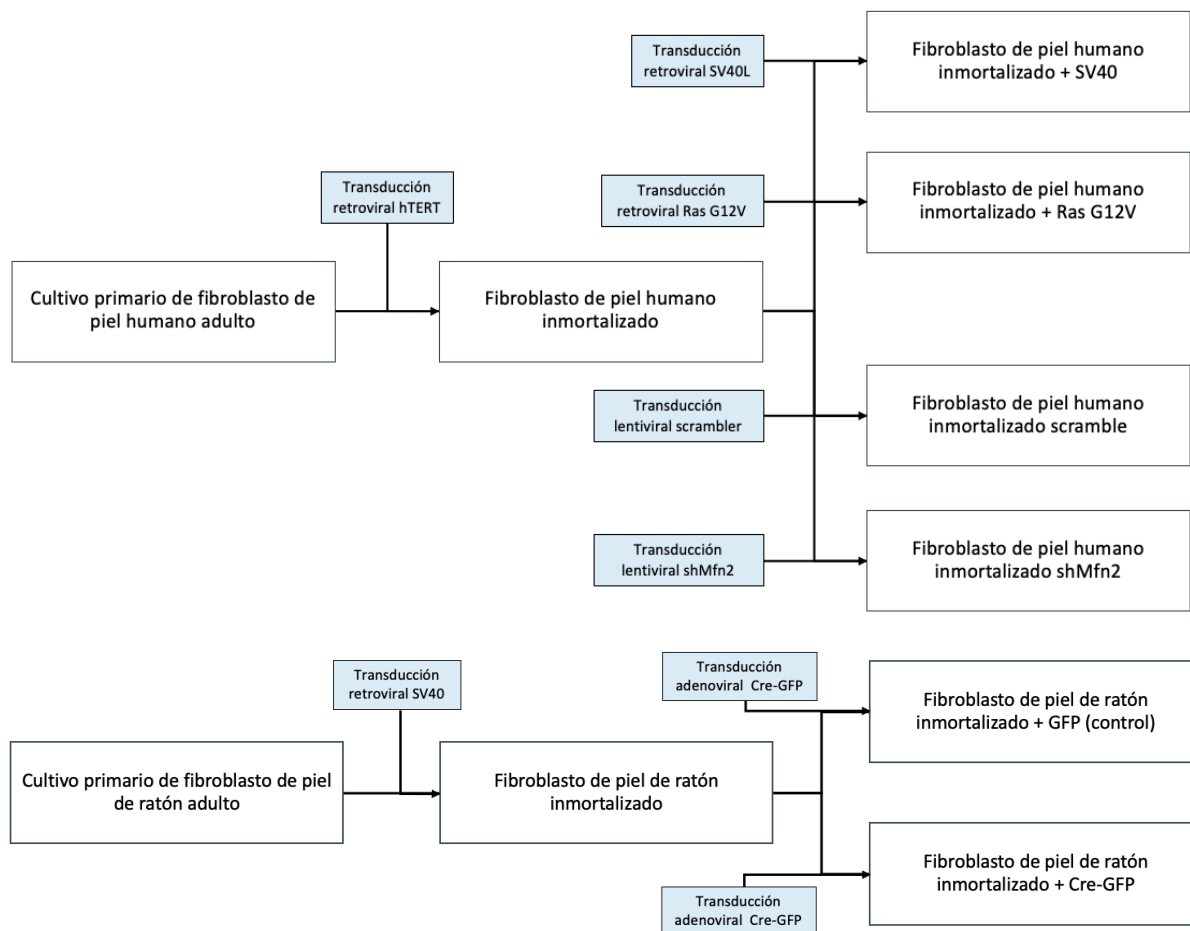


Figura 3. Líneas celulares generadas.

##### 3.1.1. Células humanas:

Fibroblastos de piel humanos adultos fueron adquiridos de Cell Application INC, 106-05A. Para generar las líneas inmortales humanas, los cultivos primarios de fibroblastos humanos fueron transducidos con un vector de expresión retroviral de la transcriptasa de la telomerasa (hTERT). Además, a partir de los fibroblastos humanos inmortalizados se generaron líneas transformadas humanas mediante la sobreexpresión retroviral de SV40L o Ras G12V.

Por otra parte, para analizar los efectos de la pérdida de función de Mfn2 en células humanas, también se generaron líneas de fibroblastos humanos knockdown para Mfn2; mediante un vector lentiviral que codifica un shRNA dirigido al mRNA de Mfn2 humano.

### **3.1.2. Células de ratón:**

Los cultivos primarios de fibroblastos de piel de ratón fueron obtenidos a partir de explantes de piel de ratones adultos de 3 meses de edad. Estos ratones han sido modificados genéticamente mediante la adición de 2 secuencias de recombinación LoxP que flanquean al gen de Mfn2<sup>14</sup>. A partir de los fibroblastos de ratón adulto se generaron líneas inmortales de ratón mediante vectores retrovirales que expresaban la proteína SV40L. Además, se generaron células knockout para Mfn2 a partir de fibroblastos immortalizados con SV40L, mediante la transducción adenoviral de la enzima Cre.

Las células fueron cultivadas en medio DMEM (11966-025) (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Thermo Fisher Scientific™) con 10% de suero bovino fetal, penicilina/estreptomicina (100U/ml); en una atmósfera humidificada a 37°C, bajo condiciones del 5% CO<sub>2</sub> en aire.

Además, el medio de cultivo fue suplementado con MEM 10X (aminoácidos no esenciales) y 2-mercaptoetanol 0,5mM (31350-010).

Para la manipulación de las células se trabajó en un ambiente estéril en la Cabina de seguridad microbiológica de Clase II Bio II Advance Plus (Telstar®).

Por otro lado, la producción de los diferentes virus y la manipulación de células con estos se realizó en la Cabina de seguridad biológica tipo II A/B CYTOSTAR 12321, TELSTAR®. Con medidas de seguridad nivel 2 (BL2).

El cultivo celular de fibroblastos ratón se realizó siguiendo el protocolo 1.

### **3.2. Western Blot**

El análisis de la expresión proteica de las distintas líneas celulares fue realizado mediante la técnica Western Blot. La cuantificación total de proteína de las muestras se realizó a través del Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

Para la electroforesis se fraccionaron 30 µg de proteína de cada línea celular en geles de acrilamida al 10% (porcentaje óptimo para detectar la Mfn2 y α-tubulina), y al 15% para detectar proteínas de interés de menor masa molecular.

El revelado de membrana fue llevado a cabo mediante el ECL™ Western Blotting Reagents, y el sistema Odyssey® Fc.

La cuantificación de las bandas reveladas mediante el Odyssey® Fc se realizó con el software Image Studio™ Lite Software.

Los anticuerpos utilizados, fueron los descritos en la Tabla 1:

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados**

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Mitofusina 2	Mitofusin-2 Rabbit Ab, (#9482, Cell Signaling Technology®)	Donkey Anti-Rabbit IgG (HRP), (#711-035-152, Jackson ImmunoResearch)
Dilución	1:10000	1:10000
α -tubulina	Monoclonal anti-α-Tubulin mouse Ab, (T5168, Sigma-Aldrich™)	Goat Anti-Mouse IgG (HRP), (#A4416, Sigma- Aldrich™)
Dilución	1:10000	1:10000
SDHC	Anti-SDHC mouse Ab, (#MBS9216068, MyBioSource)	Donkey Anti-Rabbit IgG (HRP), (#711-035-152, Jackson ImmunoResearch)
Dilución	1:1000	1:10000
Asparagine Synthetase	Asparagine Synthetase Rabbit Ab (#20843, Cell Signaling Technology®)	Donkey Anti-Rabbit IgG (HRP), (#711-035-152, Jackson ImmunoResearch)
Dilución	1:1000	1:10000

Esta técnica fue realizada siguiendo el Protocolo 2.

### 3.3. Plásmidos utilizados

Se utilizaron los plásmidos comerciales pBABE-puro SV40 LT (#13970, addgene), pCL-Eco (#12371, addgene), pAmpho (#15799, addgene), pBABE-neo largeTcDNA (#1708, addgene), pBabe-vHras-zeo (#17756, addgene) y pBABE-hygro-hTERT (#1773, addgene) para la producción de los distintos vectores retrovirales. La generación de lentivirus se realizó mediante los plásmidos psPAX2 (#12260, addgene), pMD2.G (#12259, addgene) y pLKO.1-puro Scrambler (#SHC001V), o siMfn2 (sh82684) estos últimos de MISSION® Sigma- Aldrich™.

Los mapas de los plásmidos se encuentran en el apartado Figuras de los Anexos.

### 3.4. Transducción adenoviral de la proteína CRE-GFP

Para general las células de ratón knockout de Mfn2, realizó la transducción adenoviral de la proteína Cre recombinasa fusionada a la proteína fluorescente verde (Ad5Cre-GFP) y el control, solo GFP; a células de ratón inmortalizadas con SV40L. Para la transducción adenoviral se utilizó una concentración de 200 MOI de virus por célula. Los

vectores adenovirales fueron obtenidos de la Unidad de Vectores Virales (University of Iowa).

### **3.5. Producción de vectores retrovirales y lentivirales**

Los lentivirus y los retrovirus fueron producidos en células HEK 293T. Para la producción de vectores retrovirales de ratón las células fueron transfectadas con el vector de empaquetamiento viral ecotrópico, pCL-Eco y pBABE-puro SV40 LT, que contiene la secuencia codificante del antígeno T largo SV40. Para la producción de retrovirus humanos se utilizó un plásmido pAmpho con tropismo para células humanas.

La producción lentiviral se realizó mediante los plásmidos de empaquetamiento lentiviral de segunda generación psPax2, que contiene los genes de Gag, Pol, Rev, y Tat; y pMD2.G, que contiene un gen que codifica para VSV-G y pLKO.1 puro Scrambler o pLKO.1 puro si Mfn2, el cual es un vector lentiviral que expresa un shRNA dirigido al gen de Mfn2.

Además, en ambos casos se utilizó el polímero de transfección PEI MAX 40K, y NaCl 150mM. Los virus fueron cultivados en una atmósfera humidificada a 37°C, al 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>. A las 24h las células fueron trasladadas a un ambiente humidificado a 33°C, al 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>, favoreciendo así la exocitosis de los distintos virus en el medio, donde fueron recolectados.

El proceso de producción, infección y selección de virus se encuentra detallado en el protocolo 3.

### **3.6. Microscopía**

Para observar la viabilidad celular y determinar el número de células se utilizó un microscopio Eclipse TS100 (Nikon) y se hicieron micrografías con aumentos utilizando objetivos de 10X y 20X. El número de células fue determinando mediante el uso de una Cámara de Neubauer. Las células en suspensión fueron contadas utilizando un objetivo 4X, se contabilizaron los 4 cuadrantes laterales y se obtuvo el promedio de células por cuadrante ( $\bar{X}$ ). El número de células por ml se calculó mediante la fórmula:

Recuento cámara de Neubeauer:  $\bar{X}$  de los 4 cuadrantes  $\times$  10.000 = N° células/ml

Para analizar la morfología de las distintas líneas celulares se utilizó un microscopio invertido de campo claro y epifluorescencia (Inverted Routine Microscope ECLIPSE Ts2-

FL, Nikon). Las células fueron analizadas con un objetivo de 10 y 20X; para detectar la fluorescencia de la proteína fluorescente verde (GFP) se utilizó un filtro BP520/60nm.

### **3.7. Análisis de la proliferación celular**

El análisis de la proliferación celular de las diferentes líneas celulares generadas se realizó mediante la técnica de tinción cristal violeta. Se contaron 200.000 células de cada línea celular y se sembraron en pocillos de 35 mm. Trascorridos 72h de cultivo, se quitó el medio y se eliminaron las células muertas. Las células adheridas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 min y luego se tiñeron por 1h con Cristal Violeta al 0,2%. Después de varios lavados con PBS1X, las células se incubaron con ácido acético al 10% para liberar el Cristal Violeta asociado a las células fijadas.

Finalmente, se determinó la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro de placas de 96 pocillos Sunrise, Tekan. Los detalles de esta técnica se describen en el protocolo 4 de la información suplementaria.

### **3.8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de, al menos, 3 replicados de cada condición experimental fue realizado por medio de la prueba t de Student, pareado y de 2 colas. Un valor  $p \leq 0,05$  fue considerado significativo. Los gráficos son representados como el promedio  $\pm$  SEM (error estándar).

## 4. RESULTADOS

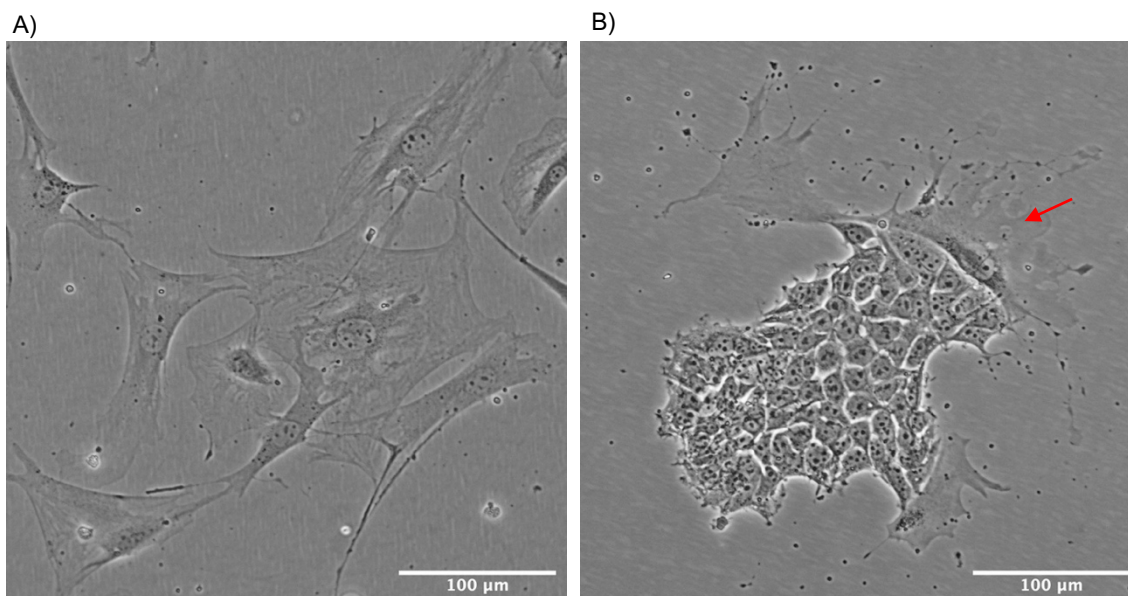
### 4.1. Generación de líneas inmortalizadas de ratón LoxP Mfn2, mediante la expresión retroviral de la proteína SV40L.

Con el fin de investigar las alteraciones celulares inducidas durante el proceso de immortalización celular, utilizamos como modelo cultivos primarios de fibroblastos de piel proveniente de ratón macho adulto LoxP Mfn2, de 3 meses de edad.

Estos cultivos primarios de células de fibroblasto fueron immortalizados mediante la expresión retroviral del antígeno L derivado del papilomavirus SV40. La proteína del Antígeno L de SV40 expresada en el vector retroviral, interactúa e inhibe la actividad de la proteína p53 y retinoblastoma (RB); conduciendo a la desregulación del ciclo celular, y provoca la proliferación celular <sup>11</sup>.

Las células que sobreexpresaban el antígeno L y coexpresan el gen de selección Neo (aminoglicosido 3-trasferasa) fueron seleccionadas con el antibiótico neomicina (Figura S4).

Mediante microscopía óptica, se observaron cambios en el fenotipo entre el cultivo primario de fibroblasto y el cultivo de fibroblasto immortalizado con SV40L. En el fibroblasto parental (Figura 4A), se observó una célula de dimensiones  $20.239 \mu\text{m}^2$ , completamente diferenciada, caracterizada por proyecciones citoplasmáticas delgadas (filopodios), y prolongaciones anchas y laminares (lamedipodios).



**Figura 4. A) Fibroblasto de ratón parental (cultivo primario) 10X. B) Fibroblasto de ratón immortalizado con SV40L 10X.** La flecha indica un fibroblasto que mantiene el fenotipo parental a partir del cual se originó una colonia de células inmortalizadas.

Por otra parte, en los cultivos de fibroblastos inmortalizados con SV40L, se observó pérdida de la diferenciación celular, las células muestran un fenotipo redondeado y crecen formando grupos de células. Además, se observó una disminución significativa del tamaño celular,  $261 \mu\text{m}^2$ ; comparativamente, una célula transformada es 10 veces de menor tamaño que la célula parental.

Por otra parte, se observó la aparición de nuevas células inmortales a partir del fibroblasto parental que ha adquirido SV40L (Figura 4B), estas células crecen cerca del fibroblasto parental y representan la aparición de un clon de células inmortalizadas.

#### **4.2. Generación de líneas inmortales humanas mediante la sobreexpresión retroviral de la transcriptasa de la telomerasa (hTERT).**

De manera paralela a la generación de líneas inmortales de ratón, se generaron líneas inmortales de fibroblasto humano mediante la expresión retroviral de la transcriptasa de la telomerasa, hTERT. Esta enzima mantiene la replicación de los telómeros celulares y mantiene la proliferación celular evitando la senescencia <sup>11</sup>. El vector retroviral además sobreexpresa el gen higromicina fosfotransferasa, que otorga resistencia a la higromicina, antibiótico que fue utilizado para la selección de las células que co-expresan hTERT.

Mediante el análisis por microscopia se observó un cambio de fenotipo entre el cultivo primario de fibroblasto y el cultivo de fibroblasto inmortalizado de piel de humana. En el fibroblasto parental (Figura 5A), se observó una células de grandes dimensiones  $32.200 \mu\text{m}^2$ , alargadas debido a la aparición de proyecciones citoplasmáticas delgadas (filopodios).

Por otra parte, en el fibroblasto inmortalizado que sobreexpresa hTERT, se observó pérdida de la diferenciación celular, y una reducción considerable del tamaño celular  $5.000\mu\text{m}^2$ . Además, se observa la formación de nuevas células en colonias a partir del fibroblasto parental que ha adquirido hTERT (Figura 5B).

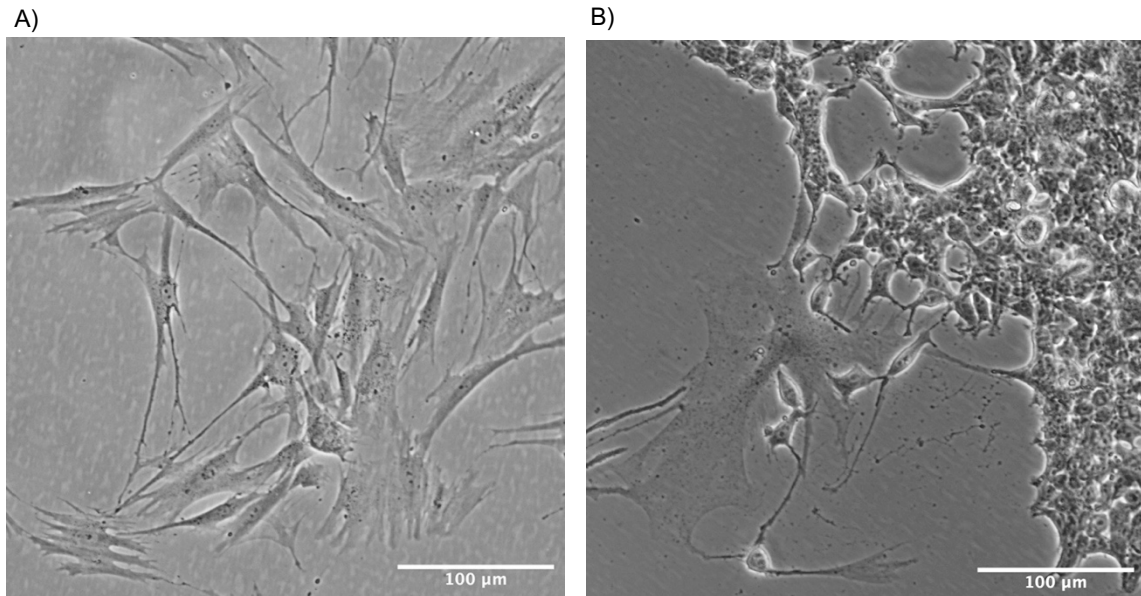


Figura 5. A) Fibroblasto de piel humana parental 10X. B) Fibroblasto de piel humana inmortalizado mediante la sobreexpresión hTERT 10X.

Por otro lado, se realizó el estudio de la proliferación celular en un tiempo de 72 horas, partiendo de 200.000 células sembradas; mediante la técnica de tinción cristal violeta. Los resultados utilizando esta aproximación experimental mostraron que la adquisición de hTERT produce un aumento de la proliferación celular 40 veces mayor en células inmortalizadas respecto a las parentales (Figura 6).

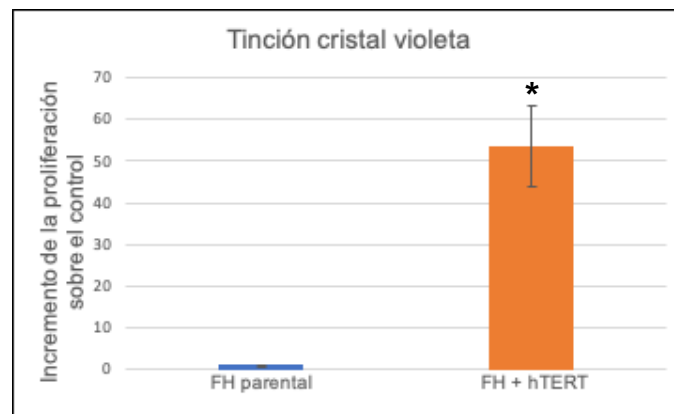


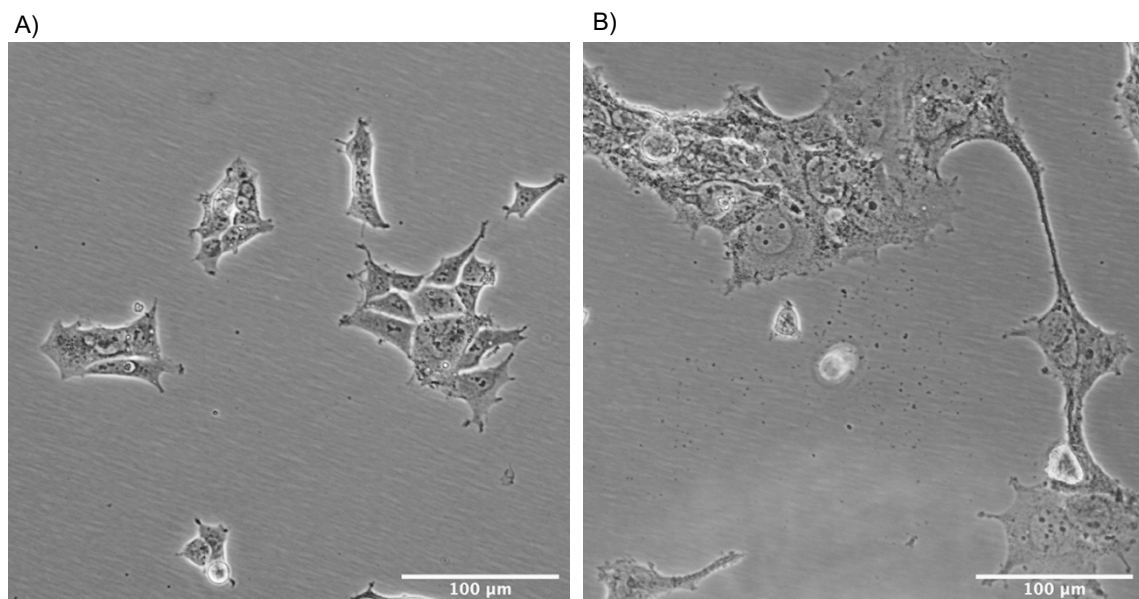
Figura 6. Incremento en la proliferación celular de fibroblastos humanos que sobreexpresan hTERT. Comparación de la proliferación celular en 72 horas, entre fibroblasto humano parental y fibroblasto humano inmortalizado con hTERT, mediante la técnica tinción violeta. Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, n=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .

#### 4.3. Generación de líneas transformadas humanas mediante la sobreexpresión retroviral de SV40L o Ras G12V en fibroblastos humanos inmortalizados.

Diversas investigaciones han demostrado que el proceso de inmortalización y transformación de células humanas requiere la pérdida de función o mutación de varios genes involucrados en proliferación, replicación y reparación del DNA entre otros

procesos. Con el objetivo de inducir un proceso de transformación secuencial se generaron fibroblastos humanos inmortalizados que expresaban la proteína SV40L o Ras G12V a partir de fibroblastos inmortalizados con la transcriptasa de la telomerasa. Las células que adquirieron SV40L o Ras G12V, fueron seleccionadas mediante los antibióticos geniticina y zeocina, ya que coexpresan los genes de resistencia a estos antibióticos respectivamente.

Mediante el análisis de microscopia se observó que ambas líneas celulares presentan un fenotipo similar a las células inmortalizadas solo con hTERT (Figura 7).



**Figura 7. Micrografías de células de fibroblasto de piel humana inmortalizados: A) Fibroblasto humano inmortalizado con hTERT + SV40. B) Fibroblasto humano inmortalizado con hTERT + Ras G12V. Magnificación 10X.**

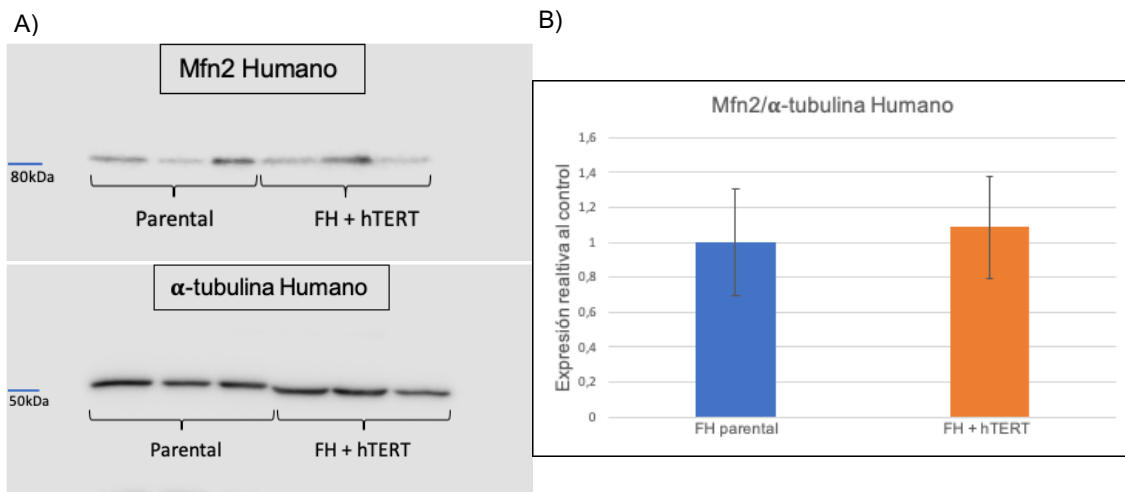
#### **4.4. Detección de la proteína Mfn2 en fibroblasto de humano y ratón inmortalizados.**

En este proyecto nos interesa investigar la participación de Mfn2 en el proceso de biogénesis de la inmortalización y transformación celular. Nuestra primera aproximación experimental para el análisis de esta proteína fue la detección de los niveles de expresión de Mfn2 en células parentales e inmortalizadas.

Para ello, se realizó la extracción de proteína de las líneas celulares inmortales y de las células parentales. Posteriormente, las proteínas fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida al 10% y se inmunodetectó la proteína mitocondrial Mfn2 de 85 kDa. Los resultados obtenidos mediante western blot fueron normalizados mediante el estudio de

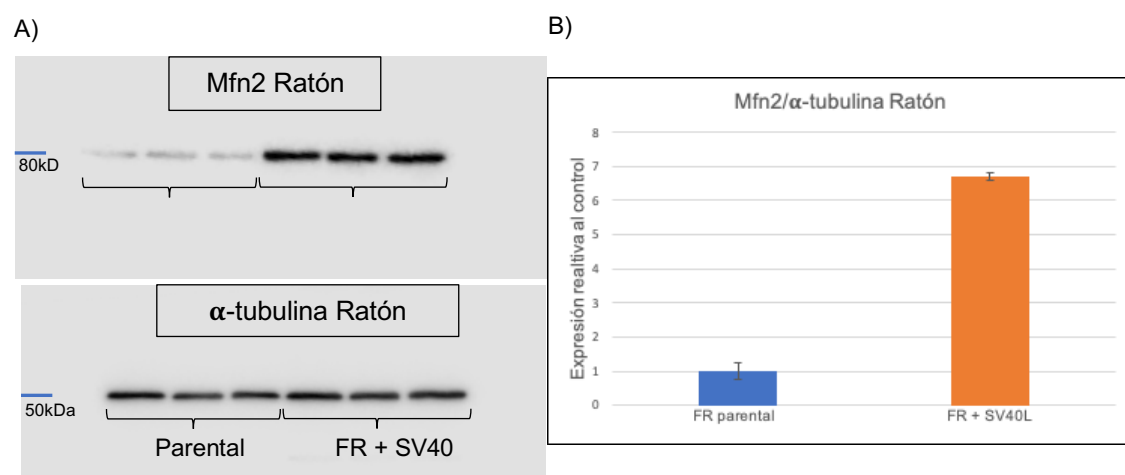
la expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina de 55kDa; una proteína esencial de las células eucariotas que se expresa en de manera constitutiva y en altos niveles.

En células de humano, no se observó una diferencia significativa entre la expresión de la proteína Mfn2 en células parentales e inmortalizadas con hTERT (Figura 8). Indicando que la sostenida amplificación de los telómeros celulares no provoca alteraciones en la expresión de Mfn2.



**Figura 8. La inmortalización de fibroblastos humanos con hTERT no provoca alteraciones en la expresión de Mfn2. A) Western blot Mfn2 y  $\alpha$ -tubulina en humano. B) Cuantificación de la expresión de la proteína Mfn2 entre fibroblasto humano parental y fibroblasto humano inmortalizado con hTERT. Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, N=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .**

Por otra parte, se observó un incremento significativo de la expresión de Mfn2 respecto a las células parentales (Figura 9) en células de ratón inmortalizadas con SV40L.

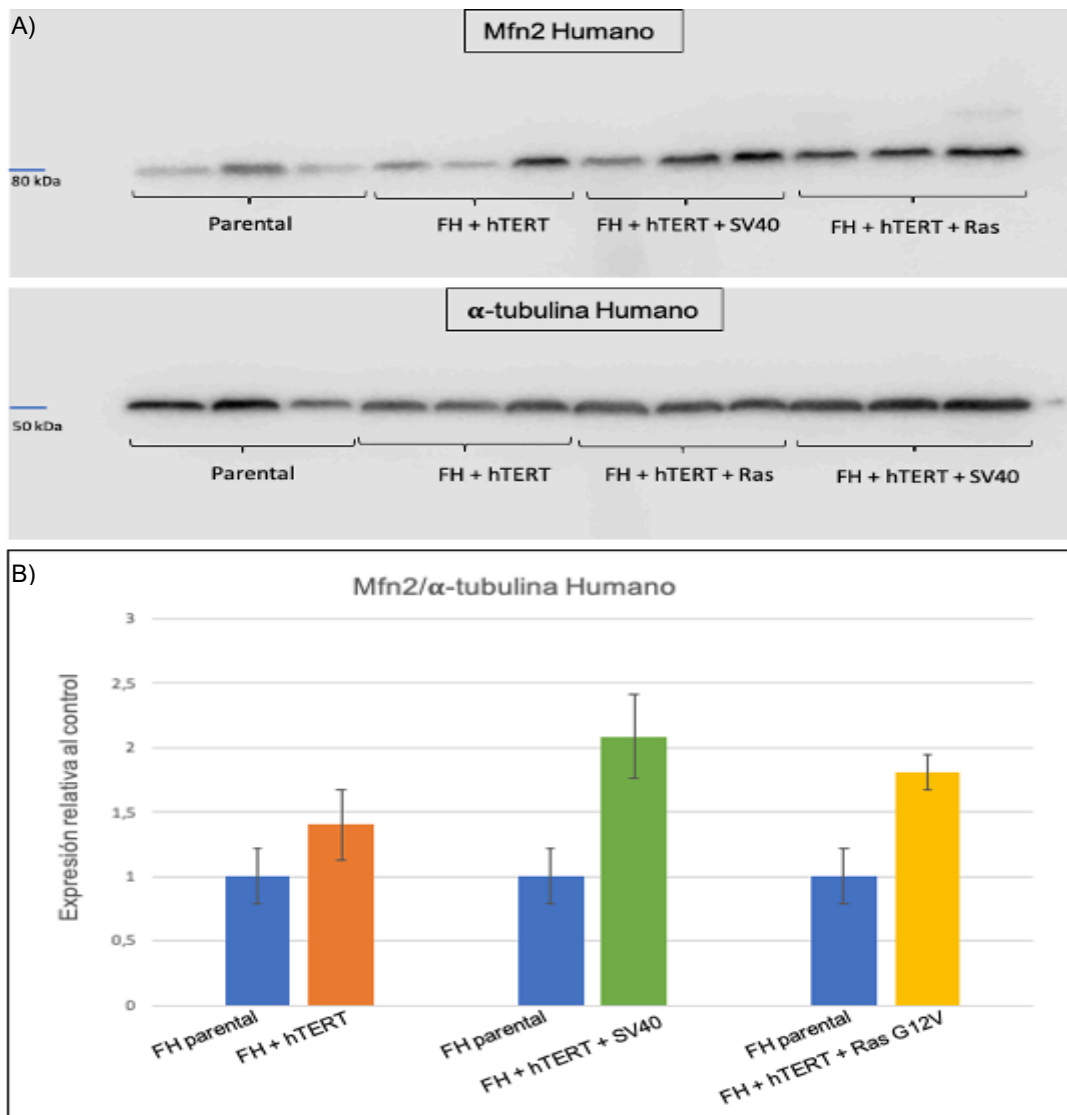


**Figura 9. Los niveles de Mfn2 incrementan en fibroblastos de ratón inmortalizados con SV40L. A) Western blot Mfn2 y  $\alpha$ -tubulina en ratón. B) Comparación Mfn2 normalizada entre fibroblasto de ratón parental y fibroblasto de ratón inmortalizado con SV40L. Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, n=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .**

#### 4.5. Detección de la proteína Mfn2 en fibroblasto de humano inmortalizados y transformados.

Para investigar si la expresión SV40L y Ras G12V inducen alteraciones en la expresión de Mfn2, se analizó la expresión de la proteína Mfn2 en las líneas celulares humanas que sobreexpresan hTERT +SV40L o hTERT +Ras G12V, en paralelo a las células parentales.

El análisis de los niveles de Mfn2 por Western blot mostró que la expresión de esta proteína incrementa considerablemente en células inmortalizadas con hTERT +SV40L o hTERT +Ras G12V comparadas a las células parentales (Figura 10).



**Figura 10. La inmortalización celular induce un incremento en la expresión de Mfn2** A) Western blot Mfn2 y  $\alpha$ -tubulina en humano. B) Niveles normalizados por tubulina de la proteína Mfn2 fibroblasto humano parental, fibroblasto humano inmortalizado con hTERT, fibroblasto humano inmortalizado hTERT + SV40L o hTERT+ Ras G12V. Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, n=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .

Por otro lado, las células inmortalizadas solo con hTERT presentan un incremento sutil en la expresión de Mfn2 respecto a los fibroblastos parentales, a diferencia de los resultados observados anteriormente (Figura 8).

#### 4.6. Generación de fibroblasto knockout de ratón mediante la transducción adenoviral de la enzima Cre.

Con el objetivo de investigar la participación de Mfn2 en la proliferación celular, se generaron fibroblastos knockout de ratón. Para ello los fibroblastos adulto LoxP Mfn2 inmortalizados con SV40L fueron transducidos con un adenovirus que contiene la secuencia codificante de la enzima Cre fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP). Además se obtuvo células control mediante la transducción adenoviral de la proteína fluorescente verde (GFP).

Como se observa en la figura 11, las células transducidas que expresan la enzima Cre muestran fluorescencia solo en el núcleo, debido a una secuencia señal que dirige esta proteína hacia el núcleo.

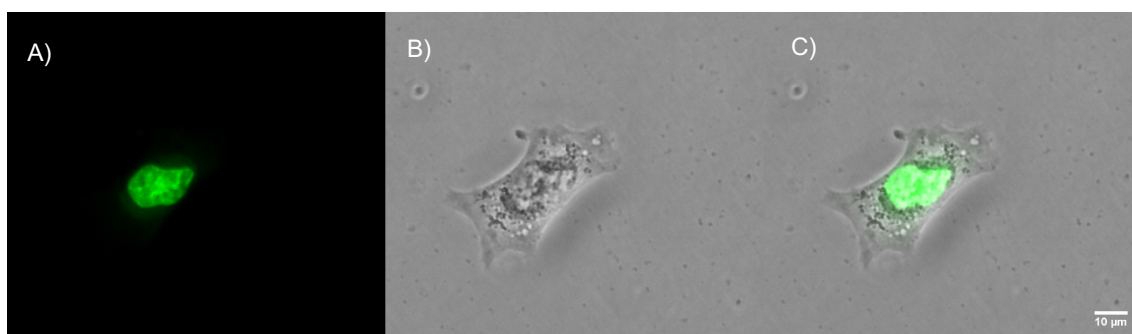


Figura 11. Expresión de la proteína Cre-GFP en fibroblastos de ratón inmortalizados con SV40L. A) Micrografía de fibroblasto knockout de ratón mediante la transducción adenoviral de la enzima Cre-GFP, B) Micrografía en contraste de fibroblasto knockout de ratón mediante la transducción adenoviral de la enzima Cre C) Superposición de las micrografías . Magnificación 20X.

Por otro lado, en las células control se observa fluorescencia en toda la célula (Figura 12). Estas células generadas serán un modelo para el estudio de la supresión de Mfn2 en un modelo murino en el proceso de inmortalización y/o transformación celular.

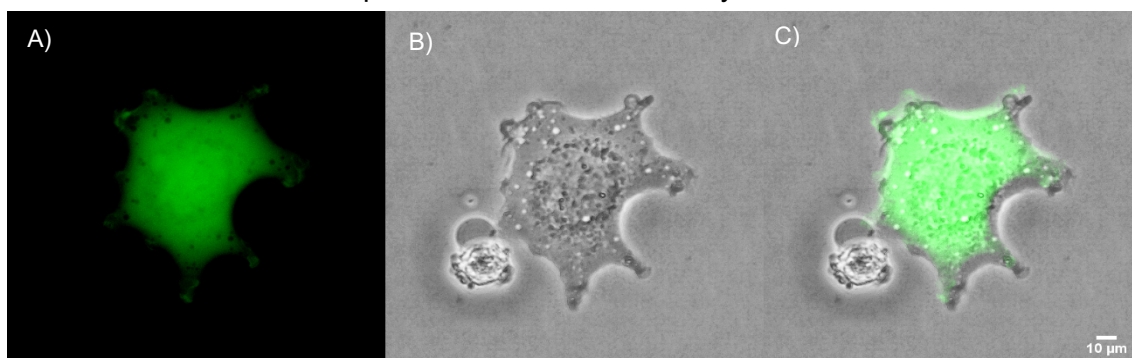
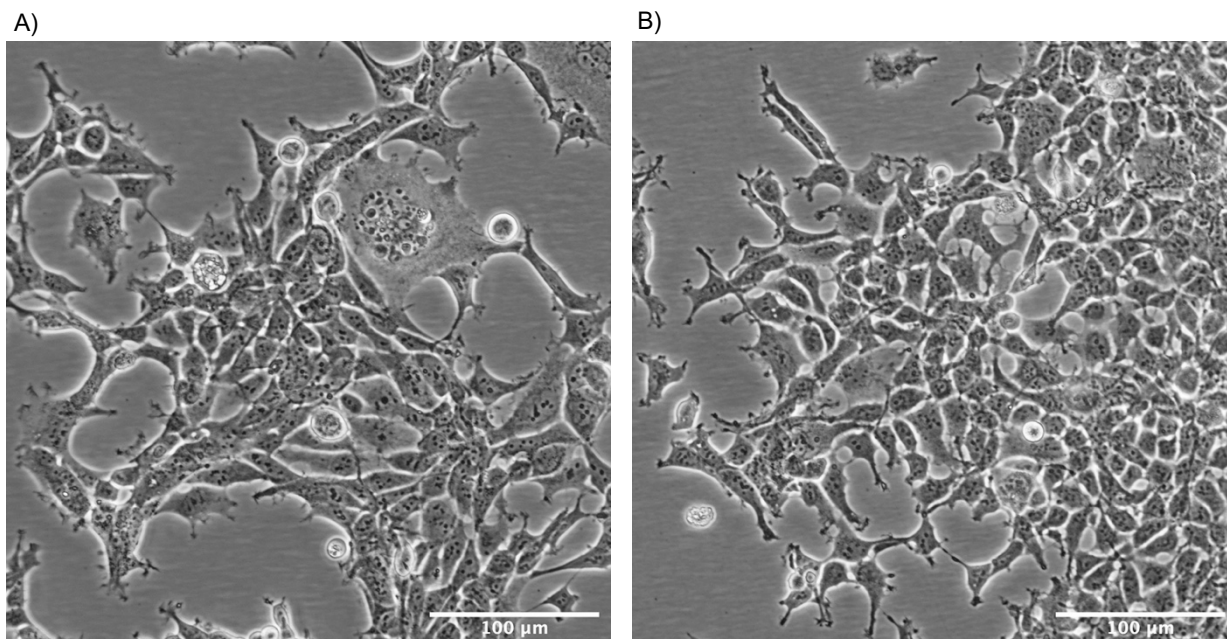


Figura 12. . Expresión de la proteína GFP en fibroblastos de ratón inmortalizados con SV40L. A) Micrografía de fibroblasto de ratón, transducción adenoviral de la proteína GFP, B) Micrografía en contraste de fibroblasto de ratón, transducción adenoviral de la proteína GFP C) Superposición de las micrografías . Magnificación 20X.



**Figura 13. A) Fibroblasto humano + hTERT Scrambler 10X. B) Fibroblasto humano knockdown para Mfn2 (sh82684) 10X.**

#### **4.7. Generación de líneas de fibroblastos humanos knockdown para Mfn2 usando un vector lentiviral que contiene un shRNA dirigido al mRNA de Mfn2.**

A partir de fibroblastos humanos inmortalizados con la transcriptasa de la telomerasa se generaron células knockdown de Mfn2, mediante la expresión lentiviral de un shRNA dirigido a Mfn2. Además, se generaron células control con un vector lentiviral que contiene un shRNA scrambler, que no tiene homología con secuencias de RNA de humano.

Los vectores lentivirales pLKO contiene un gen de resistencia al antibiótico puromicina para la selección de las células que incorporaron el lentivirus.

Mediante el análisis de por microscopia no se advierte ningún cambio en fenotípico en las células shMfn2 comparadas a las células Scr o con las células inmortalizadas con hTERT (figura 10).

Con el fin de observar la eficiencia del silenciamiento de Mfn2 en las líneas celulares, se analizó la expresión de esta proteína mediante Western blot. Se observó que la expresión de Mfn2 disminuye significativamente en un 90% en las células knockdown para Mfn2 comparadas a las células Scr (figura 14).

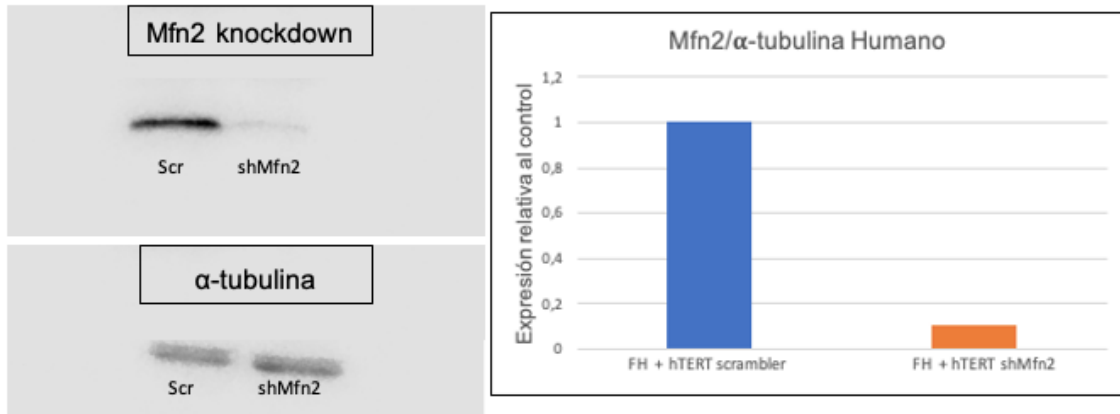


Figura 14. Knockdown de la expresión de Mfn2 en células de fibroblasto humanos hTERT. A) Western blot Mfn2 en humano. B) Comparación de la expresión de Mfn2 entre fibroblasto humano inmortalizado knockdown para Mfn2 y Scrambler.

Con el objetivo de investigar si la disminución en la expresión de Mfn2 induce cambios en la proliferación celular de las líneas de fibroblastos humano, se comparó la proliferación entre células Scrambler y shMfn2, mediante la tinción con cristal violeta. Para ello se sembraron 200.000 células de cada línea y se analizó la proliferación después de 72 horas de cultivo.

En la figura 15, se observa que en las células knockdown para Mfn2 incrementa la proliferación celular en 10 veces, respecto a las células control (Scr). Este resultado indica que la pérdida de expresión de Mfn2 en células inmortales hTERT potencia la proliferación celular, demostrando de este modo la relevancia de Mfn2 en el control de la proliferación celular.

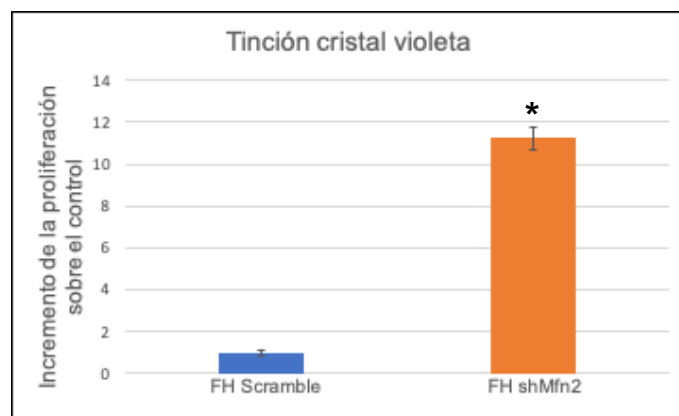
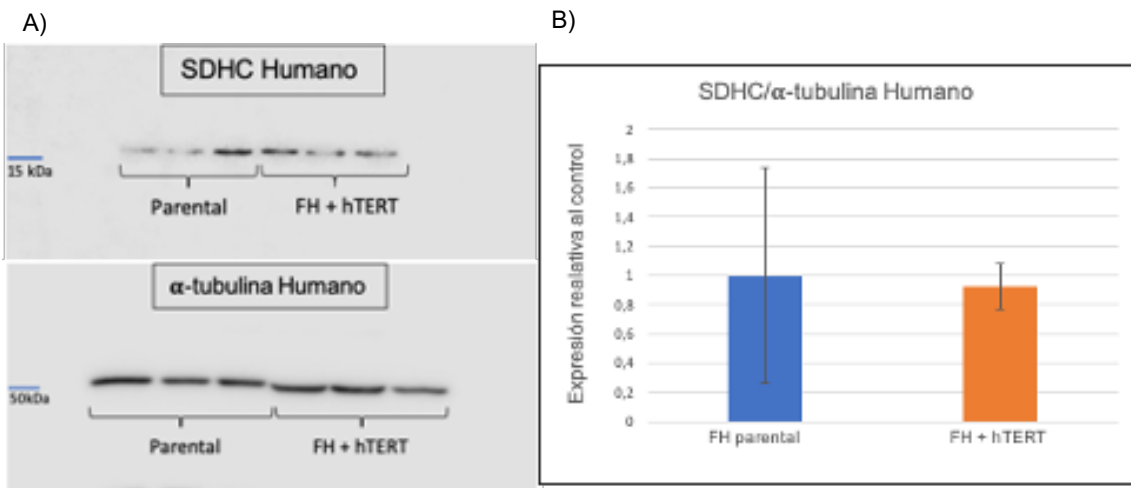


Figura 15. Incremento de la proliferación celular de las células knockdown para Mfn2. Tinción con Cristal violeta de los fibroblastos humanos inmortalizados con hTERT que expresan un shRNA Scr o shRNA Mfn2. 200000 células fueron sembradas y cultivadas por 72h para analizar la proliferación celular. Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, n=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .

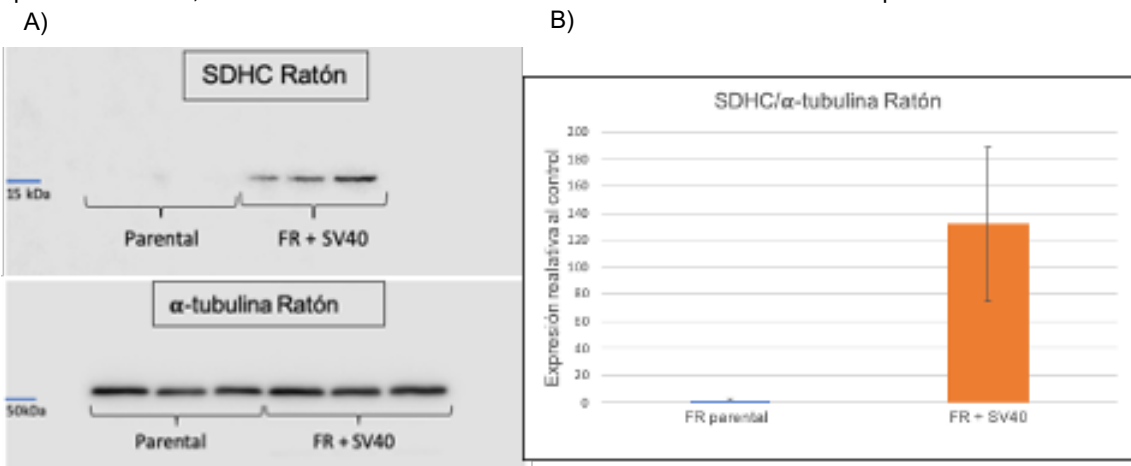
#### 4.8. Detección de otras proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y el ciclo de Krebs, entre fibroblasto de humano y ratón inmortalizados.

Resultados previos en nuestro laboratorio demostraban que células knockout para Mfn2 incrementan la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos y el ciclo de Krebs. Con la finalidad de analizar si este fenotipo es activado en fibroblastos de humano y ratón inmortalizados, se analizó la expresión de otras proteínas involucradas en el ciclo de Krebs, como la subunidad C de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHC), y proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, asparagina sintetasa (ASNS).

En células humanas inmortalizadas con hTERT se observa una ligera disminución de la expresión de SDHC, en comparación con el cultivo primario (Figura 16). Por otro lado, en células de ratón inmortalizadas con SV40L se observa un incremento de la expresión de SDHC (Figura 17)

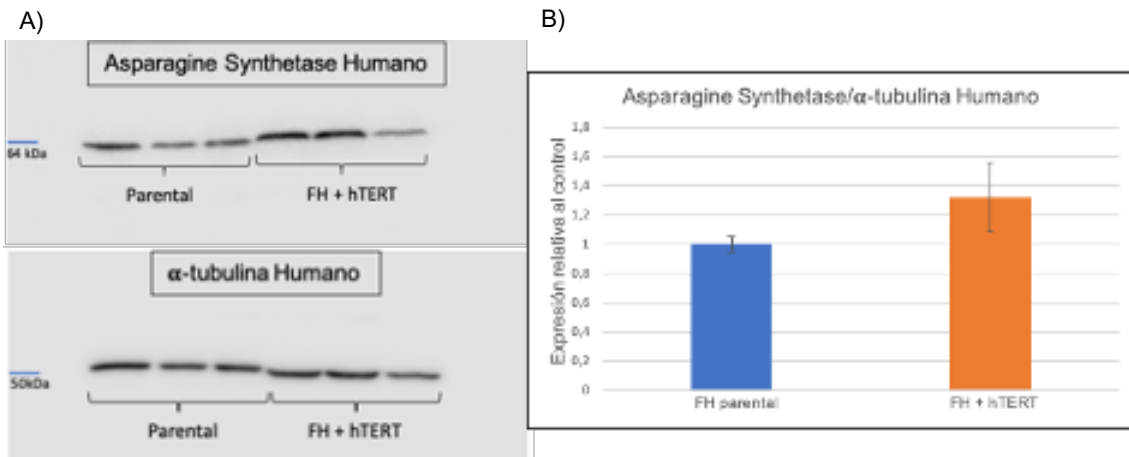


**Figura 16. A) Western blot SDHC y  $\alpha$ -tubulina en humano. B) Comparación SDHC normalizada entre fibroblasto humano parental y fibroblasto humano inmortalizado con hTERT.** Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, N=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .

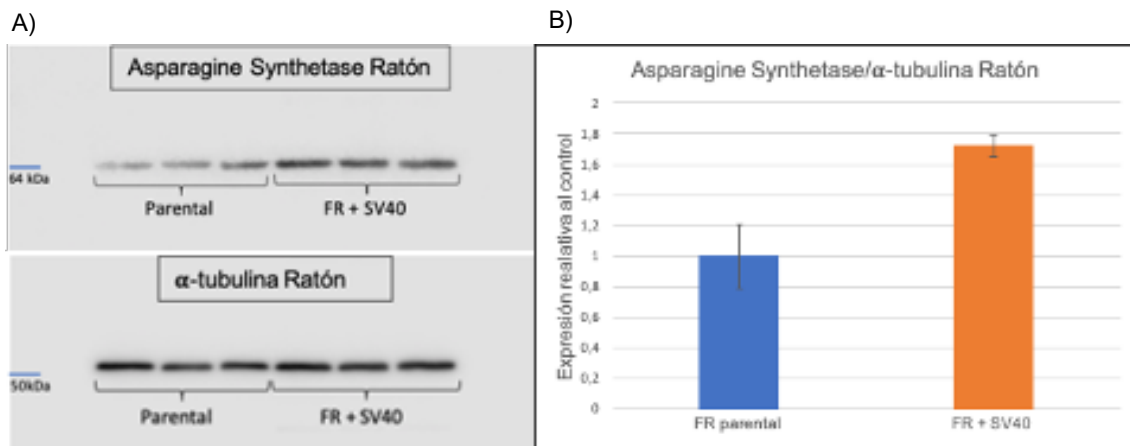


**Figura 17. A) Western blot SDHC y  $\alpha$ -tubulina en ratón. B) Comparación SDHC normalizada entre fibroblasto ratón parental y fibroblasto ratón inmortalizado con SV40L.** Las barras muestran el promedio  $\pm$  SEM, N=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .

En cuanto a la expresión de Asparagina sintetasa, se observa que la expresión aumenta en los fibroblastos humanos inmortalizados con hTERT respecto a los parentales (Figura 18). En los fibroblastos de ratón inmortalizados también se observa un incremento de la expresión de asparagina sintetasa respecto a los fibroblastos parentales (Figura 19), aún mayor que en células humanas. En conjunto estos resultados sugieren que durante el proceso de inmortalización se activan cambios en proteínas que modulan el ciclo de Krebs y el metabolismo de aminoácidos.



**Figura 18. A) Western blot asparagine synthetase y α-tubulina en humano. B) Comparación asparagine synthetase normalizada entre fibroblasto humano parental y fibroblasto humano inmortalizado con hTERT.** Las barras muestran el promedio ± SEM, N=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .



**Figura 19. A) Western blot asparagine synthetase y α-tubulina en ratón. B) Comparación asparagine synthetase normalizada entre fibroblasto ratón parental y fibroblasto ratón inmortalizado con SV40L.** Las barras muestran el promedio ± SEM, N=3. Se realizó el análisis estadístico mediante el t test. \* valor  $p \leq 0.05$ .

## 5. DISCUSIÓN

Durante el proceso de biogénesis del cáncer se originan un conjunto de cambios expresión génica, epigenéticos y metabólicos en la célula que conducen a la inmortalización y transformación celular. Los celulares tumorales adquieren un fenotipo que facilita su proliferación, resistencia a la apoptosis, migración y reprogramación metabólica. En conjunto todos estos factores facilitan la formación del tumor y la metástasis celular.<sup>4, 13</sup>

El proceso de reprogramación metabólica que ocurre durante la inmortalización y transformación incrementa el consumo y utilización de glucosa, lípidos y aminoácidos en diversos tumores, siendo esta reprogramación metabólica un proceso coordinado con cambios en la expresión génica y la función de las mitocondrias. Otto Wartburg<sup>16</sup> describió hace 70 años que las células tumorales activan el proceso de glicolisis aeróbica, es decir la canalización del metabolismo de la glucosa a lactato, obteniendo de esta reacción la formación de ATP. Adicionalmente, se demostró que algunas líneas tumorales reducían la oxidación de glucosa en las mitocondrias en condiciones aeróbicas, esta alteración en la función mitocondria potenciaría el efector Wartburg. Recientes investigaciones han demostrado que el proceso de reprogramación metabólica en tumores tiene una elevada complejidad, las células neoplásicas incrementan el glicólisis, con el fin de producir precursores anabólicos y energía en el ambiente hipóxico del tumor. La activación de la glicolisis aeróbica en las células conduciría a la un incremento en la utilización de carbonos de la glucosa para la biosíntesis de biomasa celular, por ejemplo en algunos tumores se ha observado un incremento en el destino de los carbonos de la glucosa a los aminoácidos, tales como la serina, glicina o cistina, o a la vía de las pentosa para la síntesis de nucleótidos.

Por otra parte, las mitocondrias también tendrían papel en la formación de precursores para la biogénesis de biomasa celular por un proceso denominado anaplerosis, la cual son un conjunto de reacciones enzimáticas que proporcionan nuevos intermediarios metabólicos para la biosíntesis de macromoléculas. Recientes estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la pérdida de Mfn2 incrementa el consumo de aminoácidos tales como la glutamina y la cistina en cultivo celular. Estos aminoácidos sería utilizados por las vías anapleróticas del ciclo de Krebs para formar precursores para la biosíntesis de lípidos y proteínas. Este fenotipo es relevante en el estudio de células proliferativas y cáncer, en las cuales se ha observado un incremento de la anaplerosis de aminoácidos.

Adicionalmente la disminución de los niveles de expresión de Mfn2, causa importantes alteraciones en la función mitocondrial, lo cual sugiere que la pérdida de función de Mfn2 puede actuar como un factor adicional para el proceso de reprogramación metabólica.<sup>2,3,10</sup>

En este proyecto decidimos explorar un modelo de immortalización y transformación secuencial de células de fibroblasto humano y de ratón adulto con la finalidad de estudiar el progreso de las alteraciones metabólicas que ocurren en cáncer. La producción de una serie de líneas celulares a partir de un cultivo primario diferenciado nos permitirá identificar las variaciones en la expresión de Mfn2 durante la biogénesis de la immortalización/transformación celular. Adicionalmente estos modelos permiten hacer silenciamiento de cada paso del proceso de transformación celular e investigar si Mfn2 induce alteraciones metabólicas que potencian la proliferación y reprogramación metabólica.

En este trabajo el primer objetivo fue caracterizar las líneas celulares obtenidas a partir de cultivos primarios de fibroblasto. Las células fibroblasto immortalizadas mediante la expresión ectópica de la transcriptasa reversa de la telomerasa, producen una estabilización de los telómeros que permite que células pre-senescentes humanas se multipliquen indefinidamente.<sup>13</sup> Nuestros resultados muestran que la expresión de hTERT produce un cambio fenotípico caracterizado por una disminución del tamaño celular, 10 veces menor, perdiendo la morfología característica de los fibroblastos parentales, y la formación de colonias de células (Figura 1). También se produce un gran aumento, 40 veces mayor, de la proliferación celular en comparación con fibroblastos parentales. Estos cambios fenotípicos están en concordancia con una pérdida de la diferenciación celular, debido a la alta tasa de proliferación.

Con el fin de analizar si la expresión de Mfn2 está asociada con estos cambios, analizamos por Western blot la expresión de esta proteína. Observamos que la expresión de Mfn2 en fibroblastos humanos no se ve afectada significativamente por el proceso de immortalización. Estos resultados sugieren que la immortalización inducida por la expresión de hTERT, no requiere cambios en la expresión de Mfn2. Este resultado está en concordancia con los efectos de hTERT en las células inmortales. Este modelo de immortalización se ha utilizado como herramienta para estudiar diversas líneas celulares, y una de sus características es que no produce alteraciones significativas en el cariotipo celular o formación de células malignas.

Con el fin de detectar la expresión de la proteína Mfn2 en otros estadios de inmortalización, se inició un proceso de transformación secuencial, mediante la expresión de las proteínas SV40L o Ras G12V en las células hTERT. Ambas proteínas afectan a la función de varios genes involucrados en la proliferación y supervivencia celular, cuyo bloqueo, junto con la estabilización telomérica, conducen a la transformación celular.<sup>11</sup>

Por otra parte, en células que expresan hTERT y, SV40L o Ras G12V, se produce un aumento significativo en los niveles de la proteína Mfn2. Este resultado es interesante, ya que sugiere que durante los primeros pasos de la inmortalización celular inducidos por SV40L o RAS G12V, estas células requieren incrementar la dinámica y función mitocondrial. Telang S. et al. 2007 demostró que en células inmortalizadas incrementa el consumo de oxígeno mitocondrial<sup>15</sup>. Los mecanismos asociados a este proceso no han sido dilucidados, pero indicarían que etapas tempranas del proceso de reprogramación metabólica la actividad mitocondrial incrementa. Este resultado concuerda con un incremento en la expresión de Mfn2, que modula la respiración en células de cultivo en tejidos *in vivo*.<sup>4</sup> Además, El incremento en la expresión de Mfn2 fue independiente del origen de la célula parental, ya que fue observado en las células inmortales humanas y murinas, lo que indicaría que este es un proceso generalizado en mamíferos.

Por otro lado, nuestro laboratorio y otros investigadores han reportado que el silenciamiento de Mfn2 contribuye a la proliferación celular en algunos modelos celulares. El análisis de la proliferación celular de las células humanas inmortalizadas con hTERT, en las cuales se ha silenciado la expresión de Mfn2 mediante la expresión lentiviral de un shRNA dirigido a Mfn2 indican que la pérdida en la expresión de Mfn2 favorece la proliferación celular. Observamos un incremento en 10 veces en la proliferación de las células knockdown para Mfn2 comparadas a las células Scrambler. Este resultado indica que la pérdida de Mfn2 contribuye a las alteraciones en el ciclo celular que potencian la proliferación en células hTERT. Es importante mencionar que estas alteraciones en la proliferación solo ocurren en células inmortalizadas, nuestro laboratorio ha demostrado que la pérdida de expresión de Mfn2 en células parentales conduce a la muerte celular, debido al alto estrés celular que se origina en estas células. Se ha observado un incremento de especies reactivas de oxígeno mitocondriales que conducen a la muerte celular.

Con la finalidad de investigar si durante la inmortalización se activan genes implicados en el ciclo de Krebs y metabolismo de aminoácidos, analizamos la expresión

de 2 genes activados durante la reprogramación metabólica de aminoácido. Los resultados muestran que la expresión de una de las proteínas involucradas en el ciclo de Krebs (SDHC) y en el metabolismo de aminoácidos, tal como la asparagina sintetasa (ASNS), una enzima involucrada en la conversión de glutamina y aspartato en glutamato y asparagina, incrementa su expresión en células inmortalizadas.

## 6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En esta investigación se ha analizado la expresión de Mfn2 en células inmortalizadas con hTERT, hTERT + SV40L o Ras G12V. Se ha observado un aumento de la expresión de Mfn2 en células inmortalizadas más SV40L y Ras G12V. En futuros estudios habría que investigar las regiones promotoras del gen *Mfn2*, ya que el aumento de la expresión de la proteína Mfn2 puede estar asociado a los factores transcripcionales modulados positiva o negativamente durante la inmortalización.

Por otro lado, se ha visto que la expresión de Mfn2 disminuye en células cancerosas.<sup>1</sup> Para observar en que estadio entre la inmortalización y la transformación celular se produce la disminución de la expresión de Mfn2; habría que generar células completamente transformadas, y analizar la expresión de esta proteína, así como la expresión del gen *Mfn2*.

El modelo desarrollado permitirá analizar los cambios en el metabolismo celular que se producen durante la transformación e inmortalización. A futuro se propone hacer estudios de metabolómica en las células inmortales o transformadas en las cuales ha sido silenciada Mfn2.

Adicionalmente, se propone usar un modelo *in vivo* para analizar la contribución de Mfn2 en la generación de los tumores. Para ello se propone inyectar ratones inmunodeprimidos con las células inmortalizadas o transformadas en las cuales han sido silenciada Mfn2 y analizar cambios de tamaño del tumor y metástasis.

## **7. CONCLUSIÓN**

- La inmortalización de fibroblastos parentales de humano y ratón, produce un cambio fenotípico; caracterizado por la disminución del tamaño celular, la formación de grupos de células y aumento de la proliferación.
- La inmortalización de fibroblastos humanos parentales junto con la expresión de SV40L o Ras G12V, produce un aumento de la expresión de Mfn2, asociada con un aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial.
- El knockdown de Mfn2 en fibroblastos inmortalizados favorece la proliferación celular.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Filadi R, Pendin Di, Pizzo P. Mitofusin 2: From functions to disease [Internet]. Vol. 9, Cell Death and Disease. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2020 Aug 25]. p. 1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-017-0023-6>
2. Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol Rev* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 Aug 25];93(2):933–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29068134/>
3. Sebastián D, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging [Internet]. Vol. 23, Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2017 [cited 2020 Aug 26]. p. 201–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28188102/>
4. Allegra A, Innao V, Allegra AG, Musolino C. Relationship between mitofusin 2 and cancer. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Academic Press Inc.; 2019. p. 209–36.
5. Zorzano A, Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Muñoz JP. Mitofusin 2 as a Driver That Controls Energy Metabolism and Insulin Signaling [Internet]. Vol. 22, Antioxidants and Redox Signaling. Mary Ann Liebert Inc.; 2015 [cited 2020 Aug 24]. p. 1020–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25567790/>
6. De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* [Internet]. 2008 Dec 4 [cited 2020 Aug 24];456(7222):605–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19052620/>
7. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Apr 3 [cited 2020 Aug 25];109(14):5523–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22427360/>
8. Sebastián D, Zorzano A. When MFN2 (mitofusin 2) met autophagy: A new age for old muscles [Internet]. Vol. 12, Autophagy. Taylor and Francis Inc.; 2016 [cited 2020 Aug 25]. p. 2250–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27575337/>
9. Pang G, Xie Q, Yao J. Mitofusin 2 inhibits bladder cancer cell proliferation and invasion via the wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncol Lett* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2020 Aug 26];18(3):2434–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31402945/>
10. Cheng CT, Kuo CY, Ouyang C, Li CF, Chung Y, Chan DC, et al. Metabolic stress-induced phosphorylation of kap1 ser473 blocks mitochondrial fusion in breast cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Aug 26];76(17):5006–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27364555/>
11. Hahn WC. Immortalization and transformation of human cells [Internet]. Vol. 13, Molecules and Cells. Mol Cells; 2002 [cited 2020 Aug 26]. p. 351–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12132573/>
12. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, et al. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* [Internet]. 1999 Jan [cited 2020 Aug 26];21(1):115–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9916803/>
13. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg

- RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* [Internet]. 1999 Jul 29 [cited 2020 Aug 26];400(6743):464–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10440377/>
14. Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell* [Internet]. 2007 Aug 10 [cited 2020 Aug 26];130(3):548–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17693261/>
  15. Telang S, Lane AN, Nelson KK, Arumugam S, Chesney J. The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol Cancer* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2020 Aug 27];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18053146/>
  16. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? [Internet]. Vol. 41, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd; 2016 [cited 2020 Aug 31]. p. 211–8. Available from: </pmc/articles/PMC4783224/?report=abstract>

## **9. AUTOEVALUACIÓN**

La estancia en prácticas que he realizado en el centro de investigación IRB Barcelona ha sido muy satisfactoria en todos los aspectos. Desde mi llegada al laboratorio, se me presentó un proyecto interesante, que además, permitía que me familiarizase con muchas técnicas básicas en la investigación. Así, he aprendido a trabajar en el laboratorio de una manera independiente, junto con la supervisión de mi tutor.

Por otro lado, debido a las circunstancias actuales, no he podido realizar todo el trabajo que estaba planeado al inicio. Aún así, agradezco la oportunidad de posponer las prácticas a los meses de verano para poder llevar a cabo un trabajo experimental, con el aprendizaje que este conlleva.

Además, llevar a cabo este proyecto me ha permitido ver como es trabajar en un laboratorio de investigación, y me ha animado a seguir formándome en el área de la biotecnología sanitaria.

## 10. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

### 10.1. Protocolos

#### Protocolo 1: Aislamiento de fibroblastos de ratón

El material para el cultivo primario de fibroblastos se obtiene a través de explantes de piel de ratón/humana. Se aísla la dermis de la epidermis con bisturís y tijeras. Después las muestras de dermis son separadas en fragmentos de 5,0 mm<sup>2</sup>.

Los fragmentos se ponen en placas de Petri de 10cm en áreas cuadradas marcadas por líneas perpendiculares realizadas con el bisturí.

Las placas de Petri se mantienen semi-abiertas en flujo laminar durante 40 minutos para que las muestras de dermis se adhieran a la superficie del cultivo. Es importante evitar la desecación de las muestras de dermis añadiendo una solución fisiológica, tampón fosfato salino (PBS), sobre ellas para mantener la viabilidad celular.

#### - Cultivo primario de fibroblastos

Una vez los fragmentos están fijados a la superficie de la placa de Petri:

1. Se añade a la placa 10 ml de DMEM con 20% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomycin, a 37°C. Se mantiene placa de cultivo en una incubadora humidificada a 37°C, bajo 5% de CO<sub>2</sub> en aire.
2. Se cambia el medio de cultivo cada dos días, para mantener las condiciones de pH ideales entre 7,6 y 7,8. Esta estabilidad en el pH mantiene un equilibrio entre la proliferación celular y la actividad de biosíntesis celular de los fibroblastos.

Se observa una proliferación satisfactoria de los fibroblastos en aproximadamente 7 días.

#### - Pase de fibroblastos

El pase de fibroblastos se realiza a una confluencia de la placa de Petri del 80%.

1. Se aspira el medio de cultivo y se eliminan los fragmentos de piel con pinzas.
2. Los fibroblastos adheridos a la placa de Petri son lavados con PBS.

3. Se aspira el PBS y se añade 1 ml de tripsina a la placa de Petri, manteniéndola en un incubador humidificado a 37°C, bajo 5% de CO<sub>2</sub> en aire, durante cinco minutos.
4. Mediante microscopía óptica se observa que los fibroblastos, con morfología esférica, se han despegado de la superficie de la placa.
5. Se añaden 10 ml de medio de cultivo (DMEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal a la placa de Petri (para neutralizar la acción enzimática de la tripsina y que estos vuelvan a adherirse a la superficie de la placa).

## Protocolo 2: Western Blot

### - Homogenizado de proteína

1. Coger las placas de la estufa.
2. En hielo, quitar el medio de cultivo, añadir PBS para lavar la placa y eliminarlo.
3. Preparar buffer de lisis RIPA (150mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% SDS, 1,0 % Triton X-100, 1% Deoxicolato de sodio, 5mM EDTA).
4. Enrasar en 500 ml con agua miliQ y ajustar el pH a 7,2.
5. Añadir al buffer RIPA el inhibidor de proteasas; una pastilla por cada 10 ml de RIPA.
6. Añadir inhibidor de fosfatasas, si se requiere (NaVO<sub>4</sub> 1mM, NaF 5mM, NaPPi 1mM).
7. Poner 100 ml de "RIPA + inhibidores" en cada placa, rascar las células de la placa y ponerlas en un Eppendorf.
8. Sonicar los eppendorfs; 20%, 10 segundos, 3 pulsos.
9. Centrifugar los eppendorfs 15 minutos, a 4°C y 10.000g.

### - Preparación de muestras

Para la cuantificación proteica se utilizó el Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

En una placa de 96 pocillos poner 200 µL de los reactivos A y B (50:1, reactivo A:B)

1. Añadir en cada eppendorf 40 µg de proteína (según la concentración de cada muestra).
2. Añadir DTT 0,2M y LSB 4X a cada muestra, según el volumen final.
3. Igualar los volúmenes de todas la muestras con dH<sub>2</sub>O.
4. Desnaturalizar las muestras 5 minutos a 95°C.

### - Electroforesis

Preparar los geles de acrilamida al porcentaje requerido.

1. Poner el gel "resolving" entre los cristales, e igualar la membrana con 100 µL de isopropanol.
2. Esperar a que solidifique, 20 minutos.
3. Añadir el gel "stacking".
4. Poner las horquillas para hacer los pocillos y esperar 5 minutos.

5. Preparar 1L de buffer de electroforesis, 900 ml de agua destilada + 100 ml del "Buffer de electroforesis" (10X).
6. Cargar el primer pocillo con 7  $\mu$ L de colorante y los siguientes pocillos con las distintas muestras preparadas.
7. Dejar correr a 100 V durante 1h y media. Una vez las bandas hayan pasado el gel "stacking" subir a 120V.

- **Transferencia**

1. Preparar buffer de transferencia, 700 ml de agua destilada, 100 ml del "buffer de transferencia" (5x) y 200 ml de Metanol.
2. Montar los "sándwiches" mojando todos los elementos con buffer de transferencia. (1 esponja, 2 papeles de filtro, la membrana, el gel, 2 papeles de filtro y 1 esponja)
3. Montar la estructura en la caja, cubrir todo con buffer de transferencia y ponerlo en marcha durante 1h a 350 mA. Poner hielo a los lados para que se mantenga a baja temperatura.

- **Adición de anticuerpos**

• Bloqueo de la membrana y adición del 1<sup>er</sup> anticuerpo

1. Poner las membranas en 50 ml TBS-Tween 0,1% y añadir 1,5 g de leche sin grasa (leche al 3%).
2. Dejar bloqueando 30 min a temperatura ambiente en el agitador.
3. Poner la membrana en una caja y añadir el 1<sup>er</sup> anticuerpo en TBS-Tween 0,1%-BSA 3%; dejar incubar O/N a 4°C.

• Adición del 2<sup>do</sup> anticuerpo

1. Quitar el primer anticuerpo y hacer 3 lavados con TBS-Tween 0,1%, de 10 minutos, con agitación.
2. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario en TBS-Tween 0,1%-3% leche (1,5g de leche) durante 45 minutos.
3. Lavar con TBS-Tween 0,1%, durante 10 minutos con agitación. Hacer 3 lavados.

• Revelado de membrana

1. Añadir 2 ml de los reactivos 1 y 2 del kit ECL™ Western Blotting Reagents en una caja y poner la membrana.
2. Esperar 1 minuto.
3. Revelar la membrana utilizando el sistema de imágenes Odyssey® Fc.



Protocolo 3: Producción de vectores retrovirales/lentivirales, infección celular y selección

- Producción retrovirus/lentivirus

1. Sembrar células HEK293T al 80% de confluencia en placas de 10 cm, con medio DMEM + FBS 10%.
2. Dejar incubar 2 horas.
3. Preparar mix de plásmidos en tubos:
  - NaCl 150mM, 300 µL/placa
  - 45 µL PEI 40K (Poliethylemine HCL MAX)
  - X µg de plásmido requerido
4. Vortear los tubos.
5. Incubar durante 20 minutos.
6. Añadir el medio de transfección que contiene los plásmidos retrovirales/lentivirales a las células e incubar 16-24h a 37°C.
7. Cambiar medio de cultivo con 10 ml de DMEM + FBS 10%, e incubar durante 24 horas a 33°C.
8. Después de 24 h de producción retroviral, recoger el medio de cultivo que contiene las partículas retrovirales/lentivirales de las células HEK293T.
9. Añadir 10 ml de medio DMEM + FBS 10% nuevo a las células HEK293T transfectadas, e incubar 24 h a 33°C.
10. Pasar el medio de cultivo recogido a un falcon, a través de un filtro de 0,45 µm.
11. Repetir los pasos 8,9 y 10 hasta recolectar el medio que contiene las partículas retrovirales 3 veces.

- Infección de células

1. Preparar placas de 10 cm de los distintos tipos celulares al 60-80% de confluencia.
2. Pasar el medio de cultivo que contiene las partículas retrovirales/lentivirales a través de un filtro de 0,45 µm.
3. Transducir las células con las partículas lentivirales/retrovirales durante 48h. Cambiar el medio y añadir los antibióticos para la selección de las células que han incorporado el virus

- Selección de células

1. Añadir los distintos volúmenes del antibiótico requerido en cada placa, para 10 ml de medio de cultivo.

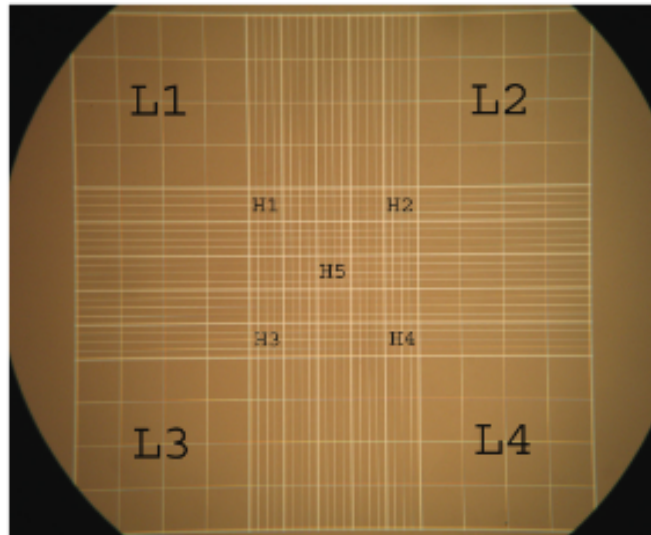
Línea Fibroblasto	Antibiótico	Concentración	Volumen añadido
FH hTERT + SV40L	Genitocina	500 µg/ml	500 µl
FH hTERT + Ras G12V	Zeocina	100 µg/ml	10 µl
FH hTERT + pLKO Scr	Puomicina	2,5 µg/ml	2,5 µl
FH hTERT + pLKO sh82684 (shMfn2)	Puomicina	2,5 µg/ml	2,5 µl

2. A medida que se va realizando la selección (se observa que el medio de cultivo cambia de color, lo que refleja la proliferación celular) retirar el medio de cultivo y añadir 10 ml de medio nuevo.

#### Protocolo 4: Tinción cristal violeta

1. Coger placas de la estufa, quitar el medio de cultivo y lavar con PBS.
2. Tripsinizar células y hacer un recuento celular mediante la cámara de Neubauer.

Recuento cámara de Neubauer:  $\bar{X}$  de los 4 cuadrantes (Lx)  $\times$  10.000 = N° células/ml



**Figura 20. Recuento cámara de Neubauer.** Lx muestra los cuadrantes a partir de los cuales se hace el recuento.

3. Sembrar 200.000 células/ml de cada línea celular en un pocillo de placas de 6cm por triplicado (3 pocillos).
4. Dejar las células en una incubadora a 37°C durante 2 días.
5. Quitar el medio de cultivo y añadir 2 ml de paraformaldehído 4% a cada pocillo. Dejar 15 minutos para que las células se fijen.
6. Retirar el paraformaldehído y lavar las células con PBS.
7. Teñir las células añadiendo 2 ml de cristal violeta 0,1% en cada pocillo. Dejar las células con el cristal violeta una hora.
8. Retirar el cristal violeta y añadir 2 ml de agua desionizada a cada pocillo. Dejar las células con agua desionizada O/N.
9. Retirar el agua y añadir 600  $\mu$ l de ácido acético al 10%. Esperar a que se diluya 10 minutos.

En el caso de que siga habiendo células fijadas a la placa diluir más la placa con acetona.

10. Poner 100 ml de cada pocillo en una placa de 96 pocillos.
11. Medir absorbancia a 595 nm.

## 10.2. Figuras

Figura S1. Mapa pBABE-puro SV40 LT

Created with SnapGene®

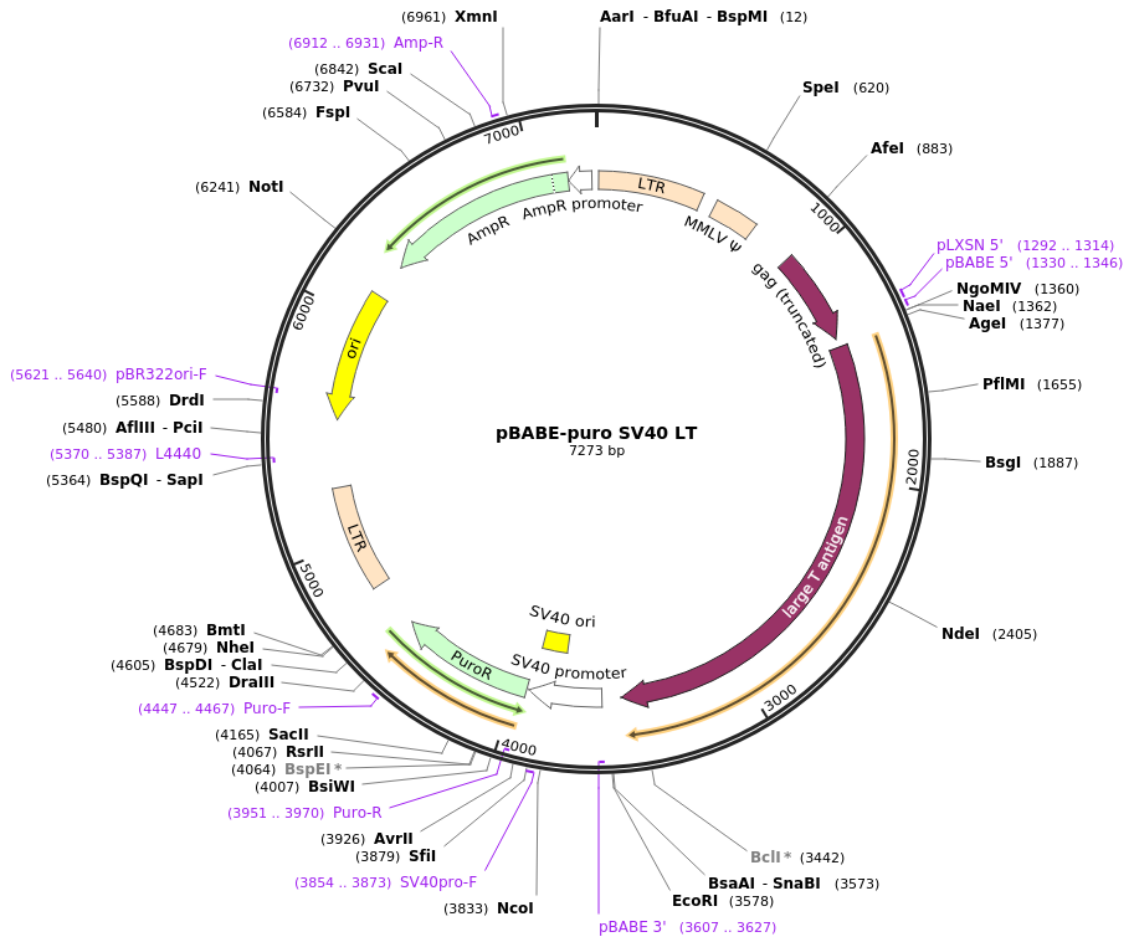


Figura S2. Mapa pCL-Eco

Created with SnapGene®

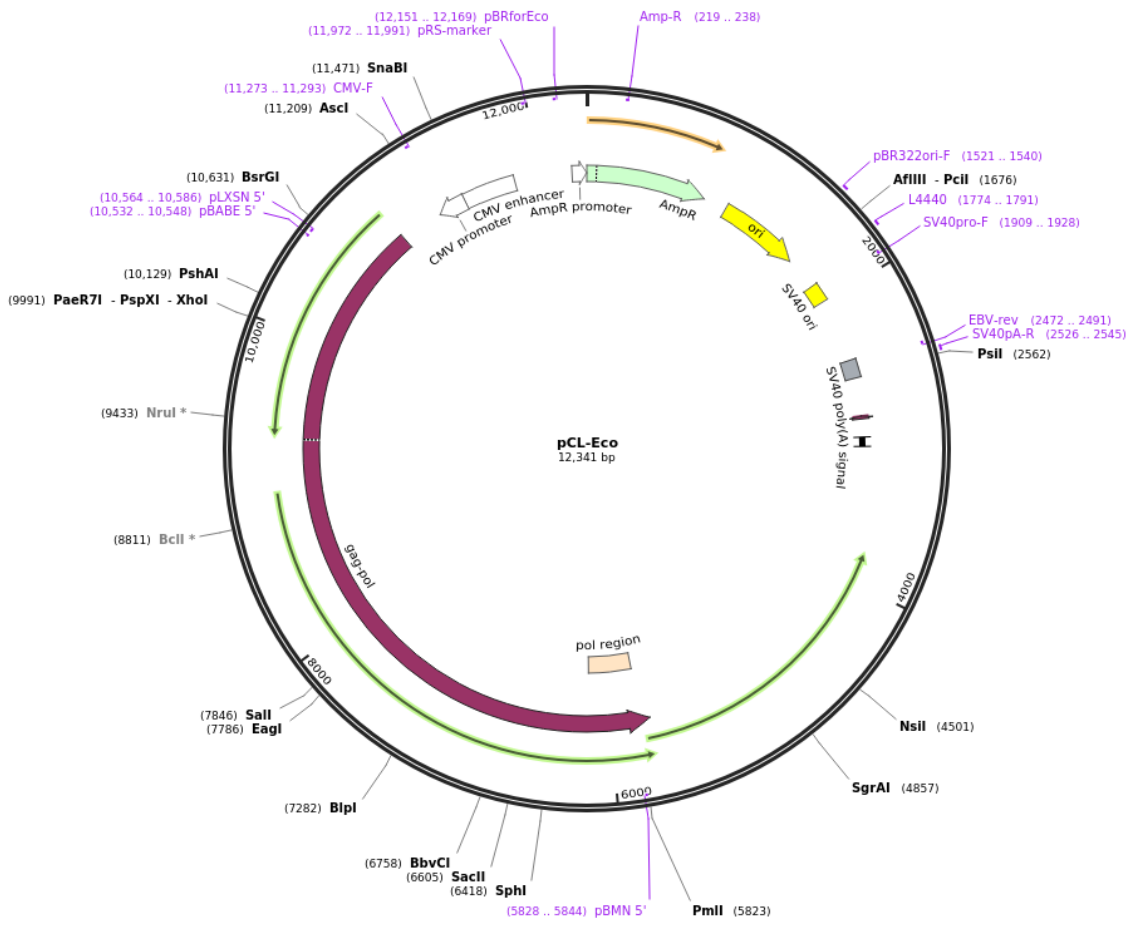


Figura S3. Mapa pAmpho

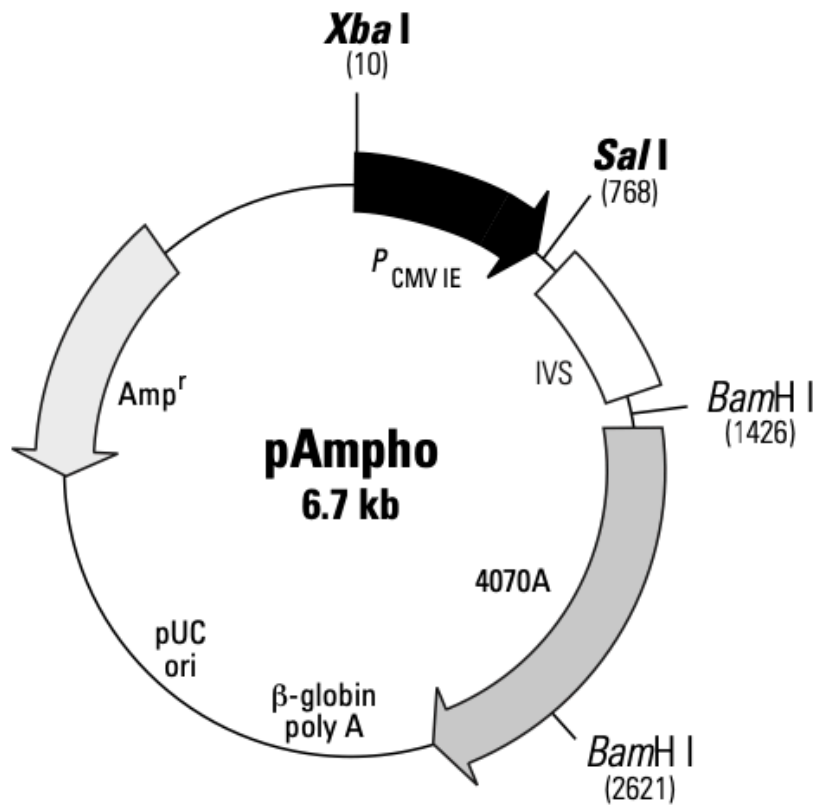


Figura S4. Mapa pBABE-neo largeTcDNA

Created with SnapGene®

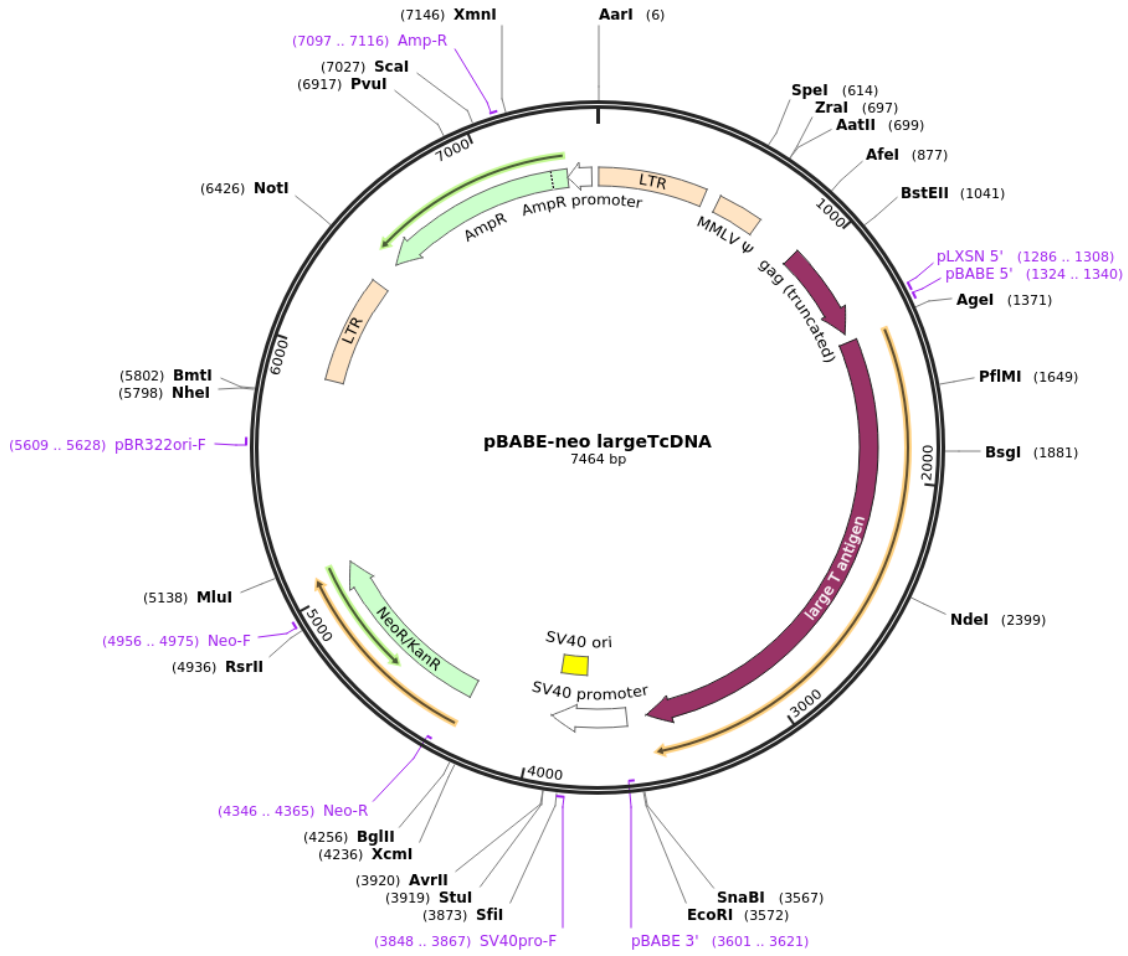
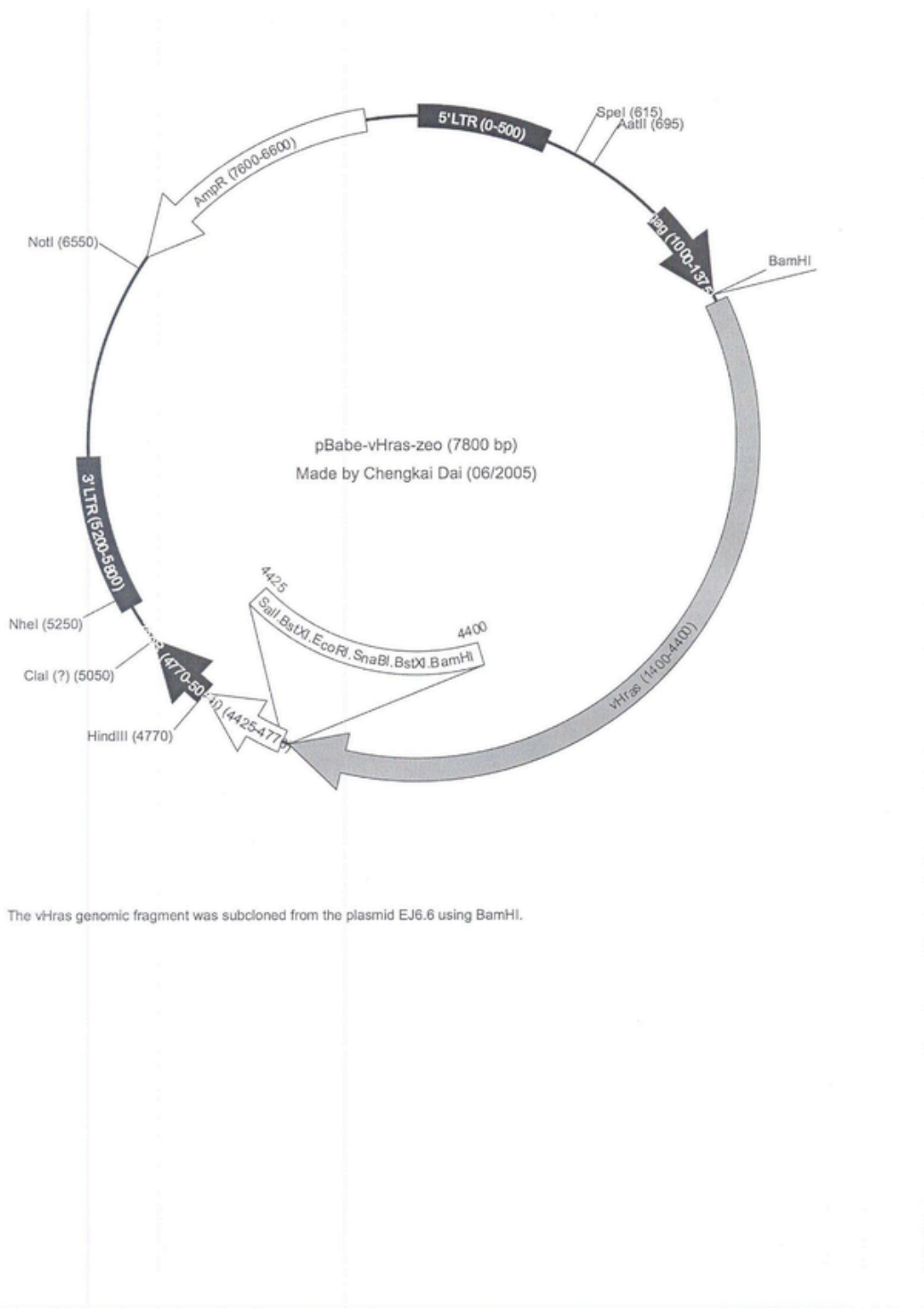


Figura S5. Mapa pBabe-vHras-zeo



The vHras genomic fragment was subcloned from the plasmid EJ6.6 using BamHI.

Figura S6. Mapa pBABE-hygro-hTERT

Created with SnapGene®

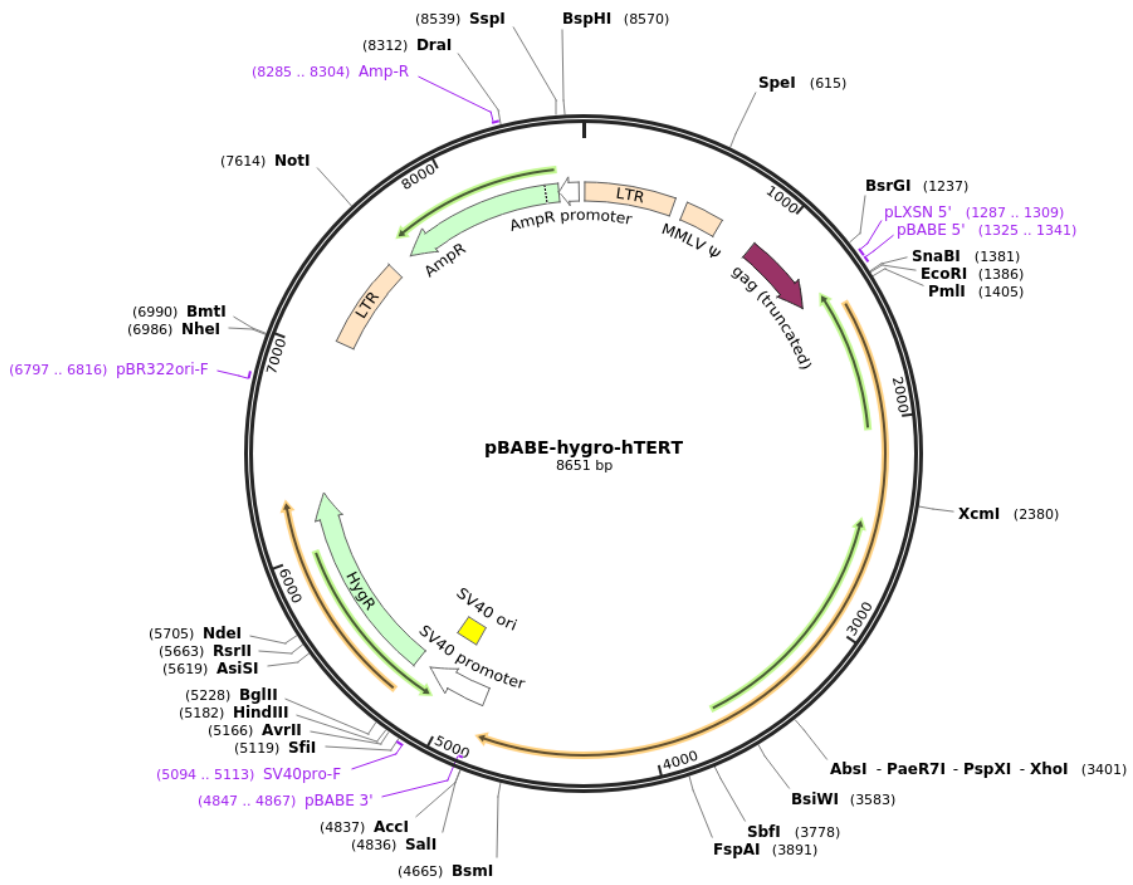


Figura S7. Mapa psPAX2

Created with SnapGene®

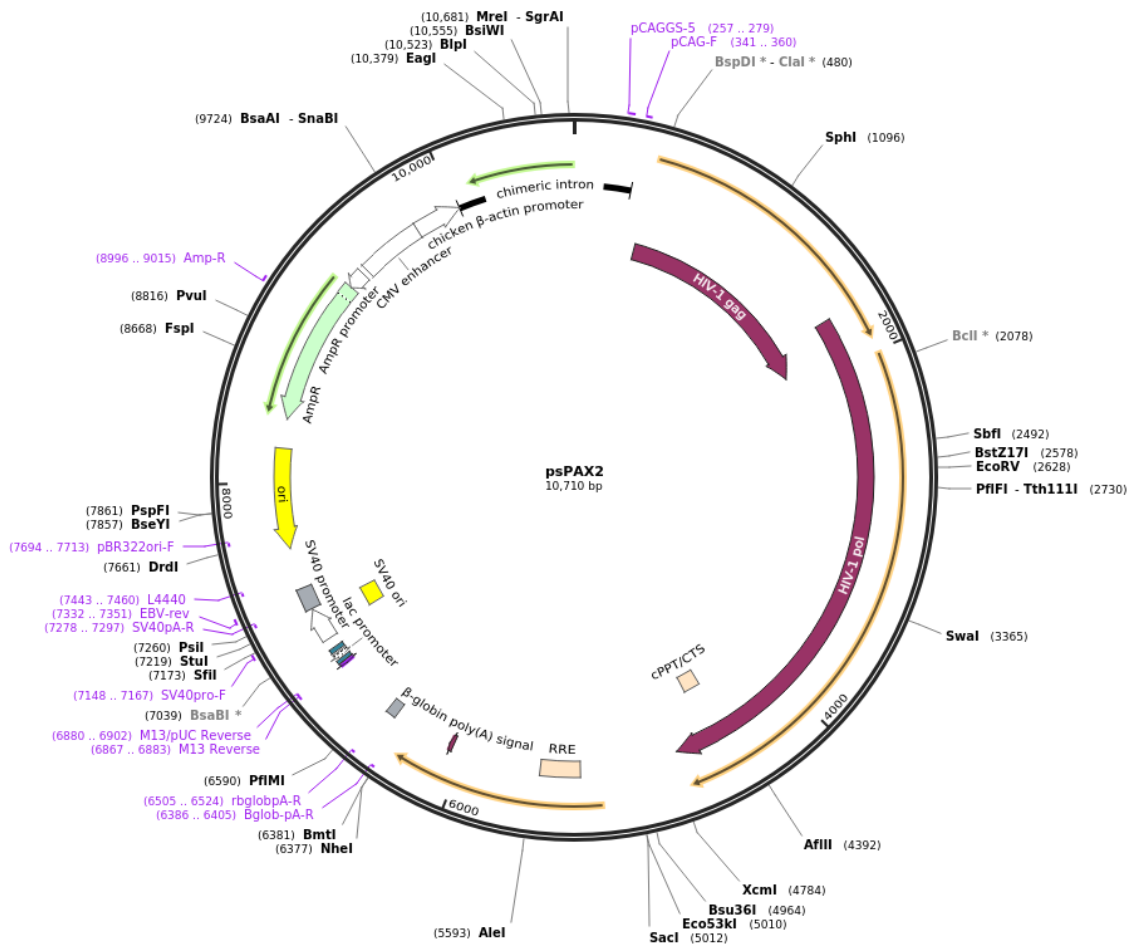


Figura S8. Mapa pMD2.G

Created with SnapGene®

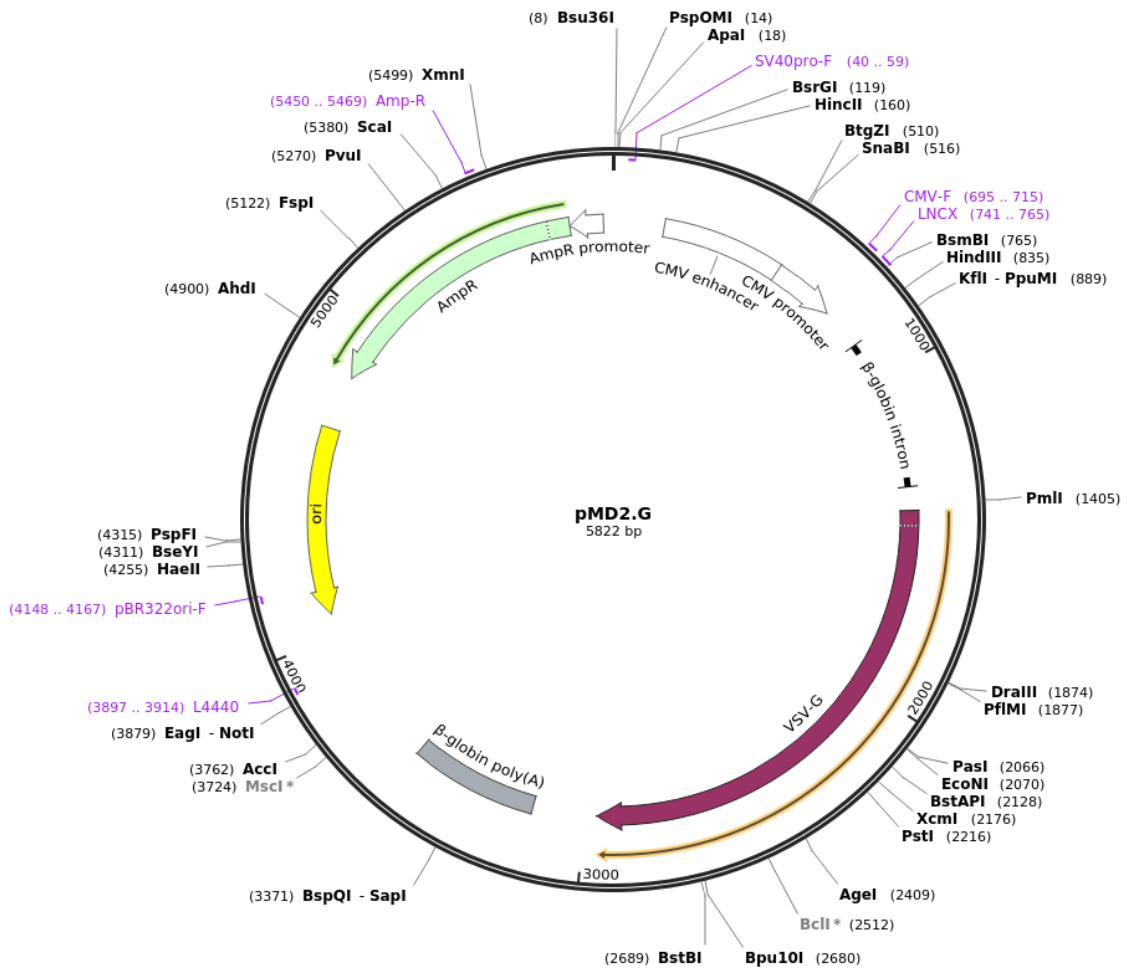


Figura S9. Mapa pLKO.1-puro

	shRNA
Scrambler (Scr)	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC- GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTT
Mfn2 (sh82684)	5'- CCGGGCAGGTTTACTGCGAGGAAATCTCGAGATTTCTCGCAGTAAACCTG CTTTTTG-3. (siRNA: 5'-GCAGGTTTACTGCGAGGAAAT-3')

