

Eritropoyesis: Mecanismos moleculares que favorecen la maduración eritroide

Erythropoiesis: Molecular mechanisms favoring erythroid maturation

AUTORES

RUBEN GROSSO

Veterinario, becario de investigación IHEM-CONICET. Profesor de Histología y Embriología Universidad Juan Agustín Maza. Veterinario, becario de investigación IHEM-CONICET. Profesor de Histología y Embriología Universidad Juan Agustín Maza. Veterinario, becario de investigación IHEM-CONICET. Profesor de Histología y Embriología Universidad Juan Agustín Maza.

BETIANA SALASSA

Bioquímica, becaria de investigación IHEM-CONICET.

Jefa de Trabajos Prácticos de Bioquímica General y Estomatológica (Facultad Odontología-UNCUYO).

ALEJANDRO TONELLI

Becario Alumno de investigación SeCTyP. Ayudante alumno de Bioquímica General y Estomatológica (Facultad Odontología-UNCUYO).

CLAUDIO FADER

Doctor en Bioquímica y Biología Celular. Investigador Adjunto IHEM-CONICET. Profesor Adjunto efectivo de Bioquímica General y Estomatológica (Facultad Odontología-UNCUYO).

RESUMEN

En células eucariotas, la autofagia es un proceso catabólico que participa en aislar componentes celulares dentro de vesículas y llevarlos a los lisosomas para su degradación. Este proceso cumple un rol muy activo durante la eritropoyesis, siendo responsable de eliminar organelas que no son necesarias en el glóbulo rojo maduro. El mecanismo por el cual se activa la autofagia en la eritropoyesis requiere de estudios celulares con mayor profundidad para su correcto entendimiento. En el presente estudio demostramos que hemina, un compuesto fisiológico capaz de estimular la maduración eritroide, puede inducir la estimulación de la autofagia en células K562 (eritroblastos de leucemia mieloide crónica). No obstante hemina induce la despolarización y el consecuente secuestro de mitocondrias por parte de vesículas específicas de la vía autofágica llamadas autofagosomas. La importancia de este trabajo es aportar información básica relevante de la función de la autofagia en células cancerosas con proyección en la terapéutica de la leucemia.

Palabras claves: Autofagia, LC3, Eritropoyesis, Leucemia.

ABSTRACT

In eukaryotic cells, autophagy is catabolic process which participates in isolate cellular components within vesicles and targeting to lysosomes for its degradation. This process plays a highly active role during erythropoiesis being responsible of eliminating non-necessary organells in the mature red blood cell. The mechanism by which autophagy is activated during erythropoiesis requires more thorough studies. In the present work we demonstrated that hemin, a physiological compound capable of stimulating erythroid maturation, may induce the stimulation of autophagy in K562 cells (CML erythroblast). Nonetheless, hemin induces mitochondrial depolarization and its subsequent engulfment by specific autophagy vesicles called autofagosomes. The relevance of this study is to give basic information regarding the aim of autophagy in cancer cells and future leukemia therapeutic outreach.

Key words: Autophagy, LC3, Erythropoiesis, leukemia.

Eritropoyesis: Mecanismos moleculares que favorecen la maduración eritroide

Ruben Grosso; Betiana Salassa; Alejandro Tonelli; Claudio Fader

INTRODUCCIÓN

La autofagia es un mecanismo intracelular que a través de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, secuestra componentes intracelulares, microorganismos y otras estructuras con el fin de llevarlo hasta los lisosomas para su degradación (1). Normalmente durante el ayuno celular (privación de nutrientes), se activa esta vía produciendo el catabolismo de compuestos complejos a sus formas más simples para proveerse de nutrientes. Diversas proteínas participan en la autofagia, activándose en forma de cascada para finalmente activar la producción de los autofagosomas (2). Una de las proteínas que caracteriza a este proceso es la proteína LC3 (Light Chain 3) la cual conforma a los autofagosomas durante todo el procesamiento. Cuando se activa la vía autofágica esta proteína normalmente citosólica (denominada LC3-I) se une a fosfatidiletanolamina (denominándose LC3-II), lo cual le permite anclarse a las membranas que luego formarán los autofagosomas. Esta conversión de LC3-I (citosólica) a LC3-II (activa en membrana) permite medir si la autofagia ha sido estimulada por algún compuesto (3,4).

La eritropoyesis es un proceso por el cual las células madres hematopoyéticas son estimuladas al pasar por una serie de etapas de diferenciación celular para dar lugar finalmente a la formación de glóbulos rojos maduros (5). Durante los estadios finales de la eritropoyesis, en los eritroblastos ortocromáticos y reticulocitos, la autofagia se encuentra muy activa, siendo responsable de la eliminación de los ribosomas (ribofagia) y las mitocondrias (mitofagia) una vez terminada la síntesis de hemoglobina en los reticulocitos (4,6,7). En células eritroleucémicas la maduración se encuentra

interrumpida por alteraciones cromosómicas, llevando a la proliferación y liberación de células inmaduras (eritroblastos) hacia la sangre. Estas células no cumplen la función de nutrición y oxigenación fisiológica, provocando fallas a nivel multiorgánico. Diversos compuestos como hemina, ácido butírico (BA), hidroxí urea (DHU), pueden estimular la maduración eritroide convencional, pero no se conoce bien su efecto sobre la autofagia (8).

El presente estudio tiene como objetivo estudiar si los compuestos de estimulación eritroide, tienen efectos en la respuesta autofágica de células leucémicas eritroides y si esto se asocia o no a un aumento de estímulos de maduración como la síntesis de hemoglobina y la eliminación de mitocondrias por parte de la vía autofágica (mitofagia).

MATERIALES Y MÉTODOS:

Cultivo celular: Se utilizaron células K562: eritroblastos leucémicos (cromosoma philadelphia positivos) en cultivo con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina (50U/ml) y estreptomycin (50µg/ml). Para las pruebas de estimulación se utilizaron células K562 en su forma wild-type y K562 sobreexpresando la proteína LC3 asociada a una proteína fluorescente GFP (Green fluorescent protein), lo que permite ser visualizada en microscopios de fluorescencia. Los inductores de maduración utilizados por 5 días en medio de cultivo fueron: ácido butírico 1,4mM, Hemina 50µM, hidroxí urea 100µM, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) como control negativo ya que estimula la maduración de megacariocitos y no de eritroblastos. La fluorescencia se observó in vivo en microscopio de fluorescencia confocal Olympus FV-1000.

Tinción May-Grünwald Giemsa: Las células fueron centrifugadas por 4 min a 800g. Del pellet obtenido se hizo un extendido en portaobjeto. Luego del secado con aire se utilizó la tinción MGG (Sigma-Aldrich) según protocolo indicado por la empresa manufacturera. Visualización en microscopio óptico.

Microscopía electrónica: células K562 fueron incubadas por 5 días con Hemina 50µM. El procesamiento se realizó según lo descrito previamente en otro estudio (9). Brevemente, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído 2% en buffer cacodilato de sodio 0,15M durante 20 min, lavadas y pos fijadas en OsO4 2% en cacodilato pH7,4, y se finalizó el lavado y montaje como se describe en artículos previos (10). Se utilizó Microscopio Electrónico Zeiss 900 para observar las muestras.

Western Blot: las muestras se centrifugaron y el pellet fue disuelto en buffer de lisis con SDS loading buffer, luego incubadas 5min a 95°C. Se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida 12,5% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham). Estas fueron bloqueadas en Blotto (leche descremada 5% en 0,1% de PBS Tween 20). Incubación con anticuerpo primario y secundario conjugado con peroxidasa.

Reconstrucción 3D: se obtuvieron imágenes confocales seriadas en eje Z de células K562 expresando RFP-LC3 (rojo) y GFP-mito (marcador mitocondrial verde). Se alinearon las imágenes en secuencia y se procedió a la reconstrucción 3D con Software Reconstruct 1.1.0 (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Hemina estimula la autofagia y la síntesis de hemoglobina en células eritroleucémicas:

Eritropoyesis: Mecanismos moleculares que favorecen la maduración eritroide

Ruben Grosso; Betiana Salassa; Alejandro Tonelli; Claudio Fader

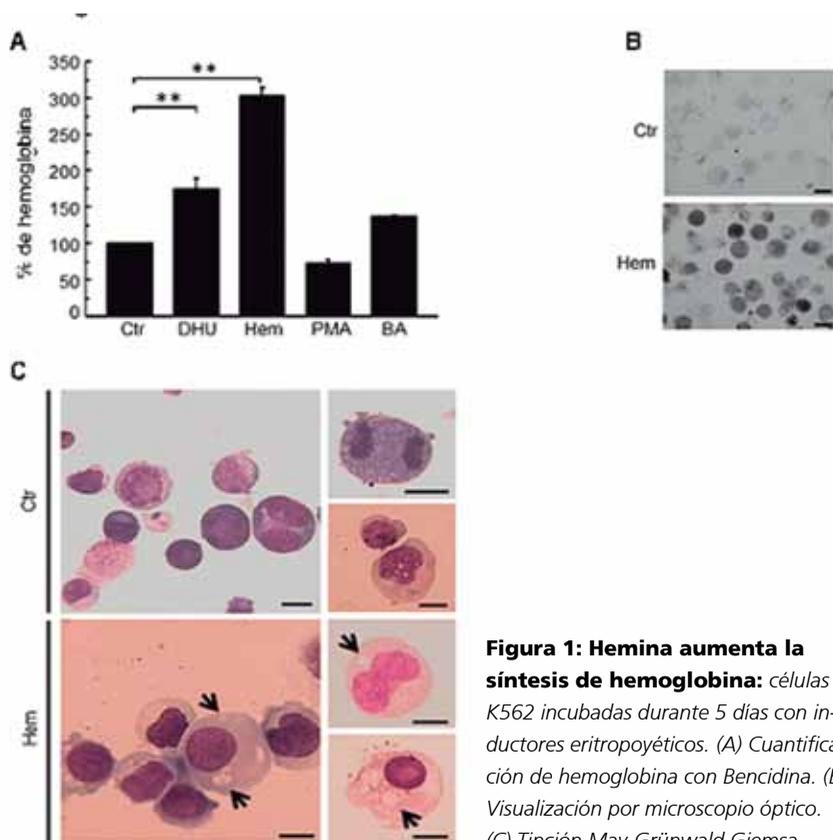


Figura 1: Hemina aumenta la síntesis de hemoglobina: células K562 incubadas durante 5 días con inductores eritropoyéticos. (A) Cuantificación de hemoglobina con Bencidina. (B) Visualización por microscopio óptico. (C) Tinción May-Grünwald Giemsa.

Con el fin de estudiar el rol que cumplen los inductores eritropoyéticos mencionados anteriormente, sobre las células leucémicas, se realizó incubación de células K562 durante un periodo de 5 días con cada uno de ellos. Los resultados obtenidos demostraron que tanto DHU como Hemina incrementaron significativamente el porcentaje de hemoglobina medido por la reacción de Bencidina, en células K562, siendo el aumento de 2 y 3 veces más que el control respectivamente (Figura 1A). Este aumento de hemoglobina intracelular puede ser observado por microscopio óptico convencional, utilizando la reacción oxidante del grupo hem mediante la prueba de la bencidina, resultando en positivo aquellas células que toman una coloración marrón oscura mientras más hemoglobina contengan en

su interior. Las células tratadas con Hemina dan una reacción mayor que el grupo control (Figura 1B). Al realizar tinción MGG se pudo detectar que las células incubadas con Hemina, a diferencia de los otros inductores de maduración, presentaron un marcado aumento de grandes vesículas intracelulares (Figura 1C).

Con el fin de analizar si las vesículas en formación ante el estímulo de hemina provenían de la vía autofágica (autofagosomas), se realizó microscopía de fluorescencia en células que expresan establemente la proteína GFP-LC3 y se procedió al conteo de cantidad de vesículas positivas (autofagosomas) por célula. Los datos obtenidos indicaron un significativo incremento del número de autofagosomas de gran tamaño en aquellas células incubadas con hemina comparadas con células control

sin estímulo. Esto no fue visualizado con la estimulación de los otros inductores de maduración (Figura 2A).

Para evaluar si conjuntamente al aumento de autofagosomas hemina inducía además un estímulo de la vía autofágica se analizó por western blot la cantidad de proteína LC3-I y LC3-II. Como se puede observar en la Fig. 2B, hemina produjo un aumento del 50% de la conversión a LC3-II, comparado con situación control. Este incremento es comparable al que se induce cuando se coloca cloroquina (CQ) 1 μ M, un compuesto que detiene el flujo autofágico, inhibiendo la fusión de autofagosomas con lisosomas, lo que conduce a un incremento del número de autofagosomas y LC3-II por no poder continuar la vía. Para diferenciar si hemina estaba estimulando la vía en lugar de frenarla, se analizó su efecto en asociación con CQ. El resultado indica que hay un mayor incremento de LC3-II comparado al que produce hemina sola, lo que demuestra que hemina está estimulando el flujo y no impidiéndolo (Fig 2B).

La ultraestructura de autofagosomas se estudió por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en condiciones control sin estímulo y con hemina. Observamos por TEM que los autofagosomas que se observan como vesículas de doble membrana con contenido celular poco electródenso en su interior. Pero de manera importante se visualizaron mitocondrias adentro de los autofagosomas en las células estimuladas con hemina. Esto no fue hallado en las células sin estimulación (Figura 2C), indicando de que hemina estaba induciendo a demás la mitofagia.

En otro estudio realizado en nuestro laboratorio, se pudo corroborar mediante marcación de compartimentos degradativos, que en células K562 incubadas con Hemina, las mitocondrias

Eritropoyesis: Mecanismos moleculares que favorecen la maduración eritroide

Ruben Grosso; Betiana Salassa; Alejandro Tonelli; Claudio Fader

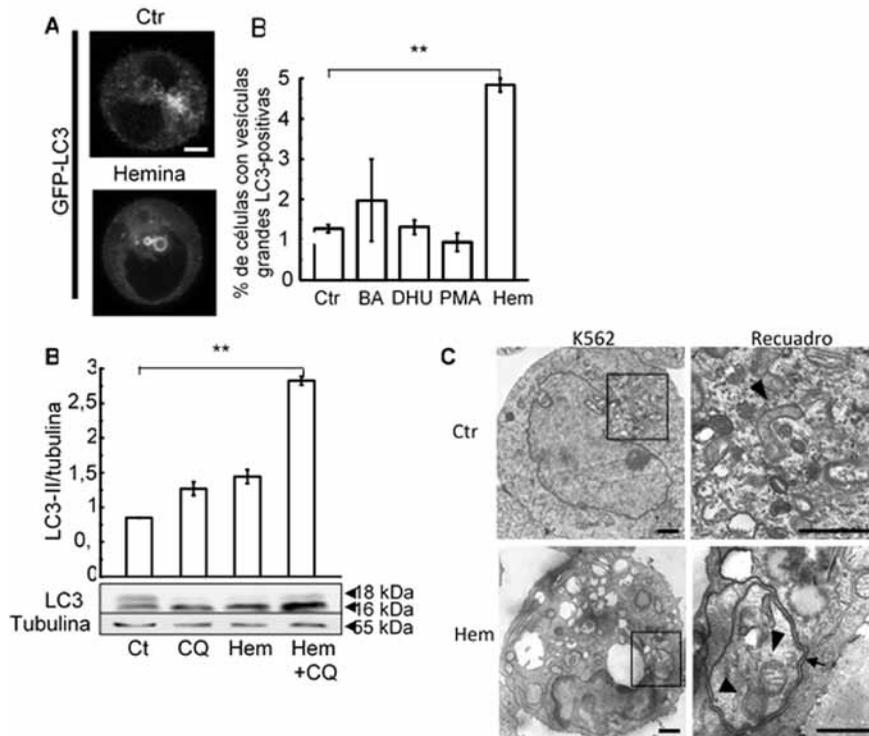


Figura 2: Hemina induce la autofagia y la mitofagia: células K562 incubadas con Hemina 50 μ M durante 5 días y otros inductores celulares de maduración. (A). K562 sobreexpresando GFP-LC3, cuantificación de autofagosomas en microscopio de fluorescencia. (B). Western blot de K562 incubadas con Hemina, Cloroquina y en combinación. Detección de proteínas LC3-I, LC3-II y tubulina. (C) Imágenes de TEM de K562 en condiciones control sin estímulo y con Hemina. Mitochondrias (cabezas de flecha) y doble membrana del autofagosoma (flecha).

además de ser incorporada dentro de los autofagosomas, estaban siendo llevadas a los lisosomas para su degradación, viéndose reflejado esto en una disminución de la cantidad de proteínas específicas mitocondriales como TOM20 y Complejo III mediante western blot (12).

Siguiendo con este último hallazgo, se realizó microscopía de fluorescencia confocal marcando los autofagosomas con RFP-LC3 (proteína fluorescente roja) y las mitocondrias con GFP-MITO (verde). Se realizó toma de imágenes seriadas en distintos planos celulares para realizar una reconstrucción 3D y poder visualizar si, como se obtuvo por TEM, se estaba produciendo la mitofagia debido a la estimulación con hemina.

En la Figura 3A se muestran las imágenes seriadas de una célula K562 estimulada con hemina y las flechas blancas indican los puntos que tienen

colocalización (un solapamiento de color verde-rojo), por lo que se ven amarillos. Al realizar la reconstrucción 3D, se pudo corroborar que definitivamente las mitocondrias en verde, se rodean completamente por vesículas rojas LC3-positivas (autofagosomas) (Fig. 3B).

Este secuestro mitocondrial por parte de la vía autofágica, se debe en parte al efecto despolarizante que posee hemina sobre la membrana mitocondrial. Esto lleva a que expresen proteínas adaptadoras, siendo reconocidas y aisladas por parte de los autofagosomas y así evitar que se liberen factores que pueden desencadenar la muerte celular programada llamada apoptosis (12, 13).

CONCLUSIONES:

El estímulo de células eritroleucémicas con el inductor de la maduración eritroide, como la hemina, es capaz

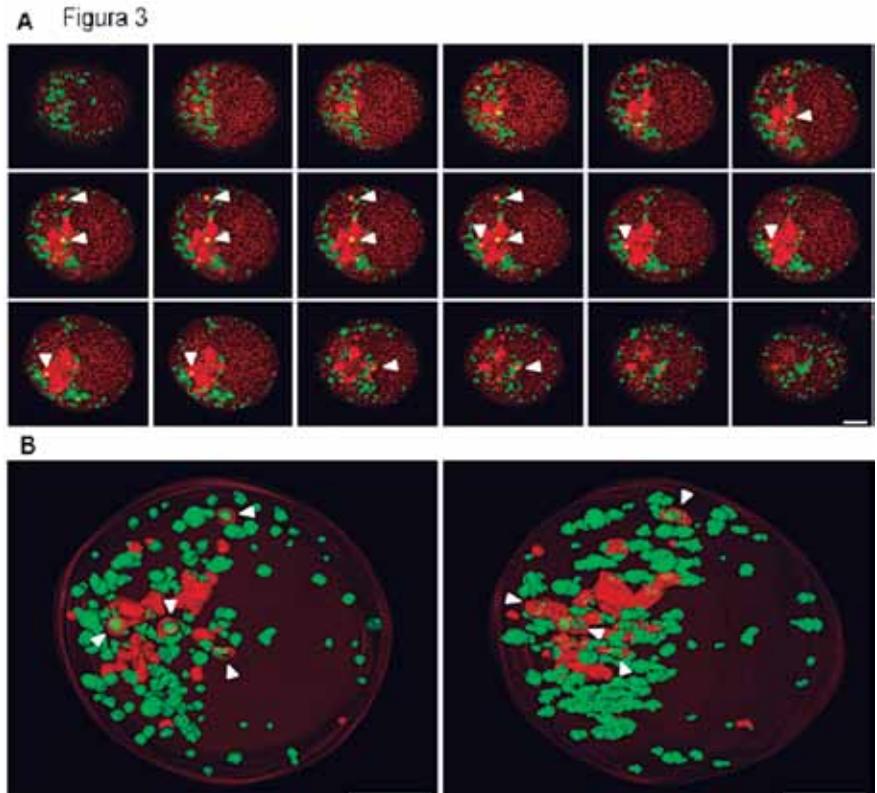
de estimular la síntesis de hemoglobina en mayor medida, comparado con otros compuestos como el ácido butírico y la dihidroxiurea. Hemina además es capaz de estimular la vía autofágica, incrementando no sólo el tamaño de los autofagosomas, sino también la síntesis de novo de los mismos al estimular la conversión de la proteína LC3-II. De manera importante, pudimos demostrar que hemina induce el secuestro mitocondrial por parte de los autofagosomas (mitofagia) para llevar dichas organelas a degradación, el cual es un evento sumamente importante en el proceso de maduración eritroide. En conjunto, estos datos nos permiten inferir que hemina puede estimular la maduración de células leucémicas inmaduras, siendo esto muy importante, ya que podría ser utilizado como coadyuvante de los quimioterápicos utilizados en la terapéutica de este tipo de cáncer.

Eritropoyesis: Mecanismos moleculares que favorecen la maduración eritroide

Ruben Grosso; Betiana Salassa; Alejandro Tonelli; Claudio Fader

Figura 3: Colocalización por fluorescencia y reconstrucción 3D:

Ensayo in vivo en células K562 sobreexpresando las proteínas RFP-LC3 y GFP-MITO, se incubaron durante 48h con Hemina 50μM. (A): Imágenes seriadas de distintos planos celulares obtenidos por microscopía de fluorescencia confocal Olympus FV-1000. Cabezas de flechas indican puntos colocalizantes. **(B)** Reconstrucción 3D de las imágenes seriadas con Software Reconstruct.



BIBLIOGRAFÍA

1. CHEN Y, KLIONSKY DJ. *The regulation of autophagy - unanswered questions.* *J. Cell Sci.* 2011;124:161-170.
2. ESKELINEN EL, SAFTIG P. *Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease.* *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1793:664-673.
3. LAMB CA, YOSHIMORI T, TOOZE SA. *The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex.* *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14:759-774.
4. GROSSO R, COLOMBO MI, FADER CM. *Autophagy: A necessary event during erythropoiesis.* *Blood reviews 2017 (en prensa)* doi: 10.1016/j.blre.2017.04.001.
5. BARON MH, ISERN J, FRASER ST. *The embryonic origins of erythropoiesis in mammals.* *Blood* 2012;119:4828-4837
6. ZHANG J, RANDALL MS, LOYD MR, DORSEY FC, KUNDU M, CLEVELAND JL, NEY PA. *Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation.* *Blood* 2009;114:157-164.
7. ZHANG J, NEY PA. *Autophagy-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial clearance during reticulocyte maturation.* *Autophagy.* 2009;5:1064-1065.
8. GAMBARI, R. (2012) *Alternative options for DNA-based experimental therapy of beta-thalassemia.* *Expert. Opin. Biol. Ther.* 12, 443-462.
9. SAVINA, A., VIDAL, M. AND COLOMBO, M.I. (2002) *The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11.* *J. Cell Sci.* 115, 2505-2515.
10. HARDING, C., HEUSER, J. AND STAHL, P. (1983) *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes.* *J. Cell. Biol.* 97, 329-339.
11. FIALA, J.C. (2005) *Reconstruct: a free editor for serial section microscopy.* *J. Microsc.* 218, 52-61
12. FADER CM, SALASSA BN, GROSSO RA, VERGARA AN, COLOMBO MI. *Hemin induces mitophagy in a leukemic erythroblast cell line.* *Biol. Cell* 2016;108:77-95.
13. SANDOVAL H, THIAGARAJAN P, DASGUPTA SK, SCHUMACHER A, PRCHAL JT, CHEN M, WANG J. *Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells.* *Nature* 2008;454:232-235.