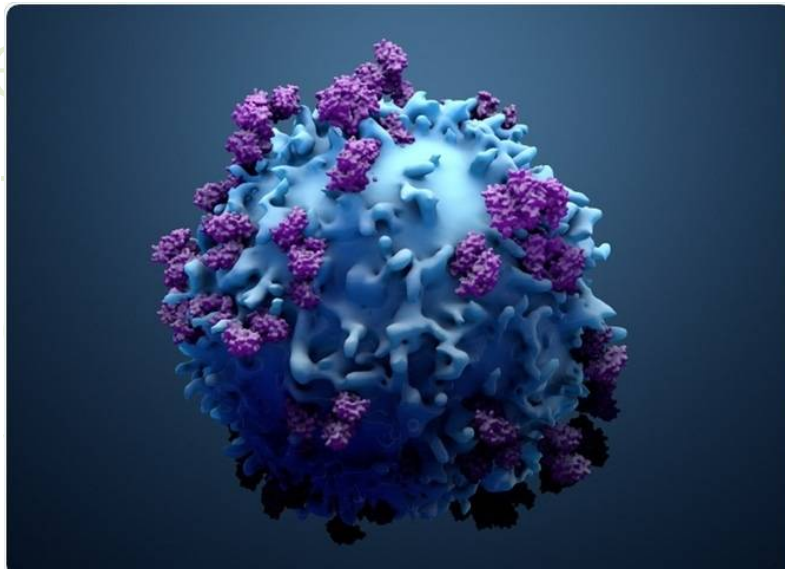


Universidad de Zaragoza

# INMUNOTOXINAS DE LA GRANULISINA PARA EL TRATAMIENTO DEL CANCER

11/09/2020

GERMÁN BERBEGAL PINILLA



2020

**Trabajo Fin de Grado de Biotecnología**

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

**Universidad de Zaragoza**

**Dirigido por Luis Alberto Anel Bernal y por Patricia Alexandra Guerrero Ochoa**

## **INDICE**

0. RESUMEN.....	5
0.1 Summary .....	6
1- INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 - CANCER.....	7
1.2 - MUERTE CELULAR.....	8
1.3. GRANULISINA .....	10
1.4 - MUC-1 Y EL ANTÍGENO Tn .....	12
2 - OBJETIVOS .....	13
3 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 - CULTIVOS CELULARES .....	13
3.2 - CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS .....	13
3.3 - PRODUCCIÓN DE GRANULISINA 9KDA Y AR20.5-GRNLY .....	14
3.4 - EXPRESIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN PICHIA PASTORIS .....	15
3.5 - PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA .....	16
3.6 - PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA .....	16
3.7 - CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD .....	16
3.8 - DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA EN EL STOCK....	17
3.9 - TINCIÓN COOMASIE E INMUNOBLOT .....	17
3.10 - UNION DE AR20.5 A Tn .....	18
3.11 - ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....	18
3.12 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	19

4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1 - PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	19
4.2 - NIVEL DE UNIÓN DE LA INMUNOTOXINA AL ANTÍGENO T <sub>n</sub> .....	20
4.3 - CITOTOXICIDAD DE iAr20.5GRNLY y GRNLY .....	21
4.4 - CITOTOXICIDAD DE iAR20.5GRNLY, AR20.5GRNLY y GRNLY SOBRE en CAPAN-2 .....	23
5 - CONCLUSIONES.....	24
5.1 CONCLUSIONS.....	24
6 - LIMITACIONES .....	25
7 - BIBLIOGRAFÍA.....	25

## 0. RESUMEN

La granulicina (GRNLY) es una proteína que en el organismo es producida por linfocitos T y las células asesinas naturales. La forma recombinante de 9kDa presenta actividad citotóxica contra ciertos microbios y en líneas celulares tumorales. Esto es debido a que presenta una activación de la vía de la apoptosis celular. Estudios realizados previamente sugieren la posibilidad de que GRNLY tendrá relevancia futura en la prevención de infecciones futuras y de cáncer.

En este trabajo y utilizando las bases sentadas por nuestro grupo en la utilización de granulicina contra las células tumorales. Se ha pretendido producir una inmunotoxina (una proteína quimérica recombinante) en la que se fusionaban la granulicina de 9kDa con el scFv anti-tn AR20.5 en la levadura *Pichia pastoris*. En esta levadura se realizan producciones de proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales solubles y correctamente plegadas.

Para ello se utilizó el plásmido pPICZ $\alpha$  C, con el cDNA tanto de la proteína como del anticuerpo, generando el plásmido pPICZ $\alpha$  C-AR20.5GRNLY. Se induce la expresión de la proteína con metanol una vez seleccionadas las cepas que han integrado el plásmido. La proteína se purificó partiendo del sobrenadante del cultivo y la realización de PEG a las colonias de levadura, mediante cromatografía de afinidad con níquel ya que se le añade a la quimera una cola de histidinas para facilitar este proceso.

Una vez purificada la proteína se ensayó la unión del anticuerpo unido a la proteína al antígeno tn, dando resultados variables en diversas líneas celulares y una gran unión a la línea CAPAN-2. Se realizaron también diversos ensayos de bio actividad y se relacionaron estos ensayos con la citotoxicidad de la granulicina recombinante y la unión previamente ensayada al antígeno tn. Se demostró que a través de la unión a tn la inmunotoxina activa la muerte celular, por vía distinta a la apoptótica, dependiente de dosis y relacionado con la citotoxicidad de la propia granulicina. Con estos resultados se puede sentar una base para la producción de esta proteína y su utilización en ensayos *in vivo* previos a una posible utilización en clínica en diversos tumores.

## 0.1 SUMMARY

Granulysin (GRNLY) is a protein produced by T lymphocytes and Natural Killer cells (NK cells). Its 9kDa recombinant form shows cytotoxic activity both against certain microbes and when present in tumor cell lines. This cytotoxicity is due to an activation of the cell apoptosis pathway. Previously conducted studies suggest that GRNLY will indeed have relevance in future infections and cancer prevention.

In this Bachelor Thesis, by employing the previous research basis of our group in the use of GRNLY against tumor cells, an immunotoxin—a chimerical recombinant protein—has been produced. This immunotoxin consisted on the fusion of 9kDa GRNLY with scFv anti-tn AR20.5 in *Pimchia pastoris* yeast. This yeast is known for the production of completely folded recombinant proteins with soluble post-transduction modifications.

For this purpose, the plasmid pPICZ $\alpha$  C, with both protein and antibody cDNA were employed, which resulted in the generation of the plasmid pPICZ $\alpha$  C-AR20.5GRNLY. Protein expression is induced through methanol exposure after isolating the strains that integrated the plasmid. The protein was purified from culture supernatant and Pulsatile Electric Field (PEF) exposure, by means of IMAC to add a histidine Tag I to the chimera, facilitating thus the process.

After protein purification, protein-antibody complex binding assays to Tn antigen were performed. This led to diverse results in different cell lines, showing in particular a high binding to CAPAN-2 line. Several bioactivity assays were also performed, which were also related to recombinant GRNLY cytotoxicity and the aforementioned Tn antigen binding. As a consequence, it was proved that Tn antigen binding to the immunotoxin activates cell death through a different pathway than that of apoptosis. This was dose dependent and related to the own toxicity of GRNLY. These results could lay a foundation for the production of this protein and its use in *in vivo* experiments prior to a possible clinical application in several tumors.

# 1- INTRODUCCIÓN

## 1.1 - CANCER

El cáncer es un problema acuciante en la salud global. Las cifras en el estado español según la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) son de 277.234 casos al año en 2019 y los datos de la OMS atribuyen al cáncer 8.8 millones de muertes en el año 2015.

Presenta una distribución global, todos los seres humanos somos susceptibles de padecer en mayor o menor porcentaje esta enfermedad, está causada por agentes externos como virus, agentes radioactivos, contaminantes, etc.; que actúan provocando errores en el código genético o en los marcadores epigenéticos de células concretas que se transforman a tumorales. Por otra parte existen condicionantes genéticos que predisponen a una mayor incidencia del cáncer (1), (2).

Se piensa que el cáncer es una enfermedad endémica del ser humano, el conjunto de procesos que nos han llevado a ser lo que somos está incompleto o mal ejecutado, la traducción de nuestro código genético da lugar a diversos errores, uno de ellos es el cáncer (2). Existen diversos tipos de células en nuestro organismo, cada una específica para una función, cada vez que una de estas células genera la transformación hacia células tumorales, el fenotipo alcanzado es dispar a otro tipo de células cancerosas. De esta manera, la complejidad, y los diversos tipos de cáncer existentes complican notablemente la “cura del cáncer” por lo que hay que trabajar de forma especializada utilizando distintas estrategias para combatirlo (2).

Las células se comunican entre sí mediante moléculas secretadas o bien a través de proteínas de membrana que sirven para comunicarse con las células vecinas. Las fallas de nuestro código genético que se desencadenan en los tumores hacen que la expresión genética cambie, que el transcriptoma sea distinto y por consiguiente que sus interacciones de proteínas con el entorno y el organismo sean diferentes. El principal problema de las células tumorales es su inmortalidad, la falta de senescencia, presentando un potencial replicativo ilimitado. Esto se basa principalmente en la adquisición de la actividad de la telomerasa. Esta enzima protege la reducción de los telómeros de los cromosomas durante el proceso replicativo evitando que las células tumorales entren en senescencia (3).

El cáncer es un problema de salud acuciante, y es necesario idear nuevas terapias que destruyan las células tumorales afectando lo menos posible a aquellas que llevan a cabo el correcto funcionamiento del organismo.

Como se ha mencionado, la interacción con las células del entorno se ve modificada, por lo tanto se deduce que las proteínas que la célula tumoral expresa en su superficie se ven modificadas también, es decir, los tumores, exponen posibles dianas de tratamientos, cuya expresión no está presente en las células no neoplásicas.

## **1.2 - MUERTE CELULAR**

La muerte celular está programada en el código genético de los seres eucariotas multicelulares superiores, de esta manera se consigue controlar el desarrollo y el crecimiento de las células (4).

La eliminación de las células que han sufrido daños irreparables o en procesos de desarrollo embrionario modela las distintas partes del organismo mientras se desarrollan. Una vez que nos convertimos en adultos tiene una gran relevancia en los procesos de homeostasis celular (5).

Las patologías asociadas a la muerte celular están basadas en alteraciones de ésta, entre ellas el cáncer. Las células cancerígenas han encontrado métodos para evadir los procesos de muerte celular, favoreciendo de esta manera su proliferación descontrolada.

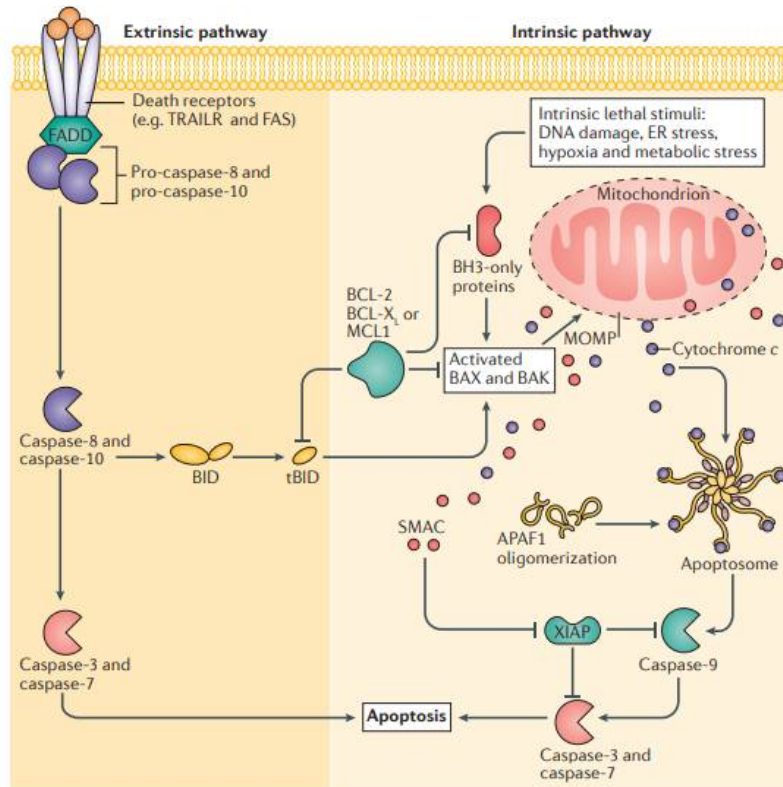
### **1.2.1 - Apoptosis**

Existen dos vías apoptóticas, una iniciada a través de señales internas de la célula (vía intrínseca) y otra a través de señales externas (vía extrínseca), ambas tienen en común la intervención de las caspasas, y en concreto las dos utilizan en última instancia la caspasa 3 y la caspasa 7, como ejecutores finales de la muerte celular (6).

La vía intrínseca es la vía mitocondrial, la más conservada en términos evolutivos. Es una vía autónoma que la célula utiliza como respuesta a diversos estímulos de daño celular. A través de proteínas preapoptóticas se produce la dimerización de Bak y Bax generando poros en la mitocondria, permitiendo la salida del citocromo C. El citocromo C interacciona con el adaptador Apaf-1, que tras el reclutamiento de la caspasa iniciadora caspasa-9, forma el llamado apoptosoma la caspasa 9, procesa y activa posteriormente a las caspasas ejecutoras 3 y 7 (6).

(7) La vía extrínseca tiene dos rutas diferentes, la primera a través de los ligandos mortales, pertenecientes a la familia del TNF, entre los que destacan FasL y Apo2/TRAIL. Estos ligandos mortales se unen a los receptores proapoptóticos Fas o DR4/DR5 respectivamente (7).





**Fig 1** Esquema integrador de ambas rutas de apoptosis. Obtenida de "A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process". Ichim et al., Nat Rev Cancer, 2016 (8)

La segunda se activa a través del proceso de exocitosis de gránulos citotóxicos. Las células T CD8+ y las células NK, contienen un conjunto de proteínas acumuladas en gránulos, como son la perforina, las granzimas y la granulicina (9).

Este proceso se inicia a través de la unión del TCR con el MHC-I y el péptido antigénico, a la vez que se produce la unión de LFA-1 e ICAM-1 y el mecanismo continua con la formación de la llamada sinapsis inmunológica de secreción (10). Finalmente se produce la fusión de los gránulos citotóxicos y la membrana celular, esto lleva a que estas proteínas citotóxicas secretadas en la sinapsis actúen contra células que en su mayoría están sufriendo una infección o contra células tumorales (9). La perforina permite entonces la entrada al citoplasma de la célula diana de la granzima B y ésta activa la apoptosis procesando directamente a la caspasa-3 o bien activando la vía apoptótica mitocondrial (9).

Este mecanismo también lo utilizan las células NK solo que en este caso la activación depende del balance de señales de activación e inhibición a través de sus receptores y no es específico de antígeno. (10)

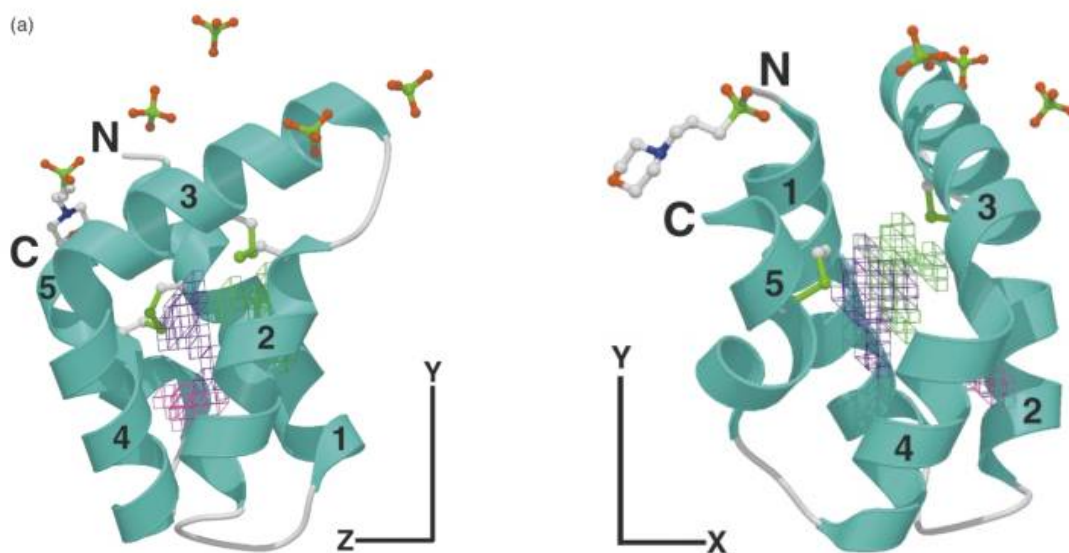
### 1.2.2 - Necroptosis

Es una vía de muerte celular programada alternativa, independiente de las caspasas. La muerte necroptótica es dependiente de las proteínas RIP, esta se manifiesta generando una mayor cantidad de proteínas reactivas de oxígeno mitocondrial,

acompañado con la pérdida de síntesis de ATP. La formación del complejo de las quinasas RIP-1 Y RIP-3 son las que median la iniciación del proceso necroptótico a través del TNF- $\alpha$ , Fas o TRAIL, que generalmente requiere que la activación de caspasas este impedida de alguna manera (5).

### 1.3. GRANULISINA

La granulicina (GRNLY) aparece en los gránulos de los CTL una vez activados y en las células NK de forma constitutiva, cuando se inicia la respuesta inmune, se libera por parte de estas dos células la GRNLY. El gen que codifica para esta proteína, se encuentra en el cromosoma 2. La granulicina presenta dos isoformas estables se encuentra una de 9kDa y otra de 15kDa. La isoforma mas grande, la de 15kDa, tiene una vida media más corta y se secreta de forma constitutiva. El procesamiento proteolítico, de la isoforma de 15kDa lleva a la forma de 9kDa. La isoforma de 9kDa se produce más lentamente, lo cual parece indicar que esta es la forma madura (11).



**Fig 2** Estructura cristalina de la granulicina Anderson, D. H., (2003). J. Mol. Biol. ,

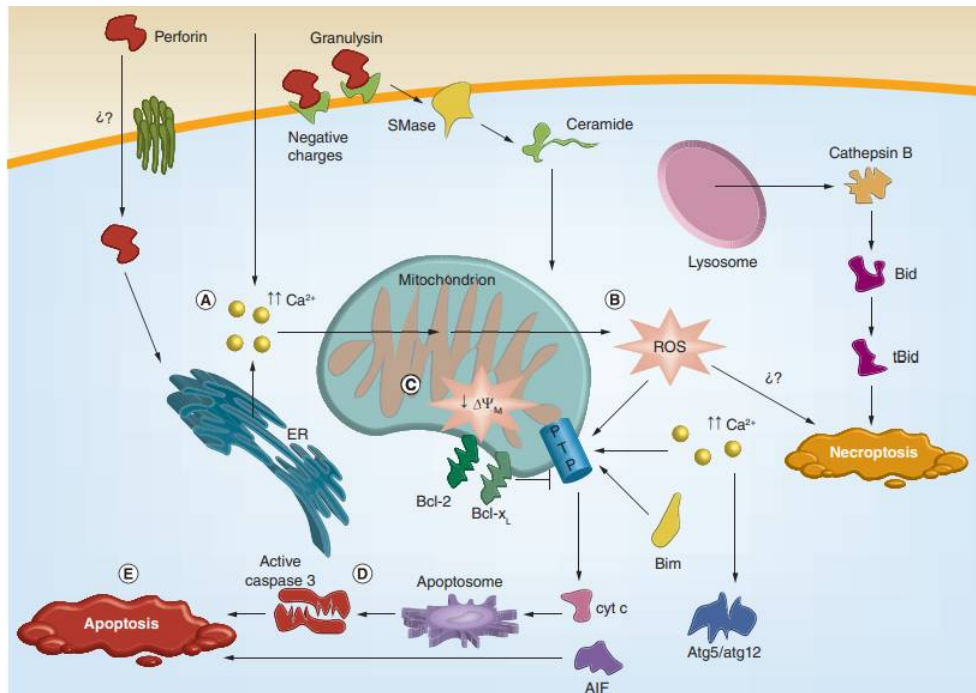
En la Fig 2 se observa la estructura de la proteína obtenida por difracción de rayos X en ambos ejes, pudiendo visualizar óptimamente las 6 hélices alfa que la componen. Las N y C representan el carboxilo y amino terminal (12).

Las cargas positivas presentes en la superficie de la granulicina, permiten a la proteína interactuar con las cargas negativas de los fosfolípidos de las membranas lipídicas (12). La granulicina lisa preferiblemente aquellas células que no presentan colesterol en su membrana (13). Es por ello que la granulicina lisa preferiblemente a bacterias cuyas membranas no posean colesterol, ya que este lípido neutro reduce la carga

negativa neta de las membranas (14), y se considera un péptido antimicrobiano de la familia SAPLIP (12,13)

La isoforma que es citotóxica es la de 9kDa, y es ésta la que se va a utilizar en este trabajo para tratar células tumorales. De hecho, esta isoforma es la que se encuentra asociada a los gránulos de alta densidad (15).

La granulicina tiene gran similitud con la amebaporina, péptido antimicrobiano que poseen las amebas, esto indica el origen evolutivo ancestral de la granulicina (15).



**Fig 3** Mecanismo de acción de granulicina, obtenida de *Death ligands and granulysin: mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities*. *Immunotherapy*, Martínez-Lostao, L., Miguel, D. de, Al-Wasaby, S., Gallego-Lleyda, A., & Anel, A. (2015)

Se ha comprobado que la granulicina es citotóxica sobre células tumorales (11) mediante activación de la vía apoptótica mitocondrial a través de un incremento de Calcio intracelular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ver fig3) (16). Al mismo tiempo se ha demostrado que no es citotóxica sobre linfocitos normales (17), debido probablemente a la diferencia en composición lipídica entre las membranas de células normales y tumorales (18)

Además, se ha comprobado la citotoxicidad de la granulicina recombinante *in vivo* en modelos de ratones atímicos de mieloma múltiple humano H929 o con el adenocarcinoma mamario MDA-MB-231. En estos modelos el tratamiento se hizo intratumoralmente (19). Si se busca un tratamiento sistémico, será necesario

direccionar la proteína hacia el tumor. De aquí nace la idea de realizar una quimera, esta quimera consiste en combinar anticuerpos contra antígenos tumorales con granulicina, la proteína citotóxica. De esta manera se conseguiría que la molécula ejerza la citotoxicidad única y exclusivamente sobre las células tumorales que expresan el antígeno tumoral seleccionado.

#### **1.4 - MUC-1 Y EL ANTÍGENO Tn**

El cambio en la expresión de antígenos en la superficie de las células tumorales permite en teoría direccionar tratamientos hacia esos factores que únicamente expresan los tumores. Uno de los factores que modifican su expresión es la glicoproteína MUC-1 y su patrón de glicosilaciones (18).

Muc-1, es una proteína que se encuentra en la superficie apical de las células epiteliales normales. Cuando la célula sufre la transformación tumoral, se produce un aumento en su expresión, y además ésta sufre O-glicosilaciones aberrantes. El antígeno Tn es una de estas glicosilaciones aberrantes y es una diana óptima para la terapia antitumoral (20). Además, en las células normales, Muc-1 tiene una expresión polar, sin embargo en los carcinomas, pierde esta polaridad y se expresa alrededor de toda su superficie (21).

#### **1.5 - INMUNOTOXINAS**

Las inmunotoxinas combinan la capacidad de destrucción celular de una citotoxina con la especificidad de un anticuerpo monoclonal, superando las limitaciones de cada una.

En 2018 se aprobó en Estados Unidos la primera inmunotoxina basada en anticuerpos, el fármaco combina un fragmento de anticuerpo recombinante anti-CD22 fusionado a una forma trunca de la exotoxina A de *Pseudomonas* (22).

Tras la observación de la actividad citolítica de la granulicina recombinante en células tumorales, se planteó la utilización de granulicina de forma sistémica; sin embargo, la administración sistémica de agentes citotóxicos provoca graves efectos secundarios. Por lo tanto se plantea administrar de forma dirigida la granulicina.

Por ejemplo, MFE23 es un fragmento de anticuerpo que presenta como antígeno de alta afinidad al antígeno carcinoembrionario (CEA) y se ha combinado previamente con la granulicina, obteniéndose buenos resultados (23). SM3 o AR20.5 son anticuerpos con afinidad por el antígeno Tn (24) (25). Para generar una inmunotoxina basada en la granulicina, ésta se debe unir a estos anticuerpos, que son los que dirigirán la proteína citolítica hacia el tumor.

## **2 - OBJETIVOS**

- Producción de la inmunotoxina AR20.5-GRNLY tanto intracelular como extracelular.
- Analizar la unión de AR20.5-GRNLY a células tumorales que expresan el antígeno Tn.
- Analizar la diferencia de citotoxicidad de AR20.5-GRNLY y de GRNLY sobre estas líneas tumorales

## **3 - MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 - CULTIVOS CELULARES**

Se ha trabajado con líneas celulares humanas MCF-7 línea celular de adenocarcinoma epitelial mamario, a549, carcinoma epitelial pulmonar Panc-1 carcinoma pancreático, H929 mieloma en linfocito b, MDA-MB-231 adenocarcinoma epitelial mamario, Jurkat leucemia aguda de tipo T y Capan-2 adenocarcinoma pancreático, Jurkat y H929 se han cultivado en RPMI 1640 (Gibco®), con suplemento al 10% de suero fetal bovino SFB, L-glutamina, penicilina (1000 U/ml) y estreptomycin (10mg/ml), también se ha usado el DMEM para el resto de líneas (Gibco®) suplementado de la misma manera. Se utilizó un incubador termostático a 37°C, aire saturado de humedad y el CO<sub>2</sub> al 5%. Se almacenaron las células en frascos de cultivo de 25 a 75 cm<sup>3</sup>, los cultivos se mantuvieron en el incubador termostático.

Todos los días se observaba en microscopio invertido el estado de las células y se contaban cada 2 o 3 días con un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i), El método de conteo usaba la tinción vital con azul tripán en una cámara de Neubauer. Las células con la membrana dañada permitían la entrada a la célula del colorante, por lo que aquellas células teñidas no son células viables, no se tenían en cuenta para el recuento final, mientras que las no teñidas se consideraban viables.

### **3.2 - CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS**

La preservación y el almacenamiento de las células se realizó a -195°C en nitrógeno líquido o en congelador a -80°C. En los criotubos para preservación se añadieron 5x10<sup>6</sup> células en 1.5ml de SFB con un 10% de DMSO que actuaron como crioprotector, y se congeló gradualmente, primero a -20°C, luego a -80°C y finalmente se trasvasa al contenedor de N<sub>2</sub> líquido

Para descongelarse, se añadió medio completo a las células atemperado a 37°C, la suspensión descongelada se llevó con el medio a un tubo cónico y se centrifugó 1500rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en nuevo medio.

### 3.3 - PRODUCCIÓN DE GRANULISINA 9KDA Y AR20.5-GRNLY

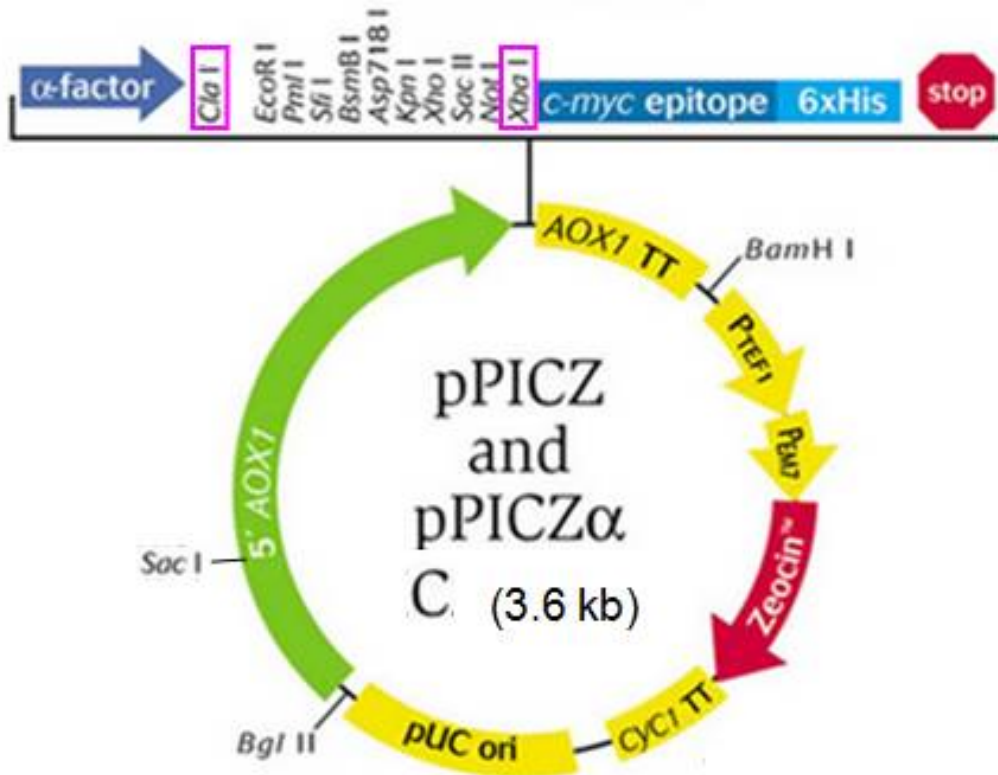
Material genético de partida: pPICZ $\alpha$ C-GRNLY y pPICZ $\alpha$ C-Ar20.5-GRNLY,

pPICZ $\alpha$ C, es un plásmido integrativo que contiene los siguientes elementos:

- pUC ori: origen de replicación de E.Coli, permite replicación en la bacteria.
- Promotor AOX1: inducible por metanol, dirige la integración en el locus AOX1, por recombinación homologa en *Pichia*.
- Factor  $\alpha$ : permite la secreción extracelular de la proteína producida.
- Sitio de clonaje múltiple: permite la inserción de DNA en el vector de expresión mediante el corte con Enzimas de restricción.
- Epítocpoc-myc: permite la detección con anticuerpos anti-myc,
- His-tag: cola de 6 histidinas que se expresan junto a la proteína, facilita la purificación de la proteína recombinante.
- Terminador AOX1: incrementa la estabilidad del mRNA permitiendo un eficiente procesamiento del extremo 3' del mRNA, incluyendo poliadenilación.
- Gen de resistencia a zeozina: el antibiótico de alto espectro es utilizado como marcador de selección. Esta flanqueado por promotores *TEF1* y EM7 y terminador de la transcripción *CYC1*.

Los cDNA tanto de la GRNLY como del AR20.5 unido a GRNLY, se integran directamente en fase entre los sitios de corte de Cla I y Xba I, se encuentran en el sitio de clonaje múltiple (marcadas en rosa en la figura), en el marco de lectura de pPICZ $\alpha$ C.

El plásmidos pPICZ $\alpha$ C-GRNLY fue sintetizado por la Dra. Laura Sanz (Hospital Puerta de Hierro, Madrid). El plásmidos pPICZ $\alpha$ C-AR20.5GRNLY fue diseñado por el doctor Ramón Hurtado del BIFI, Universidad de Zaragoza.



**Fig 4** Mapa de pPICZ $\alpha$  C, vector utilizado para el clonaje en *Pichia* y *E.Coli*

### 3.4 - EXPRESIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN *PICHIA PASTORIS*

Inicialmente debe transformarse *E.Coli* mediante electroporación para multiplicar el número de plásmidos que tenemos.

Se transforma con ambos dos plásmidos, el que contiene la quimera y el que contiene la granulinsina, se transforma por electroporación y se seleccionan las cepas con el medio LB, que contiene zeozina. Crecen las bacterias que presentan el plásmido, se aísla el plásmio mediante una miniprep, con el kit "Nucleospin® Plasmid Easypure". Se realiza electroforesis para conocer el tamaño de los plásmidos asegurándose que el plásmido esta correctamente multiplicado y es el que deseamos.

Posteriormente se debe transfectar en *Pichia*, inicialmente lo que se debe hacer es digerir el plásmido paralinealizarlo, para eso está presente el sitio SacI, que solo presenta un sitio de corte. El plásmido circular y el lineal correrán en el gel de forma diferente, por lo que realizando una electroforesis con agarosa de 1% podemos comprobar si la digestión se ha llevado a cabo correctamente.

Se electroporan las levaduras con el electroporador (MicroPulser™ de BIORAD), se cocultiva la levadura en una placa con zeozina y otra sin ella. Una vez que se han obtenido cepas que crezcan bien en zeozina. Se aíslan algunas de las colonias que han crecido mejor como candidatas a cepas productoras.

### **3.5 - PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA**

Las colonias seleccionadas, se inocularon en medio BMGY (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 100 mM tampón fosfato pH6, 13.4 g/L base de levadura nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 1ml/L glicerol y 0,4mg/L de biotina), cultivando en agitador a parte (diferente y distanciada de la zona de trabajo de cultivos celulares). Posteriormente se cambió a BMMY 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 100 mM tampón acetato de sodio pH5, 13.4 g/L base de levadura nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 0,5 ml/L glicerol y 0,4mg/L de biotina). Se cultivó en todo momento en un agitador a 30°C. La inducción de la producción se hizo con 8 ml de metanol en cada uno de los tanques de cultivo. Se produjeron diálisis que se dejaban toda la noche.

En el caso específico de AR20.5-GRNLY se añadió un procedimiento adicional debido a que la producción a partir del sobrenadante de las levaduras (proteína extracelular) es baja extracelular, para ello, colaboramos con el grupo de Javier raso en el CITA, UZ, para realizar electroporación de las levaduras usando el método de campos eléctricos pulsados (26). Con este método se consigue generar pequeños poros en las membranas de las levaduras a través de los cuales la célula va perdiendo sus proteínas intracelulares sin que se produzca la lisis celular completa.

Las condiciones a las que previa optimización se realizaron los pulsos de campo eléctrico fueron los siguientes: 8kV, pulsos de 3us, un espacio de 0.4 cm en el que pasaba la muestra y se le sometía al campo eléctrico a través de una distancia de 3 cm., con un caudal de 5l/h, y un total de 30 pulsos, temperatura de entrada de 20°C y la de salida de entorno a 35°C no llegando nunca a 37°C).

### **3.6 - PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA**

El sobrenadante debe ser filtrado, mediante vacío, inicialmente con un filtro de 0,45 µm y posteriormente con filtro de 0,22 µm. Se concentró hasta llegar a un volumen mucho menor. Seguidamente se sometía a diálisis toda la noche, con un volumen en tampón la 300 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl y 20 mM de imidazol pH 7,4. el imidazol compete con las moléculas que se unen inespecíficamente al níquel.

### **3.7 - CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

Como hemos visto en el vector, a la secuencia de ambas proteínas va unida una cola de histidinas, esta facilita la purificación. Mediante la interacción entre los anillos de imidazol de las histidinas y los cationes divalentes de la resina de agarosa, NTA agarosa (Qiagen). La resina se mezcla con tampón de lavado, se centrifuga a 2500 rpm durante 2 min eliminándose el sobrenadante, se resuspende de nuevo la resina en tampón de lavado y se mezcla con el resultado de la diálisis. Seguidamente se coloca en una rueda de agitación, durante 1 h y 30 min y posteriormente, se centrifuga a 2500 rpm durante 5 min. El precipitado obtenido se coloca en una columna de tampón de lavado y ésta se eluye con tampón de elución (500 mM de imidazol, 300 mM de NaCl y 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4).



La concentración de la proteína se realiza posteriormente con Amicon, de tamaño máximo para la quimera de 15kDa y para la granulicina con un tamaño máximo de 3kDa., se cambia el tampón por PBS y se va centrifugando a 1500 rpm, durante 5 minutos y se va añadiendo PBS al Amicon, de esta manera en la parte filtrada iremos acumulando la proteína de interés.

### **3.8 - DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA EN EL STOCK**

Se realiza mediante Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit el cual es un método colorimétrico de detección y cuantificación de proteína total. A nivel químico la cuantificación se basa en la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Ca}^+$  por la proteína en un medio alcalino, la detección de esta reducción se hace mediante el ácido bicinónico (BCA), la concentración total de la proteína es exhibida por el cambio de color de la proteína hacia púrpura, este complejo púrpura se mide en espectrofotometría a 550 nm. Se cuantifica la proteína presente en la solución midiendo el espectro de absorción y comparándose con una recta de calibrado realizada con diferentes diluciones de proteína de concentración conocida.

En nuestro caso se añadieron 14  $\mu\text{l}$  de la muestra proteica junto a 366  $\mu\text{l}$  de PBS y 100  $\mu\text{l}$  del reactivo BCA en una placa de 96 pocillos y se dejó incubando 20 minutos a 60 °C hasta la aparición de un color morado intenso.

### **3.9 - TINCIÓN COOMASIE E INMUNOBLOT**

Para comprobar la expresión de las proteínas o su grado de pureza tras la purificación se realiza electroforesis desnaturante, con un gel concentrador, o “stacking gel” con un 6% de acrilamida y gel separador o “resolving gel” con un 12% de acrilamida. Seguidamente, se tiñeron dichos geles con Azul Coomassie. Se utilizaron cubetas Bio-Rad (Life Sciences, California, USA)

Se presenta también la utilidad de comprobar que solo tenemos nuestra proteína con un western-blot posterior. Inicialmente se separan las proteínas mediante el gel, en segundo plano se transfieren las proteínas del gel a una membrana la cual se expone a un anticuerpo específico para la proteína que se desea revelar. Se añade un segundo anticuerpo el cual tiene fluorescencia, por lo tanto al revelarlo se observará fluorescencia allá donde se haya unido la proteína. Las incubaciones se realizarán durante 1 hora en el agitador y una vez realizada la incubación se lava con tampón B un total de 3 veces.

El equipo de transferencia utilizado fue (GE Healthcare, Chicago, USA) a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond™ -P, GE Healthcare, Chicago, USA).

### **3.10 - UNION DE AR20.5 A Tn**

Para ensayar la unión del anticuerpo al anticuerpo tn se añadió la quimera en frío sobre las células, seguida de un anticuerpo anti cola de histidinas hecho en ratón y de un anticuerpo anti-IgG de ratón unido a FITC. Al mismo tiempo, se comparó siempre esta tinción con la del anticuerpo anti-cola de histidina mas el anticuerpo anti igG de ratón unido a FITC como control negativo en cada línea celular analizada Se Incubó la quimera a (10 µg/ml) con las células durante una hora a 4 °C y se lava con PBS al 5%, se añade el anticuerpo anti cola de histidinas y posteriormente el anti-ratón unido a FITC. Amos dos a una dilución (1:200). Seguidamente se realiza el análisis por citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience)

Los datos obtenidos del citómetro se han analizado mediante el programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software Inc.*).

### **3.11 - ENSAYO DE CITOTOXICIDAD**

La citotoxicidad de GRNLY o de AR20.5 GRNLY se ensayó en diferentes líneas celulares MCF-7 línea celular de adenocarcinoma epitelial mamario, a549, carcinoma epitelial pulmonar Panc-1 carcinoma pancreático, H929 mieloma en linfocito b, MDA-MB-231 adenocarcinoma epitelial mamario, Jurkat leucemia aguda de tipo T y Capan-2 adenocarcinoma pancreático.

En los experimentos de citotoxicidad se incubaron las células con anexina V. Conjugada con el fluoróforo 7AAD, en tampón ABB durante 15 min en la oscuridad, de esta manera en los ensayos de citometría podemos averiguar el porcentaje de células que han perdido su integridad de membrana. La anexina presenta afinidad por la fosfatidilserina, la cual empieza a aparecer una vez que la integridad de la membrana ha desaparecido.

En todas las células se realizó ensayos comparativos de granulicina y la quimera, comparando de esta manera la capacidad citotóxica de ambas proteínas. Se comparó el número de células a cada concentración de fármaco en cada pocillo, conociendo así el porcentaje de muerte celular respecto al control.

Se sembraron entre 30.000 cels/pocillo y 50.000 cels/pocillo, durante un tiempo de 24 horas con diluciones seriadas de AR20.5GRNLY iAR20.5GRNLY y GRNLY. Una vez se ha incubado durante 24h se transfieren las células de cada pocillo a un tubo de citometría, estos se centrifugan a 3500 rpm durante 3 minutos en una centrifugadora *Beckman and Coulter* (Rotor SX4750A).

Se eliminó el sobrenadante y se añadió 0.01µl por punto disuelto en 1µl por punto de ABB (Annexin Binding Buffer (Sigma, St. Louis, USA)). Se incubó durante 20 minutos en oscuridad se añadieron 200µl de ABB por pocillo se analizó con el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) utilizando el canal FLH-1 (para el marcaje con Anexina V- FITC)

### 3.12 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se han realizado mínimo un número de 3 duplicados (n=3) para poder ser tenidos en consideración. En los experimentos que hemos realizado varias veces, el resultado se muestra como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). casos en los que se han comparado variables de este tipo se aplicó el test t de Student, considerándose estadísticamente significativos los valores  $p < 0,05$ .

## 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 - PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de la quimera entre el scFv AR20.5 y la granulicina (AR20.5GRNLY). En la tabla 1 se resumen las características más importantes de dicha proteína recombinante.

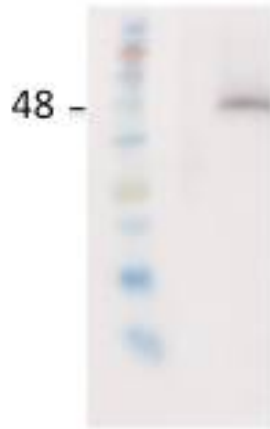
**AR20.5-LINKER-GRANULISINA (9 kDa)-COLA DE HISTIDINAS**

**Fig 5** Estructura de la inmunotoxina.

Proteína	AR20.5grnly
Número de aminoácidos	352
Peso molecular teórico del péptido	37708.12
pI teórico	9.48
Coefficiente de extinción molar $M^{-1} cm^{-1}$ a 280nm	58830
Coefficiente de extinción molar $M^{-1} cm^{-1}$ a 280nm (todas las cys reducidas)	58830

**Tabla 1** Datos de la proteína recombinante AR20.5GRNLY.

En la Figura 6 se muestra un inmunoblot de la proteína purificada, obtenida a partir de levaduras electroporadas utilizando la técnica de “pulsed electric fields” (proteína intracelular). Se observa que la proteína tiene un peso molecular cercano al marcador de peso molecular de 48 kDa. Esto implica que su peso molecular es superior al que se predice a partir del peso molecular del polipéptido, lo cual es probablemente debido a las glicosilaciones que las levaduras suelen ejercer sobre las proteínas que sintetizan. Esta observación ya se realizó previamente en la inmunotoxina realizada con el anticuerpo anti-CEA MF23 (23), en la obtenida con el anticuerpo SM3 (27) y también en producciones previas de AR20.5GRNLY a partir de sobrenadantes de cultivo de la levadura *Pichia pastoris* (proteína extracelular; Patricia Guerrero, comunicación personal).



**Fig 6** Inmunoblot de la proteína AR20.5GRNLY purificada a partir de levaduras electroporadas

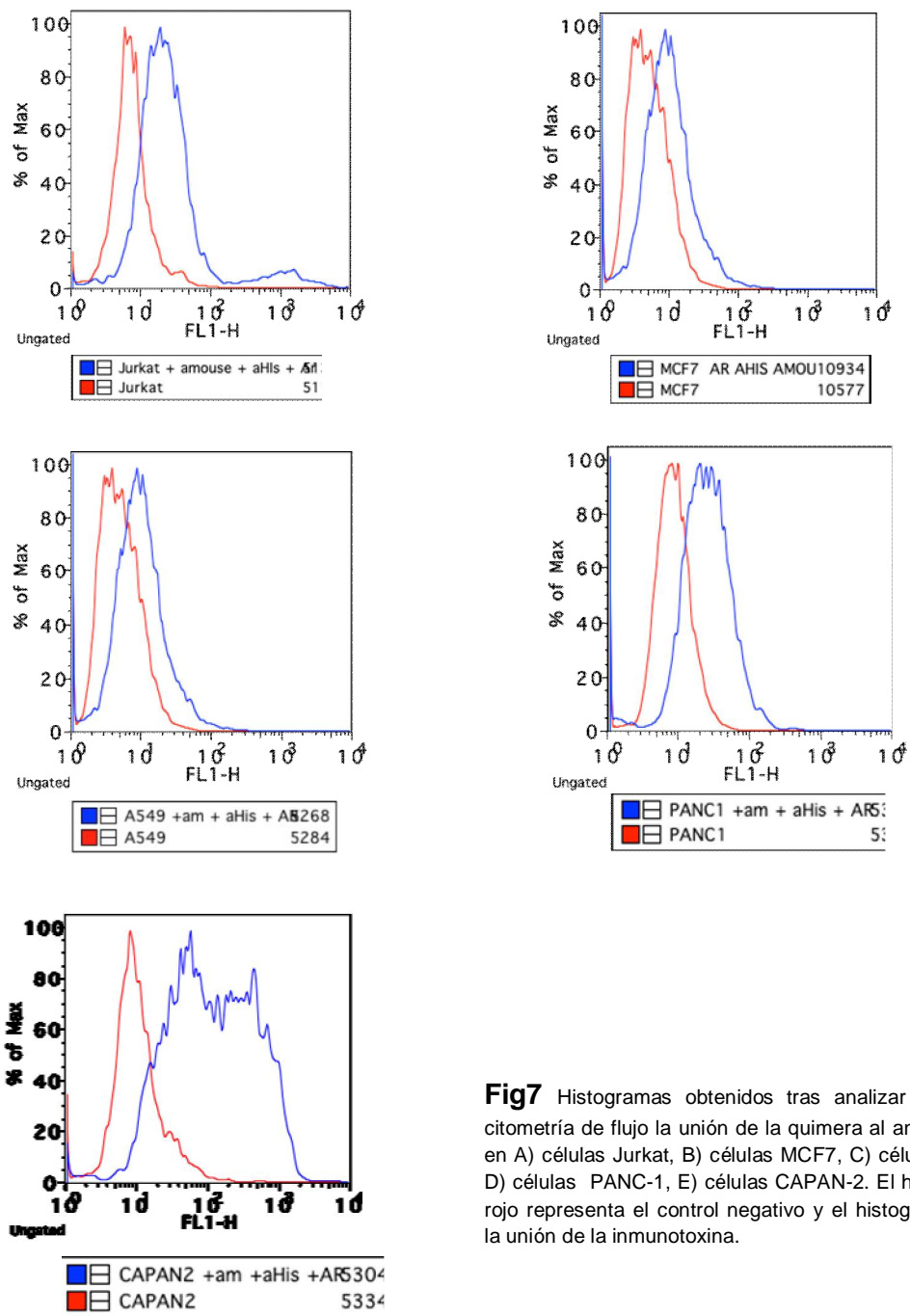
#### **4.2 - NIVEL DE UNIÓN DE LA INMUNOTOXINA AL ANTÍGENO Tn**

Lo primero que se ensayó fue la unión de la proteína quimérica al antígeno Tn expresado en la superficie de líneas celulares tumorales que se ha descrito que expresan dicho antígeno. Este estudio se realizó por citometría de flujo y detección de fluorescencia.

Las células analizadas fueron las siguientes: MCF-7 línea celular de adenocarcinoma epitelial mamario; A549, carcinoma epitelial pulmonar; Jurkat, leucemia aguda de tipo T; Panc-1 y Capan-2, adenocarcinomas pancreáticos. Para este análisis se añadió la inmunotoxina en frío y posteriormente un anticuerpo anti cola de histidinas y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón que lleva unido FITC. De esta manera se observará el marcaje fluorescente en la superficie celular y sabremos a qué línea celular presentará unión AR20.5GRNLY a Tn. Junto con esta prueba se realizaron controles negativos usando los mismos reactivos en ausencia de AR20.5GRNLY para certificar la especificidad de la unión.

Se puede observar en la Fig 7 que en todas las células existe un aumento significativo de intensidad de fluorescencia si se compara con el control negativo, lo cual demuestra la expresión de este antígeno en la superficie de todas las células analizadas. La intensidad media de fluorescencia del histograma se encuentra alrededor de valores de 10 en el caso de las células MCF7 y A549, de valores de 20 en el caso de las células Jurkat y Panc1, pero este valor es mucho mayor en el caso de las células Capan2, llegándose en este caso a valores medios de alrededor de 200.

Estos datos demuestran que la inmunotoxina se une al antígeno Tn en la superficie de todas las líneas celulares analizadas, pero que lo hace de forma especialmente intensa en la línea de adenocarcinoma pancreático Capan2.



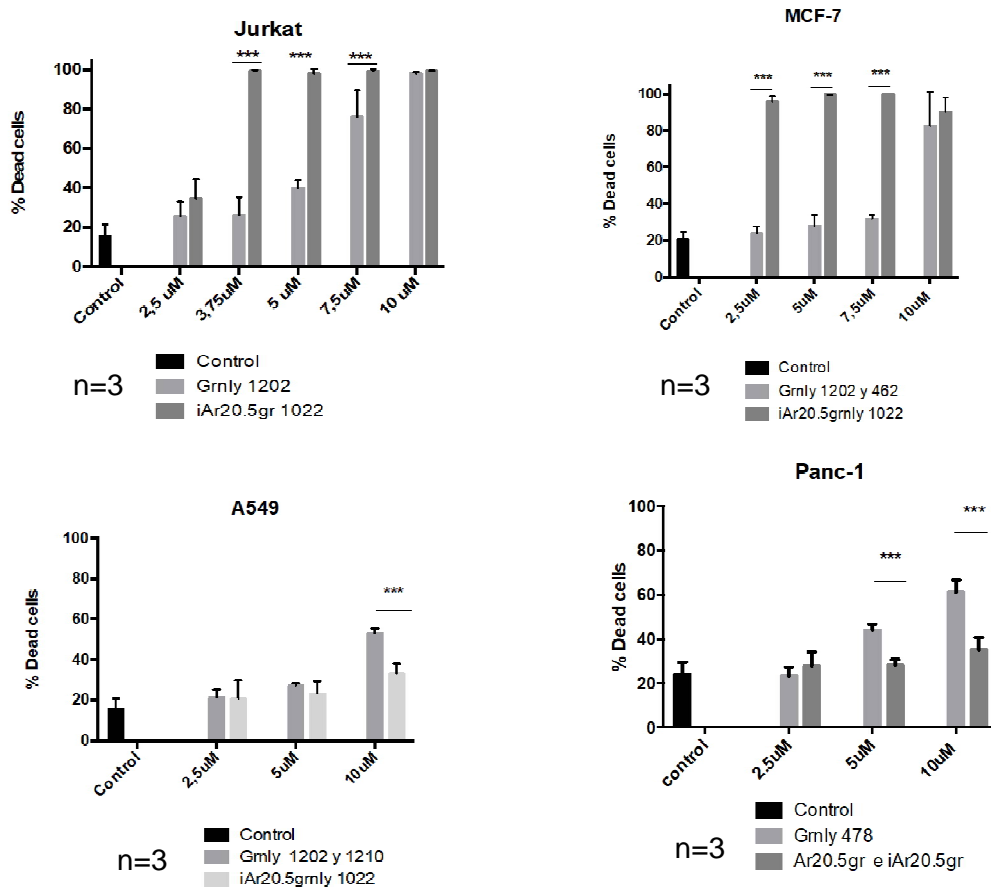
**Fig7** Histogramas obtenidos tras analizar mediante citometría de flujo la unión de la quimera al antígeno Tn en A) células Jurkat, B) células MCF7, C) células A549, D) células PANC-1, E) células CAPAN-2. El histograma rojo representa el control negativo y el histograma azul la unión de la inmunotoxina.

### 4.3 - CITOTOXICIDAD DE iAr20.5GRNLY y GRNLY

En los ensayos de citotoxicidad realizados en el citómetro, se obtuvieron los siguientes resultados de porcentaje de muerte celular contados sobre el total.

Como control negativo se utilizó un volumen de PBS equivalente al añadido de la quimera. Mediante citometría de flujo se midieron el porcentaje de células muertas apoyándonos en los gráficos de anexina positivos, tras 24 horas de incubación.

Seguidamente, se realizaron ensayos de citotoxicidad para comparar la posible diferencia entre AR20.5GRNLY y GRNLY sobre las líneas tumorales analizadas. Para ello se ensayaron distintas concentraciones de granulicina y de inmunotoxina. En el caso de las células Jurkat, MCF7, A549 y Panc1 solamente se pudo ensayar el lote de proteína intracelular que se muestra en la Figura 6 por problemas de tiempo de utilización del laboratorio como consecuencia de la pandemia de la COVID-19. En el caso de las células Capan2, se pudo ensayar además un lote de inmunotoxina producido a partir del sobrenadante de cultivo de *Pichia*, proteína en este caso extracelular. Tras las incubaciones de 24h con las diferentes dosis de las proteínas indicadas en cada caso, las células se marcaron con anexina V unido covalentemente a FITC, como marcador apoptótico para analizar la muerte celular.



**Fig 8** Experimento de la citotoxicidad de la inmunotoxina intracelular (iAR20.5GRNLY) y la granulicina (GRNLY) sobre las líneas celulares Jurkat, MCF-7, A549 y Panc-1. Se utilizaron diferentes concentraciones de ambas. Como control se utilizaron células en cultivo tratadas con la mayor cantidad de PBS usada en los ensayos con las proteínas recombinantes. Se ensayó por citometría de flujo tras 24h de incubación.

Las células Jurkat son sensibles a la citotoxicidad ejercida por ambas proteínas a altas concentraciones, sin embargo la citotoxicidad de iAR20.5GRNLY es más alta que la de GRNLY, presentando esta línea celular una  $IC_{50}$  de 6  $\mu$ M para la GRNLY y de tan solo 3  $\mu$ M para la inmunotoxina.

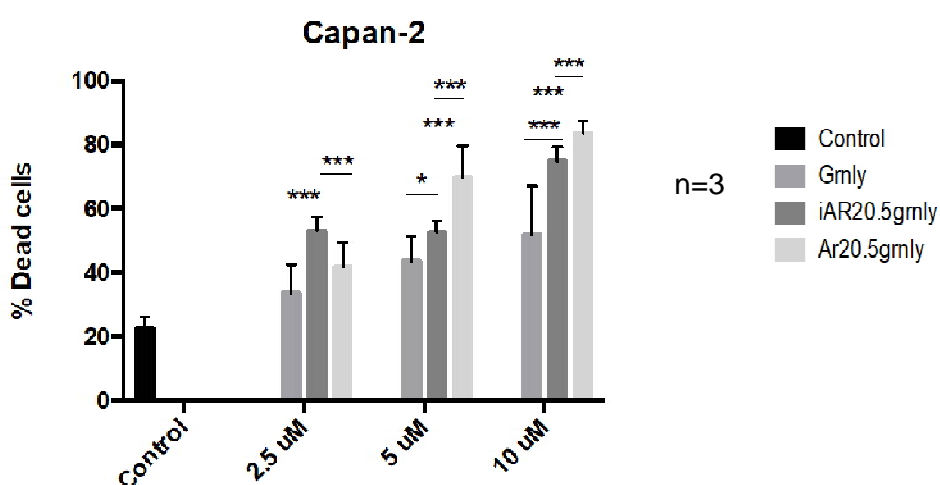
Las células MCF-7 son solamente sensibles a la inmunotoxina a concentraciones de hasta 7.5  $\mu$ M, aunque resulta sensible también a la granulicina a 10  $\mu$ M.

En estas dos líneas celulares se muestra pues una mayor eficiencia de la inmunotoxina a la hora de provocar la muerte celular. La línea celular MCF7, especialmente resistente a la GRNLY, pero muy sensible a AR20.5GRNLY no expresa caspasa 3 (28), lo cual implica que la muerte celular por apoptosis estaría impedida. La alta mortalidad provocada por la inmunotoxina sugeriría que el mecanismo de muerte inducido por esta proteína sería diferente al apoptótico. Parece ser que MUC-1 tiene influencia sobre el proceso necroptótico (29), por lo que podría ser que la inmunotoxina pudiera activar esta vía en ausencia de activación de caspasas. La confirmación de esta hipótesis requeriría en cualquier caso de experimentación adicional.

Las células A549 no fueron sensibles a altas concentraciones ni de la inmunotoxina ni de la granulicina. Sin embargo la citotoxicidad de AR20.5GRNLY resultó ser menor que la de GRNLY a la dosis más alta empleada, de 10  $\mu$ M. En cualquier caso, su IC<sub>50</sub> es muy alto, superior en ambos casos a 10  $\mu$ M.

Las células Panc-1 se comportaron de forma similar a las A549, demostrando una gran resistencia a la citotoxicidad de la granulicina y una IC<sub>50</sub> también muy alta para ambas proteínas.

#### 4.4 - CITOTOXICIDAD DE iAR20.5GRNLY, AR20.5GRNLY y GRNLY en CAPAN-2



**Fig 9** Experimento de la citotoxicidad de la inmunotoxina intracelular (iAR20.5GRNLY) o extracelular (AR2.5GRNLY) y de la granulicina (GRNLY) sobre las línea celular Capan-2. Se utilizaron diferentes concentraciones de ambas. Como control se utilizaron células en cultivo tratadas con la mayor cantidad de PBS usada en los ensayos con las proteínas recombinantes. Se ensayó por citometría de flujo tras 24h de incubación.

Las células CAPAN-2 fueron tratadas con diferentes dosis de GRNLY e inmunotoxina tanto extracelular como intracelular. La citotoxicidad de las dos inmunotoxinas en este caso fue sustancialmente mayor que la de la GRNLY. Mientras que la granulicina exhibe una IC<sub>50</sub> de 10 $\mu$ M, la IC<sub>50</sub> de la inmunotoxina intracelular es de tan solo 2.5  $\mu$ M y la de la inmunotoxina extracelular de 3  $\mu$ M, muy similares entre sí (Figura 8).

Los resultados obtenidos indican que, cuando el nivel de unión de la inmunotoxina, relacionado con el nivel de expresión del antígeno Tn, es muy elevado, como es el caso de las células Capan-2, la unión del anticuerpo al antígeno aumenta sustancialmente la citotoxicidad de la granulicina sobre las células tumorales. Sin embargo, cuando el nivel de unión de la inmunotoxina, o de expresión del antígeno Tn, no es tan alto, la inmunotoxina no siempre mejora la citotoxicidad de la granulicina sobre las células tumorales. Esta mejora se observa claramente en las células Jurkat y MCF7, en las que la granulicina por sí misma ya ejerce una cierta citotoxicidad a dosis no demasiado altas. Sin embargo, las células A549 y Panc1, en las que no se observa aumento de la citotoxicidad por parte de la inmunotoxina, son por sí mismas muy resistentes a la citotoxicidad ejercida por la granulicina y la unión del anticuerpo al antígeno Tn no es capaz de superar esta resistencia.

## **5 - CONCLUSIONES**

- Se ha conseguido expresar y purificar de manera exitosa la proteína recombinante AR20.5GRNLY expresada en la levadura *P. pastoris*.
- Se ha demostrado la unión específica por parte de la inmunotoxina al antígeno Tn en diversas líneas celulares tumorales.
- La inmunotoxina mejora la actividad citotóxica respecto de la granulicina en aquellas líneas celulares en las que el antígeno presenta un nivel de expresión elevado o en células que ya presentan una cierta sensibilidad a la granulicina.

### **5.1 CONCLUSIONS**

- The expression and purification of *P. pastoris* yeast-expressed AR20.5GRNLY recombinant protein was successfully achieved.
- The existence of a specific binding of Tn antigen to immunotoxin has been proved in several cell lines.
- The immunotoxin has proven to enhance cytotoxic activity with respect to GRNLY in those cell lines in which the antigen shows a high expression level and also in cells that already showed certain GRNLY sensitivity.



## 6 - LIMITACIONES

En 2020 la pandemia mundial provocada por la COVID-19 y los confinamientos como medida de combate contra ella nos han impedido acceder todo lo que nos hubiera gustado al laboratorio. Con mayor tiempo se podrían haber realizado más experimentos, ahondando más en los mecanismos por los que la inmunotoxina causa la muerte de la célula, por apoptosis o por necroptosis. También habría sido conveniente haber podido realizar ensayos sobre células no tumorales, como por ejemplo linfocitos de sangre periférica. En cualquier caso, esta línea de investigación se continuará en el grupo de investigación, y los resultados de este trabajo sugieren que la inmunotoxina tiene opciones de direccionar el tratamiento hacia el tumor, algo que ha de demostrarse en experimentación *in vivo* que está todavía pendiente

## 7 - BIBLIOGRAFÍA

(1) Puisieux, A., Pommier, R. M., Morel, A.-P., & Laval, F. (2018). Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 33(2), 164–172.

(2) Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, 9(4), 138–141.

(3) Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):611–622.

(4) J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug; 26(4): 239–257.

(5) Irrinki, K. M., Mallilankaraman, K., Thapa, R. J., Chandramoorthy, H. C., Smith, F. J., Jog, N. R., ... Madesh, M. (2011). Requirement of FADD, NEMO, and BAX/BAK for Aberrant Mitochondrial Function in Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Necrosis. *Molecular and Cellular Biology*, 31(18), 3745–3758.

(6) SEN, S. (1992). PROGRAMMED CELL DEATH: CONCEPT, MECHANISM AND CONTROL. *Biological Reviews*, 67(3), 287–319.

(7) Galvin, B. D., Denning, D. P., & Horvitz, H. R. (2011). SPK-1, an SR protein kinase, inhibits programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 1998–2003.

(8) Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A., & Eisenberg, D. (2003). Granulysin Crystal Structure and a Structure-derived Lytic Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 325(2), 355–365.

(9) Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, Wallich R, Müllbacher A, Froelich CJ, Simon MM. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect.* 2009;11(4):452–459.

- (10) Stinchcombe, J. C., **Bossi G, Booth S,** & Griffiths, G. M. (2001) The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges, *Immunity*, 15(5), 751-761.
- (11) Peña S V., Krensky AM. *Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. Semin Immunol.* 1997;9(2):117–125.
- (12) Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, Ernst W, Modlin R, Krensky A, Eisenberg D. *Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. J Mol Biol.* 2003. 325(2):355-65.
- (13) Stenger, S. (1998). *An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. Science*, 282(5386), 121–125.
- (14) Barman, H., Walch, M., Latinovic-Golic, S., Dumrese, C., Dolder, M., Groscurth, P., & Ziegler, U. (2006). *Cholesterol in Negatively Charged Lipid Bilayers Modulates the Effect of the Antimicrobial Protein Granulysin. Journal of Membrane Biology*, 212(1), 29–39.
- (15) Kolter, T., Winau, F., Schaible, U. E., Leippe, M., & Sandhoff, K. (2005). *Lipid-binding Proteins in Membrane Digestion, Antigen Presentation, and Antimicrobial Defense. Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41125–41128.
- (16) Martinez-Lostao, L., Miguel, D. de, Al-Wasaby, S., Gallego-Lleyda, A., & Anel, A. *Death ligands and granulysin: mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities. Immunotherapy* (2015) 7(8):883-892
- (17) Aporta, A., Catalán, E., Galán-Malo, P., Ramírez-Labrada, A., Pérez, M., Azaceta, G., Anel, A. (2014). *Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors. Biochemical Pharmacology*, 87(3), 410–423.
- (18) A Anel , J Naval , P Desportes , B González , J Uriel , A Piñeiro (1992) *Increased cytotoxicity of polyunsaturated fatty acids on human tumoral B and T-cell lines compared with normal lymphocytes. Leukemia* 6(7).680-688.
- (19) Al-Wasaby S, de Miguel D, Aporta A, Naval J, Conde B, Martínezlostao L, Anel A. *In vivo potential of recombinant granulysin against human tumors. Oncoimmunology.* 2015;4(9):1–13.
- (20) Ju, T., Otto, V. I., & Cummings, R. D. (2011). *The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity. Angewandte Chemie International Edition*, 50(8), 1770–1791.
- (21) Finn, O. J., Jerome, K. R., Henderson, R. A., Pecher, G., Domenech, N., Magarian-Blander, J., & Barratt-Boyes, S. M. (1995). *MUC-1 Epithelial Tumor Mucin-Based Immunity and Cancer Vaccines. Immunological Reviews*, 145(1), 61–89.

- (22) Kreitman R, Dearden C, Zinzani P, Delgado J, Karlin L, Robak T, Gladstone DE, le Coutre P, Dietrich S, Gotic M, et al. Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leukemia*. 2018;32:1768–1777.
- (23) Ibáñez-Pérez, R., Guerrero-Ochoa, P., Al-Wasaby, S., Navarro, R., Tapia-Galisteo, A., De Miguel, D., ... Anel, A. (2019). Anti-tumoral potential of a human granulysin-based, CEA-targeted cytolytic immunotoxin. *OncolImmunology*, 1–11.
- (24) Demichelis, S. O., Alberdi, C. G., Servi, W. J., Isla-Larrain, M. T., Segal-Eiras, A., & Croce, M. V. (2010). Comparative Immunohistochemical Study of MUC1 and Carbohydrate Antigens in Breast Benign Disease and Normal Mammary Gland. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 18(1), 41–50.
- (25) Ohyabu, N., Hinou, H., Matsushita, T., Izumi, R., Shimizu, H., Kawamoto, K.,... Nishimura, S.-I. (2009). An Essential Epitope of Anti-MUC1 Monoclonal Antibody KL-6 Revealed by Focused Glycopeptide Library. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17102–17109. doi:10.1021/ja903361f
- (26) Martínez, J. M., Gojkovic, Z., Ferro, L., Maza, M., Álvarez, I., Raso, J., & Funk, C. (2019). Use of Pulsed Electric Field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 121694.
- (27) Guerrero-Ochoa P, Aguilar-Machado D, Ibáñez-Pérez R, Macías-León J, Hurtado-Guerrero R, Raso J, Anel A. Production of a Granulysin-Based, Tn-Targeted Cytolytic Immunotoxin Using Pulsed Electric Field Technology. *Int J Mol Sci*. 2020. 21(17):E6165.
- (28) Xiao He Yang 1, Susan Edgerton, Ann D Thor.(2005) Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy *Int J Oncol* 2005 Jun;26(6):1675-80.
- (29) Zhang, H., Ji, J., Liu, Q., & Xu, S. (2019). MUC1 downregulation promotes TNF- $\alpha$ -induced necroptosis in human bronchial epithelial cells via regulation of the RIPK1/RIPK3 pathway. *Journal of Cellular Physiology*.