



Universidad de Valladolid

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

FACULTAD DE MEDICINA

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

USO DE VECTORES LENTIVIRALES PARA LA SOBREEXPRESIÓN DE GENES EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

Memoria para optar al Título de Máster en Investigación Biomédica presentada por:

Alba Santos Hipólito

Valladolid, 2015

DIRIGIDO POR: Dra. M^a Teresa Pérez García

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 CULTIVOS CELULARES	7
Líneas y cultivos celulares	7
Medios de cultivo	7
Manipulación de células HEK 293, CMLV-AU y CMLV-AC	7
3.2 PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES	9
Plásmidos utilizados	9
Extracción de DNA plasmídico utilizando columnas Quiagen	10
Co-transfección en células empaquetadoras 293T	10
Titulación de los vectores lentivirales	11
3.3 INFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 297, CMLV-AU y CMLV-AC	12
3.4 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	13
3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNOCITOQUÍMICA	13
Detección de la expresión de la proteína de fusión	13
Inmunocitoquímica	14
4. RESULTADOS	15
4.1 PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA	15
Estimación funcional del nº de viriones por célula	15
Curva de selección con puromicina	15
4.2 INFECCIÓN HEK 293	16
Microscopía confocal	16
Ensayo de proliferación	17
4.3 INFECCIÓN CMLV-AU	18
Estimación nº de viriones por célula	18
Inmunocitoquímica	19
Ensayo de proliferación	20
4.4 INFECCIÓN CMLV-AC	21
Inmunocitoquímica:	21
Medida de corrientes iónicas por Patch Clamp	22
Ensayo de proliferación	23
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

ABREVIATURAS

bFGF	Factor de crecimiento básico fibroblástico (Basic fibroblast growth factor)
CMLV-AC	Células de músculo liso vascular de arterias coronarias de cerdo
CMLV-AU	Células de músculo liso vascular de arterias uterinas humanas
DAPI	4',6- Diamidino - 2 - Fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxiribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
DPO	2,5-Difeniloxazol
EdU	5-etinil-2'-deoxyuridina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor)
GFP	Proteína Fluorescente Verde (Green fluorescent Protein)
HEK	Células embrionarias de riñón humano (Human Embryonic Kidney Cells)
IGF	Factor de crecimiento insulínico (Insulin growth factor)
MEM	Medio esencial mínimo (Minimum essential media)
PAP-1	5-(4-fenoxybutoxy)psoraleno
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate buffered saline)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MODULACIÓN FENOTÍPICA DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

Las células musculares lisas de la pared vascular (CMLV) son células bien diferenciadas, que se caracterizan por una gran abundancia en proteínas contráctiles, como la actina y la miosina y poco retículo endoplásmico rugoso. Estas células tienen en condiciones normales una función contráctil, adecuada a su papel fundamental en el control del tono vascular, y una capacidad migratoria y proliferativa muy limitada. Sin embargo, las CMLV son capaces de pasar de un fenotipo contráctil a un fenotipo proliferativo en respuesta a diversos factores o estímulos que actúan sobre el vaso. Cuando se activan, por ejemplo tras una lesión de la pared arterial, las CMLV pasan a tener un estado sintético, en el que adquieren más retículo endoplásmico rugoso para la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular. Este cambio, conocido como modulación fenotípica, es un pre-requisito para los procesos de migración y proliferación celular. Aunque la proliferación de las CMLVs tiene un papel fisiológico contribuyendo al desarrollo vascular durante la embriogénesis o a la revascularización frente a lesiones isquémicas, la plasticidad de las CMLV contribuye de forma importante a numerosas patologías cardiovasculares, como la hipertensión, la arteriosclerosis o la restenosis tras angioplastia.

En todas estas situaciones (fisiológicas y patológicas) la naturaleza plástica del músculo liso le permite desarrollarse entre otros tejidos circundantes y sobrevivir en condiciones adversas mediante una rápida modulación que involucra el aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas que regulan el crecimiento celular. En este proceso, también se han descrito cambios coordinados en la actividad y/o en la expresión de canales iónicos ¹.

1.2 CANALES IÓNICOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN FENOTÍPICA

Los canales iónicos de la membrana celular tienen un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular y la señalización, contribuyendo a la regulación de parámetros esenciales como el volumen celular, el pH o la concentración de Ca^{2+} intracelular. Por ello, la modulación fenotípica de las CMLV se asocia a cambios en el patrón de expresión de los canales iónicos. En concreto, los cambios en la expresión de los canales de K^+ se asocian con alteraciones en las propiedades funcionales de las CMLV, ya que parecen estar asociados con los procesos de proliferación vascular. Aunque los mecanismos moleculares involucrados no se conocen bien, está claro que los cambios coordinados en la expresión y en la contribución funcional de los canales de K^+ son un componente integral de la plasticidad de las VSMCs, ya que permiten redirigir la actividad bioquímica celular hacia nuevas funciones^{2,3}. Además, tanto las funciones contráctiles como proliferativas de las CMLV requieren cambios específicos en el potencial de membrana y en la organización temporal y espacial de las señales de Ca^{2+} que están determinados por el conjunto de canales iónicos que expresa la célula.

El patrón de expresión de los canales de K^+ y los cambios asociados a la modulación fenotípica se han estudiado en diversas preparaciones de CMLV. Los estudios previos de nuestro grupo, han caracterizado la expresión de un gran número de canales iónicos en modelos de modulación fenotípica in vivo (por lesión endoluminal del vaso) e in vitro (en CMLV en cultivo primario). Observamos que el cambio del fenotipo contráctil al fenotipo

proliferativo se asociaba con la sobreexpresión de dos genes, el canal Kv1.3 y la subunidad accesoria de este canal, Kv β 2.1. Además, observamos que el canal Kv más abundante en el fenotipo contráctil, el Kv1.5, desaparece tras el cambio fenotípico ⁴.

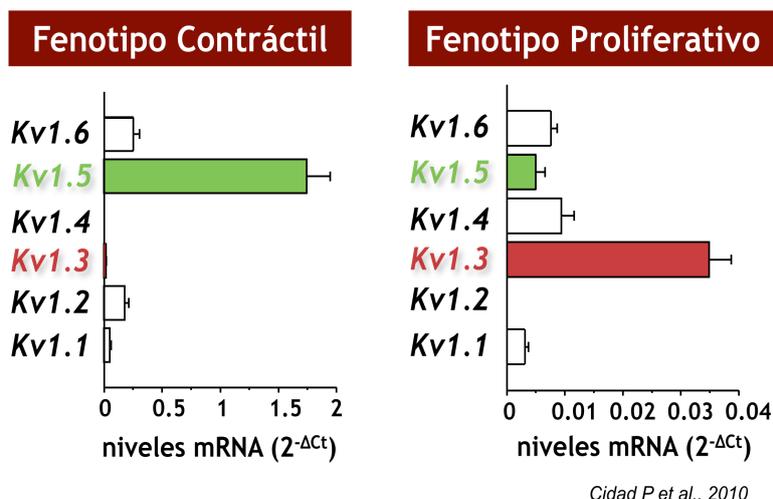


Figura 1. Niveles de mRNA de Kv1.3 y Kv1.5 en células de fenotipo contráctil y proliferativo (modificado de Ciudad et al., 2010).

Estudios posteriores han permitido demostrar que existe una asociación entre el aumento de la expresión funcional de los canales Kv1.3 y la capacidad de proliferación de las CMLV, puesto que los bloqueantes selectivos del canal inhiben la migración y la proliferación de las CMLV⁵.

Asimismo, utilizando un sistema heterólogo (células HEK293), hemos comprobado que la sobreexpresión de Kv1.3 aumenta significativamente la proliferación celular, mientras que la sobreexpresión de Kv1.5 inhibe la proliferación sin inducir apoptosis⁶.

Este es un resultado muy interesante ya que nos permite estudiar los mecanismos moleculares que asocian estos dos canales con la proliferación celular, utilizando estrategias de ganancia y pérdida de función, expresando canales mutados y/o constructos quiméricos Kv1.3/Kv1.5 en este sistema heterólogo. Las células HEK293 no expresan de forma endógena estos canales y además son un sistema muy fácil de transfectar con métodos convencionales. Sin embargo, para determinar la relevancia fisiológica de los resultados obtenidos en el sistema heterólogo necesitamos poder manipular la expresión de los canales en sistemas nativos. Utilizando CMLV en cultivo primario hemos observado que son muy difíciles de transfectar con métodos convencionales, obteniendo en todos los casos eficiencias de transfección entre el 0.5 y el 10%. Por ello, necesitamos utilizar sistemas de manipulación de la expresión génica más eficientes como pueden ser los vectores virales.

1.3 ESTRATEGIAS DE TRANSFERENCIA DE GENES

La transferencia de genes es una herramienta importante de investigación con un alto potencial para el estudio de proteínas de interés así como para el tratamiento de enfermedades humanas. Por ello, durante las últimas décadas se han desarrollados vectores virales y no virales con el fin de optimizar la transferencia génica y lograr una alta expresión del gen de interés de forma estable. Sin embargo, la seguridad y la eficiencia de transfección de DNA sigue siendo un reto considerable en determinados tipos celulares.

La manera más directa de introducir material genético en la célula es por inyección de DNA desnudo. Sin embargo, debido a las enzimas existentes en el interior celular el DNA es degradado rápidamente y por lo tanto el sistema es poco eficiente⁷. El sistema ideal para la transferencia génica aplicada a biomedicina debe ser **específico** para una determinada célula diana, **biodegradable**, **no tóxico**, **no inflamatorio**, **no inmunógeno** y **estable para su almacenamiento**. Adicionalmente, debería tener una gran capacidad para almacenar material genético, ser un sistema de transfección eficiente y poder producirse en grandes cantidades a bajo coste. En la actualidad existen un gran número de métodos de transfección, que podríamos clasificar en dos grandes grupos, los métodos que utilizan vectores virales y los que no.

Los primeros métodos desarrollados para la transferencia de genes fueron los métodos físico-químicos o no virales. En estos métodos el DNA exógeno está integrado en un plásmido que se mantiene de forma estable e independiente del genoma de la célula huésped. En general, estos métodos son sencillos de preparar, no tienen limitaciones en cuanto al tamaño del plásmido a transferir, no presentan problemas de bioseguridad y no son inmunogénicos. Sin embargo, su mayor desventaja es que muchos de ellos sólo pueden utilizarse in vitro y además su eficiencia de transfección es baja sobre todo en cultivos primarios, lo que ha hecho que muy pocos de estos vectores lleguen a ser utilizados en ensayos clínicos.

Más recientemente se han desarrollado vectores virales que permiten obtener una alta eficiencia de transfección⁸ y que en algunos casos llega a ser incluso del 100 %. Los virus tienen la capacidad de integrar los genes virales dentro del material genético de la célula infectada y así utilizar la maquinaria celular para reproducir las partículas virales. Sin embargo, a pesar de que estos sistemas son un excelente vehículo para la introducción de DNA exógeno en la célula presentan importantes limitaciones en relación con la bioseguridad bien porque puede producirse una transferencia involuntaria del virus nativo patógeno, o bien porque pueda activarse un oncogén al insertarse el vector en un sitio al azar del genoma del huésped.

Existen diferentes grupos de vectores virales y cada grupo presenta determinadas ventajas y desventajas (**Tabla I**) que los hace apropiados para diferentes tipos de aplicaciones:

- Los **adenovirus** son responsables de las principales enfermedades de las vías respiratorias. Presentan buen tropismo por las células humanas y se conocen una gran variedad de serotipos humanos aunque los más usados en terapia génica son los serotipos 2 y 5. Son virus de DNA sin envuelta que permiten introducir genes de gran tamaño. Sin embargo, la expresión in vivo es transitoria.
- Los **herpesvirus** están basados en el virus del herpes simple (HSV). Este tipo de virus presenta especificidad por células del sistema nervioso por lo que se emplean fundamentalmente para la transferencia de genes al sistema nervioso. Son virus de DNA bicatenario y con envuelta. El principal problema de estos virus es la citotoxicidad.
- Los **virus adenoasociados** son Parvovirus que infectan al hombre pero no son patógenos. Son virus de DNA monocatenario y sin envuelta que requieren de la maquinaria celular para completar su ciclo replicativo. Este tipo de vectores virales es uno de los más utilizados en la actualidad debido a sus extraordinarias características: buena capacidad de infección, integración en el genoma de la célula huésped, expresión prolongada de la proteína de interés y ausencia de respuesta inmune frente a las

proteínas virales lo que permite que la citotoxicidad sea muy baja. Además, pueden infectar tanto células no mitóticas como células en división y también tienen la ventaja de poder integrar el gen de interés en un sitio específico del genoma, sin embargo presentan limitaciones con el tamaño del gen a insertar.

- Los **retrovirus** pertenecen a la familia *Retroviridae* que engloba a su vez tres subfamilias; *Spumaviridae*, *Lentiviridae* y *Oncoviridae*. Son virus de RNA de polaridad positiva rodeados de una vuelta fosfolipídica con glicoproteínas que pueden unirse a receptores celulares específicos. En el genoma de los retrovirus se pueden encontrar tres tipos de genes: genes *gag* (que codifican proteínas de la cápside), genes *pol* (que codifican las proteínas necesarias para el ciclo viral) y genes *env* (que codifican las glicoproteínas de la envuelta)

Además, el genoma retroviral está flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR, Long Terminal Repeat). El 5'LTR contiene una región U3 que permite el comienzo de la transcripción y una secuencia de unión (pbs, primer binding site) para el comienzo de la retrotranscripción. El 3'LTR contiene una secuencia de repeticiones idénticas (ppt) para que pueda dar lugar la replicación de la segunda cadena.

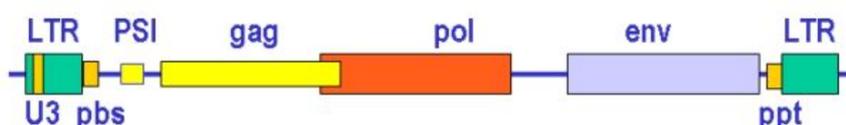


Figura 2. Estructura del genoma de un retrovirus

De las tres subfamilias de retrovirus que existen, solamente los lentivirus son capaces de atravesar la membrana celular. Debido a ello y a que contienen proteínas de localización nuclear que facilitan la entrada del virus por los poros de la membrana nuclear, son los únicos de esta familia que pueden infectar células que no están en división⁹.

Los lentivirus derivan del HIV-1, tienen un tropismo amplio, el tamaño del gen a insertar puede tener hasta 8 Kb, presentan buena infectividad y son inactivados en el torrente sanguíneo por el sistema del complemento. Una de las principales desventajas que tienen estos virus es que a pesar de que su capacidad integrativa permite que la expresión de la proteína de interés sea muy larga, en ocasiones puede ocurrir que los promotores virales se silencien por metilación y por lo tanto la expresión no es tan duradera como cabría esperar.

En la **tabla I** se muestran las principales características de los vectores mencionados:

	Adenovirus	Herpesvirus	Virus Adenoasociados	Retrovirus
Tamaño máximo gen de interés	7-8 Kb	50 Kb	5 Kb	7-8 Kb
Título máximo alcanzado (viriones/ml)	10 ¹²	10 ⁸	10 ¹¹	10 ⁸
Integración en el genoma	No	No	Si/No	Si
Duración de la expresión in vivo	Corta	Corta	Larga	Corta
Immunogenicidad	Mucha	Mucha	Poca	Poca
Problemas de seguridad	Toxicidad	Toxicidad	Mutagénesis	Mutagénesis

Tabla I. Estructura del genoma de un retrovirus.

2. OBJETIVOS

En este trabajo hemos tratado de poner a punto la utilización de vectores lentivirales expresando los canales iónicos de interés para el estudio de la modulación fenotípica (el Kv1.3 y el Kv1.5). El objetivo es poder usar estos vectores para sobreexpresar los canales en las CMLV en cultivo primario, caracterizando su contribución al fenotipo proliferativo.

Los objetivos específicos del trabajo se pueden enumerar como:

1. La determinación las condiciones más favorables de infección en células HEK 293 así como la optimización de los distintos parámetros (número de viriones, tiempo de incubación con el vector lentiviral, confluencia celular y concentración mínima y eficaz de puromicina) con el fin de obtener una alta eficiencia de transfección.
2. Una vez seleccionadas las condiciones más favorables en células HEK 293, extrapolar las condiciones a células de músculo liso vascular procedentes de arterias uterinas humanas (CMLV-AU) y de arterias coronarias de cerdo (CMLV-AC).
3. Estudiar la expresión, el tráfico y la función de los canales iónicos sobreexpresados, así como su contribución a la proliferación celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES

Líneas y cultivos celulares

Los modelos celulares utilizados durante esta investigación han sido: la línea celular humana HEK 293, y cultivos primarios de células de músculo liso vascular derivadas de arterias uterinas humanas (CMLV-AU) y de arterias coronarias de cerdo (CMLV-AC).

Las células HEK 293 son células inmortalizadas de morfología epitelial obtenidas a partir de la transformación de células de riñón embrionario humano¹⁰. Esta línea es de uso común en el estudio de canales iónicos, principalmente en estudios electrofisiológicos ya que se transfectan con bastante facilidad y además tienen una expresión endógena de canales iónicos, y en particular de canales de K, muy baja¹¹.

Las CMLV-AU son células obtenidas de muestras de arterias de donantes anónimos pertenecientes a una colección (COLMAH), mientras que las CMLV-AC se obtuvieron de corazón de cerdo. Las arterias se limpian para dejar sólo la capa muscular y se siembran en explantes. Al cabo de 1-2 semanas, las células de músculo liso vascular proliferan y migran desde los explantes dando lugar a una línea celular primaria. Estos cultivos primarios representan un buen modelo del fenotipo proliferativo de las CMLV⁴.

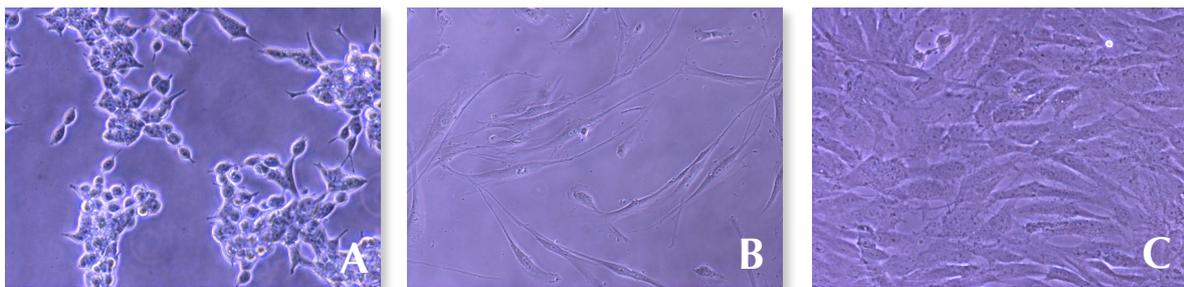


Figura 3. Células HEK 293 (3A), CMLV-AU (3B), CMLV-AC (3C). Fotos tomadas a 10X.

Medios de cultivo

Para el mantenimiento de las células HEK 293 ha usado el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con un 10% de suero fetal bovino (FBS), suplementado con L-Glutamina (Lonza) 2mM y con una mezcla de antibióticos: Penicilina 100 U/m, Streptomina 100 U/m, Fungizona 5 µg/ ml.

Para el arranque y establecimiento tanto de cultivos de CMLV-AU como de CMLV-AC se usó un medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium) con un 10% de suero fetal bovino (SFB), suplementado con insulina (5 µg/ ml, Gibco), L-Glutamina (2 mM, Lonza), bFGF (2 ng /ml) y EGF (5ng /ml, ambos de Gibco) y antibióticos (Penicilina 100 U/m, Streptomina 100 U/m, Fungizona 5 µg/ ml).

Manipulación de células HEK 293, CMLV-AU y CMLV-AC

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar Telstar Biostar (con filtro HEPA capaz de retener con una eficacia del 99,9 % partículas superiores a 0,2 µm), usando material y soluciones estériles. Las células se cultivaron en sus correspondientes medios a 37°C en un incubador Hera Cell 150 con una atmósfera de aire:CO₂ (95% : 5%).

Tripsinización

La separación de las células adherentes de las placas de cultivo para su subcultivo y / o congelación, se hizo por tripsinización en el caso de CMLV-AU y CMLV-AC. Para ello, las células se dejaron crecer hasta un 80%-90% de confluencia, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS para eliminar los restos del suero del medio que pueden inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadió una solución de tripsina-EDTA (0.02% de EDTA y 0.05% de tripsina en PBS) en un volumen suficiente como para cubrir la superficie de la placa y se incubaron durante 2 minutos en el incubador. Tras la incubación, se adicionó medio de cultivo para inhibir la acción de la tripsina en un volumen dos veces mayor que el volumen de tripsina. La suspensión de células obtenida se centrifugó durante 4 minutos a 1000 rpm (200 g). El pellet se resuspendió en 1ml de medio de cultivo y posteriormente se procedió al contaje celular empleando una cámara de Neubauer como se muestra más adelante (**Figura 4**). Este volumen se dividió en otras placas con medio de cultivo o se procedió a su congelación para su conservación.

En el caso de las células HEK, su separación no se hizo con tripsina sino mecánicamente con PBS.

Mantenimiento

Las células HEK se mantuvieron en placas de 35 mm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo (DMEM, 10% FBS) cambiándose cada 24 horas. Por otra parte, las CMLV-AU se mantuvieron en placas de 9 mm de diámetro con 500 μ l de medio de cultivo (MEM, 10% FBS) cambiándose cada 24 horas. La frecuencia de los pases celulares fue diferente para los distintos tipos celulares atendiendo a la velocidad de crecimiento de cada cultivo. En el caso de las células HEK, la velocidad de crecimiento fue elevada por lo que rápidamente (2-3 días) llegaban al 80-90 % de confluencia a diferencia de las CMLV-AU y CMLV-AC, cuya capacidad proliferativa fue mucho menor.

Es importante destacar el proceso de senescencia acelerado observado en las células de músculo liso vascular en cultivo, por el cual su capacidad proliferativa disminuía progresivamente con el número de pases llegando a ser nula (alrededor de los 10-12 pases). Por este motivo, todos los experimentos se realizaron con CMLV-AU y CMLV-AC en pases bajos (pases 3-6), en los que la células registran una buena respuesta proliferativa.

Contaje en cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es un instrumento en el que se colocan 10 μ l de suspensión celular para medir el número de células presentes en ese volumen y a partir de ahí determinar la densidad celular de la suspensión de origen. Esta cámara está adaptada al microscopio de campo claro o contraste de fases. Es un portaobjetos que tiene una depresión en el centro de 0,1 mm con una cuadrícula marcada. La cuadrícula se trata de un cuadro de 3x3 mm. El área marcada con una L en la **figura 4** se divide en 16 pequeños cuadrados de 0,25 mm de lado cada uno y corresponde a 1 mm cuadrado, que es lo que vamos a contar.

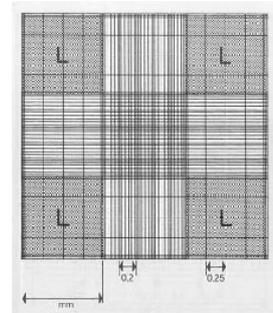


Figura 4. Cámara de Neubauer.

Además sobre la cámara colocamos un cubreobjetos que va a estar separado de la superficie de la cámara 0,1 mm. Por tanto, el volumen entre la superficie "L" y el cubre será de 0,1 mm³, o lo que es lo mismo 0,1 μ l.

Siembra en cristales tratados con Poli-L-Lisina

Las células se sembraron en cubreobjetos sobre cristales circulares (Microscope Cover Glass 12mm; ANAME 72231-01) tratados con poli-L-Lisina (Sigma) para facilitar el mayor número de células adheridas a la superficie de manera homogénea. La poli-L-Lisina se preparó con agua destilada y en condiciones de esterilidad a una concentración de 0,10 mg/ml. Después se mantuvieron los cristales circulares entre 15 – 30 minutos con la solución de poli-L-Lisina y pasado ese tiempo, se retiró la solución y se lavaron con agua destilada estéril. Los cristales se dejaron secar y se guardaron para su posterior utilización. Todo este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para garantizar la esterilidad.

3.2 PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

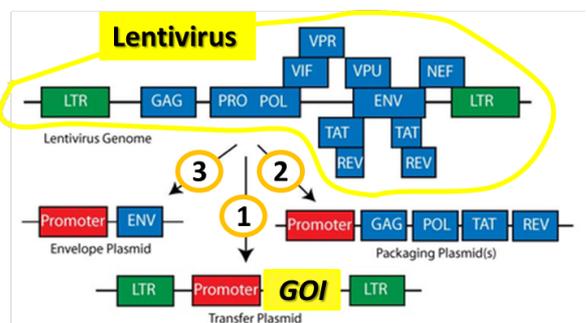
Plásmidos utilizados

Con el fin de estudiar el papel de los canales de potasio Kv1.3 y Kv1.5 en la proliferación celular se habían generado previamente en el laboratorio plásmidos expresando estos canales como proteínas de fusión con proteínas fluorescentes de la familia GFP, así como plásmidos controles expresando sólo la proteína GFP. Posteriormente, estos constructos se han subclonado en el plásmido vector que utiliza el sistema de expresión de lentivirus.

Para garantizar la seguridad del sistema, los componentes necesarios para la producción del virus se distribuyen en 3 plásmidos diferentes:

1. **Plásmido de transferencia o plásmido vector (pSIN-EF2-Sox2-Pur):** Este vector contiene nuestro gen flanqueado por los LTRs virales para facilitar su integración en el genoma del huésped. Estos plásmidos son incompetentes para la replicación y para aumentar la seguridad contienen una delección en la región U3 del LTR dando lugar a un virus autoinactivado (SIN, “self-inactivating”) tras la integración. Además, expresan un gen de resistencia a puromicina para la selección de las células infectadas.
2. **Plásmido empaquetador (ps PAX2):** Este vector lleva entre otros los genes necesarios para el empaquetamiento del RNA en la partícula viral (*gag*) y la transcripción reversa e integración en el genoma celular (*pol*).
3. **Plásmido de envuelta (PM D2.G):** Este vector porta el gen *env*, necesario para la formación de la cubierta del virus y fusión a las células

Figura 5. La figura de la derecha muestra cómo el genoma viral es editado y distribuido en los 3 plásmidos indicados. El sistema utilizado contiene un único plásmido empaquetador (2), un plásmido de transferencia con los LTRs virales y la señal de empaquetamiento viral psi en el que subclonamos nuestros constructos (1) y un plásmido codificando la proteína de la envuelta (3), que en nuestro caso es VSV-G, que infecta un amplio espectro de tipos celulares).



Los plásmidos utilizados para la obtención de vectores lentivirales se muestran en la **tabla II**.

Nº de identificación	vector	Longitud vector (pb)	Casa comercial	Inserto	Longitud inserto (pb)
p111	pMD2.G	5824	Addgene	-	-
p112	psPAX2	10703	Addgene	-	-
p119	pSin-EF2-Soux2-Pur	8496	Addgene	hKv1.3 Cherry	2300
p129	pSin-EF2-Soux2-Pur	8496	Addgene	EGFP	700
p130	pSin-EF2-Soux2-Pur	8496	Addgene	hkv1.5EGFP	2500

Tabla II. Vectores utilizados en la investigación.

Extracción de DNA plasmídico utilizando columnas Quiagen

Con una punta de pipeta se rascó el el clon de *E. coli* portador del plásmido a extraer y se introdujo la punta de pipeta con el plásmido rascado en un volumen de 6 ml de LB suplementado con Ampicilina (100 µg /ml), a 37°C en agitación toda la noche. Al día siguiente se pasaron 2 ml del cultivo de *E. coli* a un matraz aforado con 100 ml de LB suplementados con Ampicilina (100 µg /ml) y se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se cogieron las células del cultivo mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 7300x g y se eliminó el sobrenadante. La extracción del DNA plasmídico del pellet obtenido se realizó por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) comprendido en tres pasos: lisis alcalina, purificación por columna Qiagen y precipitación del DNA plasmídico. Para ello se utilizaron columnas Qiagen y tampones P1, P2, P3, QBT, QC y QF proporcionados por el kit Qiagen Plasmid Midi kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Co-transfección en células empaquetadoras 293T

Los vectores lentivirales fueron producidos por co-transfección de células empaquetadoras 293FT con los tres plásmidos:

- 1) Plásmido vector (pSin GFP, Kv1.5 o Kv1.3)
- 2) Plásmido empaquetador (PS PAX 2)
- 3) Plásmido de la envuelta (PM D.2G).

La co-transfección se realizó mediante la formación de vesículas lipídicas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen)¹². Las células empaquetadoras se cultivaron en Flask de 25 cm² a una confluencia del 90-95%.

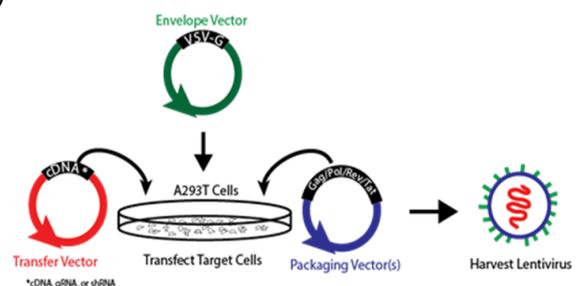


Figura 6. Co-transfección en células 293T.

Previamente a la transfección las células fueron lavadas una vez con medio Optimem (Gibco) sin suero y sin antibióticos precalentado a 37°C, dejando un volumen final de 5ml de Optimem por Flask. Por otra parte, el DNA añadido por cada Flask fue de 22,5 µg totales, en una proporción de 10 µg de plásmido vector; 7,5 µg de plásmido empaquetador y 5 µg de plásmido de la envuelta.

Para la cotransfección se diluyó en un tubo A con 1,5ml de Optimem los 22,5 µg totales de DNA y posteriormente se mezcló el contenido del tubo A en un tubo B que contenía 1,5ml de Optimem y 60 µl de Lipofectamina 2000. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla fue añadida a cada placa, incubándose

6-12 horas a 37°C al 5% de CO₂. Tras la incubación, se cambió el medio de las placas por 5 ml de Optimem fresco y se mantuvieron en cultivo 48 horas más hasta la recogida de los vectores virales, que se realizó recolectando los sobrenadantes de las placas, pasándolos por filtro de 0,45 µm y almacenándolos en alícuotas a -80°C.

Titulación de los vectores lentivirales

Extracción de RNA

Para determinar el título cuantitativo de los vectores (unidades de viriones por mililitro) se extrajo el RNA viral del sobrenadante recogido en el empaquetamiento de las partículas virales. Para ello, se utilizó el Kit PureLink Viral Mini Kit (Invitrogen). Primero se llevó a cabo la lisis de las partículas virales con proteína K (100 µg/ml) y buffer de lisis proporcionado por el fabricante durante 40 minutos a 56°C. Posteriormente se adicionó etanol al 37% con el fin de precipitar los ácidos nucleicos y el contenido se pasó a una columna silica spin proporcionada por el fabricante. Las moléculas de RNA viral quedaron retenidas en la columna mientras que las impurezas se eluyeron con Wash Buffer. Por último, la columna se pasó a un eppendorf limpio y se adicionó H₂O libre de RNAsas para eluir el RNA. Tras cuantificar el RNA viral contenido en el eppendorf se procedió a su almacenamiento a -80°C o se utilizó para la síntesis de cDNA.

Síntesis de cDNA. Transcripción inversa.

Para realizar la medida de la expresión génica de los vectores virales mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR), el mRNA del sobrenadante de las células empaquetadoras debe ser copiado a DNA complementario (cDNA) por transcripción inversa (RT). Cada muestra de RNA fue transcrita a cDNA utilizando el kit para RT-PCR, “iScript cDNA Synthesis Kit” (Bio-Rad, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

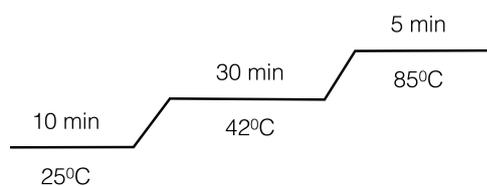


Figura 5. Programa de síntesis cDNA. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado usando un ciclo de 10 min a 25°C, un ciclo de 30 min a 42°C y un ciclo de 5 min a 85°C.

Se preparó una mezcla de reacción con los siguientes reactivos por muestra: 4 µl de Buffer 5 iScript reaction mix, 1 µl de enzima transcriptas reversa iScript, 500ng de RNA y H₂O libre de nucleasas hasta llegar a un volumen final de 20µl.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) programado con el protocolo indicado en la **figura 5**.

Estimación del número de copias de vector por PCR cuantitativa (qPCR)

Con el cDNA sintetizado se realizó una PCR cuantitativa para determinar número de viriones por µl. Para llevar a cabo la reacción de qPCR se mezclaron 5µl de cDNA (diluidos 1:10), 1,5 µl de cada oligo (Forward y Reverse) y 10 µl de 1X SYBR Green I Master Mix y 2 µl de H₂O libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 µl. Los oligos utilizados fueron los mismos que los empleados en el trabajo de L Sastry et al., 2002; FPLV2: 5'-ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC-3' y RPLV2: 5'-CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCG-3'.

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) programado con el protocolo indicado en la **figura 6**.

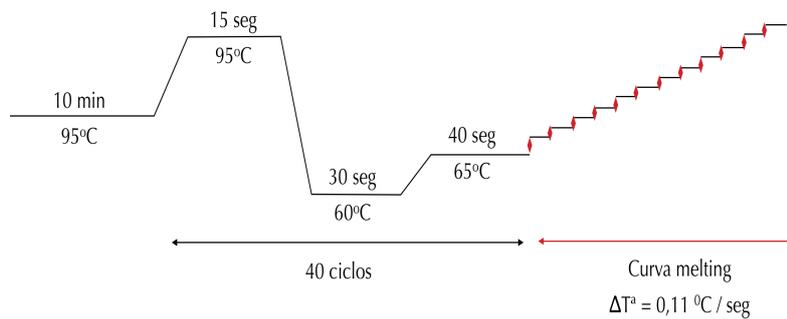


Figura 6. Protocolo qPCR. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado usando un ciclo de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 40 seg a 65°C y una curva melting con $\Delta T^{\circ} = 0,11^{\circ}\text{C}$.

Además, se realizó una curva patrón utilizando diluciones seriadas de concentraciones conocidas del vector pSin-EF2-Soux2-Pur con GFP. El número de copias de vector a partir de la concentración de DNA conocida fue calculado usando un programa informático facilitado por URI Genomics & Sequencing Center. La fórmula aplicada fue:

$$\text{N}^{\circ} \text{ copias de vector} = \frac{\text{Concentración de DNA (ng/}\mu\text{l)} \times 6,022 \cdot 10^{23}}{\text{Longitud del vector (pb)} \times 650 \cdot 10^9 \text{ (ng/mol)}}$$

donde el valor de $6,022 \cdot 10^{23}$ (moléculas/mol) corresponde al número de Avogadro, la longitud del vector se expresa en pares de bases y el valor de $650 \cdot 10^9$ (ng/mol) se corresponde con el peso molecular de un par de bases.

Los resultados de la curva patrón que se muestra en la **figura 7** revelan que existe una relación lineal entre la Ct y el número de copias de vector/ μl .

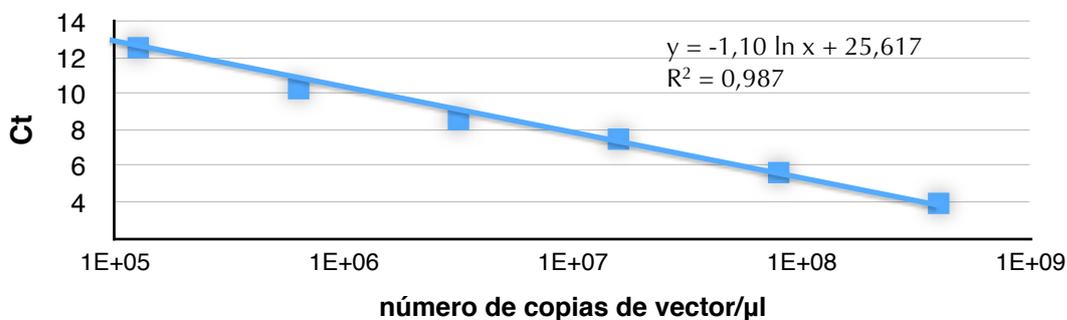


Figura 7. Curva patrón qPCR.

Los resultados obtenidos de extrapolar el valor de cada Ct problema en la curva patrón y multiplicar por los factores de dilución aplicados, se utilizaron para poner a punto la titulación de la concentración viral absoluta.

Los títulos virales obtenidos estuvieron en un rango de 10^7 y 10^8 .

3.3 INFECCIÓN DE CÉLULAS HEK 297, CMLV-AU y CMLV-AC

Con el fin de estudiar el tráfico de los canales de potasio y su relevancia en la proliferación celular se infectaron células HEK 293, CMLV-AU y CMLV-AC utilizando diferentes condiciones y parámetros. Primero se procedió a infectar células HEK 293 con diferentes unidades de viriones por célula. Para ello, se sembraron previamente en placas con pocillos de 2 cm^2 de superficie desde 20.000 hasta 40.000 células por cada pocillo.

Pasadas 24 horas, las células se infectaron con diferentes cantidades de viriones por célula (30, 300, 600, 1.000, 2.000 y 3.000) y se dejaron con el medio de infección entre 12 y 15 horas. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio de infección por medio HEK nuevo al 5% de FBS. Por otro lado, también se probó infectar las células HEK 293 utilizando 5 µg/ml de protamina.

Además, puesto que el vector viral pSin lleva incorporado un casete de resistencia a Puromicina, se realizó una curva dosis-respuesta de Puromicina para seleccionar aquellas células que habían integrado el vector. Para ello, se probaron concentraciones desde 0,1 µg/ml hasta 4 µg/ml en intervalos de 0,5 µg/ml y se cambió el medio con puromicina todos los días durante una semana. Una vez acotados los parámetros óptimos de infección en células HEK 293 se procedió a probarlos en CMLV-AU y CMLV-AC.

3.4 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para estimar la tasa de proliferación celular se utilizó el kit comercial Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor®. En este kit se utiliza EdU (5-etinil-2'-deoxyuridina) como análogo a la timidina. El EdU se incorpora de forma eficiente en la nueva síntesis de DNA y mediante una reacción colorimétrica con el fluorocromo Alexa se puede determinar el número de células que están incorporando EdU y por lo tanto en fase de proliferación.

En los ensayos de proliferación celular se sembraron 15000 células sobre cristales tratados con poli-L-lisina. Posteriormente, se incubaron las células con EdU (análogo a la timidina) a una concentración 1:1000 durante distintos tiempos dependiendo del tipo celular; las células HEK 293 se incubaron durante 45 minutos, las CMLV-AU se incubaron durante 6 horas y las CMLV-AC se incubaron durante 2 horas. Pasado el tiempo de incubación con EdU, se procedió a fijar las células durante 12 minutos con formaldehído 4X en PBS preparado a partir de formaldehído 40X. Una vez fijadas las células, se procedió a realizar el protocolo CLICK-IT. Para ello, se incubaron durante 20 minutos con Tritón X-100 al 0,5% en PBS y seguidamente se lavaron 2 veces con PBS. Después se incubaron durante 30 minutos con 250 µl de cocktail Click-it (**Tabla IV**) y tras la incubación se hicieron 3 lavados con PBS. Para marcar todos los núcleos celulares se incubó durante 15 minutos con reactivo Hoechst 1:2000 en PBS y tras la incubación se hicieron 3 lavados con PBS. Por último se procedió a montar los cristales en portaobjetos colocando previamente una gota (2-3 µl) de medio de montaje Vectashield.

Una vez montadas las muestras (3 cristales por cada condición) , se tomaron 10 fotos por cada cristal en el microscopio óptico y se analizaron los núcleos positivos respecto a los núcleos totales.

Cocktail Click-iT para vF 250 µl	
Reaction Buffer	215 µl
CuSO ₄	10 µl
Alexa 488/Alexa 532	0,625 µl
Buffer Aditivo al 10%	25 µl (2,5 µl + 22,5 µl diH ₂ O)

Tabla IV. Reactivos Click-iT.

3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNOCITOQUÍMICA

Detección de la expresión de la proteína de fusión

Las células infectadas se levantaron y se sembraron sobre cristales circulares tratados con poli-L-Lisina en un cubre estéril con medio de cultivo completo hasta una confluencia del 50-60%.

Pasadas 24 horas, se eliminó el medio de cultivo de la placa, se lavaron las células con PBS y se fijaron durante 12 minutos con formaldehído 4X en PBS preparado a partir de formaldehído 40X. Transcurrido ese tiempo, se retiró el formaldehído de la placa y se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS a temperatura ambiente. Para el marcaje de los núcleos se realizó una incubación con Hoechst 33342 (1:2000, Life Technologies) en PBS durante 20min. Por último, se retiró el cubre de la placa y se colocó sobre un portaobjetos en el que previamente se había puesto una gota de medio de montaje (Vectashield).

Una vez montadas las muestras, se utilizó un microscopio óptico UpRight monitorizado en Z Nikon Eclipse 80i con filtros UV-2A (Ex 330-380), B-2A (Ex 450-490) y G-2A (Ex 510-560).

Además para un análisis más detallado también se tomaron imágenes con un microscopio confocal LEICA TCS SP5 usando los siguientes parámetros: para la proteína fluorescente verde (GFP) y para la proteína de canal Kv1.5 se usó una longitud de onda de excitación del láser de 488nm y una ventana de emisión de 500-530nm; para la preparación que contenía proteína de canal Kv1.3 se usó un láser de longitud de onda de excitación de 532 nm y una ventana de emisión de 530 a 600nm. Se utilizó un objetivo de 60x con aceite de inmersión. En el caso de doble marcaje, las células fueron excitadas secuencialmente para la captura de imágenes

Inmunocitoquímica

Para analizar el tráfico a membrana de las distintas proteínas de fusión, las células HEK 293 y CMLV-AU subconfluentes y sembradas sobre cristales tratados con poli-L-lisina en placas multipocillo, se fijaron con formaldehído 4 X en PBS durante 12 minutos y se lavaron 3 veces con PBS. Tras la fijación, las muestras se bloquearon con Goat Serum al 2% en PBS-TritónX100 al 0,1% (Solución bloqueo permeabilizada) durante 15 minutos. Después se añadió el anticuerpo primario anti-proteína de fusión (1:50, **Tabla VI**) en solución bloqueo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras durante 5 minutos con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado fluorescentemente (1:100, **Tabla VI**) en solución bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Para el marcaje de los núcleos se realizó una incubación con Hoechst 33342 (1:2000, Life Technologies) en PBS durante 20min. Tras varios lavados con PBS y un último lavado con agua, los cristales se montaron con 2 µl de Vectashield sobre un portaobjetos de 26x76mm. Los portaobjetos se guardaron a 4°C y se analizó la inmunofluorescencia con un microscopio confocal LEICA TCS SP5.

A continuación se detallan los datos de todos los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Tipo	Especie Hospedadora	Casa Comercial y Referencia
Policlonal anti- Kv1.3 extracelular	1°	Conejo	Alomone, APC-002
Policlonal anti- GFP	1°	Ratón	Neuromab, 75-131
Policlonal anti-Kv1.5 extracelular	1°	Conejo	Alomone, APC-150
Policlonal anti- IgG de conejo (432)	2°	Cabra	Invitrogen, A-11009
Policlonal anti- IgG de ratón (488)	2°	Cabra	Invitrogen, A-11001
Policlonal anti-IgG de conejo (488)	2°	Cabra	Invitrogen, A-11008

Tabla VI. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

4. RESULTADOS

4.1 PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA

Estimación funcional del nº de viriones por célula

Para poner a punto la infección de lentivirus se probó a infectar distintas concentraciones de viriones por célula en células HEK 293 teniendo en cuenta el título obtenido en la cuantificación absoluta por qPCR.

Las concentraciones utilizadas en células HEK 293 fueron 30, 300, 600, 1000, 2000 y 3000 viriones por célula. Además, también se probó a utilizar protamina (péptido altamente catiónico que facilita la entrada del material genético en la célula) a una concentración de 5 µg/ µl.

Los resultados obtenidos indican que la expresión de la proteína de interés es mayor a medida que aumenta el número de viriones por célula, sin embargo, las cargas virales altas también ejercen un efecto citotóxico. Además, aunque el tiempo mínimo hasta que se observa la expresión es 48 horas, cuando se infecta con un número de viriones por célula más bajo es necesario que pasen al menos 72 horas para poder visualizar la expresión.

Teniendo en cuenta la elevada mortalidad de las células observada en las infecciones de 1000, 2000 y 3000 viriones por célula y el escaso nivel de expresión con 30 viriones por célula, se establece que la carga viral mínima que se puede utilizar en células HEK 293 es de 300 viriones por célula (**Figura 8**).

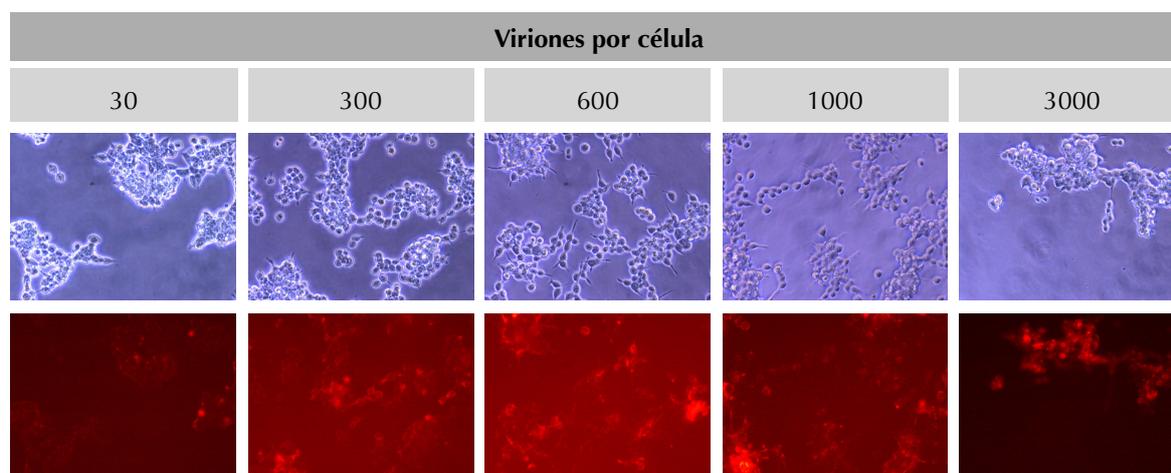


Figura 8. Células HEK 293 (con objetivo 20X) transcurridas 72 horas tras la infección con lentivirus que codifica para la proteína kv1.3 fusionado con la proteína cherry (rojo).

Respecto al uso de protamina con el fin de optimizar la infección viral no se observó ninguna diferencia en comparación con infecciones sin protamina.

Curva de selección con puromicina

La puromicina es un antibiótico ampliamente utilizado como inhibidor de la síntesis de proteínas. Este antibiótico elimina a todas las células que no han incorporado el plásmido viral con el cassette que confiere resistencia a puromicina. Para seleccionar las células resistentes a puromicina cuando se utiliza una línea celular nueva, es necesario utilizar una concentración suficiente que mate a todas las células no infectadas pero que no sea demasiado tóxica para las células que han incorporado el vector lentiviral.

Como la concentración de puromicina para las células HEK 293 (de 2 $\mu\text{g/ml}$) ya estaba optimizada previamente en el laboratorio, se procedió a titular la concentración necesaria para el cultivo primario en células de músculo liso vascular. Se probaron concentraciones en un rango de entre 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 4 $\mu\text{g/ml}$ y se refrescó el medio con puromicina todos los días.

Los resultados obtenidos fueron los mismos que para las células HEK 293, siendo la concentración mínima y eficaz de puromicina 2 $\mu\text{g/ml}$. Como se observa en la **figura 9** a partir de las 48 horas con el medio de selección de 2 $\mu\text{g/ml}$ todas las células que no presentan resistencia al antibiótico mueren al no poder sintetizar proteínas.

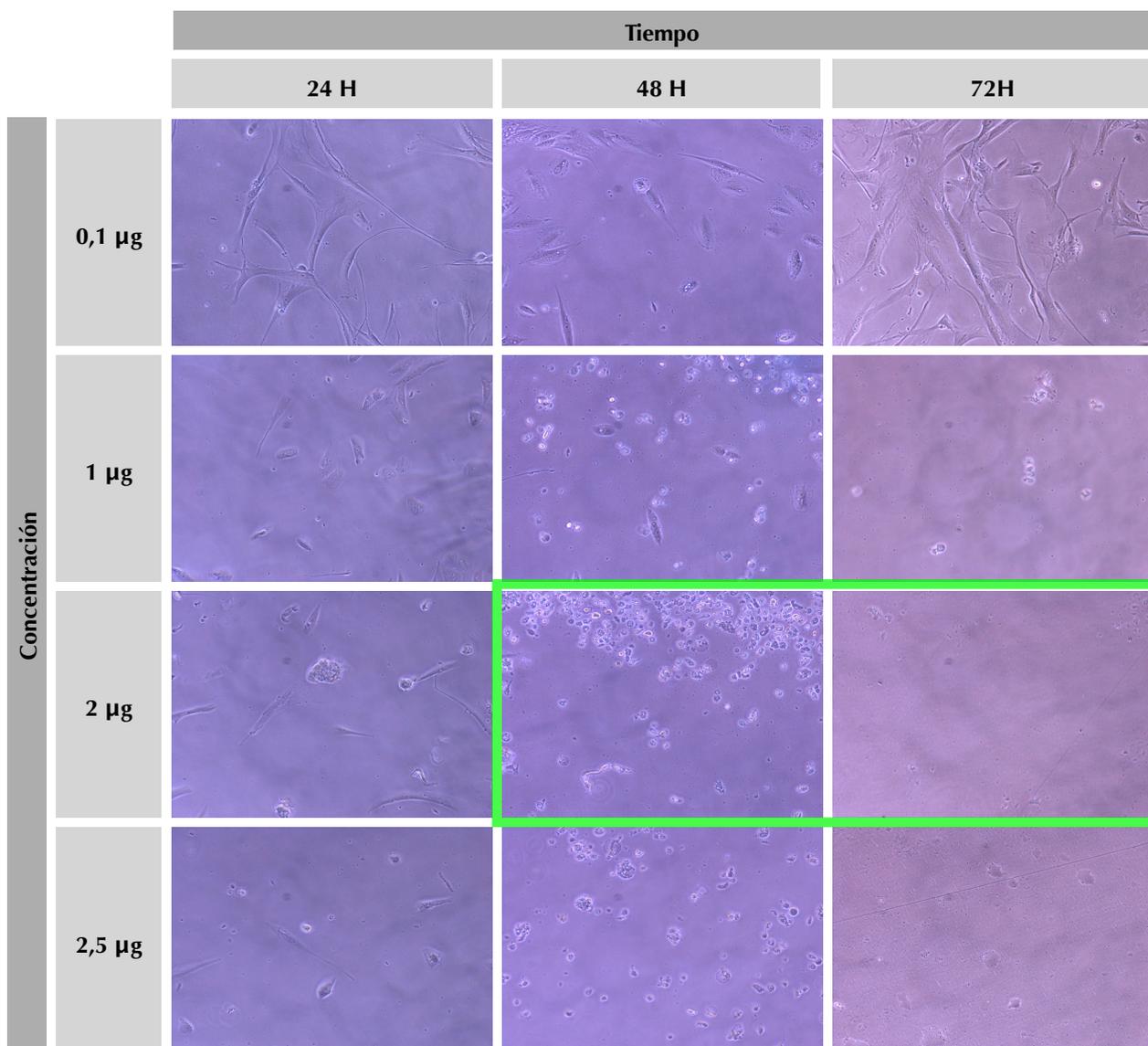


Figura 9. Tratamiento con Puromicina en CMLV-AU control no infectadas con vectores virales (objetivo 10X).

4.2 INFECCIÓN HEK 293

Microscopía confocal

Para estudiar la localización de las proteínas de interés se utilizó microscopía confocal. En la **figura 10** se muestran las imágenes obtenidas del canal Kv1.3, del canal Kv1.5 y del control con GFP.

En el caso de la proteína GFP, su expresión es mayoritaria en el núcleo y además también se encuentra por el citoplasma celular. Por otro lado, la proteína Kv1.3 trafica

principalmente a la membrana plasmática y además también se observa un característico punteado rojo. En cambio, el canal kv1.5 se encuentra mayoritariamente distribuido por el citoplasma celular y delimitando claramente la membrana nuclear.

La diferente localización de los canales iónicos puede estar relacionada con la función específica que llevan a cabo en ese momento. Además, se ha descrito en estudios previos que la función de canales de potasio como el Kv1.3 no sólo está regulada por la localización del canal sino también por interacciones con otras proteínas capaces de modular y modificar la actividad del canal^{3;14}.

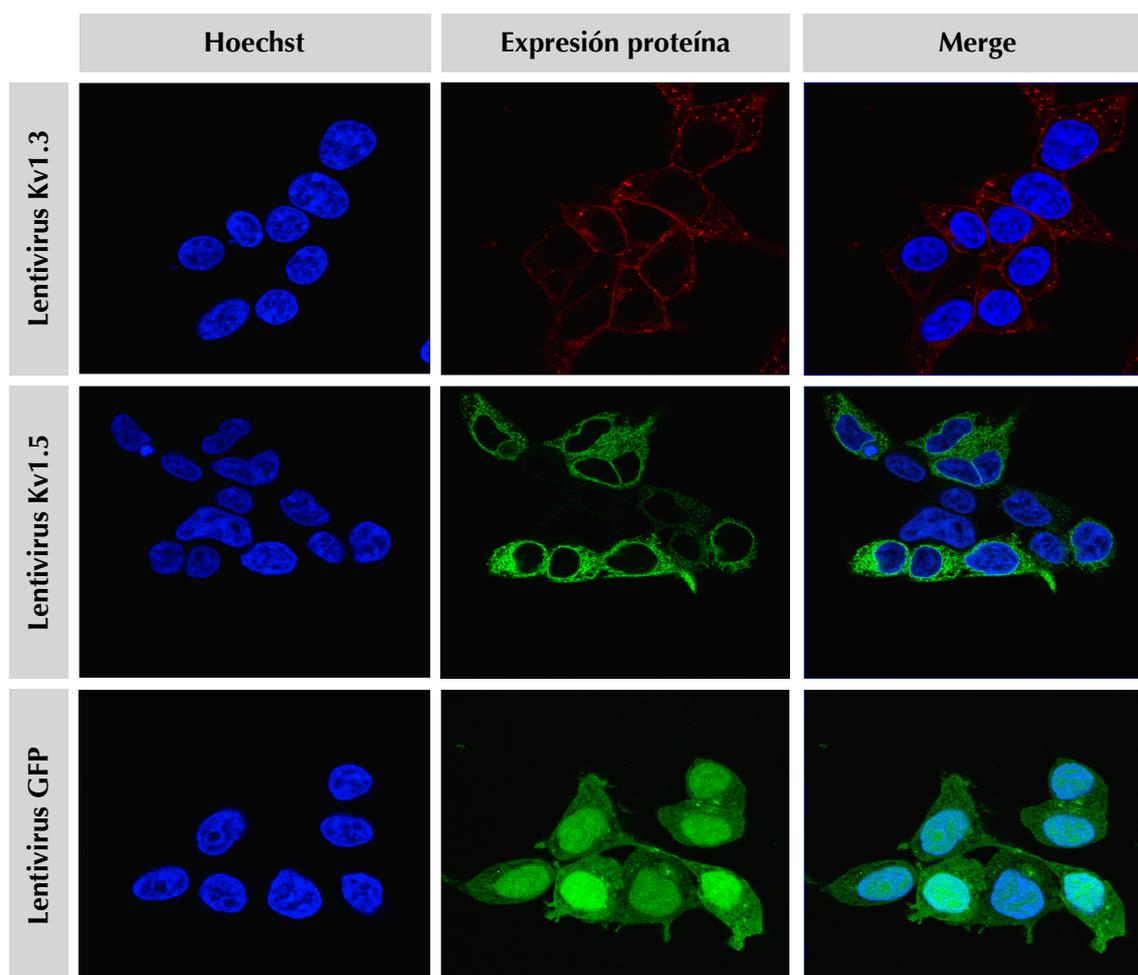


Figura 10. Microscopía confocal células HEK 293 (con objetivo 60 X) infectadas con lentivirus de Kv1.3, Kv1.5 y GFP

Ensayo de proliferación

Se determinó la proliferación celular de células HEK 293 tras incubarlas 45 minutos con EdU (análogo a la Timidina). Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 11**. La proliferación de las células infectadas con canal Kv1.3 fue significativamente superior a las células infectadas con Kv1.5 y con control de GFP. Este resultado era de esperar ya que en las células de fenotipo proliferativo, predomina la expresión de Kv1.3 sobre la expresión de Kv1.5^{4;6} y por tanto, todas aquellas células con mayor expresión de Kv1.3 respecto a Kv1.5 presentan mayores índices de proliferación. Por otro lado, las células infectadas con Kv1.5 presentan índices de proliferación significativamente menores respecto a las células control de GFP y las células infectadas con Kv1.3. Al contrario que el canal Kv1.3, cuando las

células expresan mayor ratio Kv1.5/Kv1.3 predomina el fenotipo contráctil y disminuye la capacidad proliferativa como se observa en la imagen.

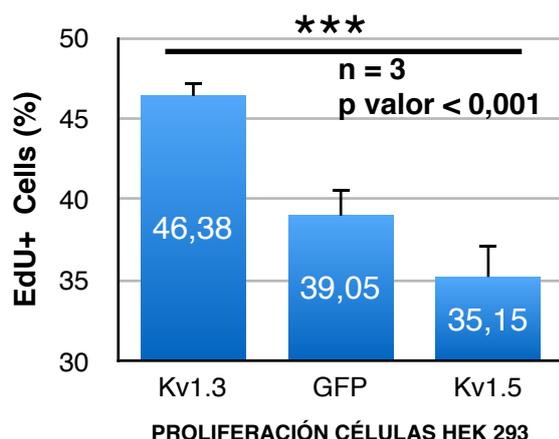


Figura 11. Valores promedio \pm desviación típica de células HEK 293 infectadas con lentivirus de Kv1.3, Kv1.5 y GFP. Experimento con $n=3$. Para el análisis estadístico se aplicó un test ANOVA de un factor y el resultado obtenido fue un p valor $< 0,001$ entre los distintos grupos.

4.3 INFECCIÓN CMLV-AU

Estimación nº de viriones por célula

Una vez optimizados los parámetros en células HEK 293 se procedió a infectar las CMLV-AU utilizando las mismas condiciones. Sin embargo, las eficiencias de infección obtenidas fueron mucho más bajas que en células HEK 293 y debido a ello se procedió a utilizar concentraciones mayores, en concreto de 120, 1200, 2400 y 12000 viriones por célula (**figura 12**). Al igual que en la titulación de los virus en las células HEK 293, se observó poca eficiencia de infección con la concentración más baja y un efecto tóxico con concentraciones altas por lo que se determinó que la concentración mínima de viriones para observar la expresión de la proteína canal en CMLV-AU es de 1200 viriones por célula y el tiempo mínimo para poder observar la expresión tras la infección es de 72 horas.

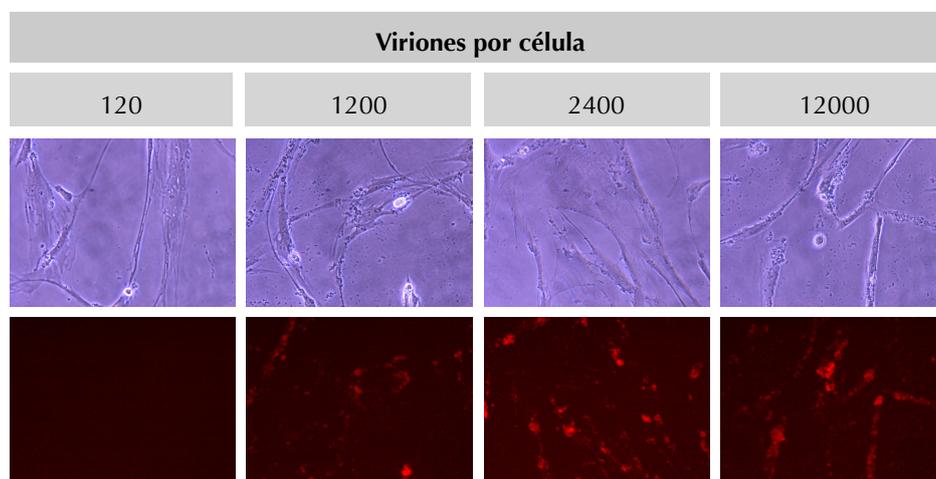


Figura 12. CMLV-AU (con objetivo 10X) transcurridas 72 horas tras la infección con lentivirus que codifica para la proteína kv1.3 expresada en color cherry.

Además, en el caso del canal Kv1.3 se observó mayor expresión en restos celulares o grupos correspondientes a células muertas. Este resultado indica que la sobreexpresión del canal Kv1.3 en CMLV de cultivos primarios puede tener un efecto tóxico sobre las mismas. De hecho, debido a la gran dificultad e imposibilidad de mantener células vivas expresando el canal se decidió no seguir con este lentivirus en sucesivos experimentos. Por el contrario, con el canal Kv1.5 y el control de GFP no se observó un problema tan grande de viabilidad celular. En el caso del lentivirus control, la concentración mínima de viriones para observar

la expresión de GFP en CMLV-AU fue de 1200 viriones por célula. Esta expresión no se observó hasta pasados 5 días. Por otra parte, la infección con el canal Kv1.5 fue más difícil de identificar debido a la expresión sumamente tenue del canal (**figura 13**).

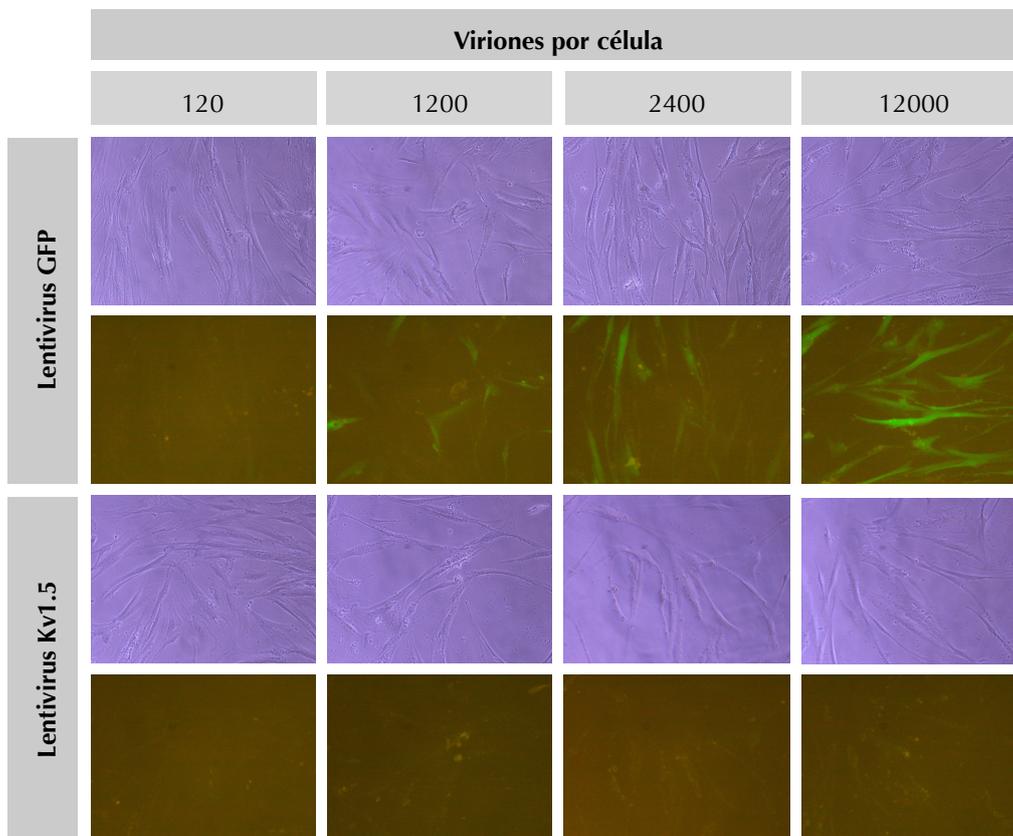


Figura 13. CMLV-AU (con objetivo 10X) transcurridos 5 días tras la infección con lentivirus que codifica para la proteína GFP y Kv1.5 expresada en color verde.

Inmunocitoquímica

Para estudiar la localización de las proteínas de interés se realizó una inmunocitoquímica con los anticuerpos específicos. En la **figura 14** se muestran las imágenes obtenidas con microscopía confocal del canal Kv1.3, del canal Kv1.5 y del control con GFP.

En las imágenes correspondientes a la infección con proteína Kv1.3, se puede observar una intensidad de expresión muy baja. Esta poca eficiencia de infección se corresponde con la dificultad de conseguir expresar de forma estable el canal en células de cultivos primarios. Además, como se muestra en la figura 14, también se observa un punteado rojo con mayor intensidad de expresión que se corresponde con restos de células muertas. En el caso de la expresión del canal Kv1.5 y del control de GFP, se observó la misma distribución que en células HEK 293. El canal Kv1.5 se encuentra mayoritariamente por el citoplasma de la célula de músculo liso vascular delimitando claramente el núcleo celular donde no se observa expresión mientras que la expresión de la proteína GFP se encuentra de forma homogénea por el citoplasma celular y el núcleo. Sin embargo, a diferencia de la elevada expresión de GFP que se observó en el núcleo de las células HEK 293, la expresión de la proteína en el núcleo de CMLV-AU fue mucho más tenue.

Hay que destacar que los anticuerpos policlonales utilizados no parecen ser muy específicos puesto que ha sido necesario saturar las imágenes correspondientes a los anticuerpos para poder visualizar la expresión. Además, en este caso todas las células que

se muestran han sido permeabilizadas ya que cuando se realizó el mismo experimento sin permeabilización no se observó la unión del anticuerpo a la membrana celular.

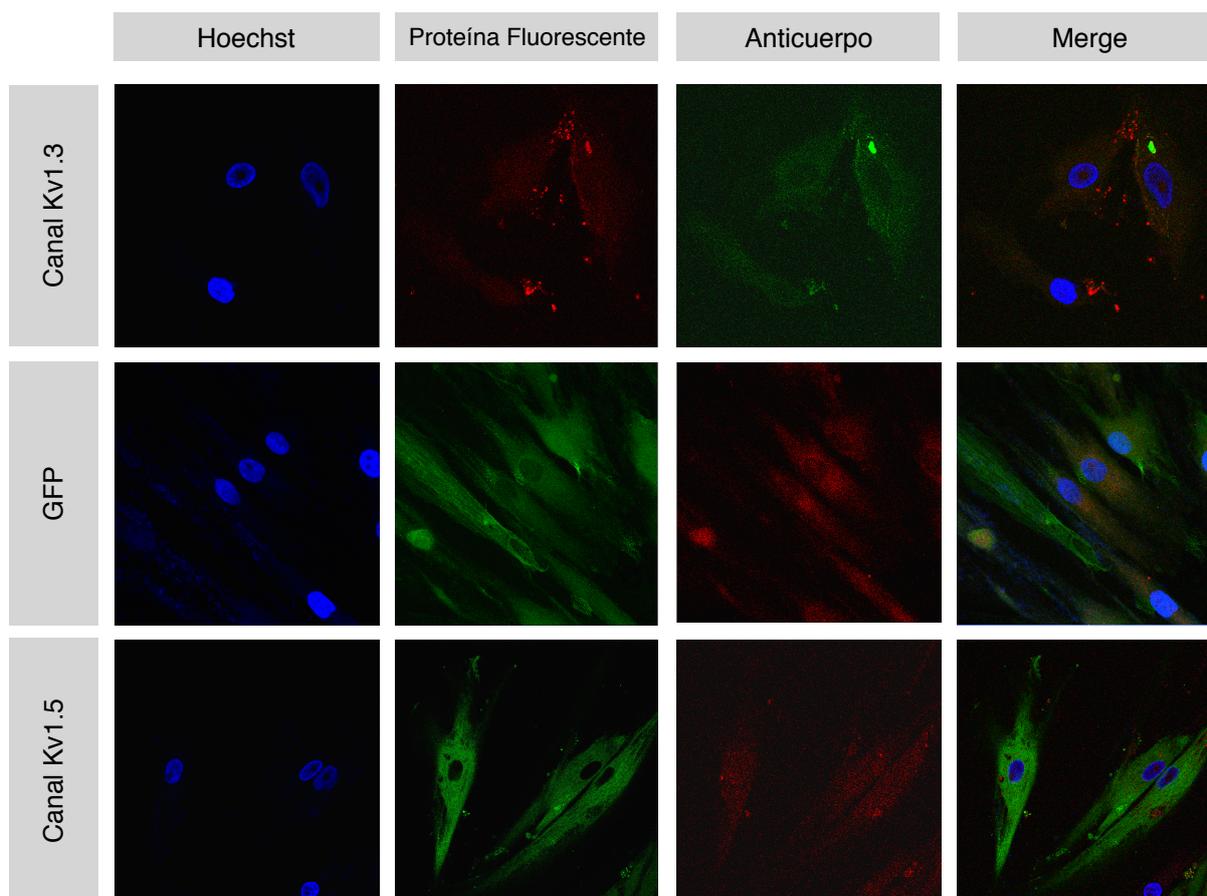


Figura 14. Microscopía confocal inmunocitoquímica de CMLV-AU permeabilizadas y previamente infectadas con lentivirus de Kv1.3, Kv1.5 y GFP. Las fotos se muestran con un objetivo de 60X.

Ensayo de proliferación

Debido a la imposibilidad de mantener células de músculo liso vascular vivas sobreexpresando el canal Kv1.3, sólo se pudo realizar ensayos de proliferación con células infectadas con Kv1.5 y GFP. En la **figura 15** se muestra un descenso significativo del número de células con capacidad proliferativa respecto al control con GFP. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en las células HEK 293 y por tanto nos permiten confirmar que también en las CMLV-AU la sobreexpresión del canal Kv1.5 inhibe la activación del fenotipo proliferativo.

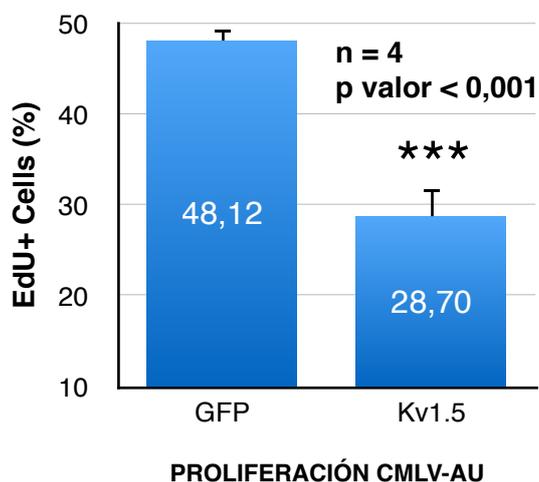


Figura 15. Valores promedio \pm desviación típica de CMLV-AU infectadas con lentivirus de Kv1.5 y GFP. Experimento con n=4 por triplicado. Para el análisis estadístico se aplicó un t-test y el resultado obtenido fue un p valor < 0,001 entre los distintos grupos.

4.4 INFECCIÓN CMLV-AC

Immunocitoquímica:

Para estudiar la localización de las proteínas de interés en CMLV-AC se realizó una inmunocitoquímica permeabilizada con los anticuerpos específicos. En la **figura 16** se muestran las imágenes obtenidas con microscopía confocal del canal Kv1.5 y de diferentes anticuerpos específicos. Los resultados indican que la expresión del canal Kv1.5 se encuentra por todo el citoplasma celular delimitando la membrana nuclear. Esta expresión a modo de red por el citoplasma también se observó en células HEK 293 y CMLV-AU. La expresión del anticuerpo de GFP en estas células se observó de manera ubicua tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Por último, también se utilizó un control positivo con el anticuerpo SM22, marcador específico de músculo liso.

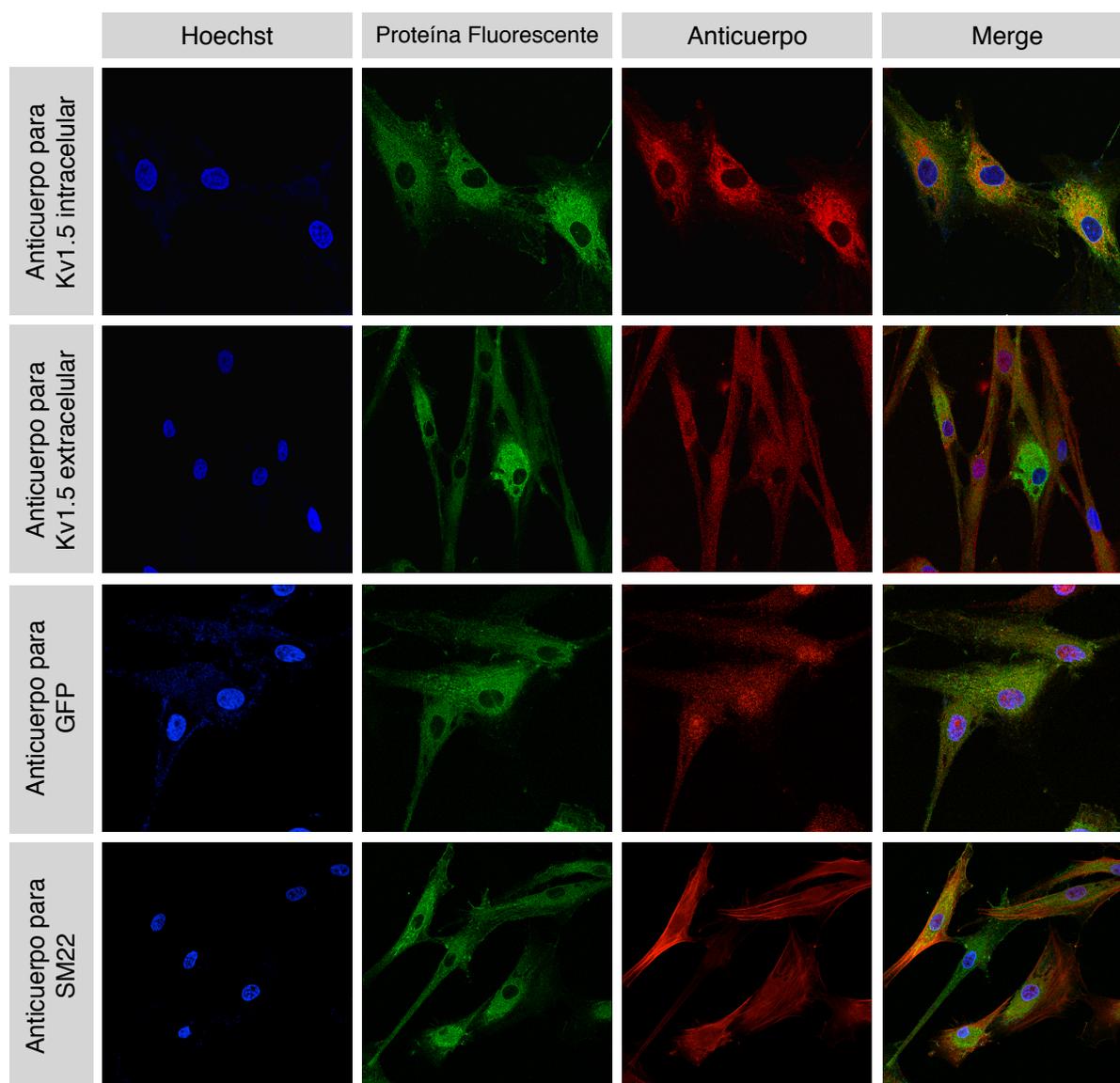
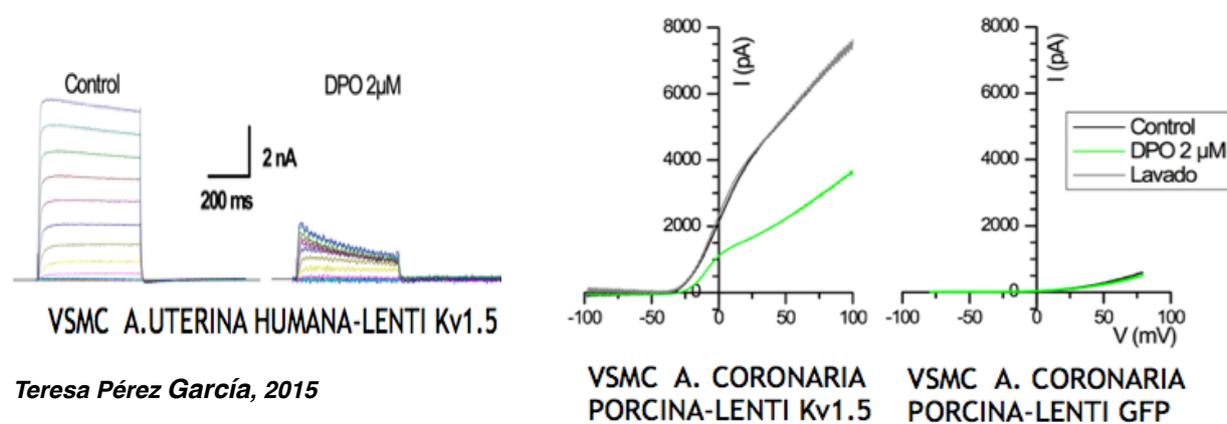


Figura 16. Microscopía confocal inmunocitoquímica de CMLV-AU permeabilizadas y no permeabilizadas previamente infectadas con lentivirus de Kv1.3, Kv1.5 y GFP. Las fotos se muestran con un objetivo de 60X. Las células se permeabilizaron en todas las condiciones excepto en la condición con anticuerpo Kv1.5 extracelular.

Medida de corrientes iónicas por Patch Clamp

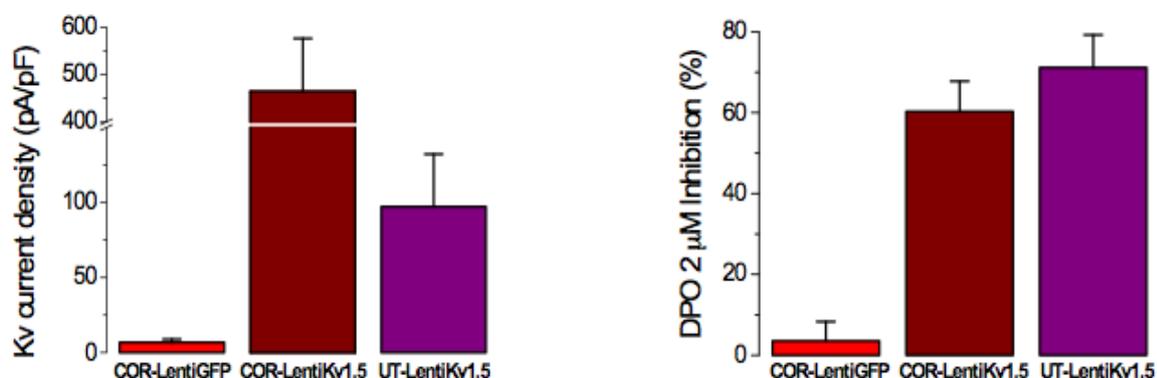
Para apoyar los datos que se vieron en la inmunocitoquímica de CMLV-AC en el laboratorio se probó a medir las corrientes de potasio de células de músculo liso vascular infectadas con lentivirus Kv1.5 y lentivirus GFP por electrofisiología.

Como se muestra en las **figuras 17 y 18**, el registro de corrientes permitió identificar diferencias significativa en las células infectadas con Kv1.5 respecto a las células control con GFP. En el caso de las células con el canal Kv1.5 se registraron corrientes de hasta 8000 pA. Además, también fue posible bloquear las corrientes con DPO, el bloqueante selectivo del Kv1.5, de forma reversible. En las células controles (no infectadas o infectadas con GFP) se registraron corrientes mucho menores que no fueron sensibles a DPO. Aunque se observó el mismo efecto tanto en CMLV-AU como en CMLV-AC, fue más acusado en CMLV-AC.



Teresa Pérez García, 2015

Figura 17. Registros de corriente de células de músculo liso vascular de arterias uterinas y coronarias infectadas con lentivirus Kv1.5. **Derecha** Curva I/V obtenida a partir de los registros de corriente de potasio tomando para cada valor de potencial la amplitud pico de la corriente. Se representan los valores obtenidos de ambos tipos celulares en solución control (trazo negro), en presencia de 2µM DPO (trazo verde) y tras volver a solución control (trazo gris).



Teresa Pérez García, 2015

Figura 18. **Izquierda.** Diagrama de barras de la densidad de corriente registrada en células control y Kv1.5. **Derecha** Representación del porcentaje de inhibición de corrientes tras suministrar 2µM de DPO en células control y Kv1.5.

Ensayo de proliferación

Se determinó la proliferación celular en CMLV-AU en diferentes condiciones tras incubar el cultivo celular durante 2 horas con EdU.

En el experimento 1 se estudió la proliferación de las células infectadas con lentivirus de GFP y Kv1.5 sin haber sido tratadas con puromicina. No se observó diferencia significativa entre el grupo control (células sin infección lentiviral) y el grupo con lentivirus de GFP. Sin embargo, sí que se observó diferencia significativa entre las células con Kv1.5 y las células control o GFP. Este resultado era de esperar ya que en experimentos previos en células de músculo liso vascular y en células HEK 293 se había visto que la sobreexpresión del canal Kv1.5 disminuía la actividad proliferativa.

En el experimento 2 se realizó el mismo ensayo de proliferación pero las células habían sido tratadas con puromicina, con lo cual, tenemos una mayor población de células expresando el canal y las diferencias son mas claras (p valor $< 0,01$).

Estos resultados se reprodujeron en cuatro experimentos diferentes utilizando en cada uno de ellos 3-4 cristales por condición. Los datos promedio se muestran en la **figura 20**.

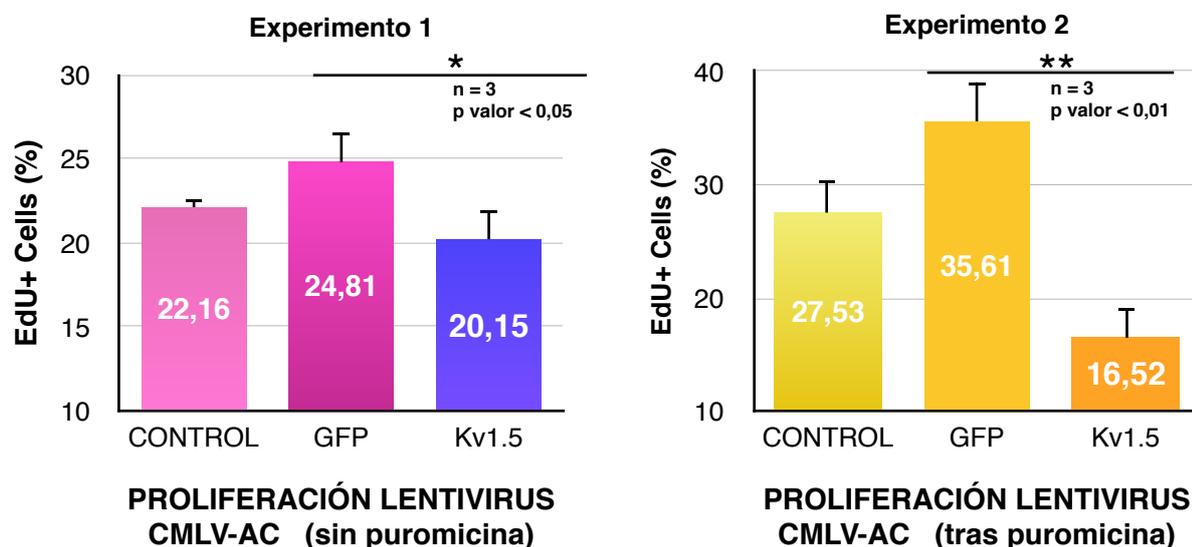


Figura 19. Valores promedio \pm desviación típica de CMLV-AC control e infectadas con lentivirus de Kv1.5 y GFP. Experimentos con $n=3$. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA de un factor y el resultado obtenido fue un p valor $< 0,05$ en el experimento 1 y un p valor $< 0,01$ en el experimento 2.

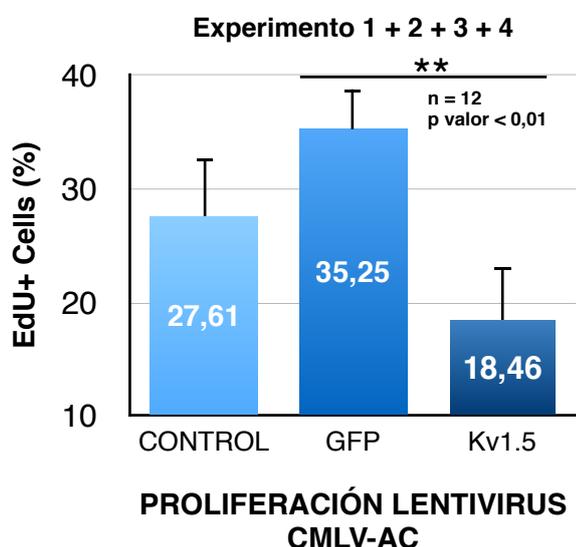


Figura 20. Valores promedio \pm desviación típica de CMLV-AC control e infectadas con lentivirus de Kv1.5 y GFP. Experimentos con $n=12$. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA de un factor y el resultado obtenido fue un p valor $< 0,01$.

5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo ha sido la puesta a punto del uso de vectores lentivirales con el fin de expresar de forma estable distintos canales iónicos que pueden ser relevantes para la proliferación de las células de músculo liso vascular.

Tras el estudio bibliográfico de los distintos tipos de vectores virales se optó por utilizar los lentivirus. Este tipo de vectores virales derivan del HIV-1 y pertenecen a la familia de los retrovirus. La principal ventaja del uso de estos vectores es su capacidad de infectar células que no están en división o que se dividen muy lentamente como las CMLV. Además permiten integrar el gen de interés en el genoma de la célula huésped y son un sistema que está disponible comercialmente.

Con respecto al primer objetivo específico, **la determinación de las condiciones y los parámetros más favorables de infección en células HEK 293**, nuestros resultados indican que a pesar de que la expresión de la proteína de interés (Kv1.3, Kv1.5 o GFP) es más temprana cuanto más elevada es la concentración de viriones por célula, las altas concentraciones ejercen un efecto citotóxico sobre el cultivo celular. Este efecto citotóxico puede ser debido al insulto que supone la infección en sí junto con los efectos funcionales de la sobre expresión de los canales iónicos, que van a dar lugar a cambios en el potencial de membrana o en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Estos efectos tóxicos fueron mucho más acusados con la sobreexpresión de canales Kv1.3 que los canales Kv1.5. Por otro lado, no se observó expresión hasta transcurridas 24 horas tras la infección, siendo las 72 horas el tiempo mínimo para observar la expresión de concentraciones de viriones bajas. Este efecto es debido a que cuantos menos viriones infectan a cada célula, la expresión es más baja y es necesario que transcurra más tiempo para que se sintetizen más proteínas y poder detectar la señal. La concentración mínima de viriones para observar la expresión de la proteína de los canales (o de la GFP) fue de 300 viriones por célula.

Otro de los parámetros que se estudió fue la **concentración de puromicina mínima y eficaz para seleccionar células de músculo liso vascular**. La concentración de puromicina óptima para las células HEK 293 ya había sido puesta a punto previamente en el laboratorio. El resultado obtenido fue el mismo en ambos tipos celulares. El tratamiento con puromicina es de gran importancia puesto que al no obtener una eficiencia de infección del 100% de las células, es el mejor método de eliminar todas aquellas células que no contienen el gen de interés.

El segundo objetivo de este trabajo trata de extrapolar las **condiciones** acotadas en el sistema heterólogo de células HEK 293 a **cultivos primarios de células de músculo liso vascular**.

Los resultados obtenidos indican que la concentración mínima de viriones por célula para detectar la expresión de las proteínas de interés en células de músculo liso vascular es 4 veces mayor que la necesaria en el sistema heterólogo. En esta gran diferencia puede ser importante el hecho de que el tamaño de las células HEK 293 es muchísimo menor que el de las CMLV, con lo cual las proteínas que se sintetizan a partir de un número determinado de viriones quedan más concentradas en el citoplasma y la expresión es más fácilmente detectable. En el caso de la infección en CMLV, como el tamaño es mayor y ocupan más espacio el número de células sembradas es menor y la concentración de viriones / ml de medio también es mucho menor. En este sentido, si bien en este trabajo hemos utilizado la forma convencional de referirse a la concentración de partículas virales, como n° de

viriones/célula, hay que tener en cuenta que esta medida no correlaciona con la concentración de viriones si se expresa en función del volumen de medio o de la superficie ocupada por las células. En cada uno de los tipos celulares, se sembraron por pocillo un número diferente de células, ya que el parámetro que se tuvo en cuenta fue la densidad del cultivo, o el % de confluencia, y puesto que los tamaños celulares eran tan diferentes el número de células sembradas también lo fue, y sembramos en torno a 3 veces más de células HEK que CMLV. Teniendo en cuenta estas consideraciones, si en lugar de hablar de viriones/célula utilizamos medidas de concentración de partículas virales (viriones/ml de medio) las diferencias observadas entre los distintos tipos son mucho menores y las concentraciones efectivas son más comparables, y las diferencias de 4 veces en el nº de viriones/célula (de 300 a 1200) se reducen a diferencias de 1,6 veces (de $2,2 \times 10^7$ a $3,5 \times 10^7$ viriones/ml de medio en promedio (*tabla VII*). En cualquier caso, parece claro que los parámetros óptimos de infectividad deben acotarse para cada tipo celular en función de sus características fisiológicas y morfológicas.

Tipo celular	Tamaño (μm)	Nº Células sembradas	Nº de viriones/célula	Nº viriones / ml
CMLV-AU / CMLV-AC	25-80	7000-8000	1200	$3,3 \cdot 10^7$ - $3,8 \cdot 10^7$
HEK 293	10-25	15000-20000	300	$1,8 \cdot 10^7$ - $2,4 \cdot 10^7$

Tabla VII. Comparación de los parámetros de infección utilizados en células HEK 293 y CMLV.

Respecto a la sobreexpresión del canal Kv1.3 en CMLV-AU se puede concluir en base a los resultados obtenidos que este canal ejerce un efecto citotóxico sobre las células de cultivos primarios incluso en infecciones con una carga viral baja. Puede ser que el propio constructo viral sea tóxico para este tipo celular o bien que la propia sobreexpresión del canal sea incompatible con la supervivencia celular ya que la gran mayoría de las células que conseguían expresar la proteína canal acababan muriendo con el paso de los días de manera y sólo fue posible detectar expresión en zonas correspondientes a células muertas o restos celulares. Este efecto no era de esperar puesto que no se había observado en células HEK 293.

Una vez establecidos los parámetros óptimos para la infección con vectores lentivirales, **se estudió la localización de las distintas proteínas de interés** por microscopía confocal. Los resultados obtenidos tanto en células HEK 293 como en CMLV indican que el canal Kv1.3 trafica fundamentalmente hacia la membrana celular mientras que el canal Kv1.5 además de estar localizado en la membrana también se encuentra por el citoplasma celular a modo de red. Es posible que esta distribución intracelular del canal Kv1.5 sea consecuencia del mal tráfico del canal a la membrana, o alternatively puede deberse a que existan asociaciones de la proteína del canal con el citoesqueleto celular. Respecto al control de células infectadas con GFP, los resultados indican que tiene una localización homogénea por toda la célula y a diferencia de los canales Kv1.3 y Kv1.5, la expresión de GFP también se encuentra en el núcleo.

La comprobación de que el marcaje de los distintos constructos corresponde en caso de los canales iónicos a la expresión de las proteínas de fusión y de que estas proteínas de fusión codifican para canales funcionales se llevó a cabo con dos técnicas complementarias. La expresión de las proteínas se estudió mediante inmunocitoquímica, y la expresión funcional de los canales mediante técnicas de registro electrofisiológico y utilizando bloqueantes selectivos.

Al realizar la **inmunocitoquímica** de CMLV con anticuerpos específicos para los distintos canales los resultados obtenidos inicialmente no fueron los esperados. Como se muestra en las imágenes de CMLV-AU, la detección de los anticuerpos es muy tenue, incluso utilizando el microscopio confocal. Estos resultados sugerían que o bien los anticuerpos primarios utilizados no eran tan específicos o tan sensibles como cabría esperar o bien teníamos algún otro problema técnico con el procedimiento o con los anticuerpos secundarios. La repetición de esta técnica utilizando más controles positivos y cambiando el espectro del anticuerpo secundario nos ha permitido concluir que el problema era esto último. Utilizando CMLV-AC infectadas con el lentivirus del Kv1.5 hemos podido detectar una expresión robusta de la proteína del canal utilizando dos anticuerpos diferentes (uno frente a un epítipo intracelular y otro extracelular) así como utilizando un anticuerpo frente a la GFP de la proteína de fusión. Estos resultados confirman la expresión de la proteína codificada por el lentivirus, por lo que sería necesario volver a repetir la inmunocitoquímica de CMLV-AU probando otros anticuerpos diferentes.

Debido a estos problemas iniciales para detectar la expresión de los canales con anticuerpos en las CMLV, llevamos a cabo un **estudio de la funcionalidad del canal**. Para ello se realizaron registros de las corrientes iónicas de las células infectadas con lentivirus de GFP y de Kv1.5. Los resultados obtenidos demuestran la funcionalidad de la sobreexpresión del canal Kv1.5 tanto en CMLV-AU como en CMLV-AC. En ambos casos se observó un aumento muy llamativo de las corrientes totales de las células, y se comprobó que estas corrientes eran debidas a la sobreexpresión del canal Kv1.5 mediante la inhibición por DPO, que es un bloqueante selectivo de los canales Kv1.5. La contribución de este canal en la corriente total de la célula es un claro indicativo que el uso de vectores virales es un buen método para sobreexpresar estas proteínas de forma estable en cultivos primarios.

Por último, los resultados de los **ensayos de proliferación** en células HEK 293 y CMLV infectadas con las distintos lentivirus fueron los esperados. En el caso de las células HEK 293 ya se habían hecho ensayos de proliferación previos con estos canales utilizando vectores no virales y ya se había observado que el número de células con actividad proliferativa era significativamente mayor en células transfectadas con Kv1.3 que en células control. Además, las células transfectadas con Kv1.5 presentaban un descenso significativo de la actividad proliferativa⁶. Los cambios observados con el sistema lentiviral son en general más pronunciados, como cabe esperar si tenemos un mayor número de células expresando los canales (casi el 100% de células infectadas tras la selección con puomicina frente a un 35-50% de células transfectadas). Para concluir, los cambios en la expresión de distintos canales de K⁺ como el Kv1.3 y el Kv1.5 tanto en el sistema heterólogo como en los cultivos primarios, están intrínsecamente relacionados con la actividad proliferativa y además contribuyen de forma importante al mantenimiento de la homeostasis y el fenotipo celular.

En resumen, el presente trabajo proporciona una detallada descripción de la puesta a punto del uso de vectores lentivirales con el fin de estudiar la funcionalidad de distintos canales iónicos involucrados en la modulación fenotípica de las CMLV. Además, los datos mostrados sugieren que los canales iónicos Kv1.3 y Kv1.5 son relevantes en la modulación fenotípica de las CMLV y por lo tanto el estudio en profundidad de estos canales puede ser de gran utilidad de cara a la identificación de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de patologías asociadas a la proliferación de las CMLV como la hipertensión, aterosclerosis o la neovascularización de procesos tumorales, entre otras.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que resumen los resultados obtenidos de la puesta a punto del uso de vectores lentivirales en este trabajo de investigación son las siguientes:

1. El número de viriones mínimo para observar la expresión de las proteínas de interés en células HEK 293 es de 300 viriones/célula, siendo necesario que transcurra un tiempo mínimo de 72 horas para observar dicha infección.
2. En el caso de células procedentes de cultivos primarios, el número de viriones es 4 veces mayor, lo que indica que los parámetros óptimos de infectividad deben acotarse para cada tipo celular en función de sus características fisiológicas y morfológicas.
3. Además, la sobreexpresión de canales Kv1.3 y Kv1.5 con los vectores lentivirales ejerce un efecto citotóxico que es más acusado en las CMLV que en las HEK y más llamativo para el Kv1.3 que para el Kv1.5.
4. Los cambios en la expresión de distintos canales de K⁺ como el Kv1.3 y el Kv1.5 están intrínsecamente relacionados con la actividad proliferativa y además contribuyen de forma importante al mantenimiento de la homeostasis y el fenotipo celular.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados de esta puesta a punto nos permiten extraer una serie de conclusiones interesantes, pero también nos plantean nuevas cuestiones que han de explorarse. Entre ellas cabe destacar:

- Usar bloqueantes específicos del canal Kv1.3 como el PAP-1 para comprobar si la toxicidad es por la propia actividad del canal o bien por otros factores desconocidos.
- Explorar la agresividad de los distintos vectores virales mediante estudios de apoptosis celular para tener una idea más real de la viabilidad celular tras la infección con cada vector.
- Realizar una nueva producción de lentivirus siguiendo el mismo protocolo con el fin de comprobar la reproducibilidad de la técnica.
- Intentar cuantificar la expresión de marcadores asociados al fenotipo contráctil o proliferativo que apoyen la funcionalidad del canal Kv1.5 o Kv1.3.
- Por último, también sería interesante infectar directamente arterias de ratón in-vivo, ya que nos podría dar una idea más real del comportamiento de los canales en un ambiente fisiológico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995;75:487-517.
2. Neylon CB. Potassium channels and vascular proliferation. *Vascular Pharmacology* 2002;38:35-41.
3. Beech DJ. Ion channel switching and activation in smooth-muscle cells of occlusive vascular diseases. *Biochemical Society Transactions* 2007;35:890-894.
4. Ciudad P, Moreno-Dominguez A, Novensa L, Roque M, Barquin L, Heras M et al. Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1203-1211.
5. Ciudad P, Miguel-Velado E, Ruiz-McDavitt C, Alonso E, Jimenez-Perez L, Asuaje A et al. Kv1.3 channels modulate human vascular smooth muscle cells proliferation independently of mTOR signaling pathway. *Pflugers Arch* 2014
6. Ciudad P, Jimenez-Perez L, Garcia-Arribas D, Miguel-Velado E, Tajada S, Ruiz-McDavitt C et al. Kv1.3 channels can modulate cell proliferation during phenotypic switch by an ion-flux independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1299-1307.
7. Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003;10:453-458.
8. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm* 2014;459:70-83.
9. Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 2006;1:241-245.
10. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
11. Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv beta 2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;271:2406-2412.
12. Toscano MG, Frecha C, Ortega C, Santamaria M, Martin F, Molina IJ. Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Ther* 2004;11:956-961.
13. Campomanes CR, Carroll KI, Manganas LN, Hershberger ME, Gong B, Antonucci DE et al. Kvbeta Subunit Oxidoreductase Activity and Kv1 Potassium Channel Trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:8298.
14. O'Connell KM, Tamkun MM. Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains. *J Cell Sci* 2005;118:2155-2166.