

Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Trabajo de Fin de Grado Biotecnología



Universidad Zaragoza

Expresión y purificación de granzima A de ratón en *Pichia pastoris* y análisis de su acción pro-inflamatoria sobre macrófagos.

Dirigido por

Dr. Julián Pardo Jimeno.

Dr. Maykel Alberto Arias Cabrero.

Memoria presentada por

Ana Cobos Gálvez

Septiembre 2017

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción/Antecedentes	2
2.1 El sistema inmunológico	2
2.2 Células citotóxicas	2
2.2.1 Células NK	2
2.2.2 Linfocitos T citotóxicos	2
2.2.3 Mecanismos de citotoxicidad de las células efectoras	3
2.3 Exocitosis granular	3
2.3.1 Perforina	4
2.3.2 Granzimas	4
2.3.2.1 Granzima B	4
2.3.2.2 Granzima A	5
2.3.2.3 Otras granzimas con propiedades proinflamatorias	5
2.4 Activación canónica y no canónica del inflammasoma	6
3. Objetivos	8
4. Materiales y métodos	9
4.1 Cepas de <i>Pichia pastoris</i> y condiciones de cultivo	9
4.1.1 Medios de cultivo de la cepa de levadura	10
4.1.2 Almacenamiento de las levaduras	10
4.1.3 Sobreexpresión de <i>gzmA</i> en <i>P. pastoris</i>	10
4.1.4 Purificación de <i>gzmA</i> de ratón	10
4.2 Cultivos celulares	11
4.2.1 Generación de sobrenadantes de células X-63Ag8653	11
4.2.2 Diferenciación de macrófagos derivados de la médula ósea con GM-CSF (GM-BMDM).	11
4.2.3 Inflamación inducida por granzima A en GM-BMDM	12
4.3 Análisis de proteínas	12
4.3.1 Análisis de proteínas de la superficie celular de macrófagos por citometría de flujo	12
4.3.2 Cuantificación de citoquinas por ELISA	13
4.3.3 Análisis de proteínas mediante tinción con azul de Coomassie	13
4.3.4 Análisis de proteínas mediante tinción con plata	13
4.3.5 Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia (Western Blotting)	14
5. Resultados y discusión	15
5.1 Expresión y purificación de <i>gzmA</i> recombinante de <i>P. pastoris</i>	15

Índice

5.1.1 Detección de la granzima A mediante tinción con azul de Coomassie	15
5.1.2 Detección de la granzima A mediante tinción con plata	16
5.1.3 Detección de la granzima A mediante la técnica de inmunotransferencia (Western Blotting)	16
5.2 Mecanismo de la inflamación inducida por granzima A	17
5.2.1 Caracterización de los macrófagos GM-BMDM	17
5.2.2 Inflamación en macrófagos inducida por granzima A. Producción de IL-1 β y TNF α	18
5.2.3 Inflamación en macrófagos inducida por granzima A. Producción de IL-6	20
6. Conclusiones	22
7. Bibliografía	23
8. Anexos	26
8.1 Abreviaturas	26

1. Resumen

Recientemente se ha descrito que la serín proteasa granzima A (gzmA) presenta actividad inflamatoria induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF α en diferentes grupos celulares como macrófagos y monocitos. Además, estudios *in vivo* han demostrado la relevancia biológica de esta proteasa en diferentes patologías inflamatorias como sepsis y artritis reumatoide. Pero el mecanismo por el cual esta proteasa induce la producción de citoquinas proinflamatorias se desconoce. En este trabajo analizamos de forma preliminar el mecanismo por el cual la gzmA induce la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos. Para ello primeramente se sobreexpresó gzmA recombinante de ratón utilizando el sistema de expresión eucariota *Pichia pastoris*. La gzmA sobreexpresada se purificó mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), si bien no se pudo obtener una cantidad adecuada ya que no se consiguió una buena expresión de esta proteína en este sistema. Por ello, para el estudio del mecanismo de inflamación inducido por gzmA se utilizó una muestra de gzmA nativa aislada de los gránulos citotóxicos de la línea celular de ratón 1.3E6, previamente purificada en nuestro laboratorio. Utilizando macrófagos derivados de la médula ósea estimulados y sin estimular con LPS de *E. coli* hemos encontrado que la gzmA es capaz de inducir la producción de IL-1 β en macrófagos previamente estimulados con LPS por un mecanismo dependiente de caspasa-1, siendo además capaz de incrementar la producción de TNF α en los macrófagos que se estimularon con LPS. También encontramos que la gzmA puede inducir la producción de IL-6 en macrófagos sin necesidad de un estímulo previo.

Abstract

Recent studies have described that the serine protease granzyme A (gzmA), has inflammatory activity by stimulating the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α in different cell groups (e.g. macrophages and monocytes). In addition, *in vivo* studies have shown the biological relevance of this protease in several inflammatory pathologies as sepsis and rheumatoid arthritis. However, the mechanism by which this protease induces proinflammatory cytokine production is so far unknown. In this project, we have preliminary analyzed the mechanism by which gzmA induces proinflammatory cytokine production in macrophages. Mouse recombinant gzmA was firstly overexpressed by using a *Pichia pastoris* eukaryotic expression system. GzmA was purified by Immobilized Metal Ion Affinity (IMAC), although an adequate amount could not be obtained since a good expression of this protein in this system was not obtained. Thus, native gzmA, previously isolated in our lab from cytotoxic granules from the mouse cell line 1.3E6, was used. By using LPS-stimulated and unstimulated bone marrow derived macrophages, we have found that gzmA is able to induce IL-1 β production in a caspase-1-dependent manner in LPS-stimulated macrophages. Moreover, gzmA has the ability to increase TNF α production in LPS-stimulated macrophages. We have also found that gzmA can induce IL-6 production in macrophages without the requirement of any previous stimulus.

2. Introducción/Antecedentes

2.1 El sistema inmunológico

Todos los organismos han desarrollado mecanismos de defensa para proteger su integridad biológica frente a agresiones externas e internas. Estos mecanismos pueden ser inespecíficos, impidiendo su entrada en el organismo o destruyéndolos con rapidez; o más específicos. Todos ellos forman lo que se conoce como sistema inmunológico (Núñez Jurado et al 2015).

El sistema inmunológico puede clasificarse en 3 niveles: 1) las barreras anatómicas y fisiológicas; 2) la inmunidad innata; y 3) la inmunidad adaptativa. El fallo en cualquiera de estos sistemas aumentará en gran medida la susceptibilidad a una infección (Turvey & Broide 2010).

2.2 Células citotóxicas

Dentro de la respuesta del sistema inmune se encuentran las células citotóxicas que son las responsables de eliminar células infectadas o transformadas a través de la inducción de muerte celular o inflamación (Martinez-Lostao et al 2015). Sin embargo si estas funciones no se regulan adecuadamente pueden desencadenar diferentes patologías (Pardo et al 2009). Dentro de las células citotóxicas se encuentran las células NK (del inglés, “Natural Killer”), las células NKT, los linfocitos T citotóxicos, CTL (del inglés “Cytotoxic T Cells”) y los linfocitos T $\gamma\delta$.

2.2.1 Células NK

Las células NK son un tipo de linfocito perteneciente a la inmunidad innata, capaces de distinguir y eliminar a células transformadas o infectadas por patógenos intracelulares incluyendo virus, bacterias y protozoos.

Su activación se produce a través de la interacción con células somáticas en las que las señales activadoras son mayores que las señales inhibitorias (Vivier et al 2004). Además, la activación de las células NK está regulada por citoquinas secretadas por células accesorias como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células epiteliales y linfocitos T y B (Souza-Fonseca-Guimaraes et al 2012). Además de ejercer sus funciones citotóxicas, las células NK activadas son una fuente importante de citoquinas que contribuyen al ambiente proinflamatorio durante una infección. Las principales citoquinas producidas por las células NK activadas son IFN- γ , GM-CSF y TNF α (Huntington et al 2007).

2.2.2 Linfocitos T citotóxicos

Los CTL se generan a partir de la activación de los linfocitos T CD8+ que son células pertenecientes a la inmunidad adquirida capaces de reconocer antígenos asociados a moléculas de MHC I a través de su interacción con el receptor de linfocitos T (TCR, del inglés “T cell receptor”). La principal función de estos linfocitos es la de eliminar células infectadas o transformadas que expresen antígenos extraños. Además, son capaces de secretar citoquinas como INF γ y TNF α que favorecen el ambiente proinflamatorio durante una infección.

La correcta activación de las células T CD8+ requiere de tres señales: 1) El reconocimiento del antígeno por el TCR; 2) la presencia de señales coestimuladoras proporcionadas por las células APC (células presentadoras de antígeno); 3) y para la adquisición de las funciones proliferativas y citotóxicas, una tercera señal que son la IL2 y la IL-12 o los interferones de tipo I, respectivamente (Curtsinger et al 2003, Williams & Bevan 2007).

Antecedentes y Objetivos

2.2.3 Mecanismos de citotoxicidad de las células efectoras

Las células NK, NKT, los linfocitos $T\gamma\delta$ y los linfocitos T CD8⁺ ejercen sus funciones citotóxicas sobre células transformadas o infectadas a través de tres mecanismos comunes (Martinez-Lostao et al 2015, Pardo et al 2009):

1. Secreción de citoquinas como IFN- γ y TNF α .
2. Unión de los ligandos de muerte (FasL, Apo2L/TRAIL) a los receptores correspondientes expresados las células dianas (Fas/CD95, DR4/DR5).
3. Degranulación de vesículas citotóxicas que contienen perforina y granzimas (gzms), y granzulina en el caso de humanos. La exocitosis granular.

2.3 Exocitosis granular

La exocitosis granular es un mecanismo por el cual las células citotóxicas inducen muerte celular en las células infectadas. La liberación del contenido de los gránulos citotóxicos se puede dividir en cuatro etapas (Bossi & Griffiths 2005, de Saint Basile et al 2010):

1. Formación de la sinapsis inmunológica y reorganización del citoesqueleto de actina.
2. Polarización del MTOC (del inglés MicroTubule-Organizing Center) y de los gránulos citotóxicos hacia la sinapsis inmunológica.
3. Movimiento de los gránulos citotóxicos hacia zonas cercanas a la membrana plasmática
4. Fusión de los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática de las células efectoras, y liberación de su contenido hacia la membrana plasmática de la célula diana.

El reconocimiento de la célula diana se produce a través del TCR en el caso de los CTLs, o a través del balance entre las señales de los receptores de inhibición y de activación en las células NK.

Los gránulos citotóxicos están compuestos tanto por proteínas que únicamente se encuentran en este tipo de gránulos, así como otras que se encuentran también en los lisosomas. En la tabla 2.1 se muestra el contenido de los gránulos citotóxicos.

Molécula	Función
Perforina	Formación de poros
Granzimas	Proteasas de serina
Granzulina *	Agente antimicrobiano
Calreticulina	Inhibidor de la perforina
Catepsina C	Activación de las granzimas
Serglicina	Unión a granzimas
Catepsina B	Degradación de la perforina
Serpinas	Inhibidores de granzimas
Esfingomielinasa ácida	Degradación esfingomielina/ exocitosis granular
Catepsina D	Proteasa
Catepsina L	Proteasa
Receptor de manosa 6-fosfato	Tráfico de proteínas
ATPasa-H ⁺	Acidificador de los gránulos
Arilsulfatasa	Degradación de polisacáridos
β - Hexosamidasa	Degradación de polisacáridos
β - Glucuronidasa	Degradación de polisacáridos
CD63	Marcador lisosomal
Lamp 1	Marcador lisosomal

*Expresado en rumiantes (un homólogo) y primates y ausente en roedores

Tabla 2.1. Contenido de los gránulos citotóxicos.

Antecedentes y Objetivos

2.3.1 Perforina

La proteína formadora de poros, perforina, es una proteína de aproximadamente 67 kDa que se localiza en los gránulos citotóxicos de las células NK, NKT, linfocitos Tc y linfocitos T $\gamma\delta$ (Bade et al 2005, Voskoboinik et al 2015). Esta proteína es crucial para la función intracelular de las gzms. Con el uso de ratones deficientes de perforina, se ha demostrado la importancia de esta proteína al verse comprometida la capacidad citotóxica de CTLs y células NK (Kagi et al 1994), siendo estos ratones más sensibles a infecciones virales y al desarrollo de tumores (Bolitho et al 2007, Voskoboinik et al 2015).

La función de esta proteína es la de permitir la entrada de las gzms al interior de las células diana y estas serán responsables de ejercer muerte celular o inflamación en la célula diana.

2.3.2 Granzimas

Las gzms son una familia de serín proteasas descubiertas en los años 80 (Masson & Tschopp 1987, Simon et al 1987). Hasta la fecha, se han descrito 5 gzms en humanos (A, B, H, K, y M) y 10 en ratón (A, B, C, D, E, F, G, K, M y N) siendo la gzmA y la gzmB las más abundantes y mejor caracterizadas (Bolitho et al 2007, Voskoboinik et al 2015). Se expresan principalmente en linfocitos T CD8⁺ y células NK. También se han detectado en otros grupos celulares como linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T CD4⁺, células T reguladoras, macrófagos, basófilos, mastocitos, espermatozoides, células de sertoli, queratinocitos, neumocitos, macrófagos alveolares y células epiteliales alveolares (Arias et al 2017).

Las gzms son sintetizadas como zimógenos inactivos y en los gránulos, después de eliminar el péptido señal sufren un proceso de maduración por la captépsina C, la que eliminará 2 aminoácidos del extremo N-terminal (McGuire et al 1993). En el interior de las vesículas, debido al pH ácido, estas se mantienen inactivas y cuando son liberadas al espacio extracelular adquieren su capacidad proteolítica (Trapani 2001).

Inicialmente, se pensaba que la función fundamental de las gzms era la de inducir la muerte celular por apoptosis en las células infectadas o transformadas. En los últimos años, se ha visto que las gzms juegan un papel importante en muchos otros procesos como la regulación de la inflamación. Además, se ha visto que juegan un papel importante en la inactivación de virus, la modificación de la matriz extracelular o el control de linfocitos activados (Arias et al 2017, Hiebert et al 2011, Martinez-Lostao et al 2015, Pardo et al 2009, Wensink et al 2015).

2.3.2.1 Granzima B

La gzmB es una proteasa con actividad aspartasa que es clave en la inducción de apoptosis y, además, ejerce diversas funciones extracelulares. La observación de que los CTL provenientes de ratones deficientes en gzmB, no eran capaces de inducir una rápida fragmentación del ADN, fue la primera evidencia que indicó que gzmB era crucial para la inducción de apoptosis mediada por células citotóxicas (Heusel et al 1994).

Diversos trabajos han permitido determinar que la gzmB puede inducir apoptosis principalmente por dos mecanismos: activando directamente a las caspasas o a través de la vía apoptótica mitocondrial (Metkar et al 2003, Pardo et al 2009). Además de sus funciones citotóxicas, la gzmB se ha relacionado con procesos inflamatorios, envejecimiento, reparación tisular, coagulación y también se le han atribuido funciones antivirales e inmunosupresoras (Arias et al 2017, Hiebert et al 2011, Martinez-Lostao et al 2015, Pardo et al 2009, Wensink et al 2015).

Antecedentes y Objetivos

2.3.2.2 *Granzima A*

La gzmA es la serin proteasa más abundante. Presenta actividad triptasa al igual que la gzmK, aunque a diferencia de esta, la gzmA es secretada de los gránulos en forma de dímero (Froelich et al 2009).

Durante las últimas décadas, se presumió que todas las gzms inducían muerte celular. Pero en los últimos años han surgido evidencias que indican que la función principal de la gzmA y la gzmK es la de inducir inflamación en diferentes grupos celulares (Voskoboinik et al., 2015; (Arias et al 2017, Hiebert et al 2011, Martinez-Lostao et al 2015, Pardo et al 2009, Wensink et al 2015).

La capacidad citotóxica de la gzmA se demostró *in vitro* utilizando modelos heterólogos. En estos experimentos se utilizó gzmA recombinante de ratón o de rata en combinación con perforina de rata y células de ratón como dianas (Hayes et al 1989, Shi et al 1992b). Con estos experimentos, se observó que mientras la gzmB necesitaba 4 h para inducir muerte celular, la muerte con gzmA se producía a las 20 h (Shi et al 1992a, Shi et al 1992b). Por el contrario, cuando se ensayó la gzmA en modelos autólogos (perforina, gzmA y células diana de la misma especie), no se observó que la gzmA indujera muerte celular incluso a concentraciones micromolares, mientras que la gzmB inducía muerte celular a concentraciones nanomolares en las mismas líneas celulares (Kaiserman et al 2006, Metkar et al 2008).

Las últimas evidencias indican que la gzmA es una proteasa proinflamatoria. Se ha visto que tanto la gzmA pura como las células citotóxicas que expresen gzmA, inducen la liberación de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en macrófagos humanos y de ratón (Metkar et al., 2008). Otros estudios, han mostrado que la gzmA es capaz de inducir la producción de IL-6 e IL-8 en fibroblastos e IL-8 en células epiteliales (Sower et al 1996).

También se han detectado niveles elevados de gzmA en el plasma de pacientes con enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas. Por ejemplo, se observó que en modelos de endotoxemia por LPS, que la ausencia de gzmA incrementa la supervivencia de los ratones deficientes en estas gzms en comparación con ratones wt (Metkar et al 2008). También en nuestro grupo, utilizando un modelo de infección con el patógeno de ratón *Brucella. Microti*, se apreció que los ratones deficientes en gzmA mostraban una mayor supervivencia a la sepsis inducida por este patógeno en comparación con los ratones control. Además presentaban menores niveles de citoquinas proinflamatorias en suero como IL-1 β , TNF α e IL-6 (Arias et al 2014). De igual forma, en pacientes con artritis reumatoide se han encontrado niveles elevados de gzmA, tanto en el plasma como en los fluidos sinoviales (Tak et al 1999). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la gzmA es capaz de inducir osteoclastogénesis por un mecanismo dependiente de TNF α y, además, utilizando un modelo de artritis inducida por colágeno, se observó que los ratones deficientes en gzmA mostraban una menor severidad de la enfermedad (Santiago et al 2016). Además otro grupo, utilizando un modelo murino de artritis inducida por Chikungunya observó un incremento de la expresión de gzmA en las articulaciones y ganglios linfáticos, demostrando que los ratones deficientes en gzmA presentaban una menor severidad en la artritis inducida por este virus (Wilson et al 2017). Sin embargo, el mecanismo por el cual la gzmA induce inflamación en diferentes grupos celulares se desconoce por lo que necesitan realizar más estudios para descifrarlo.

2.3.2.3 *Otras granzimas con propiedades proinflamatorias*

Otras gzms con propiedades proinflamatorias son la gzm K y la gzm M. Se ha demostrado que la gzmK es capaz de inducir inflamación en diferentes tipos celulares (Joeckel

Antecedentes y Objetivos

et al 2011). La gzmK humana induce la producción de IL-6, IL-8 y MCP-1 en fibroblastos pulmonares humanos, por un mecanismo dependiente de la activación del receptor PAR-1 (del inglés, “protease-activated receptor 1”) (Cooper et al 2011). También se ha visto que la gzmK recombinante activa induce la producción de IL-1 β en macrófagos peritoneales pre-estimulados con LPS (Joeckel et al 2011). En este mismo trabajo también se logró inducir la producción de IL-1 β con el uso de linfocitos Tc aislados *ex vivo* de ratones deficientes en gzmA y B infectados con el virus de la linfocoriomeningitis de ratón (LCMV), que expresan gzmK (Joeckel et al 2011).

Recientemente, se ha observado que la gzmK humana es capaz de potenciar la liberación inducida por LPS de TNF α , IL-6 e IL-8 en monocitos humanos y este efecto no requiere de la actividad proteolítica de la proteasa. El mecanismo que se plantea para esta sinergia es que la gzmK promovería la formación del complejo entre LPS y CD14 al liberar moléculas individuales de LPS a partir de las micelas (Wensink et al 2014).

Por otro lado se ha descrito que la gzmM pudiera ejercer efectos reguladores significativos en la liberación de citoquinas durante las infecciones por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Anthony et al 2010). Utilizando ratones deficientes en gzmM se ha visto que después de la administración de LPS, los niveles en suero de citoquinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , TNF α e IFN γ son inferiores en comparación con los ratones control (Anthony et al 2010).

2.4 Activación canónica y no canónica del inflammasoma

Los mecanismos de activación de la caspasa-1 que desencadenan los diferentes tipos de inflammasomas son complejos, diversos y llevan a la inducción y secreción de la IL-1 β la cual es clave en la generación de la inflamación (Guo et al 2015). Asimismo, estos mecanismos son los responsables de un tipo de muerte celular denominada piroptosis.

La activación de los inflammasomas se encuentra dirigida por dos señales: una preestimuladora a través de los receptores Toll y una estimuladora dirigida por las proteínas NLR (Guo et al 2015). Los mecanismos de activación de los inflammasomas se encuentran descritos aunque faltan detalles.

La activación comienza con el ensamblaje del inflammasoma después de que sensores moleculares detectan los PAMPs de virus y bacterias, además de las señales de peligro o de estrés, las cuales son llamadas patrones moleculares asociados a daño DAMPs y que son capaces de inducir una respuesta inflamatoria mediada por los inflammasomas. Las toxinas bacterianas y el LPS figuran como los principales activadores del inflammasoma (Sharma & Kanneganti 2016)

Tras el ensamblaje del inflammasoma, la caspasa-1 es activada y madura mediante proteólisis a la pro-IL-1 β , y a la pro-IL-18. La pro-IL-1 β procesada carece de péptido señal, pero aun así, ésta es secretada por un mecanismo no convencional distinto a la ruta clásica de retículo endoplásmico-aparato de Golgi. Este mecanismo aun no descrito también permite la secreción de la caspasa-1 y de otras proteínas que participan en la inflamación y reparación tisular.

En la actualidad existen dos vías de señalización utilizados por los inflammasomas: canónica y no canónica descritos en la literatura. En la vía canónica (**figura 2.1**), la activación del inflammasoma se encuentra precedida por la formación de un complejo macromolecular que

Antecedentes y Objetivos

involucra los tres componentes canónicos (NLRP3, ASC y procaspasa-1) y la posterior secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18. (Sharma & Kanneganti 2016)

En la activación no canónica del inflamasoma no están implicados los tres componentes canónicos. En ese sentido, la vía no canónica se encuentra dirigida por la caspasa-11 (**figura 2.2**), la cual induce apoptosis y secreción de IL-1 β e IL-18 en respuesta a las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* y a sus toxinas bacterianas como la subunidad B de la toxina del cólera. Otra singularidad de la vía no canónica de activación dependiente de caspasa-11 es que no implica la participación de los sistemas de secreción que permitan la liberación de PAMPs en el citosol del hospedador, sino que requiere la señalización mediada por TLR4 inducida por LPS, a través de la proteína adaptadora contentiva de un dominio TIR (región homóloga del receptor Toll/Interleuquina-1) inducible por IFN- β (TRIF) para la concomitante producción de interferón dependiente de la proteína TRIF. Esta señalización mediada por los interferones cumple un papel importante en la regulación y activación de la caspasa-11. Entre las funciones celulares llevadas a cabo por la caspasa-11 después de su activación por la vía no canónica están: la activación de la caspasa-1 dependiente de NLRP3 (no se sabe exactamente como la caspasa-11 lleva esta activación a cabo), y la posterior secreción de la IL-1 β , la IL-18 y la piroptosis; aunque también se ha descrito otro mecanismo de activación, dependiente de caspasa-11 sin la participación de NLRP3 que es capaz de generar choque séptico inducido por LPS. (Suarez & Buelvas 2015)

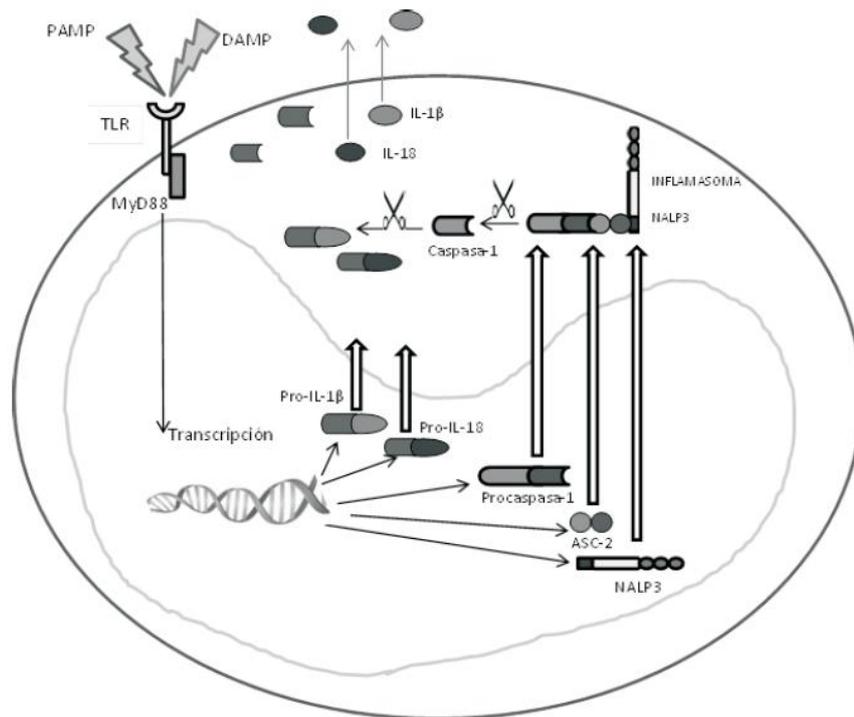


Figura 2.1. Activación canónica del inflamasoma. Los componentes del inflamasoma pueden ser ensamblados sólo después de que la proteína sensora NLRP3 se activa con la interacción de su dominio LRR con cristales, ROS o alguna otra especie microbiana. El ensamblaje de los dominios conduce a la liberación de la caspasa-1 funcional, que activa a la IL-1 β a través de la pro-IL1 β y esta desencadena la inflamación. (Adaptado de Suarez & Buelvas 2015).

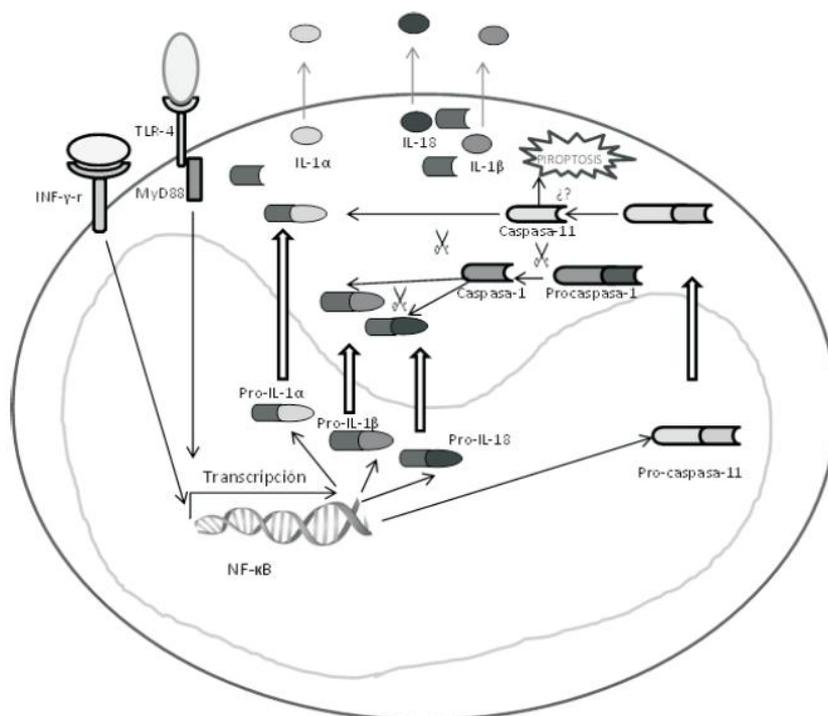


Figura 2.2. Activación no canónica del inflammasoma mediada por caspasa-11. La caspasa-11 activa actúa en conjunción con los componentes del inflammasoma NLRP3, y estimula la maduración de pro-IL1 β y pro-IL18 dependiente de caspasa-1. La caspasa-11 activada, también induce la lisis celular, secretando señales de peligro como IL-1 α y HMGB1. La detección de bacterias Gram negativas a través de TLR4, estimula la transcripción de NF κ B y posteriormente la expresión de pro-IL1 β y pro-caspasa-11. La pro-caspasa-11 se auto-activa, muy probablemente al alcanzar una concentración crítica. (Adaptado de Suarez & Buevas 2015)

En base a estos antecedentes, planteamos la hipótesis de que la *gzmA* induciría la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos, bien por sí misma o bien potenciando el efecto de otros agentes externos como el LPS bacteriano, por un mecanismo que podría implicar la síntesis *de novo* de citoquinas mediante la vía NF κ B y/o su posterior maduración a través del inflammasoma.

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es optimizar la expresión y purificación de *gzmA* de ratón en *Pichia Pastoris* y estudiar el mecanismo por el cual la *gzmA* induce inflamación en macrófagos.

Por ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Expresar y purificar *gzmA* recombinante en *P. pastoris*.
2. Diferenciar macrófagos derivados de la médula ósea con un fenotipo proinflamatorio M1.
3. Analizar el papel de NF- κ B y caspasa-1 (inflammasoma) en generación de citoquinas inflamatorias inducidas por *gzmA* en macrófagos.

4. Materiales y métodos

4.1 Cepas de *Pichia pastoris* y condiciones de cultivo

Todas las manipulaciones se realizaron con material estéril, medio autoclavado y dentro del área estéril creada por la llama de un mechero de alcohol. En este trabajo se utilizó las levaduras *Pichia pastoris* GS115 transfectadas con el plásmido pPIC9 que contiene un inserto de *gzmA* de ratón, donada por un grupo colaborador del departamento de bioquímica de la universidad de Monash en Victoria, Australia, para la producción de *gzmA* recombinante de ratón.

La *gzmA* recombinante de ratón se produjo amplificando la secuencia codificante de la mGzmA (sintetizada en el plásmido pUC; Genscript) por PCR utilizando cebadores que sustituían la secuencia señal con una cola FLAG y un sitio de corte por enteroquinasa en el extremo N-terminal y añadía una cola de histidinas en el extremo C-terminal. El producto fue clonado en el plásmido pPIC9 y transformado en *P.pastoris*.

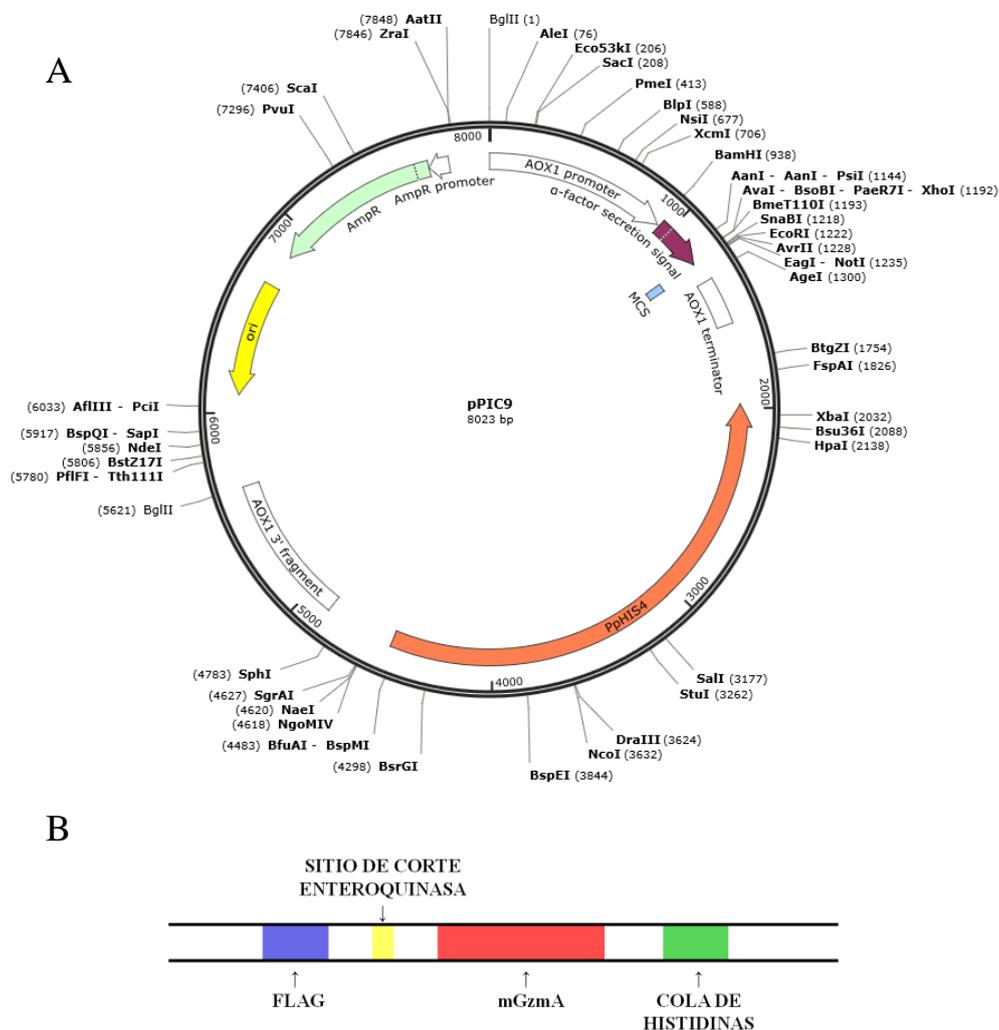


Figura 4.1. A) Estructura del plásmido de expresión pPIC9. B) Esquema de la secuencia del inserto con el gen de la mGzmA.

Materiales y Métodos

4.1.1 Medios de cultivo de la cepa de levadura

Los cultivos de *P. pastoris* se realizaron en los siguientes medios:

- Medio líquido de enriquecimiento YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium): Peptona 2 % (Sigma), Extracto de levadura 1 % (Sigma), Dextrosa 2 % (Sigma).
- Medio RDB Agar (Regeneration Dextrose Medium): Sorbitol 1M (Sigma), Dextrosa 1 % (Sigma), YNB 1,34 % (Sigma), Biotina 4×10^{-5} % (Sigma), Aminoácidos 0,005 % (Sigma).
- Medio YPM (Yeast Extract Peptone Medium + Metanol): Peptona 1 %, Extracto de levadura 2 %, Metanol 3 % (Panreac).

Una vez que se pesaron los componentes de cada medio de cultivo, se disolvieron en 1 L de agua destilada, se vertió la disolución en botellas de vidrio de 500 ml y se esterilizaron en autoclave. Tras atemperarse, las botellas se almacenaron a 4 °C.

4.1.2 Almacenamiento de las levaduras

Para una conservación a largo plazo, las levaduras se almacenan a -80 °C en glicerol (Panreac) estéril. Para ello se hizo un cultivo de levaduras en medio líquido YPD con ampicilina a 100 µg/ml a 30 °C y en agitación en un orbital (Innova 40) a 210 rpm. Se dejaron cultivando durante 24 horas aproximadamente hasta alcanzar una densidad óptica (DO) medida 600 nm de 50 a 100 (aproximadamente de $2,5 \times 10^9$ a 5×10^9 células/ml).

Una vez transcurrido este tiempo, se mezclan en criotubos (Nunc) 700 µl de cultivo y 300 µl de glicerol (Panreac) al 80 %. Estas alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Para su almacenamiento a corto plazo, se almacenó no más de una semana a 4 °C en placas de RDB Agar.

4.1.3 Sobreexpresión de *gzmA* en *P. pastoris*

Tras descongelar los viales con *P. pastoris* se hizo una siembra por agotamiento en medio RDB Agar y se dejó crecer este cultivo a -30 °C durante cinco días. Pasado este tiempo, se preparó un cultivo de *P. pastoris*. Para ello, se seleccionó una colonia de la placa y se cultivó con ampicilina 100 µg/ml a 30 °C en 5 ml de YPD en orbital a 120 rpm. A las 12 horas se vertió el cultivo sobre 500 ml de YPD en un matraz Erlenmeyer de 2 L y se dejaron cultivando en el orbital a las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 36 h.

Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó el cultivo a 6371 xg durante 10 minutos en centrifuga (Avanti J-E). Para inducir la expresión de *gzmA*, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 500 ml de YPM. Se volvió a pasar el contenido a los erlenmeyer de 2 L y se le añadió arginina 0,5 % (Sigma) y se incubó durante 60 h a 23 °C y a 120 rpm.

4.1.4 Purificación de *gzmA* de ratón

Una vez llevado a cabo el protocolo de inducción, se centrifugó el cultivo a 6371 xg por 10 minutos. El sobrenadante se filtró con filtros de 0,45 µm y 0,22 µm (Millipore). Posteriormente, para llevar a cabo la concentración de proteínas, se hizo pasar el sobrenadante por un filtro Pellicon (Biomax 10 KDa; Millipore) a 4 °C con ayuda de una bomba peristáltica.

Posteriormente se dializó 3 veces la proteína concentrada con 100 veces su volumen, en buffer Tris-HCl 50 mM con NaCl 150 mM a pH 7,5.

Materiales y Métodos

Para la purificación de gzmA se aprovechó el hecho de que se diseñó la gzmA recombinante de ratón para que expresara en su extremo N-terminal una secuencia de 6 histidinas, por lo que la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Se utilizó una bomba peristáltica, que proporciona un flujo continuo a través de la columna. Los tampones que se utilizaron en este proceso son:

- Tampón unión 50 mM Tris – 150 mM NaCl
- Tampón lavado 50 mM Tris – 150 mM NaCl – 5mM Imidazol
- Tampón elución 1 50 mM Tris – 150 mM NaCl – 150mM Imidazol
- Tampón elución 2 50 mM Tris – 150 mM NaCl – 300mM Imidazol

Para la purificación de gzmA se utilizó una columna de cobalto de 1ml (GE Healthcare). Brevemente: se equilibra la columna con al menos 5 ml de tampón unión, seguidamente se hace pasar la proteína, previamente concentrada y dializada, a un flujo de 0,5 ml por min. Una vez que ha pasado la proteína, se lava la columna con 15-20 ml de tampón lavado, y se eluye la proteína con 6 ml de tampón elución 1 y 2 ml de tampón elución 2. Se recogen alícuotas de 1 ml. Finalmente se lava la columna con 20 ml de agua destilada y se preserva con etanol al 20 %.

Durante la última etapa de elución, se recogieron fracciones de 20 µl de cada alícuota y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), seguida de la tinción por Azul de Coomassie (sección 4.3.3) y tinción con plata (sección 4.3.4). Además, se realizó la identificación de la proteína por Western Blotting (sección 4.3.5). Las fracciones con mayor concentración de proteína se juntaron, se pasaron por una columna de desalinización PD-10 (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante y se recuperó la proteína en tampón 50 mM Tris – 150 mM NaCl.

4.2 Cultivos celulares

4.2.1 Generación de sobrenadantes de células X-63Ag8653

Para la generación de macrófagos derivados de la médula ósea con fenotipo M1, se utilizó el sobrenadante de las células X-63Ag8653 como fuente de GM-CSF. Una línea celular de mieloma murino transfectada con un plásmido que produce el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos de ratón (GM-CSF, del inglés Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Zal et al 1994).

Para su obtención, estas células se cultivaron en medio RPMI con 5 % SFB de complementado, Glutamax y geneticina 1 mg/ml hasta obtener 60×10^6 células. Las células se centrifugaron a 330 xg durante 5 min para retirar el medio con geneticina y se resuspendieron en 200 ml de medio RPMI 5 % SFB de complementado y Glutamax. A continuación, las células se cultivaron durante 48 h hasta su confluencia, se centrifugaron a 330 xg durante 5 min, se recogió el sobrenadante y alicuotó en frascos de 50 ml que se congelaron a -20 °C.

4.2.2 Diferenciación de macrófagos derivados de la médula ósea con GM-CSF (GM-BMDM)

Con este procedimiento se diferencian macrófagos con fenotipo proinflamatorio M1 utilizando como factor de crecimiento y diferenciación el GM-CSF.

Para la obtención de GM-BMDM, se utilizaron ratones de fondos genéticos C57BL/6 los que, tras ser sometidos a eutanasia por asfixia con CO₂, se les extrajo las extremidades posteriores. Tras eliminar cuidadosamente la piel y el músculo, se lavaron en etanol al 70 % y DMEM, se cortaron asépticamente los extremos de hueso para dejar al descubierto la médula ósea y se eluyeron las células inyectando, en condiciones estériles, 5 ml de medio DMEM a

Materiales y Métodos

través de la cavidad de la médula ósea. A continuación, esta suspensión se homogeneizó y posteriormente se filtró mediante un filtro estéril de nylon de 100 μm (Falcon). Seguidamente se lisaron los eritrocitos y la suspensión se centrifugó a 330 xg durante 5 min.

Estas células se resuspendieron en medio GM-CSF (RPMI 1640 con Glutamax, suplementado con 10 % de SFB, 10 % de sobrenadante de la línea X-63Ag8653 como fuente de GM-CSF), se ajustó la concentración a 1×10^6 células/ml y se sembraron 10 ml en placas de cultivo estériles de 90 mm. Al tercer día, se eliminó el sobrenadante, las placas se lavaron 2 veces con PBS y se les adicionó medio 10 ml de BMDC fresco. Este procedimiento se repitió al sexto día. El noveno día, se eliminó nuevamente el sobrenadante, se lavó dos veces con PBS y se adicionaron 3 ml de tripsina (Sigma) por placa. Tras una incubación de 15 min a 37 °C y 5 % de CO₂ se añadieron 5 ml de medio RPMI suplementado con 5 % de SFB, se recogieron las células en tubos estériles de fondo cónico y se centrifugaron durante 5 minutos a 330 xg.

Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron nuevamente en 10 ml de RPMI suplementado con 5 % de SFB, se contaron, se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar) o 2×10^5 células/pocillo en placas de 48 pocillos (Costar) y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ para ser utilizadas en experimentos el día siguiente.

4.2.3 Inflamación inducida por *gzmA* en GM-BMDM

Se diferencian macrófagos con fenotipo M1 utilizando GM-CSF a partir de médula ósea fresca o congelada de ratones B6 como se describe en la sección 4.2.2. Un grupo de GM-BMDM fueron estimulados con LPS de *E. coli* a 10 y 100 ng/ml durante 3h. Tras retirar el sobrenadante, se añadió *gzmA* nativa (300nM) o ATP (1 y 5 mM) y se incubaron 18 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Como controles se utilizaron macrófagos sin estimular, sin estimular tratados con *gzmA* y estimulados solamente con LPS. Transcurrido el tiempo de incubación se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80 °C hasta su utilización para la cuantificación citoquinas por ELISA (sección 4.3.2).

La *gzmA* nativa fue purificada de los gránulos citotóxicos de la línea celular 1.3E6 cedida amablemente por el Dr. Markus Simon del Instituto Max-Planck de Inmunobiología y Epigenética, Friburgo, Alemania.

4.3 Análisis de proteínas

4.3.1 Análisis de proteínas de la superficie celular de macrófagos por citometría de flujo

Una vez diferenciados los macrófagos, se tomó una alícuota de 10^5 células que se centrifugaron a 330 xg durante 5 min y se lavó una vez con PBS suplementado con 5 % SFB. Seguidamente, las células se incubaron con los anticuerpos anti F4/80-APC y anti CD11b-FITC a una concentración de 1:50 en 100 μl de PBS con 5 % SFB durante 15 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se lavaron 3 veces con PBS con 5 % SFB, y se fijaron con 100 μl paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 min a 4 °C. Posteriormente el paraformaldehído se diluyó al 1 % adicionando 300 μl de PBS y las células se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y los resultados obtenidos se analizaron utilizando los programas informáticos Cell Quest y Weasel.

Materiales y Métodos

4.3.2 Cuantificación de citoquinas por ELISA

Se utilizaron diferentes KIT, “Ready-Set-Go”, de Affymetrix (eBioscience) para cuantificar en los sobrenadantes de cultivos celulares o en suero las siguientes citoquinas: IL-1 β (ref: 88-7013-88), IL-6 (ref 88-7064-88), IFN γ (ref: 88-7314-88) y TNF α (ref: 88-7324-88).

De forma general, se adicionaron 100 μ l del anticuerpo de captura a la concentración recomendada en “coating buffer” a la placa de ELISA de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) y se incubó toda la noche a 4 °C. Se lavó la placa 3 veces con 250 μ l solución de lavado (PBS 0.05 % TWEEN 20) y seguidamente se bloqueó con 200 μ l de tampón de ensayo durante 1 h a temperatura ambiente. Se adicionó el patrón y el blanco como recomienda el fabricante, además de las muestras diluidas en tampón de ensayo, incubándose 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar la placa de 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 μ l del anticuerpo de detección conjugado con biotina a la concentración recomendada y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa de 3 veces con solución de lavado, se adicionaron 100 μ l de enzima avidina unida a HRP (“horseradish peroxidase”) (1:4000 en tampón de ensayo) y se incubó durante 30 min. Seguidamente, se lavó la placa de 5 veces y se adicionaron 100 μ l de TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) y tras 15 min, se detuvo la reacción adicionando 50 μ l de H₂SO₄ (2N). Se determinó la absorbancia en un lector de ELISA (poner marca) a 450 nm y 570 nm, restando el valor de absorbancia a 570 nm al de 450 nm.

4.3.3 Análisis de proteínas mediante tinción con azul de Coomassie

La expresión de proteínas puede analizarse también tiñendo directamente el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie, reactivo que se une a las proteínas. Para ello, el gel se incubó aproximadamente durante 4 h con la solución de tinción (azul de Coomassie 0,5 g/L, Sigma; ácido acético glacial 6 %, metanol 45 % (Scharlab)), se lavó durante varias horas con un decolorante (ácido acético glacial 10 %; metanol 25%; glicerol 2 %) mediante sucesivos cambios hasta que el gel recuperó su color inicial. Finalmente, se dejó durante al menos 24 h en una solución de preservación (metanol 70 %; glicerol 3 %). Todos estos pasos se realizaron con agitación suave a temperatura ambiente.

4.3.4 Análisis de proteínas mediante tinción con plata

La pureza de las proteínas también se analizó a través de la tinción del gel de poliacrilamida con plata utilizando el kit de Amersham-Biosciences (PlusOne™ Silver Staining kit) con algunas modificaciones. Tras acabar el recorrido electroforético, los geles se sumergieron durante al menos 30 min a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C en una solución de etanol 40 % y ácido acético glacial 10 % para el fijado de las proteínas. Posteriormente, se incubaron 30 min en etanol 30 %, tiosulfato sódico 0,2 % (p/v) y acetato sódico 6,8 % (p/v). Tras lavar tres veces durante 5 min cada vez con agua destilada, se incubaron con una disolución que contenía nitrato de plata al 0,25 % (p/v) durante 20 min y se volvieron a lavar dos veces durante 1 min cada vez con agua destilada. Finalmente, los geles se revelaron durante 2-5 min con una disolución que contenía carbonato sódico 2,5 % (p/v) y formaldehído 0,02 % (37 % p/v). La reacción se paró incubando los geles en EDTA-Na₂ al 1,5 % (p/v) durante 10 min. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con agua destilada. Para la conservación final del gel, se dejó durante al menos 24 h en una solución de preservación (metanol 70 %, glicerol 3 %). Todos estos pasos se realizaron con agitación suave a temperatura ambiente.

Materiales y Métodos

4.3.5 Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia (Western Blotting)

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (PolyVinylidene Fluoride, Amersham Hybond, GE Healthcare). En resumen, finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, para lo cual, previamente la membrana se incubó 30 seg con metanol (grado HPLC, Panreac). La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca (BioRad) a 20 V y 400 mA durante 55 min en tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM pH 8,3; glicina 39 mM; SDS 0,0373 %; metanol 20 %). Las membranas de PVDF con las proteínas fijadas se bloquearon con tampón de bloqueo (Thermo Scientific) durante 1 hora. La detección de la *gzmA* se realizó con la ayuda del anticuerpo monoclonal de ratón His-Tag (1/1.000 Novagen). La incubación con el anticuerpo primario específico se realizó durante toda la noche a 4°C y con agitación suave. Tras esta incubación, se realizaron tres lavados de 15 min con tampón de bloqueo 1:10, en agitación. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario frente a ratón, hecho en cabra unido al fluoróforo IRDye800 CW (Goat anti-mouse IRDye 800 CW, LI-COR) a una dilución de 1/20.000. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave, tras lo cual se realizaron tres nuevos lavados de 15 min con tampón de bloqueo 1:10 para eliminar el exceso de anticuerpo. La detección de los complejos se llevó a cabo en el Odyssey CLx (LI-COR) mediante la técnica de espectroscopía en infrarrojos cercanos.

5. Resultados y discusión

5.1 Expresión y purificación de *gzmA* recombinante de *P. pastoris*

Una vez que se purificó por IMAC, se procedió a comprobar su pureza y que la proteína obtenida era realmente la *gzmA*, analizando en qué fracciones de las recogidas durante el eluido se encuentra y la presencia de otras proteínas. Para ello, se separaron la/s proteína/s mediante PAGE y se llevó a cabo una tinción con azul de Coomassie (sección 5.1.1), una tinción con plata (sección 5.1.2) y un Western Blotting (sección 5.1.3).

5.1.1 Detección de la *gzmA* mediante tinción con azul de Coomassie

Esta tinción sirve para visualizar las diferentes proteínas en las alícuotas tomadas a lo largo de todo el proceso. La *gzmA* tiene una masa de aproximadamente 34 kDa, por lo que era de esperar que apareciera una banda a dicha altura en algunas de las alícuotas tomadas al eluir la proteína de la columna.

Tal y como se aprecia en el gel de la **figura 5.1**, esta banda de aproximadamente 34 kDa correspondiente a la *gzmA* aparece en las alícuotas de los eluidos EL5 y EL7, habiendo una mayor cantidad en la primera de estas. No se observa banda en las alícuotas EL1 y EL3 y tampoco en los sobrenadantes de producción P2 y P4 tomados antes de comenzar el proceso de concentrado y purificación, ya que aunque debería haber *gzmA* en ellos, está demasiado diluída como para que esta pueda ser detectada por esta técnica. En el carril del concentrado (CONC) obtenido tras el paso del sobrenadante de producción por el Pellicon se observan diversas bandas, entre las cuales estará la banda correspondiente a la *gzmA*.

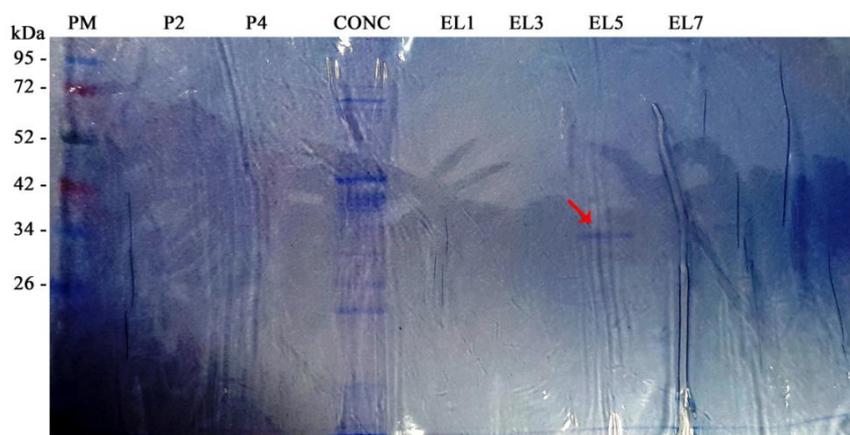


Figura 5.1. Detección de *gzmA* mediante tinción con azul de Coomassie en gel de poliacrilamida para las diferentes alícuotas tomadas a lo largo de su proceso de purificación. PM: Pesos moleculares; P2, P4: Alícuotas tomadas tras la producción de *gzmA* antes de concentrar y purificar; CONC: Alícuota tomada tras la concentración en Pellicon; EL1, EL3, EL5, EL7: Alícuotas tomadas al eluir con imidazol la columna de cobalto para recoger la *gzmA* unida a la misma. La flecha roja señala a una proteína de aproximadamente 34 kDa.

5.1.2 Detección de la gzmA mediante tinción con plata

Debido a que al realizar la tinción de azul de Coomassie no se pudieron analizar todas las fracciones recogidas en la columna, se realizó una tinción de plata analizando todas las fracciones recolectadas (EL1-EL8). Además, esta técnica tiene la ventaja de ser más sensible que la tinción con azul de Coomassie lo que nos permite la detección de una proteína con un peso similar a la gzmA en otras fracciones (EL6 y EL7) aparte de en la detectada anteriormente (EL5).

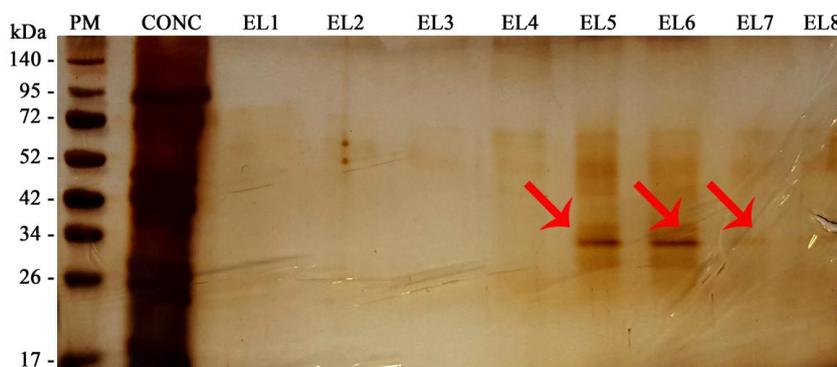


Figura 5.2. Detección de gzmA mediante tinción de plata en gel de poliacrilamida para las diferentes alícuotas tomadas a lo largo de su proceso de purificación. PM: Pesos moleculares; **P2, P4:** Alícuotas tomadas tras la producción de gzmA antes de concentrar y purificar; **CONC:** Alícuota tomada tras la concentración en Pellicon; **EL1, EL3, EL5, EL7:** Alícuotas tomadas al eluir con imidazol la columna de cobalto para recoger la gzmA unida a la misma. Las flechas rojas señalan a una proteína de aproximadamente 34 kDa.

5.1.3 Detección de la gzmA mediante la técnica de inmunotransferencia (Western Blotting)

Finalmente para corroborar que la proteína que se detectaba a altura de 34 kDa era realmente la gzmA, se realizó una identificación de la proteína por Western blotting utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la cola de histidinas presente en el extremo C-terminal.

Se observó que en las alícuotas EL5 y EL7 (**figura 5.3**) obtenidas tras eluir con imidazol, las proteínas unidas la columna eran realmente gzmA. También se detectó gzmA como era de esperar en la alícuota tomada tras la concentración en el Pellicon y en la fracción correspondiente a las proteínas que no se unieron a la columna (BIND) así como en la fracción obtenida con el tampón de lavado (WASH).

Con estos resultados se puede confirmar que en nuestro laboratorio podemos expresar y purificar gzmA recombinante de *P. pastoris*. Seguidamente se intentó activar la gzmA (expresada como zimógeno inactivo) obtenida mediante corte con enteroquinasa, pero hasta la fecha este proceso está por optimizar en nuestro laboratorio. La principal limitación son los bajos niveles de expresión obtenidos lo que provoca la pérdida de la gzmA en los sucesivos pasos de activación y posterior purificación. También se ha obtenido previamente en nuestro laboratorio gzmA activa en *E. Coli* pero este sistema no es el más adecuado para el estudio de inflamación por la dificultad de eliminar completamente el LPS, el cual presenta gran actividad inflamatoria incluso en el rango pM. Por esta razón se decidió utilizar gzmA nativa disponible en el laboratorio para el estudio del mecanismo por el cual la gzmA induce inflamación en macrófagos.

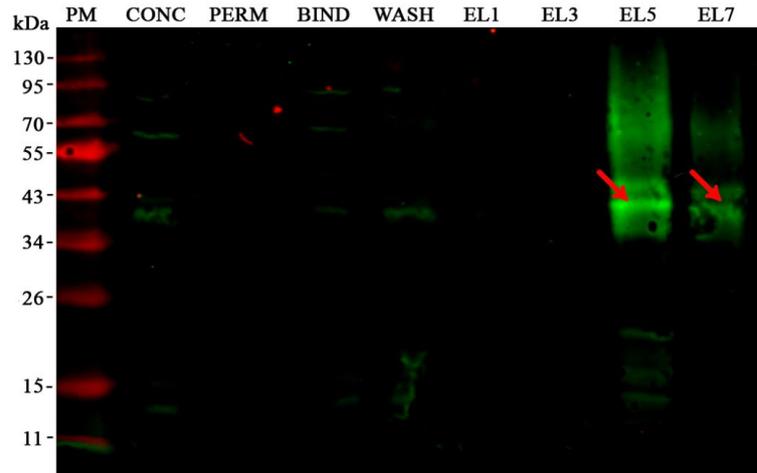


Figura 5.3. Detección de gzmA mediante Western Blotting en las diferentes alícuotas tomadas a lo largo de su proceso de purificación. PM: *Pesos moleculares*; CONC: Alícuota tomada tras la concentración en Pellicon; PERM: Sobrenadante libre de proteínas procedente del Pellicon; BIND: Alícuota tomada con las proteínas que no se unieron a la columna; WASH: Alícuota tomada tras lavar la columna.; EL1, EL3, EL5, EL7: Alícuotas tomadas al eluir con imidazol las proteínas unidas a columna de cobalto para recoger la gzmA pegada en la misma. Las flechas rojas señalan a la gzmA. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón His-Tag (1/1.000 Novagen) seguido de un anticuerpo secundario frente a IgG de ratón unido al fluoróforo IRDye800 CW, tal y como se describe en materiales y métodos.

5.2 Mecanismo de la inflamación inducida por gzmA

5.2.1 Caracterización de los macrófagos GM-BMDM

Para el estudio del mecanismo de la inflamación inducida por gzmA en macrófagos, utilizamos macrófagos derivados de la médula ósea diferenciados con GM-CSF (GM-BMDM), como se describe en la sección 4.2.2 de materiales y métodos. Como se puede apreciar en la **figura 5.4**, las células diferenciadas con este protocolo mostraron un fenotipo característico de macrófagos (CD11b⁺, F4/80⁺).

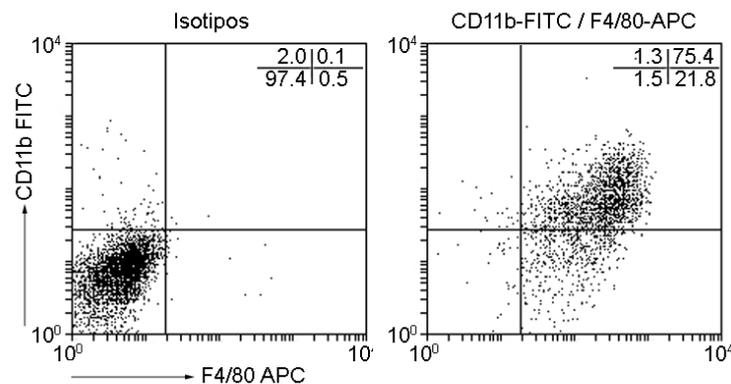


Figura 5.4. Fenotipado de los GM-BMDM. Células de la médula ósea se cultivaron con medio condicionado de la línea X-63Ag8653 como fuente de GM-CSF, como se describe en la sección 4.2.2 de materiales y métodos. Transcurridos 10 días, se analizó la expresión de CD11b y F4/80 mediante un marcaje con los anticuerpos CD11b-FITC y anti F4/80-APC de ratón y se analizaron mediante citometría de flujo. Los números representan los porcentajes de células de cada cuadrante. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 diferenciaciones.

Una de las principales características de los macrófagos diferenciados con GM-CSF es que tienen un gran potencial proinflamatorio y al ser estimulados con LPS producen citoquinas proinflamatorias (Fleetwood et al 2007), es por esta razón que se decidió utilizar estos macrófagos para el estudio del mecanismo de la inflamación inducida por *gzmA*. Como se puede apreciar en la **figura 5.5** estos macrófagos producen una gran cantidad de TNF α e IL-1 β al ser estimulados con LPS (activa la síntesis *de novo* de citoquinas como TNF α y pro-IL1b) o LPS y ATP (induce la activación del inflamasoma y la maduración y secreción de IL1b) respectivamente.

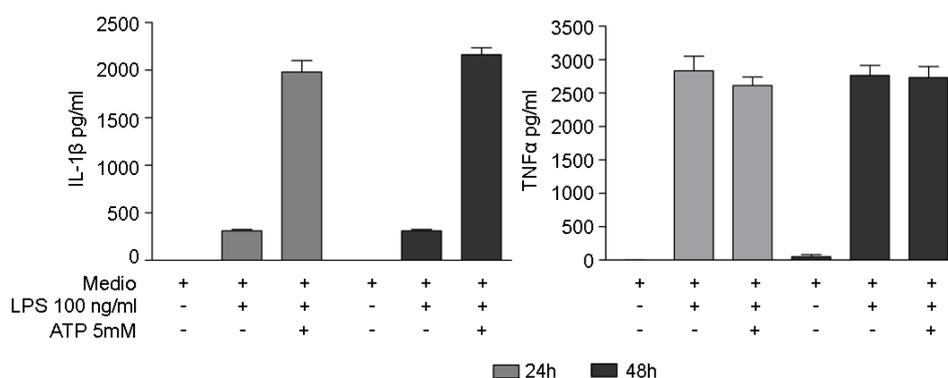


Figura 5.5. Capacidad de los GM-BMDM de producir citoquinas proinflamatorias. Se estimularon GM-BMDM con LPS de *E. coli* a 100 ng/ml durante 4 h. Transcurridas las 4 h de estimulación con LPS, se retiró el sobrenadante y se trató un grupo de macrófagos con ATP (5 mM). Después de 24 y 48 h de incubación se recogió el sobrenadante y se cuantificaron los niveles de IL-1 β y TNF α . Los valores se representan como la media \pm SEM de los niveles de las citoquinas analizadas de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. La diferencia de las medias se analizó mediante la prueba ANOVA de una vía con un análisis posterior de Bonferroni. Nivel de significación estadística (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

5.2.2 Inflamación en macrófagos inducida por *gzmA*. Producción de IL-1 β y TNF α

La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria muy importante que tiene dos mecanismos de control: a nivel de transcripción y a nivel de maduración y liberación. La transcripción de pro-IL-1 β se induce por la activación del factor de transcripción NF- κ B, mientras que la maduración está mediada principalmente por la acción proteolítica de la caspasa-1 al activarse el inflamasoma. Por otro lado, la producción de TNF α está mediada por la activación de NF- κ B (sección 2.4).

Con el objetivo de estudiar el mecanismo por el cual la *gzmA* es capaz de inducir la producción de IL-1 β y TNF α en macrófagos, se diseñó un experimento en el que se adicionó *gzmA* nativa a GM-BMDM estimulados con LPS, en presencia de inhibidores de caspasa-1 y de NF- κ B (**figura 5.6**). Al estimular los macrófagos con LPS se observa una ligera producción, aunque significativa de IL-1 β , que se incrementó significativamente al tratar a estas células con ATP. Como era de esperar, al utilizar el inhibidor de NF- κ B antes de la estimulación con LPS, se redujo drásticamente la producción de IL-1 β . También, con el uso del inhibidor de caspasa-1, los niveles de IL-1 β se redujeron, aunque de forma menos drástica.

De igual forma, se observó que la *gzmA* es capaz de inducir la producción de IL-1 β en los macrófagos previamente estimulados con LPS. Este aumento en la producción de IL-1 β se inhibió al inhibir NF- κ B y caspasa-1. Estos resultados indican que la *gzmA* induce la producción de IL-1 β por un mecanismo dependiente de caspasa-1.

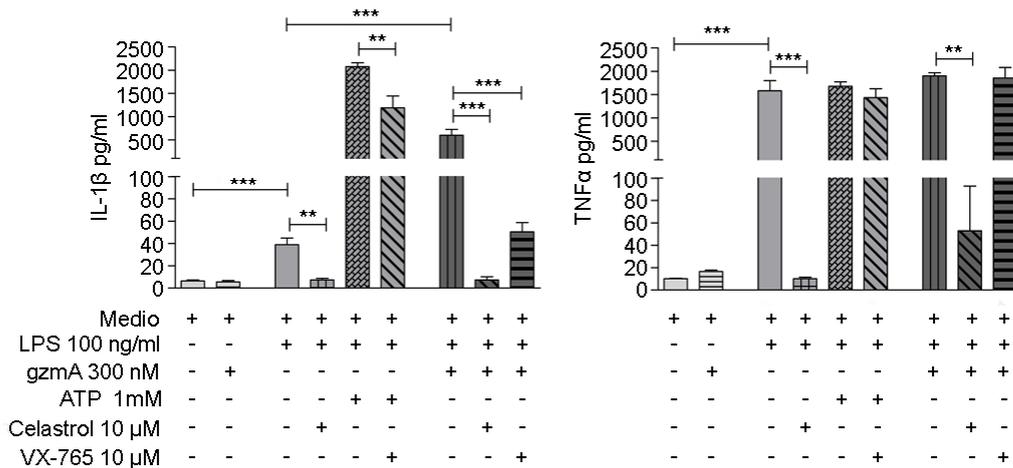


Figura 5.6. Inflamación inducida por gzmA en GM-BMDM. Se estimularon GM-BMDM con LPS de *E. coli* a 100 ng/ml durante 4 h. En algunos casos se utilizaron inhibidores de caspasa-1 (VX-765, 10 μM) y de NF-κB (celastrol, 10 μM), que se incubaron durante 1 h antes de la estimulación con LPS. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y se trataron los macrófagos con gzmA nativa (300 nM) o ATP (1 mM). Tras 24 h de incubación, se recogió el sobrenadante para determinar los niveles de IL-1β y TNFα por ELISA. Los valores se representan como la media ±SEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. La diferencia de las medias se analizó mediante la prueba ANOVA de una vía con un análisis posterior de Bonferroni. Nivel de significación estadística (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

Al estimular los macrófagos con LPS, se apreció una gran producción de TNFα, que como era lógico, se redujo significativamente al inhibir NF-κB. No se observó que la gzmA incrementara la producción de esta citoquina en macrófagos previamente estimulados con LPS a 100 ng/ml. Pensamos que quizás esto se debía a que el LPS a esa concentración es un estímulo muy fuerte y produce por sí mismo grandes cantidades de TNFα. Por ello, diseñamos otro experimento en el que se estimularon los macrófagos con una concentración más baja de LPS para después adicionar gzmA nativa o ATP (**figura 5.7**). Al igual que en el experimento anterior, la estimulación con LPS o LPS y ATP induce la producción de TNFα e IL-1β respectivamente. Como se puede apreciar en estas condiciones la gzmA induce la producción de IL-1β e incrementa la producción de TNFα en macrófagos estimulados con LPS. Sin embargo, la gzmA no induce la producción de IL-1β y TNFα en macrófagos que no recibieron un estímulo previo con LPS.

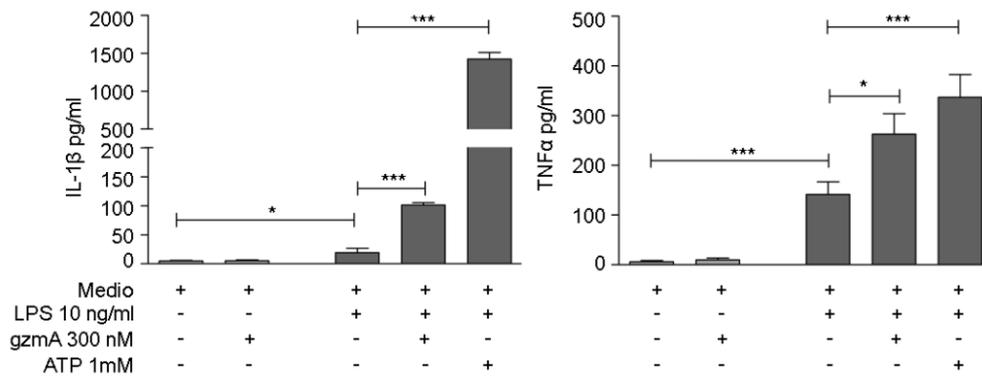


Figura 5.7. La gzmA incrementa la producción de IL-1β y TNFα en GM-BMDM. Se estimularon GM-BMDM con LPS de *E. coli* a 10 ng/ml durante 4 h. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y se trataron los macrófagos con gzmA nativa (300 nM) o ATP (1 mM). Tras 24 h de incubación, se recogió el sobrenadante para determinar los niveles de IL-1β y TNFα por ELISA. Los valores se representan como la media ±SEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. La diferencia de las medias se analizó mediante la prueba ANOVA de una vía con un análisis posterior de Bonferroni. Nivel de significación estadística (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

5.2.3 Inflamación en macrófagos inducida por gzmA. Producción de IL-6

Una vez analizado que la gzmA es capaz de inducir la producción de IL-1β por un mecanismo dependiente de caspasa-1 y que es capaz de incrementar la producción de TNFα en macrófagos previamente estimulados con LPS, quisimos analizar la capacidad de la gzmA de inducir la producción de IL-6 en macrófagos. Para ello se diseñó un experimento en el que se adicionó gzmA nativa a GM-BMDM estimulados y sin estimular con LPS.

Como se puede apreciar en la **figura 5.8** al añadir gzmA nativa a GM-BMDM se incrementa de forma significativa la producción de IL-6. De igual forma al estimular los macrófagos con una LPS a una concentración de 100 ng/ml o de 10 ng/ml se observa un incremento en la producción de IL-6. Al añadir gzmA a macrófagos estimulados con LPS 10 ng/ml se produce un incremento en la expresión de IL-6. Por el contrario, cuando se adiciona gzmA a macrófagos estimulados con LPS a 100 ng/ml no se aprecia un incremento en la producción de esta citoquina. Pensamos que esto se debía, como en el caso de la producción de TNFα, a que este estímulo es muy fuerte e induce por sí mismo la producción de una gran cantidad de IL-6 por lo que resulta difícil observar un efecto aditivo con un segundo estímulo.

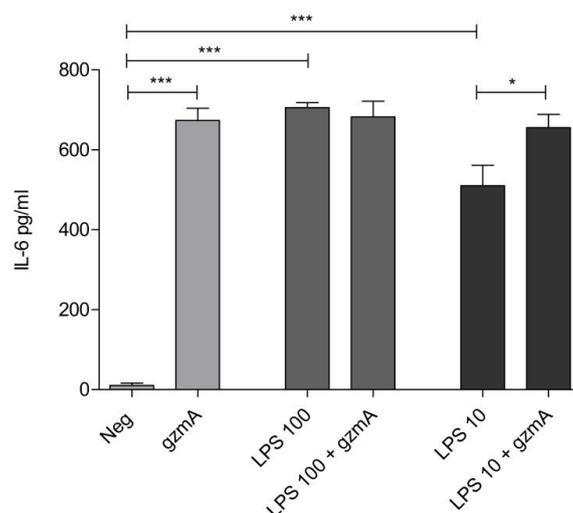


Figura 5.8. La gzmA incrementa la producción de IL-6 en GM-BMDM. Se estimularon GM-BMDM con LPS de *E. coli* a 10 ng/ml o 100 ng/ml durante 4 h. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y se trataron los macrófagos con gzmA nativa (300 nM). Tras 24 h de incubación, se recogió el sobrenadante para determinar los niveles de IL-6 por ELISA. Los valores se representan como la media \pm SEM. La diferencia de las medias se analizó mediante la prueba ANOVA de una vía con un análisis posterior de Bonferroni. Nivel de significación estadística (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

En este trabajo hemos analizado de forma preliminar el mecanismo por el cual la gzmA extracelular puede inducir inflamación en macrófagos. En diferentes estados patológicos se han detectado niveles elevados de gzmA en diferentes fluidos corporales, lo que sugiere que la gzmA puede tener efectos extracelulares en muchas patologías. Por ejemplo en pacientes con sepsis se han encontrado niveles elevados de gzmA en suero (Lauw et al 2000, Zeerleder et al 2005), también en pacientes con artritis reumatoide se han encontrado niveles elevados en el plasma y en los fluidos sinoviales (Tak et al 1999), y en pacientes con alveolitis alérgica extrínseca se han detectado niveles elevados de gzmA activa en los lavados bronqueoalveolares.

La capacidad de la gzmA de inducir la maduración de IL-1 β e incrementar la producción de TNF α en macrófagos estimulados con LPS de forma independiente de perforina podría ser uno de los mecanismos por el cual la gzmA incrementa la producción de estas citoquinas proinflamatorias en sepsis. Esto podría indicar un papel patológico de la gzmA extracelular detectada en humanos tal y como se indica arriba. Además apoyaría los datos obtenidos previamente *in vivo* sobre el papel extracelular de gzmA en artritis reumatoide (Santiago et al 2016, Wilson et al 2017). Aunque no se pueda descartar que la perforina contribuya a la inflamación inducida por esta proteasa *in vivo*. Además, se ha demostrado que los efectos de la gzmA se incrementan con la liberación intracelular de esta proteasa (Metkar et al 2008).

Nuestros resultados indican que la gzmA incrementa los niveles de IL-6 sin necesidad de un estímulo previo así como en macrófagos previamente estimulados con LPS. Recientemente se ha demostrado que la gzmK, una serín proteasa con una especificidad de corte muy similar a la gzmA, es capaz de inducir la producción de IL-6 en células endoteliales a través de la activación del receptor activado por proteasa PAR-1 que conlleva a la activación de la proteína quinasa p38 (Sharma et al 2016). Teniendo en cuenta la similitud en la especificidad de corte de la gzmK y la gzmA sería lógico pensar que la gzmA pudiera inducir la producción de IL-6 en macrófagos a través de la activación del receptor PAR-1 aunque se necesitan realizar experimentos para verificar esta hipótesis.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten destacar las siguientes conclusiones:

1. A partir del modelo de expresión eucariota *P. pastoris* se logra sobreexpresar gzmA recombinante de ratón con el plásmido pPIC9, aunque su nivel de expresión es muy bajo y no nos ha permitido obtener la proteasa activa.
2. La gzmA es capaz de inducir la producción de IL-1 β en macrófagos previamente estimulados con LPS por un mecanismo dependiente de caspasa-1.
3. En macrófagos estimulados con LPS la gzmA es capaz de incrementar la producción de TNF α .
4. La gzmA es capaz de inducir la producción de IL-6 en macrófagos sin necesidad de un estímulo previo.
5. La gzmA aumenta la producción de IL-6 en macrófagos previamente estimulados con LPS.

Conclusions

The obtained studies in this project can highlight the following conclusions:

1. The overexpression of mouse recombinant gzmA is achieved with the pPIC9 plasmid in the eukaryotic expression model *P.pastoris* although the expression level is low and it has not been possible to get the active protease.
2. GzmA is able to induce IL-1 β production in previously LPS-stimulated macrophages by a caspase-1-dependent mechanism.
3. In LPS-stimulated macrophages, gzmA can increase the TNF α production.
4. GzmA has the ability to induce IL-6 production in non-previously stimulated macrophages.
5. GzmA increases the production of IL6 in LPS-stimulated macrophages.

7. Bibliografía

- Anthony DA, Andrews DM, Chow M, Watt SV, House C, et al. 2010. A role for granzyme M in TLR4-driven inflammation and endotoxemia. *Journal of immunology* 185: 1794-803
- Arias M, Martinez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo J. 2017. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends in cancer* 3: 407-22
- Arias MA, Jimenez de Bagues MP, Aguilo N, Menao S, Hervas-Stubbs S, et al. 2014. Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. *Cell reports* 8: 420-9
- Bade B, Boettcher HE, Lohrmann J, Hink-Schauer C, Bratke K, et al. 2005. Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. *International immunology* 17: 1419-28
- Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. 2007. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current opinion in immunology* 19: 339-47
- Bossi G, Griffiths GM. 2005. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Seminars in immunology* 17: 87-94
- Cooper DM, Pechkovsky DV, Hackett TL, Knight DA, Granville DJ. 2011. Granzyme K activates protease-activated receptor-1. *PloS one* 6: e21484
- Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine* 197: 1141-51
- de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature reviews. Immunology* 10: 568-79
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *Journal of immunology* 178: 5245-52
- Froelich CJ, Pardo J, Simon MM. 2009. Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases. *Trends in immunology* 30: 117-23
- Guo H, Callaway JB, Ting JP. 2015. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* 21: 677-87
- Hayes MP, Berrebi GA, Henkart PA. 1989. Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A. *The Journal of experimental medicine* 170: 933-46
- Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76: 977-87
- Hiebert PR, Boivin WA, Abraham T, Pazoooki S, Zhao H, Granville DJ. 2011. Granzyme B contributes to extracellular matrix remodeling and skin aging in apolipoprotein E knockout mice. *Experimental gerontology* 46: 489-99
- Huntington ND, Vosshenrich CA, Di Santo JP. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature reviews. Immunology* 7: 703-14
- Joeckel LT, Wallich R, Martin P, Sanchez-Martinez D, Weber FC, et al. 2011. Mouse granzyme K has pro-inflammatory potential. *Cell death and differentiation* 18: 1112-9
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, et al. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369: 31-7
- Kaiserman D, Bird CH, Sun J, Matthews A, Ung K, et al. 2006. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of cell biology* 175: 619-30
- Lauw FN, Simpson AJ, Hack CE, Prins JM, Wolbink AM, et al. 2000. Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. *The Journal of infectious diseases* 182: 206-13

- Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. 2015. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21: 5047-56
- Masson D, Tschopp J. 1987. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 49: 679-85
- McGuire MJ, Lipsky PE, Thiele DL. 1993. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *The Journal of biological chemistry* 268: 2458-67
- Metkar SS, Mena C, Pardo J, Wang B, Wallich R, et al. 2008. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity* 29: 720-33
- Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, et al. 2003. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of cell biology* 160: 875-85
- Núñez Jurado D, Gálvez Buerba EM, Pardo Jimeno J. 2015. *Desarrollo de inmunobiosensores y sistemas de diagnóstico para aplicaciones biomédicas : análisis de la interacción ICAM-1/LFA-1 y detección de aspergilosis invasiva*. Tesis-Universidad de Zaragoza thesis. Instituto de Carboquímica,, Zaragoza. 13 , 314 p. pp.
- Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, et al. 2009. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11: 452-9
- Santiago L, Mena C, Arias M, Martin P, Jaime-Sanchez P, et al. 2016. Granzyme A contributes to inflammatory arthritis through stimulation of osteoclastogenesis. *Arthritis & rheumatology*
- Sharma M, Merkulova Y, Raithatha S, Parkinson LG, Shen Y, et al. 2016. Extracellular granzyme K mediates endothelial activation through the cleavage of protease-activated receptor-1. *The FEBS journal* 283: 1734-47
- Sharma D, Kanneganti TD. 2016. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *The Journal of cell biology* 213: 617-29
- Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R, Greenberg AH. 1992a. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *The Journal of experimental medicine* 176: 1521-9
- Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg AH. 1992b. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 175: 553-66
- Simon HG, Fruth U, Kramer MD, Simon MM. 1987. A secretable serine proteinase with highly restricted specificity from cytolytic T lymphocytes inactivates retrovirus-associated reverse transcriptase. *FEBS letters* 223: 352-60
- Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM. 2012. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Molecular medicine* 18: 270-85
- Sower LE, Klimpel GR, Hanna W, Froelich CJ. 1996. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cellular immunology* 171: 159-63
- Suarez R, Buelvas N. 2015. [Inflammasome: activation mechanisms]. *Investigacion clinica* 56: 74-99
- Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Breedveld FC, Froelich CJ, Hack CE. 1999. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clinical and experimental immunology* 116: 366-70
- Trapani JA. 2001. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome biology* 2: REVIEWS3014
- Turvey SE, Broide DH. 2010. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125: S24-32
- Vivier E, Nunes JA, Vely F. 2004. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306: 1517-9
- Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. 2015. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews. Immunology* 15: 388-400

- Wensink AC, Hack CE, Bovenschen N. 2015. Granzymes regulate proinflammatory cytokine responses. *Journal of immunology* 194: 491-7
- Wensink AC, Kemp V, Fermie J, Garcia Laorden MI, van der Poll T, et al. 2014. Granzyme K synergistically potentiates LPS-induced cytokine responses in human monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 5974-9
- Wilson JA, Prow NA, Schroder WA, Ellis JJ, Cumming HE, et al. 2017. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *PLoS pathogens* 13: e1006155
- Williams MA, Bevan MJ. 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology* 25: 171-92
- Zal T, Volkman A, Stockinger B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *The Journal of experimental medicine* 180: 2089-99
- Zeerleder S, Hack CE, Caliezi C, van Mierlo G, Eerenberg-Belmer A, et al. 2005. Activated cytotoxic T cells and NK cells in severe sepsis and septic shock and their role in multiple organ dysfunction. *Clinical immunology* 116: 158-65

8. Anexos

8.1 Abreviaturas

ASC:	Proteína tipo punto asociada a apoptosis
APC:	Célula Presentadora de Antígeno
BMDC:	Células dendríticas derivadas de la médula ósea
BMDM:	Macrófagos derivados de la médula ósea
DAMPs:	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM:	Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FasL:	Ligando de Fas.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
GM-BMDM:	Macrófagos derivados de la médula ósea diferenciados con GM-CSF
gzm:	Granzima
HMG:	Grupo de alta movilidad
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN:	Interferón
IL:	Interleuquina
ILR:	Receptor de interleuquina
IFN:	Interferón
LRR:	Repeticiones ricas en leucina
MCP:	Proteína quimiotáctica de monocitos
NF- κ B:	Factor nuclear κ B
NK:	Célula asesina natural
NLR:	Receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos)
PAMP:	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PAR:	Receptor activado por proteasa
PRRs:	Receptores de reconocimiento de patrones
RNA:	Ácido ribonucleico
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RPMI:	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB:	Suero fetal bovino
Tc:	Linfocito T citotóxico
TCR:	Receptor de antígeno de células T
TIR:	Dominio Toll/ILR del receptor de tipo Toll 4
TLR:	Receptor de tipo Toll
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TRIF:	Dominio TIR que contiene molécula adaptadora que induce el interferón- β