

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Trabajo Fin de Máster:

**Mecanismos de muerte celular mediada por
células citotóxicas (Tc y NK) implicados en la
protección frente al desarrollo tumoral *in vivo*.**

Presentado por:
Paula Jaime Sánchez
Director:
Julián Pardo Jimeno



D. JULIAN PARDO JIMENO, Doctor en Ciencias Químicas e Investigador Aragón I+D en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y Profesor Asociado del Departamento de Microbiología, Salud Pública y Medicina Preventiva de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster “MECANISMOS DE MUERTE CELULAR MEDIADA POR CÉLULAS CITOTÓXICAS (Tc y NK) IMPLICADOS EN LA PROTECCIÓN FRENTE AL DESARROLLO TUMORAL *IN VIVO*”, ha sido realizado por la Licenciada en Bioquímica PAULA JAIME el en Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Título de Máster en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Septiembre de 2013

Fdo.: D. Julián Pardo Jimeno

ABREVIATURAS

APC: célula presentadora de antígeno.

BSA: albúmina sérica bovina.

CTG: cell tracker Green (sonda fluorescente verde).

DISC: complejo de señalización inductor de muerte.

DC: célula dendrítica.

D89E: Forma mutada de la proteína MFG-E8.

EFG: factor de crecimiento epitelial.

FADD: dominio mortal ligado a Fas.

FasL: ligando de Fas.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

Gp33: péptido inmunodominante de LCMV.

GZMS: granzimas.

INF: interferón.

I.P: intraperitoneal.

IL: interleuquina.

ITAM: inmunorreceptor con motivos de acción basados en tirosina.

KO: knock out.

LCMV: virus de la linfocoriomeningitis murina.

Linfocito Tc: linfocito T citotóxico.

Linfocitos Th: linfocitos T cooperador.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

mRFP: proteína fluorescente roja monomérica.

NK: asesina natural.

PBS: suero fisiológico.

PE: ficoeritina.

PEI: polietilenimina.

PERF: perforina.

PS: Fosfatidilserina.

S.C: subcutáneo.

SFB: suero fetal bovino.

TCR: receptor de células T.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

WT: fenotipo salvaje.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. SISTEMA INMUNE E INMUNIDAD ANTITUMORAL.....	1
1.2. CÉLULAS CITOTÓXICAS DEL SISTEMA INMUNE.....	1
1.2.1. CÉLULAS NK.....	2
1.2.2. LINFOCITOS T.....	2
1.3. MECANISMOS CITOTÓXICOS DE LAS CÉLULAS NK Y CÉLULAS T _c	6
1.3.1. MUERTE CELULAR. APOPTOSIS.....	6
1.3.1.1. La vía intrínseca o ruta mitocondrial.....	7
1.3.1.2. Fagocitosis de las células apoptóticas	8
1.3.2. MECANISMOS EFECTORES DE LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS...	9
1.3.2.1. Receptores mortales.....	9
1.3.2.2. Exocitosis granular.....	10
1.4. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER.....	14
1.4.1. Muerte inmunogénica y su aplicación en la inmunoterapia.....	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Cultivos celulares	18
3.1.1. Líneas celulares.....	18
3.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	18
3.1.3. Congelación y descongelación de células.....	19
3.1.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular.....	19
3.1.5. Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR.....	20
3.2. Experimentación animal	21
3.2.1. Animales.....	21
3.2.2. Generación <i>in vivo</i> de linfocitos T _c específicos del virus LCMV-WE...	21
3.2.3. Marcaje de las células con la sonda CTG y la sonda eFluor670.....	21
3.2.4. Citotoxicidad <i>in vivo</i> de linfocitos T _c específicos para epítomos virales.	22
3.2.5. Análisis de la distribución de células EL4 <i>in vivo</i>	22
3.2.6. Análisis del uso de la sonda eFluor670 para marcar poblaciones celulares en los experimentos <i>in vivo</i>	23

3.2.7. Separación de poblaciones celulares mediante MACS (Separación celular basada en campos magnéticos).....	24
3.2.8. Análisis de la expresión intracelular de granzimas.....	24
3.2.9. Análisis del papel de los linfocitos Tc en el desarrollo de tumores primarios.	25
3.2.10. Evaluación de la respuesta de memoria frente al linfoma T EL4.....	25
3.2.11. Análisis de la infiltración de linfocitos en los tumores.	26
3.3. Técnicas de Biología Molecular.	26
3.3.1. Preparación de medios y cultivos bacterianos.....	26
3.3.2. Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.....	26
3.3.3. Extracción de DNA plasmídico.	27
3.3.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.	28
3.3.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.	28
3.3.6. Plásmidos.....	28
3.4. Transfección de células HEK.....	29
3.4.1. Transfección con el vector reportero pBabe-mRFP.	29
3.4.1.1. Transfección mediante el método de fosfato de calcio con el tampón Hepes.....	29
3.4.1.2. Transfección mediante el método de fosfato de calcio con el tampón BES.....	29
3.4.1.3. Transfección con el reactivo PEI.....	30
3.4.2. Transfección con el vector pEF-BOS-EX conteniendo las proteínas MFG-E8 y su forma mutada D89E.....	30
3.5. Purificación de proteínas.....	31
3.6. Análisis de las proteínas obtenidas tras la purificación.	31
3.6.1. Separación de proteínas. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	31
3.6.2. Transferencia de proteínas a membranas.....	31
3.6.3. Análisis de las proteínas por inmunoblot (Western Blotting).....	31
3.7. Tratamiento estadístico de los resultados.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Optimización del protocolo y estudio del mecanismo de eliminación <i>in vivo</i> de la línea celular de linfoma de células T EL4.....	33
4.1.1. Evaluación del papel de las granzimas A y B en la eliminación <i>in vivo</i> de células EL4 mediada por linfocitos Tc.	33

4.1.2. Evaluación de la contribución de linfocitos Tc en la eliminación <i>in vivo</i> de células EL4.	35
4.1.3. Evaluación del papel de la perforina en los mecanismos de eliminación de células EL4 <i>in vivo</i> independientes de linfocitos Tc.	41
4.1.4. Optimización del protocolo de eliminación <i>in vivo</i> de células tumorales mediada por linfocitos Tc utilizando la sonda fluorescente eFluor670.	43
4.2. Desarrollo de un modelo <i>in vivo</i> basado en la inmunización con el virus LCM para prevenir el desarrollo del linfoma T EL4.	46
4.2.1. Establecimiento de las condiciones en las que los linfocitos Tc antivirales son capaces de impedir el desarrollo de tumoral primario.	46
4.2.2. Evaluación de la memoria inmunológica antitumoral generada tras la eliminación de las células tumorales tal y como se indica en 4.2.1.	49
4.3. Optimización del protocolo de producción y purificación de la proteína MFG-E8 recombinante en células eucariotas HEK.293T	54
4.3.1. Análisis de la transformación de las bacterias y aislamiento de los plásmidos.....	54
4.3.2. Evaluación de la eficiencia de transfección.....	54
4.3.3. Obtención de la proteína MFG-E8 y su forma mutada D89E.	56
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	57
6. BIBLIOGRAFÍA.....	62

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA INMUNE E INMUNIDAD ANTITUMORAL.

Las células tumorales presentan antígenos propios de su condición que son reconocidos por células del sistema inmune. Estos antígenos tumorales pueden ser antígenos específicos de tumor (TSA, del inglés “Tumor Specific Antigen”), resultado de las mutaciones oncogénicas que dan proteínas alteradas o antígenos asociados a tumores (TAA, del inglés “Tumor Associated Antigen”), presentes también en células normales, pero sobreexpresados en células tumorales [1].

Es así como en algunos casos, el sistema inmune es capaz de prevenir la aparición de tumores al eliminar estas células en los primeros estadios de generación del tumor, o en los casos en los que se llega a originar, colaborar en su desaparición. Fiel reflejo de este hecho es la mayor incidencia de tumores espontáneos en ratones deficientes en diversos elementos del sistema inmune, como el INF- γ y la perforina (perf) [2].

A pesar de todos estos mecanismos de defensa, los individuos inmunocompetentes pueden acabar desarrollando tumores, por lo que la interacción entre las células del sistema inmune y las células tumorales ha sido un intenso campo de estudio en los últimos años, llegando a postularse *la hipótesis de edición de tumores* [3]. En esta se considera que el sistema inmune es capaz de eliminar las células cancerígenas más inmunogénicas, y son las menos inmunogénicas las que escapan de su acción y acaban generando cáncer.

1.2. CÉLULAS CITOTÓXICAS DEL SISTEMA INMUNE.

Las células citotóxicas son claves en la eliminación de las células tumorales y destacan dos tipos principales. Por un lado, **las células NK**, pertenecientes al sistema inmune innato. Y por otro, **las células T citotóxicas** (Tc), pertenecientes al sistema inmune adaptativo. Sus mecanismos efectores son los mismos: la secreción de sustancias solubles como el interferón (IFN- γ) o factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que poseen efectos antiproliferativos, proapoptóticos o angioestáticos, y la inducción de apoptosis en la célula diana mediante dos mecanismos principales: a través de la vía de los *ligandos mortales* (ej: FasL y TRAIL) y mediante *la exocitosis granular*, que se

comentarán en detalle más adelante. Sin embargo la forma en que estos dos tipos celulares se activan para poner en marcha estos mecanismos es distinta.

1.2.1. CÉLULAS NK.

Las células NK son capaces de eliminar células tumorales sin una sensibilización previa. No expresan receptores específicos de antígeno, sino que detectan células que han sufrido algún cambio en su superficie como consecuencia de la transformación o la infección por un virus. Para ello, en su superficie presentan diversos receptores que se clasifican en activadores o inhibidores de modo que el balance entre las señales inhibitorias o activadoras originadas por la presencia de ligandos de inhibición (MHC-I) o activación (MIC, Rae, H60...) en las células diana determinará si estas son eliminadas o no [4].

Aunque las células NK naïve ya expresan granzimas (gzms) y perf [4], requieren de ciertas citoquinas proinflamatorias (IL15 o IL18 principalmente) para poder desarrollar todo su potencial citotóxico [5]. Además secretan IFN- γ , lo que permite aumentar la actividad de células dendríticas y macrófagos [6].

1.2.2. LINFOCITOS T.

Los linfocitos T pertenecen al sistema inmune adquirido y reconocen antígenos específicos presentados por las Células Presentadoras de Antígeno Profesionales (APC, del inglés, “Antigen Presenting Cell”). Se distinguen dos poblaciones principales: linfocitos T cooperadores (Th CD4⁺), que se encargan de sintetizar citoquinas responsables de promover la inflamación y la proliferación de distintas células del sistema inmune. Y los linfocitos T CD8⁺, que una vez activados gracias a la ayuda de los T CD4⁺, se convertirán en células Tc y serán los responsables de la lisis de las células infectadas por virus o células tumorales. En este trabajo, vamos a centrarnos en esta segunda población.

RECEPTOR DE LAS CÉLULAS Tc

Las células Tc son capaces de reaccionar contra antígenos específicos. Este reconocimiento se lleva a cabo a través del receptor de antígeno de células T (TCR, del inglés “T Cell Receptor”) de su superficie. El TCR es un heterodímero compuesto por dos cadenas proteicas codificadas por cuatro genes: α , β , γ , δ , que están formados por

segmentos génicos que se recombinan al azar, y dan como resultado la enorme diversidad de receptores de las células T, responsables de la especificidad antigénica [1]. La mayor parte de las células T de los humanos y ratones presentan un TCR formado por las cadenas α y β , mientras que los linfocitos T que presentan las cadenas γ y δ son minoritarios y reconocen antígenos no peptídicos procedentes de microorganismos en el contexto de una molécula similar al MHC, CD1.

El TCR se encuentra asociado con el complejo CD3, formado por cinco cadenas polipeptídicas invariantes, encargado de llevar a cabo la transducción de señales [7-9] gracias a la presencia de los dominios ITAM [10].

Las moléculas de membrana CD4 y CD8 favorecen el reconocimiento del antígeno y la activación de la célula T [11-13] y permiten la clasificación de los linfocitos T en dos poblaciones según expresen uno u otro. Los *linfocitos T* $CD4^+$ (T_H) reconocen antígenos asociados a moléculas MHC clase II, mientras que los *linfocitos T* $CD8^+$ (T_c) reconocen antígenos asociados a moléculas MHC clase I.

PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

El TCR solo reconoce antígenos que han sido procesados y presentados en el contexto de moléculas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), conjunto de genes denominados complejo HLA en humanos y complejo H-2 en ratones, que codifican las moléculas de MHC-clase I y MHC-clase II, encargadas de presentar los péptidos antigénicos principalmente a través de tres vías:

MHC-I: Vía endógena

Las moléculas de MHC-clase I están presentes en la superficie de todas las células del organismo y se encargan de la presentación de antígenos “propios” a células T $CD8^+$ [14]. Están formadas por una cadena proteica α (con tres dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) vinculada de forma no covalente a la proteína microglobulina $\beta 2$, necesaria para que se forme un complejo estable [15]. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son variables e interaccionan para formar una hendidura capaz de unirse a péptidos antigénicos de 8 a 10 aminoácidos. Los antígenos presentados por el MHC-clase I proceden de la degradación de proteínas del interior de las células llevadas a cabo por el proteasoma. Este es un complejo enzimático citosólico que se encarga de regular el recambio proteico celular y que además es utilizado para presentar antígenos propios en el contexto de MHC-I,

contribuyendo esto al desarrollo de la tolerancia inmunogénica. Los péptidos antigénicos obtenidos tras la degradación son traslocados al interior del RE, donde se unen a la molécula de MHC-clase I y el complejo es transportado por vesículas hasta la superficie celular.

Cuando una célula ha sido infectada por un virus o se trata de una célula transformada, producirá péptidos "extraños" que serán presentados al igual que los péptidos propios. Sin embargo, este complejo antígeno/ MHC-clase I será reconocido por los linfocitos TCD8⁺, induciendo su activación.

MHC-II: vía extrínseca.

El MHC-clase II está formado por dos cadenas polipeptídicas α y β que se vinculan entre sí mediante interacciones no covalentes. Cada una presenta dos dominios extracelulares, $\alpha 1$ $\alpha 2$ y $\beta 1$ $\beta 2$. En este caso $\alpha 1$ y $\beta 1$ son las regiones variables que interaccionan para formar una hendidura capaz de unirse a péptidos antigénicos procesados de 13 a 18 residuos. El MHC clase II solo está presente en las APC, que son células dendríticas (DC, del inglés "Dendritic cell"), macrófagos y células B, donde presenta péptidos antigénicos a células T CD4⁺ [16]. Estos péptidos proceden de material extracelular (microorganismos, células apoptóticas...) que es fagocitado por las APC y degradado en sus lisosomas. Durante la ruta de exocitosis, los péptidos se encuentran con el MHC-II procedente del RE unido a una molécula denominada "cadena invariante", la desplazan por afinidad y este complejo antígeno/MHC-II es transportado a la superficie celular de la APC, donde inducirá la activación de los linfocitos T CD4⁺.

Presentación cruzada ("Cross-priming")

Este proceso, descrito por primera vez en 1976 [17] se basa en la capacidad de ciertas APC, en concreto de las DC, de presentar en el contexto de moléculas de MHC-clase I, péptidos obtenidos de la degradación de material extracelular fagocitado. De forma que antígenos fagocitados del medio extracelular, mediante mecanismos que todavía no se conocen muy bien, pasan a la vía intrínseca y son presentados por moléculas de MHC-clase I. Esto supone una gran ventaja, puesto que permite activar linfocitos T CD8⁺ antivirales y antitumorales sin la ayuda de los linfocitos T CD4⁺ [18].

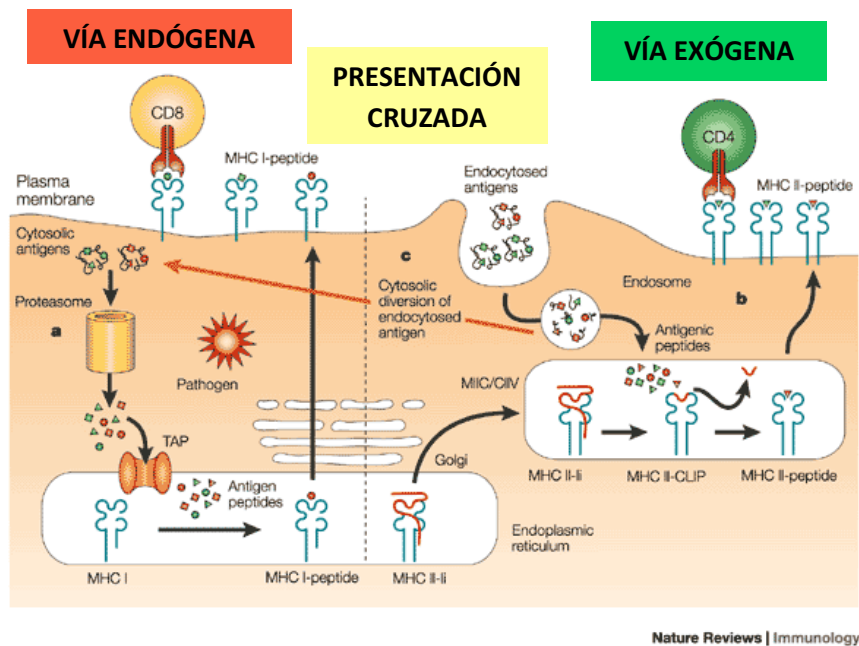


Fig.1.1: Representación de las tres vías principales de procesamiento y presentación antigénica.

ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T_c

Además de la interacción entre el TCR y el MHC-I presentando péptido extraño, para que las células T CD8⁺ vírgenes se activen y se diferencien a células T_c son necesarias una serie de señales adicionales proporcionadas por la interacción con las APC. Una APC, generalmente una DC detecta la presencia de virus o antígenos tumorales a través de diferentes receptores, procesa dichos antígenos y los presenta en los complejos de MHC-clase I y MHC-clase II en su superficie. A continuación, esta DC migrará a los ganglios linfáticos donde se produce la activación de los linfocitos T_H y T_c tal y como se resume en la figura 1.2.

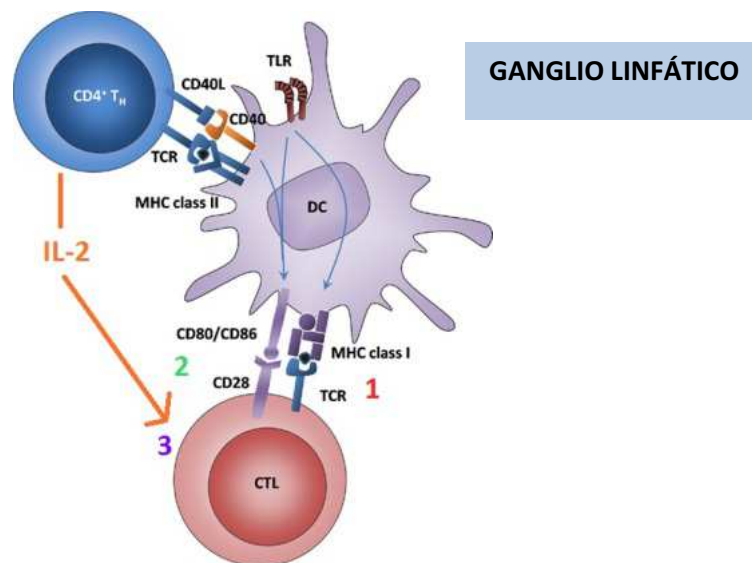


Fig. 1.2: Activación de células T CD8⁺ naive a células T_c citotóxicas (Tc). En los ganglios linfáticos, la DC interacciona con linfocitos T_H a través de los péptidos asociados a moléculas de MHC clase II [19]. Esto hace que la

célula Th sintetiza IL-2 y expone la molécula CD40L que se unirá a CD40, su receptor presente en la DC. Una vez ocurre esta interacción, la DC aumenta la expresión de ligandos de co-estimulación [20, 21] y es capaz de interactuar con los linfocitos T CD8⁺ específicos y activarlos de forma mucho más eficaz [22]. Las señales necesarias para la activación de los linfocitos T CD8⁺ son las siguientes: **1.** Una señal específica de antígeno entre el complejo MHC-clase I de la DC que presenta el péptido antigénico y el TCR de los linfocitos T CD8⁺ que reconoce dicho antígeno. **2.** Una señal co-estimuladora transmitida por la interacción entre el receptor CD28 de los linfocitos T CD8⁺ y los ligandos de co-estimulación (CD80 y CD86) de la DC. Si no se produce esta señal, el Tc no se activará y entra en un estado de anergia clonal en el que permanece sin estar activo ni poder ejercer sus acciones efectoras. **3.** Una señal proporcionada por la IL-2 secretada por los linfocitos T CD4⁺ activados previamente, que induce la proliferación clonogénica de las células Tc activadas.

Para que estas interacciones tengan lugar de forma correcta y eficaz es necesario que haya un contacto muy estrecho entre el linfocito y la APC, esta unión es conocida como *Sinapsis Inmunológica* [23]. Existen toda una serie de moléculas de adhesión, entre las que destaca la integrina LFA-1 de las células T que se une al receptor de integrinas ICAM presente en la APC, que colaboran aumentando la afinidad de esta unión [24].

Una vez generadas, las células Tc son capaces de migrar y eliminar células del organismo infectadas, puesto que expresan moléculas citotóxicas como *perforina* y *granzimas* y tiene capacidad secretora de IFN- γ . Sin embargo, necesitan en todo momento de un ambiente rico en citoquinas, principalmente IL-2 y IL-15, para sobrevivir y proliferar [25], aunque su capacidad citotóxica no depende de la presencia de éstas.

1.3. MECANISMOS CITOTÓXICOS DE LAS CÉLULAS NK Y CÉLULAS Tc.

Como ya hemos comentado, ambos tipos celulares causan la muerte de la célula diana por apoptosis, principalmente mediante dos mecanismos [26]. Por un lado, mediante la secreción de *ligandos mortales* (FasL y TRAIL), que se unirán a los receptores mortales en la célula diana (Fas y DR4/DR5). Y por otro lado, a través de la vía de *exocitosis granular*, en el que la célula efectora secreta unos gránulos que contienen la proteína *perforina*, que permite la entrada al interior de la célula diana de otros componentes de los gránulos, las *granzimas*, *serin-proteasas* que por degradación de diversos sustratos intracelulares desencadenarán su muerte por un mecanismo conocido como apoptosis [27].

1.3.1. MUERTE CELULAR. APOPTOSIS.

La apoptosis fue descubierta por primera vez por Kerr y colaboradores [28] y es una de los tres tipos principales de muerte celular descritas por el comité NCCD (del

inglés, “Nomenclature Committee on Cell Death”), junto con la necrosis y la autofagia [29]. Las células que sufren apoptosis se caracterizan por experimentar una reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. Los orgánulos y la membrana plasmática se mantienen intactos hasta que finalmente la célula experimenta un burbujeo (blebbing) y se acaba fragmentando en pequeños cuerpos apoptóticos rodeados de membrana plasmática intacta, que son fagocitados por células fagocíticas como macrófagos, células dendríticas inmaduras, células endoteliales o fibroblastos. Existen dos vías principales de apoptosis: La vía extrínseca, o de los receptores mortales [30], de la cual se hablará más adelante, y la vía intrínseca o ruta mitocondrial [31]. En ambos casos se desencadena la activación de una familia de enzimas, *las caspasas*, ejecutoras finales de la apoptosis. Las caspasas son una familia de cisteín proteasas con especificidad de corte en un residuo aspártico [32]. Existen 14 caspasas que, según su función, se clasifican como *caspasas inflamatorias* (caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14) que participan en la maduración de citoquinas y en respuestas inflamatorias y *caspasas apoptóticas*, que son las que llevan a cabo la muerte de la célula tras ser activadas por diversos estímulos proapoptóticos [33]. Estas últimas pueden ser divididas en:

-Caspasas Iniciadoras: Son las caspasas 2, 8, 9 y 10. Son las primeras en activarse tras recibir una señal proapoptótica y las encargadas de activar a las caspasas efectoras o ejecutoras por proteólisis.

-Caspasas Ejecutoras: Son las caspasas 3, 6 y 7 y son las responsables finales de la muerte celular mediante la proteólisis de diversos sustratos: inhibidores de DNAsas (ICAD), proteínas del citoesqueleto, proteínas de la lámina nuclear...Todas ellas se encuentran en el citosol en su forma inactiva procaspasa, y cuando son activadas actúan como heterotetrámeros.

1.3.1.1. La vía intrínseca o ruta mitocondrial.

Esta vía se desencadena por una serie de señales intracelulares originadas por estímulos como daño oxidativo, estrés, falta de nutrientes, radiaciones...y los principales participantes son la *mitocondria* y las *proteínas de la familia Bcl-2*. Estas se clasifican en proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xl o Mcl1 y proteínas pro-apoptóticas divididas en dos grupos según el número de dominios de tipo BH (del inglés, “Bcl-2 Homology”) que presentan: proteínas multidominio y proteínas solo BH3 [34].

La activación de esta vía conlleva la salida de factores apoptogénicos de la mitocondria a través de canales formados en la membrana externa mitocondrial por homó o heterodimerización de dos proteínas pro-apoptóticas multidominio, Bak y Bax. Entre ellos destacan el *citocromo c* que junto con Apaf-1 y dATP forma el apoptosoma [35], que induce la activación de la caspasa-9, la cual activa a las caspasas ejecutoras (3 y 7). *AIF* y *EndoG* que inducen apoptosis independiente de caspasas [36] y *Smac/DIABLO* [37] y *Omi/HtrA2* [38] que ayudan a la correcta activación de las caspasas retirando unos inhibidores conocidos como IAPs.

1.3.1.2. Fagocitosis de las células apoptóticas

En el organismo, las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas principalmente por macrófagos y células dendríticas. Esto evita la liberación de componentes celulares al exterior, lo que podría desencadenar reacciones inflamatorias graves, ya que este es un proceso que ocurre continuamente en los distintos tejidos, además de problemas de autoinmunidad [39]. Para ello, las células apoptóticas liberan señales (“find-me signals”) (figura 1.3) en estadios tempranos de la muerte celular con el fin de atraer a estos fagocitos. Estas señales son moléculas de diversa naturaleza: nucleótidos como el ATP o UTP, lípidos como esfingosina 1-fosfato (S1P) y lisofosfatidilcolina (LPC) o proteínas como la fractalquina. Todas se unen a receptores específicos en los fagocitos y mediante el establecimiento de un gradiente quimiotáctico los atraen hasta la célula apoptótica [40]. Una vez en las proximidades, los fagocitos necesitan otras señales (“eat-me signals”) (figura 1.3) que les permiten reconocer a la célula apoptótica frente al resto de células, de forma que se produzca una fagocitosis selectiva de esta. Existen muchas moléculas, como la calreticulina o trombospondina, que ejercen estas funciones; pero la fosfatidilserina (PS) es la más estudiada. Uno de los eventos apoptóticos iniciales más importantes es la traslocación de la fosfatidilserina (PS) desde la monocapa interna de la membrana plasmática a la monocapa externa y esta es la principal señal que permite a las células fagocíticas reconocer a las células apoptóticas frente a las células normales [40] y fagocitar los cuerpos apoptóticos para su eliminación. Muchas son las moléculas que reconocen a la PS, como receptores específicos para la PS (TIM-4, Estabilina-2...), receptores LDL, receptores “scavenger”, además de proteínas solubles [41]. Este es el caso de la proteína MFG-E8 (del inglés, “Milk Fat Globule-EGF-factor 8”), identificada por primera vez

como un componente de los glóbulos de leche [42] y producida por macrófagos y células dendríticas maduras.

FIN-ME SIGNALS	RECEPTORES	EAT-ME SIGNALS	RECEPTORES
Nucleotidos (ATP, UTP)	P2Y2	Azúcares alterados	Lectinas
Fractalquina	CX3CR1	Fosfatidilserina(PS)	Receptores PS
Lisofosfatidilcolina (LPC)	G2A	C1q (Complemente)	LRP1/CD91
Esfingosina 1-fosfato	S1P- R1/5	Trombospondina	CD36
		Calreticulina	LRP1/CD91
		ICAM-3	CD14

Fig.1.3. Tabla con las moléculas que promueven la atracción y fagocitosis selectiva de las células en proceso de muerte con sus correspondientes receptores de unión presentes en la superficie de las células fagocíticas. [39]

MFG-E8 contiene un dominio C-terminal, formado por dominios homólogos al del factor VIII de coagulación, que es capaz de unirse a la fosfatidilserina de la célula apoptótica y un dominio N-terminal, formado por dominios de tipo EGF (del inglés, “Epithelial Growth Factor”), que se une a la integrina $\alpha_v\beta_3$ (CD61) de la superficie del macrófago. De esta forma se produce el anclaje de ambas células para que el macrófago pueda fagocitar a la célula apoptótica. La mutación puntual en la secuencia RGD de un aspártico (D) por un glutámico (E) del segundo dominio de tipo EGF genera una proteína mutante que se une a la PS pero no a la integrina de los fagocitos, de forma que la célula apoptótica no podrá ser fagocitada [43]. Los ratones en los que se inyecta por vía intravenosa esta proteína mutada desarrollan autoanticuerpos y deposición de inmunocomplejos en los riñones, resultado de la liberación y acumulación de componentes intracelulares de células apoptóticas que no han podido ser eliminadas [43].

1.3.2. MECANISMOS EFECTORES DE LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS.

1.3.2.1. Receptores mortales.

Los receptores mortales pertenecen a la familia de los receptores del TNF (TNFR) [44] y son capaces de generar señales que regulan tanto la supervivencia y proliferación como la muerte celular. Estos receptores se encuentran en forma de homotrímeros en la superficie de la célula diana que tras unión con su ligando se entrecruzan, formando agregados más complejos [45]. Presentan un dominio citosólico (DD, del inglés, “Death Domain”) [46] que se asocia con proteínas del interior celular que participan en la vía de señalización que acabarán desencadenando la muerte de la célula diana. Los miembros más destacados en la inducción de apoptosis son Fas/CD95

cuyo ligando es FasL, DR4/DR5 [47] cuyo ligando es la proteína Apo2L/TRAIL y TNFR1 al que se une la citoquina TNF- α .

La unión de los ligandos mortales a sus receptores correspondientes promueve el reclutamiento de unas proteínas citosólicas a través del dominio DD que estas comparten con los receptores. En el caso de FasL y Apo2L/TRAIL la proteína adaptadora es FADD. Estas poseen en su extremo carboxilo terminal un dominio (DED, del inglés, “Death Executor Domain”) a través del cual reclutarán a las caspasas iniciadoras 8 y 10 que también poseen en su estructura este dominio. Esta asociación de proteínas es el denominado Complejo de señalización de muerte o DISC (del inglés, “Death-Inducing Signaling Complex”) [48]. En este complejo, las moléculas de pro-caspasa 8 y 10, que se encuentran todavía inactivas, son capaces de activarse recíprocamente al encontrarse próximas entre ellas y poseer una cierta actividad basal, formando tetrámeros activos que proteolizarán diversos sustratos del citosol. Entre estos sustratos se encuentran las procaspasas ejecutoras 3 y 7, que darán las formas activas de caspasa 3 y 7, responsables últimas de la muerte por apoptosis en células de tipo I. La caspasa 8 también puede promover la apoptosis por la vía intrínseca en células de tipo II al ser capaz de hidrolizar a la proteína pro-apoptótica Bid, dando el fragmento t-Bid [49].

En lo que respecta al sistema inmune, aunque se pueden encontrar ya sintetizados en el interior celular, la activación de las células T aumenta la expresión de FasL y TRAIL, los cuales son secretados en la membrana de exosomas o expresados en la membrana celular dependiendo de tipo celular y la especie [50, 51].

Además de su papel citotóxico, estos ligandos mortales, principalmente FasL y TRAIL, se encuentran implicados en la homeostasis del sistema inmune, controlando la eliminación de los linfocitos T activos una vez se ha producido la respuesta inmune.

1.3.2.2. Exocitosis granular.

Las células Tc y las células NK poseen en su citoplasma unos granulos citotóxicos que entre otros componentes contienen la proteína formadora de poros, perf y unas enzimas con actividad serín-proteasa, las gzms. El reconocimiento de la célula diana por parte de la célula Tc o la célula NK pone en marcha una serie de eventos que permitirán su movilización y exocitosis a través de una red de tubulina. Este proceso depende de las proteínas AP-3, Rab27a, Munc13-4 y esfingomielinasa ácida [52].

PERFORINA

La perf es una proteína formadora de poros que resulta esencial para la función de las gzms. Ratones deficientes en perf han perdido la capacidad citotóxica de sus linfocitos, haciéndose sensibles a la mayoría de infecciones virales [53]. Además, desempeña un papel importante en la defensa frente a la aparición y desarrollo de tumores [54], de hecho, ratones deficientes en perf desarrollan linfomas espontáneos.

La perf actúa formando pequeños poros, que por sí solos no pueden causar muerte celular, pero permitirán la entrada de las gzms, que serán las responsables de causar la apoptosis de la célula. Aunque la perf es indispensable para el acceso de las gzms al citosol celular, todavía no está claro si la entrada de las gzms depende de los poros formados en la membrana plasmática o está relacionado con procesos de endocitosis.

GRANZIMAS

Las gzms son una familia de serín-proteasas descubiertas en los años 80 localizadas en el interior de los gránulos citotóxicos de los linfocitos, principalmente en células NK y células Tc. Se conocen 5 gzms en humanos (A, B, H, K, y M) y 10 en ratón (A, B, C, D, E, F, G, K, M y N) [55] (figura 1.4), siendo la gzmA y la gzmB las más abundantes y las mejor caracterizadas. Cada una presenta diferentes especificidades en cuanto al sitio de corte, actuando sobre distintos sustratos. Las gzms A y B, junto con la perf, constituyen un elemento clave en la inmunidad antiviral y antitumoral [27]. Si bien, la ausencia de las gzms A y B en ratones produce un fenotipo más leve que la ausencia de perf, sugiriendo que otras moléculas cooperan con la perf en el control de virus y tumores. El resto se encuentran poco caracterizadas funcionalmente y no se han observado *in vivo*, salvo la gzmK.

Las gzms son sintetizadas como zimógenos y adquieren su conformación activa cuando son incorporadas al interior de los gránulos. Sin embargo aquí todavía permanecen inactivas, al igual que la perf, debido al pH ácido del interior de las vesículas, adquiriendo su actividad cuando se produce su liberación al exterior celular [56]. Así pues, una vez han alcanzado el citoplasma de la célula diana, serán las encargadas de llevar a cabo su apoptosis.

Granzima	Especies	Especificidad Corte	Expresión <i>in vivo</i>
A	H-R	Lys/Arg	CTL, NK, NKT, $\gamma\delta$
B	H-R	Asp/Glu	CTL, NK, $\gamma\delta$, CD4, NKT, MC, Bas, Mac, CD
C	R	Asn/Ser	Desconocido
D	R	Phe/Leu	Desconocido
E	R	Phe/Leu	Desconocido
F	R	Phe/Leu	Desconocido
G	R	Phe/Leu	Desconocido
H	H	Phe/Leu	CTL, NK
K	H-R	Lys/Arg	NK, NKT, CTL, $\gamma\delta$
M	H-R	Met/Leu	NK, NKT, $\gamma\delta$
N	R	Desconocido	Espermatozoides

Figura 1.4: **Granzimas expresadas en células de origen humano y murino.** H,humano; R, ratón; MC, monocito; Bas, basófilo; Mac, macrófago; CD, célula dendrítica.

GRANZIMA B

La gzmB es una serín-proteasa que corta tras residuos de aspártico, al igual que las caspasas. Se ha estudiado de forma exhaustiva sus diversos sustratos, tanto intracelulares como extracelulares. En el medio extracelular está descrito que puede actuar de forma independiente de perf, regulando procesos como la inflamación, coagulación y envejecimiento [57, 58]. En el interior celular, la gzmB posee una amplia variedad de sustratos, pero los principales son *la caspasa 3* y *la proteína Bid* (figura 1.5). De esta forma, puede causar la apoptosis de la célula diana a través de dos vías distintas: la activación directa por proteólisis de las caspasas ejecutoras 3 y 7 o la activación de estas caspasas a través de la ruta mitocondrial mediante el procesamiento de Bid para generar t-Bid. A través de una u otra vía las caspasas 3 y 7 serán las encargadas finales de la translocación de fofatidilserina, la producción de ROS y la despolarización de la mitocondria [27]. Si se inhiben ambas rutas la gzmB todavía es capaz de eliminar a la célula diana a través de un mecanismo desconocido [59].

Además durante los últimos años se ha observado que algunas gzms, como la gzmB o la gzmH son capaces de interferir con el ciclo de replicación de algunos virus, eliminándolos sin matar a la célula diana, en un proceso dependiente de perf [60].

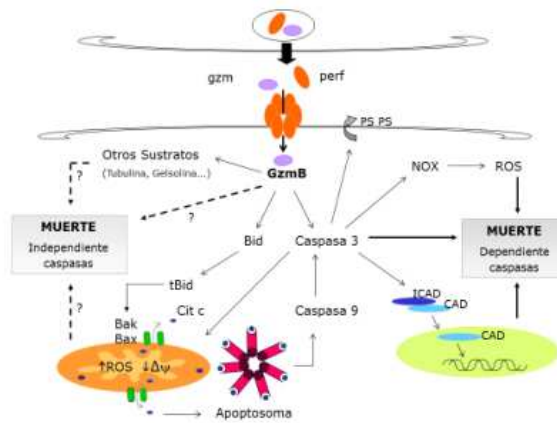


Figura 1.6: Mecanismos de acción de la granzima B.

GRANZIMA A

Se trata de una enzima proteolítica que corta a partir de residuos básicos, principalmente Lys y Arg. El potencial citotóxico de la gzmA resulta un tema controvertido y todavía no está claro si realmente se trata de una proteína con capacidad citotóxica [61]. Los experimentos originales *in vitro* donde se describía su capacidad citotóxica utilizaban concentraciones muy altas de gzmA recombinante, imposibles de alcanzar en condiciones fisiológicas y combinaban gzmA, perf y células diana de distintas especies (rata, ratón, humanas), de forma que se obtuvieron resultados muy diversos y poco fiables [62]. Sin embargo, cuando se realizaron experimentos en donde tanto la perf como la gzmA y las células diana eran de la misma especie (ratón, humano) se vio que la gzmA pura no era capaz de inducir muerte, mientras que la gzmB en concentraciones del orden de nanomolar sí lo era [63]. En experimentos utilizando linfocitos Tc provenientes de ratones *gzmB^{-/-}* se ha observado que su citotoxicidad podría depender del tipo de célula diana [64]. Se ha descrito que la gzmA recombinante podría inducir apoptosis a través del complejo denominado SET tras la generación de ROS debido a la proteólisis de un componente del complejo I mitocondrial (NDUFS3) [65].

Algo más clara se encuentra su participación en la respuesta pro-inflamatoria. Parece ser que la gzmA es capaz, al menos *in vitro*, de procesar a la pro-IL1 β [66], así como de inducir la liberación de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en macrófagos humanos y de ratón en un mecanismo dependiente de la caspasa 1 [63]. Confirmando esta función, se ha observado que ratones deficientes en gzmA son más resistentes al shock séptico inducido por lipopolisacáridos (LPS) [63]. Por lo que parece que el papel de la gzmA *in vivo* podría estar basado en su acción para generar una respuesta inflamatoria.

OTRAS GRANZIMAS

Se necesitan más estudios para conocer más claramente las funciones de las otras gzms. Por un lado, **la gzmK** al igual que la gzmA, parece tener poca capacidad citotóxica, pero es capaz de regular la respuesta pro-inflamatoria en macrófagos [67]. **La gzmC** purificada de ratón parece inducir muerte celular con algunas características apoptóticas como exposición de PS y fragmentación de DNA, pero con ausencia de otras como la activación de caspasas o la liberación de citocromo c, no habiéndose detectado *in vivo* [65]. La **gzmH** humana es expresada principalmente en células NK, aunque su participación en procesos citotóxicos es cuestionable, ya que la inhibición de la gzmB en estas células inhibe casi completamente su capacidad citotóxica [65]. Por último, la **gzmM** es expresada en células NK y se le atribuye un papel importante en la inmunidad innata y una posible implicación en procesos inflamatorios [65].

1.4. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER.

En los últimos años, la inmunoterapia ha emergido como una nueva alternativa en el tratamiento contra el cáncer [68]. Incluye todas las estrategias de tratamiento para estimular o reponer el sistema inmune frente al tumor, distinguiéndose una inmunoterapia pasiva donde la administración de mediadores inmunológicos (anticuerpos monoclonales específicos contra el tumor funcionalizados con toxinas, células inmunitarias citotóxicas...) atacan directamente al tumor, y una inmunoterapia activa, basada en estimular el sistema inmunitario del paciente (administración de citoquinas como IL-2 o TNF- α , células o vacunas terapéuticas entre otros).

1.4.1. Muerte inmunogénica y su aplicación en la inmunoterapia.

El sistema inmune es capaz de eliminar las células que están muriendo en nuestro organismo, ya sea por el recambio celular normal que ocurre en los tejidos, o bien por daños celulares, infecciones o cáncer. Tradicionalmente se había considerado que, al contrario de la necrosis, la muerte por apoptosis era un tipo de muerte poco inmunogénica y no inflamatoria, ya que las células apoptóticas eran rápidamente fagocitadas [39]. Sin embargo, actualmente se ha debatido esta noción, y parece ser que lo que determina que la muerte de una célula sea inmunogénica o no son los factores liberados por esta y no el tipo de muerte [69]. Entre estos factores liberados por las células que mueren se encuentran citoquinas, ATP, calreticulina o los DAMPS (del

inglés, “Danger Associated Molecular Patterns”), que incluyen moléculas como ácido úrico, nucleótidos, y proteínas del retículo como chaperonas o HMGB1. Todos estos factores son capaces de unirse a receptores (RAGE, TLRs...) presentes en las APC (DCs principalmente) las cuales activarán a células Tc mediante la presentación cruzada y a células Th mediante presentación a través de MHC-II, desencadenando una respuesta inmune protectora [70].

Aplicando todos estos conceptos a la inmunidad antitumoral, si se consigue eliminar las células tumorales desencadenando un tipo de muerte inmunogénica, no solo se puede obtener una más rápida y eficaz eliminación del tumor gracias a la activación del sistema inmune, como se ha visto en el uso de fármacos quimioterápicos como las antraciclinas [69] (que causan una muerte inmunogénica) frente a otros compuestos antitumorales. Sino que además, la respuesta inmunológica lleva consigo la generación de memoria [71]. De forma que ante una posible reaparición tumoral, en seguida se activarían las células del sistema inmune para eliminarlo. Por lo que el estudio de estrategias de este tipo parece un campo prometedor.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las células NK y los linfocitos Tc son las principales armas del sistema inmune en el control del desarrollo tumoral [2, 3]. Para ello son capaces de inducir la eliminación de las células tumorales a través de la inducción de apoptosis mediante dos vías comunes: a) el sistema de ligandos mortales (como FasL o TRAIL) y la vía de exocitosis granular (perforina y granzimas) [26]. Por ello la modulación de su actividad resulta un foco de gran atención en los tratamientos más novedosos y prometedores frente al cáncer y la inmunoterapia celular antitumoral.

Recientemente se ha descrito que ciertos fármacos antitumorales como las antraciclinas eliminan las células tumorales generando un tipo de muerte denominada inmunogénica, en la que determinadas señales favorecen la fagocitosis de las células moribundas y la activación de las células dendríticas (DCs), las cuales activarán linfocitos Tc específicos contra las células tumorales, lo que contribuirá a su eliminación [72]. A este respecto se ha descrito que la proteína soluble MFG-E8 secretada por macrófagos y células dendríticas maduras es capaz de unirse a la fosfatidilserina de la célula apoptótica favoreciendo su fagocitosis. Asimismo se han descrito mutaciones en su dominio N-terminal que impiden la correcta fagocitosis de las células apoptóticas [43].

En nuestro grupo se han estudiado los mecanismos de inducción de muerte celular por linfocitos Tc obtenidos *ex vivo* [27, 54, 59, 73-75] sobre diferentes tipos de células tumorales. Además se ha establecido un modelo *in vivo* para analizar la contribución de la granzima B de linfocitos Tc en la eliminación de células EL4 y el posible papel citotóxico de la granzima A, así como el papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por la granzima B *in vivo*. Durante estos trabajos previos se ha observado que los linfocitos Tc utilizan principalmente la granzima B para eliminar células tumorales *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Asimismo se ha caracterizado que estos linfocitos Tc son capaces de inducir la muerte de células tumorales con mutaciones en la vía de apoptosis mitocondrial que les confieren resistencia a la mayoría de los fármacos de quimioterapia. Estos resultados sugieren que los tratamientos de inmunoterapia celular basados en células Tc o células NK podrían ser muy útiles para tratar tumores que presentan resistencia a drogas. Sin embargo se desconoce si la eliminación de estas células tumorales con mutaciones en las vías de apoptosis generará las señales

inmunogénicas adecuadas para favorecer su completa eliminación y la aparición de recaídas.

Por ello el **objetivo general** de este trabajo es establecer un modelo *in vivo* para evaluar si la muerte celular inducida por los linfocitos Tc sobre células tumorales es inmunogénica y si mutaciones en la vías de apoptosis cambian las características inmunogénicas de esta muerte. De forma que **los objetivos concretos** que se han planteado son los siguientes:

1. Optimización del protocolo y estudio del mecanismo de eliminación *in vivo* de la línea celular de linfoma de células T EL4.

- 1.1. Evaluar el papel de las gzm A y B en la eliminación *in vivo* de células EL4 mediada por linfocitos Tc.
- 1.2. Evaluar la contribución de los linfocitos Tc en la eliminación *in vivo* de las células EL4.
- 1.3. Evaluar el papel de la perf en los mecanismos de eliminación de células EL4 *in vivo* independientes de linfocitos Tc.
- 1.4. Optimización del protocolo de eliminación *in vivo* de células EL4 mediada por linfocitos Tc utilizando la sonda eFluor670.

2. Desarrollo de un modelo *in vivo* basado en la inmunización con el virus LCM para prevenir el desarrollo del linfoma T EL4.

- 2.1. Establecimiento de las condiciones en las que los linfocitos Tc antivirales son capaces de impedir el desarrollo de tumoral primario.
- 2.2. Evaluación de la memoria inmunológica antitumoral generada tras la eliminación de las células tumorales tal y como se indica en 2.1.

3. Optimización del protocolo de producción y purificación de la proteína MFG-E8 recombinante en células eucariotas HEK.293T.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

3.1.1. Líneas celulares.

La línea de fibroblastos embrionarios humanos de riñón HEK.293T fue cedida por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de investigación del cáncer, Salamanca). La línea EL4 es un linfoma tímico de ratón de origen C57BL/6 (H-2^b).

3.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares.

La línea celular EL4 se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Sigma), L-glutamina (PAN Biotech GmbH) 2 mM y antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomicina, 100 µg/ml, Sigma, Madrid). Mientras que la línea celular 293T se cultivó en medio DMEM (PAN Biotech GmbH) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma). Las líneas celulares en suspensión se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm², con tapón con filtro en un volumen de 10 ml. En el caso de la línea celular 293T adherente se cultivó en placas circulares de 60.1 cm² (TPP, Suiza) en un volumen de 10 a 15 ml. Generalmente, las células se sembraron a una densidad inicial de 5x10⁴ cél/ml.

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado con regulación electrónica de flujo de CO₂ (Heraeus Cell, Alemania), a 37° C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. Una vez alcanzadas las densidades de saturación en estas condiciones, se establecieron subcultivos derivados de los iniciales. Para ello, se determinó el número de células y su viabilidad (en azul Tripán, Sigma, Madrid) con ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer al microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i), se transfirieron a tubos estériles de fondo cónico y se centrifugaron durante 5 min a 335 xg (20 °C) en una centrífuga Beckman and Coulter (Rotor SX4750A). Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se resembraron las células en medio fresco o se utilizaron para los diferentes experimentos. En el caso de las líneas celulares adherentes, las células se despegaron mediante incubación con tripsina/EDTA a 37°C durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 6 ml de medio con suero para inactivar la tripsina, se transfirieron las células a tubos de fondo cónico y se sometieron al proceso descrito anteriormente.

Todas las manipulaciones con las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar, España) y en condiciones estériles. El material de vidrio y

plástico usado en las mismas se esterilizó previamente en un autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta, España) durante 20-30 min a 1,2 atm de presión. Todas las disoluciones añadidas a los cultivos celulares se esterilizaron usando filtros de 0,22 µm de tamaño de poro.

3.1.3. Congelación y descongelación de células.

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido. En cada criotubo (Nunc, Dinamarca) se congelaron aproximadamente $5-8 \cdot 10^6$ células en 800 µl de medio completo suplementado con 10% DMSO (Sigma, Madrid). Los viales se introdujeron rápidamente en un congelador a -80°C, durante 24-72 horas. Finalmente, se transvasaron a un contenedor de nitrógeno líquido, hasta el momento de su utilización.

La descongelación se realizó mediante la adición gradual de medio completo atemperado hasta 10 ml. A continuación la suspensión se centrifugó 5 min a 149 xg para luego resuspender las células en 5 ml de medio completo.

3.1.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la tinción con azul Tripán (Sigma, Madrid). Esta técnica se basa en que las células muertas que han perdido la integridad de su membrana son permeables a este colorante y adquieren una tonalidad azulada, mientras que aquellas células que permanecen vivas o apoptóticas, todavía mantienen su membrana plasmática intacta y no adquieren el colorante. Para contar las células, se tomó una alícuota de la suspensión celular, homogeneizada previamente mediante agitación, y se mezcló con el mismo volumen de una disolución estéril al 0,4 % de azul Tripán en NaCl 0,15 M. Esta mezcla se depositó sobre una cámara Neubauer y se procedió a su contaje con un microscopio óptico (Optiphot, Nikon).

La densidad celular se determinó contando un número de cuadrantes completos de la cámara tal que se obtuvieran como mínimo 100 células totales (viables y no viables) y se calculó como el número de células viables dividido por el número de cuadrantes y multiplicado por la dilución de la suspensión celular y 10^4 (ajuste del tamaño de la cámara). La viabilidad celular se evaluó considerando el porcentaje de células no coloreadas y no apoptóticas -viables- respecto al número total de células.

3.1.5. Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR.

Las posibles contaminaciones de los cultivos celulares por micoplasmas fueron analizadas de forma rutinaria mediante PCR. Para ello, se recoge sobrenadante de un cultivo celular que al menos lleve 48 horas creciendo y se guarda congelado a -20°C o se utiliza directamente para el análisis.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores de la reacción fueron los siguientes:

Mico A 5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3'

Mico B 5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G-3'

Estos oligonucleótidos reconocen varias cepas diferentes de micoplasma, entre las que se encuentran las que habitualmente producen contaminaciones de cultivos celulares.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl . La mezcla de reacción contenía 5 μl de tampón de reacción (MgCl_2 15 mM, KCl 500 mM, 1 % Tritón, Tris -HCl 100 mM pH 8.8), 5 μl dNTPs 2 mM, 2,5 μl de cebador Mico A 10 μM , 0,25 μl de cebador Mico B 100 μM , 2 μl de sobrenadante, 0,5 μl de Taq polimerasa 2 U/ μl y 36,5 μl de agua Milli-Q estéril. Como control negativo de la amplificación se preparó la misma mezcla anterior sustituyendo el sobrenadante celular por agua Milli-Q estéril; como control positivo se utilizaron sobrenadantes de un cultivo celular contaminado testado con anterioridad.

La amplificación se realizó mediante el siguiente programa de PCR:

- | | | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 1- Calentamiento inicial: | 94 $^{\circ}\text{C}$ / 3 min | |
| 2- Desnaturalización: | 94 $^{\circ}\text{C}$ / 30 seg | } 30 ciclos: pasos 2-4. |
| 3- Hibridación: | 60 $^{\circ}\text{C}$ / 30 seg | |
| 4- Extensión: | 72 $^{\circ}\text{C}$ / 30 seg | |
| 5- Extensión: | 72 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min | |

Los posibles productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE (0,045 M Tris-borato, 1mM EDTA) que contenía 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Como marcadores de peso molecular se utilizó el 100bp DNA ladder de Promega. La visualización se llevó cabo en el transiluminador Gel Doc 2000 de BioRad Laboratories (Hércules, CA) y se analizó mediante el programa Bio-Rad Muti-Analyst (PC versión 1.1). En caso de resultado positivo apareció una banda de aproximadamente 500 bp.

3.2. Experimentación animal

3.2.1. Animales.

Para la mayoría de los experimentos se han utilizado ratones de la estirpe C57BL/6 cuyo haplotipo para el MHC-I es H-2K^b/D^b (H-2^b). En algunos experimentos se utilizaron también ratones Balb/C (H-2^d). Además, se han utilizado ratones deficientes (knock out -KO-) para algunas proteínas del sistema inmune implicadas en el mecanismo de exocitosis granular, como: granzimas A y B (gzmAxB^{-/-}) y perforina (perf^{-/-}) que originalmente fueron cedidos por Markus Simon, del Max-Planck Institute of Immunobiology, Friburgo, Alemania.

Estos ratones se han mantenido y criado en condiciones libres de patógenos en el animalario del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón. En los experimentos se utilizaron animales con edades comprendidas entre 6 y 8 semanas, libres de patógenos y se realizaron de acuerdo a las instrucciones de FELASA, bajo la supervisión y con la aprobación del Comité Ético para la Experimentación Animal del CITA o de la Universidad de Zaragoza.

3.2.2. Generación *in vivo* de linfocitos Tc específicos del virus LCMV-WE.

Para generar linfocitos Tc específicos contra antígenos del virus LCMV-WE se pincharon distintas concentraciones de virus, en 200 µl de RPMI 2% SFB de complementado. Tras ocho días, cuando la actividad de los linfocitos es máxima, se llevó a cabo el experimento de citotoxicidad.

3.2.3. Marcaje de las células con la sonda CTG y la sonda eFluor670.

Para marcar las células que inyectaremos posteriormente en el peritoneo de los ratones se utilizó la sonda fluorescente CTG (CellTracker Green, CTG, $\lambda_{\text{abs}}=492$ nm, $\lambda_{\text{em}}=517$ nm; Invitrogen) almacenada en DMSO a una concentración de 10 mM y la sonda eFluor (eFluor670, $\lambda_{\text{abs}}=647$ nm, $\lambda_{\text{em}}=670$ nm; eBioscience) almacenada en DMSO a una concentración de 5mM. Las células se resuspenden en un volumen tal de PBS para obtener una densidad celular de $2 \cdot 10^6$ c/ml y el marcaje según la sonda es: La sonda verde (CTG) se utiliza a 0.5 y 5 µM según la población celular. Las células se incuban 15 min a 37°C, seguido de una centrifugación (5min, 335 xg) y tres ciclos de lavado con 5 volúmenes de medio RPMI con 5% de suero de complementado, dejando las células 10 min a 37° entre lavado y lavado. En el caso de la sonda eFluor670 se

utiliza a 3 μM y se incuba 10 min a 37°C. Después se añaden 5 volúmenes de medio RPMI con 5% de suero de complementado y se dejan 5 min a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifuga y se lava 2 veces más con el medio anterior.

3.2.4. Citotoxicidad *in vivo* de linfocitos Tc específicos para epítomos virales.

En este tipo de experimentos se quiere evaluar la citotoxicidad *in vivo* frente a las células EL4 presentadoras del péptido viral gp33. Para ello se incuban la mitad de las células EL4 que van a utilizarse con el péptido inmunodominante del LCMV, KAVYNFATM (gp33, NeoMPS) a una concentración 1 μM durante 30 min a 37°C en RPMI 5% SFB de complementado a una densidad celular de $2 \cdot 10^6/\text{ml}$. Las dos poblaciones obtenidas, EL4 y EL4gp33, se incuban con la sonda CTG a 0.5 y 5 μM respectivamente, lo que nos permitirá distinguir los dos tipos celulares en virtud de su intensidad de fluorescencia. La mezcla de las dos poblaciones se inyecta por vía intraperitoneal (i.p.) en ratones C57BL/6 wt o los respectivos ko (10^6 células totales por ratón en 200 μl de RPMI 2% suero fetal de complementado) inmunizados 8 días antes con distintas concentraciones de LCMV. Tras una hora se lleva a cabo los lavados peritoneales con 8 ml de PBS frío para arrastrar todo el contenido del peritoneo, se fijan las células obtenidas con paraformaldehído al 1% y después se analiza por citometría de flujo el porcentaje relativo de células correspondientes a cada pico de fluorescencia. Antes de fijar las células se separa una alícuota para analizar 1) número total de células por azul tripán, 2) porcentaje de células CD8⁺ utilizando el anticuerpo anti CD8a marcado en APC a una dilución 1/50 (BD, España).

3.2.5. Análisis de la distribución de células EL4 *in vivo*.

En este experimento se quiso evaluar si las células EL4 inyectadas i.p en los experimentos de citotoxicidad *in vivo* migraban a otros órganos durante el tiempo de incubación. Para ello, se utilizaron 13 ratones C57BL/6 wt que se distribuyeron en cuatro grupos compuestos por tres individuos: un grupo al que no se pinchó LCMV y grupos en los que se pinchó 10^2 , 10^3 , 10^4 pfu de LCMV. A todos ellos se les inoculó $5 \cdot 10^6$ de células EL4 marcadas con 2.5 μM de sonda fluorescente CTG para poder realizar su seguimiento. Un ratón sirvió como control y no se le pinchó ni virus ni células EL4 fluorescentes.

A las dos horas se procedió al análisis de los siguientes órganos: Peritoneo, bazo, ganglios mesentéricos, hígado, pulmones, timo y médula. Para analizar el

peritoneo se llevó a cabo un lavado con 8 ml de PBS frío. En el caso del bazo, ganglios mesentéricos y timo se procedió a su extracción para cada uno de los ratones y se colocaron de forma individual en placas de 24 pocillos con medio RPMI 5% SFB de complementado. Se extrajeron las células presionando cada órgano con el émbolo de una jeringa estéril y se eliminaron los restos de tejido graso de la suspensión celular haciéndolas pasar por un filtro de nylon de 100 μm . Estas suspensiones celulares se centrifugaron y se procedió a la lisis de los eritrocitos resuspendiendo el pellet en 1 ml de tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 154 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) y dejándolo incubar 10 min a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se añadieron 10 ml de medio y se centrifugaron (5min, 335 xg) desechando el sobrenadante. Finalmente las muestras se resuspendieron en 5 ml de medio.

La ruptura mecánica del hígado y del pulmón requirió del uso del GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Alemania). Cada uno de estos órganos se depositó en un pocillo con medio RPMI en el momento de la extracción y posteriormente se añadieron a un Falcon donde se adicionaron 2.5 ml de Tampón HEPES, colagenasa y DNasa y se realizó el protocolo de disgregación adecuado para cada órgano con el GentleMACS Dissociator. Las soluciones celulares obtenidas se filtraron a través de un filtro estéril de 100 μm , se centrifugaron y se resuspendieron en 10 ml de medio.

Las suspensiones celulares de la médula se obtuvieron a partir del fémur, por inyección de PBS con una jeringa en la zona central del hueso depositándose la suspensión celular obtenida en placas de 24 pocillos.

En todos los casos, se tomó una alícuota para realizar el conteo por azul tripán y las muestras finales se centrifugaron 5 min a 335 xg, resuspendiéndose en 400 μl de paraformaldehído 1% para evaluar el nivel de fluorescencia mediante citometría de flujo.

3.2.6. Análisis del uso de la sonda eFluor670 para marcar poblaciones celulares en los experimentos *in vivo*.

En este tipo de experimentos se quiso evaluar si el uso de la sonda eFluor670 es adecuado para realizar los experimentos de citotoxicidad *in vivo*. Para ello ratones C57BL/6 o BALB/c wt (según el caso) fueron distribuidos en dos grupos: uno grupo sin inmunizar y otro inmunizado con 10^5 pfu de LCMV. A los ocho días, a cada ratón se le inoculó por vía i.p 500.000 células EL4 marcadas con la sonda eFluor670 a una concentración de 3 μM . Dos horas después se realizó un lavado peritoneal con 8 ml de

PBS frío. Las muestras se centrifugaron, se fijaron con paraformaldehído 1% y se analizaron por citometría de flujo. Según el tipo de experimento, antes de fijar las muestras, se tomaron alícuotas en las que se analiza: 1) número total de células por conteo con azul tripán 2) presencia de macrófagos peritoneales marcando con el anticuerpo anti-CD11b marcado con FITC (Miltenyi Biotec, Alemania) a una dilución 1/50 3) identificación de células de la estirpe Balb/c con el anticuerpo anti-H-2K^d marcado con PE (BD, España) a una dilución 1/50.

3.2.7. Separación de poblaciones celulares mediante MACS (Separación celular basada en campos magnéticos)

En los experimentos de citotoxicidad *in vivo* además se extrajo el bazo de los ratones para aislar linfocitos Tc con el fin de analizar la expresión de las gzms. Estos bazos se depositaron sobre placas de 6 pocillos con 5 ml de medio RPMI y se presionaron con el émbolo de una jeringa estéril para a continuación pasar esta solución por un filtro de nylon de 100 μ m, recogiénola en un falcon estéril de 50 ml. Los pocillos se lavan con 5 ml de medio para recoger todas las células posibles y se vuelven a pasar por el filtro. Esta solución de esplenocitos se centrifuga y se lisan los eritrocitos. Para separar las células de interés utilizaremos anticuerpos unidos a microesferas metálicas que serán seleccionadas en columnas colocadas en el interior de un campo magnético. Tanto las columnas como los anticuerpos utilizados provienen de Miltenyi Biotec, Alemania. El tampón utilizado para el marcaje y la separación (tampón MACS) está compuesto por PBS con 0,5% SFB y 2 mM EDTA. Para separar los linfocitos Tc, utilizamos el anticuerpo anti-CD8a unido a bolitas magnéticas. Así pues, se resuspende el pellet de los esplenocitos (después de eliminar los eritrocitos) en tampón MACS a una densidad de 10^7 células en 90 μ l de tampón y se añaden 10 μ l de anticuerpo. Las células se incuban 10 min a 4°C y después se lavan con tampón MACS. La separación se lleva a cabo en columnas LS según las instrucciones del fabricante.

3.2.8. Análisis de la expresión intracelular de granzimas.

Las gzms son proteínas intracelulares contenidas en los gránulos citotóxicos. Para analizar su expresión $3 \cdot 10^5$ de linfocitos Tc enriquecidos por MACS se fijan durante 15 min a 4°C con 200 μ l de PFA 1% en PBS. A continuación se lavan dos veces con PBS con 5% de SFB y se resuspenden en 100 μ l de una solución permeabilizadora (saponina 0.1% en PBS con 5% de SFB) que contiene el anticuerpo que reconoce a cada

granzima (gzm A dilución 1/100, gzmB dilución 1/100 y gzmK dilución 1/1000) o sus respectivos isotipos, que nos proporcionan un control negativo. Se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario específico para cada gzm. Posteriormente se lavan dos veces con la solución de permeabilización y se incuban durante 45 min en oscuridad y a temperatura ambiente con 100 µl de solución de permeabilización conteniendo el anticuerpo secundario Alexa488 diluido 1000 veces. Para finalizar, las células se lavan dos veces con el tampón de permeabilización y se resuspenden en PFA 1% para su análisis por citometría de flujo.

3.2.9. Análisis del papel de los linfocitos Tc en el desarrollo de tumores primarios.

Para realizar este experimento 9 ratones C57BL/6 wt se dividieron en dos grupos. Un grupo de 4 miembros que no fue inmunizado con LCMV y un grupo de 5 miembros que fue inmunizado con 10 pfu de LCMV. A los 8 días se inocularon por vía subcutánea (s.c) dos poblaciones celulares distintas para inducir los tumores. En el costado izquierdo de cada ratón se pincharon 500.000 células EL4 y en el costado derecho se pincharon 500.000 células EL4gp33 (células EL4 presentando el péptido viral gp33). A partir de este día se hizo el seguimiento de los tumores midiendo su volumen cada dos días y finalmente cada ratón fue sacrificado cuando al menos uno de los tumores hubo alcanzado un volumen de 1 cm³. El volumen del tumor se calculó siguiendo la fórmula: $l \cdot a \cdot h$. (l:largo; a:ancho h:altura)

3.2.10. Evaluación de la respuesta de memoria frente al linfoma T EL4.

En este experimento se dispuso de 27 ratones wt que se distribuyeron en cuatro grupos. **Grupo 1**, constituido por 5 miembros, a los que no se inmunizó con virus y a los que se inoculó por vía s.c. 500.000 células EL4 en el costado izquierdo y 500.000 células EL4gp33 en el costado derecho al mismo tiempo que en los otros tres grupos (26 días desde el inicio del experimento). **Grupo 2**, constituido por 6 miembros, a los que se inmunizó con 10 pfu de LCMV y al mismo tiempo que en los otros tres grupos se inocularon por vía s.c las dos poblaciones celulares anteriores (día 26). **Grupo 3**, constituido por 8 miembros, a los que se inmunizó con 10 pfu del LCMV. A los 8 días se les inoculó 10⁶ células EL4 por vía i.p. y 11 días después de esta inoculación (día 19) estos ratones habían desarrollado tumores intraperitoneales, por lo que fueron sacrificados. **Grupo 4**, constituido por 8 miembros, a los que se inmunizó con 10 pfu del virus LCM. A los 8 días se les inoculó por vía i.p 10⁶ células EL4gp33. 18 días

después de esta inoculación (día 26), estos ratones carecían de tumores i.p y se les inoculó por vía s.c las poblaciones EL4 y EL4gp33 en el costado izquierdo y derecho respectivamente, al mismo tiempo que en los anteriores grupos (día 26).

Se hizo el seguimiento de los tumores midiendo su volumen cada dos días, y finalmente cada ratón fue sacrificado cuando al menos uno de los tumores hubo alcanzado un volumen de 1 cm³.

3.2.11. Análisis de la infiltración de linfocitos en los tumores.

Para cada grupo, se juntaron todos los tumores de cada tipo (EL4 y EL4gp33) y se procedió a su ruptura mecánica con ayuda del émbolo de una jeringa estéril obteniéndose una suspensión celular que se hizo pasar por un filtro de nylon de 100 µm. Se tomó una alícuota y se analizó la presencia de linfocitos infiltrados con los anticuerpos CD3 marcado en FITC, CD4 marcado en PE, CD8a marcado en APC, CD11b marcado en APC, CD11c marcado en PE, CD19 marcado en PE y NK1.1 marcado en PE (BD, España) todos a una dilución 1/50.

3.3. Técnicas de Biología Molecular.

3.3.1. Preparación de medios y cultivos bacterianos.

Todas las manipulaciones con medio autoclavado y con cultivos bacterianos se realizaron dentro del área estéril creada por la llama de un mechero de alcohol. Para preparar medio Luria Bertani (LB), se pesaron 10 g de triptona (Panreac), 5 g de extracto de levadura (Panreac) y 5 g de NaCl (Panreac), se disolvieron en 1L de agua destilada, se vertió la disolución en botellas de vidrio de 500 ml y se esterilizaron en un autoclave (Autestar Mod 4376, Selecta). Tras atemperarse, las botellas se almacenaron a 4° C. Para la preparación de placas de LB-agar, se pesaron 17,5 g de Plate Count Agar (Sigma) y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Se vertió la mezcla en botellas de vidrio de 500 ml y se esterilizaron en autoclave (Autestar Mod. 4376, Selecta). Una vez atemperado se le añadió el antibiótico de selección (Ampicilina, Roche) a 100 µg/ml, se homogeneizó por agitación suave y se fue vertiendo sobre placas Petri (50 ml/placa). El medio se dejó solidificar con las placas semiabiertas bajo la campana de flujo durante 2 horas. Una vez solidificado el LB-agar las placas se cerraron y se almacenaron a 4°C.

3.3.2. Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.

Las bacterias competentes se prepararon a partir de un cultivo de 10 ml de *E. coli* XL1-Blue. A este cultivo se le añadió 100 ml de medio estéril y se dejó crecer a 37° C en el agitador orbital hasta alcanzar la densidad adecuada ($A_{600nm} = 0,4$). Se recogió el volumen del cultivo en dos tubos estériles de 50 ml y se dejaron enfriar en hielo. Una vez fríos se centrifugaron 10 min a 4° C y 2851 xg. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml de tampón de trituración (100 mM $CaCl_2$, Merck; 70 mM $MgCl_2$, Merck; 40mM CH_3COONa , Panreac), se homogeneizó el pellet y se añadieron 30 ml de tampón de trituración. Se centrifugaron 15 min a 4° C 2851 xg y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 4 ml de tampón de conservación (100mM $CaCl_2$, Merck; 15% glicerol, Panreac). Las células se transformaron inmediatamente o se conservaron a -80° C en alícuotas de 400 µl.

Para la transformación de las bacterias se empleó el método de choque térmico, para lo cual se descongeló en hielo una alícuota de bacterias competentes para cada transformación y se les añadió 40 ng de DNA. Se incubaron 20 min en hielo, y seguidamente 1' 30'' a 42° C en el baño húmedo. A continuación se llevaron al hielo durante 2 min, tras lo cual se diluyó cada alícuota con 1ml de LB estéril y se incubaron 15 min a 37° C. Se centrifugaron 5 min a 2095 xg, se descartó parte del sobrenadante y se resuspendieron las bacterias ya transformadas para sembrarse en una placa Petri de LB-agar con el antibiótico de selección. Las placas se incubaron a 37° C en la estufa durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se seleccionaron varias colonias de la placa, transfiriendo cada una a un tubo estéril con 10 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección (100 µg/ml). Esta operación se realizó con un asa de cultivo esterilizada a la llama y rozando con el asa las paredes del tubo para asegurar la correcta resuspensión. La suspensión bacteriana se incubó a 37° C durante 24 horas en el agitador orbital. Se almacenó 1 ml de cada cultivo bacteriano con 400 µl de glicerol y se guardó a -80°C.

3.3.3. Extracción de DNA plasmídico.

Para obtener pequeñas cantidades de plásmido se utilizó el Kit GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen de cultivo de partida fueron 1,5 ml y la elución final se realizó con 50 µl H_2O milliQ estéril. Para obtener cantidades mayores de plásmido se necesitaron cultivos de entre 50 y 100 ml, y el kit de extracción de DNA empleado fue

el Kit Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (BioRad, USA). Las eluciones se realizaron en 600 µl de H₂O milliQ estéril.

3.3.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

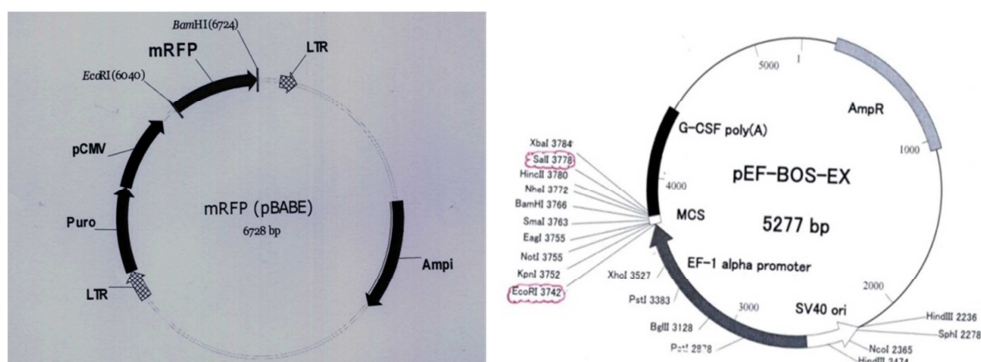
Los geles de agarosa al 1% se prepararon fundiendo la agarosa (Scharlau) en 30 ml de tampón TBE (0,045 M Tris-borato, 1 mM de EDTA). A esta mezcla se añadió SYBR-safe (1:10000, Invitrogen) para teñir el DNA y se vertió en los moldes para su gelificación. A la muestra de DNA se añadió el tampón de carga 10X (Takara) para determinar la posición del frente de la muestra en el gel. La estimación del peso de los fragmentos de DNA se realizó por comparación con marcadores de pesos moleculares. Como marcadores de pesos moleculares se emplearon λ /Hind III, 100 bp y 10 bp ladder (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 90 V, 400 mA, durante 30 min. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad).

3.3.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La determinación de las concentraciones tanto de vectores como de fragmentos de DNA se realizó usando alícuotas de 3 µl con el espectrofotómetro NanoVue (GEHealthcare, Amersham).

3.3.6. Plásmidos.

En primer lugar se utilizó el plásmido **pBabe-mRFP**, que contiene el cDNA de la proteína monomérica fluorescente roja (mRFP) como plásmido reportero para evaluar el porcentaje de transfección conseguido con los distintos métodos.



Para la obtención de la proteína MFG-E8 y forma mutada D89E se utilizó el plásmido **pEF-BOS-EX**. Los plásmidos, conteniendo uno el cDNA de la proteína

MFG-E8 y otro el cDNA para la proteína mutada en un aminoácido D89E, nos fueron cedidos amablemente por el grupo de Shigekazu Nagata, (Osaka, Japón). Este plásmido contiene un gen de resistencia para la ampicilina, un origen SV40 que permitirá la replicación del plásmido en las células, el promotor de alta eficiencia EF-1 α (factor de elongación de la traducción) que proporcionará una elevada expresión del inserto, un sitio de restricción múltiple donde se encuentran los insertos y una cola de poliadenilación con el fin de que se forme un mRNA de nuestras proteínas estable. Los insertos presentan en su extremo C-terminal una cola FLAG que nos facilitará la purificación y detección de nuestras proteínas.

3.4. Transfección de células HEK.

3.4.1. Transfección con el vector reportero pBabe-mRFP.

3.4.1.1. Transfección mediante el método de fosfato de calcio con el tampón Hepes.

Se sembraron las células HEK un día antes en placas de 10 cm de diámetro, a una densidad tal que al día siguiente se encontraran a una confluencia del 60-70%. Antes de realizar la transfección se añadieron 10 ml de medio nuevo y 3 μ l de cloroquina 1mM. Esta última inhibe la acidificación de los lisosomas, reduciendo la digestión del complejo DNA-fosfato de calcio que ha entrado en la célula. Se preparó la mezcla de transfección añadiendo los siguientes reactivos: 10 μ g de plásmido pBabe + 500 μ l de CaCl_2 0.25 M (Merck) + 500 μ l de HBS 2X (NaCl 274 mM, Merck; Hepes 50 mM, Sigma; Na_2HPO_4 1,5 mM, Merck;) a 3pHs distintos: 7, 7.09, 7.16. La mezcla anterior se burbujeó durante 15 seg con una pipeta Pasteur con filtro y se añadió gota a gota a la placa de células HEK. Se agitaron las placas suavemente y se incubaron a 37°C durante al menos 6 horas. Tras este tiempo se sustituyó el medio por 10 ml de medio OptiMEM (Invitrogen).

3.4.1.2. Transfección mediante el método de fosfato de calcio con el tampón BES.

En segundo lugar se realizó otro **método de fosfato de calcio modificado**, que utiliza como tampón la solución BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES;Calbiochem-Novabiochem) 50 mM, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1.5mM pH 6.95) en vez del tampón HBS. Este método parece proporcionar una mayor efectividad en la transfección, especialmente en los casos de transfección estable, ya que favorece la

formación gradual de las partículas de fosfato de calcio, que se irán depositando sobre la superficie de las células [76]. Se sembraron las células HEK a una densidad tal que al día siguiente hubiera una confluencia del 60-70%. Se añadieron 10 ml de medio nuevo y 3 μ l de cloroquina 1mM antes de añadir la mezcla de reacción: 10 μ g plásmido *pBabe-mRFP* + 500 μ l CaCl_2 0.25 M + 500 μ l BES. La mezcla de reacción se añadió gota a gota y las placas se dejaron incubando toda una noche en una estufa a un 3% de CO_2 , de forma que al día siguiente el pH del medio sea ligeramente alcalino pH 7.6, hecho que favorece el proceso de transfección.

3.4.1.3. Transfección con el reactivo PEI.

En el último método se utilizó el reactivo **Polietilenimina** (PEI, Aldrich). En este caso las células HEK se sembraron un día antes en placas a una densidad tal que alcanzaran una confluencia del 90% en el momento de la transfección. Se añadieron 5 ml de medio OPTIMEM justo antes de llevar a cabo el procedimiento y en un falcon se añadieron 5 ml de medio OPTIMEM junto con: 45 μ g de plásmido *pBabe-mRFP* + 67.5 μ l de una disolución de PEI 1 mg/ml filtrada y ajustada a pH 7 para una relación DNA/PEI de 1:1.5 o 90 μ l de PEI en el caso de una relación DNA/ PEI 1:2. Se agitó la mezcla y se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron los 5 ml gota a gota sobre las placas.

Para los tres métodos a las 48 horas se tomaron fotografías de las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia. A continuación se despegaron las células con tripsina, se homogeneizaron bien y se tomó una alícuota de 50 μ l para evaluar la viabilidad celular y una alícuota de 500 μ l que se centrifugó, se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en 300 μ l de PFA 1% para cuantificar la fluorescencia mediante citometría de flujo.

3.4.2. Transfección con el vector pEF-BOS-EX conteniendo las proteínas MFG-E8 y su forma mutada D89E.

Se transfectaron las células HEK con el plásmido conteniendo la proteína MFG-E8 y el plásmido conteniendo la forma mutada D89E utilizando el reactivo PEI. Una vez transfectadas las células, se dejaron incubar cuatro días y se procedió a la recogida del medio de cultivo, pues estas proteínas son secretadas al medio extracelular ya que contienen una secuencia de secreción en su extremo N terminal. Se añadieron 10 ml de medio OPTIMEM nuevo y se dejaron las células tres días más en cultivo hasta la

recogida del segundo sobrenadante. Estos sobrenadantes se centrifugaron y filtraron (0,22 μ m, Pall Corporation, USA) para eliminar posibles restos celulares y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.5. Purificación de proteínas.

Las dos proteínas tienen fusionadas el péptido FLAG (DYKDDDDK) en su extremo carboxilo. Esto nos permitió purificarlas usando una columna con una Resina M2 ANTI-FLAG (Sigma, Madrid) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

3.6. Análisis de las proteínas obtenidas tras la purificación.

3.6.1. Separación de proteínas. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La separación de proteínas en función de su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes, conteniendo un 0,1% de SDS. Se tomó una alícuota de 10 μ l de la fracción eluida para cada proteína, se añadieron 5 μ l de tampón de carga 3x y se incubó la mezcla durante 5 min a 107°C. A continuación las muestras se centrifugaron (30 seg, 335 xg) en una minifuga y se aplicaron en los pocillos. Las condiciones de electroforesis fueron de 20 mA por gel y 180 V, con un tiempo medio de unos 60-90 min. La electroforesis se realizó en presencia del tampón de electroforesis con una composición Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 3,4 mM.

3.6.2. Transferencia de proteínas a membranas

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF incubadas previamente durante 30 seg en metanol para que se lleve a cabo su activación. En la transferencia se usa un tampón compuesto por Tris HCl 48 mM pH 8,3, glicina 39 mM, SDS 0,037% y metanol de calidad HPLC 20% (v/v). La transferencia se realizó a 20 V durante 55 min. Los pesos moleculares relativos de las proteínas detectadas se calcularon en relación a los pesos moleculares de los patrones estándar de proteínas.

3.6.3. Análisis de las proteínas por inmunoblot (Western Blotting)

Una vez las proteínas quedaron inmovilizadas en las membranas de PVDF se procede a su detección con el uso de un anticuerpo específico. Para ello la membrana

debe bloquearse previamente con un tampón compuesto por leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (NaCl 0,12 M, Tris/HCl 10 mM pH 8, Tween-20 0,5% (p/v) en PBS pH 7.4), durante 30 min a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente, la membrana se incubó durante toda la noche, a 4°C y con agitación suave, con el anticuerpo específico, en este caso, un anticuerpo M2 anti-FLAG (Sigma), que reconoce la secuencia del péptido FLAG presente en las proteínas purificadas. Este anticuerpo primario se incubó a una concentración 1/1000 diluyéndose en una solución en tampón B de leche en polvo al 2,5% (p/v). Finalizada la incubación, la membrana se lavó con tampón B, 3 veces durante 10 min, con agitación moderada en todo momento. A continuación, las membranas se incubaron en tampón A con el anticuerpo secundario correspondiente, en este caso un anticuerpo contra las IgGs de ratón conjugado con la enzima peroxidasa, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave a una concentración de 0,05 µg/ml. Pasada esta hora, la solución del anticuerpo se retiró y la membrana se lavó abundantemente, 4 veces durante 15 min, agitando moderadamente con la disolución de lavado B.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante captación de la señal quimioluminiscente en films fotográficos, tras incubar la membrana con una disolución para revelado quimioluminiscente (GE HealthCare) durante 90 seg, y posterior exposición de la membrana con el film en oscuridad durante 15 min.

Los líquidos de revelado y fijado utilizados fueron de la marca AGFA, y la preparación de los mismos se realizó según las instrucciones del fabricante.

3.7. Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 5. En todos los casos se utilizó el test t no pareado, a dos colas, siendo el intervalo de confianza de un 95 %. De forma que * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. El símbolo ns es una abreviatura de no significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Optimización del protocolo y estudio del mecanismo de eliminación *in vivo* de la línea celular de linfoma de células T EL4.

4.1.1. Evaluación del papel de las granzimas A y B en la eliminación *in vivo* de células EL4 mediada por linfocitos Tc.

El objetivo principal de este trabajo era analizar si la muerte inducida por linfocitos Tc sobre el linfoma EL4 es inmunogénica y, por tanto, crea memoria inmunológica frente a este tipo de tumores. Por ello, en primer lugar se quiso evaluar los mecanismos utilizados por los linfocitos Tc para eliminar las células EL4 *in vivo* y en concreto el papel que juegan en estos mecanismos la grzmA y la grzmB.

Para ello se utilizaron ratones wt y grzmAxB^{-/-} sin inmunizar o inmunizados con LCMV. Ocho días más tarde se inocularon dos poblaciones celulares marcadas con 0.5 μ M (EL4) y 5 μ M (EL4 gp33) de la sonda de fluorescencia verde (CTG) a una relación 1:1. Las células marcadas con 5 μ M CTG se habían incubado previamente con el péptido inmunodominante del LCMV gp33. De este modo se analiza la desaparición de las células con fluorescencia alta (gp33) respecto a las células con fluorescencia baja que no presentan antígeno viral y por tanto no son eliminadas por los linfocitos Tc antivirales.

Como se puede observar en la figura 4.1.1, los ratones wt eliminan de forma más eficaz las células diana en comparación con los ko para las grzms A y B tanto a una concentración baja (10^1 pfu) como alta (10^4 pfu) de virus, aunque los ratones grzmAxB^{-/-} también son capaces de eliminarlas parcialmente. Para ambas cepas, los ratones que no han sido inmunizados con virus no son capaces de eliminar a la población diana al no poseer linfocitos Tc antivirales y la eliminación es más eficaz si se inmuniza con una mayor concentración de virus (10^4 pfu). Se analizó además el porcentaje de linfocitos Tc en el peritoneo de los ratones, siendo mayor a una concentración de virus de 10^4 pfu tanto en los ratones WT como en los grzmAxB^{-/-}, pudiendo relacionarse esto con la mayor citotoxicidad observada. Para ambas cepas el número de linfocitos Tc en el peritoneo es similar, de forma que la menor citotoxicidad en los ratones grzmAxB^{-/-} se debe a la ausencia de ambas grzms y no a que posean un menor número de linfocitos Tc.

Los ratones que no han sido inmunizados con el virus no presentan apenas linfocitos Tc en el peritoneo.

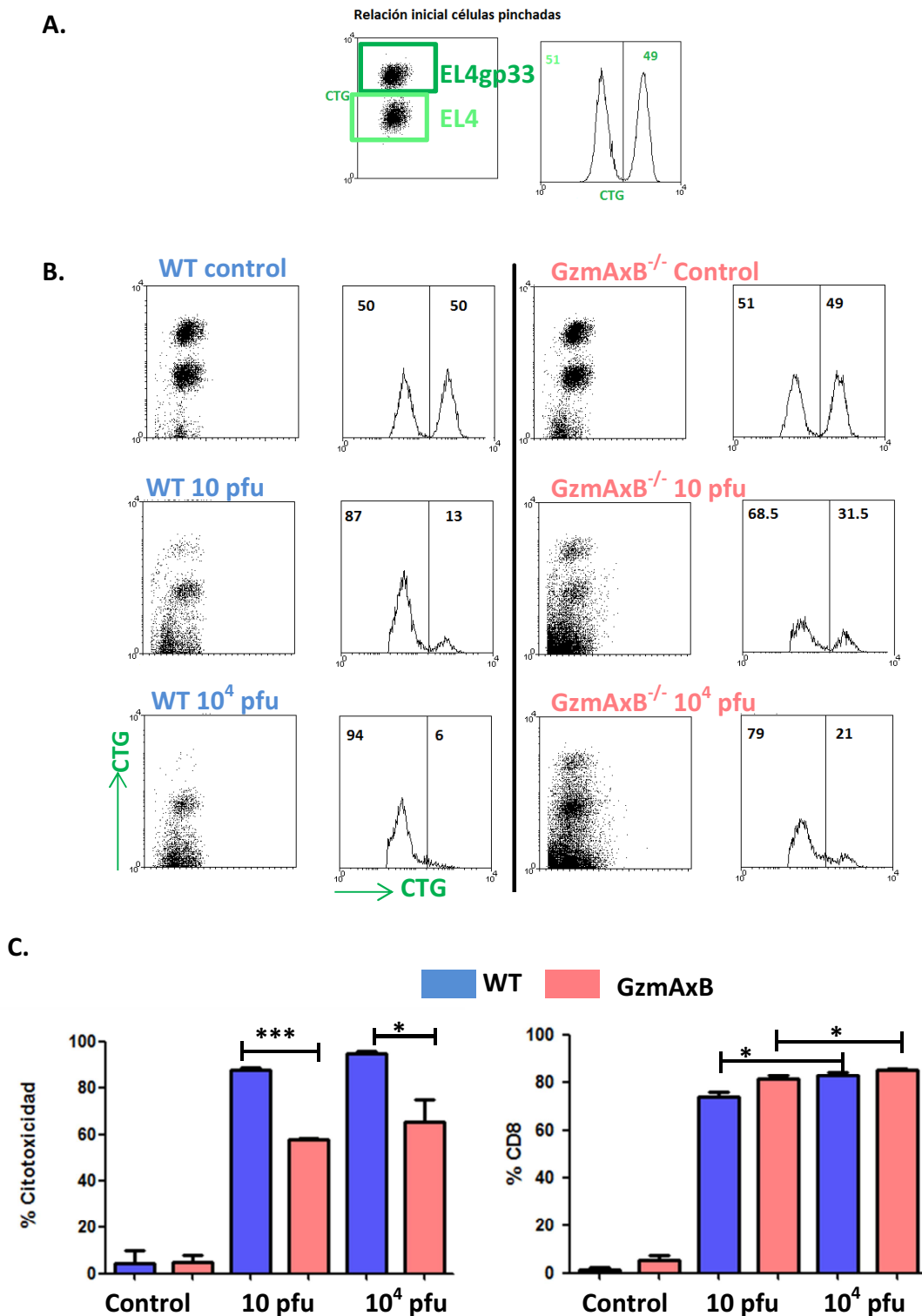


Figura 4.1.1. Eliminación *in vivo* de células EL4 en ratones WT y GzmAxB^{-/-}. Ratones wt y gzmAxB^{-/-} fueron divididos en tres grupos: un grupo control sin inmunizar y dos grupos inmunizados con 10 y 10⁴ pfu de LCMV. A los ocho días se inoculó por vía i.p 500.000 células EL4 sin incubar (-gp) y 500.000 células EL4 incubadas (+gp) con el péptido inmunodominante gp33 marcadas con 0.5 y 5 μ M de sonda CTG respectivamente. **A.** Relación de células antes de la inoculación. **B.** Una hora tras las inoculación se realizaron los lavados peritoneales y se evaluó la desaparición de la población diana (EL4 +gp) respecto a la población EL4 -gp. **C.** Se representa el % de citotoxicidad para cada grupo, calculado como: $1 - (\% \text{población +gp} / \% \text{población -gp}) \times 100$. Se compara la citotoxicidad para los

ratones WT y $gzmAxB^{-/-}$ a las dos concentraciones de virus. **D.** Gráfica que representa el % de linfocitos Tc en el peritoneo de los ratones para ambas cepas. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de tres ratones independientes.

Se evaluó también la expresión de gzms mediante marcaje intracelular en linfocitos Tc aislados del bazo de estos ratones. Los ratones ko no expresan ni gzm A ni gzm B y expresan algo de gzmK, pues se observa un segundo pico en la señal del histograma, el problema es que el isotipo ha dado demasiada señal y no se ve muy claro. En el caso de los ratones wt se observa como el control sin inmunizar no expresa ninguna de las tres gzms, mientras que en los ratones inmunizados con 10^4 pfu se ve una expresión similar tanto de gzmA como de gzmB. De forma que la diferencia de citotoxicidades observadas para los grupos a las dos concentraciones de virus en los ratones WT no parecen deberse a diferencias de expresión de gzms, sino a diferencias en el número de linfocitos Tc presentes en el peritoneo.

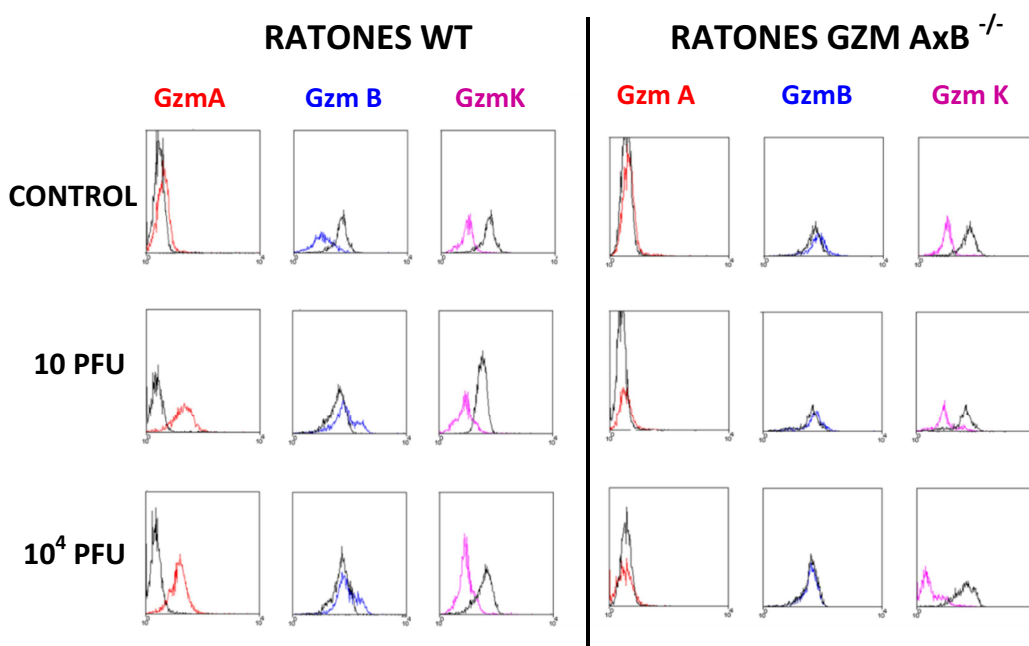


Figura 4.1.2: **Expresión de granzimas A, B y K en linfocitos Tc aislados del bazo en ratones WT y Gzm AxB^{-/-}.** Se aislaron linfocitos Tc del bazo de ratones control (no inmunizados) o inmunizados con 10^4 pfu del virus LCM y se analizó la expresión de gzm A, B y K mediante marcaje intracelular tal y como se describe en materiales y métodos.

4.1.2. Evaluación de la contribución de linfocitos Tc en la eliminación *in vivo* de células EL4.

Tanto en el experimento anterior como en todos los experimentos de citotoxicidad *in vivo* realizados anteriormente en nuestro laboratorio se observa una disminución en la población de células EL4 marcadas con el péptido viral gp33 en

aquellos ratones a los que se ha inmunizado con virus. La población de células EL4 sin péptido no debería ser eliminada, por no presentar ningún péptido que los linfocitos Tc generados frente a LCMV puedan reconocer. Sin embargo, el número de células EL4 recuperadas tras realizar los lavados peritoneales es mucho menor en el grupo inmunizado con virus respecto al grupo control (figura 4.1.3) Las poblaciones EL4gp33 y EL4 en el ratón sin inmunizar con virus representan un 9% de la muestra del lavado peritoneal y mantienen la relación 1:1. Mientras que en el ratón inmunizado con virus, la población EL4 marcada con el péptido al ser diana de los linfocitos Tc, desaparece casi completamente (0.03%). Sin embargo, la población EL4, aunque se mantiene, también disminuye al compararla con el ratón control, reduciéndose su presencia hasta un 1.21%. Cuando se cuantificó el número de células recuperadas se observa que este valor es mucho menor en el grupo donde se ha inmunizado con el virus LCM que en el grupo control, incluso en las células donde no se había marcado con el péptido EL4. Se quiso evaluar si esta disminución se debía a que las células migraban a otros órganos; y si no era así, la otra posible explicación es que estarían siendo eliminadas por algún mecanismo inespecífico mediado por células del peritoneo activadas durante la infección.

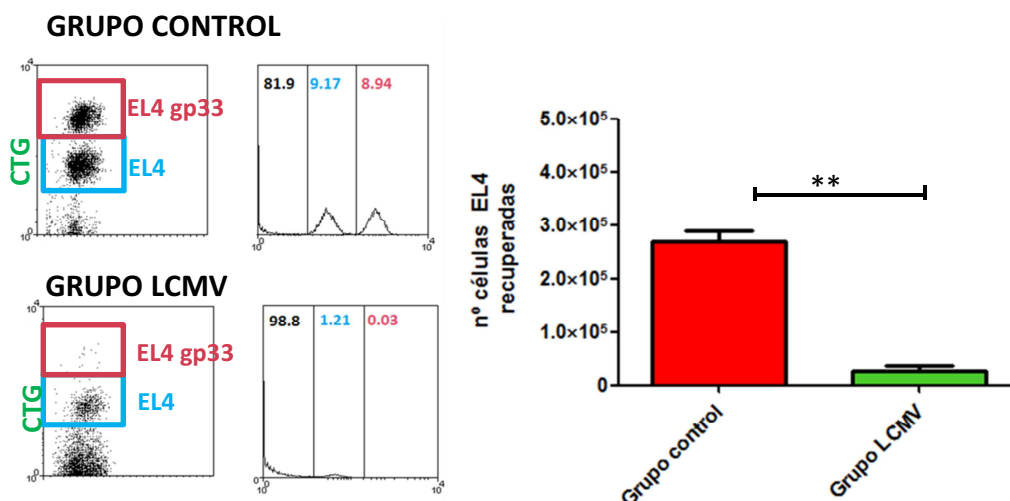
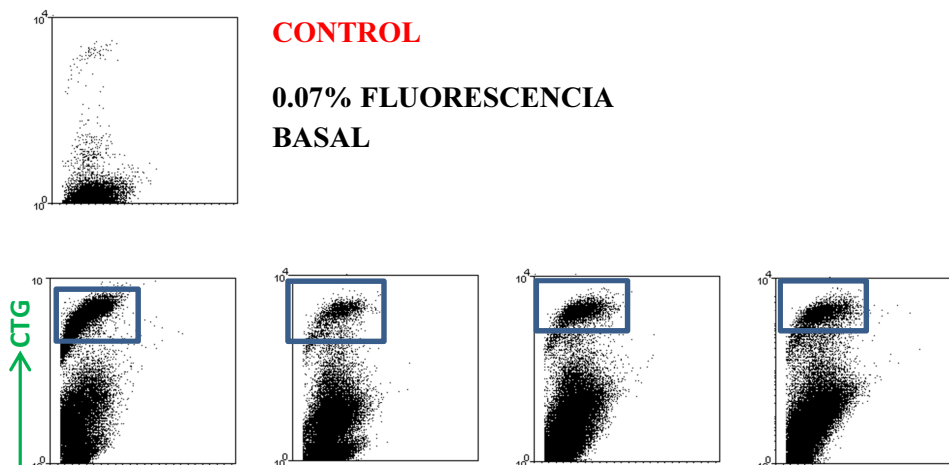


Figura 4.1.3.: **Análisis de la recuperación de células EL4 del peritoneo de ratones inmunizados o no con el virus LCM.** Ratones wt fueron inmunizados o no con 10 pfu de LCMV. A los ocho días se inoculó por vía i.p 500.000 células sin incubar (-gp) y 500.000 células EL4 incubadas (+gp) con el péptido inmunodominante gp33 previamente marcadas con una concentración de 0.5 y 5 μ M de sonda CTG respectivamente. Una hora tras la inoculación se realizaron los lavados peritoneales y se evaluó el número total de células EL4+gp (recuadro rosa) y EL4 (recuadro azul) recuperadas del peritoneo. A partir de la densidad celular y el volumen de las muestras de lavados peritoneales y conociendo el % de células EL4 presente en cada muestra se calcula el número de células EL4 sin marcar con el péptido (-gp) recuperadas para cada miembro del grupo tal y como se representa en la gráfica. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de tres ratones independientes.

Para aclarar esta cuestión, en primer lugar se evaluó si las células EL4 sin marcar con el péptido gp33 migraban a otros órgano tal y como se describe en materiales y métodos (3.2.5).

PERITONEO:

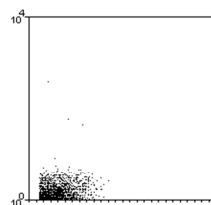


	NO LCMV	10² pfu	10³ pfu	10⁴ pfu
% EL4	21,85 ± 5,44	1,35 ± 0,44	2,60 ± 3,05	3,05 ± 0,45
Nº células	3,80·10 ⁶	3.68·10 ⁵	4.56·10 ⁵	1.2·10 ⁶
% Recu- peración	76	7	9	24

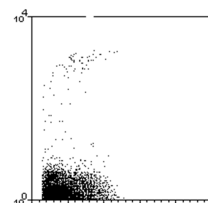
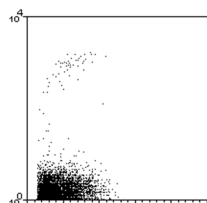
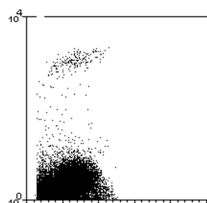
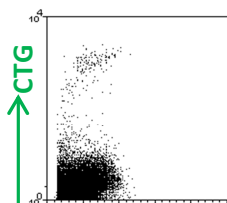
Figura 4.1.4: **Presencia de células EL4 en el peritoneo de los ratones tras la inoculación intraperitoneal.** Se inocularon por vía i.p $5 \cdot 10^6$ de células EL4 marcadas a una concentración de $2.5 \mu\text{M}$ de sonda CTG y sin marcar con el péptido gp33 en ratones C57BL/6 wt distribuidos en cuatro grupos: sin inmunizar e inmunizados con 10^2 , 10^3 y 10^4 pfu de LCMV ocho días antes. Se muestran los gráficos de puntos representativos de cada grupo para las muestras recogidas del peritoneo. Debajo de cada grupo se indica el % de células EL4 frente al total de células obtenidas tras el lavado peritoneal, el número total de células EL4 y el % (media \pm SD de 3 ratones) de recuperación respecto al número de células EL4 pinchadas inicialmente. EL % de recuperación se calcula como (células EL4 recuperadas del peritoneo/células inoculadas)*100.

Como se observa en la figura 4.1.4, en los ratones sin inmunizar con virus se recupera un 76% de las células EL4 pinchadas inicialmente, mientras que en los ratones donde se han pinchado virus el porcentaje de recuperación es mucho menor (7, 9, 24 %), que apoya lo visto anteriormente. De forma que esto parece indicar que la desaparición de las células EL4 depende de la activación del sistema inmune con el virus LCM, pero no se observa que a mayores concentraciones de virus haya una mayor desaparición.

BAZO:



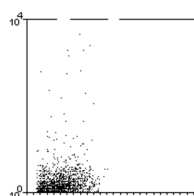
CONTROL
0,01 % FLUORESCENCIA
BASAL



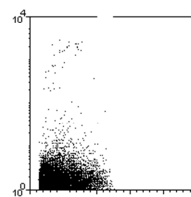
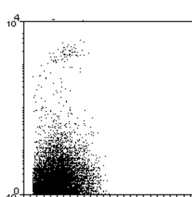
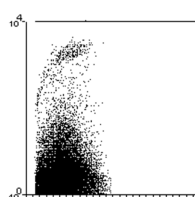
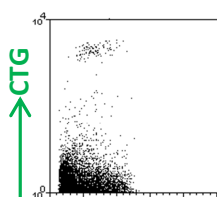
	NO LCMV	10 ² pfu	10 ³ pfu	10 ⁴ pfu
%EL4	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,05	0	0
Nº cel.	7,83 · 10 ³	3,06 · 10 ⁴	0	0
%Migración	0.16	0.61	0	0

Figura 4.1.5: Presencia de células EL4 en el bazo de los ratones tras la inoculación intraperitoneal tal y como se describe en la figura 4.1.4.

GANGLIOS MESENTÉRICOS:



CONTROL
0,03 % FLUORESCENCIA BASAL



	NO LCMV	10 ² pfu	10 ³ pfu	10 ⁴ pfu
%EL4	0,02	0,04	0	0
Nº cel.	3,00 · 10 ²	2,83 · 10 ³	0	0
%Migración	0.006	0.06	0	0

Figura 4.1.6: Presencia de células EL4 en los ganglios mesentéricos de los ratones tras la inoculación intraperitoneal tal y como se describe en la figura 4.1.4.

Como se observa en la figura 4.1.5, en cada uno de los grupos correspondientes a las muestras del bazo, si comparamos con el control, se observa una ligera población

fluorescente, por lo que parece que las células EL4 migran algo hacia el bazo. Sin embargo, en los grupos de 10^3 y 10^4 no es posible cuantificar este porcentaje frente al total de células. Y en el caso de los otros dos grupos donde sí es posible cuantificar esta presencia, el número de células EL4 presentes en el órgano es extremadamente reducido ($7.83 \cdot 10^3$ para el grupo sin virus y $3.06 \cdot 10^4$ para el grupo inmunizado con 10^2 pfu) si lo comparamos con el número de células EL4 que pinchamos inicialmente ($5 \cdot 10^6$). En los ganglios mesentéricos, como se observa en la figura 4.1.6, de nuevo hay una ligera población fluorescente para cada uno de los grupos, que es posible cuantificar en el caso del grupo de ratones sin virus y del grupo 10^2 pfu, aunque el número de células fluorescentes que han migrado a los ganglios respecto a las que pinchamos es muy bajo (0.06 y 0.057% respectivamente). En los dos últimos grupos, no es posible cuantificar la población fluorescente aunque sí que podemos detectarla en los gráficos.

HÍGADO:

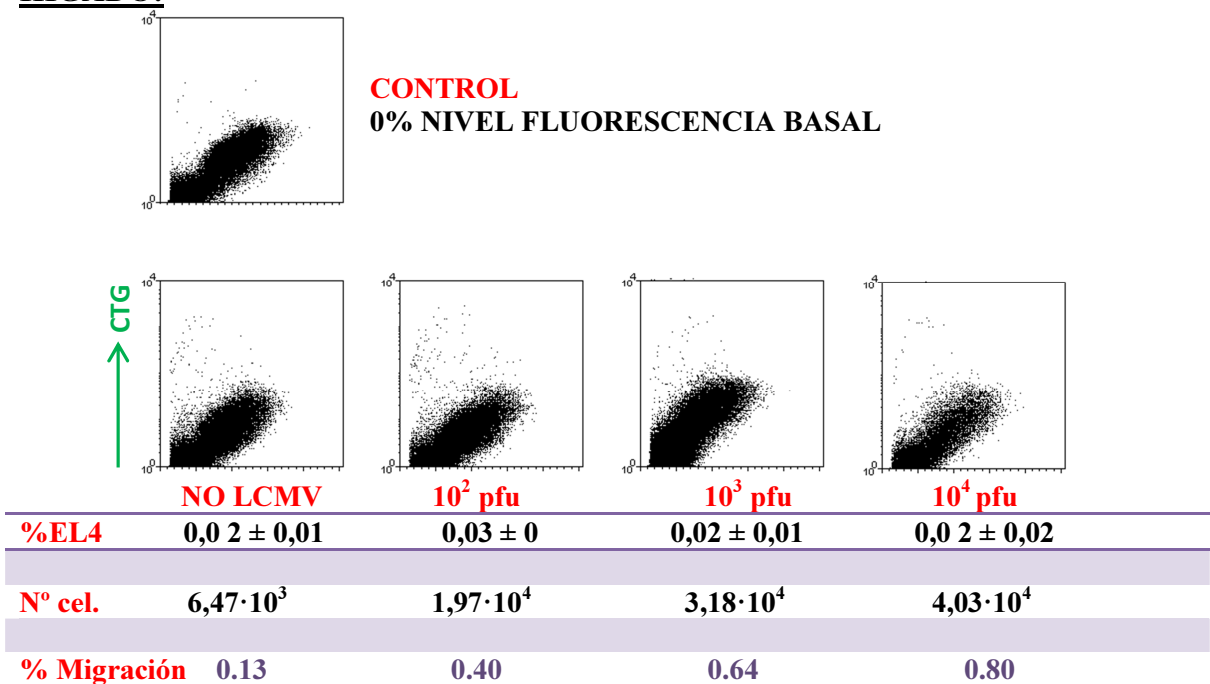
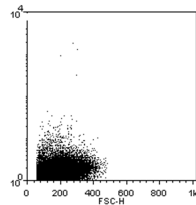


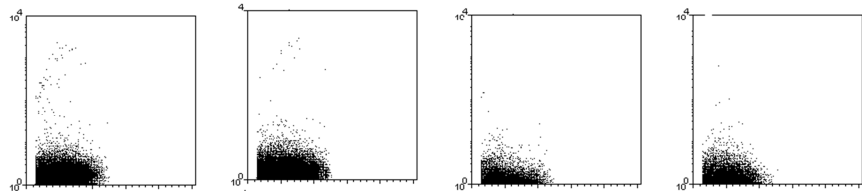
Figura 4.1.7. Presencia de células EL4 en el hígado de los ratones tras la inoculación intraperitoneal tal y como se describe en la figura 4.1.4.

En el hígado sí que se observa una población fluorescente que es posible cuantificar en todos los grupos, aumentando el % de migración con la concentración de virus pinchada. Por lo que hasta ahora este es el órgano donde ha tenido lugar una mayor migración, aunque sigue siendo minoritaria, ya que solo se detectan 40.000 células EL4 de los 5.000.000 de células que pinchamos inicialmente en el caso del grupo de 10^4 pfu, que es donde se observa el máximo porcentaje de migración.

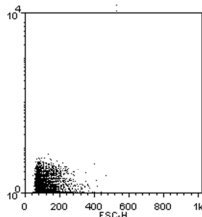
PULMONES:



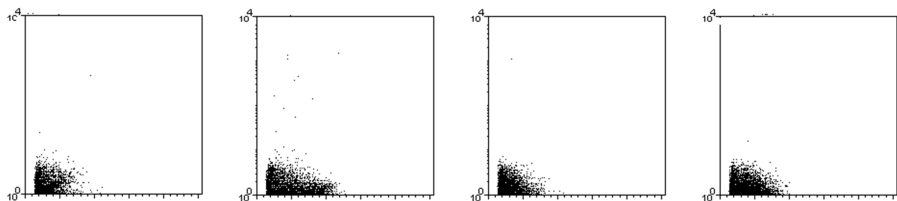
CONTROL
0% NIVEL FLUORESCENCIA BASAL



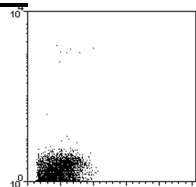
TIMO:



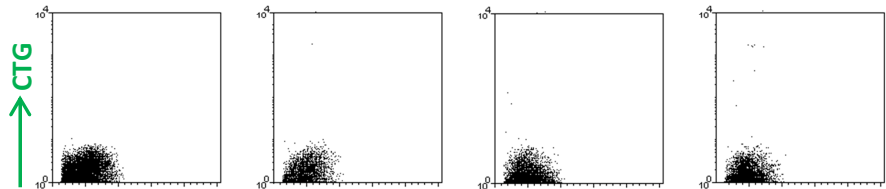
CONTROL
0% NIVEL FLUORESCENCIA BASAL



MÉDULA:



CONTROL
0% NIVEL FLUORESCENCIA BASAL



	NO LCMV	10 ²	10 ³	10 ⁴
%EL4	0	0	0	0

Figura 4.1.8 Presencia de células EL4 en pulmones, timo y médula ósea de los ratones tras la inoculación intraperitoneal tal y como se describe en la figura 4.1.4.

En los pulmones no se detecta población fluorescente en ninguno de los grupos, por lo que parece ser que las células EL4 no migran a este órgano. Se quiso evaluar si las células EL4 migraban al timo, ya que esta línea tumoral es un linfoma tímico y cabía la posibilidad de que migraran a su órgano de origen. Pero comprobamos que no era así y no se detecta población fluorescente en ningún grupo. En la médula ósea se obtienen los mismos resultados que en los dos órganos anteriores, las células EL4 parecen no migrar.

De forma que resumiendo todos los datos anteriores obtenemos que:

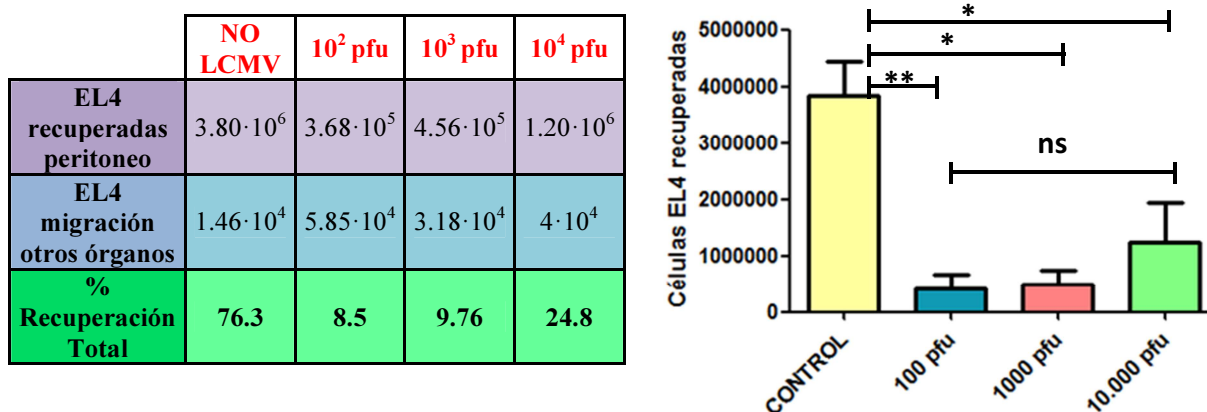


Figura 4.1.9. **Recuperación de las células EL4 en los distintos órganos analizados en los distintos grupos de ratones.** En la tabla se muestra el número de células EL4 recuperadas del peritoneo y el total de células recuperadas del resto de órganos analizados. Con estos datos y considerando los $5 \cdot 10^6$ de células inicialmente inoculadas, se calcula el % de recuperación total como (células recuperadas todos los órganos/células inicialmente inoculadas) * 100. En la gráfica se representa el número total de células EL4 recuperadas (peritoneo y el resto de órganos) para cada uno de los grupos y se compara el grupo control con los grupos inmunizados con virus. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de tres ratones independientes.

Con estos datos desechamos la hipótesis de que la desaparición de las células EL4 se deba a su migración desde el peritoneo donde son inoculadas a órganos cercanos.

4.1.3. Evaluación del papel de la perforina en los mecanismos de eliminación de células EL4 *in vivo* independientes de linfocitos Tc.

Los resultados anteriores indican que las células EL4 no migran a otros órganos y por tanto sugieren que son eliminadas por otros mecanismos independientes de antígeno. Los dos posibles candidatos a llevar a cabo esta eliminación son los macrófagos y las células NK que se encuentran en el peritoneo de los ratones. Ambas poblaciones celulares son capaces de ejercer citotoxicidad sobre células tumorales. Si

bien sólo en el caso de las células NK se ha descrito que la vía de exocitosis granular sería el principal mecanismo de su acción citotóxica y, por tanto, la ausencia de *perforin* impediría la eliminación de las células EL4 [53]. Para testar esta hipótesis se utilizaron ratones *perforin*^{-/-} y se evaluó la eliminación de células EL4 independiente de antígeno en ellos.

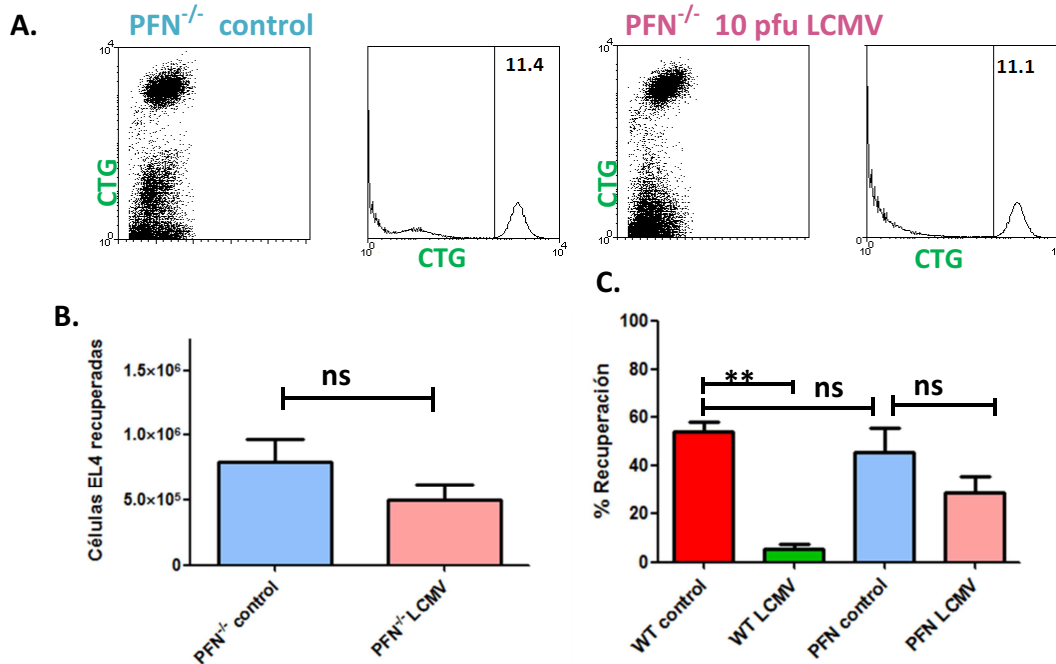


Figura 4.1.10: **Eliminación *in vivo* de células EL4 en ratones *PFN*^{-/-}.** Se inocularon $1.75 \cdot 10^6$ células EL4 sin incubar con el péptido (-gp) y marcadas previamente con 2.5 μ M de sonda CTG a cada ratón *pfⁿ*^{-/-} en el grupo sin inmunizar e inmunizado con 10 pfu de virus LCMV 8 días antes. Dos horas tras la inoculación se realizaron los lavados peritoneales y se evaluó el número de células EL4 (-gp) recuperadas. **A.** Representación de un miembro de cada grupo, donde se muestra el gráfico de puntos y el histograma de las muestras obtenidas de los lavados peritoneales. EL % de células EL4 en la muestra de lavado peritoneal no disminuye en el grupo inmunizado con el virus como ocurría en los ratones wt. **B.** Gráfica que representa el número de células EL4 recuperadas (calculado a partir del volumen, la densidad celular y el % de células EL4 de las muestras de lavado peritoneal) para el grupo sin inmunizar e inmunizado con virus. **C.** Gráfica donde se representa el % de recuperación de las células EL4 inoculadas en ratones wt en experimentos anteriores y el % de recuperación en ratones *pfⁿ*^{-/-} inmunizados o no con el virus LCM. El % de recuperación se calcula como: (células EL4 recuperadas/células EL4 inoculadas)*100. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de tres ratones independientes.

Tal y como se observa en la figura 4.1.10 para los ratones deficientes en *perforin* se recupera un número similar de células EL4 en ratones inmunizados o no con el LCMV, mientras que el número de células recuperadas en ratones wt inmunizados con el LCMV es significativamente inferior, como ya habíamos descrito.

Con el fin de evaluar si las células eliminadas eran fagocitadas por células peritoneales se analizó la presencia de la sonda CTG en dichas células utilizando el marcador CD11b (figura 4.1.11). El marcador CD11b es una integrina que se expresa principalmente en macrófagos y un subtipo de células dendríticas denominadas

mieloides. El marcaje de los lavados peritoneales nos permitió distinguir una población de células CD11b⁺ que había fagocitando a las células EL4, puesto que dan señal para el marcador CD11b y además dan señal de fluorescencia verde (procedente de la sonda CTG con la que hemos marcado a las células EL4). Para cada grupo se calculó el % de células EL4 que estaban siendo fagocitadas, siendo la media de un 8.8% y un 5.6% para el grupo control y el grupo LCMV respectivamente.

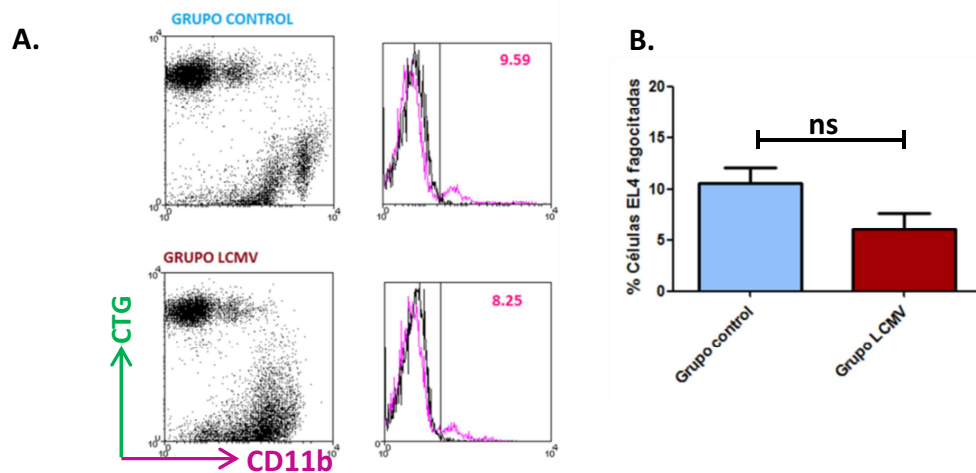


Figura 4.1.11. **Fagocitosis de las células EL4.** Se inocularon $1.75 \cdot 10^6$ células EL4 marcadas con una concentración de $2.5 \mu\text{M}$ de sonda CTG en ratones $\text{pfn}^{-/-}$ inmunizados o no con el virus LCM ocho días antes. Tras 2 horas se realizaron lavados peritoneales y se marcaron las células con un anticuerpo anti-CD11b marcado con APC. **A.** Gráfico de puntos de un animal representativo de cada grupo. Los histogramas reflejan el % de células CD11b positivas dentro de las células CTG⁺ tal y como se delimita con la línea vertical; CD11b APC se muestra en rosa y el isotipo en negro. **B.** Gráfica donde se representa el % de células fagocitadas por las células CD11b⁺ para cada grupo de ratones tal y como se calcula en los histogramas indicados en A. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de tres ratones independientes.

4.1.4. Optimización del protocolo de eliminación *in vivo* de células tumorales mediada por linfocitos Tc utilizando la sonda fluorescente eFluor670.

El siguiente objetivo fue optimizar el protocolo de los experimentos de citotoxicidad *in vivo*. Para ello, se quiso incorporar la sonda eFluor670 con un máximo de emisión en la zona de fluorescencia roja y utilizarla al mismo tiempo que la sonda CTG (máximo de emisión en la zona verde) para marcar cada población celular. Quizá esto nos permitiría distinguir mejor las poblaciones que el uso de una sonda a dos concentraciones distintas. Además nos daría la posibilidad de utilizar las dos sondas a dos concentraciones diferentes y distinguir hasta cuatro poblaciones celulares en un único animal. De este modo se reduciría el número de animales a utilizar.

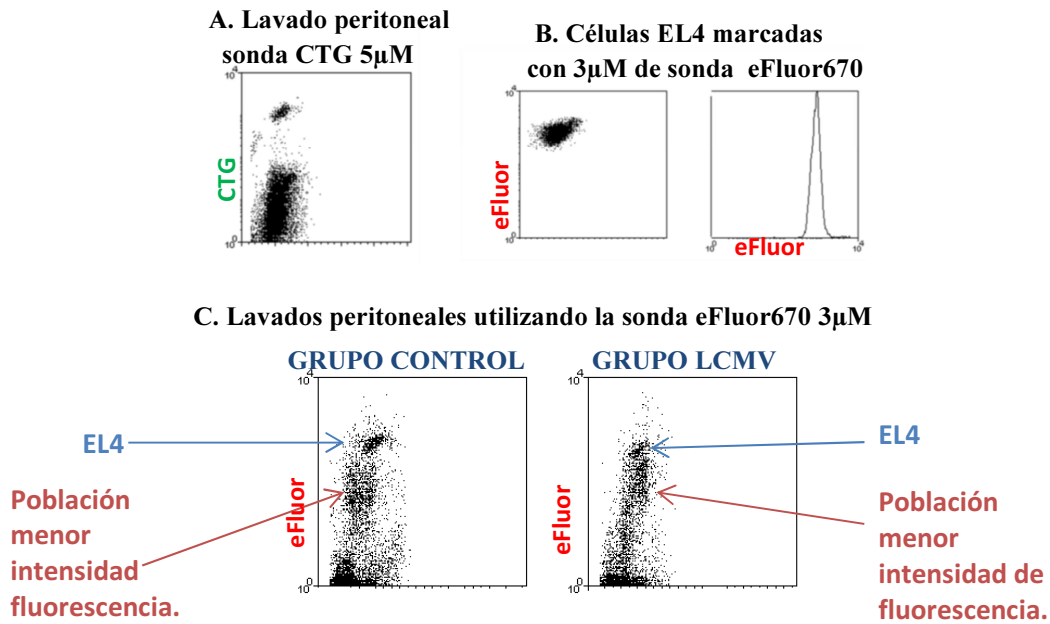


Figura 4.1.12: **Análisis de la recuperación de células EL4 marcadas con sonda CTG o eFluor670 del peritoneo de ratones inmunizados o no con el virus LCM.** Se inocularon por vía i.p 500.000 células EL4 marcadas con una concentración de CTG 5 μM (A) o eFluor670 3 μM (B y C) en el peritoneo de ratones inmunizados 8 días antes con 10^5 pfu de virus LCM o sin inmunizar. Tras dos horas se realizaron los lavados peritoneales y se analizó la presencia de las células EL4 por citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos e histogramas representativos de cada grupo de animales. Las imágenes en B corresponden a las células EL4 antes de ser inoculadas en los animales.

Tal y como se observa en la figura 4.1.12 (C y A) las células marcadas con la sonda eFluor670 no se separan tan bien de las células peritoneales como cuando se usa la sonda CTG, distinguiéndose dos poblaciones fluorescentes con distinta intensidad. Sin embargo, solo deberíamos ver una, pues en este caso solo hemos pinchado células a una sola concentración de sonda como se refleja en la figura correspondiente a una muestra de las células antes de su inoculación (Figura 4.1.12.B). Esta población menos fluorescente pueden ser células EL4 que han perdido sonda o células del peritoneo que se vuelven fluorescentes, bien por la presencia de sonda en el ambiente, o porque han fagocitado las células EL4. Cabe destacar que tanto en los ratones sin virus como en los que hemos pinchado virus se observa este hecho, si bien el efecto es más pronunciado en los ratones infectados. Para determinar si esta población que observamos son las células pinchadas o células del peritoneo realizamos un experimento donde utilizamos ratones Balb/c que presentan un haplotipo H-2d para las moléculas de MHC-I. Si marcamos con el anticuerpo H-2K^d, este se unirá al MHC-clase I presente en la superficie de todas las células peritoneales (Balb/c), pero no al de las células EL4, ya que estas proceden de ratones C57BL/6 cuyo haplotipo es H-2b.

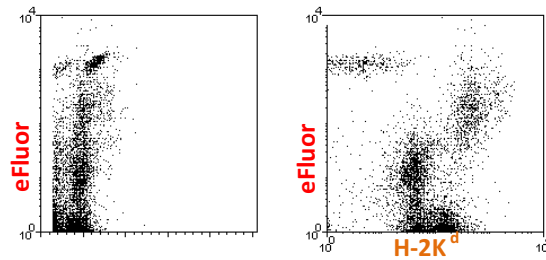


Figura 4.1.13: **Análisis de la presencia de sonda eFluor670 en células del peritoneo de ratones Balb/c inoculados con células EL4 marcadas con eFluor670.** Se inocularon 500.000 células EL4 marcadas con una concentración de eFluor670 3 μ M en el peritoneo de ratones BALB/c inmunizados con 10^5 pfu del virus LCM ocho días antes (3 ratones por grupo). Tras dos horas se realizaron los lavados peritoneales, se marcaron con un Ab anti-H-2K^d marcado con PE (fluorescencia amarilla) y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos e histogramas representativos. Se muestran los gráficos de puntos del lavado peritoneal de un ratón inoculado con células EL4 eFluor670 sin marcar (A) o marcado (B) con anti- H-2K^d-PE.

Se observa perfectamente como la población que tiene mayor fluorescencia en la primera imagen de la figura 4.1.13 se corresponde con las células EL4, pues no marcan para el anticuerpo H-2K^d (Segunda imagen, figura 4.1.13). Mientras que la población de fluorescencia intermedia pertenece al peritoneo del ratón, pues sí que marcan para el haplotipo H-2K^d. De forma que esto nos permite desechar la hipótesis de que esta población menos fluorescente sean células EL4 que hayan perdido sonda.

El siguiente paso fue identificar la población peritoneal que había captado la sonda eFluor. En el peritoneo de los ratones existen mayoritariamente tres poblaciones: células B (50-60%), macrófagos (30%) y células T (5-10%) [77]. Pensamos que esta población podría corresponderse con macrófagos, al ser células que muestran tendencia por fagocitar cualquier elemento ajeno a su entorno.

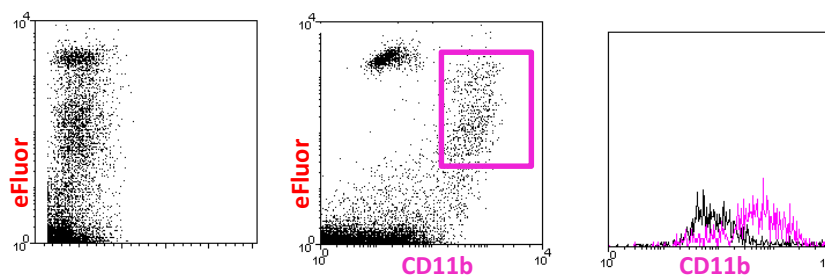


Figura 4.1.14: **Análisis de la presencia de sonda eFluor670 en macrófagos de ratones inoculados con células EL4 marcadas con eFluor670.** Se inocularon por vía i.p 500.000 células EL4 marcadas con una concentración de eFluor670 3 μ M en el peritoneo de ratones C57Bl/6 inmunizados con 10^5 pfu del virus LCM 8 días antes (3 ratones por grupo). Tras dos horas se realizaron lavados peritoneales, se marcaron con un Ab anti-CD11b marcado con FITC (fluorescencia verde) y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran los gráficos de puntos del lavado peritoneal de un ratón inoculado con células EL4 eFluor670 sin marcar (A) o marcado (B) con anti-CD11b-FITC. El histograma (C) muestra el marcaje de CD11b (violeta) respecto a la del isotipo control (negro) en la región de la población con fluorescencia intermedia.

Como se observa en la figura 4.1.14 la población con fluorescencia intermedia expresa el marcador CD11b, mientras que las células EL4 no dan señal. De esta forma identificamos esta población como macrófagos peritoneales.

4.2. Desarrollo de un modelo *in vivo* basado en la inmunización con el virus LCM para prevenir el desarrollo del linfoma T EL4.

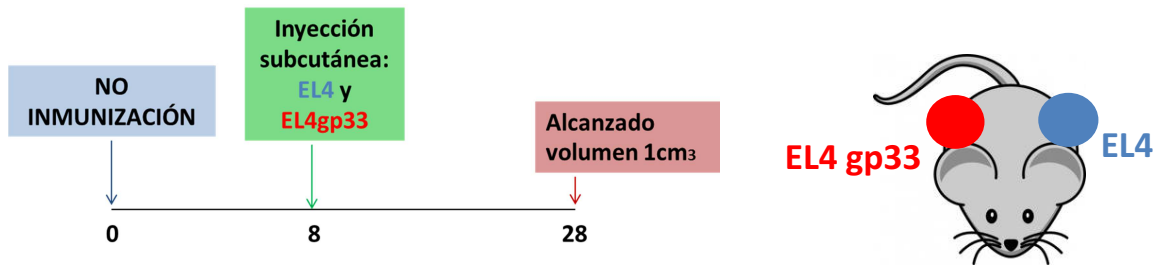
4.2.1. Establecimiento de las condiciones en las que los linfocitos Tc antivirales son capaces de impedir el desarrollo de tumoral primario.

En este objetivo se pretendía analizar si la eliminación de células EL4 marcadas con antígenos virales mediada por los linfocitos Tc antivirales tal y como se ha descrito en el objetivo 1, protegía del desarrollo posterior de linfomas EL4 inoculados en ausencia de antígeno viral. Es decir, si durante la eliminación primera de las células EL4 los animales generaban una memoria inmunológica frente a antígenos derivados del linfoma EL4, de modo que quedaban protegidos frente a este tumor.

En primer lugar, se evaluó que la eliminación de las células EL4 marcadas con el péptido viral gp33 no solo se produce a nivel intraperitoneal a tiempos cortos como se ha demostrado en los experimentos de citotoxicidad *in vivo* (4.1.1), sino que además estas células son eliminadas completamente y no generan tumores en ratones previamente inmunizados con el virus LCM. En segundo lugar se analizó que la inmunización únicamente con el virus LCM no protege del desarrollo de tumores generados a partir de la inyección de células EL4. Para ello se utilizó el modelo de inoculación tumoral subcutánea (s.c) que permite una monitorización del crecimiento tumoral más precisa.

Se establecieron dos grupos de ratones, tal y como hemos detallado en materiales y métodos (3.2.9), a los que se sometieron a los siguientes procedimientos:

GRUPO CONTROL:



A continuación se representan las gráficas de crecimiento de los tumores en el grupo control:

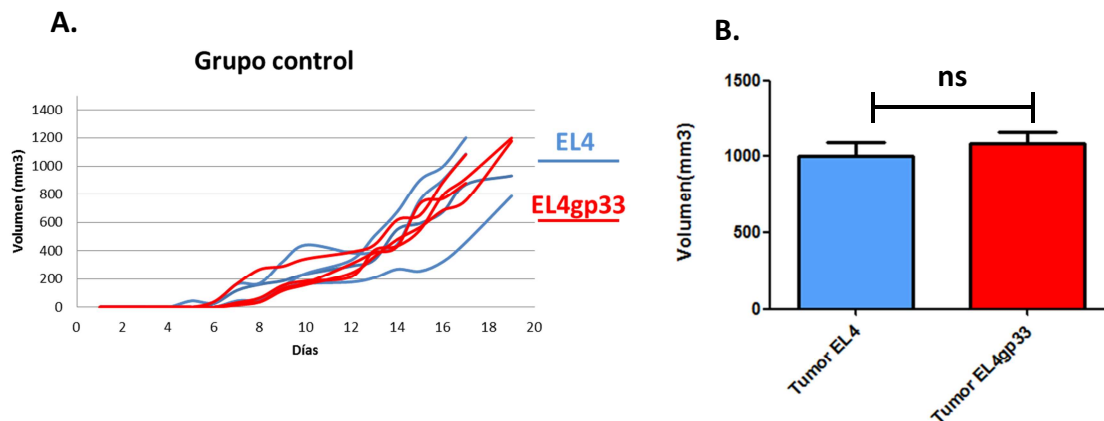
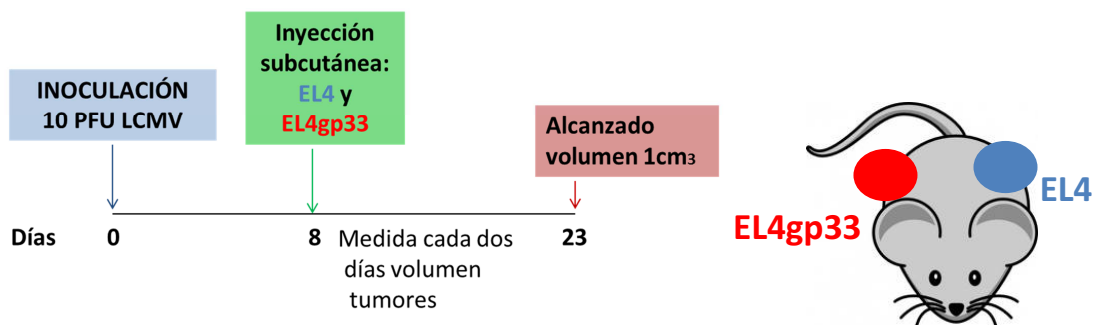


Figura 4.2.1. **Crecimiento de los tumores EL4 en ratones no inmunizados.** Se inocularon por vía s.c. 500.000 células EL4 en el costado izquierdo y 500.000 células EL4 previamente incubadas con el péptido gp33 en el costado derecho de ratones wt C57BL/6 sin inmunizar con virus. **A.** Se representa el volumen medido cada dos días desde el momento en que se inocularon las células tumorales. Las líneas azules representan los tumores generados a partir de células EL4 y las líneas rojas representan los tumores generados a partir de células EL4gp33. **B.** Volumen final de los tumores EL4 y EL4gp33 para el grupo no inmunizado con LCMV. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de cuatro ratones independientes.

Como se observa en la figura 4.2.1 en el grupo control los tumores de células EL4 y EL4gp33 crecieron a un mismo ritmo, alcanzándose un volumen de 1 cm³ de forma simultánea. No se observan pues grandes diferencias en el crecimiento de estos dos tumores para ninguno de los miembros del grupo.

GRUPO LCMV:



A continuación se representan las gráficas de crecimiento de los tumores en el grupo LCMV:

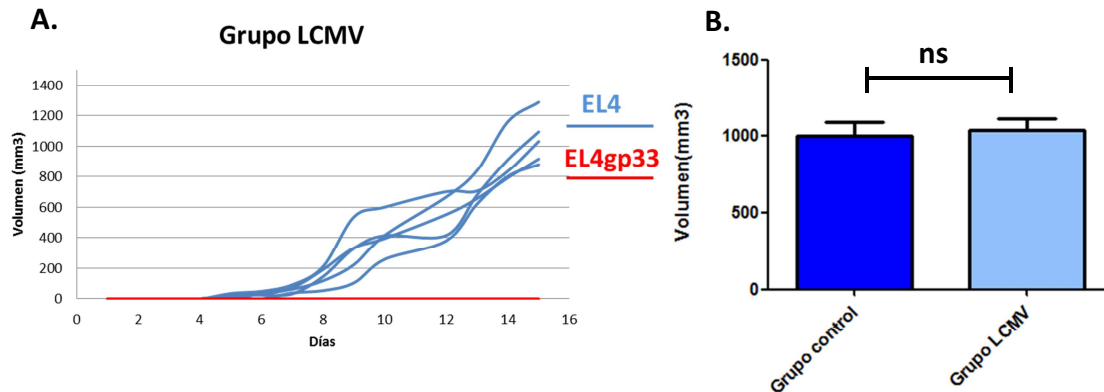


Figura 4.2.2: **Crecimiento de los tumores EL4 en ratones inmunizados con el LCMV.** Se inocularon por vía s.c. 500.000 células EL4 en el costado izquierdo y 500.000 células EL4 previamente incubadas con el péptido gp33 en el costado derecho de ratones wt C57Bl/6 inmunizados con 10 pfu de LCMV. **A.** Se representa el volumen medido cada dos días desde el momento en que se inocularon las células tumorales. Las líneas azules representan los tumores generados a partir de células EL4 y las líneas rojas representan los tumores generados a partir de células EL4gp33. **B.** Volumen final de los tumores EL4 para el grupo control y el grupo inmunizado con LCMV. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de cuatro ratones y cinco ratones independientes para el grupo sin inmunizar y el grupo inmunizado respectivamente.

En ninguno de los miembros del grupo inmunizado con el virus LCMV creció tumor a partir de la población EL4 gp33. Sin embargo las células EL4 no son eliminadas pues no existen linfocitos Tc específicos contra ellas y generan tumores tras su inoculación subcutánea, alcanzándose un volumen de 1 cm³ a los 15 días. En el grupo control tanto la población EL4 como EL4gp33 genera tumores con las mismas características (Figuras 4.2.1 A y B). Si comparamos los datos de la figura 4.2.1A y 4.2.2A se observa una cinética de crecimiento similar de las células EL4 sin gp33 tanto en ratones no inmunizados (control) como en los inmunizados con LCMV y el volumen final para este tipo de tumores es parecido para ambos grupos (Figura 4.2.2.B y 4.2.3). De forma que la inmunización con el virus LCMV parece no afectar al desarrollo de tumores generados a partir de la línea celular EL4 si no existe la presencia de antígenos virales.

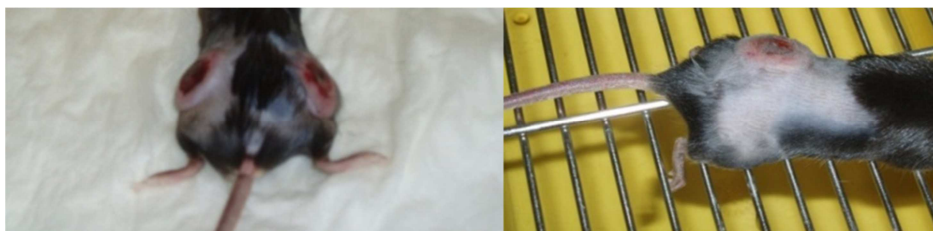


Figura 4.2.3. **Fotos realizadas a un miembro representativo de cada grupo.** En la primera foto se muestra un ratón del grupo control que presenta un tumor en cada costado de tamaño similar. En la segunda foto aparece un ratón del grupo inmunizado con LCMV que presenta un tumor en el costado izquierdo (EL4) pero no presenta ningún tumor en el costado derecho (EL4gp33).

4.2.2. Evaluación de la memoria inmunológica antitumoral generada tras la eliminación de las células tumorales tal y como se indica en 4.2.1.

Hasta ahora se había comprobado que la inmunización únicamente con LCMV eliminaba completamente las células EL4 marcadas con gp33 y no afectaba al desarrollo de los tumores sin péptido antigénico. Asimismo se había determinado que esta eliminación era más eficiente en presencia de gzm A y B. Una vez realizados estos controles se analizó si la eliminación de las células EL4 marcadas con gp33 generaba una memoria frente a antígenos del linfoma EL4 que protegiera del desarrollo de los tumores tras una inoculación posterior. Si se esto fuera cierto podríamos decir que la muerte celular inducida por los linfocitos Tc antivirales es inmunogénica. Para comprobar esta hipótesis se dispuso de 27 ratones que se dividieron en cuatro grupos, a los que se sometió a distintos tratamientos.

GRUPO 1: GRUPO CONTROL

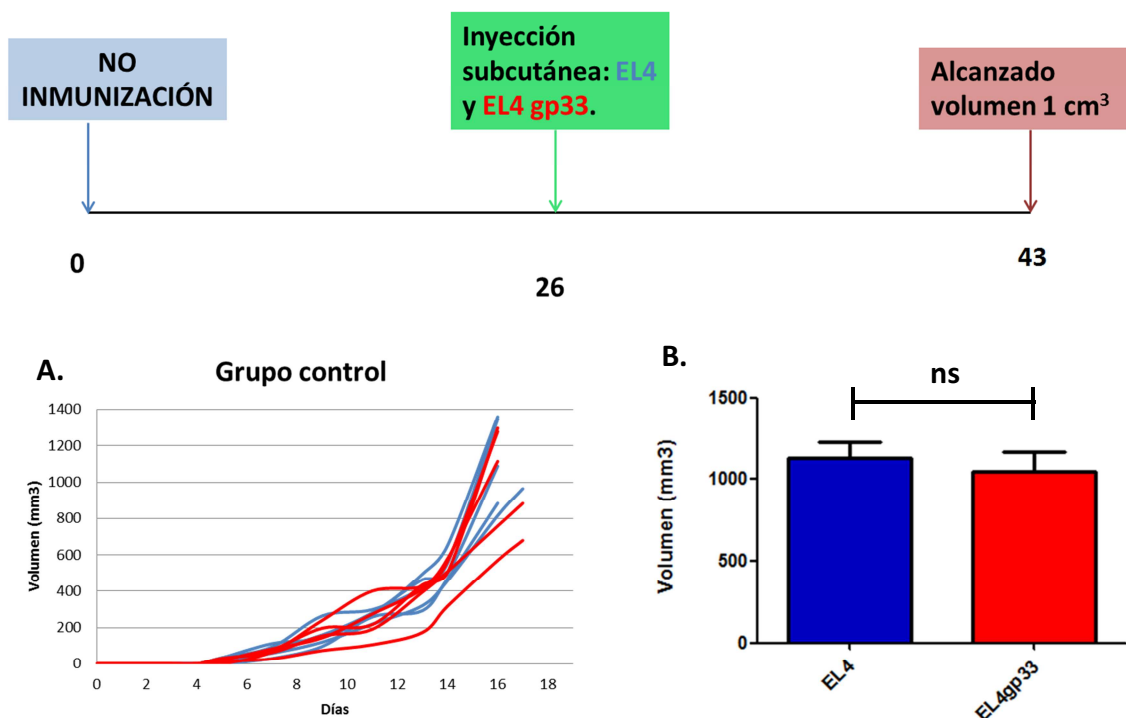


Figura 4.2.4. Crecimiento de los tumores EL4 en ratones no inmunizados. Se inocularon por vía s.c. 500.000 células EL4 en el costado izquierdo y 500.000 células EL4 previamente incubadas con el péptido gp33 en el costado derecho de ratones wt C57Bl/6 sin inmunizar con virus. **A.** Se representa el volumen medido cada dos días desde el momento en que se inocularon las células tumorales. Las líneas azules representan los tumores generados a partir de células EL4 y las líneas rojas representan los tumores generados a partir de células EL4gp33. **B.** Volumen final de los tumores EL4 y EL4 gp33 del grupo control. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de cinco ratones.

Tal y como se observa en la figura 4.2.4 en este grupo los tumores crecieron de manera simultánea para todos los miembros y el volumen final de 1 cm³ se alcanzó al

mismo tiempo para los tumores EL4 y EL4gp33, tal y como habíamos visto en el objetivo 4.2.1.

GRUPO 2: GRUPO LCMV

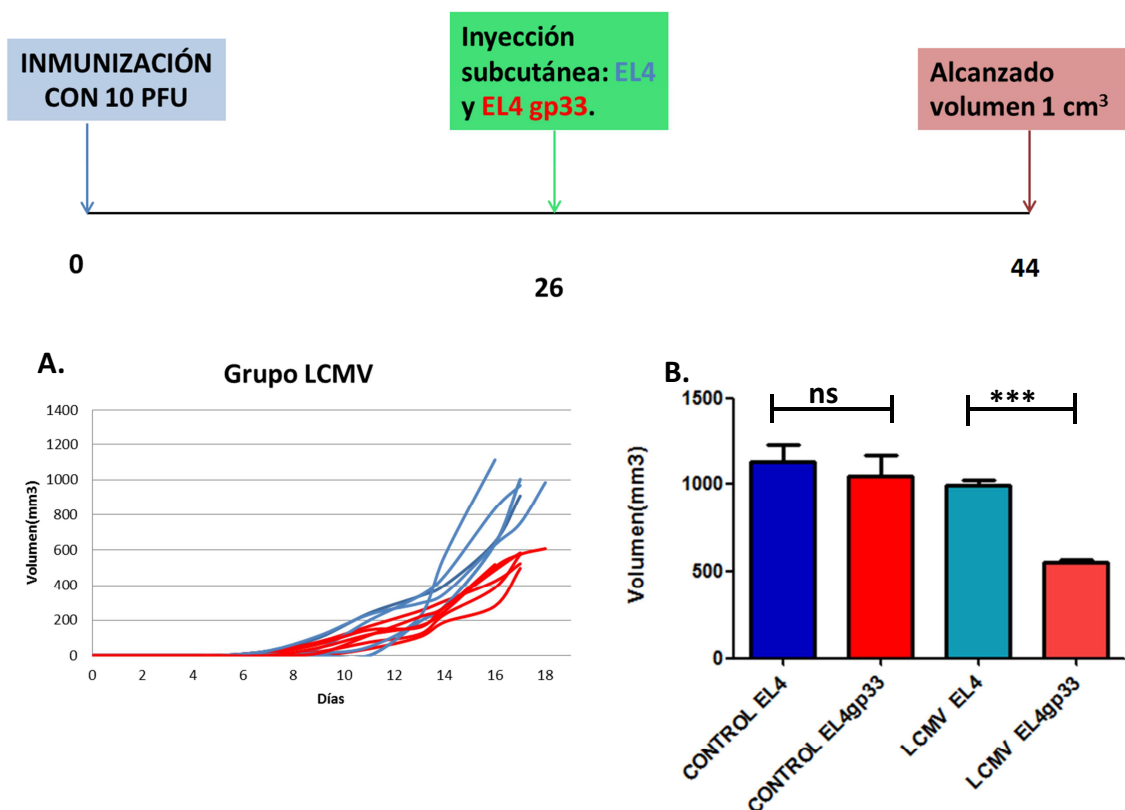
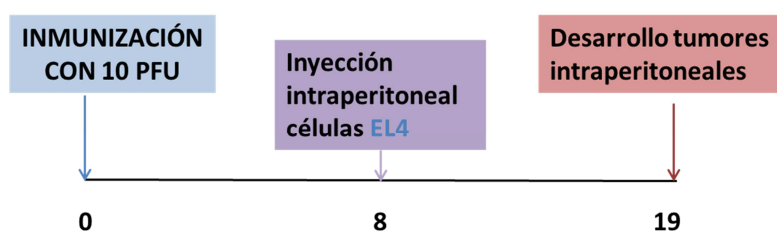


Figura 4.2.5. **Crecimiento de los tumores EL4 en ratones inmunizados con 10 pfu del virus LCM.** Se inocularon por vía s.c. 500.000 células EL4 en el costado izquierdo y 500.000 células EL4 previamente incubadas con el péptido gp33 en el costado derecho de ratones wt C57Bl/6 inmunizados con 10 pfu 26 días antes. **A.** Se representa el volumen medido cada dos días desde el momento en que se inocularon las células tumorales. Las líneas azules representan los tumores generados a partir de células EL4 y las líneas rojas representan los tumores generados a partir de células EL4gp33. **B.** Gráfica que compara el volumen final para los dos tipos de tumores del grupo control e inmunizado con LCMV. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de cinco y seis ratones independientes para el grupo sin inmunizar e inmunizado respectivamente.

Tal y como se observa en la figura 4.2.5 crecieron tumores a partir de las células EL4gp33 inoculadas, aunque su crecimiento fue más lento que en las células EL4, alcanzándose un volumen medio de 552 mm³ cuando los tumores generados a partir de las células EL4 habían alcanzado un volumen de 1000 mm³. EL crecimiento de los tumores EL4 sin gp33 fue similar en los grupos de ratones inmunizados o no con el LCMV (Figura 4.2.5 B).

GRUPO 3: GRUPO LCMV + EL4

Este grupo debía servir como control para garantizarnos que la inyección i.p de células EL4 sin el péptido no activa el sistema inmune, de forma que la muerte inmunogénica de las células EL4 se da en presencia exclusivamente del péptido y por tanto se puede atribuir a linfocitos Tc.

Tal y como se observa en la imágenes representativas de la figura 4.2.6, a los once días de la inoculación de los tumores los ratones habían desarrollado tumores intraperitoneales y fueron sacrificados. De forma que de nuevo comprobamos que la inmunización con el virus no protege frente al desarrollo tumoral a partir de células EL4, ni inoculados de forma subcutánea (anterior experimento), ni inoculadas intraperitonealmente. Esto nos impide utilizar este grupo como otro control tal y como se usó en el objetivo 4.2.1.

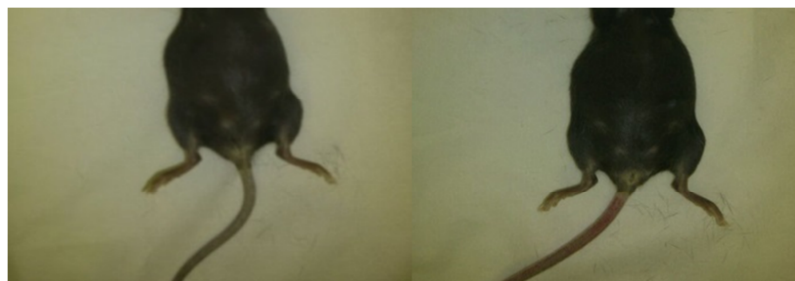
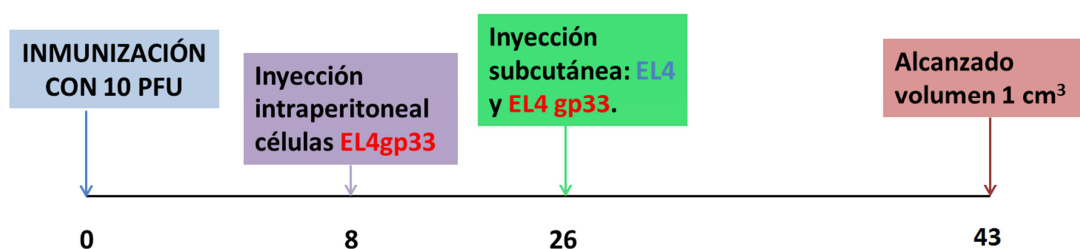


Figura 4.2.6 La inmunización con el virus LCMV no elimina las células EL4 tras su inoculación por vía i.p. Se inmunizó a este grupo de ratones con 10 pfu del virus LCMV y a los ocho días se les inocularon por vía i.p 10^6 células EL4 sin marcar (-gp). A los once días todos los ratones habían desarrollado tumores i.p y fueron sacrificados. Se muestra la presencia de dichos tumores en dos ratones representativos del grupo 3.

GRUPO 4: GRUPO LCMV + EL4gp33

Estos ratones no desarrollaron tumores intraperitoneales tras la inoculación de células EL4gp33, verificándose que los resultados del experimento anterior obtenidos con la inoculación de células tumorales de forma s.c se dan también a nivel intraperitoneal. En este grupo esperamos que la eliminación de estas células EL4gp33 sea inmunogénica y acabe generando una respuesta de memoria frente a las células EL4. Sin embargo, este grupo acabó desarrollando tumores a partir de las células EL4 al mismo ritmo que el grupo control (Figura 4.2.4) y el grupo inmunizado con LCMV (Figura 4.2.5). Estos ratones también desarrollaron tumores a partir de la población EL4gp33, de nuevo de menor tamaño que el grupo control (Figura 4.2.4), pero también de menor tamaño que el grupo LCMV (Figura 4.2.5), como se muestra a continuación.

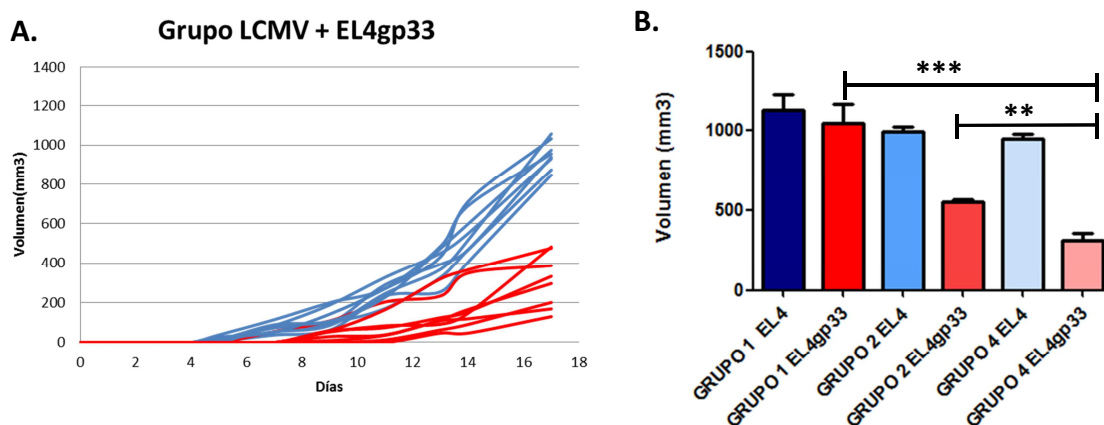


Figura 4.2.7. **Crecimiento de los tumores EL4 en ratones inmunizados con 10 pfu del virus LCM e inoculados i.p con 10^6 células EL4 gp33.** Se inmunizó a este grupo de ratones con 10 pfu del virus LCM y a los ocho días se les inocularon por vía i.p 10^6 células EL4 incubadas con el péptido viral gp33. Dieciocho días después se les inoculó por vía s.c. 500.000 células EL4 en el costado izquierdo y 500.000 células EL4 previamente incubadas con el péptido gp33 en el costado derecho de ratones wt C57Bl/6. **A.** Se representa el volumen medido cada dos días desde el momento en que se inocularon las células tumorales. Las líneas azules representan los tumores generados a partir de células EL4 y las líneas rojas representan los tumores generados a partir de células EL4gp33. **B.** Gráfica que muestra el volumen final de los dos tipos de tumores para cada uno de los grupos. En todos los casos las gráficas muestran la media \pm SD de cinco, seis y ocho ratones independientes para el grupo 1, 2 y 4 respectivamente.

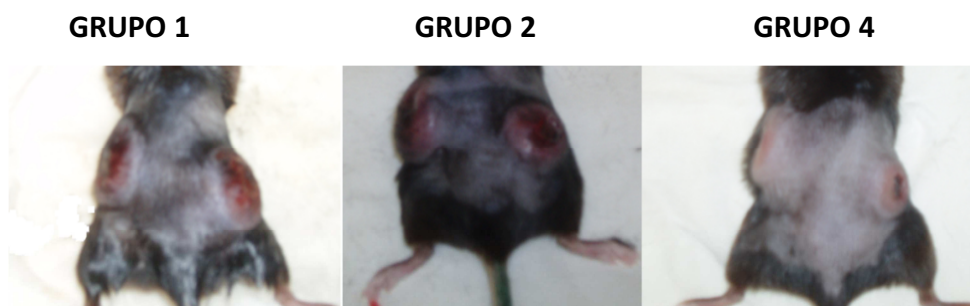


Figura 4.2.8. **Fotografías realizadas a un miembro representativo de cada grupo.** Cada grupo fue sometido a los procedimientos descritos anteriormente. Se muestra como el tumor de la izquierda, procedente de la población EL4 es parecido para los tres grupos, mientras que el tumor de la derecha, procedente de la población EL4gp33 es menor para el grupo 2 y todavía menor para el grupo 4.

Posteriormente estudiamos los linfocitos infiltrados en los dos tipos de tumores para los tres grupos tal y como se observa en la figura 4.2.9. En los tumores EL4 del grupo control no se observa infiltración linfocitaria, que sí se da en los tumores EL4gp33 del mismo grupo y para el resto de tumores de los otros dos grupos. Esto parece indicar que los linfocitos se desplazan al tumor cuando se da la presencia de un péptido antigénico (en el caso del tumor EL4gp33 del grupo control) o se ha activado el sistema inmune de los ratones, como es el caso de los grupos 2 y 4. Por otro lado, se observa que el mayor % de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ dentro de la población de linfocitos infiltrados en el tumor se da en el grupo 4, donde se ha estimulado dos veces el sistema inmune. Aunque en ningún caso este aumento en la presencia de linfocitos Th y Tc se relaciona con un menor crecimiento tumoral. Únicamente en los tumores EL4gp33 del grupo 4 se observa una población de DCs CD11c⁺CD11b⁻ que constituye un 27% de la población de linfocitos infiltrados, cuando en el resto de tumores esta población no llega a superar el 6%.

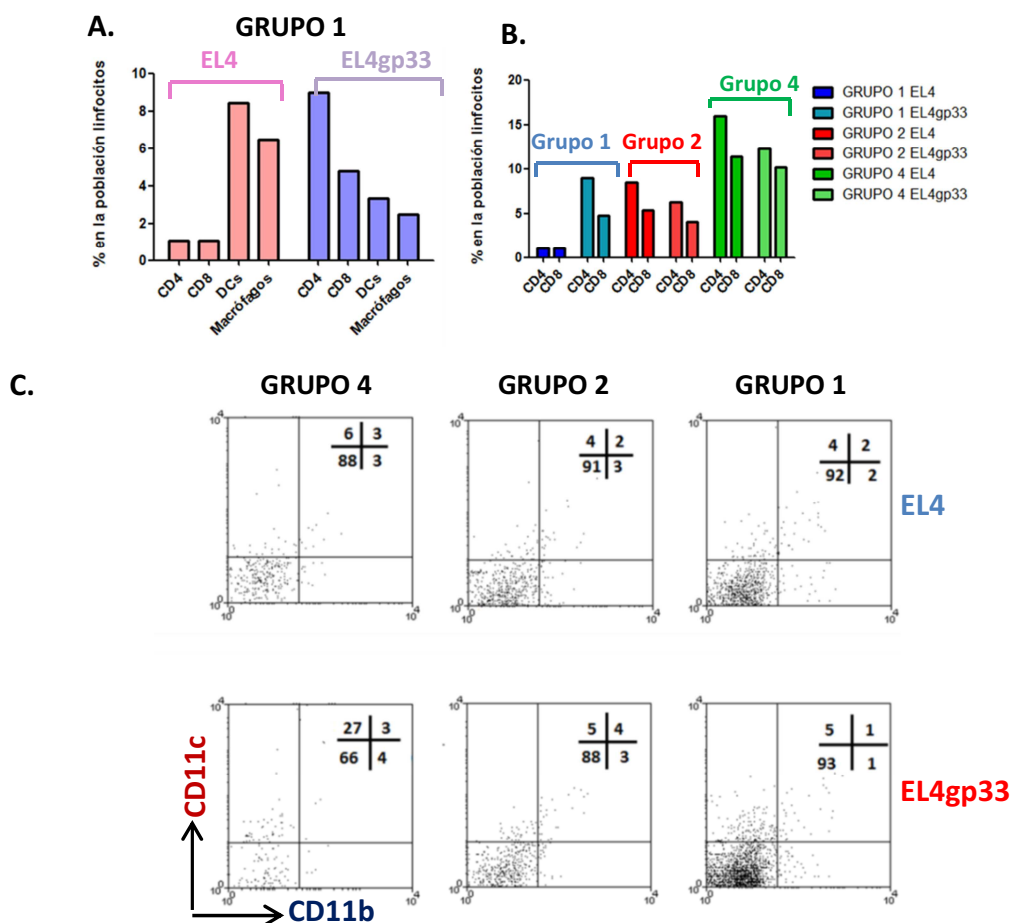


Figura 4.2.9. **Análisis de la infiltración de linfocitos en los tumores.** **A.** Representación del % de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, macrófagos y células dendríticas en la población de linfocitos infiltrados en los tumores EL4 y EL4gp33 del grupo control. **B.** Gráfica donde se compara el % de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en la población de linfocitos infiltrados en los tumores para los tres grupos. **C.** Gráficos de puntos del marcaje CD11c CD11b de las muestras de los tumores, donde se muestra el % de la población DC CD11c⁺CD11b⁻ y CD11c⁺CD11b⁺.

4.3. Optimización del protocolo de producción y purificación de la proteína MFG-E8 recombinante en células eucariotas HEK.293T

El objetivo de producir estas dos proteínas es utilizar la proteína mutada para inhibir la fagocitosis de las células apoptóticas en los experimentos de citotoxicidad *in vivo* mediados por linfocitos Tc. Lo que se quiere ver es si al suprimir esta fagocitosis se suprime también el proceso de presentación cruzada, en el que se basa el modelo *in vivo* de generación de una respuesta inmune frente a tumores que queremos establecer.

4.3.1. Análisis de la transformación de las bacterias y aislamiento de los plásmidos.

Para la producción de la proteína MFG-E8 y su mutante D89E se transformaron por choque térmico bacterias *E.coli* xL-Blue competentes con el plásmido pEF-BOS-EX conteniendo el inserto para la proteína WT y con el mismo plásmido conteniendo el inserto para la proteína mutada, obteniéndose así dos poblaciones bacterianas distintas. Se cultivaron en placas con ampicilina y se utilizó como control negativo bacterias sin transformar. Al día siguiente solo habían crecido colonias en las placas con las bacterias transformadas, de forma que la transformación había tenido lugar correctamente. Posteriormente se comprobó la presencia del plásmido conteniendo los insertos correspondientes en cada población tal y como se observa en la figura 4.3.1.

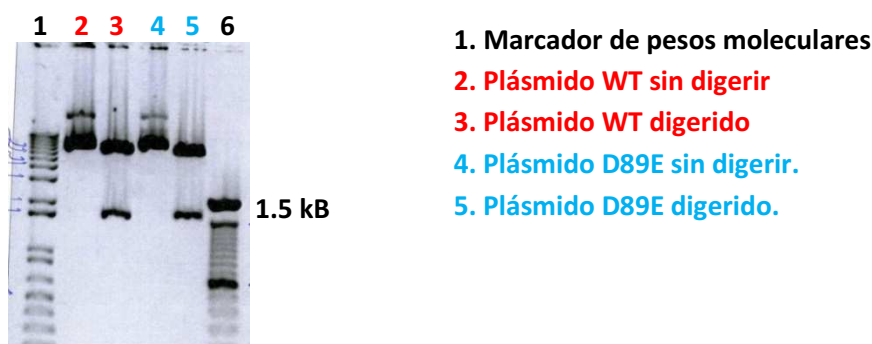


Figura 4.3.1. Análisis de transformación de bacterias con el plásmido conteniendo el inserto para la proteína WT y con el plásmido conteniendo el inserto para la forma mutada, D89E. La digestión enzimática del plásmido se realizó con las enzimas SalI y EcoRI, que permitieron linealizar el plásmido pEF-BOS-EX y liberaron un inserto de 1.4 kbases, correspondiente al cDNA de la proteína wt y la proteína mutada en cada caso.

4.3.2. Evaluación de la eficiencia de transfección.

Una vez disponibles de los plásmidos con los insertos se procedió a la producción de las proteínas. Para ello se evaluó la eficiencia de transfección de tres métodos distintos, descritos en el apartado de materiales y métodos (3.4.1), utilizando

un plásmido que contenía la proteína fluorescente roja monomérica mRFP, y finalmente elegir el que diera los mejores resultados.

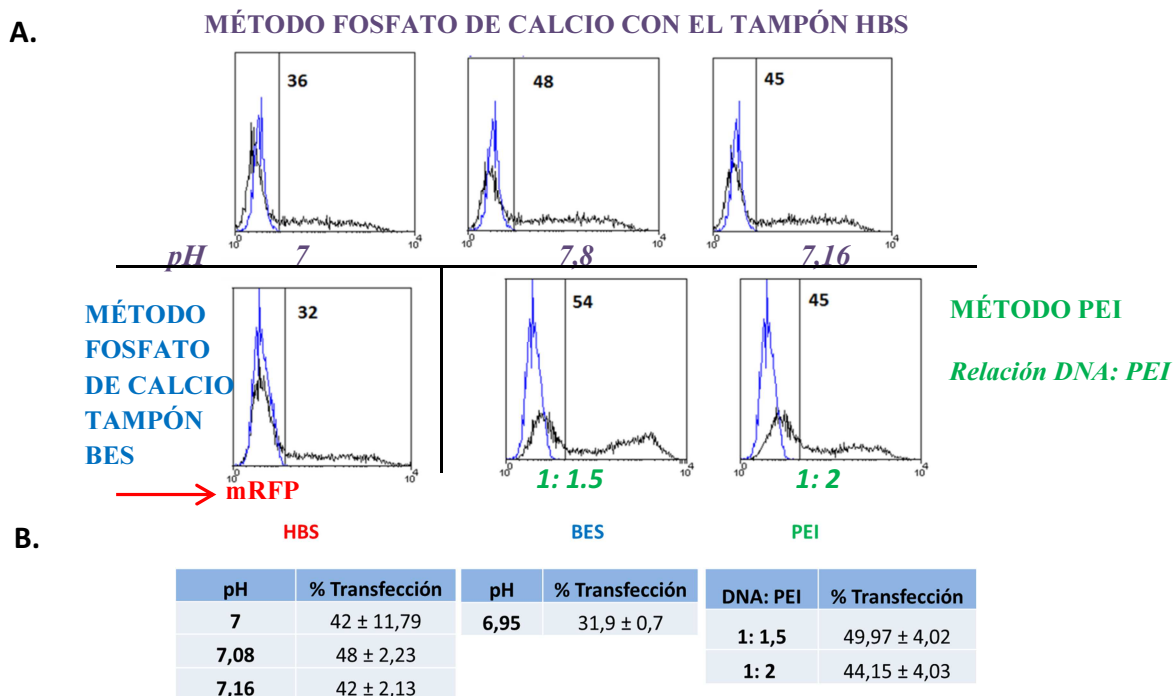


Figura 4.3.2: **Resultado de la eficiencia de transfección en células HEK mediante los tres métodos descritos. A.** Se muestran los histogramas representativos del % de células transfectadas con el plásmido pBabe-mRFP mediante el método de fosfato de calcio con tampón Hepes a 3 pHs distintos, mediante el método de fosfato de calcio con el tampón BES a pH 6.95 y mediante el reactivo PEI a dos relaciones DNA:PEI distintas. El pico azul representa una población de células 293T sin transfectar. **B.** Tablas conteniendo la media obtenida en los tres experimentos realizados para cada uno de los métodos con la desviación estándar. La viabilidad de los cultivos celulares fue superior al 95% en todos los casos, evaluada por conteo con azul trypan.

Antes de realizar al análisis por citometría de flujo se tomaron fotos con el microscopio de fluorescencia para comprobar que se había producido la transfección.

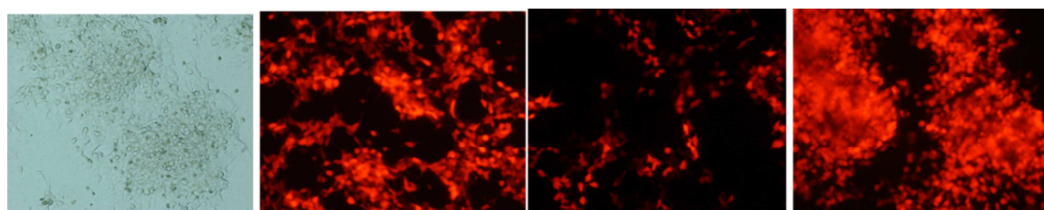


Figura 4.3.3. **Imágenes correspondientes a las células HEK transfectadas con el plásmido pBabe-mRFP con los distintos métodos de transfección anteriormente comentados.** Se muestra de izquierda a derecha células HEK sin transfectar, células transfectadas con el método de fosfato de calcio con tampón Hepes a pH 7.08, células transfectadas con el método de fosfato de calcio con tampón BES y células transfectadas con el reactivo PEI.

En estas fotos ya se puede intuir los resultados de eficiencias mostrados anteriormente. En el método con el tampón BES no se observa tanta densidad de células rojas como en los otros dos métodos. Los mejores resultados se obtienen utilizando el reactivo PEI para una relación DNA/ PEI 1: 1.5, en el que se consigue que

el 50% de células del cultivo expresen la proteína mRFP. El aumento de la cantidad de PEI (relación 1:2) no proporciona mayores % de transfección, además las células están más dañadas, pues el PEI es ligeramente tóxico. Con el método del fosfato de calcio utilizando el tampón HBS se obtiene un 48% de células transfectadas a un pH de 7.08, observándose una ligera diferencia con los otros dos pHs, de forma que el pH del tampón afecta al proceso de transfección [76]. Utilizando el tampón BES se obtienen menores % de transfección, por lo que rápidamente fue desechado. Finalmente, para llevar a cabo la transfección con los plásmidos conteniendo la proteína de interés y la proteína mutada optamos por **el método PEI**.

4.3.3. Obtención de la proteína MFG-E8 y su forma mutada D89E.

Una vez seleccionado el mejor método de transfección, se procedió a la producción de ambas proteínas tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez purificadas, se analizó su presencia mediante Western-Blot utilizando un anticuerpo anti-FLAG ya que dichas proteínas se producían como proteínas de fusión que contenían una cola FLAG en su extremo C-terminal.

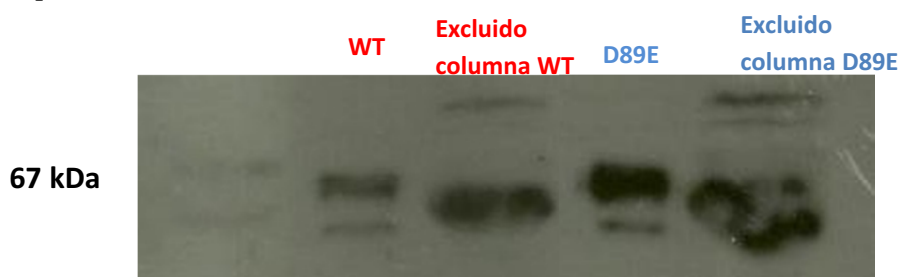


Figura 4.3.4. **Western-Blot de las muestras obtenidas tras la purificación de la proteína wt y mutada.** En el primer carril se aplicó medio de cultivo de células HEK sin transfectar como control de la ausencia de nuestra proteína en el medio de cultivo de células no transfectadas. En el segundo carril se aplicó la proteína WT purificada, a continuación el excluido de la columna de purificación de la proteína WT para saber si parte de nuestra proteína no quedaba fijada a la columna. Y por último la proteína mutada purificada y el excluido de la columna de purificación de esta proteína.

Tal y como se observa en la figura 4.3.4 aparecen bandas tanto en la disolución obtenida de la purificación de la proteína WT como de la forma mutada D89E, que parece estar a mayor concentración, puesto que se observa una banda más intensa. La banda mayoritaria aparece sobre unos 67 KDa que corresponde con el PM de nuestras proteínas. También se observan bandas a un PM menos que podrían ser contaminantes como la albumina presente en el medio de cultivo (PM alrededor de 60 KDa) o productos de degradación de las proteína.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En continuación con los estudios realizados en nuestro laboratorio sobre el mecanismo de inducción de muerte de linfocitos Tc se quiso evaluar el papel de las gzms A y B en la eliminación *in vivo* del linfoma de células T EL4 siguiendo el protocolo previamente optimizado [75]. Para ello se utilizaron ratones C57BL/6 wt y $gzmAxB^{-/-}$ a los que se inmunizó con el LCMV. Se observa que ambas cepas son capaces de eliminar la población diana, sin embargo los ratones que carecen de gzms A y B eliminan las células EL4gp33 parcialmente y de forma menos eficaz que los ratones wt. Estas diferencias entre ratones wt y $gzmAxB^{-/-}$ no se deben a una menor activación de los linfocitos Tc, puesto que el número de linfocitos Tc en el peritoneo de las dos cepas es similar, sino a la ausencia de las gzms A y B. Los linfocitos Tc de estos ratones no serían capaces de eliminar a las células diana, ya que expresan algo de $gzmK$ que, dada la ausencia de las dos principales gzms, podría actuar en su lugar. No obstante no está claro si la $gzmK$ posee capacidad citotóxica [67] por lo que otra explicación sería que en estas condiciones la $perf$ sola o en combinación con ligandos mortales como FasL [78] indujera la eliminación de estas células. Sin embargo, es evidente que la ausencia de las gzms A y B reduce la capacidad citotóxica de los linfocitos Tc en comparación con la de los ratones wt. Este resultado está en contradicción con trabajos previos en los que se observaba que linfocitos Tc frente al virus ectromelia de ratones $gzmAxB^{-/-}$ poseían intacta su capacidad citotóxica *in vivo* [79]. Sin embargo en dicho trabajo se utilizaba una única dosis de virus bastante elevada y según resultados de nuestro grupo [75], la cantidad de virus inoculada tiene influencia sobre la capacidad citotóxica de los linfocitos Tc en ratones deficientes en ambas gzms.

En este tipo de experimentos de citotoxicidad *in vivo* mediada por linfocitos Tc, y confirmando resultados previos [75] se había observado una disminución en la población de células EL4 sin incubar con el péptido en el grupo de ratones inmunizado con el virus, respecto al grupo sin inmunizar, cuando solo la población EL4 incubada con el péptido viral gp33 debería ser eliminada por linfocitos Tc. Nuestros análisis indican que no es debido a la migración de estas células a otros órganos, lo que nos lleva a pensar que la infección con LCMV puede estar activando a otros componentes del sistema inmune. Al evaluar la desaparición de células EL4 en ratones $perf^{-/-}$ se comprobó que tanto en ratones inmunizados como sin inmunizar la población EL4 recuperada era similar. Sólo en el caso de las células NK (aparte de los linfocitos Tc) se

ha descrito que la vía de exocitosis granular sea el principal mecanismo de su acción citotóxica, por lo que las células NK parecen ser las responsables de esta eliminación. Con todo esto, podemos afirmar que la inmunización con el virus LCM activa en cierta medida a las células NK del peritoneo, tal y como se ha descrito previamente [80]. Estas eliminarían de forma minoritaria a las células inoculadas i.p en los experimentos de citotoxicidad *in vivo* a través de un mecanismo independiente de antígeno y por ello afectará igualmente tanto a la población EL4 como a la población marcada con el péptido EL4gp33. Dado que esta última es la única diana de los linfocitos Tc, somos capaces de evaluar la eliminación específica por acción de estos y los resultados obtenidos en los experimentos de citotoxicidad *in vivo* siguen teniendo validez a la hora de analizar los mecanismos utilizados por linfocitos Tc para eliminar el linfoma EL4.

Una vez analizados los mecanismos por los que las células EL4 son eliminadas en el peritoneo se procedió a desarrollar un modelo *in vivo* basado en la inmunización con el virus LCM para prevenir el desarrollo del linfoma T EL4. En primer lugar se comprobó que los linfocitos Tc antivirales generados utilizando el mismo protocolo que en los experimentos de citotoxicidad *in vivo* son capaces de impedir el desarrollo de tumores subcutáneos generados a partir de células EL4 incubadas con el péptido viral gp33, pero no de células EL4 que no presenten dicho péptido. Asimismo se comprobó que los ratones que no han sido inmunizados con el virus y carecen por tanto de linfocitos Tc antivirales desarrollan tumores procedentes tanto de la población EL4 como EL4gp33. De este modo se procedió a generar una respuesta de memoria frente a las células EL4. Para que se de esta respuesta, en primer lugar los linfocitos Tc deben eliminar las células EL4gp33 generando una muerte inmunogénica [70], proceso que a través de las DC activaría una población de linfocitos Tc específicos contra antígenos tumorales procedentes de las células EL4, y ante una nueva aparición de estas células tumorales, los linfocitos Tc serían capaces de reconocerlas y eliminarlas. En este caso, en el grupo inmunizado con el virus (grupo 2) se desarrollaron tumores tanto de la población EL4 como de la población EL4gp33, siendo el volumen final de estos últimos la mitad que el de los tumores EL4. Esto se debe a que en este caso la eliminación de las células que presentan el péptido depende de la acción de linfocitos Tc antivirales de memoria, puesto que la inducción de tumores se realiza 26 días después de haber inmunizado con el virus y no ocho días después como en el experimento inicial, donde la población de linfocitos Tc se encuentra en su punto de máxima actividad. De forma

que la acción de los linfocitos Tc antivirales de memoria parece no ser tan eficaz en la eliminación de las células EL4 marcadas con péptido, ya que no consiguen impedir el crecimiento tumoral, aunque sí lo frena.

Finalmente en el grupo 4 se realizó el protocolo para que se generara la respuesta de memoria frente a las células EL4. Sin embargo, en este caso se desarrollaron tumores procedentes de la población EL4 al mismo ritmo que el grupo control y el grupo 2. Sin embargo, los tumores EL4gp33, aunque también se desarrollaron, alcanzaron un volumen menor al del grupo 2 lo que indicaba que la inmunización con células EL4 de algún modo potenciaba el efecto de la inmunización con el LCMV. La explicación podría ser debida a que en los ratones inmunizados con LCMV y EL4gp33 se generara una respuesta de memoria frente al LCMV y frente al péptido gp33 (mediante el proceso de presentación cruzada) de las células EL4, lo que potenciará el control del tumor EL4gp33, pero no el control del tumor EL4. Aunque los resultados obtenidos en el grupo 4 nos hacen pensar que se ha dado un proceso de presentación cruzada, para demostrarlo serían necesarios experimentos adicionales, como la depleción de las DC en estos ratones. No podemos descartar que se hayan generado también linfocitos Tc que reconozcan antígenos de las células EL4, pero hemos sido incapaces de detectarlo mediante este modelo experimental. Además, el estudio de la población de linfocitos infiltrados en los tumores reveló exclusivamente en los tumores EL4gp33 del grupo 4 un aumento en una población de DCs CD11c⁺CD11b⁻ que son las responsables de llevar a cabo la presentación cruzada *in vivo*. [81]

De esta forma tendremos que modificar el procedimiento realizado para conseguir una inmunización frente a las células EL4 y no frente al péptido viral. La concentración de virus con la que se inmuniza, el tiempo que se espera hasta la inducción de los tumores o el número de células EL4 utilizadas en la inmunización y/o en la inoculación s.c. son parámetros que podemos modificar en futuros estudios para conseguir nuestro objetivo.

La proteína MFG-E8 favorece la fagocitosis de las células apoptóticas [43] y debería ser necesaria para que se produzca el proceso de presentación cruzada de forma eficiente. La producción de esta proteína junto con su mutante inactivo nos permitiría el estudio de la fagocitosis y la inhibición de este proceso *in vivo*, y por tanto evaluar la importancia del proceso de presentación cruzada en la creación de una respuesta de memoria frente al linfoma EL4. Para la producción de la proteína MFG-E8 y su forma

mutada D89E optamos por la transfección de la línea celular HEK.293T en vez de la producción por transformación bacteriana, con la finalidad de obtener una proteína recombinante con una mayor homología estructural y funcional a la original. La introducción de material genético a células eucariotas (transfección) es un proceso complejo, que depende de múltiples factores [76], de forma que es recomendable establecer un buen protocolo adaptado a la línea celular de la que se dispone. Por ello evaluamos la eficiencia de transfección de tres métodos distintos, siendo finalmente el reactivo PEI el método de elección. La mejor eficiencia obtenida (niveles de fluorescencia más altos de mRFP respecto a los otros métodos) con este método no es sorprendente, ya que este polímero tiene una elevada capacidad amortiguadora del pH y evita que el complejo PEI-DNA sea digerido en los lisosomas [82], con lo que se evita el uso de cloroquina que acaba resultando tóxica. Aunque se ha descrito que el PEI puede resultar tóxico para las células [83], a una relación 1:1.5 se observa una viabilidad celular superior al 95% en todos los casos, factor que será importante para obtener mayores niveles de proteína y de mayor calidad. La banda que se observa a un menor PM tanto en la proteína pura como en las muestras del excluido de la columna de purificación en las dos proteínas en la imagen del Western-Blot obtenido podría ser BSA (66 KDa) ya que es la principal proteína del medio de cultivo utilizado. El anticuerpo con el que reconocemos a nuestra proteína es un anticuerpo M2 anti-FLAG, que reconoce al octapéptido FLAG (DYKDDDDK) sea cual sea la posición en la que esté. A diferencia de los anticuerpos de tipo M1, que reconocen exclusivamente a las colas FLAG en posición N- terminal y por tanto son más selectivos [84]. Al buscar la secuencia de aminoácidos de la BSA se encontró que hay varias posiciones donde coinciden al menos cuatro aminoácidos con la secuencia FLAG, de modo que esta podría ser la razón por la que nuestro anticuerpo se une a la BSA y observamos estas bandas que no deberían ser reconocidas. La BSA está mayoritariamente en el excluido, al no ser capaz de unirse a la resina anti-FLAG que se utilizó para purificar y en una mínima cantidad impurificando las proteínas aisladas.

CONCLUSIONES

- La inmunización con el virus LCM permite generar una población de linfocitos Tc antivirales que eliminan de forma específica y a tiempos cortos la población EL4

marcada con el péptido viral gp33, lo que nos permite evaluar la *citotoxicidad in vivo* de los linfocitos Tc.

- Las Gzms A y B son un elemento clave para una eliminación eficiente *in vivo* de la línea celular EL4 mediada por linfocitos Tc antivirales.
- Existe un mecanismo independiente de las gzms A y B que contribuye a la eliminación de células EL4 *in vivo* de forma menos eficiente que en la presencia de dichas gzms.
- La inmunización con el virus LCM activa parcialmente a una población de células peritoneales que eliminan parte de las células inoculadas por un mecanismo independiente de antígeno y dependiente de perf, por lo que podría tratarse de células NK.
- La sonda eFluor670 no proporciona tan buenos resultados como la sonda CTG a la hora de diferenciar las poblaciones celulares inoculadas y distinguirlas de las células peritoneales en los experimentos de citotoxicidad *in vivo*.
- La inmunización con bajas concentraciones de virus LCM (10 pfu) genera una población de linfocitos Tc antivirales capaces de frenar el desarrollo tumoral de células EL4 marcadas con el péptido viral gp33.
- La inmunización con el virus LCM no protege frente al desarrollo tumoral de células EL4 que no han sido marcadas con el péptido viral gp33.
- La inmunización con bajas concentraciones de virus LCM (10 pfu) genera una población de linfocitos Tc antivirales de memoria que no es capaz de impedir el desarrollo tumoral de células marcadas con el péptido viral gp33, pero sí de retardar su crecimiento.
- La inmunización con bajas concentraciones de virus LCM (10 pfu) junto con la inoculación i.p de células marcadas con el péptido viral gp33 genera una respuesta de memoria que no impide el desarrollo tumoral de células marcadas con el péptido viral gp33, pero sí frena su crecimiento de forma más acusada que si solo se inmuniza con el virus LCM.
- El polímero catiónico PEI proporciona mejores resultados que el método de fosfato de calcio en la transfección de la línea celular HEK.293T al proporcionar una población de células transfectadas con una expresión más intensa de la proteína mRFP.
- La proteína MFG-E8 y su forma mutada D89E puede producirse por transfección transitoria en la línea celular HEK.293T mediante el uso del polímero catiónico PEI.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kindt, T.J., *Kuby Immunology*.
2. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol. **29**: p. 235-71.
3. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
4. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
5. Fehniger, T.A., et al., *Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 798-811.
6. Moretta, A., et al., *NK cells at the interface between innate and adaptive immunity*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 226-33.
7. Geisler, C., J. Kuhlmann, and B. Rubin, *Assembly, intracellular processing, and expression at the cell surface of the human alpha beta T cell receptor/CD3 complex. Function of the CD3-zeta chain*. J Immunol, 1989. **143**(12): p. 4069-77.
8. Garcia, K.C. and L. Teyton, *T-cell receptor peptide-MHC interactions: biological lessons from structural studies*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(4): p. 338-43.
9. Weiss, A. and J.D. Stobo, *Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line*. J Exp Med, 1984. **160**(5): p. 1284-99.
10. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
11. Veillette, A., et al., *The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck*. Cell, 1988. **55**(2): p. 301-8.
12. Diez-Orejas, R., et al., *Genetic and immunochemical evidence for CD4-dependent association of p56lck with the alpha beta T-cell receptor (TCR): regulation of TCR-induced activation*. EMBO J, 1994. **13**(1): p. 90-9.
13. Anel, A., et al., *T cell receptor and CD8-dependent tyrosine phosphorylation events in cytotoxic T lymphocytes: activation of p56lck by CD8 binding to class I protein*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2310-9.
14. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. Nature, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
15. Bernabeu, C., et al., *Beta 2-microglobulin from serum associates with MHC class I antigens on the surface of cultured cells*. Nature, 1984. **308**(5960): p. 642-5.
16. Doyle, C.a.J.L.S., *Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion*. Nature. , 1987. **330**(19-25).
17. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay*. J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
18. Monu, N. and E.S. Trombetta, *Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(1): p. 66-72.
19. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
20. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 474-8.
21. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
22. Schoenberger, S.P., et al., *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
23. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.

24. Davignon, D., et al., *Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4535-9.
25. Bosque, A., et al., *Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8+ T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss*. Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1446-53.
26. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.
27. Pardo, J., et al., *The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation*. Microbes Infect, 2009. **11**(4): p. 452-9.
28. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
29. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ. **19**(1): p. 107-20.
30. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-65.
31. Marzo, I. and J. Naval, *Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(8): p. 939-46.
32. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
33. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, *Mechanisms of caspase activation*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 725-31.
34. Marzo, I. and J. Naval, *Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls*. Biochem Pharmacol. **86**(6): p. 703-10.
35. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
36. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
37. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
38. Suzuki, Y., et al., *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 613-21.
39. Hochreiter-Hufford, A. and K.S. Ravichandran, *Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion*. Cold Spring Harb Perspect Biol. **5**(1): p. a008748.
40. Ravichandran, K.S., *Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums*. J. Exp. Med, 2010. **207**(9): p. 1807-1817.
41. Bratton, D.L. and P.M. Henson, *Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up?* Curr Biol, 2008. **18**(2): p. R76-9.
42. Aoki, N., et al., *Molecular cloning of glycoprotein antigens MGP57/53 recognized by monoclonal antibodies raised against bovine milk fat globule membrane*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1245**(3): p. 385-91.
43. Asano, K., et al., *Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 459-67.
44. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
45. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 469-74.
46. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(11-12): p. 1123-36.
47. Martinez-Lostao, L., et al., *Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer*. Biochem Pharmacol. **83**(11): p. 1475-83.

48. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
49. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
50. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
51. He, J.S. and H.L. Ostergaard, *CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2339-48.
52. de Saint Basile, G., G. Menasche, and A. Fischer, *Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules*. Nat Rev Immunol. **10**(8): p. 568-79.
53. Voskoboinik, I., et al., *Perforin: structure, function, and role in human immunopathology*. Immunol Rev. **235**(1): p. 35-54.
54. Pardo, J., et al., *Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control*. Eur J Immunol, 2002. **32**(10): p. 2881-7.
55. Ewen, C.L., K.P. Kane, and R.C. Bleackley, *A quarter century of granzymes*. Cell Death Differ. **19**(1): p. 28-35.
56. Trapani, J.A., *Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases*. Genome Biol, 2001. **2**(12): p. REVIEWS3014.
57. Pardo, J., et al., *Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin*. Cell Death Differ, 2007. **14**(10): p. 1768-79.
58. Hiebert, P.R. and D.J. Granville, *Granzyme B in injury, inflammation, and repair*. Trends Mol Med. **18**(12): p. 732-41.
59. Pardo, J., et al., *Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 567-79.
60. Andrade, F., *Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state*. Immunol Rev. **235**(1): p. 128-46.
61. Froelich, C.J., J. Pardo, and M.M. Simon, *Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases*. Trends Immunol, 2009. **30**(3): p. 117-23.
62. Hayes, M.P., G.A. Berrebi, and P.A. Henkart, *Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 933-46.
63. Metkar, S.S., et al., *Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response*. Immunity, 2008. **29**(5): p. 720-33.
64. Susanto, O., et al., *Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis*. Cell Death Differ. **20**(9): p. 1183-93.
65. Chowdhury, D. and J. Lieberman, *Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 389-420.
66. Irmiler, M., et al., *Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1917-22.
67. Joeckel, L.T., et al., *Mouse granzyme K has pro-inflammatory potential*. Cell Death Differ. **18**(7): p. 1112-9.
68. Alderton, G.K. and Y. Bordon, *Tumour immunotherapy--leukocytes take up the fight*. Nat Rev Immunol. **12**(4): p. 237.
69. Griffith, T.S. and T.A. Ferguson, *Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells*. Immunity. **35**(4): p. 456-66.
70. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
71. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol. **31**: p. 51-72.
72. Green, D.R., *The end and after: how dying cells impact the living organism*. Immunity. **35**(4): p. 441-4.

73. Aguiló, J.I., et al., *Granzyme B of cytotoxic T cells induces extramitochondrial reactive oxygen species production via caspase-dependent NADPH oxidase activation*. Immunol Cell Biol. **88**(5): p. 545-54.
74. Pardo, J., et al., *The differential contribution of granzyme A and granzyme B in cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis is determined by the quality of target cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1980-5.
75. Catalán, E., *Análisis de la contribución de los mecanismos efectores de las células citotóxicas en la inmunidad antitumoral*. Tesis Doctoral, 2013.
76. Chen, C. and H. Okayama, *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(8): p. 2745-52.
77. Ray, A. and B.N. Dittel, *Isolation of mouse peritoneal cavity cells*. J Vis Exp, (35).
78. Rode, M., et al., *Perforin and Fas act together in the induction of apoptosis, and both are critical in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection*. J Virol, 2004. **78**(22): p. 12395-405.
79. Regner, M., et al., *Cutting edge: rapid and efficient in vivo cytotoxicity by cytotoxic T cells is independent of granzymes A and B*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 37-40.
80. Welsh, R.M., et al., *Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1053-63.
81. den Haan, J.M., S.M. Lehar, and M.J. Bevan, *CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1685-96.
82. Florea, B.I., et al., *Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures*. AAPS PharmSci, 2002. **4**(3): p. E12.
83. Lee, M., *Apoptosis Induced by Polyethylenimine/DNA Complex in Polymer Mediated Gene Delivery*. Bull. Korean Chem. Soc, 2007. **28**(1): p. 95-98.
84. Sloodstra, J.W., et al., *Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5*. Mol Divers, 1997. **2**(3): p. 156-64.

