



Universidad
Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y

Biología Molecular y Celular

Trabajo de Fin de Grado

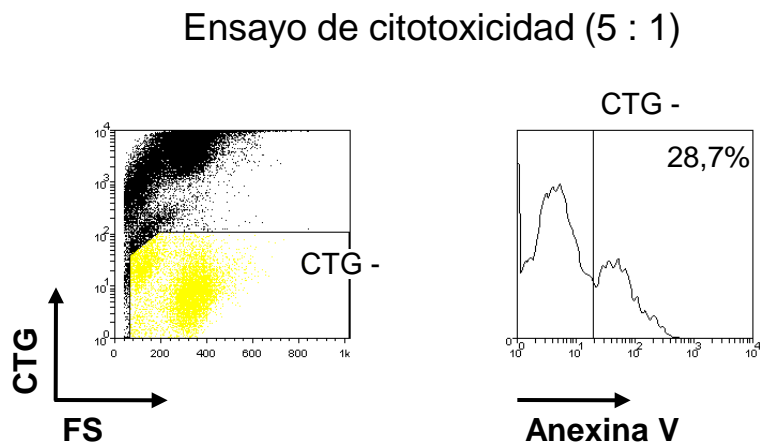
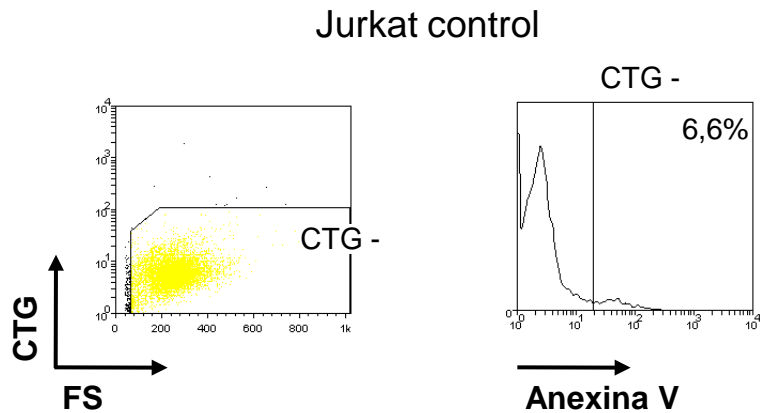
ANEXO FIGURAS

**Expresión y secreción del ligando mortal
Apo2L/TRAIL en células efectoras del sistema
inmune**

Autor: Manuel Sanclemente Cidón

Director: Luis Martínez Lostao

Figura 1.



CTG - = células *Cell Tracker Green* negativas (células diana)

5 : 1 = Razón células efectoras : células diana

Muerte específica:

Células anexina V+: $28,7 - 6,6 = 22,1\%$

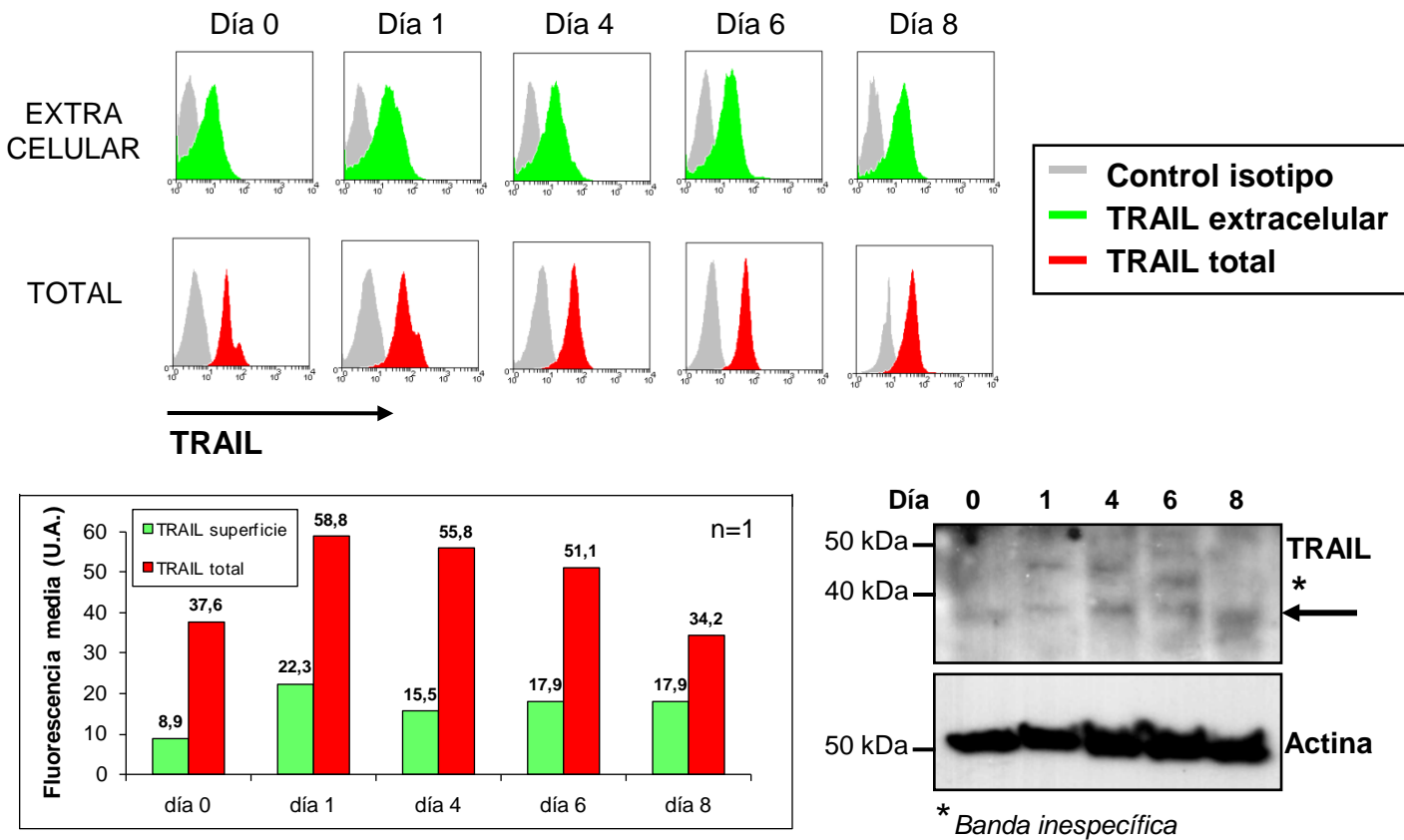
Figura 1. Ejemplo de los ensayos de citotoxicidad debida a las células efectoras (blastos T o células Jurkat reactivadas) sobre las células diana (Jurkat). En la izquierda se muestran los histogramas de puntos que representan su morfología versus marcaje con la sonda fluorescente CTG (*Cell Tracker Green*) de las células Jurkat control (células diana en ausencia de células efectoras) y las células presentes en el ensayo de citotoxicidad (células efectoras y células diana a una razón células efectoras:células diana de 5:1). En ambos histogramas se han seleccionado las células CTG negativas (células diana) y sobre éstas se ha analizado el parámetro de muerte celular anexina V (histogramas de la derecha).

Para calcular la apoptosis inducida específicamente en las células diana por las células efectoras en cada ensayo de citotoxicidad, a la muerte celular observada en la población CTG negativa del pocillo en el que se había realizado el co-cultivo, se le restó la muerte celular basal observada en el pocillo control (panel inferior).

Figura 2.

A

Expresión de TRAIL durante la activación de los PBLs



B

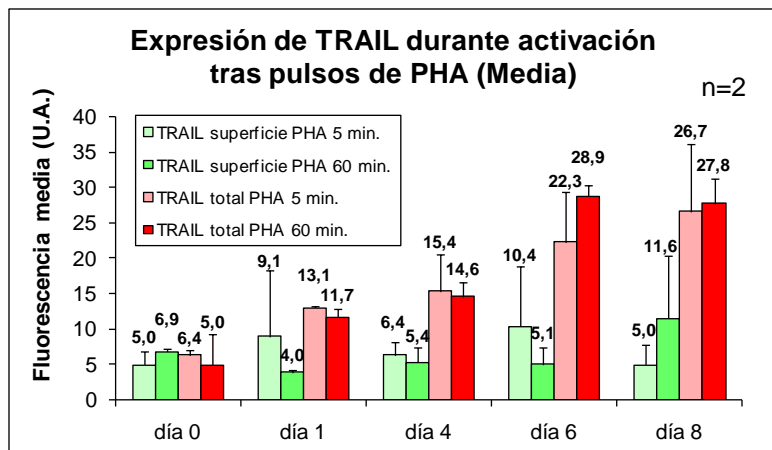
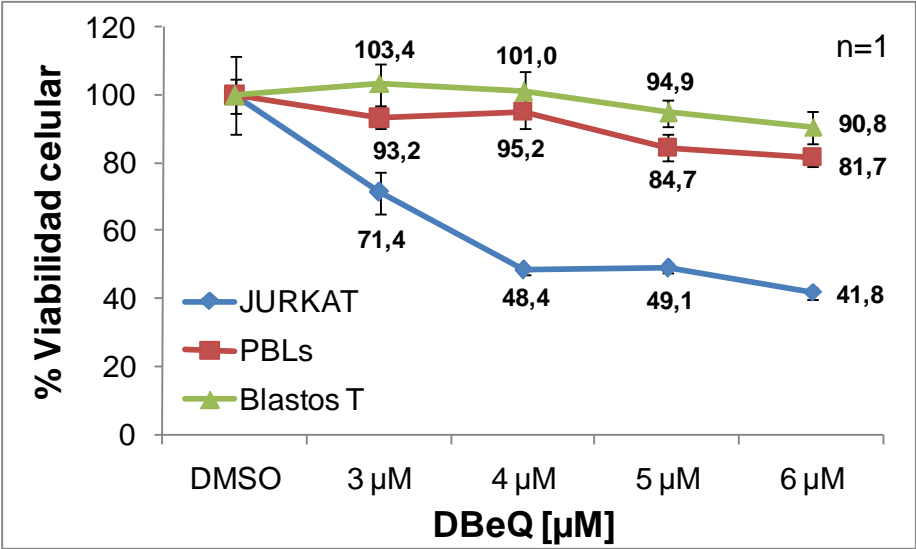


Figura 2. Expresión de TRAIL en linfocitos normales de sangre periférica (PBLs). **A)** Se ha analizado la expresión en superficie y total de TRAIL en PBLs durante su proceso de activación explicado en Materiales y Métodos a los tiempos indicados. El panel superior muestra los histogramas de citometría de flujo. En el panel inferior se muestra la gráfica con los datos de la intensidad media de fluorescencia específica y el análisis de la expresión total de TRAIL mediante *Western-blot*. **B)** Durante el proceso de activación de los PBLs a los tiempos indicados, se analizó la expresión en superficie y total de de TRAIL tras su reactivación con PHA (5 µg/mL) durante 5 minutos o durante 1 hora. La gráfica muestra la media ± error estándar típico de los experimentos realizados con los PBLs de 2 donantes distintos.

Figura 3.

A



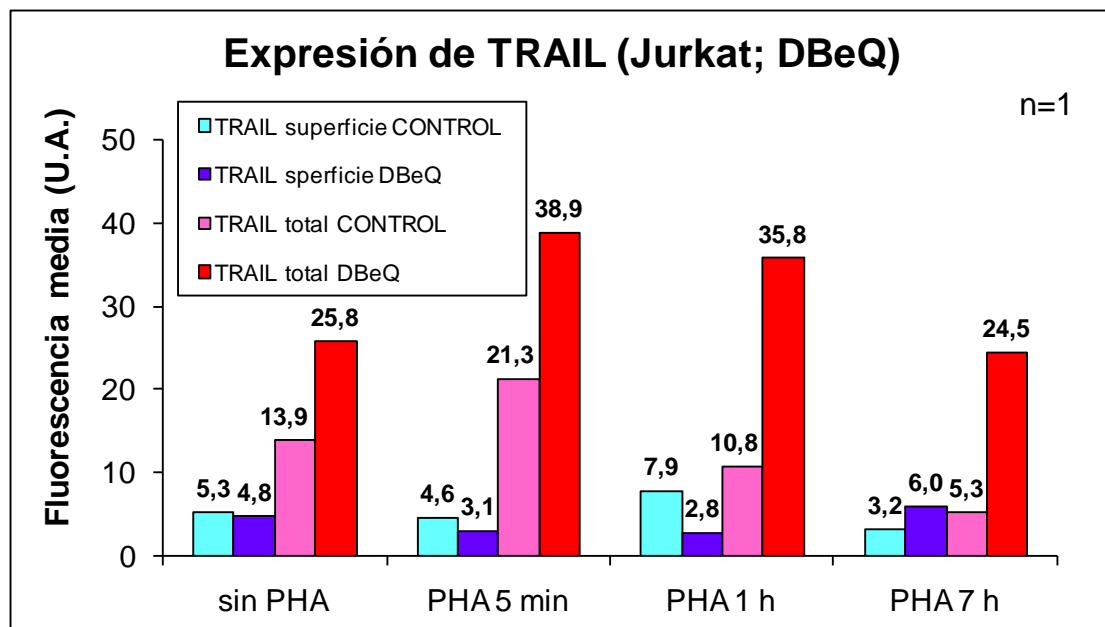
B

PBLs		Blastos T		JURKAT	
% muerte celular (trypan)		% muerte celular (trypan)		% muerte celular (trypan)	
Control	0,7	Control	1,4	Control	7,0
Control DMSO	2,6	Control DMSO	4,8	Control DMSO	9,6
3 μM	3,1	3 μM	3,7	3 μM	23,7
4 μM	2,5	4 μM	6,8	4 μM	44,5
5 μM	8,0	5 μM	11,5	5 μM	50,0
6 μM	13,0	6 μM	16,7	6 μM	66,7

Figura 3. Efecto citotóxico del DBeQ sobre células PBLs , blastos T y células Jurkat. A) Se ha realizado un ensayo dosis respuesta empleando las concentraciones indicadas para analizar la capacidad citotóxica del inhibidor de la proteína VCP/p97 (DBeQ) en PBLs, en blastos T obtenidos a partir de éstos y en células Jurkat medido mediante MTT (método de Mossman). Los resultados que se muestran son la media ± desviación estándar del triplicado de cada punto experimental. B) Análisis de la capacidad citotóxica del inhibidor de la proteína VCP/p97, DBeQ en PBLs, en blastos T mediante tinción con azul Trypan.

Figura 4.

A



B

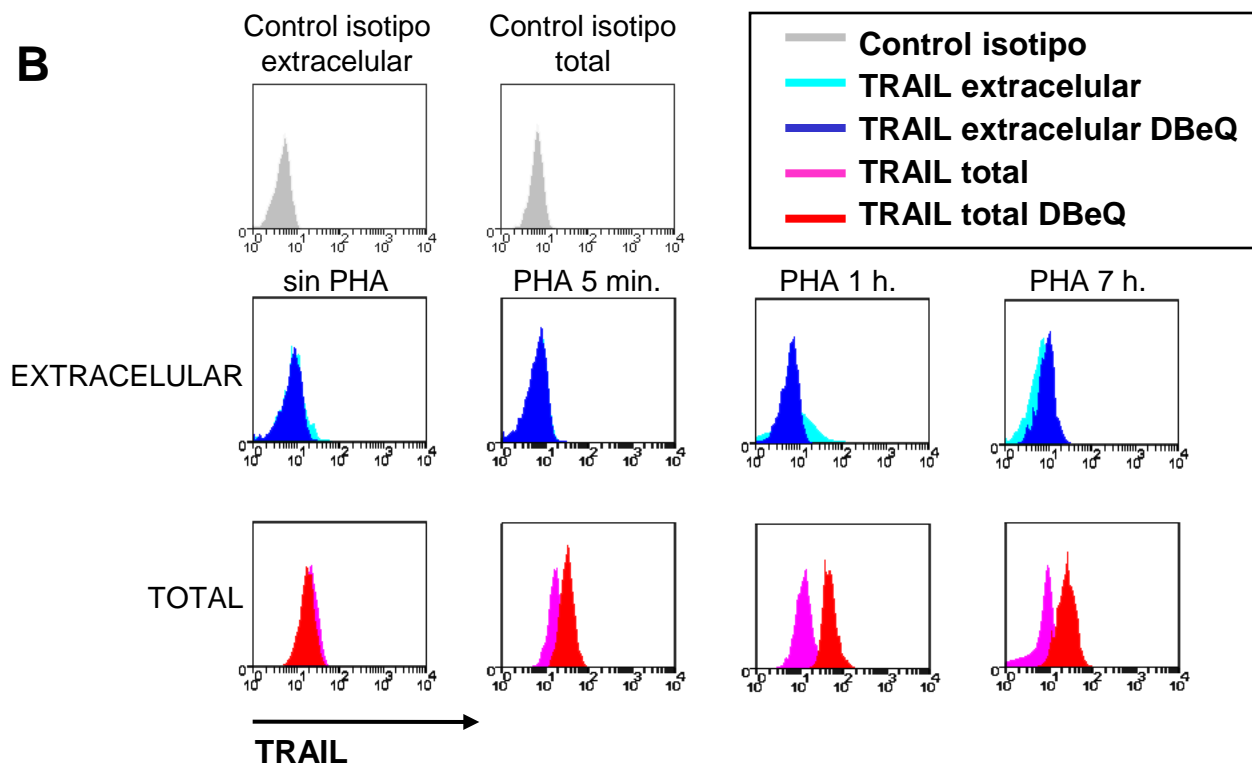
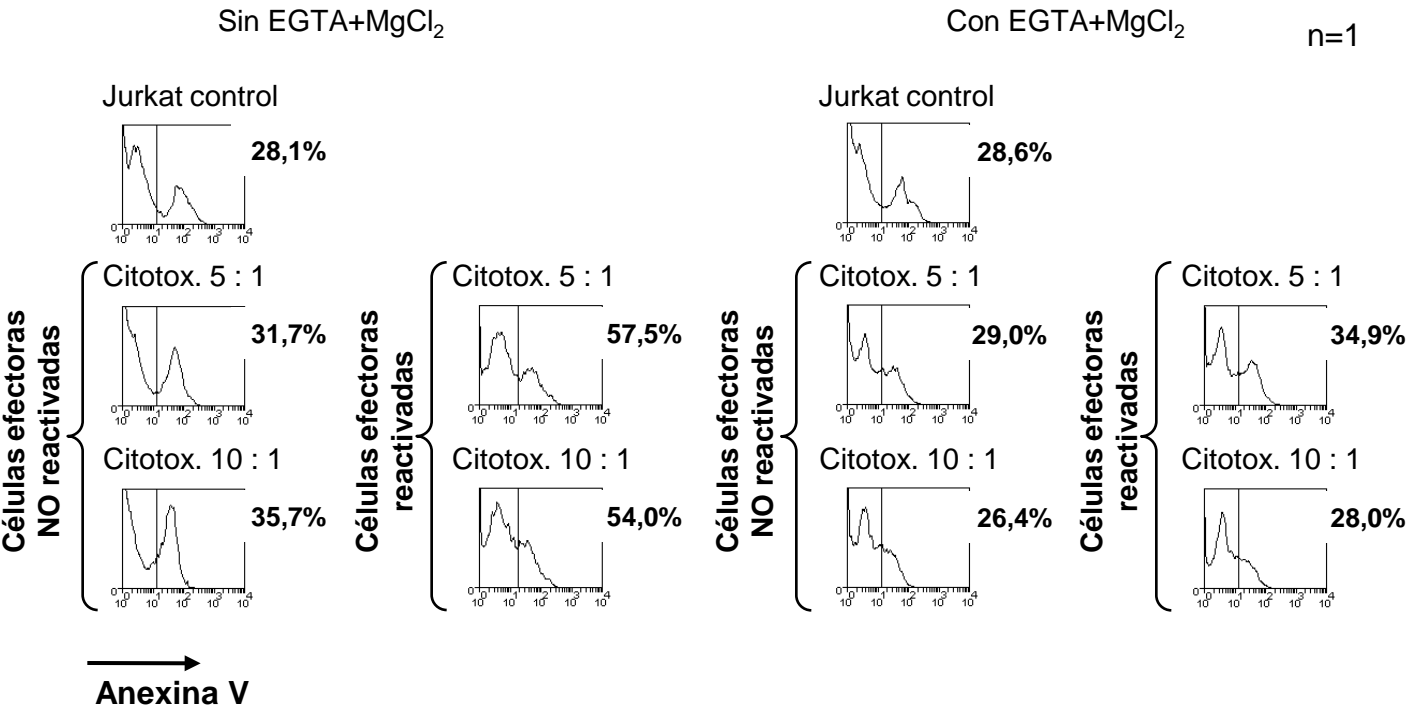


Figura 4. Efecto del DBeQ sobre la expresión de TRAIL en células Jurkat. A) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia específica de la expresión de TRAIL en superficie y la expresión de TRAIL total en células Jurkat sin pretratar con DBeQ y pretratadas con DBeQ a una dosis de 3 μ M durante 14 horas y estimuladas a distintos tiempos con PHA (sin estimular, estimulación de 5 minutos, de 1 hora y de 7 horas). B) Histogramas de citometría de flujo la expresión de TRAIL en superficie y la expresión de TRAIL total en células Jurkat sin pretratar con DBeQ y pretratadas con DBeQ.

Figura 5.

BLASTOS TSIN PRETRATAMIENTO CON DBeQ

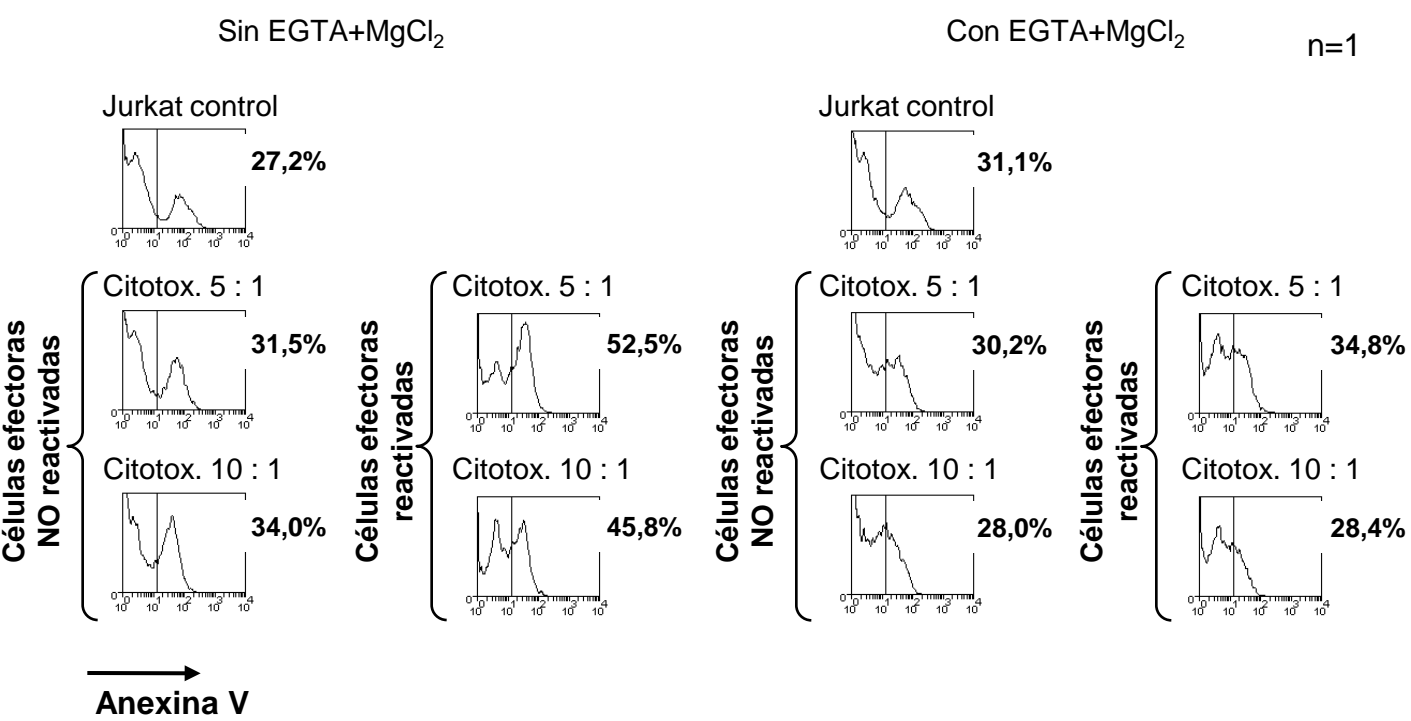


<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>
<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>
AnnV+: 3,6%	AnnV+: 29,4%	AnnV+: 0,4%	AnnV+: 6,3%
<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>
AnnV+: 7,6%	AnnV+: 25,9%	AnnV+: 0%	AnnV+: 0%

Figura 5. Efecto citotóxico de los blastos T no pretratados con DBeQ frente a la línea celular Jurkat. Se ha analizado mediante citometría de flujo la capacidad citotóxica de los blastos T (una vez han sido secretados los ligandos mortales asociados a exosomas) frente a las células diana (Jurkat) en distintas condiciones: sin reactivar o reactivados durante 2 horas con PMA e ionomicina y sin inhibir o inhibiendo, posteriormente a la reestimulación, la exocitosis granular (perforina y granzimas) mediante el tratamiento con EGTA y MgCl₂. En los paneles inferiores se muestran los datos de la muerte específica de las células diana según lo indicado en la Figura 1.

Figura 6.

BLASTOS T CON PRETRATAMIENTO CON DBEQ

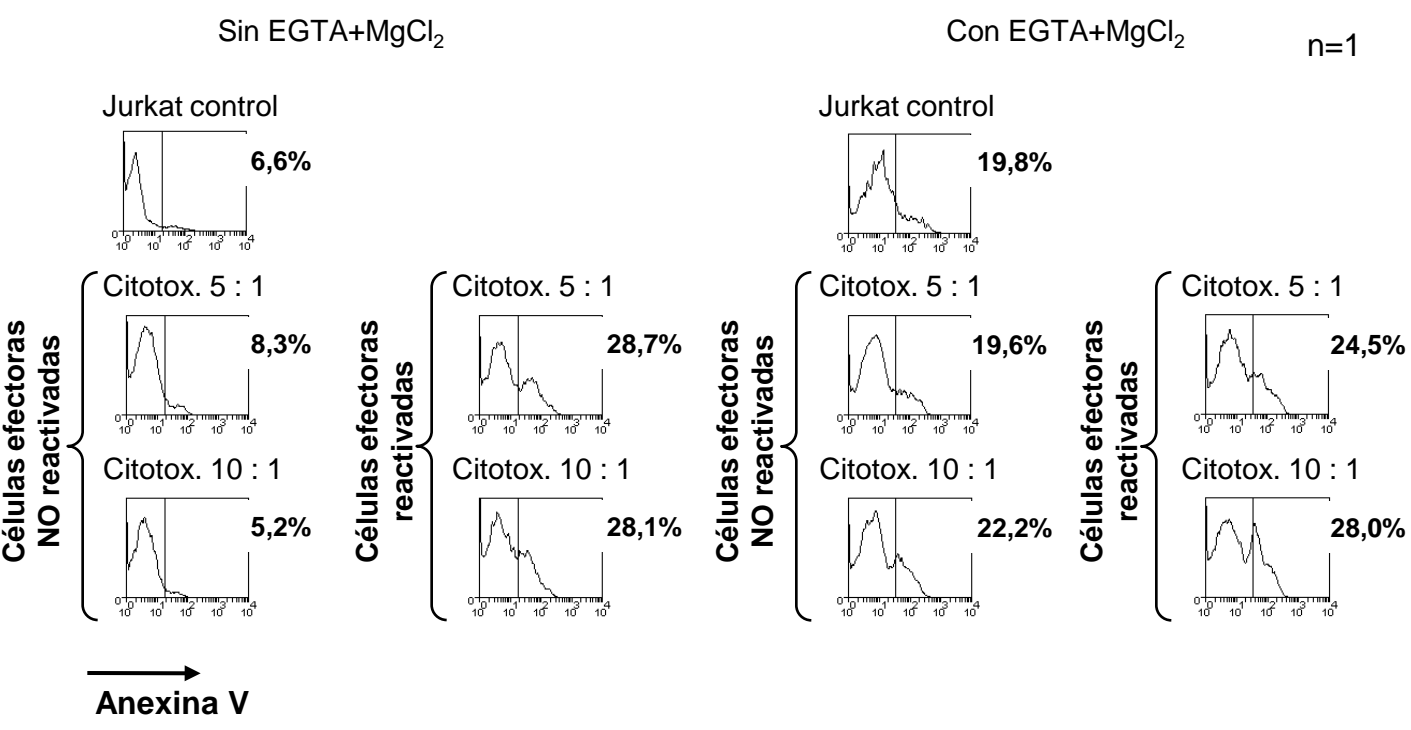


<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>
<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>
AnnV+: 4,3%	AnnV+: 25,3%	AnnV+: 0%	AnnV+: 3,7%
<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>
AnnV+: 6,8%	AnnV+: 18,6%	AnnV+: 0%	AnnV+: 0%

Figura 6. Efecto citotóxico de los blastos T pretratados con DBEQ frente a la línea celular Jurkat. Se ha analizado mediante citometría de flujo la capacidad citotóxica de los blastos T (una vez han sido secretados los ligandos mortales asociados a exosomas) frente a las células diana (Jurkat) en distintas condiciones: sin reactivar o reactivados durante 2 horas con PMA e ionomicina y sin inhibir o inhibiendo, posteriormente a la reestimulación, la exocitosis granular (perforina y granzimas) mediante el tratamiento con EGTA y MgCl₂. En los paneles inferiores se muestran los datos de la muerte específica de las células diana según lo indicado en la Figura 1.

Figura 7.

JURKAT SIN PRETRATAMIENTO CON DBEQ

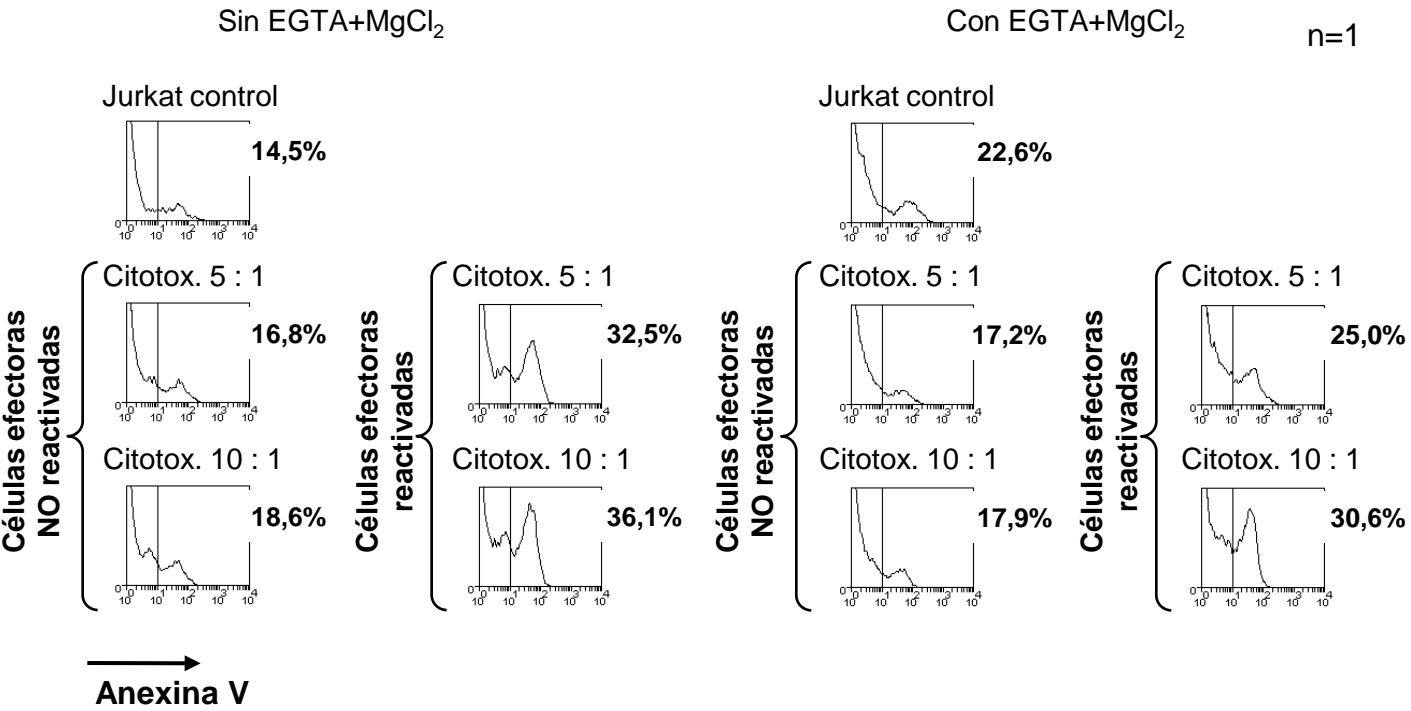


<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>	<u>Muerte específica:</u>
<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>	<u>Razón 5 : 1</u>
AnnV+: 1,7%	AnnV+: 22,1%	AnnV+: 0%	AnnV+: 4,7%
<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>	<u>Razón 10 : 1</u>
AnnV+: 0%	AnnV+: 21,5%	AnnV+: 2,4%	AnnV+: 8,2%

Figura 7. Efecto citotóxico de las células Jurkat no pretratadas con DBEQ frente a la línea celular Jurkat. Se ha analizado mediante citometría de flujo la capacidad citotóxica de las células Jurkat (una vez han sido secretados los ligandos mortales asociados a exosomas) frente a las células diana (Jurkat) en distintas condiciones: sin reactivar o reactivadas durante 2 horas con PMA e ionomicina y sin inhibir o inhibiendo, posteriormente a la reestimulación, la exocitosis granular (perforina y granzimas) mediante el tratamiento con EGTA y MgCl₂. En los paneles inferiores se muestran los datos de la muerte específica de las células diana según lo indicado en la Figura 1.

Figura 8.

JURKAT CON PRETRATAMIENTO CON DBEQ



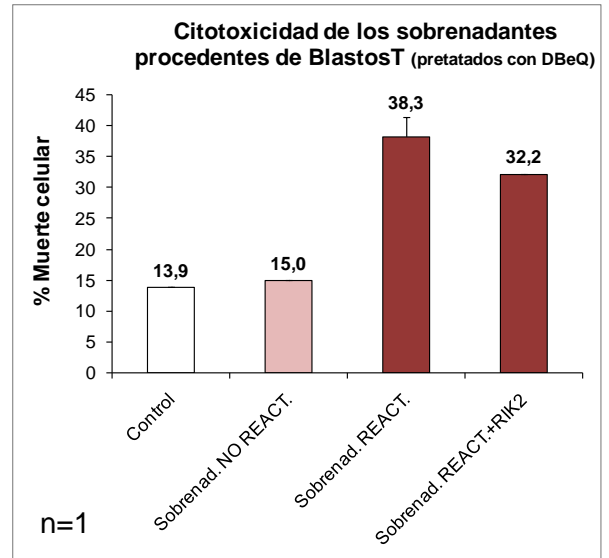
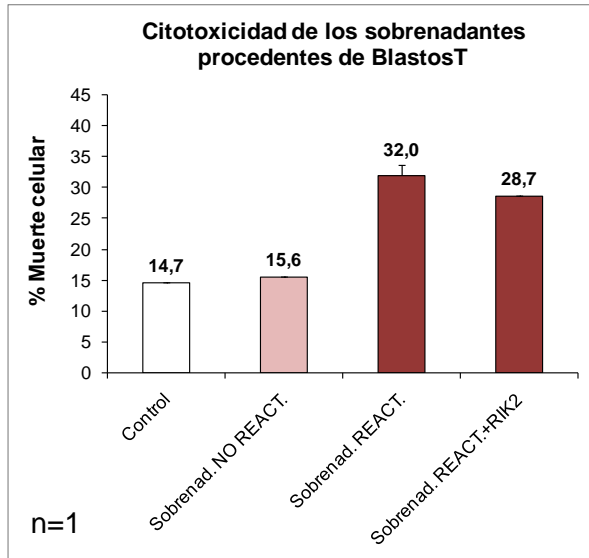
Sin EGTA+MgCl ₂		Con EGTA+MgCl ₂	
Muerte específica:		Muerte específica:	
<u>Razón 5 : 1</u>		<u>Razón 5 : 1</u>	
AnnV+:	2,3%	AnnV+:	18,0%
<u>Razón 10 : 1</u>		<u>Razón 10 : 1</u>	
AnnV+:	2,1%	AnnV+:	21,6%

Sin EGTA+MgCl ₂		Con EGTA+MgCl ₂	
Muerte específica:		Muerte específica:	
<u>Razón 5 : 1</u>		<u>Razón 5 : 1</u>	
AnnV+:	0%	AnnV+:	2,4%
<u>Razón 10 : 1</u>		<u>Razón 10 : 1</u>	
AnnV+:	0%	AnnV+:	8,0%

Figura 8. Efecto citotóxico de las células Jurkat pretratadas con DBEQ frente a la línea celular Jurkat. Se ha analizado mediante citometría de flujo la capacidad citotóxica de las células Jurkat (una vez han sido secretados los ligandos mortales asociados a exosomas) frente a las células diana (Jurkat) en distintas condiciones: sin reactivar o reactivadas durante 2 horas con PMA e ionomicina y sin inhibir o inhibiendo, posteriormente a la reestimulación, la exocitosis granular (perforina y granzimas) mediante el tratamiento con EGTA y MgCl₂. En los paneles inferiores se muestran los datos de la muerte específica de las células diana según lo indicado en la Figura 1.

Figura 9.

A Sobrenadantes provenientes de Blastos T



B Sobrenadantes provenientes de Jurkat

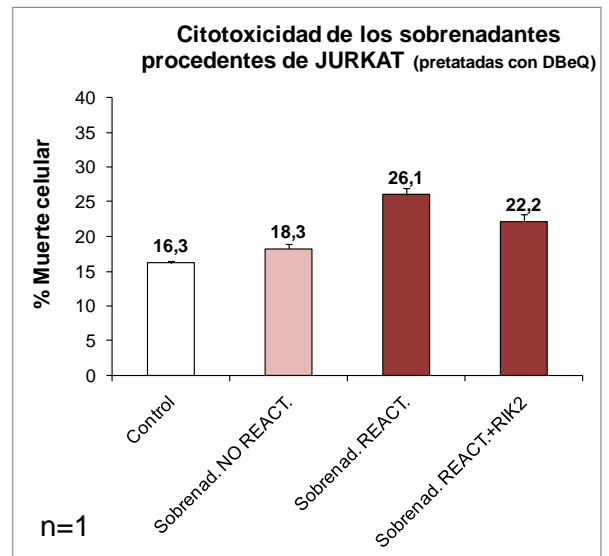
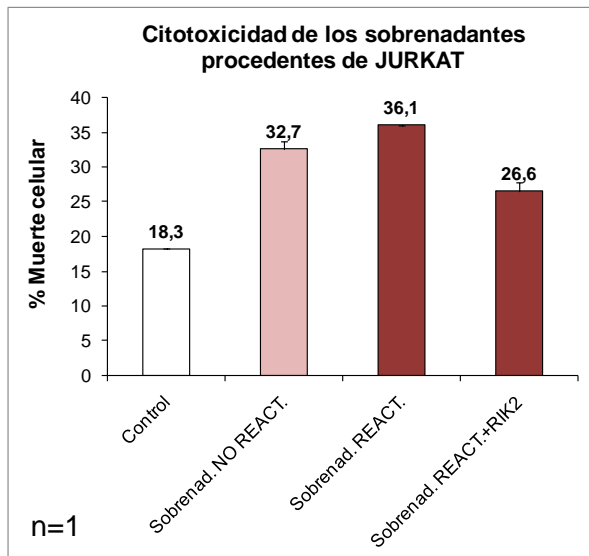


Figura 9. Efecto citotóxico de los sobrenadantes frente a la línea celular Jurkat. Se ha analizado mediante citometría de flujo analizado el porcentaje de células 7-AAD positivas en células diana (Jurkat) para estudiar la capacidad citotóxica de los sobrenadantes (en los que se encuentran secretados los exosomas con los ligandos mortales asociados) obtenidos de las células efectoras de los ensayos de citotoxicidad sin reactivar o reactivadas durante 2 horas con PMA e ionomicina. Los sobrenadantes se incubaron durante 14 horas con las células diana.

A) Sobrenadantes obtenidos de los blastos T sin pretratar o pretratados con DBeq. **B)** Sobrenadantes obtenidos de las células Jurkat sin pretratar o pretratadas con DBeq.

Figura 10.

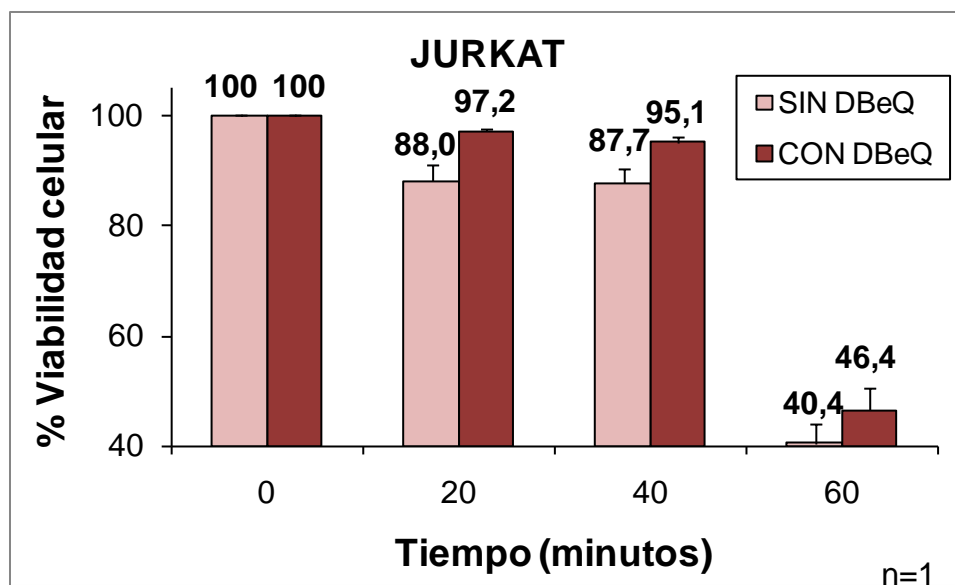


Figura 10. Efecto citotóxico a lo largo del tiempo de los sobrenadantes obtenidos de las células Jurkat. Se ha analizado sobre células diana (Jurkat) la capacidad citotóxica de los sobrenadantes (en los que se encuentran secretados los exosomas con los ligandos mortales asociados) obtenidos de las células Jurkat tras una estimulación de 5 minutos con PHA (50 $\mu\text{g/mL}$). Tras el estímulo, los sobrenadantes fueron recolectados a los tiempos indicados y se incubaron durante 14 horas con las células diana. El análisis de la viabilidad celular en células diana (Jurkat) se ha realizado mediante MTT (método de Mossman). La gráfica representa la media \pm desviación estándar del triplicado por cada punto experimental.