

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular

**Proyecto Máster:**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN, SECRECIÓN Y MECANISMOS  
INDUCTORES DE APOPTOSIS DE LOS LIGANDOS MORTALES  
EN CELULAS HEMATOLÓGICAS**

Presentado por:

**Vanessa Villalba Mouco**

Directores:

**Dr. Luis Martinez Lostao**

**Dr. Alberto Anel Bernal**





**Universidad  
Zaragoza**

## **UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular**

---

D. Luis Martínez Lostao, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. Alberto Anel Bernal, Doctor en Ciencias Químicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster **“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN, SECRECIÓN Y MECANISMOS INDUCTORES DE APOPTOSIS DE LOS LIGANDOS MORTALES EN CELULAS HEMATOLÓGICAS”**, ha sido realizado por la Graduada en Biología *Vanessa Villalba Mouco* en el 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, Junio de 2013

Fdo: D. Luis Martínez Lostao

Fdo: D. Alberto Anel Bernal



# ÍNDICE

<b>1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
2.1 APOPTOSIS.....	3
2.1.1 Vía intrínseca de la apoptosis.....	4
2.1.2 Vía extrínseca de la apoptosis.....	4
2.2 TRAIL (Apo2L).....	5
2.2.1 TRAIL y sus receptores.....	6
2.2.2 Vía de señalización de TRAIL.....	6
2.2.3 Funciones biológicas de TRAIL.....	9
2.2.3.1 TRAIL y regulación inmune.....	9
2.2.3.2 TRAIL y enfermedades autoinmunes.....	10
2.2.3.3 TRAIL e inmunovigilancia tumoral.....	11
2.3 MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LIGANDOS MORTALES.....	11
2.4 EXOSOMAS Y VCP.....	13
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 CULTIVOS CELULARES.....	16
3.1.1 Líneas celulares.....	16
3.1.1.1 Congelación y descongelación de células.....	16
3.1.1.2 Determinación de la viabilidad celular.....	17
3.1.2. Generación de líneas resistentes a TRAIL.....	17
3.1.3 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBLs) y generación de blastos T....	18
3.1.3.1 <i>Ficoll</i> .....	18
3.1.3.2 Generación de blastos T.....	18

3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL EN SUPERFICIE Y TOTAL.....	19
3.2.1 Expresión de TRAIL en superficie mediante citometría de flujo.....	19
3.2.2 Expresión de TRAIL intracelular mediante citometría de flujo.....	20
3.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	20
3.3.1 Citotoxicidad de blastos T sobre células diana.....	20
3.3.2 Citotoxicidad de los sobrenadantes de blastos T.....	22
3.3.3 Análisis de la muerte celular. Citometría de flujo.....	23
3.4 ESTUDIO DE LA ACCIÓN DEL DeBQ SOBRE JURKAT, PBLs y BLASTOS T.....	24
3.4.1 Determinación de la proliferación celular.....	24
3.4.2 Análisis de la expresión de TRAIL en la línea celular Jurkat y en blastos T pretratados con DeBQ.....	25
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 EXPRESIÓN DE TRAIL EN LA LÍNEA CELULAR JURKAT.....	27
4.2 EXPRESIÓN DE TRAIL EN PBLs.....	28
4.3 EXPRESIÓN DE TRAIL EN LAS SUBPOBLACIONES DE BLASTOS T CD4 Y BLASTOS T CD8. .....	29
4.4 CITOTOXICIDAD DE LOS BLASTOS T Y DE SUS SOBRENADANTES.....	31
4.4.1 Citotoxicidad de los blastos T sin inhibir la exocitosis granular y la secreción de ligandos mortales (FasL y TRAIL) asociados a exosomas.....	32
4.4.1.1 Citotoxicidad de los blastos T.....	32
4.4.1.2 Citotoxicidad del sobrenadante de los blastos T.....	33
4.4.2 Citotoxicidad de los blastos T inhibiendo la exocitosis granular y la secreción de ligandos mortales (FasL y TRAIL) asociados a exosomas.....	33
4.4.2.1 Citotoxicidad de los blastos T.....	33
4.4.2.2 Citotoxicidad del sobrenadante de los blastos T.....	34

4.5 ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DEL DeBQ EN JURKAT, PBLs Y BLASTOS T.....	35
4.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL EN CÉLULAS JURKAT Y EN BLASTOS T PRETRATADOS A UNA DOSIS SUBTÓXICA DE DeBQ.....	38
4.7 GENERACIÓN DE SUBLÍNEAS RESISTENTES A TRAIL.....	39
4.7.1 Sublínea celular H929 resistente a TRAIL.....	39
4.7.1 Sublínea celular MM1S resistente a TRAIL.....	41
<b>5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>7 REFERENCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los ligandos mortales están implicados en la regulación del sistema inmune. La principal contribución en estos procesos se debe al ligando mortal FasL/CD95L mientras que el papel de TRAIL no está completamente clarificado.

En nuestro grupo se demostró que FasL (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1996) y TRAIL (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998) se encuentran preformados intracelularmente en la línea celular Jurkat y en los linfocitos T normales activados, y que son secretados al exterior tras la reactivación de estas células a través de su TCR. Estos ligandos mortales se secretaban mayoritariamente asociados a exosomas de entre 100-200 nm manteniendo intacto su potencial citotóxico (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999). Finalmente se observó que estos exosomas que contenían FasL y TRAIL se encontraban almacenados en linfocitos T normales activados, dentro de unos compartimentos denominados cuerpos multivesiculares (MVB) (Monleón *et al.*, 2001).

Nuestro grupo también ha realizado un análisis proteómico de los exosomas liberados por las células tumorales Jurkat y de los linfocitos T normales activados (Bosque, 2005) donde se han encontrado diferencias en el contenido proteico de ambos. Una de las proteínas diferenciales encontradas en células Jurkat y no en linfocitos T normales activados ha sido VCP (p97) (datos no publicados). VCP, entre otras muchas funciones, parece estar implicada en el tráfico vesicular y la presencia de esta proteína en los exosomas de células Jurkat (y no de linfocitos T normales activados) hace sospechar que podría estar interviniendo en la secreción de éstos en células tumorales y no en células normales.

Por otra parte, como ya es sabido, el mecanismo de acción de TRAIL es la inducción de la apoptosis a través de la vía extrínseca tras la unión a sus receptores proapoptóticos DR4 y DR5 en las células diana. TRAIL es capaz de inducir la apoptosis en diferentes tipos celulares tumorales humanos pero no en células sanas lo que hace de esta molécula un prometedor agente antitumoral. Sin embargo, diversos cánceres humanos son resistentes a la acción citotóxica de TRAIL.



El presente trabajo pretende profundizar en el papel de TRAIL en los procesos de regulación del sistema inmune para lo cual se va a comenzar por analizar la expresión de este ligando mortal así como su secreción y la contribución de TRAIL expresado en superficie o secretado a la capacidad citotóxica de linfocitos T normales activados obtenidos a partir de sangre periférica antes y después de ser reestimulados comparándolo con la expresión y secreción en células tumorales de estirpe hematológica.

También se pretende profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia a la inducción de apoptosis mediada por TRAIL, para lo que se intentarán generar líneas celulares de estirpe hematológica resistentes a este ligando mortal para analizar cuáles son algunos de esos mecanismos en células tumorales sanguíneas.

Los objetivos del presente estudio son:

1. Analizar la expresión en superficie e intracelular de TRAIL en linfocitos T normales activados obtenidos a partir de sangre periférica y comparar su expresión en la línea celular tumoral Jurkat.
2. Analizar *in vitro* el papel de TRAIL en la muerte celular inducida por los linfocitos T normales activados tras ser sometidos a reactivación.
3. Analizar *in vitro* el papel de la proteína VCP (p97) en el mecanismo de secreción de exosomas en linfocitos T normales activados obtenidos a partir de sangre periférica y en la línea celular tumoral Jurkat mediante el uso de DeBQ, un inhibidor específico de VCP (p97).
4. Generar líneas celulares hematológicas resistentes a TRAIL mediante cultivo mantenido en presencia de este ligando mortal.
5. Analizar los mecanismos moleculares de resistencia a TRAIL en las líneas celulares hematológicas resistentes generadas.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se produce de una manera controlada, siguiendo un patrón de ejecución determinado genéticamente. A nivel fisiológico, la apoptosis es un proceso fundamental durante el desarrollo en época embrionaria, y en la regulación de los mecanismos homeostáticos y la renovación de las poblaciones celulares de tejidos en organismos adultos (Chowdhury *et al.*, 2006).

En células en cultivo, las células apoptóticas se pueden diferenciar por distintos métodos, ya que presentan el denominado *fenotipo apoptótico*. Entre las características medibles de este fenotipo apoptótico encontramos principalmente: 1) exposición de fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana celular; 2) caída del potencial mitocondrial; 3) condensación de la cromatina; 4) fragmentación nuclear; y 5) *blebbing* o formación de burbujas a partir de la membrana celular que se denominan *cuerpos apoptóticos*.

Las proteínas clave implicadas en apoptosis se denominan caspasas. Son cisteín-proteasas que presentan especificidad de corte por el ácido aspártico. En humano se han identificado 12 caspasas distintas. Se clasifican en: iniciadoras (caspasas 2, 8, 9,10), ejecutoras (caspasas 3, 6, 7) e inflamatorias (caspasas 1, 4, 5) (Cohen, 1997). Las caspasas se expresan como zimógenos (procaspasas) que presentan escasa actividad. Estas procaspasas tienen que ser proteolizadas por proteasas o caspasas previamente activadas desencadenando un proceso de activación en cascada. En el caso de las caspasas iniciadoras esta activación proteolítica se produce por autoproteólisis tras su unión a los dominios mortales de distintas moléculas adaptadoras. En el caso de las caspasas ejecutoras o inflamatorias, su activación se produce por el corte de una caspasa iniciadora previamente activada.

Existen dos vías principales de apoptosis, la vía extrínseca o de receptores mortales y la vía intrínseca o mitocondrial, aunque existe una conexión entre ambas y una puede influir sobre la otra (Igney & Krammer, 2002). Además de estas dos vías, existe la vía de la exocitosis granular que comparte características con las anteriores y que sólo se

lleva cabo por las células citotóxicas del sistema inmunitario (principalmente células NK y linfocitos T citotóxicos).

### **2.1.1 Vía intrínseca de la apoptosis**

La vía intrínseca (también denominada *mitocondrial*) se activa por distintos estímulos intracelulares entre los que se incluyen la radiación UV, agentes quimioterapéuticos, productos víricos o bacterianos, estrés oxidativo, privación de factores de crecimiento, etc.

Esta vía se encuentra regulada principalmente por las proteínas de la familia Bcl-2 que consta de proteínas que inhiben la apoptosis (anti-apoptóticas) o que la favorecen (pro-apoptóticas). La inhibición de los miembros anti-apoptóticos (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Mcl-1*) de la familia Bcl-2, junto con la activación de los miembros pro-apoptóticos (Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, Puma, Noxa) induce la oligomerización de las proteínas pro-apoptóticas Bak y Bax (Cory & Adams, 2002). Esta oligomerización provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) permitiendo la salida desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol de una serie de proteínas apoptogénicas entre las que se encuentran el citocromo C, la proteasa de serina HtrA2/Omi, el inhibidor Smac/Diablo, la endonucleasa endoG y el factor inductor de apoptosis (AIF). Una vez en el citosol, el citocromo C liberado se une a la molécula adaptadora citosólica Apaf-1 y promueve la formación del apoptosoma (Bao & Shi, 2006) en el que se activa por procesamiento la caspasa iniciadora 9 que termina procesando a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7.

Por otra parte, AIF junto a endoG se traslocan al núcleo e inducen apoptosis de una manera independiente de caspasas.

### **2.1.2 Vía extrínseca de la apoptosis**

Esta vía de inducción de apoptosis se activa por medio de la interacción de una serie de receptores de membrana con sus correspondientes ligandos de unión.

Los ligandos mortales pertenecen a la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral, y de todos ellos, TNF- $\alpha$  y sobre todo FasL y Apo2/TRAIL son los capaces de inducir

apoptosis. Cada ligando mortal tiene su correspondiente receptor mortal específico. El receptor de TNF- $\alpha$  es TNFR y el de FasL es CD95/Apo1/Fas. Apo2L/TRAIL, a diferencia de los dos anteriores, tiene dos receptores pro-apoptóticos, DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2). A nivel estructural, todos los receptores son proteínas de membrana de tipo I, con regiones ricas en cisteína (CRD) en su parte extracelular y un dominio mortal (*Death Domain*) (DD) en su región intracelular. El mecanismo de transducción de la señal apoptótica comienza cuando un homotrímero de ligando mortal se une a su correspondiente receptor mortal lo que provoca a su vez la trimerización de los receptores. Tras esta oligomerización, a nivel citoplasmático se produce el reclutamiento de proteínas adaptadoras que poseen, por un lado un dominio mortal de unión al receptor (DD), y por otro un dominio efectores de muerte (*Death Effector Domain*) (DED) para reclutar a las caspasas iniciadoras 8 y 10. Las procaspasas iniciadoras 8 y 10 se activan por autoproteólisis y éstas a su vez pueden procesar a las caspasas ejecutoras 3,6 y 7 (Kischkel *et al.*, 1995).

## **2.2. TRAIL (Apo2L)**

TRAIL (también denominado Apo2L) fue descrito de manera independiente por dos grupos distintos como un ligando mortal capaz de inducir apoptosis por la vía extrínseca de manera independiente de Fas (Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996).

Al igual que los otros miembros de la familia TNF, TRAIL es una proteína de membrana de tipo II compuesta por 281 aminoácidos y cuyo gen está localizado en el cromosoma 3, posición 3q26. Su dominio extracelular C-terminal presenta homología con los otros miembros de su familia, en cambio el N-terminal no. El monómero de TRAIL tiene un peso molecular de 32,5 kDa y de 41 kDa cuando está completamente glicosilado. TRAIL, de modo similar a otros miembros de la familia TNF, es un homotrímero y cada uno de los monómeros está compuesto de dos láminas beta antiparalelas. La única característica exclusiva de TRAIL es que forma homotrímeros en torno a un átomo de Zinc de manera espontánea que mantiene su estabilidad y actividad biológica (Hymowitz *et al.*, 1999).

### **2.2.1 TRAIL y sus receptores**

Los receptores mortales de TRAIL, DR4 y DR5 son proteínas transmembrana de tipo I, siendo DR5 el de mayor actividad pro-apoptótica (Gomez-Benito *et al.*, 2007). Además de DR4 y DR5, TRAIL tiene otros receptores, DcR1 y DcR2, que son receptores *señuelo* y no transmiten la señal apoptótica ya que carecen de dominio citoplasmático (DcR1) o lo tienen truncado (DcR2) (Ashkenazi & Dixit, 1998) y un receptor soluble de menor afinidad denominado osteoprotegerina (Emery *et al.*, 1998). El papel fisiológico de ambos receptores DcR no está claro pero se piensa que podrían tener un papel regulador de la acción de TRAIL.

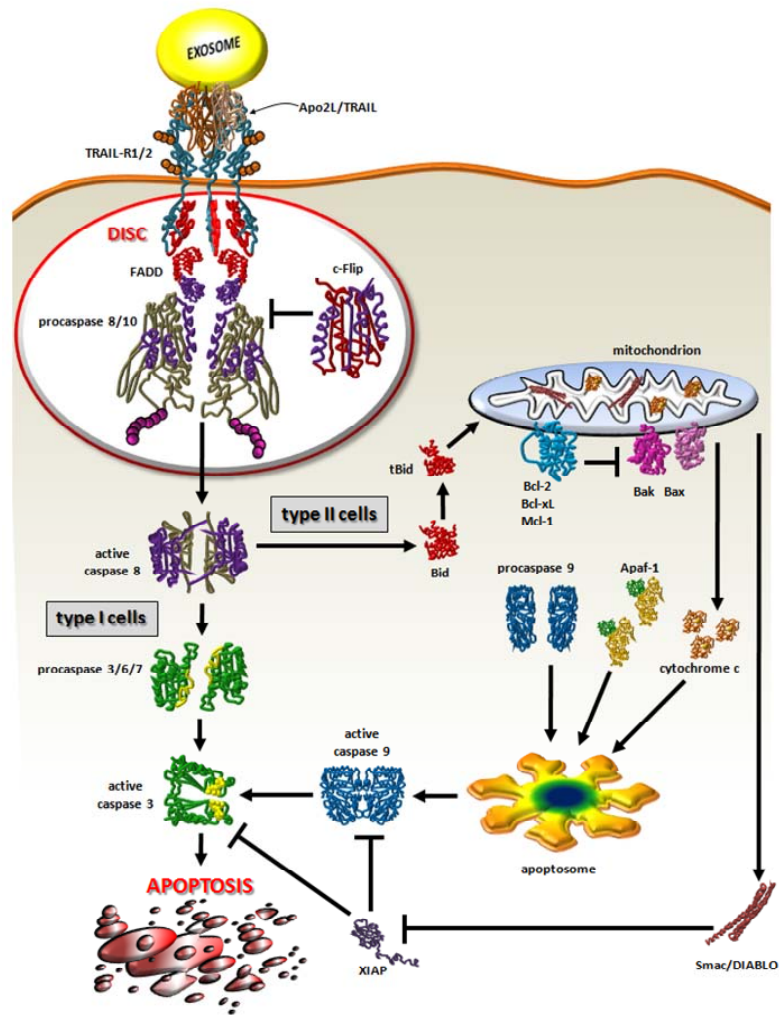
### **2.2.2. Vía de señalización de TRAIL**

La vía de señalización apoptótica de TRAIL se esquematiza en la **Figura 1**. El paso inicial en la apoptosis inducida por TRAIL es la unión de un homotrímero de TRAIL a sus receptores DR4 o DR5.

La interacción de TRAIL con uno de ambos receptores induce su agrupación que reclutan a nivel citoplasmático a la proteína adaptadora FADD, y ésta a su vez a las procaspasas iniciadoras 8 y 10, la cuales promueven el ensamblaje del complejo multimolecular denominado DISC (*Death Inducing Signalling Complex*).

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

Las caspasa 8 y 10 son reclutadas y activadas en el DISC con una cinética similar y pudiendo actuar una independientemente de la otra. Algunos autores sugieren que la caspasa 10 puede ser la sustituta de la caspasa 8 (Kisckel *et al.*, 2001). Sin embargo, otros autores aseguran que la caspasa 10 no restaura la sensibilidad a la apoptosis vía extrínseca en células deficientes en caspasa 8 (Sprick *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Representación esquemática de la vía de señalización apoptótica inducida por TRAIL (sg. Martínez-Lostao L. *et al.* Biochem. Pharmacol. (2012)).

Dependiendo del tipo celular, la activación de la apoptosis a través de la vía extrínseca requiere de la vía intrínseca (Scaffidi *et al.*, 1998). Las células que pueden concluir la apoptosis por la activación de la vía extrínseca ya que producen elevados niveles de caspasa 8 que le permiten proteolizar y activar completamente a las caspasas ejecutoras se denominan de tipo I. En las células de tipo II la cantidad de caspasa 8 que se genera no es suficiente para activar completamente a las caspasas ejecutoras y necesitan de la amplificación de la señal apoptótica a través de la vía mitocondrial (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Esta conexión entre la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis vienen dada por la capacidad de la caspasa 8 iniciadora de procesar y activar la proteína pro-apoptótica Bid. La forma procesada y activa de Bid se denomina tBid (Bid truncado) y

es capaz de activar la vía mitocondrial a través de Bax y Bak y la salida al citosol de citocromo C.

La vía apoptótica de señalización por TRAIL se encuentra regulada a distintos niveles para prevenir la activación de caspasas de manera no deseada. Por una parte, no todas las proteínas presentes en el DISC son proapoptóticas. cFLIP (*Cellular FLICE Inhibitory protein*) la cual comparte una elevada homología con la caspasa 8 y la caspasa 10, puede inhibir la activación de ambas en el DISC por competición por unión a FADD. De las dos variantes que existen por *splicing* de cFLIP que pueden detectarse a nivel proteico, cFLIP<sub>s</sub> bloquea el procesamiento y la activación de la caspasa 8 en el DISC mientras que el papel de cFLIP<sub>L</sub> es controvertido. La mayoría de autores afirman que cFLIP<sub>L</sub> es una proteína antiapoptótica que actúa de manera similar a cFLIP<sub>s</sub> (Irmiler *et al.*, 1997). Contrariamente, algunos autores describen a cFLIP<sub>L</sub> como una molécula proapoptótica, ya que media la activación autocatalítica de la caspasa 8 en el DISC (Mischeau *et al.*, 2002).

Otro punto de control en la cascada apoptótica viene dado por XIAP (*X chromosome-linked inhibitor of apoptosis*), una molécula que se une a caspasa 3,7 y 9 y es capaz de inhibir su actividad. En las células de tipo II se requiere de la activación de caspasas y de que XIAP se encuentre inhibida. La proteína Smac/DIABLO es liberada por la mitocondria y es capaz de inhibir a XIAP y activar caspasas. La proporción entre cFLIP y caspasa 8 y entre XIAP y Smac/DIABLO puede determinar si la célula (de tipo I o de tipo II) es capaz de responder a la señal apoptótica desencadenada por la unión de TRAIL a los DRs (Gonzalvez & Ashkenazi, 2010).

Por otra parte, modificaciones postraduccionales de los DRs también pueden modular la señal apoptótica inducida por TRAIL. Entre estas modificaciones destaca la glicosilación, la palmitolización o la endocitosis de los receptores pro-apoptóticos por mecanismos dependientes de dinamina.

Finalmente, se ha descrito que TRAIL también es capaz de inducir señales de supervivencia además de señales de muerte celular. En según qué tipos celulares, TRAIL es capaz de activar vías de supervivencia como la de NF-κB y la de las MAPK quinasas entre otras (Falschlehner *et al.*, 2007).

### **2.2.3 Funciones biológicas de TRAIL**

Son varias las funciones biológicas en las que se le ha atribuido un papel a TRAIL. A continuación se van a comentar algunas de ellas relacionadas principalmente con el sistema inmunitario.

#### **2.2.3.1 TRAIL y regulación inmune**

TRAIL tiene un importante papel en la regulación de la respuesta inmune y de hecho, este ligando mortal se expresa en una amplia variedad de células inmunes dependiendo su expresión del estado de activación de estas células. La expresión de Apo2L/TRAIL es baja en la superficie de PBLs humanos recién extraídos pero su expresión aumenta claramente durante el proceso de generación de blastos T (células T activadas) (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998). Aunque los linfocitos T CD4+ y T CD8+ no activados expresan DR4 y DR5, ambos son resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL. Sin embargo, si estos linfocitos se activan por IL-2 se vuelven susceptibles a TRAIL (Wendling *et al.*, 2000; Mirandola *et al.*, 2004).

TRAIL está implicado en la muerte celular inducida por activación (AICD) de los linfocitos T (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998). La AICD de los linfocitos T generados por expansión clonal es un mecanismo implicado en la homeostasis de toda respuesta inmune normal. Este proceso es dependiente de la acción de los ligandos mortales, especialmente FasL (Dhein *et al.*, 1995), pero también TRAIL juega un papel importante en la AICD. La implicación de TRAIL en la AICD fue sugerida por Marsters y colaboradores (Marsters *et al.*, 1996) quienes demostraron que rAPO-2L induce la muerte de los linfocitos T periféricos solo después de que éstos hubiesen sido sensibilizados en presencia de IL-2. Esto es similar a los requerimientos de la inducción de AICD a través de Fas/FasL, sugiriendo que sólo los linfocitos T reactivados son sensibles a la eliminación por apoptosis (Peter *et al.*, 1997).

En presencia de IL-2, la unión de Apo2L/TRAIL y FasL a sus correspondientes receptores induce la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados mediada por esta interleucina, en vez de la muerte celular (Bosque *et al.*, 2005). El efecto de



Apo2L/TRAIL parece menos potente que el de FasL cuando se analizan las poblaciones de linfocitos T activados de manera conjunta. En cambio, si se analizan por separado (CD4+ y CD8+) se observa como Apo2L/TRAIL inhibe el crecimiento de linfocitos T mediado por IL-2 preferentemente en la subpoblación de CD8+, induciendo un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M (Bosque *et al.*, 2005).

También se ha descrito *in vivo* que TRAIL juega un papel importante en la homeostasis de las linfocitos T CD8+. En condiciones normales, la expansión de linfocitos T CD8+ ocurre gracias a la ayuda de los linfocitos T CD4+. Como consecuencia de esta primera expansión de linfocitos T, se genera una población de células T CD8+ memoria, la cual es capaz de llevar a cabo una segunda expansión clonal una vez son reestimuladas sin necesidad de la cooperación de los linfocitos T CD4+. Sin embargo, los linfocitos T CD8+ expandidos en ausencia de la ayuda de los linfocitos T CD4+ son incapaces de llevar a cabo una segunda expansión clonal y los linfocitos T CD8+ de memoria así generados mueren tras su activación por un mecanismo dependiente de TRAIL (Janssen *et al.*, 2005; Schoenbarger *et al.*, 2011)

### **2.2.3.2 TRAIL y enfermedades autoinmunes**

Las enfermedades autoinmunes se generan debido al reconocimiento inapropiado de autoantígenos o por defectos en la regulación de la respuesta inmune. Los mayores protagonistas en este tipo de enfermedades son los linfocitos T autorreactivos lo cuales son capaces de atacar a las propias células del organismo y causan una respuesta inmune patológica en ausencia de infección. La señalización vía TRAIL parece estar implicada en una amplia variedad de enfermedades autoinmunes y puede ser capaz de modular las enfermedades autoinmunes. A pesar de que los ratones *knockout* de TRAIL o TRAIL-R no desarrollan enfermedades autoinmunes espontáneas sí que son más susceptibles a enfermedades autoinmunes experimentalmente inducidas (Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que TRAIL es capaz de inhibir enfermedades autoinmunes en varios modelos animales (Anel & Martinez-Lostao, 2011). En estos estudios, TRAIL actúa inhibiendo la inflamación, inhibiendo la progresión del ciclo celular

y la proliferación de los linfocitos T autorreactivos, o inhibiendo la producción de citocinas y/o anticuerpos.

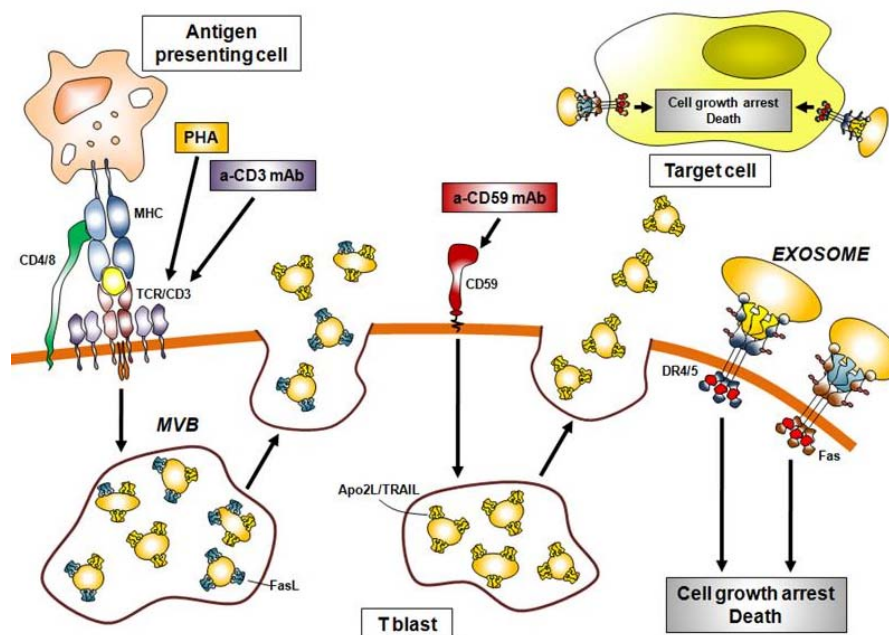
### **2.2.3.3 TRAIL e inmunovigilancia tumoral**

Desde su primera descripción se observó que TRAIL inducía apoptosis en una amplia variedad de células tumorales pero no en células normales, por lo que se convirtió en un potencial agente antitumoral (Ashkenazi *et al.*, 1999). Dentro de la terapia antitumoral basada en TRAIL se emplean dos principales aproximaciones: 1) uso de TRAIL recombinante; y 2) uso de anticuerpos agonistas de receptores proapoptóticos de TRAIL (PARAs) (Ashkenazi, 2008).

Respecto a su papel antitumoral *in vivo*, estudios en ratones sugieren que la vía de Apo2L/TRAIL tiene un papel en la inmunovigilancia tumoral. Los ratones deficientes en, ya sea TRAIL o en mDR5 (el único receptor ortólogo de ratón de DR4 y DR5 humano) muestran una mayor susceptibilidad a la tumorigénesis (Jonhstone *et al.*, 2008). Muchos tumores desarrollan diversos mecanismos para escapar de la vigilancia antitumoral mediante un proceso conocido como inmunoselección o inmunoedición. Las condiciones inflamatorias que se generan durante tumorigénesis puede inducir la expresión de TRAIL por parte de las células inmunes que son capaces de infiltrarse en el tumor (Cretney *et al.*, 2002), ejerciendo tal vez una presión inmunoselectiva maligna. Por este motivo, es necesario identificar que tumores pueden ser sensibles al uso de terapias basadas en TRAIL, mediante la identificación de biomarcadores celulares predictivos (Yang *et al.*, 2010).

## **2.3. MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LOS LIGANDOS MORTALES**

Durante los estudios de la implicación de los ligandos mortales en la AICD se observó que la secreción de FasL y TRAIL solubles que se encuentran preformados se produce tras la reestimulación de blastos T a través de su TCR (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1996; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999). Tanto FasL como TRAIL son liberados al medio como proteínas completas (sin proteolizar) y asociados a microvesículas de 100-200 nm de diámetro (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Representación esquemática de la secreción de los ligandos mortales (FasL y TRAIL) asociados a exosomas (sg. Anel A. & Martínez-Lostao L. *Recent Patents on Inflamm. & Allergy Drug Discov.* (2011)).

Estas microvesículas son liberadas al medio tras la reactivación y contienen un mayor valor citotóxico que las formas proteolizadas, sugiriendo que la proteólisis actúa como un mecanismo de regulación negativa (Martínez-Lorenzo *et al.*, 1999).

Las microvesículas preformadas están localizadas en un principio dentro de cuerpos multivesiculares (Martínez-Lorenzo *et al.*, 1999), similares a las que se encuentran en las células presentadoras de antígenos (APC), que reciben el nombre de exosomas y que contienen las proteínas de membrana correctamente orientadas. El hecho de que contengan FasL y TRAIL posicionado correctamente indica que tiene un proceso de formación similar al de los exosomas que contienen MHC II de las células APC.

Poco tiempo después de la reestimulación, los cuerpos multivesiculares migran hacia la membrana plasmática de la célula con la cual se fusionan, liberando los exosomas internos intactos. El mecanismo de secreción de los ligandos mortales unidos a microvesículas es más eficiente y rápido que las formas solubles por sí solas. Esto es debido a que las microvesículas contienen una menor movilidad que las formas solubles

por lo que se mantiene la concentración local y de este modo se limita la acción de inducir la muerte de manera autocrina y paracrina a las células vecinas durante la regulación de la respuesta inmune (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999; Monleón *et al.*, 2001).

Por otra parte, en el caso de FasL se ha descrito la existencia de distintas metaloproteasas capaces de procesar FasL expresado en la superficie de distintos tipos celulares generando una forma soluble de FasL (Mitsiades *et al.*, 1998, Kayagaki *et al.*, 1995). Sin embargo el papel de esta forma soluble de FasL es controvertido. Mientras que en algunos casos se ha reportado que la forma soluble de FasL generada es citotóxica (Powell *et al.*, 1999), en otros casos parece que esta forma soluble supone un mecanismo de regulación negativa de la capacidad pro-apoptótica de FasL asociado a membrana (Schneider *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998).

En lo referente a TRAIL y dadas las similitudes que muestra en distintos aspectos con FasL, se piensa que debe existir una metaloproteasa que pueda cortar TRAIL expresado en la superficie celular sin embargo por el momento no se ha identificado esa metaloproteasa putativa. En este sentido, se ha descrito que a diferencia de FasL, no se produce un aumento de TRAIL en superficie tras el tratamiento con inhibidores de metaloproteasas (Mariani *et al.*, 1998), lo que supone que TRAIL no se libera como una proteína soluble en condiciones fisiológicas.

#### **2.4. EXOSOMAS Y VCP**

Los exosomas son estructuras esféricas de entre 40 y 100 nm de diámetro. La composición lipídica parece ser común a la de todos ellos, enriquecidos en colesterol y esfingomielina. En cambio la composición proteica (citoplasmática y de membrana) es variable y depende del tipo de célula de la que proceda y de la función que tenga. Se han descrito más de 70 proteínas asociadas a estas microvesículas, muchas de ellas comunes (en todos los exosomas), pero otras específicas de las células de procedencia (Bosque, 2005). Se postula que la composición común a todas estas estructuras, tanto lipídica como proteica, podría actuar como señal de salida de la célula; y que las proteínas exclusivas de procedencia podría darles funciones específicas (Stoorvogel *et al.*, 2002), como puede ser la comunicación celular durante la repuesta inmune.

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

Son muchos los tipos celulares capaces de liberar estas microvesículas. Dentro del sistema inmunitario se han descrito estas estructuras en otras células; células B (Raposo *et al.*, 1996), células dendríticas (Zitvogel *et al.*, 1998) y linfocitos T (Martinez-Lorenzo, 1999, Monleón *et al.*, 2001). La liberación de FasL y Apo2L/TRAIL en la superficie de microvesículas es el mecanismo principal de acción de la AICD de los linfocitos T (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1996; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998).

VCP o p97 es una ATPasa de tipo II AAA que se caracteriza por presentar dos dominios ATPasa AAA conservados (Neuwald et al; 1999). Es una proteína ubicua, esencial y muy abundante en las células (representa el 1% de la proteína total celular). Se ha demostrado que juega un papel importante en: 1) degradación de proteínas de membrana y proteínas secretoras mal plegadas; 2) reensamblaje de la membrana del Aparato de Golgi; 3) transporte de membranas; 4) regulación del ensamblaje de miofibrillas; 5) división celular; 6) formación de agregados proteicos y, 7) maduración del autofagosoma.

Se cree que el amplio rango de funciones deriva de la habilidad de desplegar proteínas o desensamblar complejos proteicos pero se desconoce el mecanismo concreto de acción de p97 (Cho *et al.*, 2011).

El análisis proteómico de los exosomas liberados tras la activación de las células Jurkat determinó un alto contenido de la proteína VCP. Por el contrario, VCP no se encontró en el contenido proteico de los exosomas liberados tras la reactivación de los blastos T (Datos no publicados).

Por otra parte, se ha desarrollado un inhibidor específico de VCP denominado DeBQ (Cho *et al.*, 2011). Se ha visto que este inhibidor de VCP ejerce un efecto citotóxico

diferencial sobre células tumorales, deduciendo la importancia de la proteína VCP en tumores y su uso como posible diana en terapia antitumoral.

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

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS:**

#### **3.1. CULTIVOS CELULARES**

##### **3.1.1 Líneas celulares**

Para la realización de este estudio se utilizaron las líneas celulares tumorales humanas: 1) *Jurkat* (leucemia aguda de células T); 2) H929 (Mieloma Múltiple); y 3) MM1S (Mieloma Múltiple).

Los medios de cultivo empleados fueron RPMI 1640 (*Gibco*) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB), con L-glutamina 2mM y con los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 mg/mL) para la línea celular *Jurkat*, y el mismo medio pero suplementado al 10% con suero fetal bovino para las líneas celulares MM1S y H929. Este medio suplementado se denominó medio completo.

Las líneas celulares se cultivaron a una densidad de  $1,5-2 \times 10^5$  células/mL, en el caso de *Jurkat*, y a  $2,5-3 \times 10^5$  en el caso de H929 y MM1S, en un incubador termostático (*Heraeus Cell*) a 37°C en aire saturado de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las manipulaciones celulares se realizaron en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar vertical (*Telstar*).

##### **3.1.1.1 Congelación y descongelación de células**

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido. Para ello se centrifugaron  $6 \times 10^6$  células a 1.200 rpm durante 5 minutos. Después se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µL de medio completo con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se trasvasó la suspensión celular a viales estériles de congelación (*Nunc*). Los viales se congelaron a -80°C durante las primeras 24-72 horas y luego se trasladaron a un contenedor de nitrógeno líquido donde se almacenaron hasta su utilización.

Para la descongelación de las células, se dejó atemperar el vial de congelación bajo campana de flujo laminar, se le añadió 1 mL de medio completo y se trasvasó a un tubo *Falcon* que contenía 10 mL del mismo medio. Las células se centrifugaron durante 5

minutos a 1.200 rpm, se decantó el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en 5 mL de medio completo y se trasvasó a un frasco de cultivo que se incubó a 37°C en aire saturado de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub>. En los días sucesivos se controló la densidad de crecimiento celular hasta establecer la densidad normal de mantenimiento (1,5-2x10<sup>5</sup> células/mL en Jurkat y 2,5-3x10<sup>5</sup> células/mL en H929 y MM1S).

### **3.1.1.2 Determinación de la viabilidad celular**

Para determinar la viabilidad celular se realizó la tinción con azul *Trypan*, colorante que tiñe el interior de las células muertas, las cuales han perdido su integridad de membrana. Para el conteo se mezclaron 50 µL de suspensión celular y 50 µL de solución azul de *Trypan* (azul *Trypan* al 0,4% en NaCl 0,15M). Esta mezcla se depositó sobre un hemocitómetro y se realizó el conteo celular con un microscopio óptico (*Optiphot, Nikon*).

La viabilidad celular se evaluó considerando el porcentaje de células no teñidas (viables) respecto al número total de células.

La densidad celular se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$DC \text{ cél/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células viables} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4}{\text{n}^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

$$\left( \begin{array}{l} DC: \text{Densidad celular} \\ 10^4: \text{Ajuste del tamaño de la cámara} \\ \text{Factor de dilución: 2, al mezclar 50ml + 50ml.} \end{array} \right)$$

### **3.1.2 Generación de líneas resistentes a TRAIL**

Se intentaron generar sublíneas celulares resistentes a TRAIL a partir de las líneas celulares H929 y MM1S. Para ello, se sembraron ambas líneas celulares a una concentración de 3 x10<sup>5</sup> cel/mL en placas de 6 pocillos y se les fue añadiendo dosis crecientes de TRAIL, empezando con una concentración subtóxica de 200ng/mL en el caso de H929 y de 100ng/mL en el caso de MM1S. La selección de células vivas se realizó por



centrifugación a baja velocidad (600 rpm) y una vez obtenidas, se volvieron a cultivar en presencia de TRAIL a las concentraciones anteriormente mencionadas.

### **3.1.3 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBLs) y generación de blastos T**

Se aislaron linfocitos procedentes de sangre periférica (*PBLs: Peripheral Blood Cells*) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre total heparinizada de donantes sanos obtenida del Hospital Lozano Blesa.

#### **3.1.3.1 Ficoll**

La técnica de *Ficoll-Hypaque* es un método de centrifugación por gradiente de densidad para separar linfocitos del resto de células sanguíneas.

La sangre total recibida se diluyó en proporción 1:1 en tampón PBS (tampón fosfato salino: NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), se depositó suavemente sobre el reactivo *Ficoll-Hypaque* (*GH Healthcare*) en una proporción 2:1 (sangre diluida: *Ficoll-Hypaque*) y se centrifugó a 1.200 rpm sin freno a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Posteriormente, se recolectó la capa de PBLs y se lavaron con tampón PBS para eliminar plaquetas y restos de *Ficoll-Hypaque*. Tras lavar las células se resuspendieron en RPMI 1640 con 10% de SFB de complementado (sometido a un baño de 56º durante 30 minutos para inactivar el complemento). Este medio se denominó medio completo de complementado.

Se tomó una alícuota para determinar la concentración y viabilidad celular mediante tinción con azul *Trypan*.

#### **3.1.3.2. Generación de Blastos T**

A partir de los PBLs se generaron linfocitos T activados (blastos T). Para ello, los PBLs se cultivaron a una densidad de 2x10<sup>6</sup> células/mL con 5µg/mL de fitohematoaglutinina (PHA) en RPMI 1640 completo al 10% de SFB de complementado durante 24 horas. Luego, se eliminó la PHA lavando las células con medio completo de complementado y las células se pusieron en cultivo a una densidad de 2x10<sup>6</sup> células/mL en medio completo de complementado al que se le añadieron 30 UI/mL de interleucina 2

(IL-2) humana recombinante durante los siguientes 6 días, cambiando el medio y añadiendo IL-2 cada 48 horas (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998; Bosque *et al.*, 2005).

### **3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL EN SUPERFICIE Y TOTAL**

Se analizó mediante citometría de flujo la expresión de TRAIL tanto en la superficie como en el total de la célula tras cultivarlas con PHA a distintos tiempos en la línea celular Jurkat y en los blastos T generados. La PHA se eliminó transcurrido los distintos tiempos de estimulación lavando las células 3 veces con PBS y se esperó una hora (+ 1h) después de ello para analizar la expresión de TRAIL.

Se empleó un citómetro *FACScan* (Benton & Dickinson) y el análisis de los datos obtenidos se realizó empleando el *software Weasel v3.0.1* (Walter Eliza Hall Institute).

#### **3.2.1 Expresión de TRAIL en superficie mediante citometría de flujo**

Se sembraron 100  $\mu$ L de células a una concentración de  $5 \times 10^5$  cel/mL por cada punto experimental en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células se lavaron con 100  $\mu$ L de PBS al 5% de SFB y se les añadió 100  $\mu$ L de PBS al 5% de SFB más los anticuerpos necesarios en cada caso. Los anticuerpos empleados fueron:

<b>ANTICUERPOS</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b> (tipo, especie, fluorocromo)	<b>CONCENTRACIÓN</b> ( $\mu$ g/mL)	<b>CASA COMERCIAL</b>
RIK2 (anti-TRAIL)	mc, ratón, PE	0,06	BD Pharmingen
IgG (isotipo)	mc, ratón, PE	0,06	BD Pharmingen
CD4 (anti-CD4)	mc, ratón, FITC	0,05	Invitrogen
CD8 (anti-CD8)	mc, ratón, FITC	0,05	Invitrogen

mc: monoclonal.

Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad. Seguidamente se lavaron con 100 $\mu$ L de PBS con 5% de SFB y se fijaron en 100  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% en PBS para analizar por citometría de flujo.

En el caso del marcaje de TRAIL en la línea celular Jurkat, se realizaron marcajes simples con RIK2-PE o IgG-PE, y en el caso de los blastos T se realizaron dobles marcajes con RIK2-PE o IgG-PE más CD4-FITC o CD8-FITC para diferenciar entre las subpoblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+.

### **3.2.2 Expresión de TRAIL intracelular mediante citometría de flujo**

Para analizar la expresión de proteínas en el interior de las células, es necesario permeabilizar su membrana con una solución de permeabilización que contiene saponina al 0,1% en PBS con 5% de SFB.

En el caso del marcaje en células Jurkat, se sembraron 100  $\mu$ L de células en suspensión a una concentración de  $5 \times 10^5$  cel/mL por cada punto experimental sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos. La permeabilización se realizó a continuación con 100  $\mu$ L de solución de permeabilización durante 10 minutos. Luego, se añadieron 100  $\mu$ L de esta solución con RIK2-PE o con IgG-PE durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células 2 veces con 100  $\mu$ L de solución de permeabilización y se fijaron en 100  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% en PBS para realizar el análisis por citometría de flujo.

En el caso de los blastos T, se analizó la presencia de proteínas tanto en superficie (CD4 y CD8) como en el interior celular (TRAIL). En estos casos se realizó primero el marcaje en superficie tal y como se describe en el apartado anterior y a continuación se procedió a realizar el marcaje intracelular, siguiendo el mismo método que acaba de ser descrito para la línea celular Jurkat.

## **3.3. ENSAYOS DE CITOXICIDAD**

### **3.3.1 Citotoxicidad de los blastos T sobre células diana**

Para analizar la capacidad citotóxica de los blastos T (células efectoras) generados a partir de PBLs obtenidos de sangre periférica se realizaron co-cultivos con la línea celular tumoral Jurkat (células diana).

17x10<sup>6</sup> blastos T fueron re-estimulados con 10 ng/mL de PMA (Phorbol 12-myristato 13-acetato) y con 600 nM de ionomicina (ionóforo de calcio) que estimulan la célula a través de la activación de la PKC y la consiguiente producción de citoquinas durante 2 horas a 37°C. 8x10<sup>6</sup> blastos T se dejaron sin re-estimar y se usaron como control negativo (Del Rey et al., 2006).

Previamente a realizar el ensayo de citotoxicidad, las células efectoras se marcaron con la sonda fluorescente *Cell Tracker Green* (CTG, *5-chloromethylfluorescein diacetate, Invitrogen*) para poder analizar la muerte celular específica de las células diana (CGT negativas). CTG es un reactivo fluorescente verde que atraviesa libremente la membrana de las células y una vez dentro de éstas reacciona con los grupos tioles presentes en ellas a través de su grupo clorometilo por medio de una reacción mediada por la enzima glutation S-transferasa, de manera que queda retenido en el interior de la célula sin impedir su viabilidad.

Para marcar con CTG, se centrifugaron los blastos T durante 5 minutos a 1.200 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS que contenía CTG 0,1 mM por cada 2x10<sup>6</sup> células. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C y seguidamente se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 1 mL de medio completo de complementado y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Más tarde, se centrifugaron las células durante 15 segundos a 10.000 rpm y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio completo de complementado para que su concentración fuera de 5x10<sup>6</sup> cel/mL.

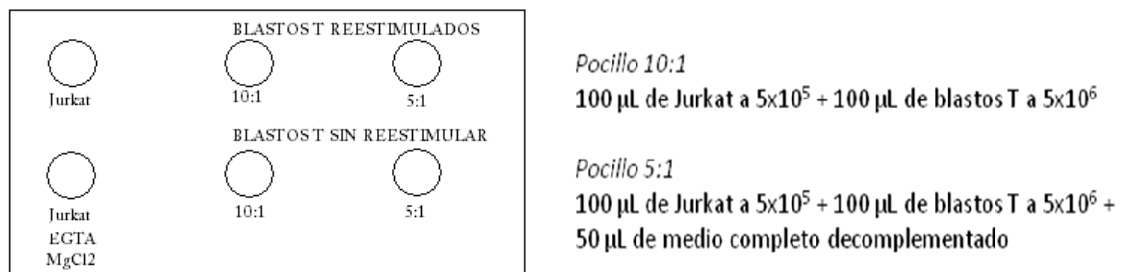
Para realizar el ensayo de citotoxicidad, se empleó una placa de 96 pocillos de fondo redondo. En cada uno de los pocillos se co-cultivaron las células efectoras y las células diana en la siguiente proporción:

*10 células efectoras (blastos T):1 células diana (Jurkat)*

*5 células efectoras (blastos T):1 células diana (Jurkat)*

Este ensayo también se realizó en presencia de EGTA como inhibidor de la degranulación (sistema de exocitosis granular) y de la secreción de ligandos mortales

(FasL y TRAIL) asociados a exosomas para analizar la muerte debida exclusivamente a ligandos mortales de superficie. En este caso es necesario complementar el medio con  $MgCl_2$ , para que actúe como sustituto del ion calcio y así amortiguar los fenómenos de ósmosis. Además, se empleó en todos los casos medio completo decomplementado para evitar la muerte por la activación del sistema del complemento. La incubación se realizó en un incubador termostatzado a 37°C durante 4 horas, tras lo cual se procedió al análisis de los parámetros de muerte celular de las células diana mediante citometría de flujo. En todos los ensayos se dispuso un pocillo con células Jurkat solas y otro pocillo con células Jurkat más EGTA y  $MgCl_2$  para determinar la muerte basal de estas células durante el ensayo.



**Figura 3.** Esquema de la placa de citotoxicidad.

Las células efectoras (blastos T) marcadas previamente con CTG se pueden diferenciar de las células diana (Jurkat) en el análisis por citometría de flujo de modo que para analizar específicamente la apoptosis en las células diana, se seleccionó la población celular CTG negativa.

### **3.3.2. Citotoxicidad de los sobrenadantes de los blastos T**

Por otra parte, se recogieron los sobrenadantes procedentes de los blastos T re-estimulados con PMA e ionomicina y de los no re-estimulados y se analizó su capacidad citotóxica frente a la línea tumoral Jurkat (Del Rey *et al.*, 2006).

Para ver el papel que juega cada uno de los ligandos mortales (FasL y TRAIL) se pre-incubó parte del sobrenadante activado con los anticuerpos anti-TRAIL (anticuerpo bloqueante anti-TRAIL, BD, clon RIK2) y anti-FasL (anticuerpo bloqueante anti-FasL, BD,

clon NOK1), de manera individual y conjunta. Se añadieron a una concentración de 10 µg/mL y se incubaron durante 1 hora en un incubador termostatzado a 37°C. Se centrifugaron las células Jurkat durante 5 minutos a 1.500 rpm, se resuspendieron en el volumen adecuado de medio completo para que su concentración fuera de  $5 \times 10^5$  cel/mL y se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 100µL de suspensión de células Jurkat por pocillo. Seguidamente se centrifugó la placa durante 2 minutos a 3.500 rpm, se descartó el medio y se añadió 100 µL por pocillo de los sobrenadantes procedentes de los blastos re-estimulados (con o sin anticuerpos bloqueantes) y de los blastos sin re-estimar. La placa se incubó en un incubador termostatzado a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se procedió al análisis de los parámetros de muerte celular mediante citometría de flujo. Además, se dispuso un pocillo con células Jurkat con medio completo para determinar la muerte basal de estas células durante cada ensayo.

### **3.3.3 Análisis de la muerte celular. Citometría de Flujo:**

En el estudio de la muerte celular mediante citometría de flujo se analizaron dos parámetros característicos de la apoptosis:

- Translocación de la fosfatidilserina (marcaje con Anexina V).
- Permeabilidad de la membrana celular (marcaje con 7-AAD).

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

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

Para medir estos eventos indicadores de apoptosis se utilizó Ann-V marcada con el fluoróforo APC (*allophyllocyanin*) detectable en el canal de fluorescencia FL-4 del citómetro de flujo en el caso del estudio de la citotoxicidad de blastos T sobre Jurkat, y Ann-V marcada con el fluorocromo FITC detectable en el canal de fluorescencia FL1 en el caso del estudio de la citotoxicidad de los sobrenadantes. El 7-ADD, detectable en el canal FL-3, se usó en ambos casos.

Para realizar el marcaje se centrifugaron las placas en las cuales se hicieron los ensayos de citotoxicidad durante 2 minutos a 3.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 µL de tampón ABB (*annexin binding buffer*), 2 µL de Ann-V-APC o 1,5µL de Ann-V-FITC y 1.5 µL de 7-AAD. Las células se incubaron 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se trasvasaron a un tubo de citometría que contenía 200 µL de tampón ABB. Las muestras se analizaron empleando un citómetro *FACScan* y el análisis de los resultados se realizó mediante el *software Weasel v3.0.1*.

### **3.4. ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE DeBQ SOBRE JURKAT, PBLs Y BLASTOS T**

#### **3.4.1 Determinación de la proliferación celular.**

Con el objetivo de encontrar una dosis subletal de DeBQ (*Sigma*), se utilizó una modificación del método de *Mossman* (Alley *et al.*, 1988) para determinar la proliferación celular tras el tratamiento con drogas citotóxicas. Este método relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul formazán, insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT). La cantidad de cristales formados es proporcional a la proliferación celular, lo que excluye tanto la inhibición del crecimiento como la muerte celular. Para poder distinguir entre ambos efectos se realizó de manera simultánea al ensayo con MTT, el conteo con azul *Trypan*.

Las células se cultivaron a una densidad de  $5 \times 10^5$  cel/mL en el caso de la línea celular Jurkat y de  $1 \times 10^6$  cél/ml en el caso de los blastos T en placa de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen de 100 µl/pocillo y al menos 4 pocillos por punto experimental, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de DeBQ. Las concentraciones fueron desde 60 µM a 0,375 µM y se incubaron en un incubador

termostatzado a 37°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se añadió a cada pocillo 10 µl de una disolución de MTT (5 mg/ml). Las células se incubaron 3 horas a 37°C en el caso de la línea celular Jurkat o durante toda la noche en el caso de los blastos T. Transcurrido este tiempo los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100 µl de isopropanol y agitando en una placa vibradora. Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas (*MR5000, Dynatech*) frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares). Los resultados se presentaron como porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de DeBQ frente al control, constituido por los cultivos sin DeBQ.

#### **3.4.2 Análisis de la expresión de TRAIL en la línea celular Jurkat y en blastos T pretratados con DeBQ.**

Tras calcular la dosis subletal de DeBQ para la línea celular Jurkat y los blastos T, se analizó la expresión de TRAIL (extracelular y total) para estudiar el posible efecto de DeBQ en la inhibición del tráfico vesicular. Para ello se realizó el análisis de la expresión de TRAIL mediante citometría de flujo como se describe en el apartado 2.

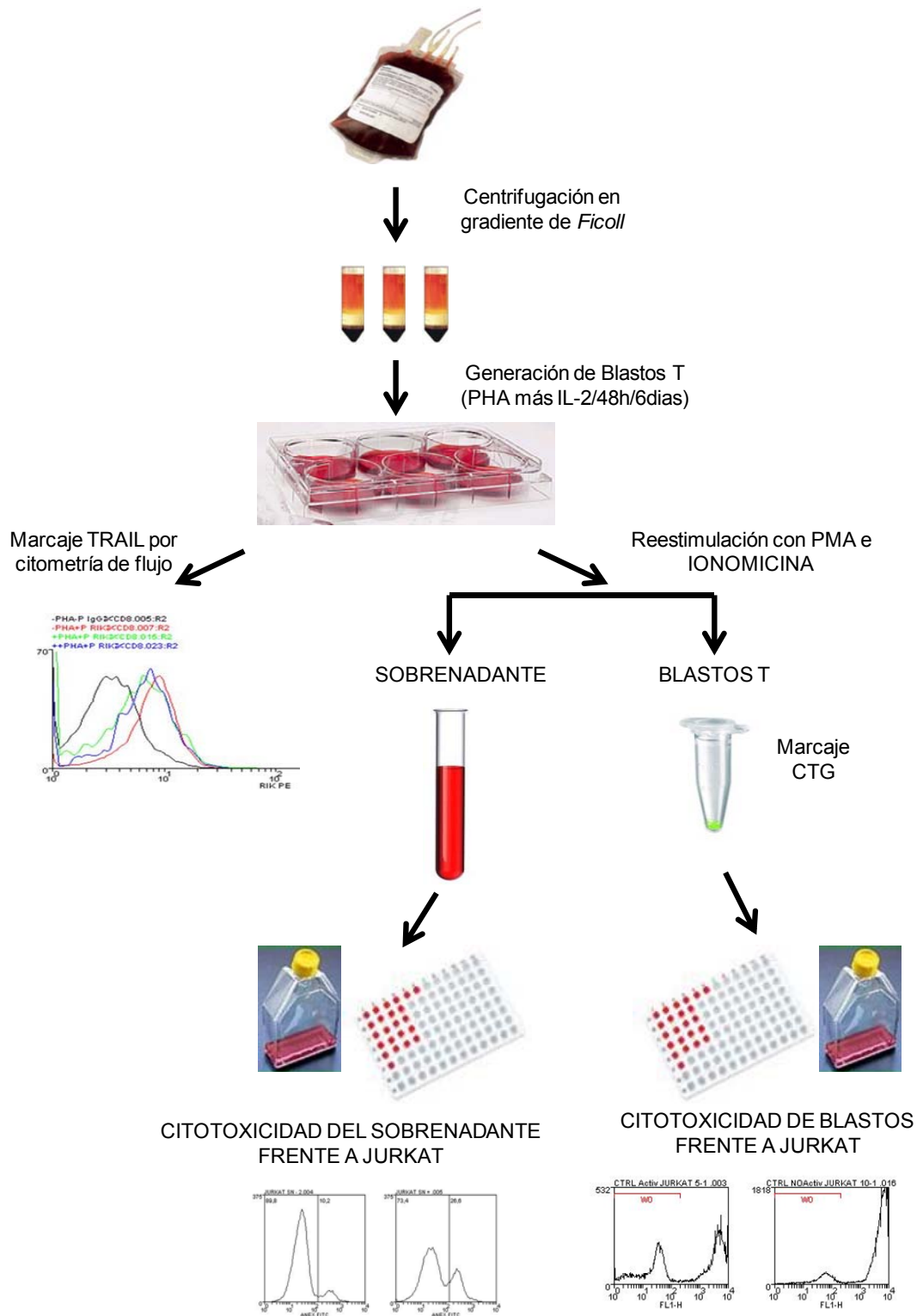
#### **3.5. ANALISIS ESTADÍSTICO**

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

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 SPSS for Windows Release 15.0 (SPSS Inc.)*.

En la **Figura 4** se muestra un esquema representando el procedimiento metodológico completo de los experimentos realizados en blastos T en el presente trabajo.





**Figura 4.** Esquema general del procedimiento completo empleado en los ensayos realizados en blastos T.

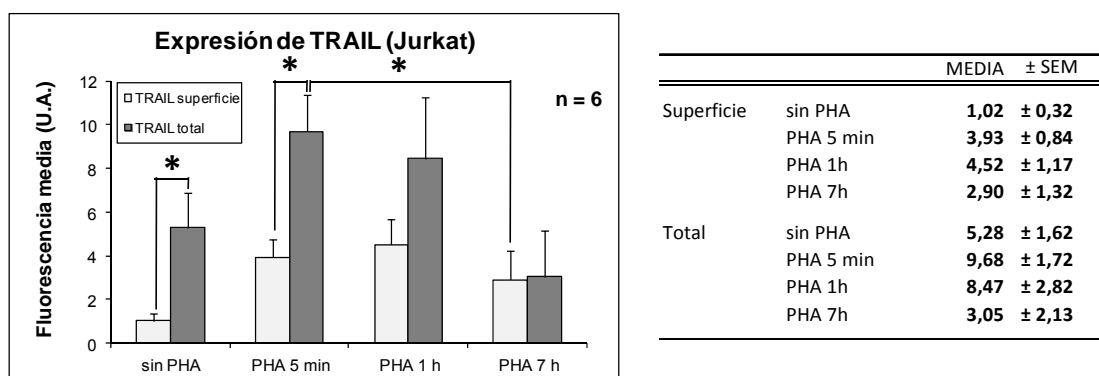
## 4. RESULTADOS:

### 4.1 EXPRESIÓN DE TRAIL EN LA LÍNEA CELULAR JURKAT

Se estudió el patrón de expresión de TRAIL en la línea celular Jurkat en condiciones basales y tras la estimulación con PHA durante 5 minutos (5min), 1 hora (1h) y 7 horas (7h). Tras los tiempos de estimulación indicados, la PHA se eliminó lavando las células 3 veces con PBS y trascurrida 1 hora, se realizó el marcaje tal y como se indica en Materiales y Métodos para analizar la expresión de TRAIL mediante citometría de flujo.

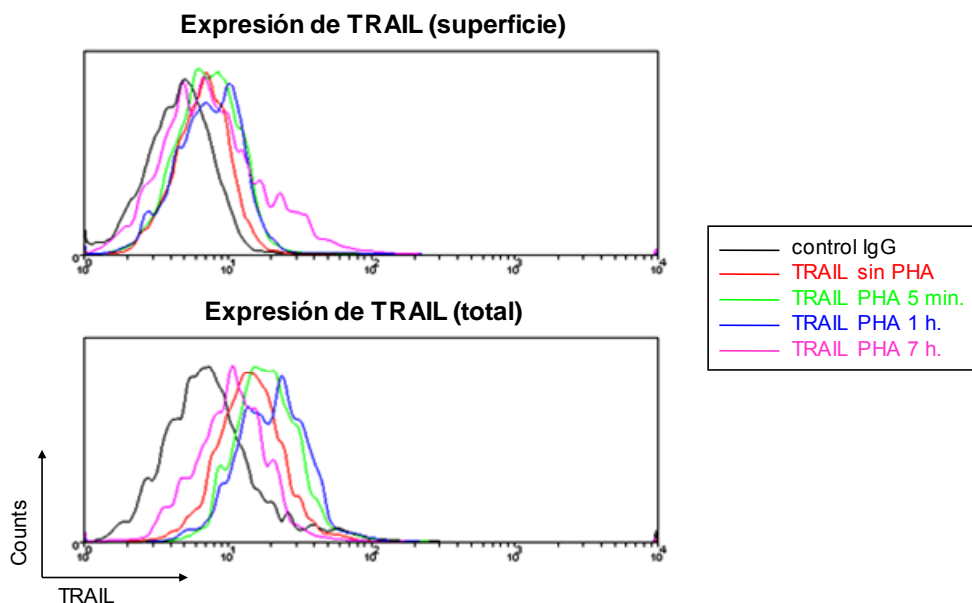
Los datos se muestran en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia y son los obtenidos tras restar a la fluorescencia media del marcaje de TRAIL (fluorescencia específica), la fluorescencia media del marcaje del control de isotipo (fluorescencia inespecífica).

La expresión basal de TRAIL en superficie fue de 1,02 UA y aumentó hasta 3,93 UA al estimular durante 5min con PHA incrementándose hasta 4,52 UA tras 1h de estimulación para volver a descender a 2,90 UA a las 7h de estimulación (**Figura 5 y 6**).



**Figura 5.** Gráfica que representa el promedio de la expresión de TRAIL en superficie (blanco) y la expresión de TRAIL total (gris) en la línea celular Jurkat, estimulada a distintos tiempos con PHA (sin estimular, estimulación de 5min, de 1h y de 7h). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media del porcentaje ± SEM). \*  $p < 0,05$ .

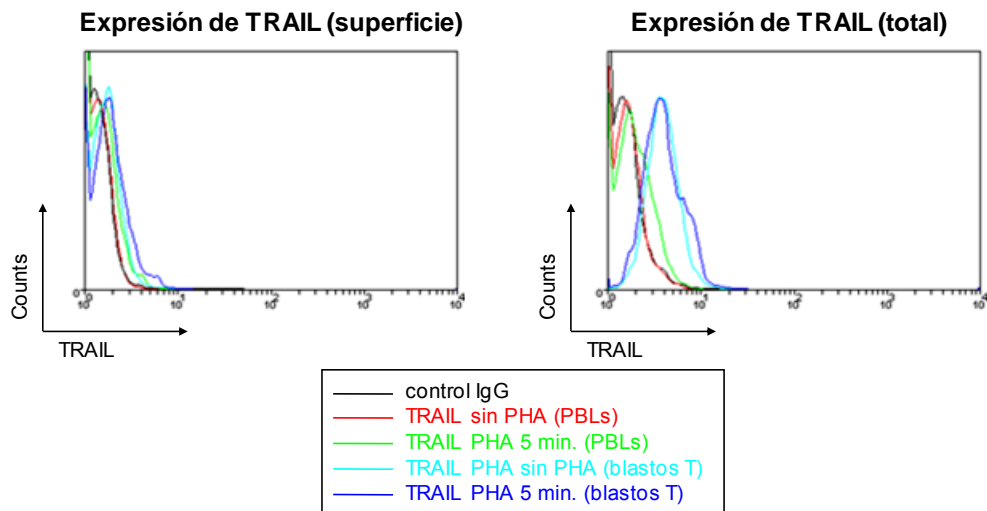
El nivel basal de expresión de TRAIL total (suma de la expresión de superficie y la intracelular) fue de 5,28 UA aumentando a 9,68 tras 5min de estimulación con PHA manteniéndose en valores similares (8,47 UA) cuando se estimuló durante 1h. Tras una estimulación de 7h, se observa una marcada disminución de la fluorescencia, por debajo de los niveles basales, alcanzando un valor de 3,05 UA.



**Figura 6.** Expresión de TRAIL en superficie y total en la línea celular tumoral Jurkat analizado mediante citometría de flujo a distintos tiempos de estimulación con PHA (sin estimular, estimulación de 5min, de 1h y de 7h). Histogramas correspondientes a un experimento representativo.

#### **4.2 EXPRESIÓN DE TRAIL EN PBLs**

Se analizó la expresión de TRAIL en PBLs recién aislado de sangre periférica. La expresión de TRAIL tanto en superficie como total en PBLs fue mínima tal y como se había descrito previamente (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998; Jeremias *et al.*, 1998). Solamente en los blastos T generados a partir de estos PBLs aumenta la expresión de TRAIL fundamentalmente a nivel intracelular (**Figura 7**).



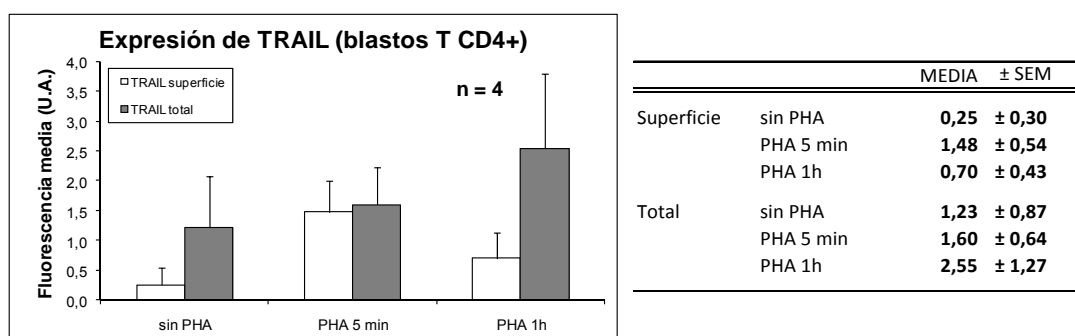
**Figura 7.** Expresión comparada de TRAIL en superficie y total de PBLs y de blastos T, analizado mediante citometría de flujo a distintos tiempos de estimulación con PHA (sin estimular, estimulación de 5min).

#### **4.3 EXPRESIÓN DE TRAIL EN LAS SUBPOBLACIONES DE BLASTOS T CD4 Y BLASTOS T CD8**

El análisis de la expresión de TRAIL en blastos T se realizó en las subpoblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+.

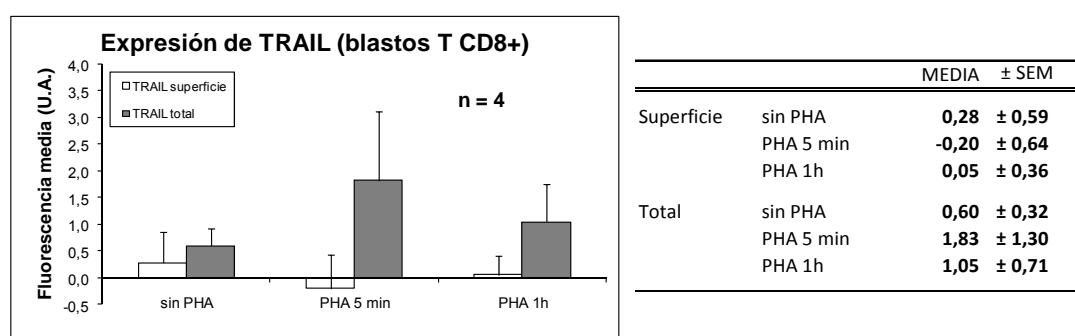
La expresión basal en superficie de TRAIL en blastos T CD4+ fue de 0,25 UA aumentando hasta un valor máximo 1,48 UA a 5min con el estímulo de PHA para volver a descender a 0,70 UA tras 1h de estimulación (**Figura 8**).

En cambio, los niveles totales de la expresión de TRAIL experimentaron un aumento progresivo siendo de 1,23 UA en blastos T CD4+ sin estimular, de 1,60 UA tras ser estimulados durante 5 min y de 2,55 UA tras 1h de estimulación con PHA (**Figura 8**).



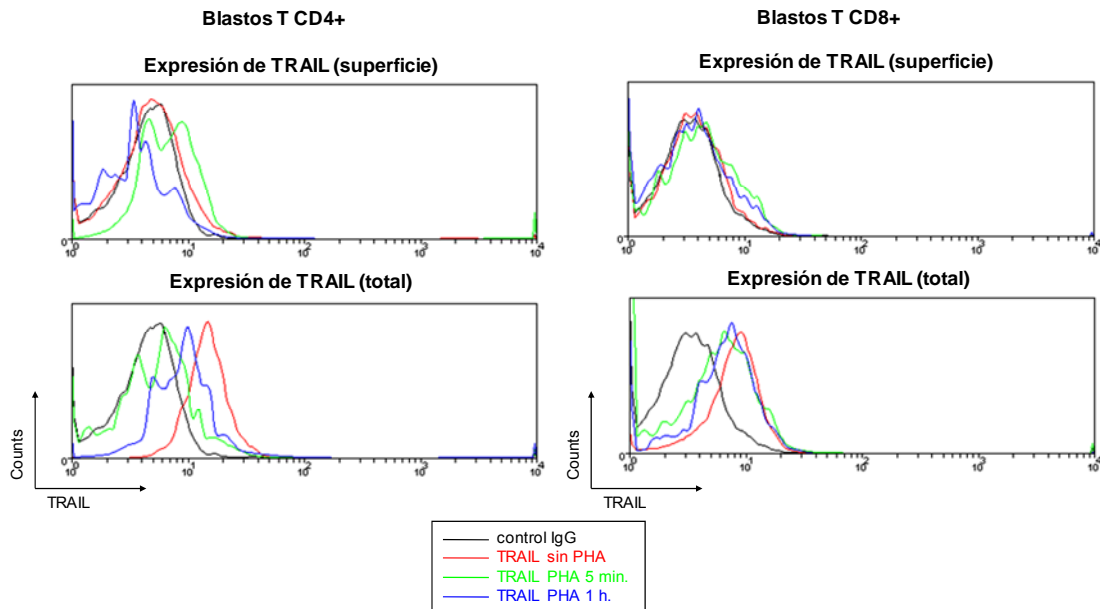
**Figura 8.** Gráfica que representa el promedio de la expresión de TRAIL en superficie (blanco) y la expresión de TRAIL total (gris) en la subpoblación de blastos T CD4+, estimulados a distintos tiempos con PHA (sin estimular, estimulación de 5min y de 1h). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media ± SEM).

La expresión de TRAIL en blastos T CD8+ siguió un patrón distinto al de blastos T CD4+ (**Figura 9**). El mayor valor de expresión de TRAIL en superficie se dio en las blastos T CD8+ sin estimular, siendo de 0,28 UA, descendiendo a valores negativos (-0,2 UA tras 5min de estimulación), o prácticamente nulos (0,05 UA tras 1h de estimulación). En cambio, la expresión de TRAIL total fue máxima a los 5min de estimulación con PHA alcanzando un valor de 1,83 UA descendiendo a 1,05 UA tras 1h de estimulación (**Figura 9**).



**Figura 9.** Gráfica que representa el promedio de la expresión de TRAIL en superficie (blanco) y la expresión de TRAIL total (gris) en la subpoblación de blastos T CD8+, estimulados a distintos tiempos con PHA (sin estimular, estimulación de 5min y de 1h). En la tabla de la derecha se muestran los datos numéricos de la gráfica (media ± SEM).

En la **Figura 10** se muestran los histogramas del marcaje de TRAIL en superficie y total de ambas subpoblaciones de blastos T correspondientes a un experimento representativo.



**Figura 10.** Expresión de TRAIL en superficie y total de blastos T CD8+ analizado mediante citometría de flujo a distintos tiempos de estimulación con PHA (sin estimular, estimulación de 5min y estimulación de 1h). Histogramas correspondientes a un experimento representativo.

#### **4.4 CITOTOXIDAD DE LOS BLASTOS T Y DE SUS SOBRENADANTES.**

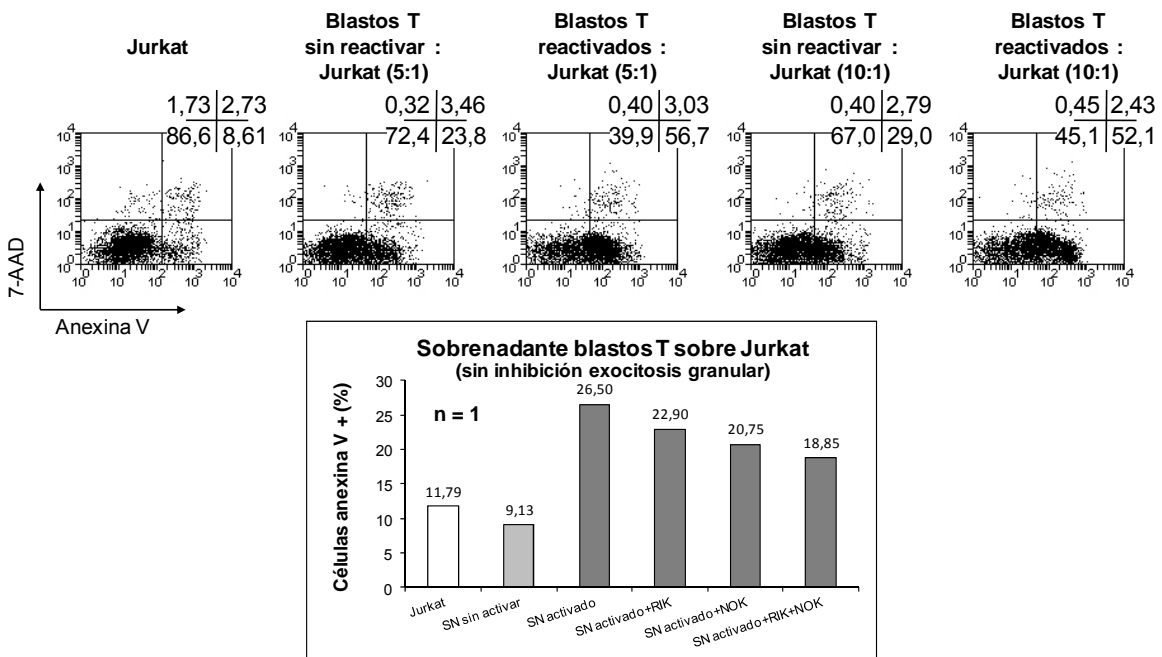
Se analizó la capacidad citotóxica de los blastos totales reestimulados con PMA e inomicina frente a células diana (línea celular Jurkat) inhibiendo y sin inhibir los mecanismos de exocitosis granular y secreción de ligandos mortales asociados a exosomas.

Además, los sobrenadantes derivados de la reestimulación de blastos fueron recolectados y se enfrentaron ante la misma línea celular para evaluar también su capacidad citotóxica.

**4.4.1 Citotoxicidad de los blastos T sin inhibir la exocitosis granular y la secreción de ligandos mortales (FasL y TRAIL) asociados a exosomas.**

**4.4.1.1 Citotoxicidad de los blastos T**

Cuando no se inhibe la exocitosis granular ni la secreción de ligandos mortales asociados a exosomas se observa que, tanto los blastos no reactivados como reactivados son capaces de inducir la muerte de las células Jurkat, aunque la reactivación con PMA e ionomicina aumenta la capacidad citotóxica de los blastos T siendo el porcentaje de células diana muertas AnnV positivas aproximadamente del doble cuando éstas se enfrentan a blastos T reactivados (**Figura 11**).



**Figura 31.** Efecto citotóxico de los blastos T frente a la línea celular Jurkat analizado mediante citometría de flujo sin inhibir la exocitosis granular (perforina y granzimas) y la secreción de ligandos mortales asociados a exosomas (arriba). Citotoxicidad del sobrenadante de los blastos T en células Jurkat medido en porcentaje de células Ann-V positivas (abajo). Los blastos T no fueron reestimulados (sin activar) o bien se reestimularon durante 2h con PMA e ionomicina (activados). Por una parte se analizó la capacidad citotóxica de los blastos frente a las células diana (Jurkat) una vez han sido secretados los ligandos mortales asociados a exosomas. Por otra parte se analizó el potencial citotóxico del sobrenadante en el que se encontraban los ligandos mortales asociados a exosomas. RIK (RIK2, anti-TRAIL); NOK (NOK1, anti-FasL).

#### **4.4.1.2 Citotoxicidad del sobrenadante de los blastos T**

Los datos se muestran como “citotoxicidad específica del sobrenadante activado”, valor calculado a partir de la resta del porcentaje de células anexinas positivas del sobrenadante procedente de los blastos T reestimulados menos el porcentaje de células anexinas positivas del sobrenadante procedente de los blastos T no reestimulados.

El sobrenadante obtenido tras la reestimulación de los blastos T (sobrenadante activado) resultó ser el más citotóxico (17,37% de citotoxicidad específica).

Cuando el sobrenadante activado fue preincubado con RIK2 (anticuerpo anti-TRAIL) y NOK1 (anticuerpo anti-FasL) su capacidad citotóxica descendió (21% y un 33% respectivamente), siendo este descenso aún mayor cuando el sobrenadante se preincubó con ambos anticuerpos, llegándose en este caso a un 44% de bloqueo.

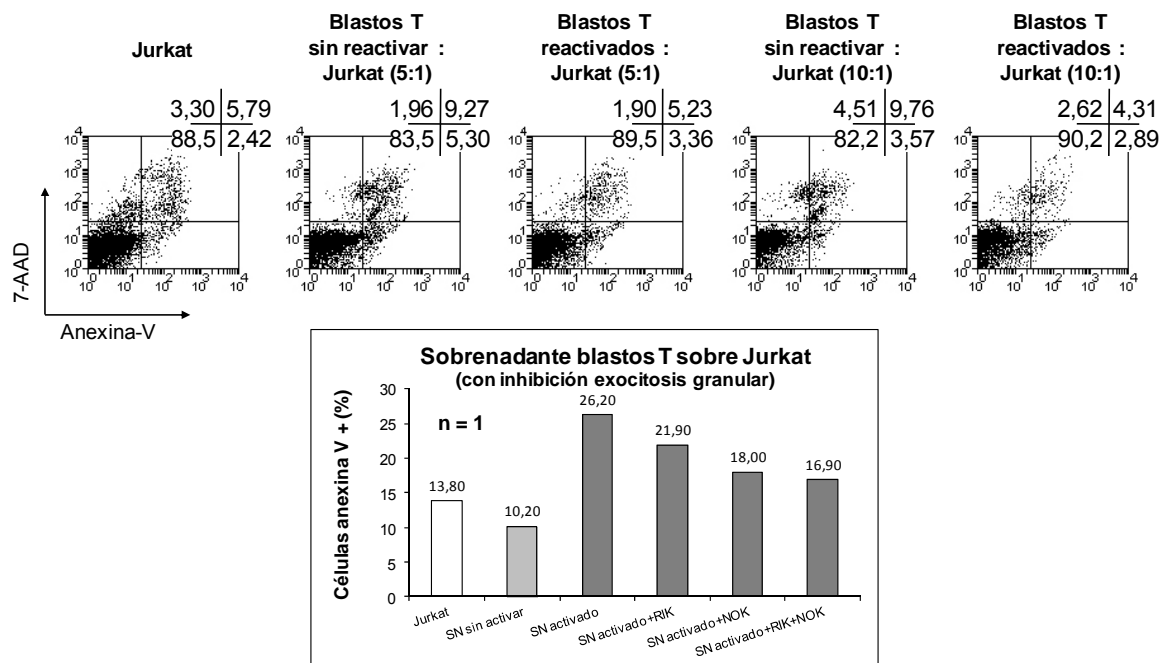
El sobrenadante procedente de blastos T sin reactivar no fue citotóxico en células Jurkat.

#### **4.4.2 Citotoxicidad de los blastos T inhibiendo la exocitosis granular y secreción de ligandos mortales asociados a exosomas.**

##### **4.4.2.1 Citotoxicidad de los blastos T**

En este caso, la muerte de las células diana (Jurkat) desciende drásticamente tanto en los blastos T no reactivados como en los blastos T reactivados con PMA e ionomicina observándose valores similares a la muerte basal de las células Jurkat (**Figura 12**).





**Figura 12.** Efecto citotóxico de los blastos T frente a la línea celular Jurkat analizado mediante citometría de flujo. Inhibición la exocitosis granular (perforina y granzimas) y la secreción de ligandos mortales asociados a exosomas (arriba). Citotoxicidad del sobrenadante de los blastos T en células Jurkat medido en porcentaje de células Ann-V positivas (abajo). Los blastos T no fueron reestimulados (sin activar) o fueron reestimulados durante 2h con PMA e ionomicina (activados). Por una parte se analizó la capacidad citotóxica de los blastos frente a las células diana (Jurkat) una vez han sido secretados los ligandos mortales asociados a exosomas e inhibiendo los mecanismos de exocitosis granular por la acción del EGTA. Por otra parte se analizó el potencial citotóxico del sobrenadante en el que se encontraban los ligandos mortales asociados a exosomas. RIK (RIK2, anti-TRAIL); NOK (NOK1, anti-FasL).

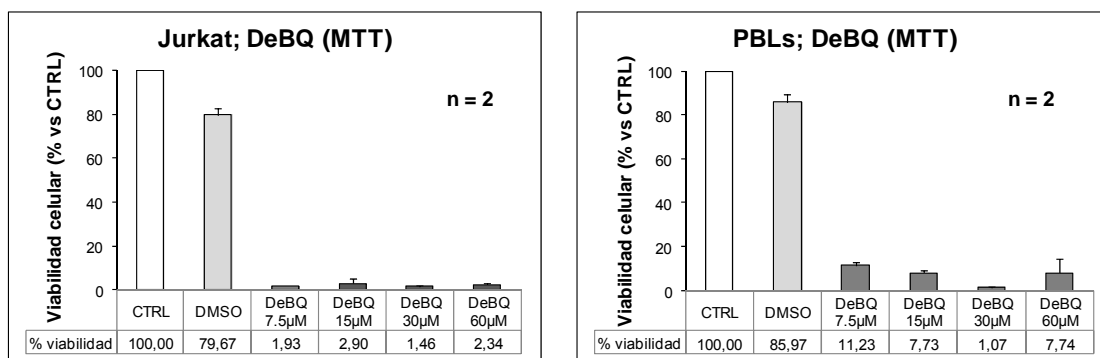
#### **4.4.2.2 Citotoxicidad del sobrenadante de los blastos T**

A pesar de la gran diferencia observada en la capacidad citotóxica de los blastos T en los que no se inhibe la exocitosis granular ni la secreción de exosomas y los que sí se inhibe, el comportamiento de los sobrenadantes obtenidos previamente, fue lógicamente similar. De nuevo, el sobrenadante derivado de la reestimulación de los blastos T (sobrenadante activado) resultó ser el más citotóxico (16% de citotoxicidad específica) y de nuevo la preincubación con los anticuerpos RIK2, NOK1 o ambos redujo la capacidad citotóxica del sobrenadante activado (bloqueo del 27%, 51% y 58% de la muerte, respectivamente). Finalmente, el sobrenadante procedente de blastos T sin reactivar no fue citotóxico en células Jurkat (**Figura 12**).

#### **4.5 ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DEL DeBQ EN JURKAT, PBLs Y BLASTOS T.**

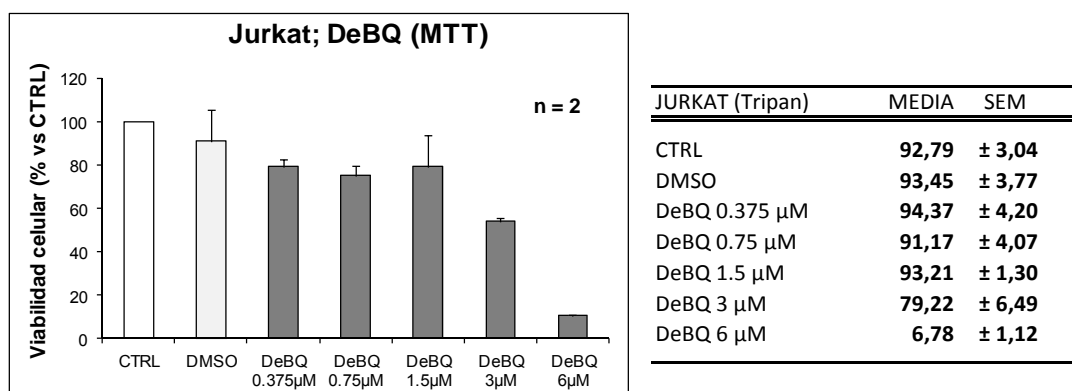
En primer lugar se analizó el potencial citotóxico del compuesto DeBQ en Jurkat, PBLs y Blastos T mediante el uso de MTT. Puesto que el DeBQ se encuentra diluido en DMSO, a los controles negativos se les añadió la concentración de DMSO equivalente a la empleada en la dosis más alta de DeBQ.

Se realizó un primer ensayo dosis-respuesta empleando un rango de concentraciones de DeBQ entre 60  $\mu\text{M}$  y 7,5  $\mu\text{M}$  (**Figura 13**). A estas dosis, la viabilidad en células Jurkat y en PBLs no superó el 2,9% y el 11,23% respectivamente. Por ello, se empleó un rango de dosis más bajas de DeBQ (entre 6  $\mu\text{M}$  y 0,375  $\mu\text{M}$ ).



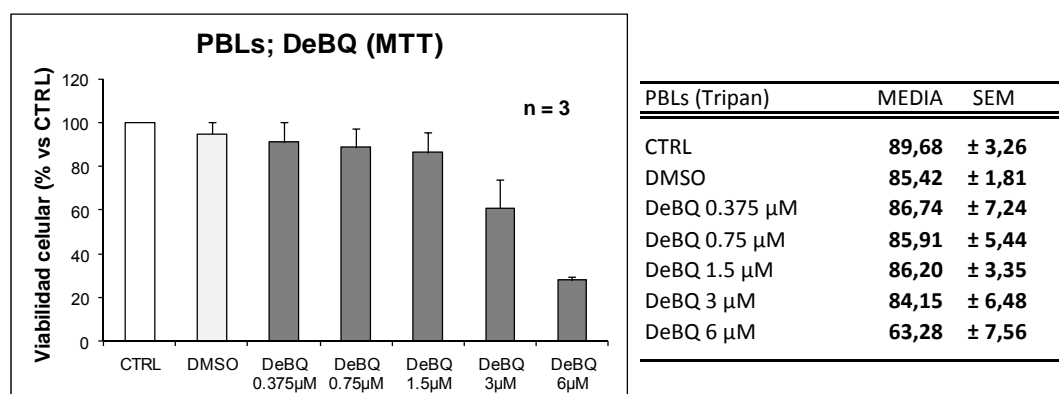
**Figura 13.** Efecto citotóxico del DeBQ sobre células Jurkat y PBLs medido mediante MTT (método de *Mossman*) Concentraciones de DeBQ entre 60  $\mu\text{M}$  y 7,5  $\mu\text{M}$ . Los resultados que se muestran son la media  $\pm$  SEM.

En células Jurkat se observó una viabilidad del 6,78% en el conteo de *Trypan* y del 10,55% en el MTT a 6  $\mu\text{M}$ , que ascendía significativamente hasta el 79,22% y el 53,82% respectivamente a partir de 3  $\mu\text{M}$ , estabilizándose en torno al 90% en el conteo de *Trypan* y en torno a un 80% en el MTT (**Figura 14**).



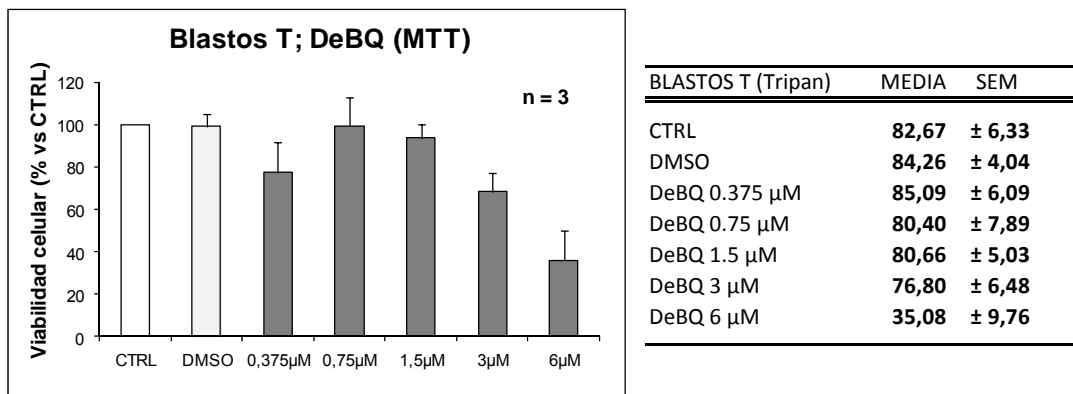
**Figura 14.** Efecto citotóxico del DeBQ sobre células Jurkat medido mediante MTT (método de *Mossman*) (izquierda) y mediante *Trypan* (derecha). Concentraciones de DeBQ entre 6 μM y 0,375 μM. Los resultados que se muestran son la media ± SEM.

En el caso de los PBLs se observa que su viabilidad es superior a la de las células Jurkat, siendo a la dosis de 6 μM del 63,28% en el conteo de *Trypan*, y del 27,88% en el MTT (**Figura 15**). En el resto de dosis, la viabilidad de los PBLs aumenta significativamente (tanto en el conteo de *Trypan* como en el MTT), al igual que en la línea celular Jurkat alcanzando el 84,15% en el conteo de *Trypan* y el 61,04% en el MTT en la dosis de 3 μM, estabilizándose en torno al 85% en el conteo de *Trypan* y en un 90% en el MTT (**Figura 15**).



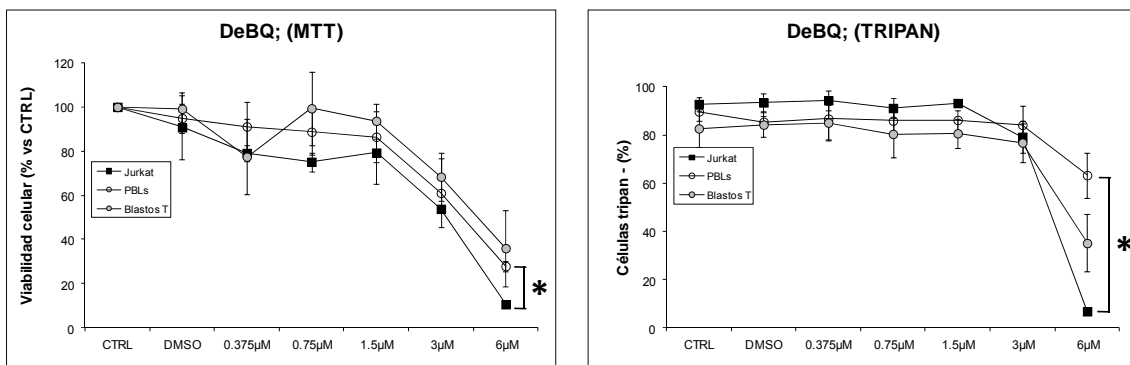
**Figura 15.** Efecto citotóxico del DeBQ sobre PBLs medido mediante MTT (método de *Mossman*) (izquierda) y mediante *Trypan* (derecha). Concentraciones de DeBQ entre 6 μM y 0,375 μM. Los resultados que se muestran son la media ± SEM.

En el caso de los blastos T, los valores de viabilidad mostraron un valor intermedio entre los encontrados en las células Jurkat y los PBLs (**Figura 16**). El porcentaje de viabilidad de los blastos T a la dosis de DeBQ de 6  $\mu\text{M}$  fue del 35,80% en el conteaje de *Trypan* y del 35,99% en el MTT. En la dosis de 3  $\mu\text{M}$  la viabilidad asciende al 76,80% en el conteaje de *Trypan* y al 68,39% en el MTT. En el resto de dosis, la viabilidad oscila entre un 80-85% en el conteaje de *Trypan* y entre un 80-90% en el MTT.



**Figura 16.** Efecto citotóxico del DeBQ sobre blastos T medido mediante MTT (método de *Mossman*) (izquierda) y mediante *Trypan* (derecha). Concentraciones de DeBQ entre 6  $\mu\text{M}$  y 0,375  $\mu\text{M}$ . Los resultados que se muestran son la media  $\pm$  SEM.

En la **Figura 17** se resumen los resultados de viabilidad obtenidos en el conteaje de *Trypan* y en el MTT de los distintos tipos celulares observándose una diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad observada en Jurkat y PBLs a la dosis de 6  $\mu\text{M}$  (tanto en el conteaje de *Trypan* como en el MTT).

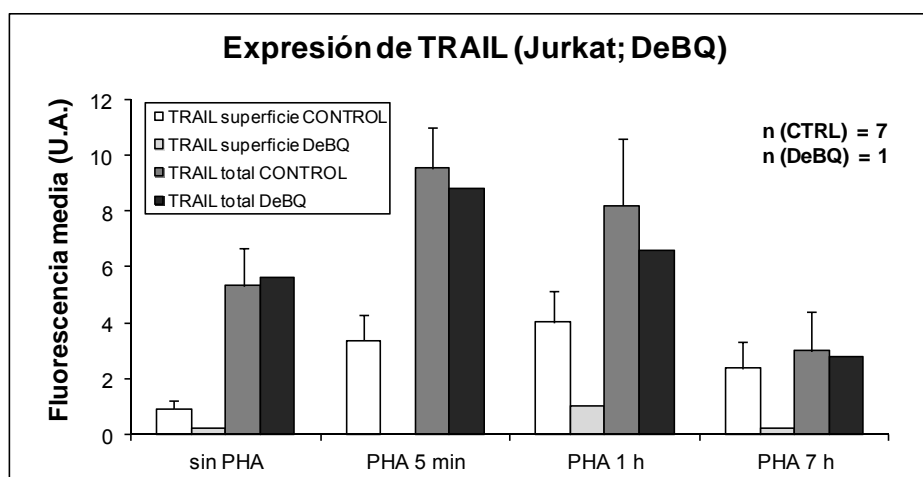


**Figura 17.** Resumen de los resultados de viabilidad en Jurkat, PBLs y blastos T mediante MTT (izquierda) y *Trypan* (derecha). Los resultados que se muestran son la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRAIL EN CÉLULAS JURKAT Y EN BLASTOS T PRETRATADOS CON UNA DOSIS SUBTÓXICA DE DEBQ.

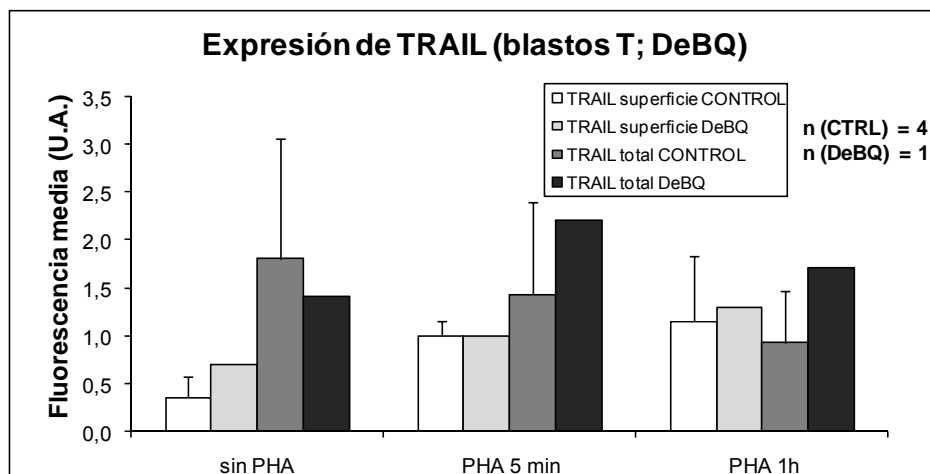
Tras realizar los ensayos dosis-respuesta con DeBQ en los distintos tipos celulares, se eligió la dosis de 3  $\mu$ M para analizar la expresión de TRAIL en la línea celular Jurkat y en blastos T.

En el caso de las células Jurkat (**Figura 18**), se observó que en las células pretratadas con DeBQ el nivel de expresión de TRAIL en superficie fue prácticamente nulo, con tan solo un discreto incremento cuando se estimularon durante 1h con PHA. En cambio, la expresión de TRAIL total siguió el mismo patrón que las células Jurkat sin tratar con DeBQ.



**Figura 18.** Gráfica que representa el promedio de expresión de TRAIL en superficie y la expresión de TRAIL total en células Jurkat sin pretratar con DeBQ y pretratadas con DeBQ a una dosis subtóxica de 3 $\mu$ M durante 14 horas y estimuladas a distintos tiempos con PHA (sin estimular, estimulación de 5min, de 1h y de 7h).

En el caso de los blastos T (**Figura 19**), no se observaron grandes diferencias entre las células sin tratar y pretratadas con DeBQ tanto en la expresión en superficie, como en la expresión total de TRAIL.



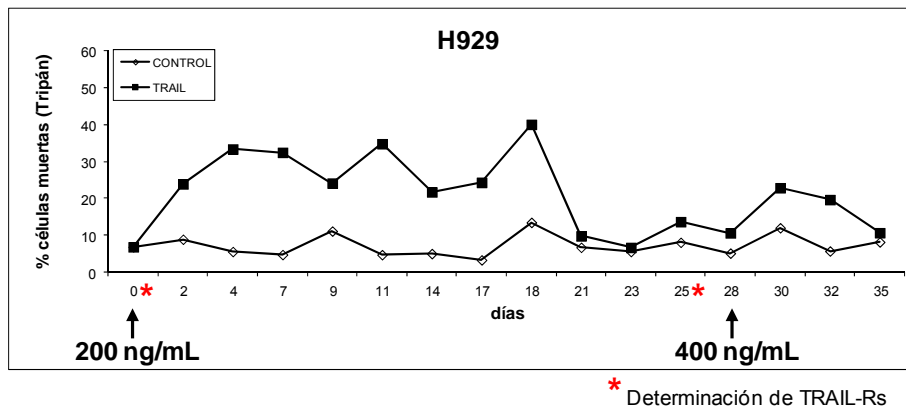
**Figura 19.** Gráfica que representa el promedio de expresión de TRAIL en superficie y la expresión de TRAIL total en blastos T sin pretratar con DeBQ y pretratados con DeBQ a una dosis subtóxica de  $3\mu\text{M}$  durante 14 horas y estimulados a distintos tiempos con PHA (sin estimular, estimulación de 5min y estimulación de 1h).

#### **4.7 GENERACIÓN DE SUBLÍNEAS RESISTENTES A TRAIL**

Se han comenzado a generar líneas celulares de estirpe hematológica resistentes a este ligando mortal para analizar cuáles son los mecanismos de resistencia a TRAIL. Se han generado 2 sublíneas celulares procedentes de las líneas MM1S y H929 (ambas procedentes de un mieloma múltiple) más resistentes a TRAIL que las líneas parentales tras el cultivo de ambas en presencia constante de TRAIL en el medio de cultivo.

##### **4.7.1 Sublínea celular H929 resistente a TRAIL.**

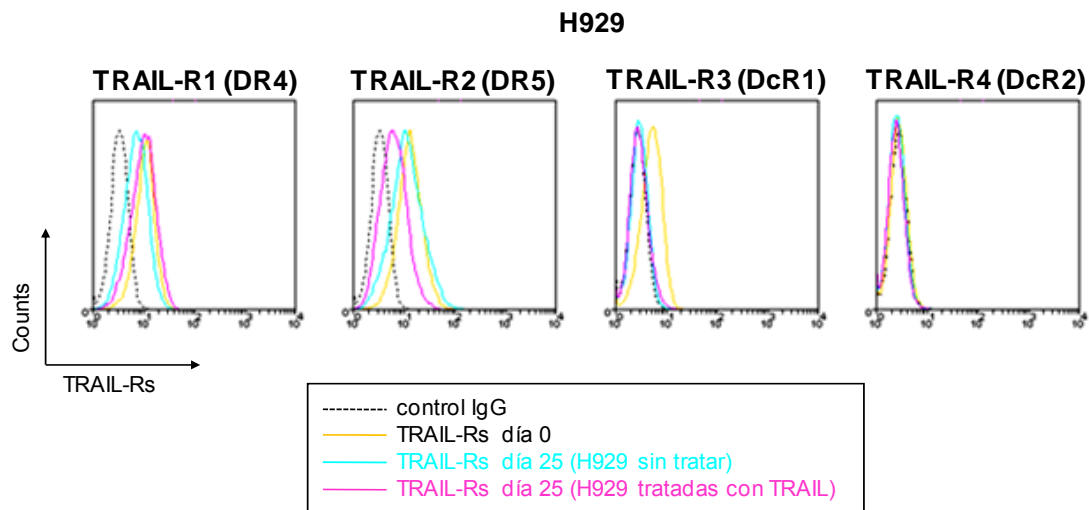
El tratamiento de la línea H929 comenzó con una dosis de 200 ng/mL alcanzándose unos niveles de muerte basal similar a la línea parental pasados 21 días. Tras 1 semana de resistencia a esta dosis, se duplicó a 400 ng/mL. La sublínea generada resultó ser parcialmente resistente a esta nueva dosis de TRAIL, mostrando una mortalidad en torno a un 20% el primer día de incubación con la dosis de 400 ng/mL (Figura 20).



**Figura 20.** Porcentaje de celular muertas determinado por *Trypan* de la sublínea H929 según el día de tratamiento con TRAIL (día 0: dosis de 200ng/mL; día 28: dosis 400ng/mL).

Para analizar los mecanismos de resistencia a TRAIL en la sublínea generada, se comenzó cuantificando los niveles de expresión de DR4 y DR5 (receptores pro-apoptóticos de TRAIL) y, DcR1 y DcR2 (receptores señuelo de TRAIL) mediante citometría de flujo (**Figura 21**).

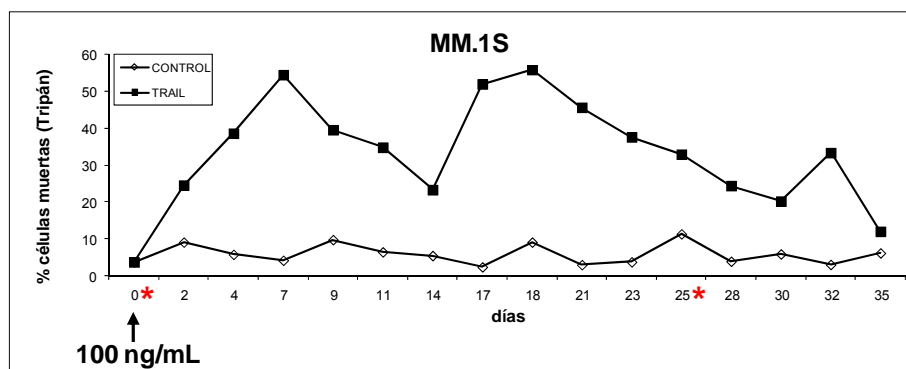
Los resultados obtenidos muestran una marcada disminución de los niveles de DR5 en la sublínea H929 resistente a TRAIL a día 25, en comparación a los de la línea parental H929. El receptor DR4 parece disminuir su expresión de manera discreta en la línea parental a día 25 respecto a la sublínea resistente. El receptor DcR1 disminuye su expresión a día 25 tanto en la línea parental como en la sublínea resistente mientras que la expresión de DcR2 no varía en ninguno de los casos.



**Figura 21.** Expresión de los receptores TRAIL (proapoptóticos: DR4 y DR5; receptores señuelo: DcR1 y DcR2) en la línea parental H929 a día 0, línea parental a día 25 (células sin tratar) y en la sublínea H929 resistente a TRAIL a día 25, analizado mediante citometría de flujo.

#### 4.7.2 Sublínea celular MM1S resistente a TRAIL.

En el caso de la línea MM1S, el tratamiento comenzó con una dosis de 100 ng/mL ya que mostraba una mayor sensibilidad a TRAIL que la línea celular H929. En este caso, a pesar de observarse un descenso paulatino de la sensibilidad a TRAIL no se alcanzó una resistencia total a dicha dosis (**Figura 22**).

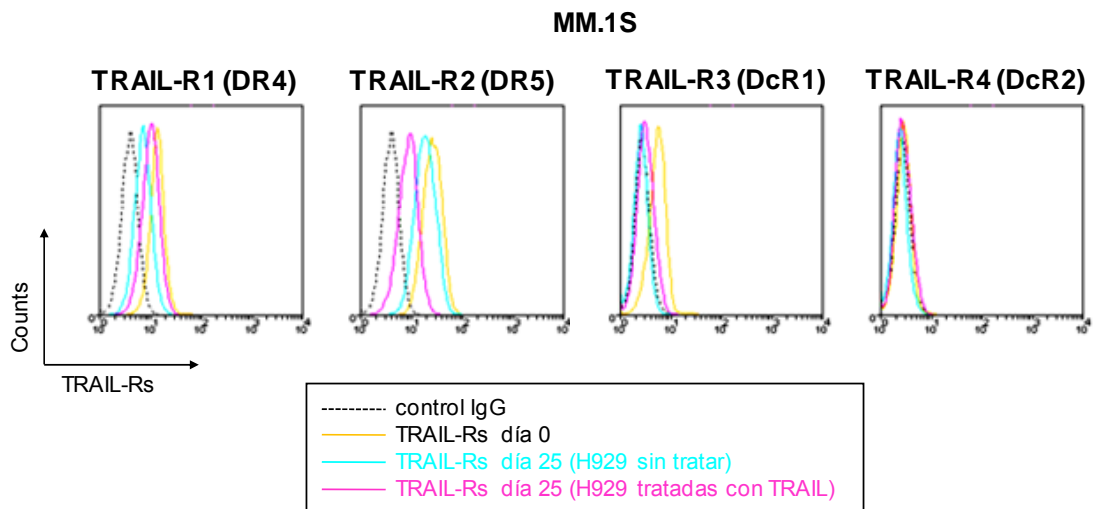


\* Determinación de TRAIL-Rs

**Figura 22.** Porcentaje de celular muertas determinado por *Trypan* de la sublínea MM1S según el día de tratamiento con TRAIL (día 0: dosis de 100ng/mL).



Los resultados en el análisis de la expresión de los distintos receptores de TRAIL obtenidos mediante citometría de flujo, siguieron un patrón similar al obtenido en la sublínea H929 observándose una disminución considerable de los niveles de DR5 en la sublínea resistente a TRAIL, en comparación con los de la línea parental a día 25, una discreta disminución de la expresión del receptor DR4 en la línea parental respecto a la sublínea resistente y una disminución de DcR1 tanto en la línea parental como en la sublínea resistente (**Figura 23**).



**Figura 23.** Expresión de los receptores TRAIL (proapoptóticos: DR4 y DR5; receptores señuelo: DcR1 y DcR2) en la línea parental MM1S a día 0, línea parental a día 25 (células sin tratar) y en la sublínea MM1S resistente a TRAIL a día 25, analizado mediante citometría de flujo.

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han estudiado distintos aspectos de la expresión y secreción del ligando mortal TRAIL en células hematológicas humanas. Se ha estudiado el patrón de expresión de TRAIL en condiciones basales y tras la estimulación con PHA a distintos tiempos tras los cuales, la PHA se eliminó y transcurrida 1 hora, se realizó el análisis de la expresión de TRAIL. Para ello, se han empleado células tumorales como es el caso de la línea celular tumoral Jurkat así como células normales como son los blastos T obtenidos a partir de linfocitos de sangre periférica de donantes sanos.

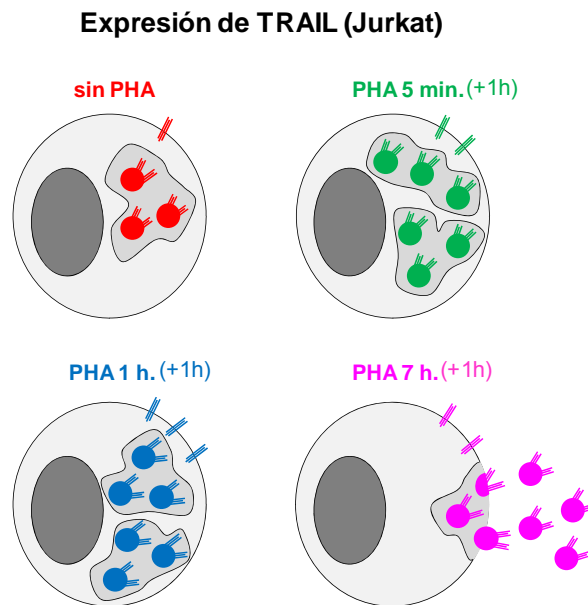
En lo referente a la expresión de TRAIL, se ha analizado la expresión diferencial de este ligando en la superficie de la célula y en el interior de la misma mediante citometría de flujo. En las células Jurkat, la expresión basal de TRAIL es sobre todo intracelular ya que la mayor parte de la fluorescencia específica se observa en el marcaje total (TRAIL total = extracelular + intracelular) mientras que apenas se observa fluorescencia específica en el marcaje de superficie. Además, se ha observado una relación directa entre la estimulación con PHA y el aumento en la expresión de TRAIL. Este aumento de la expresión es rápido en el tiempo ya que se observa tras 5 minutos de estimulación y mantenido (apenas disminuye si la estimulación es de 1 hora), y es principalmente a expensas de un aumento de la expresión intracelular.

Al tratarse de una línea tumoral, las células Jurkat se comportan como linfocitos T ya activados (blastos T) por eso no es necesaria una reestimulación de estas células para ver cambios en los niveles de expresión de TRAIL.

Cuando la estimulación con PHA se lleva a cabo durante un tiempo más prolongado (7 horas en este caso), TRAIL intracelular se pierde pero en cambio TRAIL de superficie permanece, y su nivel de expresión es mayor que en el estado basal. Como ya se ha mencionado, las células Jurkat apenas expresan TRAIL en superficie en condiciones basales, pero cuando son estimuladas con PHA, los niveles de TRAIL en superficie aumentan permaneciendo más o menos constantes en el tiempo.

En estudios previos realizados por nuestro grupo se observó mediante *Western blot* que la expresión de TRAIL en células Jurkat descendía en pequeña proporción tras 1 hora y sobre todo se producía un marcado descenso tras 7 horas de estimulación con PHA sugiriendo que TRAIL era secretado al medio junto a FasL por estas células tras su estimulación (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998, Monleon *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se ha analizado además la expresión de TRAIL tras 5 minutos de estimulación con PHA y los datos obtenidos mediante citometría de flujo están de acuerdo con los obtenidos anteriormente sugiriendo también que TRAIL es sintetizado *de novo* tras la estimulación con PHA para ser posteriormente secretado (Figura 24).



**Figura 24.** Modelo propuesto de la expresión de TRAIL en la línea celular tumoral Jurkat a distintos tiempos de estimulación con PHA (sin estimulación, 5min, 1 hora y 7h de estimulación) Tras los tiempos de estimulación indicados, la PHA se eliminó lavando las células 3 veces con PBS. Transcurrido 1 hora, se analizó la expresión de TRAIL mediante citometría de flujo.

También se ha analizado la expresión de TRAIL en células hematológicas sanas, PBLs y blastos T. Los PBLs recién aislados de sangre periférica no expresan TRAIL ni a nivel extracelular ni intracelular y no se produce ningún aumento tras la estimulación con PHA durante 5 minutos. Sólo en los blastos T generados a partir de los PBLs se observa un claro incremento de expresión de TRAIL siendo éste casi exclusivamente a expensas de una expresión intracelular. Está descrito que los linfocitos T *naive* no expresan TRAIL

(Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998; Jeremias *et al.*, 1998) y que el aumento en la expresión de TRAIL solo se produce tras activar la célula T (Ehrlich *et al.*, 2003; Kayagaki *et al.*, 1999; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1998).

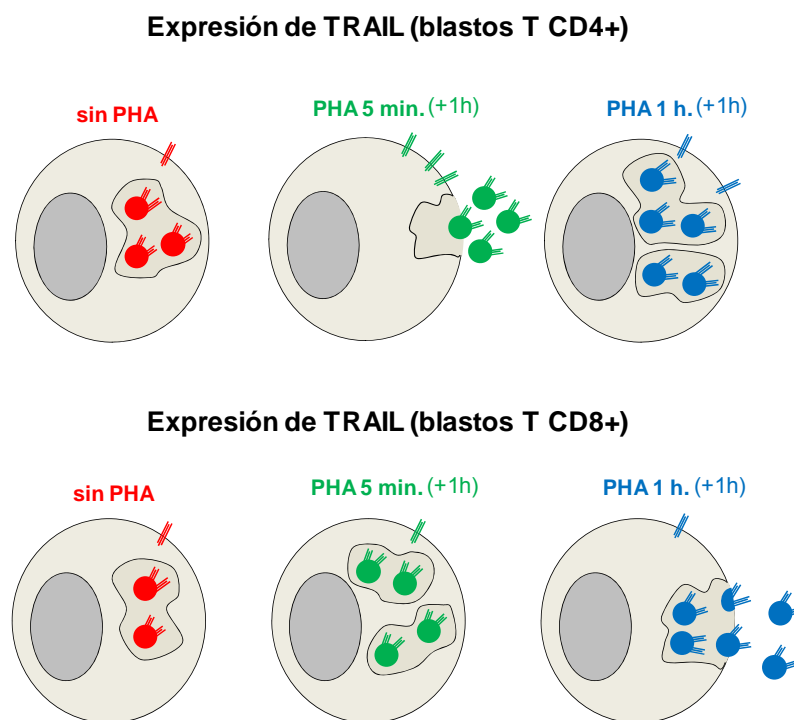
Los datos obtenidos mediante citometría de flujo en el presente trabajo están en consonancia con lo descrito previamente. A diferencia de lo observado en células Jurkat, en los blastos T apenas se observa un incremento de la expresión de TRAIL tras la reestimulación con PHA durante 5 minutos.

También se ha analizado la expresión de TRAIL en las dos principales subpoblaciones de blastos T, CD4+ y CD8+. El comportamiento de los blastos T CD4+ fue distinto al obtenido en las células Jurkat, pese a que éstas son linfocitos T tumorales CD4+. Mientras que los niveles de TRAIL en superficie siguieron un patrón similar al de las células Jurkat, los niveles de TRAIL intracelular tras 5 minutos de estimulación son prácticamente nulos ya que el valor de TRAIL total correspondería casi íntegramente al de superficie siendo el valor máximo de expresión de TRAIL extracelular registrado en los blastos T CD4+. Cuando los blastos T CD4+ se reestiman durante una hora, los niveles de TRAIL, fundamentalmente intracelular, vuelven a aumentar lo que sugiere una síntesis *de novo* de TRAIL.

En el caso de los blastos T CD8+, el nivel de expresión basal fue inferior al de los blastos T CD4+. Apenas se observó expresión de TRAIL en superficie. En cambio, a nivel intracelular se observó un comportamiento similar al observado previamente en células Jurkat, aunque en este caso con una cinética más rápida ya que el descenso de TRAIL intracelular se produce ya tras 1 hora de estimulación con PHA.

En resumen, a pesar de la variabilidad observada en los experimentos realizados con los blastos T, se puede observar un diferente comportamiento entre las subpoblaciones CD4+ y CD8+. Los datos obtenidos sugieren que en los blastos T CD4+ se produce un aumento de la expresión de TRAIL fundamentalmente extracelular seguida de una síntesis *de novo* de TRAIL intracelular. En cambio en los blastos T CD8+ se produce una síntesis *de novo* intracelular rápida tras la estimulación con PHA para luego ser también rápidamente secretado (**Figura 25**). Estas diferencias observadas entre ambas

subpoblaciones podrían reflejar su diferente función en la respuesta inmune fisiológica. Los linfocitos T CD4+, ejercen una función fundamentalmente colaboradora y de regulación de la respuesta inmune (usando para ello entre otros mecanismos la secreción de ligandos mortales como TRAIL), mientras que los linfocitos T CD8+ ejercen una función fundamentalmente citotóxica, entre cuyos mecanismos efectores se encuentra la secreción de ligandos mortales como TRAIL. Por ello, resulta lógico que mientras los blastos T CD4+ requieren una secreción rápida y una síntesis más prolongada de TRAIL como uno de sus mecanismos reguladores en órganos linfoides secundarios, en el caso de los blastos T CD8+ esta síntesis parece más rápida pero su secreción debe ser más lenta ya que TRAIL será empleado en fases posteriores como mecanismo citotóxico en el punto de infección (Anel *et al.*, 2007).



**Figura 25.** Modelo propuesto de la expresión de TRAIL en blastos T CD4+ y blastos T CD8+ a distintos tiempos de estimulación con PHA (sin estimulación, 5min, 1 hora y 7h de estimulación) Tras los tiempos de estimulación indicados, la PHA se eliminó lavando las células 3 veces con PBS. Trascurrido 1 hora, se analizó la expresión de TRAIL mediante citometría de flujo.

Para profundizar en el estudio de la secreción de TRAIL en blastos T, se han realizado ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular tumoral Jurkat empleando tanto

los propios blastos T como los sobrenadantes obtenidos a partir de ellos tras la reactivación con PMA e ionomicina.

Los datos obtenidos corroboran que el principal mecanismo citotóxico de los blastos T es el de la exocitosis granular (sistema de perforina y granzimas) y que este mecanismo se incrementa tras la reactivación de los blastos T. Cuando la exocitosis granular se ve inhibida por la acción de EGTA, la muerte de las células diana (Jurkat) prácticamente no aumenta respecto a la muerte de basal, indicando que los ligandos mortales de superficie (FasL y TRAIL) apenas intervienen en la actividad citotóxica ejercida directamente por los blastos T, debido sobre todo a que la mayor parte de los ligandos mortales han sido secretados al exterior previamente asociados a exosomas.

Como se ha descrito previamente, la reactivación de los blastos T (fundamentalmente los blastos T CD8+) conlleva la secreción de ligandos mortales como TRAIL. Cuando se analiza la capacidad citotóxica de los sobrenadantes obtenidos a partir de los blastos T reactivados se observa que éstos presentan actividad citotóxica frente a las células Jurkat. Además, no hubo diferencias entre la toxicidad del sobrenadante de los blastos T en presencia o ausencia de EGTA ya que los sobrenadantes se habían recogido tras la activación y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Para determinar el papel relativo que ejerce cada uno de los ligandos mortales (FasL y TRAIL) se preincubaron los sobrenadantes con anticuerpos bloqueantes de ambos ligandos. Se observó que ambos ligandos intervienen en la actividad citotóxica de los sobrenadantes dado que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo preincubando el sobrenadante con ambos anticuerpos bloqueantes, pero que el que mayor citotoxicidad ejercía sobre las células Jurkat fue FasL.

El compuesto DeBQ se ha descrito que entre otros efectos, es capaz de inhibir la proteína VCP (*valosin-containing protein*), una ATPasa implicada en el tráfico vesicular (Ye *et al.*, 2001), entre otras funciones. Además, se ha descrito que DeBQ (inhibidor específico de VCP) tiene un efecto citotóxico sobre tumores (Chou *et al.*, 2011). En el presente trabajo se han realizado ensayos dosis-respuesta para analizar la capacidad citotóxica que ejerce el DeBQ sobre células Jurkat, PBLs y blastos T con el objetivo de

encontrar una dosis subtóxica para analizar posteriormente la capacidad del DeBQ de interferir en los mecanismos de liberación de exosomas.

En lo referente a la capacidad citotóxica del DeBQ, se observa que a la dosis de 6  $\mu$ M el efecto es estadísticamente mayor en la línea tumoral Jurkat que sobre los PBLs.

Se ha descrito que la proteína VCP está implicada en la progresión en determinados tipos de cáncer (Yamamoto *et al.*, 2003) de modo que es posible que la inhibición de esta proteína por el DeBQ afecte de manera diferencial a las células tumorales. La muerte inducida por el DeBQ debería estar asociada con apoptosis por estrés en el retículo endoplasmático aunque esto no está demostrado experimentalmente.

En cuanto al efecto del DeBQ en los mecanismos de secreción de exosomas, se observó que el pretratamiento de las células Jurkat con DeBQ no modificó la expresión total de TRAIL. Sin embargo, la expresión extracelular de TRAIL fue prácticamente inexistente, lo que sugiere que, mientras la capacidad de síntesis de TRAIL intracelular no se vio afectada, la exposición de TRAIL en superficie procedente de la fusión del cuerpo multivesicular, con la membrana externa no se estaría produciendo en las células Jurkat (Bossi & Griffiths, 1999; Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999). Por otra parte, la disminución en los niveles de TRAIL intracelular conforme aumenta el tiempo de estimulación puede ser debido a mecanismos de degradación celular o bien a que la secreción de exosomas de TRAIL no se ve afectada.

Sin embargo, en los blastos T no se puede afirmar que se esté produciendo una inhibición de la secreción ya que tras una hora de estimulación con PHA, seguida de una hora de incubación sin PHA, el nivel de expresión de TRAIL intracelular vuelve a disminuir a expensas del TRAIL de superficie, el cual aumenta ligeramente. Estos datos muestran un efecto diferencial de la inhibición de VCP entre las células tumorales y los blastos T normales, dando validez fisiológica a lo observado en el análisis proteómico descrito.

Finalmente, para estudiar los mecanismos apoptóticos inducidos por TRAIL, se han comenzado a generar líneas celulares de estirpe hematológica resistentes a este ligando mortal para analizar cuáles son los mecanismos de resistencia a TRAIL. En las dos sublíneas generadas a partir de las líneas provenientes de mieloma múltiple, H929 y MM1S. Se ha observado que el receptor pro-apoptótico DR5 disminuye respecto a ambas líneas parentales mientras que el receptor pro-apoptótico DR4 no varía su expresión en las sublíneas resistentes. Se ha descrito que DR5 es, de los dos receptores pro-apoptóticos, es el que trasmite más eficientemente la señal apoptótica (Gomez-Benito *et al.*, 2007). En este sentido, los datos parecen indicar que las células H929 y MM1S en respuesta a la presencia continua de TRAIL reducen la expresión del principal receptor capaz de inducir su muerte mientras que mantienen la expresión del receptor con menor capacidad pro-apoptótica.



## 6. CONCLUSIONES.

A la vista de los resultados expuestos, las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. Existen diferencias entre los patrones de expresión de TRAIL, en superficie o intracelular, entre la línea hematológica tumoral Jurkat y linfocitos T activados (blastos T) provenientes de donantes sanos así como entre las subpoblaciones de blastos T CD4+ y CD8+.
2. El mecanismo citotóxico directo principal de los blastos T es el de la exocitosis granular sin apenas contribución de los ligandos mortales de superficie.
3. La contribución principal de los ligandos mortales a la citotoxicidad de los blastos T se realiza a través de su secreción asociada a exosomas. Dentro de los ligandos mortales secretados, el más citotóxico es FasL.
4. El inhibidor de VCP DeBQ es más tóxico sobre la leucemia Jurkat que sobre los linfocitos normales a determinadas concentraciones.
5. El compuesto DeBQ a una dosis subtóxica es capaz de inhibir la expresión de TRAIL en superficie en la línea celular tumoral Jurkat pero no en blastos T.
6. Uno de los mecanismos de resistencia generados ante TRAIL en las líneas celulares de mieloma MM1S y H929 es la disminución de los niveles de DR5 en su superficie celular.

## 7. REFERENCIAS.

Alley, M.C, *et al.* (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48(3): 589-601.

Anel, A. *et al.* (2007). Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Frontiers in Bioscience* 12: 2074-2084.

Anel, A. and Martinez-Lostao, L. (2011). APO2L/TRAIL: new insights in the treatment of autoimmune disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 5: 184–99.

Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with proapoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov.* 7: 1001-1012.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281 (5381): 1305-1308.

Ashkenazi, A. *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104: 155-62.

Bao, Q. and Shi, Y. (2006). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 14(1):56-65

Bosque, A. (2005) *Mecanismos de regulación de la activación de los linfocitos T humanos*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias

Bosque, A. *et al.* (2005). Human CD8+ T cell blasts are more sensitive than CD4+ T cell blasts to regulation by APO2L/TRAIL. *Eur. J. Immunol.* 35: 1812-1821.

Bossi, G. and Griffiths, G.M. (1999). Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nature Medicine* 5: 90-96.

Chou, T-F. *et al.* (2011). Reversible inhibitor of p97, DeBQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *PNAS* 108, 4834–4839.

Chowdhury, I. *et al.* (2006). Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cellular & Molecular Biology Letters* 11(4): 506-525.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326(1): 1-16.

Cory, S. and Adams, J.M. (2002). The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2(9): 647-656.

Cretney, E. *et al.* (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J. Immunol.* 168:1356-1361.

Del-Rey, M. *et al.* (2006). A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 108: 1306-1312.

Dhein, J. *et al.* (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1(Fas/CD95). *Nature* 373: 438-41.

Ehrlich, S. *et al.* (2003) Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24: 244-53.

Emery, J.G. *et al.* (1998). Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 273(23): 14363-14367.

Falschlehner, C. *et al.* (2007). TRAIL signalling: Decisions between life and death. *Int. J Biochem. Cell. Biol.* 39: 1462-75.

Gomez-Benito, M. *et al.* (2007). Membrane expresión of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Experimental Cell Research* 313(11): 2378-2388.

Gonzalvez, F. and Ashkenazi, A. (2010). New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29: 4752-65.

Hymowitz, S.G. *et al.* (1999). Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a complex with Death Receptor 5. *Molecular Cell* 4(4): 563-571.

Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2: 277-288

Irmeler, M. *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638): 190-195.

Janssen, E.M. *et al.* (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434: 88-93.

Jeremias, I. *et al.* (1998). TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 143-152.

Jonhstone, R.W. *et al.* (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2008, 8:782-798.

Kayagaki, N. *et al.* (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 182: 1777-1783.

Kayagaki, N. *et al.* (1999). Expression and function of TNF-related apoptosis inducing ligand on murine activated NK cells. *J. Immunol.* 163: 906-13.

Kischkel, *et al.* (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14(22): 5579–5588.

Kischkel, F.C. *et al.* (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem.* 276: 46639-46.

Lamhamedi-Cherradi, S.E. *et al.* (2003). Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes* 52: 2274-2278.

Li, H. *et al.* (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94(4): 491-501.

Luo, X. *et al.* (1998). Bid, a Bcl-2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 94(4): 481-490.

Mariani, S.M. and Krammer, P. H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* 28: 973–982.

Marsters, S.A. *et al.* (1996). Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr. Biol.* 6: 750-752.

Martinez-Lorenzo, M. J. *et al.* (1996). Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells. *Immunology* 89: 511-517.

Martinez-Lorenzo, M. J. *et al.* (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* 28: 2714-2725.

Martinez-Lorenzo, M. J. *et al.* (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163: 1274-1281.

Martinez-Lostao L. *et al.* (2012). Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochemical Pharmacology* 83:1475–1483. *Med.* 183: 1161-1172.

Mirandola, P. *et al.* (2004). Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 104: 2418-2424.

Mischeau, O. *et al.* (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 277: 45162-71.

Mitsiades, N. *et al.* (1998). Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *Am. J. Pathol.* 153: 1947–1956.

Monleon, I. *et al.* (2000). CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 1078–1087.

Monleon, I. *et al.* (2001). Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 167: 6736-6744.

Neuwald, A.F. *et al.* (1999). AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9: 27–43.

Peter, M.E. *et al.* (1997). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* 27: 1207-1212.

Pitti, R. M. *et al.* (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271 (22): 12687-12690.

Powell, W. C. *et al.* (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* 9: 1441–1447.

Raposo, G. *et al.* (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Scaffidi, C. et al.* (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17(6): 1675-1687.

Schneider, P. *et al.* (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 187: 1205–1213.

Schoenbarger, S.P. *et al.* (2011). TRAIL and method of modulating T cell active and adaptative immune responses using TRAIL. *US20110038855*.

Sprick, M.R. *et al.* (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21: 4520-4530.

Stoorvogel, W. *et al.* (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3: 321- 330.

Tanaka, M. *et al.* (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.*, 4: 31–36, 1998.

Wending, U. *et al.* (2000) Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *Cell Death Differ* 7: 637-44.

Wiley, S.R. *et al.* (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3(6): 673-682.

Yamamoto, S. *et al.* (2003). Expression Level of Valosin-Containing Protein Is Strongly Associated With Progression and Prognosis of Gastric Carcinoma. *J. of Clin. Oncology* 21: 2537-2544.

Yang *et al.* (2010). Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. *Current Opinion in Cell Biology* 22:837–844.

Ye, Y. *et al.* (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414:652–656.

Zitvogel, L. *et al.* (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4: 594-600.