



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR  
POR PIROPTOSIS COMO DIANA  
TERAPÉUTICA EN CÁNCER  
STUDY OF CELL DEATH BY  
PYROPTOSIS AS A THERAPEUTIC  
TARGET IN CANCER**

**Autor:** Alicia Cueli Ruiz

Tutor: María Carmen Marín Viera

Cotutor: Juan Carlos Acosta Cobacho

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Julio, 2023**

## Índice

1. Resumen y palabras clave .....	
2. Página de abreviaturas.....	
3. Texto.....	1
a. Introducción.....	1
b. Marco teórico.....	1
c. Hipótesis y objetivos.....	10
d. Metodología.....	10
e. Presentación y análisis de resultados .....	15
f. Discusión y futuras perspectivas .....	26
4. Referencias .....	29

## 1. Resumen y palabras clave

La piroptosis es un mecanismo de muerte celular caracterizado por la formación de poros en la membrana plasmática, el hinchazón de la célula y la posterior ruptura de la membrana liberando gran cantidad de moléculas que desatan una fuerte inflamación y reclutan células del sistema inmune.

En el presente trabajo se va a estudiar el papel que juegan dos proteínas durante la piroptosis: la gasdermina-E (Gsdm-E), que tiene que ser escindida para que se formen los poros en la membrana y ninjurin-1 (Ninj1) implicada en la ruptura de la misma. Para ello, se clonaron los genes *GSDM-E* y *NINJI* en un vector de expresión en la cepa Stbl3™ de *E. coli*, para posteriormente emplear estas herramientas moleculares en futuras investigaciones relacionadas con el cáncer.

No ha sido hasta hace unos pocos años cuando la piroptosis ha despertado el interés de los investigadores debido a que las células tumorales son capaces de reprimir la expresión de *GSDM-E* para evitar que la muerte celular piroptótica tenga lugar. A raíz de esto, cada vez más estudios tratan de caracterizar este proceso con el objetivo de sobreexpresar *GSDM-E* y ver las consecuencias en la progresión tumoral. Esta sobreexpresión puede conducir a la muerte por piroptosis de células tumorales y además se ha demostrado que mejora la eficacia de ciertas terapias como la quimioterapia o la radioterapia. Cabe destacar que el patrón de metilación de *GSDM-E* también podría emplearse para la detección temprana de cáncer, pero es necesario continuar con esta línea de investigación que se encuentra en pleno desarrollo.

**Palabras clave:** cáncer, gasdermina-E, piroptosis, vector de expresión

### Abstract

Pyroptosis is a cell death mechanism characterized by the formation of pores in the plasma membrane, swelling of the cell, and subsequent rupture of the membrane, releasing a large number of molecules that trigger strong inflammation and recruit immune system cells.

In the present work, the role played by two proteins during pyroptosis is studied: gasdermin-E (Gsdm-E), which must be cleaved for the pores formation in the membrane, and ninjurin-1 (Ninj1) involved in plasma membrane rupture. In order to achieve this, *GSDM-E* and *NINJI* genes were cloned in an expression vector in *E. coli* strain Stbl3™, to later use these molecular tools in future research related to cancer.

It was not until a few years ago that pyroptosis aroused the interest of researchers because tumor cells are capable of repressing the expression of *GSDM-E* to prevent pyroptotic cell death from taking place. As a result of this, more and more studies try to characterize this process with the aim of overexpressing *GSDM-E* and see the consequences in tumor progression. This overexpression can lead to death by pyroptosis of tumor cells and has also been shown to improve the efficacy of certain therapies such as chemotherapy or radiotherapy. In addition, the methylation pattern of *GSDM-E* also could be used for cancer early detection, but it is necessary to continue with this line of research that is in full development.

**Key words:** cancer, gasdermin-E, pyroptosis, expression vector

## 2. Página de abreviaturas

- **ASC:** proteína asociada a la piroptosis que contiene un dominio CARD (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain)
- **DAMP:** patrones moleculares asociados a daño (damage-associated molecular patterns)
- **GSDM:** gasdermina (gasdermin)
- **GzmB:** granzima B
- **HMGB1:** caja 1 del grupo de alta movilidad (high mobility group box 1)
- **ICD:** muerte celular inmunogénica (immunogenic cell death)
- **IL:** interleucina (interleukin)
- **LDH:** lactato deshidrogenasa (lactate dehydrogenase)
- **LPS:** lipopolisacárido (lipopolysaccharaide)
- **MCS:** sitio de clonación múltiple (multiple cloning site)
- **NINJ1:** ninjurin-1
- **NK:** células asesinas (natural killer)
- **OIS:** senescencia inducida por oncogenes (oncogene-induced senescence)
- **PAMP:** patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns)
- **PFN:** perforina (perforin)
- **PMR:** ruptura de la membrana plasmática (plasma membrane rupture)
- **PYD:** dominio de pirina (pyrin domain)
- **SNP:** polimorfismo de nucleótido único (single nucleotide polymorphism)

### 3. Texto

#### a. **Introducción**

Los diferentes tipos de muerte celular pueden clasificarse en función de si se trata de una muerte programada o no programada. La muerte celular no programada tiene lugar cuando los tejidos sufren daños o las células se ven sometidas a altos niveles de estrés y recibe el nombre de necrosis. Por el contrario, la muerte celular programada se produce en respuesta a señales moleculares y es clave para el correcto funcionamiento del organismo, por esta razón, este proceso está estrictamente regulado. La apoptosis es el mecanismo de muerte celular programada que mejor se ha caracterizado hasta el momento, pero existen otros como la piroptosis, la necroptosis o la autofagia (Muppala *et al.*, 2022).

El principal objetivo de las terapias innovadoras contra el cáncer es tratar de activar el sistema inmune del propio paciente para que este mate las células cancerosas sin herir los tejidos adyacentes que estén sanos, esto recibe el nombre de inducción de la muerte celular inmunogénica (ICD) (Muppala *et al.*, 2022). La piroptosis es un tipo de ICD que actualmente se está estudiando más en profundidad porque se cree que podría ofrecer resultados prometedores en inmunoterapias contra el cáncer. La piroptosis por lo tanto es una muerte celular lítica que se produce en respuesta a señales pro-inflamatorias, desatando una fuerte inflamación y activando la respuesta inmune (Wang y Shao, 2021; Li *et al.*, 2022).

#### b. **Marco teórico**

##### **Piroptosis**

Este proceso consta de dos partes, en primer lugar, se forman numerosos poros en la membrana plasmática y la célula comienza a hincharse, y posteriormente, se produce la ruptura de la membrana plasmática (PMR) (Muppala *et al.*, 2022).

La formación de los poros en la membrana plasmática está mediada por una familia de proteínas que son las gasderminas (Gsdm). Esta familia consta de 5 proteínas: A, B, C, D y E; pero hasta el momento sólo se ha descubierto que estén involucradas en la piroptosis D y E (Wang *et al.*, 2023). Todas ellas contienen 2

dominios altamente conservados: el N-terminal que es el efector y el C-terminal que es un dominio inhibitorio. El C-terminal se encuentra unido al N-terminal reprimiendo de este modo su acción formadora de poros. Por lo tanto, para que el dominio N-terminal esté activo es necesario que se separe del C-terminal (Muppala *et al.*, 2022) y las caspasas son las principales responsables de que la escisión se produzca. Una vez que esto ocurre, se forman los poros y comienzan a liberarse diferentes moléculas que amplifican la respuesta inflamatoria y activan el sistema inmune.

Hasta el momento se conocen dos posibles rutas que permiten la activación de la piroptosis. La primera y mejor caracterizada está mediada por Gsdm-D y es regulada por las caspasas inflamatorias 1, 4 y 5 (11 en murinos); por otro lado, se encuentra la ruta mediada por Gsdm-E, regulada por la caspasa 3 (Li *et al.*, 2022).

En cuanto a la PMR, inicialmente, se pensaba que era un suceso pasivo que se producía como consecuencia de un desequilibrio osmótico, sin embargo, recientes estudios indican que la proteína Ninjurin-1 (Ninj1) podría ser clave para que la membrana se lise por completo. Hasta el momento la principal función que se conocía de esta proteína era su intervención en la adhesión entre células cuando se producían daños en el sistema nervioso (Wang y Shao, 2021). Ahora, al margen de su implicación en la regeneración nerviosa, se ha comenzado a estudiar su posible papel en la PMR.

Ninj1 es una proteína codificada por el gen *NINJI* que tiene dos regiones transmembrana y sus dos extremos dan hacia el medio extracelular. Estudiando más a fondo su estructura, se observó que en la región N-terminal, se forma una alfa-hélice anfipática que se cree que podría ser la causante de la desestabilización y de la posterior ruptura de la membrana celular (Wang y Shao, 2021).

Una vez que tiene lugar la PMR, se libera todo el contenido celular, incluyendo grandes moléculas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como HMGB1 (Wang y Shao, 2021). Se llevaron a cabo numerosos experimentos que analizaban la liberación de LDH, (Wang y Shao, 2021) y en consecuencia se sabe que estas moléculas no pueden ser liberadas por los poros que se forman inicialmente en la membrana debido a su gran tamaño, y que, por lo tanto, es necesario que se produzca PMR para su liberación al medio. Ratones con

mutaciones en el gen *NINJI*, eran capaces de liberar pequeñas moléculas asociadas a la piroptosis como las interleucinas, pero no aquellas de gran tamaño como la LDH (o se liberaban a niveles muy bajos). Además, si en estos ratones se expresaba el gen *NINJI* de forma exógena, la liberación de moléculas como LDH se reestablecía (Liang *et al.*, 2021). Estos resultados indican que la correcta expresión de *NINJI* es necesaria para que se produzca la PMR. Cabe indicar que, aunque la membrana no se rompiera por completo, la célula moriría igualmente debido a la pérdida de ATP (Wang y Shao, 2021).

Es importante destacar que a pesar de que la PMR suele estar asociada a la piroptosis, también tiene lugar en otros procesos como en la necrosis o en la post-apoptosis. Kayagaki y colaboradores, analizaron la implicación de la proteína Ninj1 en la PMR no piroptótica, llegando a la conclusión de que esta proteína es indispensable para que se rompa la membrana celular no sólo en la piroptosis si no también en otros tipos de muerte celular (Kayagaki *et al.*, 2021).

Como se ha expuesto, en ausencia de Ninj1 la liberación de LDH y otras grandes moléculas se atenúa fuertemente, sin embargo, no desaparece por completo, por lo que es posible que existan otras proteínas implicadas en que la PMR tenga lugar (Kayagaki *et al.*, 2021).

## **Inflamasoma**

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en respuesta a la detección de señales por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) o a infecciones microbianas (Muppala *et al.*, 2022). Los inflamasomas contribuyen para mantener la homeostasis y por esta razón están estrictamente regulados (Fernández-Durán *et al.*, 2021).

Existen dos tipos de inflamasomas: canónico, que desencadena la activación de la caspasa 1 y no canónico, que activan a las caspasas 4 y 5 (caspasa 11 en murinos) (Paerewijck y Lamkanfi, 2022). El inflamasoma canónico se activa por la detección de patrones asociados a patógenos (PAMPs) y DAMPs y el no canónico por la presencia de LPS de las bacterias gram negativas (Paerewijck y Lamkanfi, 2022).

## **Inflamasoma canónico**

El ensamblaje del inflamasoma comienza cuando los PRR son activados. Estos sensores forman parte del sistema inmune innato y pueden detectar PAMPs y DAMPs (Paerewijck y Lamkanfi, 2022).

Existen diferentes tipos de PRR como los TLRs, los NLRs, los RLRs y los CLRs, algunos de ellos son receptores de membrana y otros intracelulares. Los NLRs se encuentran en el citoplasma y por lo tanto detectan alteraciones que se producen en el interior celular. Dentro de los receptores NLRs existen diferentes subfamilias y cada una de ellas presenta una estructura característica, la subfamilia mejor caracterizada son los NLRP y más concretamente el NLRP3. NLRP3 está formado por tres dominios: el dominio PYD que permite su oligomerización con la proteína ASC, el dominio NACHT, responsable de la activación del inflamasoma y por último el dominio LRR que reconoce componentes bacterianos (Kelley *et al.*, 2019).

Una vez que el PRR ha recibido una señal, se activa y promueve el ensamblaje del inflamasoma. En primer lugar, el PRR se une y activa a la proteína ASC, formada a su vez por un dominio PYD y uno CARD (por esta razón también se conoce como PYCARD). A continuación, el dominio CARD de la proteína ASC se une al dominio CARD de la procaspasa-1 (Fig. 1) (Sutterwala *et al.*, 2014).

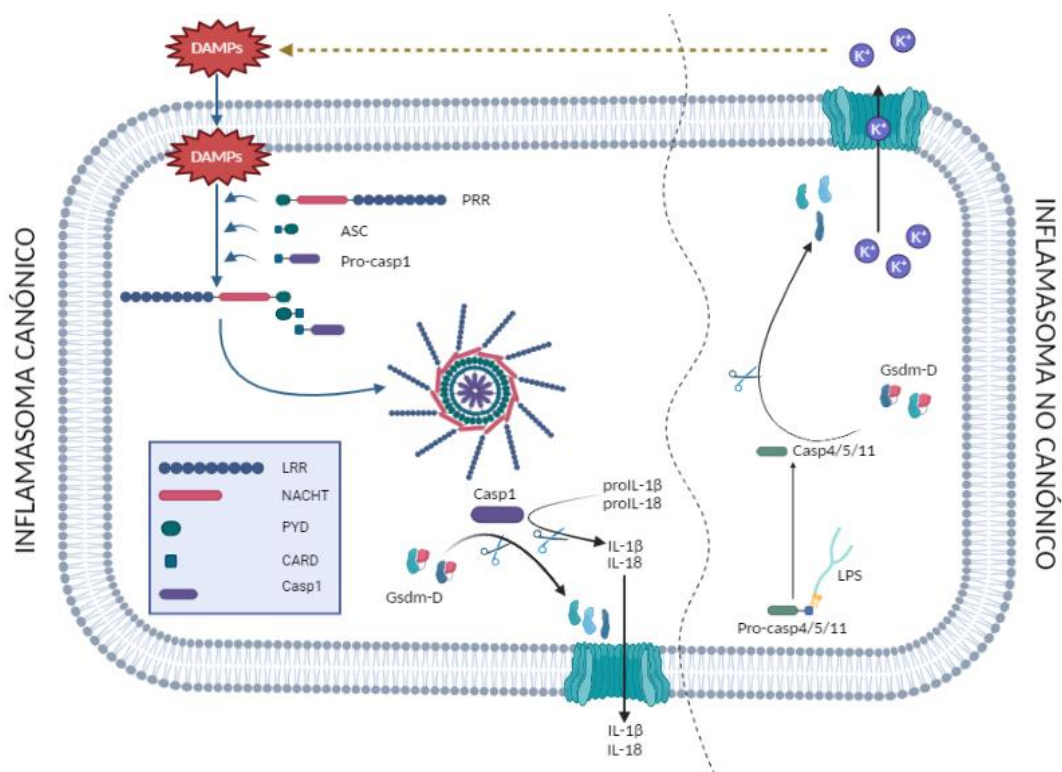


Figura 1. Mecanismo de activación y ensamblaje del inflamasoma canónico y no canónico.



Las procaspasas son zimógenos por lo que es necesario que se escinda una parte para que estén activas. Esto ocurre mediante autocatálisis después de que todos los componentes del inflamasoma se han ensamblado. Una vez que la caspasa 1 está activa y ha adquirido actividad proteolítica, va a jugar dos papeles muy importantes en el proceso inflamatorio. Por un lado, escindirá proIL-1 $\beta$  y proIL-18 para convertirlas en su forma activa (Sutterwala *et al.*, 2014; Burdette *et al.*, 2021). Por otro lado, la caspasa va a proteolizar y activar a Gsdm-D. Como se ha comentado anteriormente, la caspasa facilita la separación de los dominios terminales de Gsdm-D permitiendo que el N-terminal esté activo y se formen los poros por donde se van a liberar gran cantidad de citoquinas, incluidas las IL-1 $\beta$  e IL-18 que habían sido previamente activadas. Este conjunto de moléculas amplifica la respuesta inflamatoria y recluta células inmunes del torrente sanguíneo y de los órganos hematopoyéticos.

Al periodo de tiempo en el que la célula libera sustancias antes de morir denomina fase sublítica, posteriormente, tendrá lugar la piroptosis (fase lítica) y la célula morirá (Zhou y Abbott, 2021). Una vez que esto ocurre y la PMR ha tenido lugar, se libera todo el contenido celular potenciando aún más la inflamación.

### **Inflamasoma no canónico**

El inflamasoma no canónico se activa debido a la presencia de LPS intracelular de las bacterias Gram -. El lípido A (endotoxina) del LPS se une directamente al dominio CARD de las procaspasas 4, 5 u 11 provocando su oligomerización y la autoproteólisis para dar lugar a la caspasa en su forma activa (Burdette *et al.*, 2021).

Al igual que ocurría con la Casp1, estas caspasas van a escindir Gsdm-D liberando su dominio formador de poros. Sin embargo, no serán capaces de proteolizar a proIL. Sin estas citoquinas la respuesta inflamatoria no sería lo suficientemente potente, por esta razón, mediante la vía no canónica se activa también la vía canónica. El mecanismo de activación no se ha caracterizado por completo aún, pero se cree que podría deberse al flujo de K<sup>+</sup> que se genera al formarse los poros en la membrana celular. Una vez que esto ocurre, los PRR detectan esta alteración, activando la vía canónica y de esta manera la caspasa 1 se activará y escindirá las proIL (Burdette *et al.*, 2021).

### **GSDM-E**

El gen *GSDM-E* se encuentra en el cromosoma 7, es conocido también como deafness autosomal dominant 5 (*DFNA5*) (Burdette *et al.*, 2021).

La caspasa 3 tradicionalmente se ha asociado a la apoptosis, sin embargo, se han llevado a cabo estudios cuyos resultados muestran que la casp3 puede escindir Gsdm-E (al igual que lo hacen las caspasas inflamatorias con Gsdm-D) desviando de este modo la muerte celular apoptótica a una muerte piroptótica (Zhang *et al.*, 2020). Por otro lado, Jiang y colaboradores han concluido que el tipo de muerte en células tumorales va a depender del nivel de expresión de *GSDM-E*, si estos niveles son altos, se producirá piroptosis, pero si por el contrario la expresión no es tan alta, tendrá lugar la apoptosis (Jiang *et al.*, 2020).

El punto de escisión para la activación de la Gsdm-E se encuentra entre un residuo de aspártico situado en la posición 270 y una alanina en la 271.

Recientemente se ha empezado a indagar en la relación existente entre la Gsdm-E y la supresión tumoral y se ha visto que las células cancerosas en ocasiones sufren mutaciones de SNP (polimorfismo de nucleótido único) en el punto de escisión. Estas mutaciones son de tipo LOF (pérdida de función), de modo que la proteína se sigue sintetizando, pero no es funcional debido a que el cambio de secuencia no permite que las caspasas ni las granzimas (como se explicará a continuación) detecten el sitio de corte y, por lo tanto, el dominio N-terminal permanecerá inhibido, no se produce piroptosis, y la célula continúa dividiéndose, evitando la supresión tumoral medida por Gsdm-E (Zhang *et al.*, 2020).

En tejidos normales la expresión del gen *GSDM-E* es alta, mientras que en un considerable porcentaje de tumores la expresión está reprimida. Esta observación reafirma lo anteriormente comentado, la proteína podría tener un importante papel como supresor de tumores. La expresión de *GSDM-E* puede reprimirse epigenéticamente cuando su promotor está metilado, y por esta razón los inhibidores de la metiltransferasa (por ejemplo, decitabina) promueven la expresión del gen.

Al margen de su posible papel como supresor de tumores, numerosos trabajos han expuesto que el patrón de metilación de *GSDM-E* difiere en tejidos normales y tejidos tumorales y a raíz de esto se ha propuesto utilizar esta herramienta como marcador para la detección temprana de cáncer (Wang *et al.*, 2022).

Asimismo, los tumores en individuos que expresan correctamente *GSDM-E* crecen mucho más lento que en individuos en los que se ha bloqueado la expresión de este gen. Además, el microambiente tumoral de estos últimos tiene menos NK, linfocitos T citotóxicos y macrófagos asociados a tumores. Por lo tanto, *Gsdm-E* promueve la supresión tumoral y el reclutamiento de células del sistema inmune (Zhang *et al.*, 2020).

### **Granzima B**

Durante la fase subléptica, como ya se ha comentado, se liberan gran cantidad de citoquinas como las interleucinas que amplifican la respuesta inflamatoria y reclutan células del sistema inmune. Tanto los NK como los linfocitos T citotóxicos (CD8+), liberan gránulos citotóxicos que contienen perforina (PFN) y granzimas (Gzm).

Las PFN son proteínas formadoras de poros en la membrana celular que permiten la entrada de Gzm en la célula. La GzmB es una serín-proteasa capaz de escindir la *Gsdm-E* en el mismo punto que la caspasa, por lo tanto, se trataría de un mecanismo que activa la piroptosis independiente de caspasas (Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, la muerte celular puede amplificarse en presencia de casp3, puesto que la GzmB además de cortar *Gsdm-E*, también puede proteolizar y activar casp3. De este modo, *Gsdm-E* sería escindido por ambas proteínas y el efecto se vería potenciado.

Se ha demostrado que la GzmB y la casp3 cortan a *Gsdm-E* exactamente por el mismo punto, puesto que en células que tenían mutado el sitio de corte de la casp3, la Gzm tampoco era capaz de escindirlos (Zhang *et al.*, 2020).

### **Senescencia**

La senescencia celular es una respuesta a estrés terminal que se caracteriza por el cese de la división celular, cambios en la morfología de la célula, se potencia la actividad lisosomal, se producen daños en macromoléculas como el DNA y lo más importante, se altera el metabolismo desencadenando la secreción de gran cantidad de sustancias como citoquinas, quimiocinas, proteasas y factores de crecimiento, conocidos colectivamente como el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (Fernández-Durán *et al.*, 2021; Chibaya *et al.*, 2022). Estas moléculas juegan diferentes papeles entre los que destacan inducir senescencia a células vecinas

(conocido como senescencia paracrina) (Birch y Gil, 2020) y activar el sistema inmune reclutando células T CD8+, natural killer y macrófagos (Zhang *et al.*, 2020).

La inducción de la senescencia puede ser debido a diferentes causas como la detección de daños moleculares, la activación de oncogenes o el uso de quimioterapéuticos. Son muchos los factores que puede desencadenar este tipo de respuesta celular, sin embargo, de manera general todos ellos suelen estar asociados a daños en el DNA (Birch y Gil, 2020).

En ocasiones, la activación del inflamasoma no desencadena muerte celular piroptótica, si no que las células entran en estado de senescencia. La activación del inflamasoma en este caso se produciría en respuesta a la señalización de un oncogen como *RAS*. Una vez que esto ocurre, la célula entraría en un estado que se conoce como senescencia inducida por oncogen (OIS). Aún no se ha determinado con exactitud como la activación del inflamasoma es capaz de inducir el estado de senescencia, se cree que la primera línea de defensa frente al estrés celular es la entrada en senescencia, pero que una vez que se ha sobrepasado cierto umbral, se activa la piroptosis (Fernández-Durán *et al.*, 2021).

La senescencia se está estudiando en profundidad debido a sus implicaciones en el envejecimiento y en el cáncer. Se ha observado que en algunos cánceres existen mutaciones que permiten eludir que las células entren en senescencia (Innes y Gil, 2019), por lo tanto, este estado juega un importante papel en la supresión de tumores y se plantea como posible objetivo en algunas terapias.

Sin embargo, es necesario llevar a cabo muchos más estudios sobre la aplicación de la senescencia como tratamiento puesto que, como se expone a continuación, tiene muchos efectos secundarios tanto positivos como negativos.

Una vez que se ha establecido el SASP, se van a liberar gran cantidad de moléculas que permitirán que las células se comuniquen entre sí. Esta comunicación puede tener efectos beneficiosos (como el reclutamiento del sistema inmune, curación de heridas, refuerzo de la senescencia, aumento de la plasticidad celular, diferenciación celular, etc.) o perjudiciales (senescencia paracrina, evasión del sistema inmune, inflamación, promoción de tumores, etc.) (Birch y Gil, 2020).

Uno de los principales perjuicios que nos causa la acumulación de células senescentes es el envejecimiento. La acumulación de estas ocupa el lugar de las células totipotentes lo que desemboca en el envejecimiento de los tejidos y algunos trastornos asociados a la edad (Birch y Gil, 2020). Además, la inflamación ocasionada por el SASP también aumenta el riesgo de padecer este tipo de trastornos.

En cuanto al cáncer, el establecimiento del SASP también es un arma de doble filo que se debe estudiar minuciosamente atendiendo especialmente al contexto y al tipo celular. Se sabe que el reclutamiento de células inmunes que se produce durante el SASP contribuye a la supresión (en etapas iniciales) o al menos a la regresión tumoral. Sin embargo, algunos modelos muestran que el establecimiento del SASP en fibroblastos puede promover la tumorigénesis en células epiteliales (Birch y Gil, 2020) o también podría generarse una respuesta inflamatoria desmesurada (Chibaya et al., 2022). Además, durante el SASP también se secretan factores que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos. Esto puede favorecer la propagación del tumor por un aumento en la llegada de nutrientes o puede ejercer un efecto contrario, ya que a través de esos vasos también se facilita el acceso de las células inmunes hasta el microambiente tumoral.

Debido a las consecuencias que el SASP puede acarrear, es posible que se quieran matar las células senescentes y para ello se utilizan unas drogas que se conocen como senolíticos, ya que una de las principales características de estas células es que son resistentes a sufrir apoptosis. Esta técnica se conoce como senoterapia (Birch y Gil, 2020). La eliminación de todas las células senescentes también podría ocasionarnos problemas debido a los beneficios que estas nos aportan, por esta razón se ha encontrado una alternativa que son los senomorfos, estas drogas permiten que las células entren en estado de senescencia, pero modulan el secretoma.

Actualmente se está haciendo especial hincapié en las terapias prosenescencia, cuyo objetivo es inducir la senescencia mediante tratamientos como la radioterapia o la quimioterapia (ambos métodos causan muchos daños en el DNA y en respuesta a ese estrés generado se induce el estado de senescencia) y posteriormente eliminar esas células con agentes senolíticos para evitar los daños colaterales que causa el establecimiento del SASP.

Por el contrario, existe otra alternativa que consistiría en utilizar drogas que potencien el SASP para que estimule el sistema inmune y destruya las células senescentes.

**c. Hipótesis y objetivos**

En el grupo en que se ha desarrollado el trabajo se plantea la hipótesis de que la sobreexpresión de *GSDM-E* en células tumorales desencadena una muerte celular piroptótica favoreciendo de este modo la regresión tumoral o al menos evitando que éste siga creciendo y en consecuencia podría emplearse en futuras terapias para el tratamiento contra el cáncer.

El principal objetivo del presente trabajo es clonar tres genes involucrados en la muerte celular piroptótica: *NINJI*, el gen que codifica para la proteína completa Gsdm-E (*GSDM-E* FL) y la parte del gen que codifica para el dominio N-terminal de Gsdm-E (*GSDM-E* NT). Para ello, se amplificaron a partir de cDNA de células senescentes de la línea IMR90 para posteriormente ser introducidos en un vector de expresión y transformar bacterias de la cepa Stb13™ de *E. coli* con el plásmido recombinante.

Una vez que poseamos los genes clonados, pueden emplearse para otros ensayos. De este modo, se podrán sobreexpresar o, por el contrario, reprimir su expresión en diferentes líneas celulares (células tumorales en diferentes etapas de la enfermedad y células no tumorales) para estudiar la posible implicación de estos genes en la senescencia y en la muerte celular piroptótica.

**d. Metodología** (Sambrook y Russell, 2012)

Para tratar de resolver el objetivo inicial lo que se debe hacer en primer lugar es diseñar una pareja de primers o cebadores para cada uno de los genes que se pretende amplificar mediante PCR. Estos genes son *NINJI* (459 pb), *GSDM-E* full length (*GSDM-E* FL) (1491 pb) y el fragmento N-terminal de *GSDM-E* (*GSDM-E* NT) (687 pb).

El gen *NINJI* se va a introducir en el plásmido Ultra (pUltra) y tanto *GSDM-E* FL como *GSDM-E* NT en el plásmido TET-ONE. Para ello, se buscan y se descargan estos plásmidos en la base de datos Addgene para posteriormente poder visualizarlos

con el software SnapGene y de este modo saber qué enzimas de restricción cortan estos vectores en el sitio de clonación múltiple (MCS).

A continuación, en el software NEB cutter se introduce la secuencia de nucleótidos de los tres genes y se buscan enzimas que corten el vector en el MCS pero que no corten la secuencia del gen que queremos insertar. Una vez elegidas 2 enzimas para cada gen, se procede a diseñar los primers que posteriormente se utilizarán para la PCR. Estos deben constar de unas 25 pares de bases y su temperatura de fusión ( $T_m$ ) tiene que estar en torno a 60 °C, estos parámetros pueden ser comprobados mediante el programa IDT OligoAnalyzer o también podrían calcularse manualmente sabiendo que  $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$ . Es muy importante que la  $T_m$  sea similar entre los dos primers de cada pareja puesto que la  $T_m$  está directamente relacionada con la temperatura de annealing ( $T_a = T_m - 5$ ). Si  $T_a$  no es similar para ambos, se amplificarán fragmentos inespecíficos durante la PCR.

Existen programas como el Primer3Plus que diseñan primers automáticamente, sin embargo, en este caso es mejor diseñar la secuencia manualmente, de esta forma se puede incluir en los oligos la secuencia de corte de las enzimas de restricción que se van a emplear para que posteriormente, el producto de la PCR pueda digerirse y queden extremos cohesivos.

En primer lugar, ponemos la secuencia diana de las enzimas de restricción y a continuación de esta, se copia el inicio de la secuencia 5'→3' del gen de interés (si es el primer forward) o el reverso-complemento del final de la secuencia (si es el primer reverse). Por el otro extremo, la secuencia de corte de la enzima de restricción tiene que estar flanqueada por unos nucleótidos que confieran estabilidad al fragmento una vez se produzca el corte. Estos, permiten variar la  $T_m$  del oligo en función del contenido en G+C, a mayor contenido en G+C, mayor será la  $T_m$  debido al puente de hidrógeno triple que se forma entre estas bases nitrogenadas.

El primer cebador que se ha diseñado es el forward que se anclará al extremo 3' de la cadena 3'→5' y el segundo es el reverse, que se unirá al extremo 3' de la cadena 5'→3' (Fig. 2).

El vector pUltra se va a digerir con EcoRI y SalI, y el vector TET-ONE con EcoRI y BamHI.

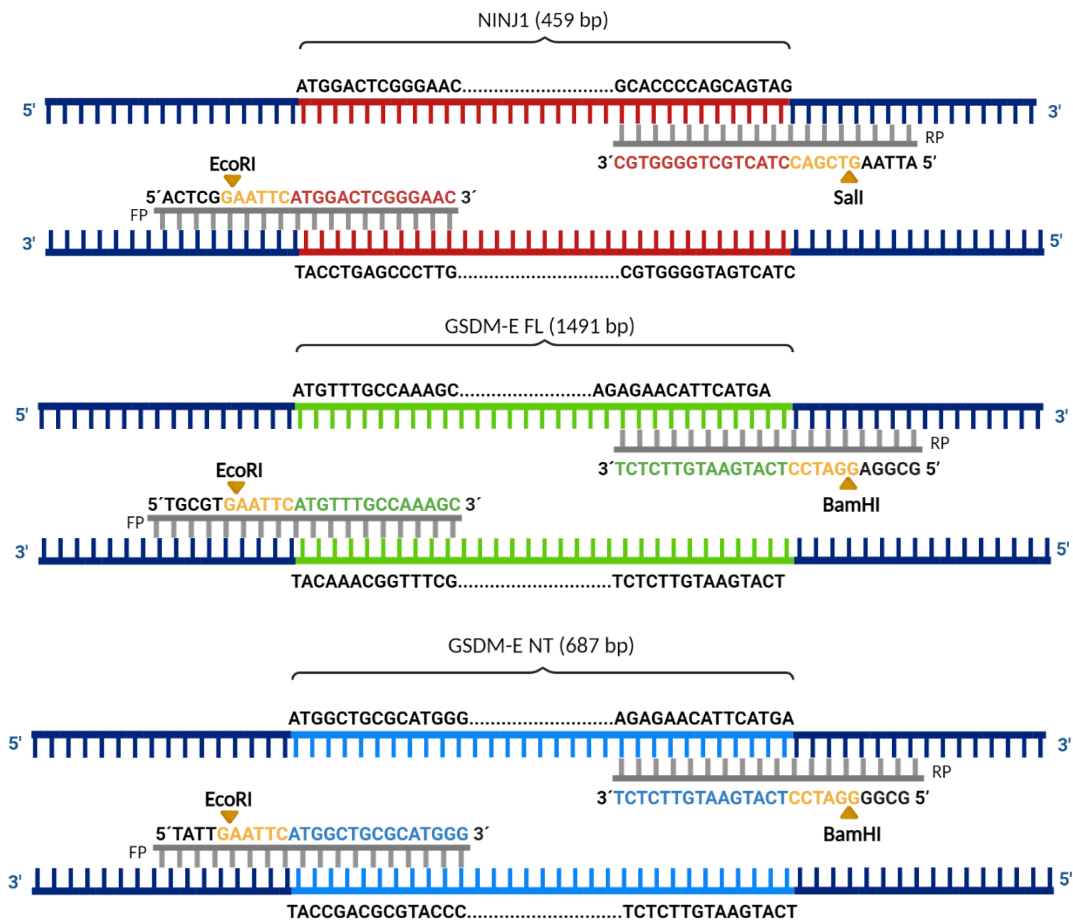


Figura 2. Diseño de los primers empleados para amplificar los genes de interés. Secuencia de las 3 parejas de cebadores: en rojo, verde y azul, la parte del primer que es complementaria a la secuencia del gen; en amarillo se introdujo la secuencia diana para la enzima de restricción y por último en negro; unos nucleótidos que confieren estabilidad una vez que el corte se haya producido.

En segundo lugar, para que la taq polimerasa sea capaz de amplificar esos genes, es necesario proporcionarle DNA que los contenga y que le sirva como molde. Se podría utilizar algún plásmido que contuviera el gen, pero en este caso no se dispone de ninguno. Si se añadiera DNA genómico, los genes contendrían intrones y exones y el producto obtenido sería mucho más grande. Por lo tanto, se va a extraer mRNA de células IMR90 senescentes y con una retrotranscriptasa (RT) se obtendrá cDNA. Esta línea celular expresa la proteína de fusión ER:RAS (receptor de estrógeno unido al oncogen mutado). Las células fueron sometidas a 4-hidroxi-tamoxifeno durante 8 días, durante este periodo la hormona se une al receptor y favorece la activación de RAS de forma que las células entran en senescencia inducida por oncogenes y por lo tanto que expresan altos niveles de los genes que se pretende amplificar.



Este cDNA será el que se emplee inicialmente en la PCR para amplificar los genes y la polimerasa es la Phusion High Fidelity, una enzima capaz de corregir sus propios errores.

Una vez haya terminado la PCR, se añade un buffer de carga a las muestras para correrlas en un gel de agarosa al 1% que permite comprobar si los fragmentos se han amplificado correctamente. Como los primers son nuevos, se usará como control positivo unos cebadores de PCR cualitativa del gen *RAS*, que ya se han utilizado anteriormente y se sabe que funcionan correctamente. De esta manera, si no amplifica ninguno de los genes y tampoco *RAS*, el problema no estaría en los primers sino en la polimerasa, en el DNA o en el protocolo de la PCR. Si por el contrario únicamente se amplifica *RAS*, los primers estarán mal diseñados o es posible que la enzima no esté trabajando en condiciones óptimas.

Inicialmente, no se obtuvo ninguna banda a pesar de estar siguiendo el protocolo, sin embargo, se repitió la PCR aumentando los tiempos y el número de ciclos y se obtuvo una gran banda de *NINJI* y una muy tenue en *RAS* y *GSDM-E NT*. Por esta razón, cabe pensar que la enzima no está funcionando de manera óptima. Se repite la PCR para todos los genes excepto para *NINJI*, pero en esta ocasión vamos a utilizar otra taq polimerasa (Phusion DNA pol F-530S), el gel obtenido muestra una prominente banda de *GSDM-E NT*, pero aún no se aprecia la banda de *GSDM-E FL*, por lo que cabe pensar que el problema reside en el primer forward de *GSDM-E FL* (ya que el primer reverse es igual que en el NT). Por si este no fuera el fallo, se van a tratar de optimizar las condiciones de la PCR y para ello, se lleva a cabo otra PCR con ambas *GSDM-E* donde en cada uno de los pocillos la temperatura de annealing será diferente. Esta temperatura va a ir variando desde 55 °C hasta 70 °C.

Una vez que se ha obtenido una gran banda en dos de nuestros genes, se corta el gel y se extrae el cDNA con un kit de extracción de geles. A continuación, se cuantifica el DNA con el NanoDrop, esta máquina permite medir la concentración de cDNA extraída y también mide la contaminación proteica (A260/A280) y orgánica (A260/A230).

Seguidamente, se digiere tanto el vector como los insertos para que se formen los extremos cohesivos. Antes de esto, conviene comprobar si las tres enzimas de restricción que vamos a utilizar (EcoRI, Sall y BamHI) funcionan correctamente. Para

ello, se corre en un gel de agarosa ambos plásmidos sin digerir, digeridos por una de las enzimas, por la otra y la digestión doble. Lo que cabría esperar si el funcionamiento de las enzimas fuera óptimo es que la banda del gel de los plásmidos que no han sido cortados sea mucho más borrosa ya que el plásmido se encontrará superenrollado. Cuando esto se llevó a cabo, se comprobó que el vector TET-ONE es cortado por ambas enzimas: EcoRI y BamHI, sin embargo, el pUltra no estaba corriendo bien en el gel por causas desconocidas, podría estar dañado o que se hubiera cometido algún error en el procedimiento. Por esta razón, inicialmente se tratará de clonar *GASDM-E FL* y *GSDM-E NT* en el vector TET-ONE y una vez que se haya logrado eso, se procederá del mismo modo con el pUltra.

El siguiente paso es purificar el vector y los insertos una vez que han sido digeridos y presentan extremos cohesivos, para ello, existen dos métodos. El primero consiste en hacer una electroforesis en gel y a partir de la banda hacer una extracción como se ha hecho anteriormente, la otra opción es utilizar una columna para la purificación. El segundo método, es más adecuado cuando la cantidad de DNA que se posee es pequeña, porque permite obtener una mayor concentración. Independientemente del procedimiento que se haya seguido, luego se mide la concentración de DNA en el NanoDrop.

Para que el inserto de DNA se integre en el plásmido se va a utilizar la ligasa t4, este proceso se conoce como ligación. En este paso, lo más importante es añadir correctamente las proporciones de inserto-vector, en este caso, se empleará una proporción 3:1. La ligación se deja toda la noche a 22 °C y al día siguiente, se procede a transformar las bacterias con el plásmido recombinante. Para la transformación, se van a usar *E. coli* químicamente competentes de One Shot™ Stbl3™, se ha elegido esta cepa debido a que reduce la frecuencia de recombinación.

Una vez terminada la transformación, se siembran las bacterias en placas de agar que contengan ampicilina (el agente selectivo) y se dejan a 37 °C toda la noche para que las bacterias puedan crecer. El medio debe contener ese antibiótico para que solo puedan crecer las bacterias transformadas con el vector, ya que tanto el pUltra como el TET-ONE presentan un gen que confiere resistencia a ampicilina.

Transcurridas unas 12h, se empezarán a observar colonias, pero se debe comprobar si realmente contienen el plásmido con el inserto ya que el vector ha

podido religarse y no contener el gen de interés. Para ello, se pican unas 20 colonias y se hace una PCR, los primers que se utilizan son los que amplifican la zona del MCS, de forma que si la bacteria contiene el inserto saldrá una banda en el gel de un tamaño ligeramente superior al del inserto, y si por el contrario no existe inserto porque el plásmido se ha religado, el tamaño que aparecerá serán unas 100 pb.

#### e. Presentación y análisis de resultados

Inicialmente los únicos genes que se consiguieron amplificar fueron *NINJI* y posteriormente *GSDM-E NT*. En función del tamaño de los genes y gracias al marcador molecular podemos saber que las bandas que aparecen en el gel se corresponden con los genes de interés (Fig. 3 y 4).

Una vez que se ha conseguido amplificar esos dos genes, comienza el primer intento de transformación que se van a llevar a cabo con diferentes cepas de *E. coli* entre las que se encuentra las DH5- $\alpha$ .

Las placas donde se van a sembrar las bacterias contienen ampicilina, un agente selectivo que sólo permitirá el crecimiento de aquellas bacterias resistentes a este antibiótico. Tanto el plásmido pUltra como el TET-ONE presentan un gen que confiere resistencia a este antibiótico. De este modo, si crecen bacterias, sabemos que contienen el

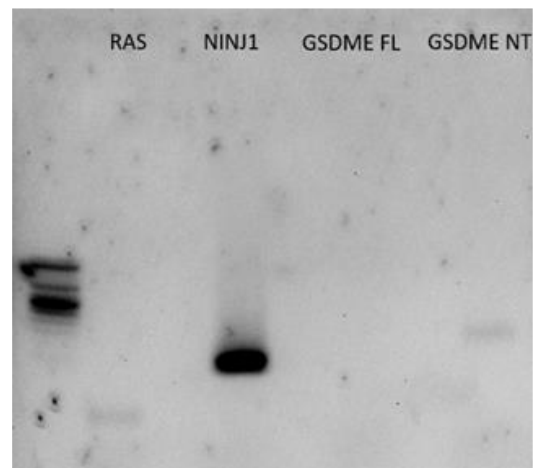


Figura 3. Amplificación de los genes de interés mediante PCR. Se empleó cDNA de células IMR90. Sólo se podrá emplear el DNA de *NINJI* puesto que la banda de *GSDM-E NT* es muy tenue y en *GSDM-E FL* no se ha amplificado nada.

Se ha empleado el marcador de 100 pb.

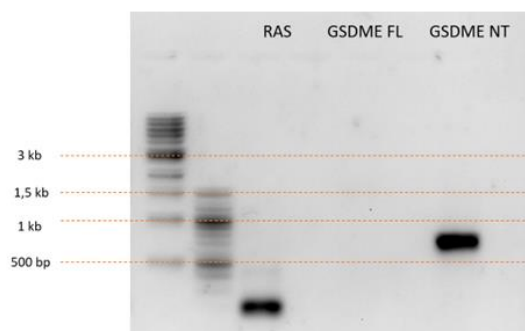


Figura 4. Amplificación de *GSDM-E NT* y *GSDM-E FL*. Para ello, se usa el mismo cDNA pero cambiando la polimerasa. Se emplea *RAS* como control positivo. En esta ocasión se ha obtenido una prominente banda del *GSDM-E NT* a la altura correcta (687 bp).

Marcadores de 100pb y 1kb.

vector o que han sufrido una mutación (ocurre en escasas ocasiones). Se debe comprobar si las bacterias que han crecido en la placa realmente contienen el vector recombinante puesto que el plásmido ha podido religarse sin haber incluido el gen de interés.

En todas las placas se obtuvieron colonias, a continuación, se picó cada una de ellas y se llevó a cabo una PCR utilizando unos primers que amplifican el MCS. No hubo ningún positivo de los 50 pocillos analizados (Fig. 5).

En base a los resultados obtenidos, se van a realizar varias pruebas para comprobar que todas las enzimas utilizadas funcionan correctamente y el DNA se encuentra en buen estado. En primer lugar, se va a tratar de optimizar las condiciones de la PCR para la amplificación de los fragmentos de *GSDM-E* variando la temperatura de annealing desde 50 a 70 °C (Fig. 6). Además, es una serie de pocillos se añade DMSO y en una réplica de los mismo se hace sin DMSO. El DMSO (dimetilsufóxido) es un agente que ayuda a relajar o evitar que se formen estructuras secundarias en la molécula de ADN, aumentando la eficiencia y especificidad de la PCR. Es habitual emplearlo

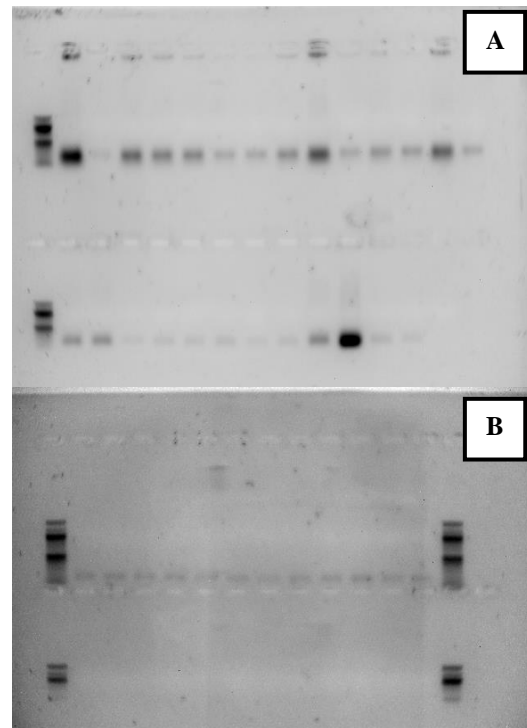


Figura 5. Comprobación mediante PCR de colonias transformadas. Se han picado 26 colonias que podrían contener el gen *NINJI* (A) y 24 con *GSDM-E* NT (B). En el último pocillo se ha puesto un control negativo.

Todas las bandas tienen un tamaño en torno a 100bp por lo que no se ha conseguido transformar ninguna colonia con el plásmido recombinante.

Se ha utilizado el marcador de 100pb.

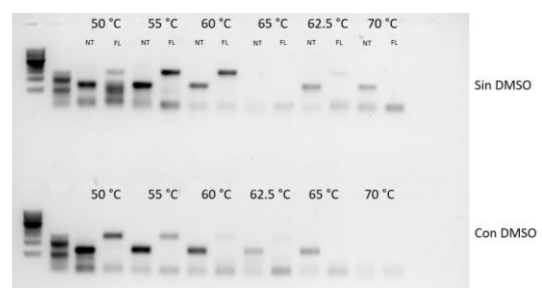


Figura 6. Optimización de la PCR para la amplificación de *GSDM-E* NT y *GSDM-E* FL. Se emplea cDNA de células IMR90 sometidas a 8 días de tamoxifeno.

Mejor amplificación 55-60 °C sin DMSO.

cuando el molde tiene un alto contenido en G+C ya que sus fuertes enlaces dificultan la separación de las hebras y la unión de los primers.

Los resultados muestran que el intervalo óptimo para llevar a cabo la PCR es entre 55 y 60 °C y es preferible no añadir DMSO.

Una vez que se ha conseguido amplificar los 3 genes (Fig. 7), se van a digerir para que se formen extremos cohesivos. Al mismo tiempo, también se digieren los 2 plásmidos y de esta forma, se comprobará si los vectores se encuentran en buen estado y las enzimas de restricción están funcionando adecuadamente. A continuación, se van a correr en un gel de agarosa cada uno de los plásmidos sin digerir, digerido con una de las enzimas, con la otra y por último digerido con ambas (Fig. 8). Cabría esperar que cuando el plásmido se encuentra superenrollado (sin digerir) aparezca una mancha más borrosa que cuando éste se ha linealizado, además, en su estado superenrollado correrá más rápido durante la electroforesis. Como se puede observar en la figura 8, el plásmido TET-ONE aparentemente se encuentra en buen estado y las enzimas lo están cortando bien. Sin embargo, en el pUltra digerido aparece un smear. Esto podría deberse a que el plásmido este degradado o a que la enzima SalI no esté funcionando correctamente (ya que EcoRI es la misma para digerir ambos plásmidos). Por lo tanto, en principio se tratará de clonar únicamente en el TET-ONE.

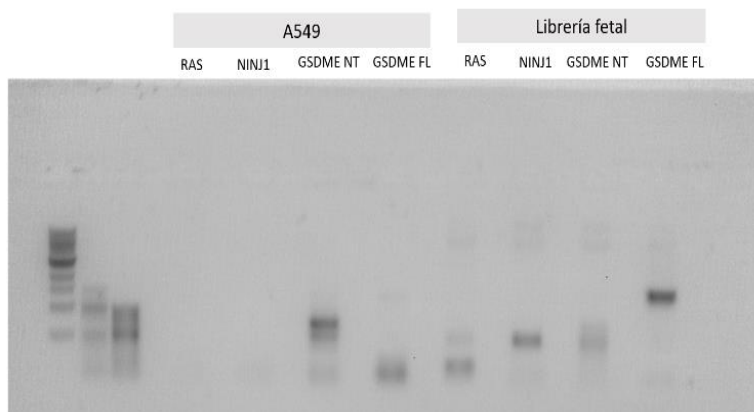


Figura 7. Amplificación de los genes de interés a partir de dos fuentes diferentes de cDNA. Finalmente se consigue amplificar *GSDM-E FL* empleando el cDNA de una librería fetal.

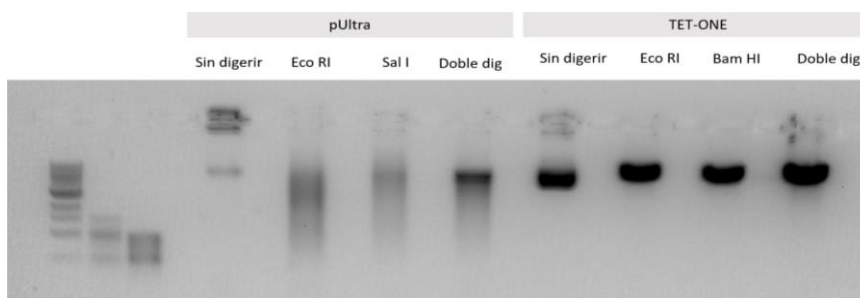


Figura 8. Mapa de restricción de los plásmidos pUltra y TET-ONE. En cada carril se observan los plásmidos bien sin digerir, o digeridos por las enzimas indicadas.

A partir de este momento se van a emplear *E. coli* StbI3 químicamente competentes, una cepa que se caracteriza por tener inactiva la recombinasa, de manera que la frecuencia de recombinación homóloga es muy pequeña. Un punto clave en el proceso de clonaje son las proporciones de vector-inserto que deben añadirse cuando se prepara la ligación, lo más común es utilizar una relación 3:1 aunque a veces, es necesario variarlo. En esta ocasión, se añadirá esa proporción.

En las placas no se obtuvo ninguna colonia. Se va a llevar a cabo otro intento, pero esta vez, se cambiarán las proporciones a 5:1. Además, se va a emplear un control positivo donde se transformarán las bacterias con el vector sin digerir, únicamente para comprobar que las bacterias son viables y que las placas con el antibiótico estén bien hechas.

En la única placa donde se observó crecimiento fue en la placa control. Por lo tanto, se sabe que el problema no reside en las bacterias. Hasta el momento, una vez se había preparado la ligación, se estaba mezclando con el spin, sin embargo, cabe la posibilidad de que la ligasa estuviera sufriendo una desnaturalización mecánica y por esta razón, se repite la ligación sin darle spin ni mezclar con la pipeta. El resultado obtenido fue el mismo, no se observó ningún tipo de crecimiento (Fig. 9).

Cabe pensar que podría haber algún error en la ligación o durante el proceso de transformación. Para comprobar si es así, se van a ligar 2 vectores (MSCV y pUltra) con 2 insertos (HRas y E6/E7) que se han utilizado en anteriores

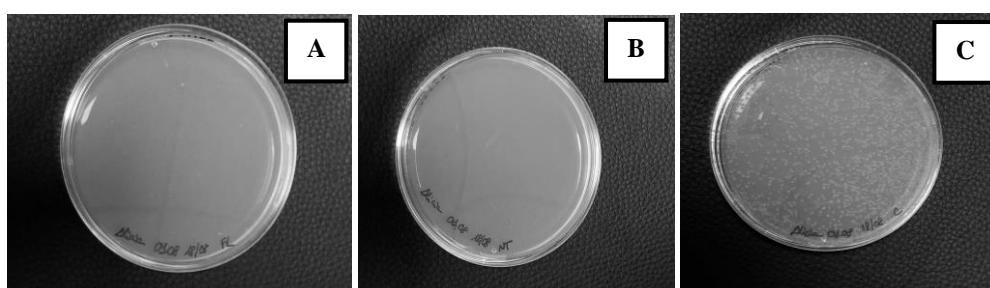


Figura 9. Placas de cultivo donde se han sembrado las bacterias transformadas con el vector de expresión TET-ONE. Nuevo intento de transformación con los insertos *GSDM-E FL* (A) y *GSDM-E NT* (B) evitando dar spin a las muestras. En paralelo, se usa un control positivo. Este control permite comprobar que la placa y el antibiótico se encuentran en buen estado al igual que las bacterias.

Se observa un abundante crecimiento en el control (C), mientras que en las placas experimentales (A y B) no hay colonias.

Esto también nos permite descartar que se esté produciendo lisis celular.

experimentos y que por lo tanto se tiene la certeza de que se encuentran bien digeridos. En paralelo y como control negativo, se va a tratar de clonar *GSDM-E NT* en el TET-ONE.

Pudo observarse crecimiento bacteriano en las dos placas experimentales, pero no en la placa control (Fig. 10). Como se ha hecho en anteriores ocasiones, se realiza una PCR para comprobar si realmente las colonias que han crecido contienen los diferentes insertos. Se analizaron 24 colonias en total de ambas placas, y se obtuvieron 8 positivos (Fig. 11). Esto conduce a pensar que la ligación y la transformación se están llevando a cabo de manera correcta y que el error se produce antes del proceso de ligación.

Para determinar si el problema reside en los vectores o en los insertos, se realiza una prueba que consiste en tratar de introducir los insertos que hemos amplificado y digerido, en plásmidos que se han empleado con anterioridad y que, por lo tanto, se sabe que funcionan. Para ello, se va a utilizar el plásmido pBlueScript y como control negativo se clonará el gen en el plásmido TET-ONE digerido en el momento.

Una vez se han incubado las placas durante un día a 37°C, se puede observar cómo únicamente han crecido 2 colonias en la placa pBlueScript (Fig. 12), pero al hacer la PCR ninguna de las dos es positivo (Fig. 13), por lo que el inserto *GSDM-E NT* no se ha conseguido clonar con ninguno de los 3 vectores. Este resultado lleva a pensar que la secuencia del inserto que se está amplificando no sea correcta o que no

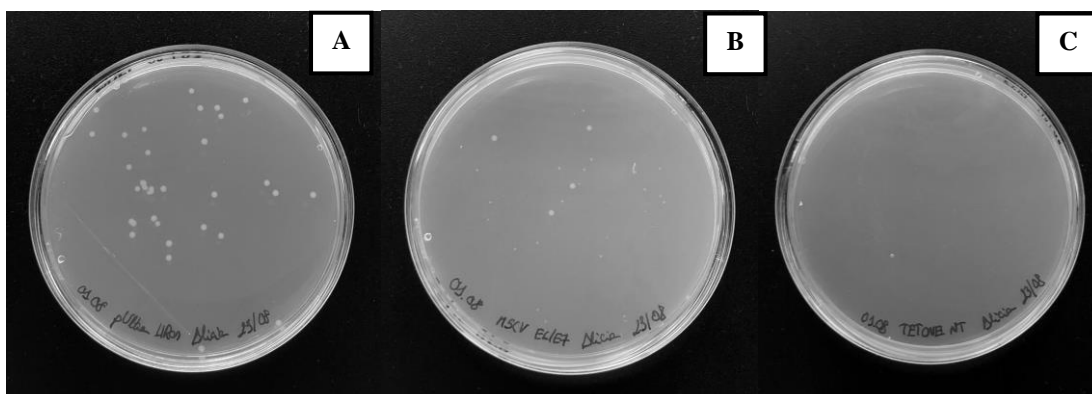


Figura 10. Placas de cultivo con colonias de bacterias transformadas con los vectores de expresión Pultra, MSCV Y TET-ONE.

Se observa crecimiento en las placas que supuestamente contienen el plásmido recombinante pUltra+HRas (A) y MSCV+E6/E7 (B). No hay colonias en la placa control como cabía esperar (C).

se está digiriendo correctamente y por esta razón, la ligasa no sería capaz de integrarlo en el plásmido.

Se va a comenzar un nuevo intento de clonar ambos fragmentos de *GSDM-E* utilizando unas nuevas enzimas de restricción fast digest y, por lo tanto, la reacción sólo puede dejarse durante 10 min, de lo contrario, podrían aparecer cortes inespecíficos. Las enzimas que se habían empleado hasta el momento se dejaban actuar toda la noche.

Este experimento, permite comprobar si eran las enzimas de restricción lo que estaba fallando, a pesar de que algunos geles anteriores (Fig. 8), reflejaban que EcoRI y BamHI estaban funcionando correctamente. Se digiere por un lado el inserto con ambas enzimas, y por otro, el plásmido con una de las enzimas, con la otra y con las dos para comprobar si las enzimas están cortando correctamente de manera individual.

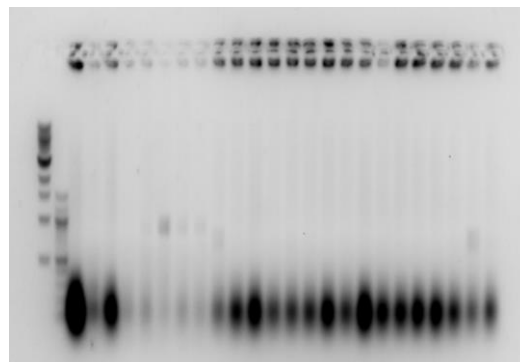


Figura 11. Resultado de una PCR para comprobar si las colonias contienen el inserto. Se analizan las colonias para comprobar si realmente contienen el plásmido recombinante y efectivamente se han obtenido 6/8 positivos.

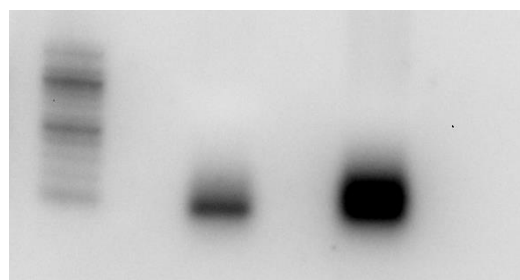


Figura 13. Amplificación del MCS para determinar si el plásmido contiene el gen de interés. Ninguna de las colonias contiene el inserto, sólo el plásmido religado.

Marcador de 100pb.

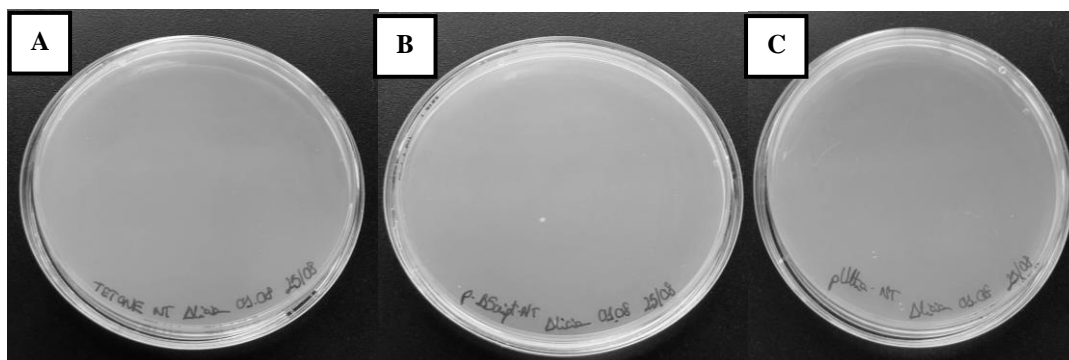


Figura 12. Placas de cultivo con colonias transformadas con vectores de expresión. (A) muestra una de las transformaciones problema (TET-ONE+*GSDM-E* NT) como control negativo. Sólo se observan dos colonias que podrían contener el plásmido pBluescript con *GSDM-E* NT inserto (B). (C) no hay crecimiento (pUltra+*GSDM-E* NT)



Se va a llevar a cabo el mismo procedimiento en paralelo con las enzimas que se habían utilizado en todos los experimentos hasta el momento. Observando el gel (Fig. 14), todo indica que no existe diferencia entre unas enzimas y otras, y que todas funcionan de manera óptima. Aun así, se va a tratar de llevar a cabo 4 transformaciones: *GSDM-E* NT y FL digeridos por un lado con las enzimas fast digest, y por el otro con las que se habían estado usando anteriormente. Como resultado (Fig. 15), en ninguna de las 4 placas se ha producido crecimiento. Por lo tanto, esto permite descartar que las enzimas de restricción fueran el problema.

Todos los experimentos que se han llevado a cabo llevan a pensar que el fallo reside en los insertos, podría existir algún error en su secuencia y por esta razón las enzimas no son capaces de formar los extremos cohesivos o, por otro lado, podría estar amplificándose mediante la PCR fragmentos inespecíficos y no los deseados. Esto sería poco probable ya que las bandas del gel reflejan el tamaño que cabría esperar. Para comprobar si los fragmentos se están amplificando correctamente, se ha buscado una endonucleasa que corte la secuencia del inserto en un único punto. El uso del software de tratamiento de DNA NEB cutter (Fig. 16) permite simular la digestión y muestra el tamaño las de dos bandas que deberían formarse. Esta prueba se ha llevado a cabo con los 3 insertos, todos ellos han sido digeridos con la enzima PstI-HF.

Como cabía esperar (Fig. 17), en los tres genes se pueden intuir las 2 bandas a la altura adecuada. Sin embargo, la cantidad de DNA que se había conseguido

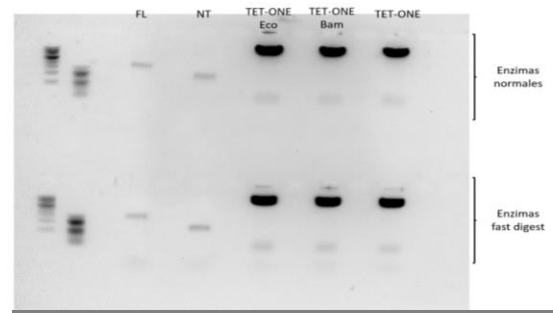


Figura 14. Digestión del vector y de los insertos con enzimas rutinarias y fast digest. Aparentemente no se observan diferencias.

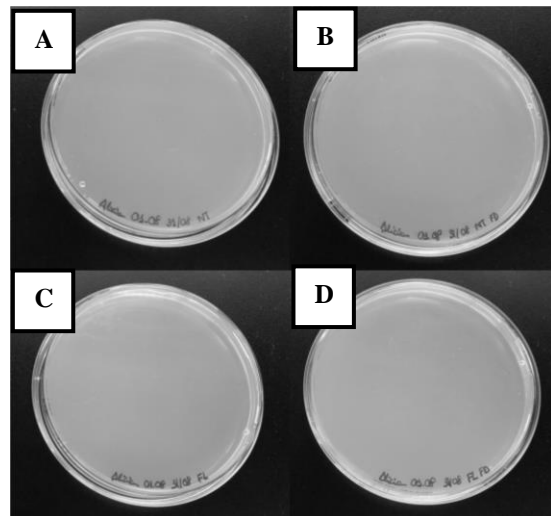


Figura 15. Placas de cultivo con colonias transformadas. Clonación de *GSDM-E* NT con enzimas normales (A) y fast digest (B) y de *GSDM-E* FL con enzimas normales (C) y fast digest (D). No hay crecimiento.

amplificar es muy escasa y a partir de este gel no se puede obtener obtienen datos concluyentes. En base a esta prueba, se sabe que los insertos que se amplifican mediante la PCR son los esperados, por lo tanto, no se puede concluir la razón por la que está fallando.

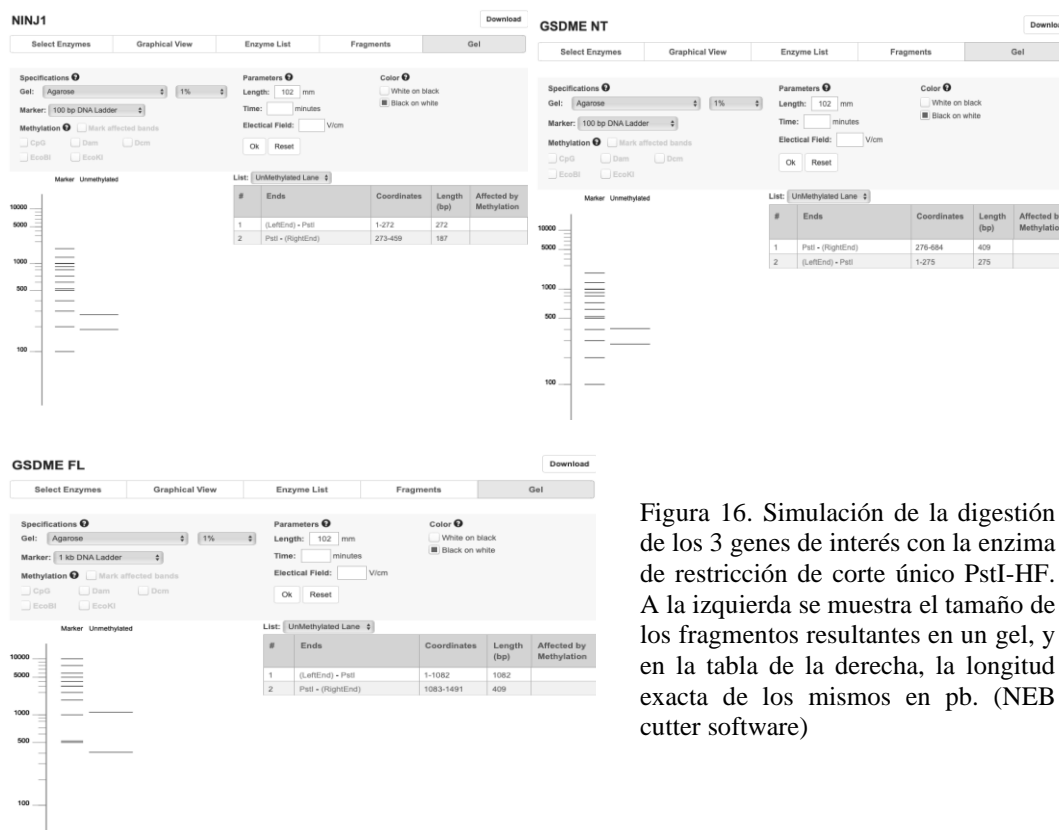


Figura 16. Simulación de la digestión de los 3 genes de interés con la enzima de restricción de corte único PstI-HF. A la izquierda se muestra el tamaño de los fragmentos resultantes en un gel, y en la tabla de la derecha, la longitud exacta de los mismos en pb. (NEB cutter software)

Se procede a intentar llevar a cabo un clonaje con extremos romos, de esta forma, no será necesario el uso de enzimas de restricción. Se va a utilizar un kit que contiene un plásmido ya digerido y preparado para clonar, lo único que hay que hacer es ligar el inserto. En las placas donde se sembraron las bacterias transformadas, no se observó ningún tipo de crecimiento, esto reafirma la hipótesis de que no se trataba de las enzimas de restricción.

El conjunto de pruebas llevadas a cabo hasta el momento conduce a pensar que el problema puede residir en los primers. Por esta razón, se diseñan nuevos oligos con los que se realizará el último intento de clonaje por falta de tiempo.

En estos nuevos oligos, se ha sustituido el sitio de corte de Sall por XhoI, ya que, aunque un fragmento sea digerido por XhoI puede pegarse en el sitio de Sall. Por esta razón, para *NINJI* se ha diseñado una pareja de oligos cortados por EcoRI y

XhoI; para *GSDM-E* NT una pareja de oligos cortados por EcoRI y BamHI y otra cortados por EcoRI y XhoI; y por último para *GSDM-E* FL también se diseñaron 2 parejas de primers, unos con la secuencia diana de EcoRI y BamHI y los otros EcoRI y XhoI.

Los insertos digeridos por EcoRI y SalI/XhoI se insertarán en pUltra y por el contrario los EcoRI y BamHI en TET-ONE.

En paralelo se intentan clonar los genes con los oligos antiguos de *GSDM-E* NT y FL (control negativo). No se van a emplear los oligos antiguos del gen *NINJI* puesto que al revisar su secuencia se detectó que faltaba un nucleótido en uno de los primers. Esta es la razón por la que no se estaba pudiendo clonar *NINJI*, sin embargo, la secuencia de los antiguos primers de los otros dos genes son correctas, por lo que se desconocen las razones por las que no se han conseguido clonar.

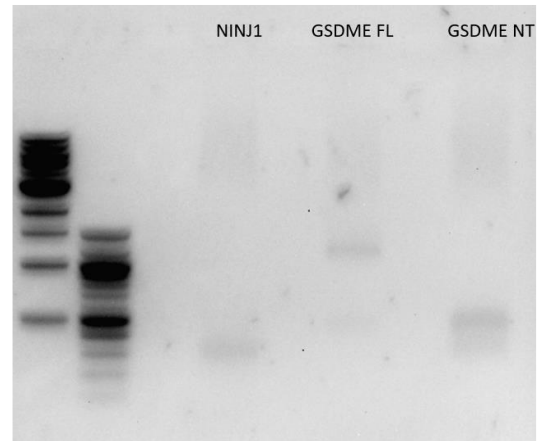


Figura 17. Mapa de restricción de los 3 genes de interés con la enzima de restricción de corte único PstI-HF. A pesar de que las bandas son muy tenues por la escasa cantidad de cDNA utilizada, en *NINJI* se observa una banda por debajo de 500 pb que podría corresponderse con los fragmentos de 272 y 187 pb. Por otro lado, en *GSDM-E* FL aparece una banda más prominente por encima del marcador de 1kb que se correspondería con el fragmento de 1082 pb y una banda que puede intuirse a una altura aproximada de 500 pb que reflejaría el fragmento de 409 pb. En último lugar, en *GSDM-E* NT aparece una banda a la altura de 500 pb y un smear por debajo, los tamaños se corresponden a los de los fragmentos esperados: 409 y 275 pb.

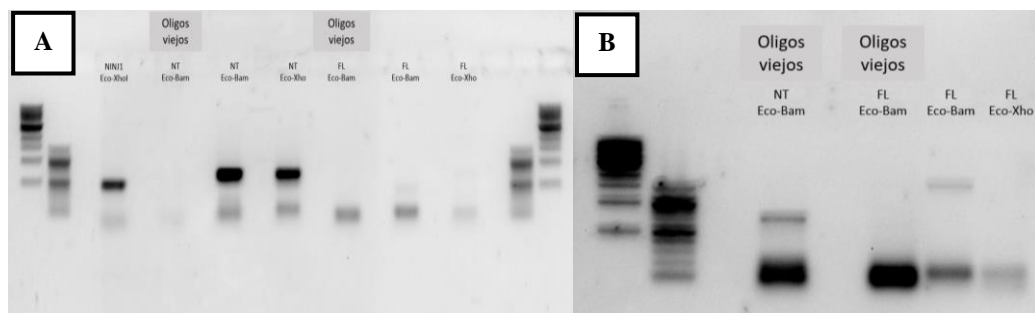


Figura 18. Amplificación de los genes de interés. Se emplean los primers nuevos y antiguos (A). No se consigue que se amplifiquen todos, por lo que se repite la PCR (B) de los pocillos en los que no se obtuvo banda.

Se procede al igual que en anteriores ocasiones, en primer lugar, se amplifican los insertos mediante una PCR (Fig. 18). No se consiguió amplificar todos los que se pretendía, sólo se amplificaron *GSDM-E* NT con las dos nuevas parejas de oligos, *NINJI* con la nueva pareja de oligos y *GSDM-E* FL con los oligos antiguos. Por falta de tiempo, se tratarán de clonar *NINJI* y *GSDM-E* NT y no se espera que aparezcan clones para *GSDM-E* FL (control negativo) ya que se emplearán los mismos oligos que en los anteriores ensayos.

Una vez que se ha llevado a cabo todo el procedimiento, se observa crecimiento en las 4 placas (Fig. 19). Es sorprendente que aparezca un gran número de colonias en la placa con el inserto *GSDM-E* FL, ya que hasta ahora no crecía ninguna. Por último, se analizan las colonias mediante una PCR cuantitativa como se ha venido haciendo hasta ahora (Fig. 20). Se analizaron 26 colonias que se habían clonado con *NINJI*, de las cuales aparecieron 3 aparentes positivos. De la placa que contenía pUltra con el inserto *GSDM-E* NT se picaron 8 colonias, ninguna de ellas positivas.

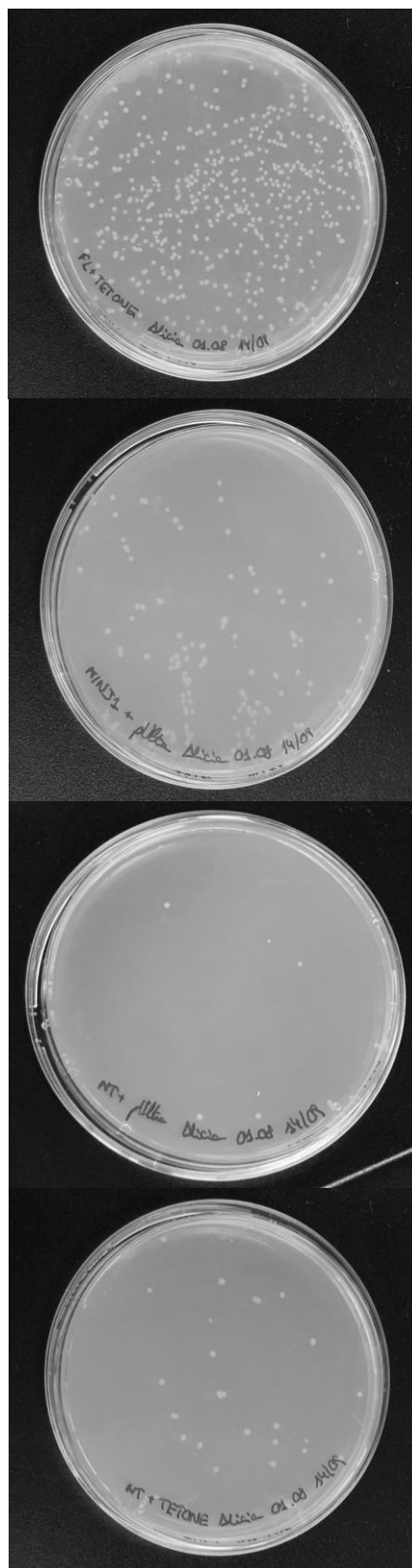


Figura 19. Placas de cultivo donde crecen las colonias transformadas con los diferentes vectores de expresión.

En las cuatro placas aparece un gran número de colonias.

Sin embargo, cuando *GSDM-E* NT se introdujo en el vector TET-ONE, podemos observar un claro positivo de las 18 colonias analizadas. Por último, de la placa de *GSDM-E* FL se picaron 26 colonias y ninguna de ellas fue positivo como cabía esperar ya que se había amplificado con los antiguos primers. En uno de los pocillos aparece una banda por encima de las demás, pero el marcador molecular nos indica que tendría unas 600pb ese fragmento y el inserto es de un tamaño mucho mayor.

Los resultados obtenidos como alguna de las bandas de *NINJI*, no asegura que el clonaje haya salido a la perfección, porque si así fuera, no debería salir la banda a la altura de 100 pb como en las colonias negativas, si no que debería aparecer únicamente una banda a la altura de unas 800 pb, sin embargo, en muchos casos se observa como aparecen las dos. Para cerciorarse de que realmente el clonaje ha sido exitoso, se debe mandar a secuenciar el DNA y una vez sepamos qué colonias contienen el plásmido recombinante, obtener un cultivo puro que posteriormente podrá emplearse para otros experimentos, por ejemplo, tratar de expresar o silenciar estos genes en células sanas y en células tumorogénicas y observar si se producen o no cambios (tanto fenotípicos, como a nivel molecular) y poder describir mejor la función e implicación de los genes.

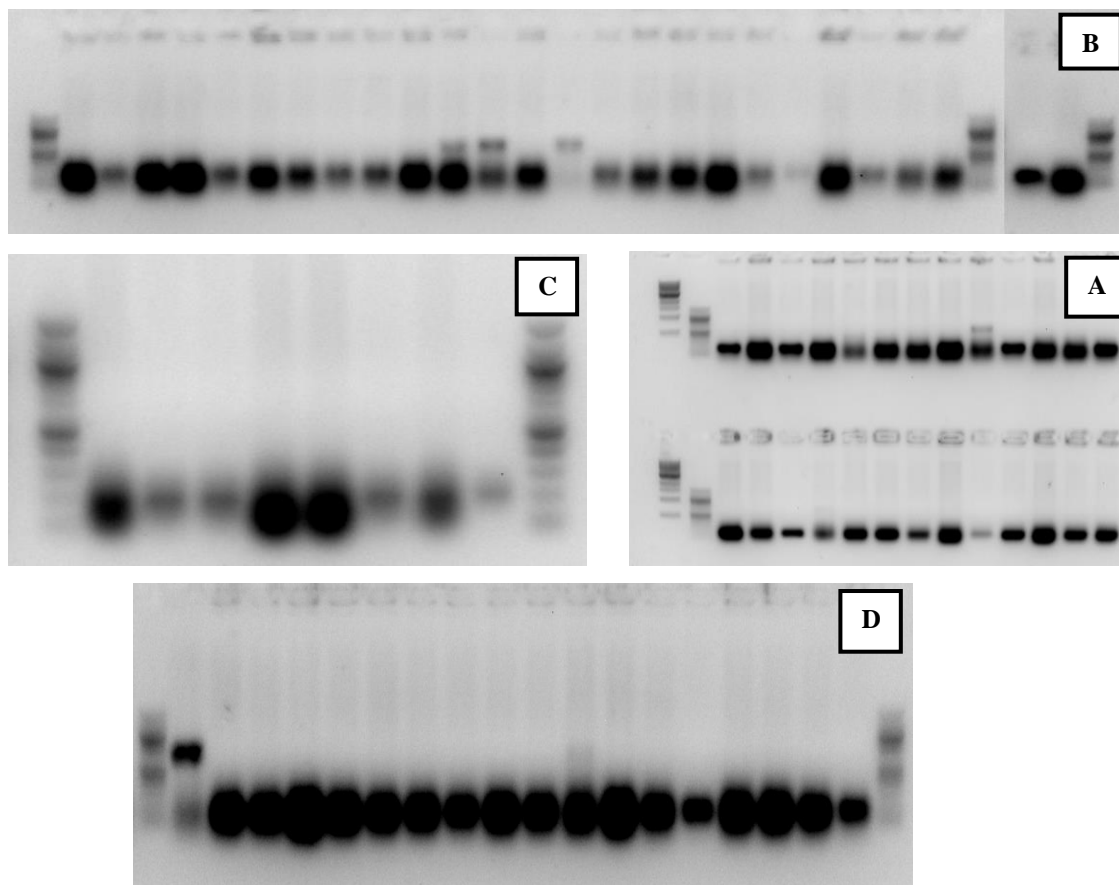


Figura 20. Amplificación mediante PCR del MCS para comprobar si las colonias contienen el plásmido recombinante o solamente el plásmido religado.

(A) 0/26 colonias contienen el plásmido recombinante TET-ONE+*GSDM-E* FL

(B) 3/26 colonias contienen el plásmido recombinante pUltra + *NINJI*

(C) 0/8 colonias contienen el plásmido recombinante pUltra + *GSDM-E* NT

(D) 1/18 colonias contiene el plásmido recombinante TET-ONE + *GSDM-E* NT

## f. Discusión y futuras perspectivas

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, en 2020 este conjunto de enfermedades se cobró la vida de casi 10 millones de personas (WHO, 2022). El cáncer comienza con una mutación o una modificación epigenética que activa protooncogenes o que inactiva un gen supresor de tumores (Jiang *et al.*, 2020).

Las terapias contra el cáncer pueden tener dos finalidades diferentes: inducir la muerte celular, que puede ser inmunogénica (mediante piroptosis) o no inmunogénica (mediante apoptosis) o simplemente tratar de parar o al menos frenar el crecimiento del tumor (inducción de la senescencia celular) (Chibaya *et al.*, 2022).

Los tratamientos clásicos como la quimioterapia o radioterapia suelen tener como objetivo inducir la apoptosis de las células tumorales. Como ya se ha comentado previamente, debido al uso masivo de este tipo de tratamientos las células cancerígenas han empezado a mostrar resistencia a sufrir apoptosis (Jiang *et al.*, 2020). Como consecuencia, ha sido necesario explorar otros campos para buscar posibles alternativas. A raíz de esto, la piroptosis ha comenzado a cobrar cada vez más importancia como mecanismo supresor de tumores.

En las células cancerígenas una alta expresión de *GSDM-E* y su consecutiva escisión, disminuye la división celular y aumenta la presencia de células citotóxicas en el microambiente tumoral. Por esta razón, se están llevando a cabo estudios que se centran en el desarrollo de fármacos (Tabla 1) cuyo objetivo es activar la caspasa 3 para inducir piroptosis (mediado por Gsdm-E) (Jiang *et al.*, 2020). Estos tratamientos tendrían aplicaciones prometedoras especialmente en el tratamiento de tumores resistentes a la apoptosis.

Por otro lado, se ha observado que el nivel de expresión de *GSDM-E* en células cancerígenas afecta a la eficacia de la quimioterapia sobre las mismas, ya que en aquellos ratones que poseían el gen mutado, el efecto del tratamiento se veía reducido

en comparación con ratones salvajes (De Schutter *et al.*, 2021). A raíz de esto, también se plantea combinar la quimioterapia o fototerapia con agentes que aumenten la expresión de este gen y de esta manera potenciar los efectos antitumorales. Un posible ejemplo es la decitabina, un inhibidor de la metiltransferasa que previene el silenciamiento de *GSDM-E* (Wang *et al.*, 2022).

Tabla 1. Fármacos cuya finalidad es activar la caspasa 3 para que escinda Gsdm-E y así inducir piroptosis en células tumorales

Fármaco	Tipo de cáncer	Referencia
Curcumina	Hepatocelular	(Liang <i>et al.</i> , 2021)
Lobaplatino	Nasofaríngeo	(Chen <i>et al.</i> , 2020)
Hexaóxido de tetraarsénico	Pulmonar	(An <i>et al.</i> , 2021)
Miltiron	Hígado	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
Ácido gambóxico	Colon	(Xu <i>et al.</i> , 2022)

Además del tratamiento de esta enfermedad, el patrón de metilación del promotor de *GSDM-E* podría emplearse para la detección temprana de cáncer. Hasta el momento sólo se ha demostrado que pueda aplicarse a algunos tipos de cáncer, pero es necesario llevar a cabo más investigaciones en torno a esto (Wang *et al.*, 2022).

A pesar de los alentadores descubrimientos que se han hecho en relación a esta proteína, se tiene constancia de que la piroptosis es un arma de doble filo en el ámbito del cáncer ya que cuando tiene lugar, se liberan gran cantidad de moléculas mediadoras de la inflamación (DAMPs) (Bhat *et al.*, 2023) que pueden desatar una respuesta inflamatoria descontrolada que dañe las células vecinas sanas favoreciendo la aparición de enfermedades autoinmunes y promoviendo el cáncer (Muppala *et al.*, 2022).

Los estudios enfocados en la caracterización de la piroptosis son muy recientes y han estado más centrados en la ruta mediada por Gsdm-D, por lo tanto, aún hay muchas dudas sin resolver sobre la actuación y regulación de Gsdm-E (Xia *et al.*, 2020) que necesitan de una mayor inversión, tanto de tiempo como de fondos. Teniendo en cuenta los prometedores resultados que podría ofrecernos en la detección temprana y terapia contra tumores, son necesarios exámenes que aseguren una aplicación segura para el paciente y que clarifiquen los posibles efectos colaterales que puede haber.

Con el objetivo de continuar con esta línea de investigación que se encuentra en pleno auge en la actualidad, en el presente proyecto se han clonado genes que podrían ser claves en la descripción de los mecanismos celulares que subyacen la muerte celular piroptótica y sobre todo la regulación de todo el proceso. Una vez que se poseen los genes, pueden expresarse, sobreexpresarse o reprimirse en diferentes líneas celulares y en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad para ver las consecuencias frente a células control. La hipótesis planteada inicialmente no se ha podido corroborar ni refutar por falta de tiempo en la experimentación debido a las complicaciones que han surgido durante la síntesis de las herramientas moleculares que se describen en este proyecto.

Cabe destacar que aún no se ha podido describir con exactitud la estructura cristalina de la Gsdm-E (Wang *et al.*, 2022), lo cual dificulta mucho su estudio e imposibilita sintetizar inhibidores para esta proteína. Una vez que se posea el gen clonado se puede expresar y si se dispone de las herramientas necesarias, intentar obtener una imagen más detallada sobre su estructura.



#### 4. Referencias

- An, H., Heo, J. S., Kim, P., Lian, Z., Lee, S., Park, J., Hong, E., Pang, K., Park, Y., Ooshima, A., Lee, J., Son, M., Park, H., Wu, Z., Park, K. S., Kim, S. J., Bae, I. y Yang, K. M. (2021) “Tetraarsenic hexoxide enhances generation of mitochondrial ROS to promote pyroptosis by inducing the activation of caspase-3/GSDME in triple-negative breast cancer cells”, *Cell death & disease*, 12(2). doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03454-9>.
- Bhat, A.A., Thapa, R., Azfal, O., Agrawal, N., Almaki, W.H., Kazmi, I., Alzarea, S.I., Altamimi, A.S. A, Prasher, P., Singh, S.K., Dua, K. y Gupta, G. (2023) “The pyroptotic role of Caspase-3/GSDME signalling pathway among various cancer: a review”, *International Journal of Biological Molecules*, 242 (2). doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124832>.
- Birch, J. y Gil, J. (2020) “Senescence and the SASP: many therapeutic avenues”, *Genes and development*, 34(23-24), pp. 1565-1576. doi: <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>.
- Burdette, B.E., Esparza, A.N., Zhu, H. y Wang, S. (2021) “Gasdermin D in pyroptosis”, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(9), pp. 2768-2782. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.006>.
- Chen, Z., Xu, G., Wu, D., Wu, S., Gong, L., Li, Z., Luo, G., Hu, J., Chen, J., Huang, X., Chen, C., Jiang, Z. y Li, X. (2020) “Lobaplatin induces pyroptosis through regulating cIAP1/2, Ripoptosome and ROS in nasopharyngeal carcinoma”, *Biochemical pharmacology*, 177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114023>.
- Chibaya, L., Snyder, J. y Ruscetti, M. (2022) “Senescence and the tumor-immune landscape: Implications for cancer immunotherapy”, *Seminars in Cancer Biology*, 86, pp.827-845. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.005>.
- De Schutter, E., Croes, L., Ibrahim, J., Pauwels, P., Op de Beeck, K., Vandenabeele, P. y Van Camp, G. (2021) “GSDME and its role in cancer: From behind the scenes to the front of the stage”, *International journal of cancer*, 148(12), pp. 2872–2883. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.33390>.
- Fernández-Durán, I., Quintanilla, A., Tarrats, N., Birch, J., Hari, P., Millar, F. R., Lagnado, A. B., Smer-Barreto, V., Muir, M., Brunton, V. G., Passos, J. F. y Acosta, J. C. (2021) “Cytoplasmic innate immune sensing by the caspase-4 non-canonical inflammasome promotes cellular senescence”, *Cell Death and Differentiation*, 29, pp. 1267-1282. doi: <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00917-6>.
- Innes, A.J. y Gil, J. (2019) “IMR90 ER: RAS: A Cell Model of Oncogene-Induced Senescence”, *Methods in Molecular Biology*, 1896, pp. 83-92. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7_9).
- Jiang, M., Qi, L., Li, L., y Li, Y. (2020). “The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer”, *Cell death discovery*, 112 (6). doi: <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00349-0>.
- Kayagaki, N., Kornfeld, O.S., Lee, B.L., Stowe, I.B., O'Rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Zhang, J., Lee, W.P., McKenzie, B.S., Ulas, G., Payandeh, J., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Reja, R., Sagolla, M., Webster, J.D., Cho, V., Andrews, T.D., Morris, L.X., Miosge, L.A., Goodnow, C.C., Bertram, E.M. y Dixit, V.M. (2021) “NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death”, *Nature*, 591, pp. 131–136. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7>.
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y. y He, Y. (2019) “The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation”, *International journal of molecular sciences*, 20(13). doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>.
- Li, S., Chen, P., Cheng, B., Liu, Y., Zhang, X., Xu, Q., Huang, M., Dai, X., Huang, K., Zhang, L., Cheng, Y. y Liu, L. (2022) “Pyroptosis predicts immunotherapy outcomes across multiple cancer types”, *Clinical Immunology*, 245. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.109163>.
- Liang, W.F, Gong, Y.X., Li, H.F., Sun, F.L., Li, W.L., Chen, D.Q., Xie, D.P., Ren, C.X., Guo, X.Y., Wang, Z.Y., Kwon, T. y Sun, H.N. (2021) “Curcumin activates ROS signaling to promote pyroptosis in

- hepatocellular carcinoma HepG2 cells”, *In vivo*, 35(1), pp. 249-257. doi: <https://doi.org/10.21873/invivo.12253>.
- Muppala, V., Farran, B. y Nagaraju, G.P. (2022) “Pyroptosis-based nanotherapeutics: Possible mechanism for cancer treatment”, *Life Sciences*, 308. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120970>.
- Paerewijck, O. y Lamkanfi, M. (2022) “The human inflammasomes”, *Molecular Aspects of Medicine*, 88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101100>.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4.<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seok, J. K., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S. y Lee, J. Y. (2021) “Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases”, *Archives of pharmacal research*, 44(1), pp. 16–35. doi: <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01307-9%201>.
- Sutterwala, F. S., Haasken, S., y Cassel, S. L. (2014) “Mechanism of NLRP3 inflammasome activation”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), pp. 82–95. doi: <https://doi.org/10.1111/nyas.12458>.
- Wang, H., Liu, R., Zhao, Y., Liu, Y., Tian, M., Shan, S., Yang, G y Li, H. (2023) “The functions of two GSDMEs in pyroptosis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in canonical and non-canonical inflammasome pathways”, *Fish and Shellfish Immunology*, 138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108838>.
- Wang, J., Ye, T., Wang, S., Wang, J. y Jin, Y. (2022) “Molecular mechanism and therapeutic relevance of gasdermin E in human diseases”, *Cellular signaling*, 90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110189>.
- Wang, Y. y Shao, F. (2021) “NINJ1, rupturing swollen membranes for cataclysmic cell lysis”, *Molecular Cell*, 81(7), pp. 1370-1371. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.005>.
- World health organization (2023) *Cancer*. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Accedido: 05 de 06 de 2022).
- Xia, S., Hollingsworth, L. R. y Wu, H. (2020) “Mechanism and Regulation of Gasdermin-Mediated Cell Death”, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(3). doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036400>.
- Xu, H., Zhang, D., Wei, R., Zhou, Y., Dai, G., Li, J., Sun, Y., Li, F. y Xi, L. (2022) “Gambogic Acid Induces Pyroptosis of Colorectal Cancer Cells through the GSDME-Dependent Pathway and Elicits an Antitumor Immune Response”, *Cancers*, 14(22). doi: <https://doi.org/10.3390/cancers14225505>.
- Zhang, X., Zhang, P., An, L., Sun, N., Peng, L., Tang, W., Ma, D. y Chen, J. (2020) “Miltirone induces cell death in hepatocellular carcinoma cell through GSDME-dependent pyroptosis”, *Acta pharmaceutica Sinica*, 10(8), pp. 1397–1413. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.06.015>.
- Zhang, Z., Zhang, Y., Xia, S., Kong, Q., Li, S., Liu, X., Junqueira, C., Meza-Sosa, K.F., Mo Yin Mok, T., Ansara, J., Sengupta, Y., Wu, H. y Lieberman, J. (2020) “Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity”, *Nature*, 579, pp. 415-420. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2071-9>.
- Zhou, B. y Abbott, D.W. (2021) “Gasdermin E permits interleukin-1 beta release in distinct sublytic and pyroptotic phases”, *Cell reports*, 35(2). doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108998>.