



**Universidad
Zaragoza**

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y

Biología Molecular y Celular

Trabajo de Fin de Grado

**Liposomas decorados con Apo2L/TRAIL
como tratamiento antitumoral
de tumores sólidos**

Autor: Lola Pejenaute Ochoa

Director: Luis Martínez Lostao

ÍNDICE:

Resumen.....	2
Abstarct.....	3
Antecedentes y Objetivos.....	4
Introducción.....	6
Apoptosis.....	6
Vías de la apoptosis.....	7
Vía intrínseca.....	7
Vía extrínseca.....	8
Apo2L/TRAIL.....	8
Características y receptores.....	8
Apo2L/TRAIL como tratamiento anti-tumoral.....	9
Materiales y Métodos.....	11
Expresión y purificación Apo2L/TRAIL-His ₆	11
Expresión de Apo2L/TRAIL TRAIL-His.....	11
Purificación de Apo2L/TRAIL-His ₆	12
Preparación de las nanopartículas lipídicas LUV-TRAIL.....	12
Preparación de las nanopartículas tipo LUV.....	12
Preparación de los LUV-TRAIL.....	12
Cultivos celulares.....	13
Ensayos de citotoxicidad.....	13
Ensayo de reducción del MTT.....	13
Cuantificación de la muerte celular mediante tinción con IP.....	14
Expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL.....	15
Microscopía de fluorescencia.....	15
Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i>	15
Análisis estadístico.....	17
Resultados.....	18
Estudio de citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células HCT-116.....	18
Expresión de receptores de Apo2L/TRAIL en células HCT-116.....	18
Citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL en células HCT-116.....	19
Análisis de la morfología nuclear tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116.....	19
Activación de las caspasas tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116.....	19
Estudio de citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células Caki-1.....	20
Expresión de receptores de Apo2L/TRAIL en células Caki-1.....	20
Citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL en células Caki-1.....	20
Análisis de la morfología nuclear tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1.....	20
Activación de las caspasas tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1.....	21
Discusión.....	22
Conclusiones.....	24
Conclusions.....	25
Bibliografía.....	26

RESUMEN:

El propósito principal de este trabajo de fin grado ha consistido en llevar a cabo la purificación de la proteína Apo2L/TRAIL (TRAIL) y unirla a la superficie de nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL) con el objetivo de usarla como tratamiento antitumoral en tumores sólidos, en concreto de colon, para lo cual se utilizó la línea celular HCT-116 y de riñón empleando la línea celular Caki-1.

Para ello, se ha llevado a cabo la purificación de dicha proteína, y la generación de las nanopartículas lipídicas y posteriormente se unió la proteína a su superficie para analizar su bioactividad y capacidad como tratamiento antitumoral comparándola con la proteína soluble.

TRAIL es un ligando mortal que interaccionan con sus receptores pro-apoptóticos en células tumorales activando la vía extrínseca de la apoptosis e induciendo la muerte de células cancerosas. Por ello, antes de llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad se estudió en ambas líneas la expresión de los receptores de TRAIL. Posteriormente se llevaron a cabo estudios de la citotoxicidad de los LUV-TRAIL comparándolos con TRAIL soluble realizando ensayos dosis-respuesta y se analizó la muerte de las células tumorales mediante citometría de flujo y MTT. También se emplearon durante estos experimentos un anticuerpo bloqueante específico de TRAIL; RIK, con el objetivo de demostrar que la muerte inducida por los LUV-TRAIL en dichas líneas se debe específicamente a TRAIL.

Para estudiar los cambios morfológicos nucleares que sufren las células tras el tratamiento con los LUV-TRAIL se realizó una tinción nuclear empleando la sonda fluorescente Hoechst y se analizó mediante microscopía de fluorescencia. Se observó en ambas líneas celulares que tras el tratamiento con los LUV-TRAIL se producían los eventos característicos de la apoptosis como la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo y la formación de burbujas nucleares llamadas "*blebs*".

Finalmente, para analizar la capacidad de los LUV-TRAIL de inducir apoptosis se analizó su capacidad de activar las principales caspasas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis. Para ello, se realizó un Western Blot para ambas líneas celulares tratadas con los LUV-TRAIL para analizar la activación de la caspasa 8 y la caspasa 3, y se realizaron experimentos de citotoxicidad empleando los inhibidores de caspasas ZVAD (inhibidor general de caspasas) e IETD (inhibidor específico de caspasa 8), con el objetivo de demostrar que la muerte inducida por los LUV-TRAIL en dichas líneas se produce como consecuencia de la activación de caspasas.

ABSTRACT:

The main purpose of this final project work has been to carry out the purification of Apo2L/TRAIL (TRAIL) and to anchor it to the surface of the lipid nanoparticles (LUV-TRAIL), in order to use it as an antitumor treatment in solid tumors, particularly in colon cancer, using HCT-116 cellline, and in renal cancer, using Caki-1 cell line.

It has been performed the purification of TRAIL, the generation of the lipid nanoparticles, and after that, TRAIL was tethered to liposome surface. Finally the bioactivity and antitumor ability of LUV-TRAIL was analyzed compared the soluble version of TRAIL.

TRAIL is a death ligand which interacts with its pro-apoptotic receptors in tumor cells, activating the extrinsic apoptotic pathway and inducing cell death. Therefore, the expression of TRAIL receptors was studied in both tumor cell lines before carrying out the cytotoxic assays. Then, cytotoxicity assays using LUV-TRAIL and soluble TRAIL were performed analyzing cell death by the MTT method and by flow cytometry. In some cases the blocking anti-human TRAIL, RIK was used in order to corroborate that cell death induced by LUV-TRAIL on these lines was specifically due to TRAIL.

In order to study the nuclear morphological changes after LUV-TRAIL treatment, it was carried out nuclear staining with the fluorescent probe Hoechst and was analyzed by fluorescence microscopy. In both cells lines, it was observed that LUV-TRAIL treatment induced the typical apoptotic morphological changes in nuclei such as chromatin condensation, nuclear fragmentation and blebbing formation.

Finally, to study the ability of LUV-TRAIL to induce apoptosis, it was analyzed their capability to induce the activation of the main caspases (caspase 8 and caspase 3) implicated in the extrinsic apoptotic pathway by Western Blot in both cells lines. It also carried out cytotoxicity assays using the pancaspase inhibitor ZVAD and the caspase 8 inhibitor IETD in order to asses that LUV-TRAIL-induced cell death was due to a caspase activation in both cell lines.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS:

La molécula de Apo2L/TRAIL endógena fue descubierta de forma independiente a mediados de la década de 1990, por dos grupos diferentes (Pitti, *et al* 1996, Wiley, *et al* 1995). Se trata de una proteína de membrana tipo II que pertenece a la familia del TNF capaz de inducir apoptosis en gran variedad de células cancerosas, al unirse a sus receptores pro-apoptóticos DR4 y DR5, pero no en células normales lo que hizo de esta molécula un prometedor agente para la terapia contra el cáncer (Almasan and Ashkenazi 2003).

De hecho en la actualidad se encuentran varios ensayos clínicos en fase II/III basados en el efecto pro-apoptótico de Apo2L/TRAIL sobre varios tipos de cánceres. Los estudios donde se está empleando dicha proteína utilizan principalmente dos estrategias terapéuticas: el uso de Apo2L/TRAIL humano recombinante soluble, o bien el uso anticuerpos monoclonales agonistas dirigidos contra DR4 o DR5 solos o en combinación con otras drogas (Ashkenazi 2008, Martinez-Lostao, *et al* 2012). En éstos últimos, los resultados obtenidos son más o menos prometedores debido a que el estrés de la combinatoria desencadena la apoptosis con mayor eficacia que de forma individual

Sin embargo, a pesar de la seguridad que Apo2L/TRAIL ha demostrado como monoterapia en los estudios clínicos, su efectividad no ha sido la esperada ya que hasta un 50% de los cánceres presentan resistencia a la forma soluble de Apo2L/TRAIL debido a distintos mecanismos moleculares.

Por ello, durante los últimos cuatro años, se emprendió un proyecto en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza para acoplar Apo2L/TRAIL a la superficie de nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL) con una composición lipídica similar a la de los exosomas naturales con fin de emplearlos como tratamiento anti-tumoral ya que se había demostrado, en estudios anteriores del mismo grupo, que en los linfocitos T activados la forma fisiológica de secreción de Apo2L/TRAIL es anclado a la superficie de unas vesículas lipídicas llamadas exosomas.

Dada la implicación de Apo2L/TRAIL en la regulación del sistema inmune, se emplearon los LUV-TRAIL *in vivo* en un modelo experimental de artritis reumatoide observándose una mayor efectividad de los mismos comparados con la forma soluble de Apo2L/TRAIL a la hora de reducir la inflamación articular (Martinez-Lostao, *et al* 2010).

Posteriormente se estudió la capacidad anti-tumoral de los LUV-TRAIL analizando su efecto citotóxico en distintas líneas celulares tumorales humanas de estirpe hematológica, que o bien sobre-expresaban proteínas anti-apoptóticas o bien

se habían silenciado proteínas pro-apoptóticas lo que les confería resistencia no solo a la muerte inducida por Apo2L/TRAIL soluble sino también a la muerte celular inducida por los fármacos quimioterápicos convencionales (De Miguel, *et al* 2013). El análisis comparativo de la capacidad citotóxica de Apo2L/TRAIL soluble y los LUV-TRAIL demostró que éstos inducían la apoptosis en todas las células tumorales analizadas de una forma mucho más eficaz que Apo2L/TRAIL soluble disminuyendo significativamente la concentración inhibitoria media (IC₅₀) sin mostrar citotoxicidad frente a su contrapartida normal, los linfocitos T mostrando por tanto una alta especificidad contra las células tumorales.

Los liposomas han sido utilizados como un vehículo de transporte de diferentes compuestos dirigidos contra células diana. Sin embargo, la unión de proteínas capaces de inducir la apoptosis supone una nueva vía de actuación sobre las células tumorales, con prometedores resultados, que hasta entonces no había sido puesta en marcha, y suponía una nueva posibilidad para hacer frente a distintos tipos de cáncer resistentes a la forma soluble de Apo2L/TRAIL, actualmente en distintos ensayos clínicos, al incrementar significativamente su bioactividad.

A la vista de estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo de fin de grado ha sido continuar con el estudio de los LUV-TRAIL como tratamiento antitumoral estudiando su capacidad citotóxica en este caso, sobre diferentes líneas celulares tumorales humanas provenientes de tumores sólidos. Los objetivos concretos de este trabajo de fin de grado han sido:

- 1) Obtener y purificar Apo2L/TRAIL-His₆ recombinante soluble empleando *E. Coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP transformadas con el plásmido pET28c-His₆-sApo2L/TRAIL.
- 2) Generar nanopartículas lipídicas artificiales de características similares en cuanto a tamaño y composición lipídica a la de los exosomas naturales con Apo2L/TRAIL-His₆ anclado a su superficie (LUV-TRAIL).
- 3) Analizar la capacidad de inducir muerte celular in vitro tanto de la forma soluble como de los LUV-TRAIL comparando su actividad sobre líneas celulares de tumores sólidos provenientes de un cáncer de colon (HCT-116) y de un cáncer de riñón (Caki-1).
- 4) Estudiarlos mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL.

INTRODUCCIÓN:

Apoptosis

La Apoptosis es un tipo de muerte celular programada, es decir, en la que su activación y ejecución se dan de forma controlada y ordenada, siguiendo una secuencia determinada por elementos codificados genéticamente. Produce una muerte limpia de la célula en la cual los restos celulares son retirados por macrófagos sin que haya salida del material citoplasmático al exterior de la célula y sin que tenga lugar un proceso inflamatorio.

Las células apoptóticas presenta una serie de características fenotípicas que permiten diferenciarlas en cultivo como la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular, condensación anormal de la cromatina y fragmentación nuclear, aparición de burbujas en la membrana plasmática (*blebs*) y caída del potencial de membrana mitocondrial.

Se trata de un proceso fundamental e indispensable para el desarrollo y mantenimiento adecuado de cualquier ser pluricelular, de modo que la falta de regulación de la apoptosis por exceso o por defecto puede contribuir a la producción de trastornos en el organismo tales como cáncer, malformaciones, trastornos metabólicos, neuropatías, lesiones miocárdicas y enfermedades autoinmunes.

Las principales moléculas encargadas de transducir, amplificar y ejecutar la apoptosis son las caspasas. Éstas son una clase de cisteín-proteasas con especificidad de corte en ácido aspártico que se sintetizan en forma de zimógeno, como procaspasas inactivas, y se localizan por norma general en el citoplasma. Las caspasas se activan por proteólisis, llevada a cabo por otras caspasas o por ellas mismas, separándose las subunidades p20 y p10. Una vez activadas, las caspasas actúan como proteasas sobre sus sustratos.

Las caspasas que intervienen en la apoptosis pueden clasificarse en:

- Caspasas iniciadoras: caspasas 2, 8, 9 y 10 □ Dentro de las caspasas iniciadoras, las caspasas 8 y 10 presentan dominios DED (*Dominios efectores de muerte*), mientras que las caspasas 2 y 9 presentan dominios CARD (*Dominio de reclutamiento de caspasas*).
- Caspasas ejecutoras: caspasas 3, 6 y 7 □ son activadas por las caspasas iniciadoras por proteólisis actuando ellas mismas como proteasas proteolizando multitud de proteínas vitales para mantener la integridad celular conduciendo a la célula a la apoptosis.

Vías de la apoptosis

La apoptosis se puede llevar a cabo a través de dos vías principales:

Vía intrínseca

Esta ruta es la más conservada evolutivamente. También se le llama ruta mitocondrial, porque la mitocondria juega un papel muy importante.

Cuando la célula se ve sometida a determinados agentes o estímulos estresantes tales como radiación UV, quimioterapia o daño en el DNA se ponen en marcha diferentes mecanismos de señalización celular activando dicha ruta apoptótica.

En esta vía juegan un papel fundamental las proteínas de la familia Bcl-2. Dentro de las proteínas de la familia Bcl-2, que regulan procesos de permeabilización mitocondrial podemos encontrar tres subfamilias:

- **Proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1)**: permiten su asociación a las proteínas pro-apoptóticas, inhibiendo su acción.
- **Proteínas pro-apoptóticas multidominio (Bax, Bak)**: Bax se encuentra en el citosol como monómero, y Bak se encuentra asociado a la membrana interna mitocondrial. Al recibir un estímulo apoptótico, Bax y Bak se unen y forman canales en la membrana mitocondrial por los que sale al citosol el citocromo c del espacio intermembrana.
- **Proteínas pro-apoptóticas sólo BH3 (Bid, Bim, Noxa, Puma)**: No pueden iniciar apoptosis por si solas sino actúan asociándose a las proteínas de la subfamilia anti-apoptótica, inhibiendo su acción anti-apoptótica o uniéndose directamente a Bax y Bak activando su actividad pro-apoptótica.

La activación de la vía intrínseca provoca la caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la salida de diversos elementos pro-apoptóticos desde la matriz mitocondrial al citosol, como son el citocromo c o Smac/DIABLO (inhibidor de IAPs). Una vez en el citosol, el citocromo c liberado se une a la molécula adaptadora Apaf-1 y a la procaspasa 9 promoviendo la formación de un complejo multimolecular denominado apoptosoma, en el que se activa la caspasa 9. Esta caspasa 9 activa procesa y activa a su vez a las caspasas ejecutoras (fundamentalmente caspasa 3 y 7) que finalmente llevan a la célula a la muerte por apoptosis.

Vía extrínseca

Esta vía de inducción de apoptosis se activa por medio de la unión de un ligando mortal a su receptor específico en la superficie de la membrana celular. Los ligandos mortales son proteínas que pertenecen a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Algunos de ellos activan vías de señalización implicadas en respuestas

pro-inflamatorias y de diferenciación celular, como TNF- α y en ocasiones la apoptosis , y otros como , FasL y Apo2L/TRAIL que son fundamentalmente pro-apoptóticos.

Estos ligandos poseen receptores mortales específicos que son proteínas de membrana de tipo I que poseen entre una y cinco repeticiones de secuencias ricas en cisteína (CRD) en su parte extracelular y un dominio mortal (DD) en su región intracelular. Los receptores para los distintos ligandos mortales son CD95/Apo1/Fas en el caso de FasL, TNFR para TNF α . Y en el caso de Apo2L/TRAIL, sin embargo se caracteriza porque tener más de un receptor: DR4 y DR5 que son los receptores pro-apoptóticos, DcR1 y DcR2 que actúan como receptores señuelo incapaces de transducir la señal pro-apoptótica y un receptor soluble llamado osteoprotegerina.

La transducción de la señal apoptótica comienza cuando un homotrímero de ligando mortal se une a su correspondiente receptor mortal a través de las CRD provocando que los receptores mortales también trimericen a nivel extracelular, lo que a su vez provoca que las regiones intracelulares adopten una conformación determinada que hace que se recluten unas proteínas adaptadoras a los dominios mortales, TRADD (para TNF- α) y FADD para FasL y Apo2L/TRAIL que poseen tanto dominios mortales (DD) que les permiten por una parte unirse a los DD de los receptores, como dominios efectores de muerte (DED) que les permiten unirse a los DED de las procaspasas iniciadoras 8 y 10. Se forma de este modo un complejo multimolecular intracelular que se denomina DISC (*Death Inducing Signalling Complex*) donde las procaspasas iniciadoras (fundamentalmente la procaspasa 8) se activan. La caspasa 8 activa procesa y activa directamente a las procaspasas ejecutoras (3, -6 y -7) llevando a la célula a la muerte por apoptosis.

En algunos tipos celulares existe un nexo de unión entre la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. En estos casos, la caspasa 8 activa puede procesar a la proteína pro-apoptótica sólo BH3 de la familia de las Bcl-2, Bid dando lugar a un fragmento corto activo llamado tBid que capaz de inducir la oligomerización de Bax/Bak activando así la vía intrínseca de la apoptosis y amplificando la señal apoptótica.

Apo2L/TRAIL

Características y receptores

Apo2 Ligando, Apo2L, también denominado TRAIL, *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*, es un ligando mortal, miembro de la superfamilia del TNF, capaz de iniciar el proceso apoptótico por la vía extrínseca de manera independiente de Fas .

El gen de 20 kb que codifica a Apo2L/TRAIL está localizado en el cromosoma 3, y está compuesto de cinco exones y cuatro intrones. Como miembro de la superfamilia del TNF, se expresa como proteína transmembrana de tipo II, de 281 aminoácidos de

tamaño en su forma humana. Este ligando comparte un 28% de homología en su secuencia con FasL y un 23% con TNF y aunque estos porcentajes parezcan bajos, el análisis de la estructura cristalina del monómero de Apo2L/TRAIL muestra una alta similitud con las estructuras tridimensionales de estos dos ligandos.

Los monómeros de Apo2L/TRAIL trimerizan en torno a un átomo de Zinc formando homotrímeros, que se unen e inducen la trimerización de sus receptores pro-apoptóticos de la membrana celular (DR4 y DR5) potenciando la actividad citotóxica de Apo2L/TRAIL en comparación con la forma monomérica.

De los receptores cinco receptores de Apo2L/TRAIL descritos, DR4 y DR5 son capaces de unirse a los trímeros de Apo2L/TRAIL y a través de sus dominios mortales son capaces de originar la formación del DISC y transmitir la señal apoptótica. Sin embargo, DcR1 y DcR2 no son capaces de transducir esta señal al carecer, en el caso de DcR1 de toda la porción intracelular, y en el caso de DcR2 de dominios mortales funcionales. Existe así una competición entre ambos pares de receptores por unirse a Apo2L/TRAIL, lo que hizo pensar en un principio que estos receptores señuelo eran los responsables de la resistencia de algunos tumores, sin embargo, esta teoría fue rebatida por estudios posteriores que indicaron que la resistencia tumoral se debía a otros motivos, de modo que la funciones de Apo2L/TRAIL no está clara.

Apo2L/TRAIL como tratamiento anti-tumoral

La expresión de Apo2L/TRAIL se ha detectado en linfocitos T CD4+ y CD8+ activados, células NK, macrófagos y células dendríticas. En linfocitos T activados los ligandos mortales Apo2L/TRAIL y también FasL, se encuentran asociados a la superficie de microvesículas lipídicas llamadas exosomas de 100 a 200 nm de diámetro que se almacenan en el interior de cuerpos multivesiculares citoplasmáticos y son secretados asociados a los exosomas por parte de los linfocitos T tras una activación adicional.

En estudios en los que se usaron ratones deficientes en TRAIL o ratones ancianos carentes de Apo2L/TRAIL han mostrado un aumento del crecimiento de tumores y mayor propensión a metástasis comparados con ratones control y ratones sanos respectivamente (Cretney, *et al* 2002). Estos resultados junto con los aquellos que indicaban la capacidad de Apo2L/TRAIL para inducir apoptosis en células tumorales sin afectar a las células sanas, hicieron pensar en esta molécula como un posible tratamiento contra el cáncer. Se ha analizado la capacidad anti-tumoral de Apo2L/TRAIL en varios ensayos clínicos en fase II/III empleando principalmente dos estrategias terapéuticas: el uso de Apo2L/TRAIL humano recombinante soluble, o bien el uso anticuerpos monoclonales agonistas dirigidos contra DR4 o DR5 (Ashkenazi 2008, Martinez-Lostao, *et al* 2012). El empleo de Apo2L/TRAIL como monoterapia ha demostrado una muy buena bioseguridad sin embargo, hasta un 50% de los canceres presentan resistencia a la forma soluble de Apo2L/TRAIL debido a distintos

mecanismos moleculares haciendo que su efectividad anti-tumoral haya sido muy limitada (Micheau, *et al* 2013). Por lo tanto el desarrollo de nuevas formulaciones de Apo2L/TRAIL que mejoren su actividad anti-tumoral es de enorme interés y éstas podrían tener una gran aplicación clínica.

Durante los últimos cuatro años, se ha llevado a cabo un proyecto en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza para generar nanopartículas lipídicas con una composición lipídica similar a la de los exosomas naturales y acoplarles Apo2L/TRAIL a su superficie con el fin de emplearlos como tratamiento anti-tumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Expresión y purificación Apo2L/TRAIL-His₆

Expresión de Apo2L/TRAIL-His₆

La molécula de Apo2L/TRAIL empleada en el presente trabajo corresponde a la porción extracelular soluble (aminoácidos del 95 al 281) con una cola de 6 histidinas en su extremo amino terminal cuyo cDNA esta clonado en el plásmido pET28c-Apo2L/TRAIL-His₆ (Novagen, amablemente cedido por la Dra M. MacFarlane). Para su expresión se han transformado bacterias *E. Coli* competentes BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene) con dicho plásmido mediante choque térmico. Para ello, 100 µL de bacterias se incubaron con 40 ng del plásmido se incubaron en hielo durante 30 minutos, y después se aplicó el choque térmico durante 20 segundos a 46 °C para que el plásmido se introduzca en el interior de las bacterias. y luego se dejaron las bacterias 2 minutos en hielo. Finalmente las bacterias transformadas se incubaron durante 2 horas a 37°C para que desarrollasen la resistencia a antibióticos aportada por el plásmido.

Las bacterias ya transformadas se sembraron con un asa de siembra esterilizada sobre la superficie de la placa de LB-agar y ampicilina a 100 µg/ml incubándolas boca abajo en estufa a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, tras crecer las bacterias en la placa, se tomó una colonia y se creció en 10 mL de medio líquido LB con kanamicina 100 µg/ml en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanza una DO₆₀₀ entre 0,6–0,8, momento en el que se llevó a cabo la inducción de Apo2L/TRAIL-His₆ cultivo mediante la adición de IPTG (isopropil-β-D-1- tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1mM. Tras la inducción, se incubo en agitación a 20°C durante 18 horas. Al dejar las bacterias incubándose a esta temperatura su metabolismo es más lento, no expresa tanta cantidad de proteínas, pero no se forman cuerpos de inclusión que posteriormente es necesario renaturalizar sino que la proteína se encuentra en su forma nativa.

Purificación de Apo2L/TRAIL-His₆

Tras recoger el cultivo de células, se lavó con el tampón PBS y al pellet bacteriano obteniéndose le añadió el tampón de solubilización para lisar las bacterias al que se le añadió lisozima (500 µg/ml), DNAasa (1 µg/10ml), DTT (2mM) e inhibidores de proteasas y se dejó incubando durante 3 horas a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron las bacterias recolectando el sobrenadante en el que se encuentra Apo2L/TRAIL-His₆ correctamente plegada en su forma nativa.

Para purificar Apo2L/TRAIL-His₆, el sobrenadante se incubó con una resina de cobalto previamente equilibrada específica para purificar proteínas que poseen cola de histidinas durante 2 horas a 4°C en agitación. Tras la incubación la resina se lavó varias veces con el tampón de lavado. y finalmente se llevó a cabo la elución de Apo2L/TRAIL-His₆ con imidazol 150 mM. Tras la elución de Apo2L/TRAIL-His₆, se cambió a otro tampón más fisiológico, KHE (KCl 100mM, HEPES 10mM pH 7.0, EDTA 0.1mM), sin imidazol empleando los filtros centrifugables Amicon (Millipore). Finalmente se cuantificó la cantidad de proteína total purificada y funcional obtenida mediante el método de Bradford.

Preparación de las nanopartículas lipídicas LUV-TRAIL

Preparación de las nanopartículas tipo LUV

Para llevar a cabo la síntesis de liposomas se empleó una mezcla lipídica que contenía fosfatidilcolina, esfingomiolina, colesterol y DOGS-NTA-Ni (lípidos artificiales con níquel que permite la unión de Apo2L/TRAIL a la superficie del liposoma a través de su cola de histidinas) en una proporción 55:30:10:5.

La mezcla de lípidos preparada en un tubo *Eppendorf* se sometió a una corriente de nitrógeno entre 30 minutos y posteriormente 3 horas a vacío para eliminar el disolvente (cloroformo) tras lo cual, las láminas lipídicas secas formadas en el fondo de los tubos se resuspendieron con tampón KHE formándose las vesículas denominadas MLV (*Multilamellar Vesicles*) formadas por varias bicapas lipídicas superpuestas. Los MLV se sometieron a 10 ciclos de congelación/descongelación mediante la inmersión en nitrógeno líquido durante 1 minuto y en un baño de agua a 37°C para eliminar en su mayoría las bicapas lipídicas superpuestas obteniéndose vesículas llamadas LOV (*Large Oligolamellar Vesicles*), que finalmente fueron sometidos a un proceso de extrusión haciéndolos pasar a través de filtros de policarbonato (Whatman) con un diámetro de poro de 200 nm en el que se eliminaron el resto de las bicapas lipídicas superpuestas obteniéndose finalmente las vesículas denominadas LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) que se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Preparación de los LUV-TRAIL

Una vez purificada la proteína y preparados los liposomas tipo LUV se generaron LUV con la Apo2L/TRAIL-His₆ anclado en su superficie, los LUV-TRAIL.

Los LUV se incuban con la proteína Apo2L/TRAIL-His₆ a una relación molar proteína:lipido de 1:2.000. Los LUV se emplean a una concentración final de 2, 5 mM. Conocido el peso molecular de Apo2L/TRAIL-His₆ (22 kDa), para mantener la relación molar proteína:lipido mencionada, la concentración final de Apo2L/TRAIL-His₆ ser de 12 µg/ml. Una vez preparada la mezcla en un *Eppendorf* ésta se incubó en un bloque

seco a 37°C durante 30 minutos en agitación a 800 rpm. Tras haberse incubado la mezcla se centrifugó a 60000 rpm a 4°C durante 6 horas y finalmente se eliminó el sobrenadante y el pellet donde se encontraban los LUV-TRAIL se resuspendió en el mismo volumen de KHE estéril y se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

Cultivos celulares

Durante este trabajo se han utilizado dos líneas celulares tumorales humanas procedentes de tumores sólidos: **HCT116** (proveniente de un carcinoma de colon) y **Caki-1** (proveniente de un carcinoma renal). Las células se mantuvieron en cultivo empleando el medio DMEN (*Gibco*) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2mM y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomycin 100 µg/ml).

Las líneas celulares se cultivaron a una densidad de 3x10⁵ células/ml en el caso de Caki-1 y 2x10⁶ células/ml en el caso de HCT116 ya que su velocidad de crecimiento era mucho mayor, se mantuvieron en un incubador termostático (Heraeus Cell) a 37°C, en aire saturado de humedad y con 5% de CO₂. Todas las manipulaciones con las dichas líneas se realizaron con material estéril y en campanas de flujo laminar vertical (*Telstar*).

La densidad y viabilidad celular se determinó mediante tinción por exclusión con azul tripán. La densidad celular se determinó con la siguiente fórmula:

$$n^{\circ} \text{célula/mL} = \frac{n^{\circ} \text{células vivas} * 10^4 * 2}{n^{\circ} \text{cuadrantes}}$$

La viabilidad celular se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{células vivas}}{n^{\circ} \text{células totales}}$$

En todos experimentos realizados las células presentaban una viabilidad superior al 90%.

Ensayos de citotoxicidad

Ensayo de reducción del MTT

Para determinar la proliferación celular del cultivo celular una vez que había sido tratado con Apo2L/TRAIL soluble y LUV-TRAIL se empleó el método de Mosmann modificado basado en la reducción del MTT (bromuro de dimetil-tiazoliltetrazolio). Este método relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul de formazán insolubles en medio acuoso que son capaces de formar, para ello, las células vivas presentan enzimas oxidoreductasas capaces de reducir el reactivo amarillo tetrazolio a azul de formazán.

Para llevar a cabo el experimento se cultivaron $1,2 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano, durante 24 horas, tiempo necesario para que las células se adhiriesen a la base del pocillo. Posteriormente, se añadió Apo2L/TRAIL-His₆ (TRAIL soluble) o LUV-TRAIL a las concentraciones finales de 1000; 333,33; 111,11; 37,04; 12,35; 4,12 y 1,37 ng/ml. De cada punto experimental se hizo un triplicado, como control se dispusieron células sin tratar y como blanco se empleó medio de cultivo DMEN completo. Tras 24 horas, se añadieron 10 μ L del reactivo de MTT (preparado a una concentración de 5 mg/ml en PBS) y se dejó incubar en la estufa durante 2-3 horas a 37 °C. Una vez que se observó la formación de cristales, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 4500 rpm, se eliminaron 50 μ L de medio de cada pocillo y se añadieron 100 μ L de isopropanol, se agitó la placa en el agitador de placas (Bioblock) y se midió la absorbancia en un lector de placas ELISA MR5000 (Dynatech).

Los resultados se han representado como el porcentaje de viabilidad de las células expuestas a las distintas concentraciones de TRAIL soluble y LUV-TRAIL respecto al control de células no tratadas.

Cuantificación de la muerte celular mediante tinción con yoduro de propidio

El yoduro de propidio es un agente intercalante fluorescente, capaz de unirse al DNA, éste es impermeable a la membrana plasmática por lo que es excluido en las células viables con la membrana íntegra, sin embargo en las células muertas cuya membrana plasmática se encuentra dañada, puede penetrar a través de ella uniéndose al DNA. Mediante el posterior análisis mediante citometría de flujo, se puede evaluar el porcentaje de células muertas tras el tratamiento con TRAIL soluble o LUV-TRAIL cuantificando el número de células yoduro de propidio positivas.

El experimento se preparó de la misma forma que el ensayo de MTT, sembrando $1,2 \times 10^4$ células/pocillo en placa de 96 pocillos y a las 24 horas se añadió la concentración de una droga adecuada dejándola actuar durante otras 24 horas.

Para realizar el marcaje se retiró el sobrenadante de los pocillos y se trasvasó a otra placa, las células se despegaron de la base de la placa añadiendo 50 μ L de tripsina e incubándolas durante 5 minutos a 37 °C. Las células se pasaron a la placa donde se encontraba el sobrenadante y ésta se centrifugó 5 minutos a 4500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió a cada pocillo 1,5 μ L de IP en 98,5 μ L de PBS. Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad, en un agitador de placas para evitar que se adhiriesen de nuevo, se resuspendieron en 200 μ L de PBS y se analizaron resultados mediante citometría de flujo.

Algunos de los experimentos de citotoxicidad se llevaron a cabo en presencia del anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK (BD Biosciences), del inhibidor general de caspasas, ZVAD o del inhibidor específico de caspasas 8, IETD (ambos de Bachem). Para

ello, TRAIL soluble o los LUV-TRAIL se preincubaron con 500 ng/ml de RIK durante 1 hora a 37 °C. En el caso de los inhibidores de caspasas, las células se preincubaron con 30 μM de ZVAD o IETD durante 1 hora a 37 °C. En ambos casos, el resto del ensayo de citotoxicidad se realizó como se ha descrito.

Expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL

La expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL, DR4, DR5, DcR1 y DcR2 se analizó mediante citometría de flujo empleando anticuerpos específicos para cada uno de los receptores conjugados con ficoeritrina (BD Bioscience).

Para ello se recolectaron 5×10^4 células por punto experimental a las que se les añadió 1 ml de PBS con 5% de SFB. Tras centrifugar las células, se resuspendieron en 100 μL del anticuerpo correspondiente diluido en PBS con 5% de SFB. Las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a Tª ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las células, se lavaron con 500 μL de PBS en 5% de SFB dos veces y finalmente las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Como control negativo las células se marcaron con un control de isotipo conjugado con ficoeritrina (BD Bioscience).

Microscopia de fluorescencia

Para analizar las características morfológicas nucleares típicas de la apoptosis (formación de *blebs*, condensación cromatínica, desintegración nuclear) se realizó tinción de las células con el colorante nuclear Hoechst 33342 (colorante fluorescente permeable que se excita con una longitud de onda de 350 nm y emite a 460 nm y que es capaz de unirse al surco menor de la doble hebra de DNA, con preferencia por las secuencias ricas en adenina y timina).

Para ello, se sembraron 4×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos sobre las cuales se había depositado un cubreobjetos esterilizado con etanol, durante 24 horas y posteriormente se añadió TRAIL soluble o LUV-TRAIL durante 6 horas. Posteriormente, se tomó una muestra de cada pocillo para analizarla muerte celular mediante citometría de flujo y con el resto se llevó a cabo la tinción. Se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 15 minutos a 4ªC. Tras lavar las células con PBS, se retiró el sobrenadante y se tiñeron las células añadiendo el colorante Hoechst 33342. Las muestras se guardaron en la nevera a 4ªC durante toda la noche y se observaron al microscopio de fluorescencia al día siguiente.

Análisis de proteínas mediante Western-blot

Para analizar la activación de la caspasa 8 y la caspasa 3 mediante *Western blot*, se sembraron 1×10^6 células en una placa de 6 pocillos y se les añadió 300 ng/ml de TRAIL soluble o LUV-TRAIL. Tras 12 horas, se recolectaron las células, se lavaron con

PBS y se les añadió 30 µl de tampón de lisis (Tritón X-100 al 1% (v/v), Tris-HCl 50mM pH 7,6, EDTA 1mM, ortovanadato sodico 1mM, pirofosfato sódico 10mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1mM, fluoruro de sodio 10mM, leupeptina 1mM, cloruro de sodio 150mM y glicerol al 10% (v/v)). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, se centrifugaron 5 minutos a 14000 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante al que se le añadió 30 µl de un tampón de carga 3x (Tris-HCl 150mM pH 7,4, SDS al 3%, molibdato de sodio 0,3mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro de sodio 30mM, glicerol al 30% (v/v), β-mercaptoetanol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,06% (p/v)). Por último, los lisados celulares se calentaron a 100 °C en un bloque seco durante 5 minutos , se centrifugaron 15 segundos a 1500 rpm .

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

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de polivinilo difluorido (PVDF, Hybond C-extra, Amersham) utilizando un tampón de transferencia compuesto por: Tris-HCl 48mM pH 8,3, glicina 3mM, SDS al 0,037% y metanol al 20%. La transferencia se llevó a cabo en un equipo de transferencia semi-seca (Hoefler) a 20 V y 400 mA, durante 55 minutos.

Las proteínas fijadas en las membranas de PVDF se analizaron mediante el uso de anticuerpos específicos (primario y secundario) y el sustrato correspondiente. En primer lugar, la membrana de PVDF se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS y se lavo 3 veces durante 5 minutos con Tampón B (NaCl 0,12M, tris/HCl 10mM pH 8,0, Tween 20 al 0,1% (p/v) en PBS pH 7,4). Posteriormente, la membrana se incubo con el anticuerpo primario específico (diluido en tampón B con leche desnatada en polvo al 2%) para detectar la proteína deseada durante 12 horas, los anticuerpos utilizados fueron:

- ✓ **Caspasa 8** (0,1 µg/ml) □ Ratón (BD Pharmingen)
- ✓ **Pro-caspasa 3** (0,1 µg/ml) □ Conejo (Cell Signaling)
- ✓ **Caspasa 3** (0,1 µg/ml) □ Conejo (Cell Signaling)
- ✓ **Actina** (0,1 µg/ml) □ Ratón (BD Pharmingen)

Tras la incubación, la membrana se lavó con tampón B 3 veces durante 5 minutos en agitación y luego se incubo con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa o fosfatasa alcalina correspondiente (Sigma) diluido en tampón B con leche desnatada en polvo al 2% durante 1 hora. Una vez, finalizada la incubación, se retiró el

anticuerpo secundario, se lavó la membrana con tampón B 3 veces durante 10 minutos en agitación y finalmente se añadió el sustrato correspondiente.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante una solución de revelado, preparada en el momento de su utilización, que contenía: 22,5 ml de tampón Tris-HCl 0,2M, MgCl₂ 1mM, pH 9,6, 2,5 ml de una disolución 1 mg/ml de NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) en dimetilformamida y 375 µl de una disolución 4 mg/ml de BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) en dimetilformamida (todos ellos de Sigma). La reacción de revelado se detuvo lavando la membrana con abundante agua destilada. Finalmente se llevó a cabo un control de carga mediante el revelado de actina del mismo modo que se ha indicado antes.

Análisis estadístico

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de *Student*. Los datos que se muestran corresponden a la media ± desviación estándar típico (SD).

En todos los casos, se ha considerado como significativamente estadístico un valor de $p < 0,05$. Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft).

RESULTADOS:

Estudio de citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células HCT-116

Expresión de receptores de Apo2L/TRAIL en células HCT-116

En primer lugar se analizó mediante citometría de flujo la expresión de los receptores pro-apoptóticos DR4, DR5 así como los receptores señuelo DcR1 y DcR2 (ANEXO FIGURAS: Figura 1). Se puede observar que las células HCT-116 provenientes de un carcinoma de colon expresan DR4 y DR5 siendo la expresión de este último superior. Las células HCT-116 no expresaron ninguno de los dos receptores señuelo, DcR1 y DcR2.

Citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL en células HCT-116

Tras determinar la expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL se llevaron a cabo el estudio de citotoxicidad sobre las células HCT-116 realizando ensayos dosis-respuesta en paralelo con TRAIL soluble y LUV-TRAIL (ANEXO FIGURAS: Figura 2). En el análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT (Figura 2A), se observó que ya desde la dosis más baja se produce un descenso mayor de la misma cuando las células fueron tratadas con los LUV-TRAIL siendo estadísticamente significativa a las dosis de 37,04 a 1000 ng/ml cuando se compara con el descenso de la viabilidad inducido por TRAIL soluble. Los resultados obtenidos mediante el marcaje con yoduro de propidio (Figura 2B), indican que este mayor descenso de la viabilidad observado con el tratamiento con los LUV-TRAIL es debido a una inducción de la muerte celular siendo estadísticamente significativa a todas las dosis empleadas comparándola con la muerte celular inducida por TRAIL soluble

La IC₅₀ con los datos del marcaje con yoduro de propidio fue de 666 ng/mL para TRAIL soluble y de 8 ng/mL para LUV-TRAIL, esto es, Apo2L/TRAIL unido a nanopartículas lipídicas presenta una bioactividad 83,25 veces mayor. Es importante destacar que los LUV solos (sin Apo2L/TRAIL acoplado en su superficie) no inducen muerte celular.

Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad pre-incubando tanto TRAIL soluble como los LUV-TRAIL con el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK (ANEXO FIGURAS: Figura 3). Como se puede observar la muerte celular tras el tratamiento con 500 ng/ml tanto de TRAIL soluble como de los LUV-TRAIL cuando se ha pre-incubado con RIK disminuyen hasta los niveles basales.

Análisis de la morfología nuclear tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116

Para analizar la morfología nuclear tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en las células HCT-116 se realizó la tinción con Hoechst 33342 y su análisis mediante microscopía de fluorescencia (ANEXO FIGURAS: Figura 4). Se puede observar que las células vivas presentes en el control mantienen la forma redondeada del núcleo, en cambio a medida que se aumenta la concentración de la Apo2L/TRAIL (tanto soluble como asociado a liposomas), aumenta el porcentaje de células con las características típicas de un muerte por apoptosis como la formación de *blebs*, condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo. Los porcentajes de muerte analizados mediante marcaje con yoduro de propidio mostraron unos niveles superiores tanto a 100 ng/ml como a 1000 ng/ml con LUV-TRAIL siendo del 41 % y 84,3 % respectivamente frente a TRAIL soluble en donde el porcentaje de muerte alcanzó un 14,2 % y 41,3% respectivamente.

Cuando se realiza la pre-incubación con RIK tanto los cambios morfológicos como la muerte celular disminuyó a niveles basales.

Activación de las caspasas tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células HCT-116

Tras comprobar la mayor capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL en las células HCT-116, se analizó el mecanismo de acción de los mismos. Para ello se analizó en primer lugar la activación de las principales caspasas implicadas en la muerte celular inducida por Apo2L/TRAIL, la caspasa iniciadora 8 y la caspasa ejecutora 3 tras el tratamiento con los LUV-TRAIL (ANEXO FIGURAS: Figura 5A). Se puede observar que en ninguno de los dos controles se produce activación de la caspasa 8 aunque sí que aparece una cierta activación de la caspasa 3 posiblemente debida a la muerte basal del cultivo celular. Cuando las células fueron tratadas con Apo2L/TRAIL (tanto soluble como asociado a liposomas) se observa una clara activación tanto de la caspasa 8 como de la caspasa 3 siendo claramente superior en el caso de los LUV-TRAIL. Esta mayor activación de las caspasas por parte de los LUV-TRAIL se correlaciona con el mayor porcentaje de células positivas para el marcaje de yoduro de propidio (Figura 5B).

Para corroborar que la muerte celular observada tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en las células HCT-116 era debida a la activación de las caspasas, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la citotoxicidad pre-incubando las células con los inhibidores IETD (inhibidor específico de la caspas 8) y ZVAD (inhibidor general de caspasas) (ANEXO FIGURAS: Figura 6). Se puede observar que el pre-tratamiento con ambos inhibidores de caspasas revierte la muerte celular inducida por ambas formas de Apo2L/TRAIL (soluble y asociado a liposomas).

Estudio de citotoxicidad de TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las células Caki-

1

Expresión de receptores de Apo2L/TRAIL en células Caki-1

De igual manera, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de los receptores pro-apoptóticos DR4, DR5 así como los receptores señuelo DcR1 y DcR2 en la línea celular Caki-1 proveniente de un carcinoma de riñón (ANEXO FIGURAS: Figura 7). Como se puede observar, las células Caki-1 expresan bajos niveles de DR4 y altos niveles de DR5 y no expresaron ninguno de los dos receptores señuelo, DcR1 y DcR2 indicando que esta línea celular también puede ser sensible a la acción de Apo2L/TRAIL.

Citotoxicidad inducida por los LUV-TRAIL en células Caki-1

Una vez analizada la expresión de los receptores de Apo2L/TRAIL se llevaron a cabo el estudio de citotoxicidad sobre las células Caki-1 llevando a cabo ensayos dosis-respuesta en paralelo con TRAIL soluble y LUV-TRAIL (ANEXO FIGURAS: Figura 8). Cuando se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT (Figura 8A), se observó que ambas formas de Apo2L/TRAIL producen un descenso similar de la misma alcanzando unos valores de disminución de la viabilidad celular del 71% con TRAIL soluble y del 78% con los LUV-TRAIL con la dosis de 1000 ng/ml. Cuando se analiza la muerte celular mediante el marcaje con yoduro de propidio (Figura 8B), se observa que a la mayor concentración empleada (1000 ng/ml), TRAIL soluble indujo muerte en un 57% de las células mientras que al tratar las células con LUV-TRAIL la muerte aumenta a un 68%.

Cuando se calcula la IC₅₀, se observa que es de 330 ng/ml para TRAIL soluble, mientras que se reduce hasta 220 ng/mL en el caso LUV-TRAIL siendo la bioactividad de éstos 1,5 veces mayor. De nuevo los LUV solos no indujeron muerte celular.

Nuevamente se realizaron ensayos de citotoxicidad inhibiendo la acción de Apo2L/TRAIL pre-incubando con el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK (ANEXO FIGURAS: Figura 9). De nuevo en las células Caki-1 se observa que la muerte celular tras el tratamiento con 500 ng/ml de Apo2L/TRAIL (soluble o asociado a liposomas) disminuye hasta niveles basales.

Análisis de la morfología nuclear tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1

También se analizó los cambios de la morfología nuclear tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en las células Caki-1 (ANEXO FIGURAS: Figura 10), observando de nuevo que a mayor concentración de Apo2L/TRAIL (tanto soluble como asociado a liposomas), aumenta el porcentaje de células con las características típicas de un

muerte por apoptosis (formación de *blebs*, condensación cromatínica y fragmentación nuclear). Los porcentajes de muerte analizados mediante marcaje con yoduro de propidio mostraron unos niveles similares para ambas formas de Apo2L/TRAIL tanto a 100 ng/ml como a 1000 ng/ml: 44,4 % y 63,4 % respectivamente con TRAIL soluble y de 48,9 % y 61,7 % con los LUV-TRAIL.

De nuevo tanto los cambios morfológicos como la muerte celular disminuyó a niveles basales cuando se realiza la pre-incubación con RIK.

Activación de las caspasas tras el tratamiento con LUV-TRAIL en células Caki-1

También se analizó la activación de las principales caspasas implicadas en la muerte celular inducida por Apo2L/TRAIL (caspasa 8 y caspasa 3) tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en las células Caki-1 (ANEXO FIGURAS: Figura 11A). Nuevamente no se observó activación de la caspasa 8 en ambos controles y una cierta activación de la caspasa 3 debida probablemente a la muerte basal del cultivo celular. En el caso de las células Caki-1 cuando fueron tratadas tanto con TRAIL soluble como con los LUV-TRAIL se observa una clara activación de la caspasa 8 siendo ligeramente superior en el caso de los LUV-TRAIL y una activación similar de la caspasa 3 tras el tratamiento con ambos. Esta activación similar de las caspasas con ambas formas de Apo2L/TRAIL se correlaciona con el porcentaje similar de células positivas para el marcaje de yoduro de propidio (Figura 11B).

Finalmente, también se realizaron ensayos de inhibición de la citotoxicidad pre-incubando las células con los inhibidores de caspasas IETD y ZVAD en las células Caki-1 (ANEXO FIGURAS: Figura 12) observándose de nuevo que el pre-tratamiento con ambos inhibidores de caspasas revierte la muerte celular inducida por ambas formas de Apo2L/TRAIL (soluble y asociado a liposomas) en esta línea celular.

DISCUSIÓN:

En el presente trabajo se ha analizado la capacidad citotóxica de una nueva formulación de Apo2L/TRAIL basada en su anclaje a la superficie de nanopartículas lipídicas de tipo LUV sobre líneas celulares tumorales humanas provenientes de tumores sólidos (carcinoma de colon y carcinoma de riñón).

Ambas líneas celulares expresaron los receptores pro-apoptóticos de Apo2L/TRAIL, DR4 y sobre todo DR5 por lo que fueron susceptibles de ser sensibles a la acción citotóxica de Apo2L/TRAIL. Efectivamente tanto la línea celular HCT-116 como la línea celular Caki-1 fueron sensibles tanto a la forma soluble de Apo2L/TRAIL como la asociada a liposomas observándose una mayor sensibilidad en el caso de las células HCT-116. Cuando se compara la capacidad citotóxica de TRAIL soluble y los LUV-TRAIL, se observa que mientras que las células HCT-116 los LUV-TRAIL fueron claramente más eficaces a la hora de inducir la muerte celular reduciendo la IC_{50} en unas 83 veces, en las células Caki-1 este aumento de bioactividad de los LUV-TRAIL fue menor reduciendo la IC_{50} sólo en 1,5 veces. La menor sensibilidad de las células Caki-1 tanto a TRAIL soluble como a los LUV-TRAIL a pesar de expresar ambos receptores pro-apoptóticos de Apo2L/TRAIL hace pensar que mecanismos moleculares intracelulares propios de esta línea celular les confieren cierta resistencia a Apo2L/TRAIL comparado con la línea celular HCT-116.

En ambas líneas celulares la muerte celular observada tras el tratamiento con los LUV-TRAIL fue debida específicamente a la presencia de Apo2L/TRAIL ya que cuando los experimentos de citotoxicidad fueron realizados en presencia del anticuerpo bloqueante de Apo2L/TRAIL RIK la capacidad citotóxica de los LUV-TRAIL fue completamente inhibida en ambas líneas celulares. En este sentido, los LUV solos (sin Apo2L/TRAIL acoplado a su superficie), no fueron capaces de inducir la muerte celular.

Para estudiar el mecanismo por el que los LUV-TRAIL inducen la muerte celular, se analizó en primer lugar las características morfológicas de núcleo tras el tratamiento con los liposomas con Apo2L/TRAIL anclado a su superficie. Tanto en las células HCT-116 como en las células Caki-1 se observó que tras el tratamiento con los LUV-TRAIL aparecían las características típicas de una muerte por apoptosis como son la formación de *blebs*, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. Además, los cambios morfológicos observados tras el tratamiento con los LUV-TRAIL fueron específicamente debidos a la presencia de Apo2L/TRAIL ya que los liposomas solos no produjeron ningún de ellos y de nuevo la pre-incubación con RIK inhibió la presencia de dichos cambios.

Los datos obtenidos en el estudio de la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia claramente sugerían que los LUV-TRAIL inducen la muerte celular por apoptosis en ambas líneas celulares. Para comprobar que la muerte

celular observada tras el tratamiento con los LUV-TRAIL era un proceso apoptótico, seguidamente se analizó la activación de las principales caspasas implicadas en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL, la caspasa iniciadora 8 y la caspasa ejecutora 3. Efectivamente en ambas líneas celulares se observó mediante *Western blot* que al igual que lo descrito para TRAIL soluble, los LUV-TRAIL son capaces de inducir el procesamiento y la consiguiente activación tanto de la caspasa 8 como de la caspasa 3 en ambas líneas celulares siendo esta activación mucho mayor en las células HCT-116 cuando se compara con la activación inducida por TRAIL soluble, lo que se correlaciona con el mayor efecto citotóxico observado en los ensayos dosis-respuesta realizados en esta línea celular.

Finalmente, para corroborar que la muerte celular observada tras el tratamiento con los LUV-TRAIL en ambas líneas celulares se debe efectivamente a la activación de las caspasas, en algunos de los experimentos de citotoxicidad realizados se emplearon los inhibidores de caspasas IETD, un inhibidor específico de caspasa 8, y ZVAD, inhibidor general de caspasas. Tanto en las células HCT-116 como en las células Caki-1 la pre-incubación de las células con estos inhibidores redujo los niveles de muerte celular a valores basales. Estos datos indican que la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL en las líneas celulares HCT-116 y Caki-1 al igual que la inducida por TRAIL soluble, es una muerte celular por apoptosis dependiente de la activación de caspasas a través de la vía extrínseca de la apoptosis.

En trabajos anteriores del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, se había demostrado la mayor capacidad citotóxica de esta nueva formulación de Apo2L/TRAIL basada en el anclaje de este ligando mortal a la superficie de nanopartículas lipídicas en líneas celulares tumorales humanas de estirpe hematológica (De Miguel, *et al* 2013). En el presente trabajo de grado se ha observado que los LUV-TRAIL también presentan una mayor bioactividad que la forma soluble de la proteína en líneas celulares tumorales humanas provenientes de tumores sólidos como el carcinoma de colon y el carcinoma de riñón.

CONCLUSIONES:

Las conclusiones obtenidas el presente trabajo fin de grado son las siguientes:

1. Se han generado liposomas tipo LUV con el ligando mortal Apo2L/TRAIL anclado a su superficie (LUV-TRAIL) manteniendo su bioactividad.
2. Los LUV-TRAIL generados presentan una mayor capacidad citotóxica en las dos líneas celulares tumorales humanas empleadas, HCT-116 (proveniente de carcinoma de colon) y Caki-1 (proveniente de un carcinoma de riñón).
3. La línea celular HCT-116 es más sensible tanto a TRAIL soluble como a los LUV-TRAIL que la línea celular Caki-1.
4. La muerte celular inducida por los LUV-TRAIL en ambas líneas celulares se debe específicamente a la presencia de Apo2L/TRAIL.
5. La muerte celular inducida por los LUV-TRAIL en ambas líneas celulares es una muerte por apoptosis dependiente de la activación de caspasas a través de la vía extrínseca.

CONCLUSIONS:

The conclusions obtained in the present Final Project work were:

1. It has been generated LUV liposomes with the mortal ligand Apol2L/TRAIL anchored to it surface (LUV-TRAIL), keeping its bioactivity.
2. The LUV-TRAIL generated, presents a higher citotoxicity capacity in both human tumor cells lines used, HCT-116 (from colon carcinoma) and Caki-1 (from a kidney carcinoma).
3. The cell line HCT-116 is more sensitive to both soluble TRAIL as the LUV-TRAIL the Caki-1 cell line.
4. The induced cell death by the LUV-TRAIL in both cells lines it's due to the specifically to the presence of Apol2L/TRAIL
5. The cell death induced by the LUV-TRAIL in both cell lines is an apoptotic death dependent of caspase activation by extrinsic way.

BIBLIOGRAFÍA:

- Almasan, A. & Ashkenazi, A. (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 337-348.
- Ashkenazi, A. (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19, 325-331.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J. & Smyth, M.J. (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol*, 168, 1356-1361.
- De Miguel, D., Basanez, G., Sanchez, D., Malo, P.G., Marzo, I., Larrad, L., Naval, J., Pardo, J., Anel, A. & Martinez-Lostao, L. (2013) Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells. *Mol Pharm*, 10, 893-904.
- Martinez-Lostao, L., Garcia-Alvarez, F., Basanez, G., Alegre-Aguaron, E., Desportes, P., Larrad, L., Naval, J., Jose Martinez-Lorenzo, M. & Anel, A. (2010) Liposome-bound APO2L/TRAIL is an effective treatment in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Rheum*, 62, 2272-2282.
- Martinez-Lostao, L., Marzo, I., Anel, A. & Naval, J. (2012) Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol*, 83, 1475-1483.
- Micheau, O., Shirley, S. & Dufour, F. (2013) Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol*, 169, 1723-1744.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A. & Ashkenazi, A. (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 271, 12687-12690.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. & Goodwin, R.G. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3, 673-682.