



Universidad
Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y

Biología Molecular y Celular

Trabajo de Fin de Grado

**Expresión y secreción
del ligando mortal TRAIL
en células efectoras del sistema inmune**

Autor: Manuel Sanclemente Cidón

Director: Luis Martínez Lostao

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	5
INTRODUCCIÓN	7
<u>TRAIL.....</u>	7
TRAIL y sus receptores	7
Vía de señalización de TRAIL	7
TRAIL y regulación inmune	8
<u>MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LOS LIGANDOS MORTALES</u>	9
<u>EXOSOMAS Y VCP</u>	10
MATERIAL Y MÉTODOS	12
<u>CUTIVOS CELULARES</u>	12
Líneas celulares	12
Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica (PBLs) y generación de blastos T	12
<u>ESTUDIO DE LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE DBEQ SOBRE JURKAT, PBLs Y BLASTOS T.....</u>	13
<u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL EN SUPERFICIE Y TOTAL.....</u>	13
Expresión de TRAIL en superficie mediante citometría de flujo	14
Expresión de TRAIL intracelular mediante citometría de flujo	14
<u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL MEDIANTE WESTERN-BLOT.....</u>	15
<u>ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD</u>	16
Citotoxicidad de los blastos T y las células Jurkat sobre células diana	16
Citotoxicidad de los sobrenadantes de las células efectoras (blastos T y células Jurkat).....	17
Ensayo temporal de la citotoxicidad de los sobrenadantes de las células Jurkat.....	17
Análisis de la muerte celular. Citometría de Flujo	18
RESULTADOS	19
<u>EXPRESIÓN DE TRAIL EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....</u>	19

Expresión de TRAIL durante la activación de los linfocitos	19
Expresión de TRAIL durante la activación de los linfocitos tras pulsos de reactivación	19
<u>ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL DBEQ EN CÉLULAS HEMATOLÓGICAS</u>	19
<u>EXPRESIÓN DE TRAIL EN CÉLULAS JURKAT</u>	20
<u>CITOTOXICIDAD DE LAS CÉLULAS EFECTORAS</u>	20
Citotoxicidad de los blastos T	20
Citotoxicidad de las células Jurkat.....	20
<u>CITOTOXICIDAD DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS EFECTORAS</u>	21
Citotoxicidad de los sobrenadantes obtenidos de los blastos T	21
Citotoxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las células Jurkat.....	21
<u>CITOTOXICIDAD TEMPORAL DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS JURKAT</u>	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS	27

RESUMEN

Los ligandos mortales juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune. FasL/CD95L es quién realiza la mayor contribución en esta función, mientras que la actuación de Apo2L/ TRAIL no se halla completamente caracterizada.

En los linfocitos T activados, ambos ligandos (FasL y TRAIL) se encuentran asociados con vesículas lipídicas denominadas exosomas, que preservan intacto su potencial citotóxico. Estos exosomas conteniendo los ligandos mortales, son almacenados en los cuerpos multivesiculares (MVB) y se secretan rápidamente al medio extracelular tras la re-estimulación de los linfocitos T activados.

Se analizó mediante proteómica el contenido proteico de exosomas provenientes de la línea celular Jurkat y de los blastos T, observándose una expresión diferencial en la proteína VCP/p97. Entre los procesos celulares en los que VCP/p97 participa, resulta particularmente interesante su papel en el tráfico vesicular y podría estar involucrada en la diferente secreción de exosomas entre los linfocitos T normales y las células leucémicas.

En este trabajo, se utilizó un inhibidor específico de VCP/p97 (DBeQ) con el propósito de profundizar en el papel de esta proteína en el transporte de los exosomas. Se analizó la expresión de TRAIL tanto en los linfocitos T activados como en las células Jurkat, así como su capacidad citotóxica y la de sus sobrenadantes tras el pre-tratamiento con DBeQ.

Los resultados obtenidos sugieren que la VCP/p97 está implicada en el tráfico vesicular de las células Jurkat, pero no en el de los linfocitos T activados.

ABSTRACT

Death ligands play an important role in the regulation of the immune system. FasL/CD95L play the most important role in this regulation. However, the role of another death ligand, Apo2L/TRAIL in the regulation of the immune system is not well characterized.

In activated T cells, both death ligands (FasL and TRAIL) are associated with lipid vesicles called exosomes keeping intact their cytotoxic potential. These exosomes with the death ligands are intracellularly stored inside lysosomal-like structures called multivesicular bodies and are rapidly released to the extracellular medium after re-stimulation of activated T cells.

The protein content of exosomes from normal activated T cells and leukemic Jurkat cells was studied by proteomic analysis and differential expression of the protein VCP/p97 was found. Among the different cellular processes in which VCP/p97 is involved, its role in vesicular trafficking is especially interesting and could be implicated in the differential secretion of exosomes between normal T cells and leukemic cells.

In this study, we used the VCP/p97 specific inhibitor (DBeq) in order to gain insight in the involvement of VCP/p97 in vesicular trafficking of exosomes with the death ligands. We analyzed the expression of TRAIL both in normal activated T cells and Jurkat cells, the cytotoxic ability of both cells types and the cytotoxic ability of supernatants from normal activated T cells and Jurkat cells after treatment with DBeq.

Our results suggest that VCP/p97 could be implicated in the exosome trafficking in leukemic cells but not in normal activated T cells.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los ligandos mortales participan en la regulación del sistema inmune y el principal papel en estos procesos lo juega el ligando mortal FasL/CD95L mientras que la función de TRAIL no se halla completamente clarificada.

FasL y TRAIL se encuentran almacenados intracelularmente en células del sistema inmune (linfocitos T normales activados y células de la línea tumoral Jurkat) asociados a vesículas lipídicas de unos 100 a 200 nm llamadas exosomas (Martinez-Lorenzo, *et al* 1999). Estos exosomas con FasL y TRAIL asociados a su membrana se encuentran dentro de unos compartimentos llamados cuerpos multivesiculares (MVB) (Monleon, *et al* 2001) y son secretados al medio extracelular cuando los linfocitos T normales y células Jurkat son reactivadas a través de su TCR preservando así el potencial citotóxico de estos ligandos mortales.

En estudios previos de nuestro grupo, se ha realizado un análisis proteómico de los exosomas liberados por linfocitos T normales activados y células tumorales Jurkat encontrándose diferencias en el contenido protéico de ambos. Una proteína diferencial presente en células Jurkat pero no en linfocitos T normales activados es una ATPasa de tipo II AAA esencial y muy abundante en las células denominada VCP/p97 (datos no publicados).

La proteína VCP/p97 parece estar implicada en distintos procesos celulares como la división celular, degradación de proteínas y formación de agregados protéicos, regulación del ensamblaje de miofibrillas así como en procesos implicados en el tráfico vesicular como el reensamblaje de la membrana del aparato de Golgi y la maduración del autofagosoma (Wang, *et al* 2004). Por tanto, la presencia de esta proteína en los exosomas de células Jurkat (y no de linfocitos T humanos normales activados) hace sospechar que podría estar interviniendo en su secreción en células tumorales y no en células normales.

Se ha desarrollado un inhibidor específico de VCP/p97 denominado DBE-Q que muestra un efecto citotóxico sobre células tumorales pero no en células normales, implicando a la proteína VCP/p97 en el desarrollo y progresión tumoral haciendo de esta proteína una posible diana terapéutica anti-tumoral (Chou, *et al* 2011).

En el presente estudio se pretende profundizar en los mecanismos que regulan la expresión en superficie e intracelular de TRAIL y la secreción de este ligando mortal en asociación a exosomas y cómo estos los cambios en esta expresión y secreción afectan a la capacidad citotóxica de linfocitos T humanos normales activados antes y después de ser re-estimulados en comparación con la línea celular Jurkat (linfocitos T humanos tumorales).

De este modo, los objetivos de este trabajo son:

- Analizar la expresión en superficie e intracelular de TRAIL en linfocitos T normales activados obtenidos a partir de sangre periférica y comparar su expresión en la línea celular tumoral Jurkat.
- Estudiar in vitro el papel de TRAIL en la muerte celular inducida por los linfocitos T normales activados tras ser sometidos a reactivación.
- Examinar in vitro la contribución de la proteína VCP/p97 en la secreción de exosomas de linfocitos T normales y en la línea celular tumoral Jurkat mediante la utilización del inhibidor específico de VCP/p97, DBeQ.
- Analizar in vitro la contribución de la proteína VCP/p97 en la capacidad citotóxica de linfocitos T normales y en la línea celular tumoral Jurkat mediante la utilización del inhibidor DBeQ.

INTRODUCCIÓN

TRAIL

Apo2L/TRAIL (*Apo2 Ligand/TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) fue caracterizado por dos grupos distintos como un ligando mortal capaz de inducir apoptosis por la vía extrínseca de manera independiente de Fas.

TRAIL es una proteína de membrana de tipo II de la familia del TNF, compuesta por 281 aminoácidos y cuyo gen está localizado en el cromosoma 3, posición 3q26. Su dominio extracelular C-terminal presenta homología con los otros miembros de su familia, no así el N-terminal. El monómero de TRAIL tiene un peso molecular de 32,5 kDa y de 41 kDa cuando está completamente glicosilado. TRAIL, como miembro de la familia TNF, es un homotrímero en el que cada monómero está compuesto de dos láminas beta antiparalelas. Una propiedad distintiva de TRAIL es la formación homotrímeros coordinándose en torno a un átomo de Zinc de manera espontánea manteniendo así su estabilidad y actividad biológica.

TRAIL y sus receptores

Los receptores mortales de TRAIL, DR4 y DR5, son proteínas transmembrana de tipo I, siendo DR5 el de mayor actividad pro-apoptótica. Además de los ya mencionados, TRAIL tiene otros receptores, DcR1 y DcR2, que son receptores señuelo que no transmiten la señal apoptótica ya que carecen de dominio citoplasmático (DcR1) o lo tienen truncado (DcR2) y un receptor soluble de menor afinidad denominado osteoprotegerina. El papel fisiológico de ambos receptores DcR no está claro pero se piensa que podrían tener un papel regulador de la acción de TRAIL.

Vía de señalización de TRAIL

El paso inicial en la apoptosis inducida por TRAIL es la unión de un homotrímero de TRAIL a sus receptores DR4 o DR5. La interacción de TRAIL con sus receptores pro-apoptóticos, induce la oligomerización de éstos provocando el reclutamiento a nivel citoplasmático de la proteína adaptadora FADD, y ésta a su vez de las procaspasas iniciadoras 8 y 10 las cuales promueven el ensamblaje del complejo multimolecular denominado DISC (*Death Inducing Signalling Complex*).

FADD se une con su dominio DD (*Death Domain*) al dominio DD de los DRs dejando disponible el dominio DED (*Death Effector Domain*) a las procaspasas iniciadoras 8 y 10. El reclutamiento de la procaspasa 8 en el DISC induce su activación por auto-procesamiento y seguidamente es liberada al citosol. La caspasa 8 activa puede activar a su vez a caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, que se encargan de llevar a cabo el programa apoptótico de muerte.

Dependiendo del tipo celular, la activación de la apoptosis a través de la vía extrínseca requiere de la vía intrínseca. Si las células pueden concluir la apoptosis por activación de la vía extrínseca debido a la producción de elevados niveles de caspasa 8 que le permiten proteolizar y activar completamente a las caspasas ejecutoras, se denominan de tipo I. Por el contrario, las células de tipo II no generan una cantidad de caspasa 8 suficiente para activar completamente a las caspasas ejecutoras y necesitan de la amplificación de la señal apoptótica a través de la vía intrínseca mitocondrial. Esta conexión entre ambas vías es debida a la capacidad de procesamiento y activación de la proteína pro-apoptótica Bid por parte de la caspasa 8 activa. La forma procesada y activa de Bid se denomina tBid (Bid truncado) y es capaz de activar la vía mitocondrial a través de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, Bax y Bak y la salida al citosol del citocromo C.

Además, se ha descrito que TRAIL no sólo tiene funciones en la muerte celular, sino que también es capaz de inducir señales de supervivencia. En según qué tipos celulares, TRAIL es capaz de activar vías de supervivencia como la de NF-KB y la de las MAPK quinasas entre otra promoviendo distintas acciones celulares como proliferación, migración celular o inflamación.

TRAIL y regulación inmune

TRAIL tiene una notable importancia en la regulación de la respuesta inmune, de hecho, se expresa en una amplia variedad de células inmunes que varía según el estado de activación de estas células (Anel and Martinez-Lostao 2011, Martinez-Lostao, *et al* 2012). La expresión de TRAIL es baja en la superficie de PBLs humanos recién extraídos pero su expresión aumenta claramente durante el proceso de generación de blastos T (células T activadas) (Martínez-Lorenzo et al., 1998). Aunque los linfocitos T no activados expresan DR4 y DR5, son resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL. Sin embargo, tras su activación por IL-2 se vuelven susceptibles a TRAIL.

TRAIL está implicado en la muerte celular inducida por activación (*Activation Induced Cell Death*, AICD) de los linfocitos T (Martinez-Lorenzo, *et al* 1998), mecanismo implicado en la homeostasis de toda respuesta inmune normal. Es un proceso dependiente de la acción de los ligandos mortales, especialmente FasL pero también TRAIL juega un papel importante induciendo la muerte de los linfocitos T periféricos solo después de que éstos hubiesen sido sensibilizados en presencia de IL-2, sugiriendo así su función en la AICD.

En presencia de IL-2, la unión de TRAIL y FasL a sus correspondientes receptores induce la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados mediada por esta interleucina, en vez de la muerte celular (Bosque, *et al* 2005a). El efecto de TRAIL parece menos potente que el de FasL cuando se analizan las poblaciones de linfocitos T activados de manera conjunta. En cambio, si se analizan por separado (CD4+ y CD8+)

se observa como TRAIL inhibe el crecimiento de linfocitos T mediado por IL-2 preferentemente en la sub-población de CD8+, induciendo un arresto del ciclo celular en la fase G₂/M (Bosque, *et al* 2005b).

También se ha descrito *in vivo* que TRAIL juega un papel importante en la homeostasis de los linfocitos T CD8+. En condiciones normales, la expansión de linfocitos T CD8+ ocurre gracias a la ayuda de los linfocitos T CD4+ generándose una población de células T CD8+ memoria, que es capaz de llevar a cabo una segunda expansión clonal al ser re-estimuladas sin necesidad de la cooperación de los linfocitos T CD4+. Sin embargo, los linfocitos T CD8+ expandidos en ausencia de ayuda de los linfocitos T CD4+ son incapaces de llevar a cabo una segunda expansión clonal y los linfocitos T CD8+ de memoria así generados mueren tras su activación por un mecanismo dependiente de TRAIL.

MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LOS LIGANDOS MORTALES

Durante los estudios de la implicación de los ligandos mortales en la AICD se observó que la secreción de FasL y TRAIL que se encuentran preformados se produce tras la re-estimulación de blastos T a través de su TCR (Martinez-Lorenzo, *et al* 1996). Tanto FasL como TRAIL son liberados al medio como proteínas completas (sin proteolizar) y asociados a microvesículas de 100-200 nm de diámetro (Martinez-Lorenzo, *et al* 1999).

Estas microvesículas que reciben el nombre de exosomas, contienen los ligandos mortales insertados en su membrana correctamente orientados mostrando una mayor capacidad citotóxica que las formas proteolizadas de FasL y TRAIL lo que sugiere que la proteólisis actúa como un mecanismo de regulación negativa.

Los exosomas preformados están localizados en el citoplasma dentro de los denominados cuerpos multivesiculares con características lisosomales similares a las que se encuentran en las células presentadoras de antígenos (APC) (Monleon, *et al* 2001) y son liberados al medio extracelular tras la reactivación de los blastos T. Tal y como se ha dicho anteriormente, FasL y TRAIL están posicionados correctamente en la membrana de los exosomas al igual que ocurre en los exosomas que contienen MHC II de las células APC lo que indica que ambos tipos de exosomas tiene un proceso de formación similar.

Poco tiempo después de la re-estimulación, los cuerpos multivesiculares migran hacia la membrana plasmática de la célula con la cual se fusionan, liberando los exosomas de su interior intactos (Martinez-Lorenzo, *et al* 1999, Monleon, *et al* 2001). El mecanismo de secreción de los ligandos mortales unidos a microvesículas es más eficiente y rápido que las formas solubles por sí solas. Esto es debido a que las microvesículas contienen una menor movilidad que las formas solubles por lo que se mantiene la concentración local y de este modo se limita la acción de inducir la muerte

de manera autocrina y paracrina a las células vecinas durante la regulación de la respuesta inmune (Anel and Martinez-Lostao 2011, Martinez-Lostao, *et al* 2012)

Por otra parte, en el caso de FasL se ha descrito la existencia de distintas metaloproteasas capaces de procesar FasL expresado en la superficie de distintos tipos celulares generando una forma soluble de FasL. Sin embargo, el papel de esta forma soluble de FasL es controvertido. Mientras que en algunos casos se ha reportado que la forma soluble de FasL generada es citotóxica, en otros casos parece que esta forma soluble supone un mecanismo de regulación negativa de la capacidad pro-apoptótica de FasL asociado a membrana.

En lo referente a TRAIL y dadas las similitudes que muestra en distintos aspectos con FasL, se piensa que debe existir una metaloproteasa que pueda cortar a este ligando mortal expresado en la superficie celular sin embargo por el momento no se ha identificado dicha proteína. En este sentido, se ha descrito que tras el tratamiento con inhibidores de metaloproteasas no se produce un aumento de la forma soluble de TRAIL, lo que supone que a diferencia de FasL, TRAIL no se libera como una proteína soluble en condiciones fisiológicas.

EXOSOMAS Y VCP

Los exosomas son estructuras esféricas de entre 40 y 100 nm de diámetro. La composición lipídica parece ser común en todos ellos, enriquecidos en colesterol y esfingomielina. En cambio la composición, protéica (citoplasmática y de membrana) es variable y depende del tipo de célula de la que proceda y de la función que tenga. Se han descrito más de 70 proteínas asociadas a estas microvesículas, muchas de ellas comunes (en todos los exosomas), pero otras específicas de las células de procedencia (Stoorvogel, *et al* 2002). Se postula que la composición común a todas estas estructuras, tanto lipídica como protéica, podría actuar como señal de salida de la célula; y que las proteínas exclusivas de procedencia podría darles funciones específicas.

Los exosomas se encuentran almacenados dentro de un compartimento celular denominado cuerpo multivesicular (MVB) que difiere del resto de compartimentos, como pueden ser lisosomas y endosomas. El origen de este compartimento es endosomal y la incorporación de proteínas procede, bien de la región trans del aparato de Golgi o del citoplasma (Stoorvogel, *et al* 2002).

Son muchos los tipos celulares capaces de liberar estas microvesículas entre ellas células del sistema inmunitario y de hecho parecen jugar un importante papel en distintas funciones de este sistema como por ejemplo la comunicación celular durante la respuesta inmune. Se ha descrito la presencia de estos exosomas entre otras células del sistema inmunitario en linfocitos B, células dendríticas y linfocitos T. Como ya se ha dicho, los exosomas de éstos últimos son portadores de FasL y TRAIL en su superficie

están implicados en otra faceta del sistema inmunitario como es el proceso de la AICD de los linfocitos T (Martinez-Lorenzo, *et al* 1996).

VCP/p97 es una ATPasa de tipo II AAA que se caracteriza por presentar dos dominios ATPasa AAA conservados. Es una proteína ubicua, esencial y muy abundante en las células (representa el 1% de la proteína total celular). Se ha demostrado que juega un papel importante en: 1) degradación de proteínas de membrana y proteínas secretoras mal plegadas; 2) re-ensamblaje de la membrana del Aparato de Golgi; 3) transporte de membranas; 4) regulación del ensamblaje de miofibrillas; 5) división celular; 6) formación de agregados protéicos y, 7) maduración del autofagosoma. Se cree que el amplio rango de funciones deriva de la habilidad de desplegar proteínas o desensamblar complejos protéicos pero se desconoce el mecanismo concreto de acción de p97 (Wang, *et al* 2004).

En el análisis proteómico de los exosomas liberados tras la activación de las células Jurkat realizado por nuestro grupo, se observó un alto contenido de la proteína VCP/p97. Por el contrario, VCP/p97 no se encontró en el contenido proteico de los exosomas liberados tras la reactivación de los blastos T (datos no publicados).

Por otra parte, se ha desarrollado un inhibidor específico de VCP/p97 denominado DBeQ (Chou, *et al* 2011). Se ha visto que este inhibidor de VCP/p97 ejerce un efecto citotóxico diferencial sobre células tumorales, deduciendo la importancia de la proteína VCP/p97 en tumores y su uso como posible diana terapéutica antitumoral.

Dado el papel que desempeña VCP/p97 en el tráfico vesicular y la presencia de esta proteína en los exosomas de células Jurkat y no en los provenientes de los blastos T hace sospechar que podría estar interviniendo en la secreción de éstos en células tumorales pero no en las células normales.

MATERIAL Y MÉTODOS

CUTIVOS CELULARES

Líneas celulares

Para la realización de este estudio se ha empleado la línea celular tumoral humana Jurkat (leucemia aguda de células T) cultivándola en el medio de cultivo RPMI1640 (Gibco) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB), con L-glutamina 2mM y con los antibióticos penicilina (100U/mL) y estreptomina (100mg/mL) a una densidad de $2-3 \times 10^5$ células/mL en un incubador termostatzado (Heraeus Cell) a 37°C en aire saturado de humedad con un 5% de CO₂. Todas las manipulaciones celulares se realizaron en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar vertical (Telstar).

Para determinar la densidad y viabilidad celular se realizó la tinción con azul Trypan al 0.4% en NaCl 0.15M, colorante que tiñe el interior de las células muertas, las cuales han perdido su integridad de membrana. La viabilidad celular se evaluó considerando el porcentaje de células no teñidas (viables) respecto al número total de células. La densidad celular (DC) se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$DC \left(\frac{\text{cél}}{\text{mL}} \right) = \frac{n^{\circ} \text{células viables} \times \text{Factor de Dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{de cuadrantes contados}}$$

Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica (PBLs) y generación de blastos T

Se aislaron linfocitos humanos normales procedentes de sangre periférica (PBLs: *Peripheral Blood Lymphocytes*) de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad empleando Ficoll-Hypaque, que permite separar linfocitos del resto de células sanguíneas en una muestra de sangre total. Ésta se diluyó en proporción 1:1 en tampón PBS (tampón fosfato salino: NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄), se depositó suavemente sobre el reactivo Ficoll-Hypaque (*GH Healthcare*) en una proporción 2:1 (sangre diluida : Ficoll-Hypaque) y se centrifugó a 1200 rpm sin freno a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se recolectó la capa de PBLs y se lavaron con tampón PBS para eliminar plaquetas y restos de Ficoll-Hypaque y posteriormente las células se resuspendieron en RPMI 1640 con 10% de SFB de complementado (sometido a un baño de 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento). Finalmente se determinó la concentración y viabilidad mediante tinción con azul Trypan.

A partir de los PBLs se generaron linfocitos T activados (blastos T). Para ello, los PBLs se cultivaron a una densidad de 2×10^6 células/mL con 5µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) en RPMI 1640 completo al 10% de SFB de complementado durante 24 horas. Luego, se eliminó la PHA lavando las células con medio completo de complementado y las células se pusieron en cultivo a una densidad de 2×10^6

células/mL en medio completo de complementado (para evitar la muerte por la activación del sistema del complemento) al que se le añadieron 30 UI/mL de interleucina 2 (IL-2) humana recombinante durante los siguientes 6 días, cambiando el medio y añadiendo IL-2 cada 48 horas.

ESTUDIO DE LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE DBEQ SOBRE JURKAT, PBLs Y BLASTOS T

Para analizar el efecto citotóxico del inhibidor de la proteína VCP/p97 (DBeq), se realizó un ensayo de reducción del MTT. Este método relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul formazán, insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT). La cantidad de cristales formados es proporcional a la proliferación celular, lo que incluye tanto la inhibición del crecimiento como la muerte celular. Para poder distinguir entre ambos efectos se realizó de manera simultánea al ensayo con MTT, el conteo con azul Trypan.

Las células se cultivaron a una densidad de 5×10^5 cel/mL en el caso de la línea celular Jurkat y de 1×10^6 cél/ml en el caso de los PBLs y de los blastos T en placa de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen de 100 µl/pocillo y al menos 4 pocillos por punto experimental, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de DBeq (3, 4, 5 y 6 µM) y se incubaron en un incubador termostatzado a 37°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se añadió a cada pocillo 10 µl de una disolución de MTT (5 mg/ml). Las células se incubaron 3 horas a 37°C en el caso de la línea celular Jurkat o durante toda la noche en el caso de los PBLs y los blastos T. Transcurrido este tiempo los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100 µl de isopropanol y agitando en una placa vibradora. Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas (MR5000, Dynatech) frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares). Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de DBeq frente al control, constituido por los cultivos sin DBeq pero con DMSO (disolvente del DBeq).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL EN SUPERFICIE Y TOTAL

Se analizó mediante citometría de flujo empleando un citómetro *FACScan* (Becton & Dickinson) la expresión de TRAIL, tanto en la superficie como en el total de la célula tras cultivarlas con PHA a distintos tiempos en la línea celular Jurkat y en los blastos T generados. La PHA se eliminó transcurrido los distintos tiempos de estimulación lavando las células 3 veces con PBS y se esperó una hora (+1h) después de ello para analizar la expresión de TRAIL. El análisis de los datos obtenidos se realizó empleando el software *Weasel v3.0.1* (Walter and Eliza Hall Institute).

Los anticuerpos empleados fueron:

ANTICUERPOS	CARACTERÍSTICAS (tipo, especie, fluorocromo)	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	CASA COMERCIAL
RIK2 (anti-TRAIL)	Mc, ratón, PE	0,06	BD Pharmingen
IgG (isotipo)	Mc, ratón, PE	0.06	BD Pharmingen

Mc: Monoclonal

Expresión de TRAIL en superficie mediante citometría de flujo

Se sembraron 100 µl de células a una concentración de 5×10^5 cel/mL (optimizado a 1×10^6 cel/mL en el caso de los PBLs) por cada punto experimental en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células se lavaron con 100 µl de PBS al 5% de SFB y se les añadió 100 µl de PBS al 5% de SFB más los anticuerpos necesarios en cada caso. Posteriormente, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, tras lo cual se lavaron con 100 µl de PBS con 5% de SFB y se fijaron en 100 µl de PBS con 1% de paraformaldehído para analizar mediante citometría de flujo.

Expresión de TRAIL intracelular mediante citometría de flujo

Para analizar la expresión intracelular de TRAIL, es necesario permeabilizar las células con una solución de permeabilización que contiene saponina al 0,1% en PBS con 5% de SFB. Por ello, se sembraron 100 µl de células en suspensión a una concentración de 5×10^5 cel/mL (optimizado a 1×10^6 cel/mL en el caso de los PBLs) por cada punto experimental sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos. Para permeabilizar, se incubaron con 100 µl de solución de permeabilización durante 10 minutos. Luego se añadieron 100 µl de esta solución con RIK-PE o con IgG-PE durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se lavaron las células 2 veces con 100 µl de solución de permeabilización y se fijaron en 100 µl de PBS al 1% en paraformaldehído para realizar el análisis por citometría de flujo. El procedimiento para el marcaje de las células es idéntico tanto para las Jurkat como para los blastos T.

En las gráficas de resultados se muestra la intensidad media de fluorescencia específica para cada punto experimental obtenida tras restar a la intensidad media del marcaje específico con el anticuerpo anti-TRAIL, la intensidad media del control de isotipo.

El análisis de la expresión de TRAIL (en superficie y total) en células Jurkat se realizó también tras haber pre-tratado éstas con 3µM de DBEq durante toda la noche. Antes de realizar el análisis de la expresión de TRAIL se recolectaron las células mediante centrifugación para eliminar el DBEq y se procedió a realizar dicho análisis mediante citometría de flujo tal y como se ha descrito anteriormente.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL MEDIANTE WESTERN-BLOT

También se analizó la expresión total de TRAIL a lo largo del proceso de activación de los PBLs mediante *Western-blot*. Para ello se recolectaron 2×10^6 PBLs a distintos tiempos durante el proceso de activación (día 0 -sin activar-, día 1, día 4, día 6 y día 8), se lavaron con PBS y se les añadió 30 μ l de tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% (v/v), Tris-HCl 50mM pH 7,6, EDTA 1mM, ortovanadato sodico 1mM, pirofosfato sódico 10mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1mM, fluoruro de sodio 10mM, leupeptina 1mM, cloruro de sodio 150mM y glicerol al 10% (v/v)). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se centrifugaron 5 minutos a 14000 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante al que se le añadió 30 μ l de un tampón de carga 3x (Tris -HCl 150mM pH 7,4, SDS al 3%, molibdato de sodio 0,3mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro de sodio 30mM, glicerol al 30% (v/v), β -mercaptoetanol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,06% (p/v)). Por último, los lisados celulares se calentaron a 100 °C en un bloque seco durante 5 minutos y se centrifugaron 15 segundos a 1500 rpm .

Las proteínas del lisado celular obtenido se separaron en función de su peso molecular en gel de poliacrilamida al 12% con SDS desnaturalizante. La composición del gel de concentración fue: acrilamida/bis al 5%, Tris-HCl 125mM pH 6,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico al 0,1%, TEMED al 0,01%. La composición del gel de resolución fue: acrilamida/bis 10% o 15% Tris-HCl 370mM pH 8,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico 0,1%, TEMED al 0,01%. La composición del tampón de carrera fue: Tris base 25mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%. Las condiciones de la carrera electroforética fueron: 180 V y 20 mA durante 90 minutos.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de polivinilo difluorido (PVDF, *Hybond C-extra*, *Amersham*) utilizando un tampón de transferencia compuesto por: Tris-HCl 48mM pH 8,3, glicina 3mM, SDS al 0,037% y metanol al 20%. La transferencia se llevó a cabo en un equipo de transferencia semi-seca (*Hoefler*) a 20 V y 400 mA, durante 55 minutos. Posteriormente la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS, se lavo 3 veces durante 5 minutos con Tampón B (NaCl 0,12M, tris/HCl 10mM pH 8,0, Tween 20 al 0,1% (p/v) en PBS pH 7,4) y se incubó con el anticuerpo primario específico que reconoce TRAIL (anticuerpo policlonal de conejo previamente generado en nuestro laboratorio) diluido en tampón B con leche desnatada en polvo al 2% durante 12 horas. Luego, la membrana se lavó con tampón B 3 veces y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (*Sigma*) diluido en tampón B con leche desnatada en polvo al 2% durante 1 hora. Posteriormente, se retiró el anticuerpo secundario, se lavó la membrana con tampón B 3 veces y se añadió el sustrato correspondiente.

La detección de los inmunocomplejos empleando el kit de quimioluminiscencia ECL (*GE Healthcare*). Por último, se llevó a cabo un control de carga mediante el revelado de actina tal y como se ha indicado anteriormente.

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Citotoxicidad de los blastos T y las células Jurkat sobre células diana

Para analizar la capacidad citotóxica de los blastos T y las células Jurkat (células efectoras), se realizaron co-cultivos con la línea tumoral Jurkat (células diana). Para ello, las células efectoras necesarias a una concentración de $1-2 \times 10^6$ c/mL fueron re-estimuladas con 10 ng/mL de PMA (Phorbol 12-myristato 13-acetato) y con 600 nM de ionomicina (ionóforo de calcio) durante 2 horas a 37°C. La PMA y la ionomicina inducen la activación de la PKC y la consiguiente producción de citoquinas. También se dejaron células efectoras sin re-estimar que se usaron como control negativo.

Previamente a realizar el ensayo de citotoxicidad, las células efectoras se marcaron con la sonda fluorescente *Cell Tracker Green* (CTG, 5-chloromethylfluorescein diacetate, Invitrogen) para luego poder diferenciarlas de las células diana (CTG negativas). Para ello, se centrifugaron las células efectoras durante 5 minutos a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en PBS (volumen necesario para dejar una densidad de 4×10^6 cel/mL) que contenía CTG 0,1 mM por cada 2×10^6 células. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C y seguidamente se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio completo de complementación y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se centrifugaron las células durante 15 segundos a 10.000 rpm y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio completo de complementación para que su concentración fuera de 5×10^6 cel/mL.

Para realizar el ensayo de citotoxicidad, se empleó una placa de 96 pocillos de fondo redondo. En cada uno de los pocillos se co-cultivaron las células efectoras y las células diana en las proporciones de 5 células efectoras : 1 células diana (Jurkat) o de 10 células efectoras : 1 células diana (Jurkat).

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en ausencia o en presencia de EGTA como inhibidor de la degranulación (sistema de exocitosis granular) y de la secreción de ligandos mortales (FasL y TRAIL) asociados a exosomas para analizar la muerte debida exclusivamente a ligandos mortales de superficie. En este caso, el medio se complementó con $MgCl_2$, para que actúe como sustituto del ion calcio y así amortiguar los fenómenos de ósmosis.

La incubación se realizó en un incubador termostatzado a 37°C durante 4 horas, tras lo cual se procedió al análisis de los parámetros de muerte celular de las células diana (CTG negativas) mediante citometría de flujo. En todos los ensayos se dispuso un pocillo con células Jurkat solas y otro pocillo con células Jurkat más EGTA y $MgCl_2$ para determinar la muerte basal de las células diana durante el ensayo.

Esta muerte basal se restó a la muerte de las células diana (células CTG negativas) en los distintos ensayos de citotoxicidad para obtener la muerte celular específica (Figura 1).

Citotoxicidad de los sobrenadantes de las células efectoras (blastos T y células Jurkat)

Por otra parte, se recogieron los sobrenadantes procedentes de las células efectoras (blastos T y células Jurkat) re-estimuladas con PMA e ionomicina y de los no re-estimulados y se analizó su capacidad citotóxica frente a la línea tumoral Jurkat.

Para ver el papel que juega TRAIL se pre-incubó parte del sobrenadante activado con el anticuerpo anti-TRAIL (anticuerpo bloqueante anti-TRAIL, BD, clon RIK2) a una concentración de 1 µg/mL y se incubaron durante 1 hora en un incubador termostatzado a 37°C. Se centrifugaron las células Jurkat durante 5 minutos a 1500 rpm, se resuspendieron en el volumen adecuado de medio completo para que su concentración fuera de 5×10^5 cel/mL y se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 100 µl de suspensión de células Jurkat por pocillo. Seguidamente se centrifugó la placa durante 2 minutos a 3500 rpm, se descartó el medio y se añadió 100 µl por pocillo de los sobrenadantes procedentes de las células efectoras re-estimuladas (con o sin el anticuerpo bloqueante) y de las células efectoras sin re-estimular. La placa se incubó en un incubador termostatzado a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se procedió al análisis de los parámetros de muerte celular mediante citometría de flujo. Además, se dispuso un pocillo con células Jurkat con medio completo para determinar la muerte basal de estas células durante cada ensayo.

Los ensayos de citotoxicidad empleando tanto las células efectoras como los sobrenadantes provenientes de éstas, se realizaron también tras haber pre-tratado las células efectoras (blastos T y células Jurkat) con 3µM de DBEq durante toda la noche. Antes de realizar ensayos de citotoxicidad se recolectaron las células efectoras mediante centrifugación para eliminar el DBEq y se procedió a realizar dichos ensayos tal y como se ha descrito.

Ensayo temporal de la citotoxicidad de los sobrenadantes de las células Jurkat

También se realizó un experimento para observar la toxicidad de los sobrenadantes obtenidos tras la estimulación de las células Jurkat a diferentes tiempos. Se tomó 1×10^6 cel/mL por cada tiempo a analizar. Para ello, se tomó una cantidad de medio de cultivo, de forma que para cada tiempo de análisis y se les añadió PHA a una concentración de 50 µg/mL durante 5 minutos. Seguidamente se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 10 minutos, se eliminó el medio con PHA

y las células se resuspendieron en el mismo volumen inicial de medio de cultivo fresco. A los tiempos indicados se recolectaron la cantidad de la suspensión celular necesaria para obtener su sobrenadante. Para ello, la suspensión celular se centrifugó, se recolectó el sobrenadante, y a éste se le añadió 5×10^5 células Jurkat como células diana que se incubaron a 37°C durante 16 horas.

Pasado ese tiempo, se analizó el efecto citotóxico de los sobrenadantes obtenidos a los distintos tiempos mediante un ensayo de reducción del MTT y determinación de la permeabilidad de la membrana celular mediante el marcaje con 7-AAD (*7-amino-actinomycin D*, ver siguiente apartado).

Este ensayo de citotoxicidad empleando los sobrenadantes provenientes de células Jurkat, se realizaron también tras haberlas pre-tratado con 3µM de DBEQ durante toda la noche.

Análisis de la muerte celular. Citometría de Flujo:

En el estudio de la muerte celular mediante citometría de flujo se llevó a cabo analizando o bien la translocación de la fosfatidilserina mediante el marcaje con Anexina V o el incremento en la permeabilidad de la membrana celular (marcaje con 7-AAD).

La fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. En etapas tempranas de la apoptosis se produce su translocación a la cara externa, de forma que queda accesible a proteínas que se unen específicamente a ella, como es la anexina V.

La determinación de la permeabilidad de la membrana celular se realiza a través del marcaje con 7-AAD. Se trata de un colorante que se une al DNA intercalándose en la doble cadena mostrando auto-fluorescencia. En etapas tardías de la apoptosis, la membrana plasmática está permeabilizada de forma que el 7-AAD puede penetrar en las mismas. El 7-AAD también se une al DNA de células necróticas, no solo apoptóticas, ya que la membrana también está permeabilizada en dicha situación.

Para realizar el marcaje se centrifugaron las placas en las cuales se hicieron los ensayos de citotoxicidad durante 2 minutos a 3500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 µl de tampón ABB (*Annexin Binding Buffer*) y 2 µl de anexina V o bien 100 µl de PBS y 1,5 µl de 7-AAD. Las células se incubaron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se trasvasaron a un tubo de citometría que contenía 200 µl de tampón. Las muestras se analizaron empleando un citómetro *FACScan* y el análisis de los resultados se realizó mediante el software *Weasel v3.0.1*.

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE TRAIL EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Expresión de TRAIL durante la activación de los linfocitos

En primer lugar se analizó la variación de la expresión de TRAIL durante el proceso de activación de los PBLs (Figura 2 A). Se puede observar que la expresión de TRAIL en los PBLs recién aislados (día 0) es baja y que es a expensas principalmente de TRAIL intracelular. También se puede observar que los niveles de este ligando aumentan rápidamente ya al día 1 de activación tanto en superficie y fundamentalmente a nivel intracelular, manteniéndose más o menos estables hasta el día 6, y descendiendo, sobre todo intracelularmente, el día 8. Los resultados observados en el análisis mediante citometría de flujo se correlacionan con los observados en la expresión total de TRAIL obtenido en el análisis mediante *Western-blot*.

A la vista de estos resultados, para la realización de los ensayos posteriores, se tomaron los blastos T tras 6 días de estimulación, ya que al menos necesitan ese tiempo para su completa activación y la expresión de TRAIL se mantiene todavía elevada.

Expresión de TRAIL durante la activación de los linfocitos tras pulsos de reactivación

Los PBLs obtenidos a partir de sangre periférica fueron re-estimulados en cada uno de los días indicados de su proceso de diferenciación mediante la adición de PHA (50 µg/mL) durante 5 minutos y 1 hora, para analizar cómo varía la expresión de TRAIL ante un re-estímulo durante la diferenciación (Figura 2 B). A pesar de la variabilidad obtenida en las dos muestra analizadas, se observa que conforme avanza la diferenciación, la capacidad de producción de TRAIL tras un re-estímulo es mayor (expresión total de TRAIL). También se puede observar que la capacidad de secreción de TRAIL (expresión en superficie de TRAIL) tras un re-estímulo varía a lo largo de la diferenciación de los PBLs. Mientras que hasta el día 4 es el re-estímulo de 5 minutos el que induce un aumento del TRAIL en superficie, a día 8 la expresión en superficie de TRAIL aumenta sobre todo con el re-estímulo de 1 hora.

ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL DBEQ EN CÉLULAS HEMATOLÓGICAS

Para analizar la acción citotóxica del DBeq sobre los PBLs, blastos T y células Jurkat se realizó el ensayo del MTT utilizando el DMSO como control negativo pues es el disolvente en el que se encuentra el DBeq (Figura 3 A). Se observa que la viabilidad de los PBLs y blastos T apenas se ve afectada a ninguna de las concentraciones

empleadas. En cambio en las células Jurkat se observa que ya a la concentración más baja empleada (3 μ M), el DBEq ya tiene un importante efecto citotóxico llegando a una reducción en la viabilidad celular en torno al 40% con la dosis de 6 μ M. Este descenso de la viabilidad celular se debe efectivamente a una inducción de la muerte celular a la vista de los datos obtenidos mediante tinción con azul *Trypan* (Figura 3 B), observándose que la muerte a la mayor dosis de DBEq para PBLs y blastos T se halla en un valor alrededor al 15% mientras que para las Jurkat es de un 66%.

EXPRESIÓN DE TRAIL EN CÉLULAS JURKAT

Posteriormente, se analizó la expresión de TRAIL en células Jurkat no pre-tratadas y tratadas durante 16 horas con DBEq 3 μ M. Tras retirar el DBEq y lavar las células se analizó la expresión de TRAIL tras ser re-estimuladas con PHA durante 5 minutos, 1 y 7 horas (Figura 4).

Los resultados obtenidos indican un claro aumento en los niveles de TRAIL intracelular cuando las células fueron pre-tratadas con DBEq, llegando a observarse valores de más del doble de fluorescencia media específica respecto las células no pre-tratadas. En relación a la expresión en superficie de TRAIL, la variación experimentada no presentaba diferencias importantes, siguiendo un patrón similar en ambos casos.

CITOTOXICIDAD DE LAS CÉLULAS EFECTORAS

Se analizó también la capacidad citotóxica de las células efectoras (blastos T y células Jurkat) re-estimulados con PMA e ionomicina frente a células diana (células Jurkat) inhibiendo y sin inhibir los mecanismos de exocitosis granular y secreción de ligandos mortales asociados a exosomas tras haber sido pre-tratadas o no con DBEq.

Citotoxicidad de los blastos T

Cuando se emplean los blastos T como células efectoras, si no son reactivadas su capacidad citotóxica es baja (3,6 % a una proporción 5:1 y 7,6% a 10:1), aumentando si son reactivadas (29,4% a 5:1 y 25,9% a 10:1). La inhibición del sistema de exocitosis granular y exosomas, la citotoxicidad disminuye drásticamente tanto en los blastos T no reactivados (0,4%, para la proporción 5:1 y 0% a 10:1) como en los reactivados. (6,3% a 5:1 y del 0% a 10:1) (Figura 5).

En lo referente al pre-tratamiento con DBEq, no se observan diferencias significativas entre los blastos T pre-tratados y los no pre-tratados (Figura 6).

Citotoxicidad de las células Jurkat

Cuando se emplean las células Jurkat como efectoras, su comportamiento es similar al de los blastos T. Si no se reactivan su capacidad citotóxica es escasa (1,7% a

5:1 y 0% a 10:1) aumentando tras la reactivación (22,1% a 5:1 y 21,5% a 10:1) (Figura 7).

De nuevo, la inhibición del sistema de exocitosis granular y exosomas, hace disminuir en gran medida la citotoxicidad siendo del 0% (5:1) y 2,4% (10:1) para las células no reactivadas y del 4,7% (5:1) y del 8.2% (10:1) en las células reactivadas.

Los resultados obtenidos en las células Jurkat pre-tratadas con DBEq, son muy similares a los de las Jurkat no pre-tratadas, del mismo modo que lo visto previamente para los blastos T (Figura 8).

CITOTOXICIDAD DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS EFECTORAS

Además, los sobrenadantes derivados de la re-estimulación de las células efectoras (blastos T y células Jurkat) fueron recolectados y se enfrentaron ante la misma línea celular (Jurkat) para evaluar también su capacidad citotóxica.

Para conocer la citotoxicidad específica de los sobrenadantes, al porcentaje de células 7-AAD positivas de cada sobrenadante (no reactivado, reactivado y pre-incubado con el anticuerpo bloqueante de TRAIL) se le resta la muerte basal de las células control. Tomando la muerte específica inducida por el sobrenadante activado como el 100%, se puede calcular con el sobrenadante pre-incubado con el anticuerpo bloqueante de TRAIL cuál es la citotoxicidad correspondiente a este ligando mortal.

Citotoxicidad de los sobrenadantes obtenidos de los blastos T

Evaluando la citotoxicidad de los sobrenadantes procedentes de los blastos T, se observa que los procedentes de los blastos T no reactivados apenas presentan muerte celular tanto en presencia como ausencia de pre-tratamiento con DBEq. Por otra parte, cuándo estos son reactivados aumenta su capacidad citotóxica, de la que un 19,1% se debe a TRAIL en el caso de las células no pre-tratadas con DBEq, mientras que este valor es del 25% para las células pre-tratadas con DBEq (Figura 9 A).

Citotoxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las células Jurkat

A diferencia de los PBLs, el sobrenadante proveniente de las Jurkat si que tiene efecto citotóxico a pesar de no haber sido reactivado (Figura 9 B). Además el pre-tratamiento con DBEq desciende la capacidad citotóxica de los sobrenadantes (provenientes de células no reactivadas y reactivadas).

En cuanto a la muerte específica por TRAIL es del 53,37% y del 39,8% para las células sin pre-tratamiento y pre-tratadas con DBEq respectivamente.

CITOTOXICIDAD TEMPORAL DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CÉLULAS JURKAT

Por último se realizó un ensayo de citotoxicidad con los sobrenadantes obtenidos a distintos tiempos provenientes de células Jurkat reactivadas con 50 µg/mL de PHA durante 5 minutos habiendo sido estas células pre-tratadas o no con DBEq (Figura 10).

Como se puede observar la capacidad citotóxica del sobrenadante proveniente de las células Jurkat pre-tratadas con DBEq a los 3 tiempos (20, 40 y 60 minutos) es menor (97,2%, 95,1% y 46,4% respectivamente) que la del sobrenadante proveniente de las células no pre-tratadas (88,0%, 87,7% y 40,4% respectivamente).

DISCUSIÓN

En primer lugar, se analizó la expresión en superficie e intracelular del ligando mortal TRAIL en linfocitos de sangre periférica humana (PBLs) durante su proceso de diferenciación a linfocitos T activados (blastos T). Para ello, se llevó a cabo el proceso de activación de estas células (PHA + IL-2) observándose que los niveles de este ligando en los PBLs recién aislados (día 0) es baja y que aumentaban, fundamentalmente a nivel intracelular, y en menor medida en superficie. Este hecho, está relacionado con que los PBLs desde un estado *naïve* hasta su completa diferenciación a blastos T aumentan la expresión de sus mecanismos citotóxicos entre ellos la expresión de los ligandos mortales, como TRAIL.

Asimismo, se analizó cómo responden los linfocitos T durante este proceso de activación a un re-estímulo (PHA 5 µg/mL) y cómo afectaba esta re-estimulación en la expresión de TRAIL. Conforme los PBLs se van diferenciando, la capacidad de producción de TRAIL tras un re-estímulo es mayor pudiéndose observar que la capacidad de secreción de TRAIL tras un re-estímulo es más rápida en los primeros estadios de diferenciación y más mantenida al final de ésta. Estas diferencias podrían reflejar la diferente función de TRAIL en la diferenciación de los PBLs. Mientras que en los primeros estadios de la diferenciación, la rápida secreción de TRAIL (tras 5 minutos) podría tener más una función de regulación de los PBLs que se están diferenciando, la secreción más tardía de TRAIL (1 hora) en las fases finales de la diferenciación, parecería estar más implicada en el empleo de este ligando como uno de sus mecanismos efectores necesarios para ejercer su función citotóxica.

En un análisis proteómico previo realizado por nuestro grupo de los exosomas liberados por linfocitos T normales activados y células tumorales Jurkat se encontró una expresión diferencial de la proteína VCP/p97 presente en los exosomas de las células Jurkat pero no en los de linfocitos T normales activados. Existe un inhibidor específico de esta proteína VCP/p97 descrito como citotóxico en células tumorales denominado DBEQ (Chou et al., 2011). Antes de emplear el DBEQ para estudiar la implicación de la proteína VCP/p97 en el tráfico de los exosomas cargados con los ligandos mortales se quiso comprobar su capacidad citotóxica en células tumorales. Para ello, se evaluó la viabilidad de los tres tipos de células (PBLs, blastos T y Jurkat) frente a dicho compuesto DBEQ, mediante ensayos dosis-respuesta observándose que mientras apenas resultaba citotóxico para los PBLs y los blastos T sí que resultaba claramente citotóxico para la línea tumoral leucémica Jurkat.

Posteriormente se analizó la expresión TRAIL en la línea celular Jurkat, tras la re-estimulación con PHA a distintos tiempos y cómo el inhibidor de VCP/p97, DBEQ puede afectar a ésta. Los resultados revelan que las células Jurkat, a diferencia de los PBLs, no necesitan el proceso de activación para expresar un alto nivel basal de TRAIL (intracelular) tras reactivación. Y es que, al ser una línea celular tumoral, estas células

se comportan como linfocitos ya activados y por ello no necesitan de dicha re-estimulación. En relación al pre-tratamiento con DBEq, se observa que al inhibir la proteína VCP/p97, el tráfico vesicular está inhibido, por lo que el ligando TRAIL no puede ser secretado y se acumula intracelularmente.

Estos datos sugieren que la inhibición de la proteína VCP/p97 está afectando al tráfico de los exosomas cargado con los ligandos mortales en las células Jurkat. Por ello, se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando como células efectoras blastos T y células Jurkat, y usando también los sobrenadantes provenientes de estas células efectoras. Como células diana se emplearon las células Jurkat.

En los ensayos de citotoxicidad empleando las células efectoras, éstas fueron pre-tratadas y sin pre-tratar con DBEq, tras lo cual se reactivaron (PMA + Ionomicina) y en presencia o ausencia de su sistema de exocitosis granular (EGTA + $MgCl_2$).

Los resultados obtenidos indican la reactivación es necesaria para que las células efectoras (blastos T y células Jurkat) adquieran su mayor capacidad citotóxica y que el principal mecanismo de acción de éstas es la exocitosis granular (sistema de perforina-granzima) ya que cuando se inhibe dicha exocitosis, la muerte de las células diana no aumenta prácticamente respecto al nivel basal. Estos datos también indican que los ligandos mortales (FasL y TRAIL) de superficie apenas intervienen en la actividad citotóxica ejercida directamente por las células efectoras (blastos T y células Jurkat) puesto que estos ligandos han sido secretados previamente al exterior asociados a exosomas.

Finalmente los datos también indican que el pre-tratamiento con DBEq no afecta a la capacidad citotóxica de los blastos T y las células Jurkat lo que sugiere que la inhibición de la proteína VCP/p97 no parece afectar a la exocitosis granular.

Respecto al análisis de la capacidad citotóxica de los sobrenadantes de las células efectoras, los resultados obtenidos indican que mientras que los blastos T necesitan de una reactivación para secretar los exosomas cargados con ligandos mortales y que éstos ejerzan su acción citotóxica, las células Jurkat parecen secretar de manera basal exosomas con ligandos mortales puesto que el sobrenadante proveniente de células Jurkat sin reactivar ya presenta una cierta capacidad citotóxica. Esta capacidad se ve incrementada cuando las células Jurkat son reactivadas. Los datos obtenidos empleando el anticuerpo bloqueante de TRAIL, indican que tanto en el caso de sobrenadantes provenientes de los blastos T como el proveniente de las células Jurkat su acción citotóxica es en parte debida a la acción de TRAIL.

En cuanto a la acción de DBEq sobre la capacidad citotóxica de los sobrenadantes, el pre-tratamiento con este inhibidor no produjo cambios en la capacidad citotóxica de los sobrenadantes de los blastos T, lo que está en consonancia con la ausencia de VCP/p97 en los exosomas provenientes de éstos. Sin embargo, sí que se observa un efecto de DBEq en la capacidad citotóxica de los sobrenadantes

provenientes de las células Jurkat, pues en presencia de este compuesto, se observa como los valores de muerte disminuyen considerablemente tanto en los sobrenadantes de las células no reactivadas como en las re-activadas.

Por otra parte, en el ensayo temporal de citotoxicidad se observó que la capacidad citotóxica del sobrenadante proveniente de las células Jurkat era menor a lo largo de tiempo cuando éstas fueron pre-tratadas con DBEq sugiriendo que la secreción de los exosomas se encuentra disminuida. En el sobrenadante obtenido tras 60 minutos después de la re-activación con PHA, la capacidad citotóxica del sobrenadantes es bastante más pronunciada que en los tiempos anteriores y similar en ambos casos lo que sugiere que la acción de DBEq es reversible.

Todos estos datos sugieren que la proteína VCP/p97 presente en los exosomas de las células Jurkat parece estar implicada en la secreción de los mismos.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos las conclusiones de este trabajo son:

1. La expresión de TRAIL en los PBLs aumenta conforme se avanza en su proceso de activación siendo este aumento fundamentalmente a nivel intracelular.
2. La acción citotóxica de los blastos T y de la línea celular Jurkat se debe esencialmente al mecanismo de exocitosis granular.
3. La principal contribución de los ligandos mortales a la citotoxicidad de los blastos T y la línea celular Jurkat es debida a su secreción asociada a exosomas, siendo poco relevante la aportación de los ligandos mortales expresados en superficie.
4. El inhibidor de VCP, DBE-Q es más tóxico sobre la línea celular tumoral Jurkat que sobre los PBLs y blastos T.
5. El inhibidor de la proteína VCP/p97 DBE-Q evita la secreción de TRAIL en células Jurkat provocando su acumulación a nivel intracelular.
6. El inhibidor de la proteína VCP/p97 DBE-Q disminuye la capacidad citotóxica de los sobrenadantes con exosomas conteniendo ligandos mortales provenientes de células Jurkat pero no en los provenientes de blastos T.

CONCLUSIONS

In view of the results, the conclusions of this work are:

1. TRAIL expression in PBLs increases during their process of activation being this increase mainly intracellular.
2. Cytotoxic ability of T blasts and Jurkat cells is mainly produced by granular exocytosis.
3. The main contribution of death ligands to cytotoxicity of T blasts and Jurkat cells is in association with exosomes while their contribution when are expressed on cell surface is not relevant.
4. The VCP/p97 inhibitor, DBE-Q is more cytotoxic in Jurkat cells than in PBLs and T blasts.
5. The VCP/p97 inhibitor, DBE-Q prevents TRAIL secretion in Jurkat cells, causing its intracellular storage.
6. The VCP/p97 inhibitor, DBE-Q decreases the cytotoxicity of supernatants from Jurkat cells (containing exosomes), but not the cytotoxicity of supernatants from T blasts.

REFERENCIAS

- Anel, A. & Martinez-Lostao, L. (2011) APO2L/TRAIL: new insights in the treatment of autoimmune disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 5, 184-199.
- Bosque, A., Pardo, J., Martinez-Lorenzo, M.J., Iturralde, M., Marzo, I., Pineiro, A., Alava, M.A., Naval, J. & Anel, A. (2005a) Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c- FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *J Leukoc Biol*, 77, 568-578.
- Bosque, A., Pardo, J., Martinez-Lorenzo, M.J., Lasierra, P., Larrad, L., Marzo, I., Naval, J. & Anel, A. (2005b) Human CD8+ T cell blasts are more sensitive than CD4+ T cell blasts to regulation by APO2L/TRAIL. *Eur J Immunol*, 35, 1812-1821.
- Chou, T.F., Brown, S.J., Minond, D., Nordin, B.E., Li, K., Jones, A.C., Chase, P., Porubsky, P.R., Stoltz, B.M., Schoenen, F.J., Patricelli, M.P., Hodder, P., Rosen, H. & Deshaies, R.J. (2011) Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 4834-4839.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Alava, M.A., Anel, A., Pineiro, A. & Naval, J. (1996) Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells. *Immunology*, 89, 511-517.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Alava, M.A., Gamen, S., Kim, K.J., Chuntharapai, A., Pineiro, A., Naval, J. & Anel, A. (1998) Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol*, 28, 2714-2725.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Gamen, S., Monleon, I., Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Alava, M.A. & Naval, J. (1999) Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol*, 163, 1274-1281.
- Martinez-Lostao, L., Marzo, I., Anel, A. & Naval, J. (2012) Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol*, 83, 1475-1483.
- Monleon, I., Martinez-Lorenzo, M.J., Monteagudo, L., Lasierra, P., Taules, M., Iturralde, M., Pineiro, A., Larrad, L., Alava, M.A., Naval, J. & Anel, A. (2001) Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol*, 167, 6736-6744.
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J. & Raposo, G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3, 321-330.
- Wang, Q., Song, C. & Li, C.C. (2004) Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol*, 146, 44-57.