



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTUDIO DEL ROL DE CONEXINA 43 EN LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA  
CITOLÍTICA ENTRE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS Y CÉLULAS DE MELANOMA”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular:

**FRANCISCA ALEJANDRA HOFMANN VEGA**

Director de Seminario de Título:

Dr. Flavio Salazar Onfray

Co-Director de Seminario de Título:

Dr. Andrés Tittarelli

Directora Patrocinante:

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Agosto 2018

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la

**Srta. Francisca Alejandra Hofmann Vega**

**“Estudio del rol de conexina 43 en la sinapsis inmunológica citolítica entre linfocitos T citotóxicos y células de melanoma”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Flavio Salazar Onfray

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

Dr. Andrés Tittarelli

**Co-Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

**Comisión Revisora y Evaluadora:**

**Presidente Comisión:**

**Dr. Mario Tulio Nuñez** \_\_\_\_\_

**Evaluadora:**

**Dra. María Rosa Bono** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, Miércoles 31 de Octubre del 2018.

## BIOGRAFÍA



Francisca Alejandra Hofmann Vega nació el 9 de Mayo de 1994 en la ciudad de Ovalle. Ingresó al Colegio Santa Teresa de Jesús en 1999 donde realizó su enseñanza pre-escolar y básica, junto al 1° año de enseñanza media. En el año 2009 ingresó al Colegio Tamecura en donde finalizó sus estudios en el año 2011.

En el 2012 ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en donde realizó el plan de estudios correspondiente a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, obteniendo el grado académico de licenciatura en el 2016.

Desde el año 2017 hasta el presente ha realizado su seminario de título en el Laboratorio de Inmunología Anti-tumoral de la Facultad de Medicina, a cargo del Dr. Flavio Salazar Onfray.

## AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quiero agradecer a mi familia por todo el amor, cariño, paciencia y apoyo que me brindaron durante cada etapa de mi vida y cada decisión que tomé en el camino que hice para llegar hasta este momento. También les agradezco todas las enseñanzas valóricas que me dieron y me permitieron llegar a ser quién soy actualmente. En especial quiero agradecer a mi Madre, por entregarme con mucho amor y paciencia todas las herramientas valóricas necesarias para enfrentarme a *la vida*. Por entregarme todo lo que eres, por tu cariño y tu constante preocupación. Gracias por ser un ejemplo para mí sobre el esfuerzo, por enseñarme a luchar por lo que quiero sin rendirme y ser feliz siendo honesto y consecuente con lo que uno quiere y necesita.

También quiero agradecerles a mis amigos que estuvieron presentes durante este largo y extenuante periodo universitario. Quiero agradecerle a Fabián, Thadani, Esteban, Leonardo y Barbara por cada día que compartimos en la facultad, por la compañía en las clases, los chistes y las bromas que hicieron más entretenido cada evaluación, y por sobre todo por la paciencia, apoyo y cariño que me brindaron en los momentos de mayor estrés. En especial quiero agradecerle a Alonso por convertirse en una de las personas más importante en mi vida, por apoyarme en todo momento, por tu paciencia, por tu cariño, y por ayudarme a ver las cosas de manera más simple y entender qué cosas son realmente importantes. A todos, Por ser más que compañeros, por ser amigos, ¡Muchas gracias cabros!

Finalmente, quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología Anti-tumoral, por brindarme su conocimiento y ayuda para lograr concretar la última etapa de mi formación como profesional. En especial, quiero agradecerle al Dr. Flavio

Salazar Onfray, por darme la oportunidad de pertenecer a este grupo de trabajo y permitirme realizar mi seminario de título, así como también participar de otros quehaceres científicos para fortalecer mis capacidades intelectuales y experiencia laboral. Finalmente, quisiera agradecer al Dr. Andrés Tittarelli, que fue mi tutor directo durante la realización de mi seminario de título, apoyándome como guía en el diseño y realización de los experimentos realizados durante este trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>BIOGRAFÍA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Respuesta inmune anti-tumoral.....	1
Sinapsis Inmunológica .....	4
Canales Gap Junctions en el sistema inmune.....	6
Modelo murino pMEL-1 .....	9
Hipótesis .....	10
Objetivo General .....	10
Objetivos Específicos.....	10
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
Líneas celulares y ratones .....	11
Generación de CTL.....	11

Obtención de LT CD8+ vírgenes .....	12
Análisis de la localización de Cx43 en la SIC mediante microscopía.....	13
Transfección con siRNA anti-Cx43.....	14
Análisis de formación de canales GJ-Cx43 funcionales .....	15
Medición de la actividad de GrzB .....	17
Western Blots.....	17
Citometría de flujo .....	19
Análisis estadístico.....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
CTL generados desde esplenocitos de ratones pMEL-1 expresan marcadores de perfil efector.....	20
Cx43 polariza hacia el sitio de contacto entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 durante la formación de la sinapsis inmunológica citotóxica .....	24
La polarización de Cx43 hacia la sinapsis inmunológica citotóxica se asocia a la formación de canales GJ-Cx43 funcionales entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 .....	28
La formación de canales GJ-Cx43 funcionales es requerida para una óptima actividad citotóxica de CTL pMEL-1 contra células de melanoma B16F10 ....	32
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>

**CONCLUSIONES**..... 49

**REFERENCIAS**..... 51



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> CTL pMEL-1 generados in vitro expresan marcadores de fenotipo efector CD25 y CD44. ....	22
<b>Figura 2.</b> LT CD8+ purificados desde esplenocitos de ratones C57BL/6 WT presentan fenotipo de LT vírgenes. ....	24
<b>Figura 3.</b> Cx43 polariza hacia el sitio de contacto entre CTL y B16F10 durante la formación de la SIC. ....	27
<b>Figura 4.</b> CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 se acoplan mediante canales GJ-Cx43 funcionales durante la formación de SIC.....	31
<b>Figura 5.</b> Inhibición de la formación de canales GJ-Cx43 afecta negativamente la actividad citotóxica de CTL pMEL-1 contra células de melanoma B16F10. ....	35
<b>Figura 6.</b> Participación de canales GJ-Cx43 en la respuesta inmune anti-tumoral. ....	47

## ABREVIATURAS

**APC:** Célula Presentadora de Antígenos

**AM:** Acetoximetil Éster

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**BSA:** Albúmina de Suero Bovino

**cAMP:** Adenosina Monofosfato Cíclica

**cGAMP:** Guanosina Monofosfato-Adenosina Monofosfato Cíclica

**cSMAC:** Complejo de Activación Supramolecular Central

**Cx:** Conexina

**Cxs:** Conexinas

**Cx43:** Conexina 43

**CTL:** Linfocitos T Citotóxicos

**DC:** Célula Dendrítica

**DE:** Desviación Estándar

**dSMAC:** Complejo de Activación Supramolecular Distal

**E:B:** Célula Efectora/Célula Blanco

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**FasL:** Fas Ligando

**FITC:** Isocianato de Fluorescina

**FSC:** Forward Scatter

**GJ:** Gap Junctions

**Grz:** Granzima

**GrzB:** Granzima B

**HRP:** Horseradish Peroxidase

**IFNs:** Interferones

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IMF:** Intensidad Media de Fluorescencia

**IL:** Interleucina

**LT:** Linfocitos T

**MAA:** Antígeno Asociado a Melanoma

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase

**MHC-I:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I

**MHC-II:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II

**miRNA:** microRNA

**mRNA:** RNA mensajero

**NK:** Natural Killer

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**PFA:** Paraformaldehído

**PKC- $\theta$** : Fosfoquinasa C isoforma  $\theta$

**Pfn**: Perforina

**pSMAC**: Complejo de Activación Supramolecular Periférico

**RIPA**: Radio Inmuno-Precipitation Assay

**SDS-PAGE**: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Eletrophoresis

**SFB**: Suero Fetal Bovino

**SI**: Sinapsis Inmunológica

**SIC**: Sinapsis Inmunológica Citotóxica

**SSC**: Side Scatter

**TAA**: Antígenos Asociados a Tumor

**TBS**: Tris Buffered Saline

**TCR**: Receptor de célula T

**TGF**: Factor de Crecimiento Transformante

**TNF**: Factor de Necrosis tumoral

**T<sub>reg</sub>**: Linfocitos T Reguladores

**WGA**: Wheat Germ Agglutinin

**WT**: Wild Type

## RESUMEN

El desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral requiere de la comunicación entre diferentes células del sistema inmune, así como del reconocimiento de la célula tumoral. Una vez que los Linfocitos T Citotóxicos (CTL) y las células Natural Killers (NK) reconocen la célula tumoral, forman la Sinapsis Inmunológica Citotóxica (SIC), una estructura supramolecular altamente especializada que resulta fundamental para la liberación localizada de los gránulos citotóxicos y la eliminación específica de la célula tumoral. Recientemente, se ha descrito la participación de canales Gap Junction (GJ) formados por la isoforma Cx43 (GJ-Cx43) en la actividad citotóxica de las células NK durante la SIC. A pesar de las similitudes funcionales y estructurales presentadas por la SIC mediada por las células NK y por CTL, la participación de los canales GJ-Cx43 en la sinapsis mediada por CTL aún no ha sido determinada. En este trabajo se estudió el rol de los canales GJ-Cx43 en la actividad de la SIC entre CTL obtenidos desde ratones pMEL-1 y células de melanoma murino B16F10. Primero, se evaluó la polarización de Cx43 hacia la zona de contacto entre CTL pMEL-1 y células B16F10, durante la SIC. Se determinó que Cx43 se acumula en el sitio de contacto entre estas células de manera antígeno específica y que esta polarización es dependiente de la activación de los CTL. Luego, se disminuyó la expresión de Cx43 en células B16F10 utilizando un RNA interferente contra Cx43 y luego se evaluó la participación de Cx43 en la formación de canales GJ mediante ensayos de transferencia de calceína y en la actividad citotóxica de los CTL, mediante ensayos de actividad de Granzima B (GrzB). Se observó que los CTL transfieren calceína a las células B16F10 formando canales GJ funcionales, al contrario de cuando se utilizan LT CD8<sup>+</sup> vírgenes como células efectoras. Además, cuando se utilizaron las células B16F10 que expresan bajos

niveles de Cx43 como células blanco, se observó una disminución en la transferencia de calceína y en la actividad de GrzB en comparación al control. Nuestros resultados demuestran que durante el reconocimiento citotóxico se forman canales GJ-Cx43 entre CTL y células B16F10 y que la formación de estos canales durante la SIC son importantes para la eliminación de células tumorales mediada por CTL.

## ABSTRACT

Development of antitumor immune responses requires communication between different immune cells, and specific immune recognition of tumor cells. Upon tumor cell recognition, CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells form the “Cytotoxic Immunological Synapse (SIC)”, a specialized molecular structure fundamental for the polarized delivery of cytotoxic granules and the specific tumor cell killing. Recently, it has been described the participation of Gap Junction Intercellular Communications formed by Connexin 43 (GJIC-Cx43) in the NK cell SIC activity. Despite that CTL and NK cells present functional and structural similarities in SIC formation, the participation of GJIC-Cx43 in CTL-mediated SIC remains unclear. In this work we studied the role of GJIC-Cx43 in the activity of SIC formed between CTL from pMEL-1 mice and B16F10 murine melanoma cells. First, we evaluated by immunofluorescence the polarization of Cx43 to contact site between CTL and B16F10 during SIC. We found that this protein localizes at the contact site of SIC and this polarization dependent on activation of CTL and is an antigenic-specific process. Then, we decrease Cx43 expression in B16F10 cells using interference RNA against Cx43 and we evaluated the participation of Cx43 in the formation of functional GJ channels by calcein transfer assay and in the cytotoxic activity of CTL by Granzyme B (GrzB) activity assay. We found that CTL transfer calcein to B16F10 forming functional GJ in contrast with when we used a naïve CD8<sup>+</sup> T cells as an effector cells. In addition, when we used a B16F10 that express low levels of Cx43 as target cells, we observed a decrease in calcein transfer and GrzB activity in comparison to the control. Our results demonstrate that GJIC-Cx43 are formed between CTL and B16F10 during SIC, and suggest that their formation is important for tumor cells-killing by CTL.

## INTRODUCCIÓN

### **Respuesta inmune anti-tumoral**

Una de las funciones del sistema inmune es reconocer y eliminar las células tumorales a través de la generación de una eficiente respuesta inmunológica anti-tumoral. Esto requiere la acción coordinada de diferentes tipos celulares, tanto del sistema inmune innato como adquirido. La respuesta inmune anti-tumoral es desencadenada cuando las Células Presentadoras de Antígenos (APC), principalmente las Células Dendríticas (DC), adquieren y procesan antígenos tumorales desde el nicho tumoral para viajar hasta el órgano linfóide más cercano y presentar dichos antígenos asociados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I) o clase II (MHC-II), a LT CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>, respectivamente (Munhoz & Postow, 2016). Cuando el procesamiento antigénico ocurre en un contexto de inflamación aguda, la APC emite tres señales que permitirán la activación y diferenciación de los Linfocitos T (LT) vírgenes hacia células efectoras: 1) presentación del péptido antigénico en contexto de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), 2) moléculas de co-estimulación, como CD80, CD86 y CD40, y 3) secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como interleucina (IL)-12 o Interferón [(IFN); Mescher et al., 2006]

Cuando las APC activan LT CD4<sup>+</sup> vírgenes generan su activación y diferenciación hacia diferentes tipos de LT ayudadores Th1, Th2 y Th17, de acuerdo al tipo de citoquinas con las cuales son estimulados, que pueden inducir y mantener una respuesta inmune contra antígenos tumorales. Se ha descrito que la estimulación con IL-12 e IFN- $\gamma$  permiten la diferenciación de LT CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia un perfil Th1, la estimulación con IL-4 permite la diferenciación hacia Th2 y que la



estimulación con TGF- $\beta$  e IL-6 produce la diferenciación hacia Th17, mientras que la estabilización y mantención de este perfil es mediada por IL-23. Estas células ayudan en la activación y expansión de LT CD8<sup>+</sup> así como también en la generación y mantención de LT CD8<sup>+</sup> de memoria, vía interacción de CD40-CD154 y la producción de IL-2 (Lai et al., 2011). Por otro lado, se ha descrito que la estimulación con IL-2 y TGF- $\beta$  provoca la diferenciación hacia Linfocitos T Reguladores (T<sub>reg</sub>), células encargadas de apagar la respuesta inmune, que son reclutadas por los tumores para evadir la respuesta inmune anti-tumoral (Kim & Cantor, 2014).

En el caso de los LT CD8<sup>+</sup>, la activación permite su diferenciación a Linfocitos T Citotóxicos (CTL), adquiriendo la capacidad de migrar hacia el tumor, reconocerlo, infiltrarlo y eliminar las células tumorales de manera antígeno-específica. El reconocimiento de la célula tumoral por parte de los CTL ocurre mediante la interacción entre el Receptor del LT (TCR) del CTL y el complejo MHC-I/péptido antigénico (pMHC-I) en la membrana de la célula tumoral. La interacción TCR-pMHC-I desencadena en los CTL una cascada de señalización que activa tres mecanismos sinérgicos para la eliminación de la célula tumoral: 1) unión de ligandos y receptores de muerte (Fas-FasL), que ayudan en la eliminación de tumores que expresan Fas, 2) secreción de citoquinas citotóxicas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y 3) liberación de gránulos citotóxicos, que contienen Perforinas (Pfn), encargadas de generar poros en la membrana de la célula blanco, y proteasas como Granzima A (GzmA) y B (GzmB), que ingresarán a la célula tumoral a través de estos poros para activar la vía de las caspasas y con ello inducir la muerte celular por apoptosis (Andersen et al., 2006). En este contexto, se ha descrito la expresión de los

receptores de membrana CD69 y CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2), como marcadores de activación en los CTL, así como también el aumento en la expresión de CD44 como indicativo de la generación de LT de memoria (Baaten et al., 2010; Boyman & Sprent, 2012).

Adicionalmente, las células Natural Killers (NK) también cumplen un rol importante en la inmunovigilancia del cáncer, controlando la diseminación de células tumorales y guiando al rechazo dependiente del sistema inmune de tumores. Las células NK son linfocitos efectores del sistema inmune innato que pueden eliminar células tumorales al igual que los CTL, mediante los mismos tres mecanismos antes descritos: interacción Fas-FasL, producción de citoquinas pro-inflamatorias y la liberación de gránulos citotóxicos. Pero, a diferencia de los CTL, las células NK no necesitan ser activados por el complejo pMHC de la DC, sino por el balance de la señalización gatillada por receptores de activación e inhibición expresados en su superficie (Ferlazzo & Münz, 2015). Además, las células NK pueden ser estimuladas por DC para aumentar su capacidad citotóxica. Se ha descrito que las DC proporcionan IL-12, IL-2 e IL-15, así como también factores dependientes de contacto como la unión de los receptores NKG2D, NKp46 y NKp30 para la activación de la función citotóxica de las células NK (Elssen et al., 2014).

De esta manera, la interacción entre el sistema inmune innato y adaptativo permite la coordinación de la activación de diferentes tipos celulares que finalmente permitirán desencadenar una eficiente respuesta inmune anti-tumoral que se encargue de controlar y eliminar células tumorales.

## **Sinapsis Inmunológica**

La generación de una respuesta inmune anti-tumoral efectiva requiere de una comunicación estrecha entre los diferentes tipos celulares involucrados, la cual se logra principalmente mediante mecanismos dependientes de contacto célula-célula. Un tipo de comunicación intercelular descrito en el sistema inmune corresponde a la formación de la “Sinapsis Inmunológica” (SI), la cual surge cuando las membranas plasmáticas de dos células inmunológicas se acercan para transmitir señales entre ellas (Dustin et al., 2010). En primera instancia, la estructura supramolecular de la SI fue descrita en el contexto de la presentación antigénica, cuando las APC, principalmente las DC, entran en contacto directo con los LT (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). También, esta estructura fue descrita durante la activación de células NK por DC (Thauland & Parker, 2010), donde la interacción es mediada por diversos receptores de activación/inhibición y sus ligandos (Elssen et al., 2014). Posteriormente, una estructura similar a la SI fue identificada durante la interacción entre CTL o células NK con células tumorales o infectadas por virus, la cual se ha denominado “Sinapsis Inmunológica Citolítica” (SIC), demostrando que la formación de esta estructura es necesaria para la liberación polarizada de gránulos citotóxicos que destruyen específicamente la célula blanco sin afectar las células sanas (Potter et al., 2001).

La formación de la SI entre LT/APC o CTL/célula blanco es desencadenada mediante la activación del TCR al interactuar con el complejo péptido-MHC (pMHC). Esta interacción desencadena la activación de diferentes vías de señalización que tienen como consecuencia la reorganización de receptores de reconocimiento entre las células participantes, de receptores de adhesión y re-estructuración del

citoesqueleto. Se ha identificado la formación de 3 estructuras características durante la SI: 1) Complejo de Activación Supramolecular Central (cSMAC), que corresponde principalmente a una acumulación de TCR, la isoforma  $\theta$  de la enzima fosfoquinasa C (PKC- $\theta$ ) y la proteína tirosina-quinasa Lck; 2) rodeando al cSMAC se encuentra el Complejo de Activación Supramolecular Periférico (pSMAC), que corresponde mayormente a moléculas de adhesión LFA-1 y su adaptador ICAM-1; y 3) rodeando al pSMAC se encuentra el Complejo Supramolecular de Activación Distal (dSMAC), formado por la reorganización del citoesqueleto de actina en una estructura de anillo que rodea el resto de los complejos (Dieckmann et al., 2016; Monks et al., 1998). En el caso de la SIC se ha identificado adicionalmente un dominio secretorio ubicado junto al cSMAC y dentro del pSMAC, que asegura la precisión de la secreción de los gránulos citotóxicos hacia la célula blanco en la grieta sináptica (Stinchcombe et al., 2001). La distribución de las moléculas participantes en la SIC en estos complejos supramoleculares asegura la estabilidad de la SI durante el contacto celular, así como también la transmisión intercelular de señales químicas. Específicamente, la función de la SI entre APC/LT facilita la activación del LT mediante la unión del complejo pMHC y las moléculas de co-estimulación, así como también permite el contacto entre ambas células por un periodo de tiempo suficientemente largo para activar al LT, mientras que por otra parte la SIC asegura el reconocimiento específico de la célula tumoral blanco por parte del CTL, así como también evita la fuga de gránulos citotóxicos hacia las células vecinas (Dustin et al., 2010), ambos procesos resultan importantes para el establecimiento de una correcta y eficiente respuesta inmune anti-tumoral.

Por otro lado, la formación de la SI requiere proteínas que actúan como mediadores de la comunicación intercelular. Uno de los mecanismos más importantes para el “cross talk” celular corresponden a las Gap Junctions, canales intercelulares que conectan el citoplasma de dos células adyacentes permitiendo la comunicación directa entre ellas (Kumar & Gilula, 1996). Trabajos recientes de nuestro laboratorio han determinado la participación de los canales GJ en la SI entre DC y LT CD4<sup>+</sup>, y entre DC y células NK, así como también durante la SIC entre células NK y células tumorales (Mendoza-Naranjo et al., 2011; Tittarelli et al., 2014), indicando que estos canales cumplen un rol importante mediando la comunicación entre células del sistema inmune y con ello en la respuesta anti-tumoral.

### **Canales Gap Junctions en el sistema inmune**

Los canales GJ son complejos proteicos intercelulares que conectan el citoplasma de dos células adyacentes permitiendo la comunicación directa entre ellas (Kumar & Gilula, 1996). Estos canales participan en la regulación de diferentes procesos celulares, tales como el control de la expresión génica, diferenciación, supervivencia y muerte celular, mediante la regulación del traspaso de iones y moléculas con un tamaño de hasta 1,4 nm (Gleisner et al., 2017). Los canales GJ se encuentran formados por la unión de dos hemi-canales o conexones, uno de cada célula adyacente, los cuales a su vez se encuentran formados por 6 proteínas de transmembrana, llamadas conexinas (Cxs), que dan forma al poro central (Maeda & Tsukihara, 2011). Actualmente, se han descrito 21 isoformas de Cxs en humanos y 20 en ratones, las cuales difieren en sus propiedades fisiológicas y de regulación (Söhl & Willecke, 2004). Un conexón puede estar formado por distintas Cxs,

permitiendo la generación de canales GJ con una amplia diversidad en cuanto conductancia, permeabilidad, “gating” y función, según las características estructurales de las isoformas que los constituyen (Cottrell & Burt, 2005). La expresión de la mayoría de las isoformas de conexinas es tejido específica, mientras que la isoforma Cx43 se expresa de manera prácticamente ubicua. En este contexto, se ha descrito la presencia de comunicaciones intercelulares mediadas por GJ en el sistema inmune, donde Cx43 corresponde a la isoforma más expresada en los distintos tipos de células, incluyendo neutrófilos, macrófagos, DC, células NK, LT y linfocitos B (Neijssen et al., 2007).

Por otro lado, recientemente se han vinculado mutaciones en varias conexinas con el desarrollo de ciertas enfermedades humanas, tales como neuropatías, enfermedades cardíacas y enfermedades de la piel (Zoidl & Dermietzel, 2010). Así mismo, se han descrito variaciones en los niveles de expresión de ciertas isoformas de conexinas en diferentes tipos de tumores sólidos, incluyendo melanoma, donde el rol desempeñado por estos canales depende del tipo de tumor o fase de desarrollo en que se encuentre, actuando como supresores durante fases tempranas y facilitando la progresión del cáncer en fases tardías de la enfermedad (Gleisner et al., 2017).

Además, como se mencionaba antes, trabajos realizados por nuestro laboratorio y otros grupos, sugieren fuertemente la participación de canales GJ en las SI y SIC. Específicamente, se ha descrito que canales GJ-Cx43 se acumulan hacia el sitio de contacto durante la SI entre DC y LT CD4<sup>+</sup>, de manera antígeno específica y dependiente del tiempo de contacto entre ambas células. Se observó que la inhibición en la formación de estos canales entre DC y LT CD4<sup>+</sup> afecta el incremento

de concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y la liberación de citoquinas por parte de los LT, demostrando ser de gran importancia para la activación de LT  $\text{CD4}^{+}$  mediada por DC (Mendoza-Naranjo et al., 2011). También, se ha descrito que estos canales polarizan hacia la SI entre DC y células NK, y la SIC entre células NK y células de melanoma. Se ha demostrado que la inhibición de la formación de canales GJ-Cx43 afecta la activación de las células NK mediada por DC, causando una disminución en la expresión de los marcadores CD69 y CD25, así como también de la secreción de  $\text{IFN-}\gamma$ . En el caso de la SIC, se ha demostrado que el bloqueo en la formación de los canales GJ-Cx43 entre células NK y células de melanoma, disminuye la capacidad citotóxica de las células NK asociada a una disminución en la actividad de GrzB y en el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia la célula tumoral (Tittarelli et al., 2014). Estos antecedentes apuntan hacia un nuevo rol de Cx43 en la respuesta inmune antitumoral, como mediador de la comunicación dependiente de contacto entre células del sistema inmune, siendo de gran importancia para el control de la eliminación de tumores por parte del sistema inmune. En este contexto, la actividad efectora de los CTL y las células NK son de suma importancia en la respuesta anti-tumoral, dado que se encuentran encargados de reconocer y eliminar las células tumorales mediante su gran capacidad citotóxica (Martínez-Lostao et al., 2015). Esta actividad citotóxica se sustenta principalmente en la formación de SIC, las cuales presentan similitudes estructurales entre ambos tipos celulares (Thauland & Parker, 2010). De esta manera, considerando los antecedentes expuestos, es plausible postular la participación de canales GJ-Cx43 en la SIC mediada por CTL y células tumorales blanco. En este proyecto proponemos estudiar la participación de Cx43 en la SIC entre CTL y células de melanoma y determinar si juegan un rol importante en la actividad citotóxica de los CTL.

## Modelo murino pMEL-1

La formación y establecimiento de la SIC mediada por CTL es dependiente de la interacción entre el TCR de esta célula y el complejo pMHC-I en la célula blanco. Por ello, para estudiar la participación de canales GJ-Cx43 en la SIC entre CTL y células de melanoma *in vitro*, resulta necesario contar con LT que reconozcan específicamente un antígeno expresado en la célula tumoral blanco. El modelo murino pMEL-1, generado a partir de ratones C57BL/6, se caracterizarse por presentar LT CD8<sup>+</sup> que expresan la cadena transgénica V $\beta$ 13 en su TCR, permitiendo el reconocimiento específico del péptido gp100<sub>25-33</sub> (XXXRNQDWL) de la proteína gp100 en el contexto de moléculas MHC-I H-2 D<sup>b</sup>. (B6.Cg-Thy1a/Cy Tg(TcraTcrb)8Rest/J, The Jackson Laboratory). La proteína gp100 o pMEL-17 es considerada un MAA que se expresa en células de linaje melanocítico y se encuentra sobre-expresada en diferentes líneas de melanoma (Kawakami et al., 1995). Se ha descrito que cerca del 95% de los LT CD8<sup>+</sup> de ratones pMEL-1 son V $\beta$ 13<sup>+</sup> y corresponden a aproximadamente el 20% de la población de esplenocitos totales desde donde es posible obtener estas células en estado virgen. Adicionalmente, la estimulación *in vitro* de esplenocitos pMEL-1 con la variante humana del péptido gp100<sub>25-33</sub> (hgp100) e IL-2 provoca la diferenciación de LT CD8<sup>+</sup> vírgenes hacia un fenotipo efector caracterizada por un aumento en la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69, y del marcador de memoria CD44, acompañada de la liberación de IFN- $\gamma$  indicando su potencial citotóxico (Overwijk et al., 2003). Dado que el modelo pMEL-1 cuenta con protocolos establecidos para la generación de CTL *in vitro*, y se ha demostrado que estos CTL pueden reconocer y eliminar eficientemente células de melanoma murino B16F10 (ATCC, CRL-6475),



singénicas en ratones pMEL-1, se ha decidido utilizar este modelo de estudio para analizar la participación de canales GJ-Cx43 en la SIC.

### **Hipótesis**

La conexina 43 (Cx43) polariza hacia la zona de sinapsis inmunológica citotóxica (SIC) entre linfocitos T citotóxicos (CTL) y células de melanoma generando canales tipo Gap Junctions necesarios para la muerte citotóxica de los melanoma mediada por CTL.

### **Objetivo General**

Estudiar el papel de los canales tipo Gap Junctions de Cx43 en la sinapsis inmunológica citotóxica (SIC) entre CTL y células de melanoma B16F10.

### **Objetivos Específicos**

1. Analizar la participación de Cx43 en la estructura de la sinapsis inmunológica entre CTL y células de melanoma B16F10.
2. Determinar la participación de canales GJ-Cx43 en la sinapsis inmunológica citotóxica mediada por CTL.
3. Determinar el papel de Cx43 acumulada en la zona de contacto entre CTL y células de melanoma B16F10 en la lisis de las células blanco.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Líneas celulares y ratones**

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: i) melanoma murino B16F10 (ATCC® CRL-6475™) y ii) carcinoma urotelial murino MB49 (RRID:CVCL\_7076). Estas células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>, en medio RPMI 1640 (Corning) suplementado con 10% SFB (Corning) y 1% Penicilina/Estreptomicina (Corning). Además, se utilizaron los siguientes ratones: i) C57BL/6 WT y ii) C57BL/6 pMEL-1 (Overwijk et al., 2003). Estos ratones fueron obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fueron utilizados siguiendo el protocolo de bioética CBA FMUCH 0825, el cual fue aprobado por la Comisión de Bioética para la Investigación en Animales de la misma institución.

### **Generación de CTL**

Los CTL fueron obtenidos a partir de esplenocitos totales de ratones C57BL/6 pMEL-1 de 10 a 12 semanas de edad. Primero, los ratones fueron sacrificados utilizando 1 ml de solución anestésica (3% ketamina clorhidrato; Laboratorio RICHMOND S.A. + 10% Xilazina; Laboratorio Centrovét Ltda.). Luego, los bazos fueron removidos y perfundidos con 10 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% FBS y 1% Penicilina/Estreptomicina, mediante el uso de una jeringa de 10 ml y una aguja de 0,5 x 15 mm (25Gx5/8"). Posteriormente, la solución obtenida de la perfusión de los bazos fue filtrada a través de Cell Strainer (poro de 70 µm; Falcon) y centrifugada a 500G por 5 minutos. Después de esto, se lisaron los glóbulos rojos de la sangre de los bazos utilizando 1 ml de RBC Lysis Buffer

(BioLegend), durante 5 minutos a 4°C; finalizado este tiempo, se agregaron 9 ml de PBS y se centrifugó a la misma velocidad anterior para obtener la solución de esplenocitos totales. Luego, los esplenocitos fueron cultivados durante 6 días en medio de cultivo RPMI GlutaMAX (ThermoFisher), 10% SFB (HyClone), 1% Penicilina/Estreptomina (Corning), 55  $\mu$ M  $\beta$ -mercapto-etanol (Corning), en placas de 24 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y estimulados con el péptido hgp100 (KVPRNQDWL, 1  $\mu$ M) y 30 UI/ml de rhIL-2 (Overwijk et al., 2003). Transcurridos los 6 días de cultivo, se verificó el fenotipo de los CTL diferenciados por este método mediante citometría de flujo, analizando la expresión de los receptores CD8, CD44, CD25 y la cadena  $V\beta 13$  del TCR, como se detalla más abajo.

#### **Obtención de LT CD8<sup>+</sup> vírgenes**

Los LT CD8<sup>+</sup> vírgenes fueron obtenidos a partir de esplenocitos totales provenientes de ratones C57BL/6 de 12 semanas de edad, como se describió anteriormente. Éstos fueron purificados mediante selección negativa utilizando el kit comercial Naive CD8a+ T Cell Isolation Kit, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (MACS, Miltenyi Biotec). La selección negativa consistió en una primera marcación indirecta de las células no correspondientes a LT CD8<sup>+</sup> vírgenes utilizando un cocktail de anticuerpos monoclonales conjugados a biotina y una segunda marcación magnética utilizando anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados a MicroBeads. Además, los LT de memoria fueron marcados de manera magnética utilizando MicroBeads anti-CD44. Luego, las células fueron transferidas a una columna magnética, en donde aquellas células magnéticamente marcadas quedaron retenidas, permitiendo la purificación de células LT CD8<sup>+</sup> vírgenes.

Finalmente, se verificó el fenotipo de estas células analizando la expresión de los receptores CD8, CD44 y CD25 mediante citometría de flujo, como se detalla más abajo.

### **Análisis de la localización de Cx43 en la SIC mediante microscopía**

Se analizó la localización subcelular de Cx43 durante la formación de la SIC entre CTL y células de melanoma murino B16F10. Para ello se realizó inmunofluorescencia de co-cultivos de estas células en donde se determinó la expresión de esta proteína. Además, se realizaron dos tipos de controles, i) control de activación: se realizaron co-cultivos en donde las células efectoras fueron reemplazadas por LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT y ii) control de especificidad antigénica: se utilizaron células MB49 como células blanco.

Primero, las células blanco fueron marcadas con Wheat Germ Agglutinin (WGA) conjugada a AlexaFluor 647 (Invitrogen) a una concentración final de 10 µg/ml y de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Luego, se co-cultivaron las células efectoras y células blanco durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> sobre coverslips previamente revestidos con poli-L-Lisina. Los co-cultivos fueron realizados a una razón E:B/2:1, utilizando 6 x 10<sup>5</sup> células efectoras, en un volumen final de 100 µl de medio normal de crecimiento. Transcurrido este tiempo, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 15 minutos y posteriormente lavadas 3 veces con PBS. Luego, los co-cultivos fueron incubados con cloruro de amonio 50 mM durante 10 minutos para disminuir la auto-fluorescencia. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y permeabilizadas con tritón 0,5% durante 10 minutos. Entonces, se realizó bloqueo incubando los co-cultivos con BSA 0,5% durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, los co-cultivos fueron incubados con el anticuerpo

monoclonal anti-Cx43 conjugado a FITC en una dilución 1:500 (sc-271837; Santa Cruz Biotechnology, Inc), durante 1,25 horas a temperatura ambiente. Luego de esto, los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 (Invitrogen), dilución 1:1000 y los filamentos de f-actina con rodamina-faloidina 16,5  $\mu$ M (R415, Invitrogen) durante 15 minutos, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron montadas en portaobjetos utilizando medio de montaje fluorescente (Dako North America) y la obtención de fotos se realizó utilizando el microscopio Spinning Disk Olympus BX61WI a un aumento 400X con aceite de inmersión. La captura de imágenes para Hoechst 33342 en el canal DAPI se realizó con un tiempo de exposición de 15 ms y 100% intensidad de luz, para Cx43 en el canal FITC con 260 ms y 100%, para actina en el canal TxRed con 4 ms y 23,13% y para WGA en el canal CY5 con 14 ms y 100%. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software ImageJ 1.50i (National Institutes of Health). La polarización de Cx43 hacia la zona de contacto intercelular fue determinada cuantificando el radio de la IMF en la zona de contacto intercelular versus a la IMF del mismo sitio en el lado opuesto a la zona de contacto célula-célula como se describió previamente (Tittarelli et al., 2014, 2015). Adicionalmente, imágenes de los conjugados fueron obtenidas en el microscopio confocal C2+ a un aumento de 1000X con aceite de inmersión. Se adquirieron alrededor de 20 secciones ópticas en Z (0,5  $\mu$ m por sección) con una intensidad de la luz de 7,4% para DAPI, 9,7% para FITC, 9,5% para TxRED y 7% para Cy5.

### **Transfección con siRNA anti-Cx43**

La expresión de Cx43 en células B16F10 fue silenciada mediante la transfección con siRNA específicos (descritos más adelante). Se utilizó el kit comercial Silencer

siRNA Transfection, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ambion, ThermoFisher). Primero se preparó el Complejo de Transfección. Para ello se diluyó el Agente de Transfección siPORT Amine, consistente en una mezcla de poliaminas, en Medio de Transfección OPTIMEM™ (Gibco) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo se prepararon los siRNAs. Se utilizó el esiRNA contra Cx43 (siRNA-Cx43; Mission, Sigma Aldrich), correspondiente a una mezcla de siRNAs contra el mRNA de esta proteína, junto al control negativo de transfección, correspondiente a un siRNA con una secuencia aleatoria que no posee blanco en el genoma murino (siRNA Scrambled; Ambion, ThermoFisher). Ambos siRNAs fueron diluidos en Medio de Transfección OPTIMEM™ para ser utilizados a una concentración final de 30 nM. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó el Agente de Transfección diluido a ambos siRNAs y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del Complejo de Transfección. Luego, se sembraron  $2,3 \times 10^5$  células B16F10 en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 6 horas con el Complejo de Transfección bajo las condiciones de cultivo normales señaladas anteriormente. Terminado este tiempo, el medio de Transfección fue reemplazado por medio normal de crecimiento (RPMI, 10% SFB, 1% Penicilina/Estreptomicina). Luego de 72 horas las células fueron cosechadas tanto para evaluar la expresión de Cx43 mediante Western Blot como para ser utilizadas en otros experimentos.

### **Análisis de formación de canales GJ-Cx43 funcionales**

La formación de canales GJ-Cx43 funcionales entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 fue evaluada mediante ensayos de transferencia de calceína.

Como control de activación de CTL, se co-cultivaron LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT como células efectoras y B16F10 no tratadas con siRNAs como células blanco.

CTL y LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT fueron marcados con calceína-AM (Invitrogen) a una concentración final de 0,7  $\mu$ M durante 30 minutos a 37 °C en medio de cultivo RPMI suplementado y posteriormente lavados 2 veces con medio de cultivo RPMI suplementado. La calceína-AM presenta un dominio acetoximetil éster (AM) que le otorga permeabilidad a la membrana plasmática celular. Una vez que la calceína-AM se encuentra dentro del citoplasma celular, esterasas intracelulares no específicas hidrolizan el dominio AM, causando que la calceína emita fluorescencia verde y pierda dicha permeabilidad, quedando retenida en la célula. Así, la calceína puede ser transferida de una célula a otra adyacente solo a través de canales GJ (Abbaci et al., 2008).

Paralelamente, células de melanoma B16F10, no tratadas o previamente transfectadas con los diferentes siRNAs (siRNA-Cx43 o siRNA Scrambled) fueron marcadas con el Cell Tracker™ Violet BMQC (Invitrogen) a una concentración final de 10  $\mu$ M. Para ello, primero las células fueron lavadas 2 veces y resuspendidas en PBS a concentración  $2 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 5  $\mu$ l de Violet BMQC 1 mM y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se agregaron 500  $\mu$ l de SFB y se incubó durante 1 minuto. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en medio de cultivo RPMI suplementado.

Posteriormente, los linfocitos marcados con calceína y las células tumorales marcadas con Violet BMQC fueron co-cultivadas durante 30 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> a una razón E:B/5:1. Finalizado el tiempo de incubación, los co-cultivos fueron

fijados durante 16 horas utilizando PFA 2%. Luego, las células se lavaron una vez y fueron resuspendidas en PBS 2% FBS y se adquirieron mediante citometría de flujo (FACS Verse™, Biolegend). Se analizó la presencia de calceína en las células B16F10 (B16F10 Violet BMQC<sup>+</sup> Calceína<sup>+</sup>) utilizando el programa FlowJo v10.0.7.

### **Medición de la actividad de GrzB**

Para evaluar la actividad citotóxica de los CTL sobre las células B16F10, se midió la actividad de GrzB en las células blanco utilizando kit comercial GranToxiLux™ según las especificaciones del fabricante (OncoImmunit, Inc.). Las células B16F10 pretratadas o no con siRNAs fueron marcadas con TFL4 y el marcador de viabilidad NFL1. Luego, fueron co-cultivadas con los CTL durante 60 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, a una razón E:B/5:1, en presencia del sustrato de GrzB (PS). Cuando el sustrato PS es hidrolizado por la enzima GrzB, emite fluorescencia, permitiendo así detectar la actividad de GrzB en las células blanco (TFL4<sup>+</sup> NFL1<sup>-</sup> PS<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo. Finalizado el tiempo de incubación, co-cultivos fueron lavados y resuspendidos en PBS 2% SFB para ser adquiridos en citómetro de flujo (FACS Verse™, Biolegend). Resultados fueron analizados utilizando el programa FlowJo v10.0.7.

### **Western Blot**

Las células fueron lisadas utilizando Buffer RIPA (ThermoFisher) suplementado con EDTA 5 mM y cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (ThermoFisher), durante 30 minutos en hielo, agitando las muestras en vórtex cada 10 minutos. Luego, las muestras fueron sonicadas durante 15 segundos a 22,5 kHz (XL2000-010; Misonix, Inc.) y centrifugadas a 13.000 G por 20 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. La concentración de proteínas fue determinada mediante el



método de Bradford (595 nm; Sigma-Aldrich). Posteriormente, se realizó electroforesis SDS-PAGE de estas muestras en donde se cargaron 30 µg de proteínas totales por carril, utilizando geles de acrilamida al 12% para separar las proteínas. Una vez finalizado, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Protram, GE Healthcare) las cuales posteriormente fueron incubadas durante 1 hora en solución de bloqueo (leche descremada 5%, TBS-Tween-20 0,1%). Luego, las membranas fueron incubadas durante 16 horas a 4°C con anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-Cx43 (C6219, Sigma Aldrich) diluido 1:500 en solución de bloqueo. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween-20 0,1%. Seguido a esto, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario producido en cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (SA1-200, ThermoFisher), diluido 1:5000 en solución de bloqueo. Finalizado este tiempo, se retiró el anticuerpo lavando las membranas 3 veces con TBS-Tween-20 0,1% y se revelaron mediante método de quimioluminiscencia utilizando el kit comercial SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de incubar la membrana con el sustrato quimioluminiscente, fue analizada en fotodocumentador (Amersham™ Imager 600, GE Healthcare) con un tiempo de exposición 5 minutos. Después de eso, se retiraron los anticuerpos unidos a las membranas de nitrocelulosa utilizando Restore™ Stripping Buffer (21059, ThermoFisher) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar la membrana una vez con TBS, se bloqueó nuevamente como se describe antes y se incubó con anticuerpo monoclonal anti-β-actina IgG<sub>1</sub> conjugado a HRP (SC-47778, Santa Cruz Biotechnology), durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana fue nuevamente revelada

utilizando el método de quimioluminiscencia y las imágenes fueron obtenidas utilizando el fotodocumentador antes señalado, con un tiempo de exposición 30 segundos.

### **Citometría de flujo**

Se analizó el fenotipo de CTL pMEL-1 y LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT mediante citometría de flujo. Para ello las células fueron lavadas una vez con PBS 2% SFB y luego incubadas durante 20 minutos con los anticuerpos anti-CD25 (1:1500, clon PC61, conjugado a APC, Biolegend), anti-CD44 (1:500, clon IM7, conjugado a PE-Cy5, Biolegend), anti-CD8 (1:500, clon 53-6.7, conjugado a V500, Biolegend) y anti-Vβ13 (1:400, clon MR 12.3, conjugado a V450, Biolegend). Posteriormente, las células fueron incubadas con el marcador de viabilidad 7-AAD (1:1500). Finalmente, las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Verse™ (Biolegend) y analizadas utilizando el programa FlowJo v10.0.7.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.01. Las diferencias entre los tratamientos utilizados fueron analizadas mediante Test T-Student o ANOVA de una vía, seguido de una prueba de múltiples comparaciones de Newman-Keuls. El valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los resultados son representados por valores promedios  $\pm$  DE.

## RESULTADOS

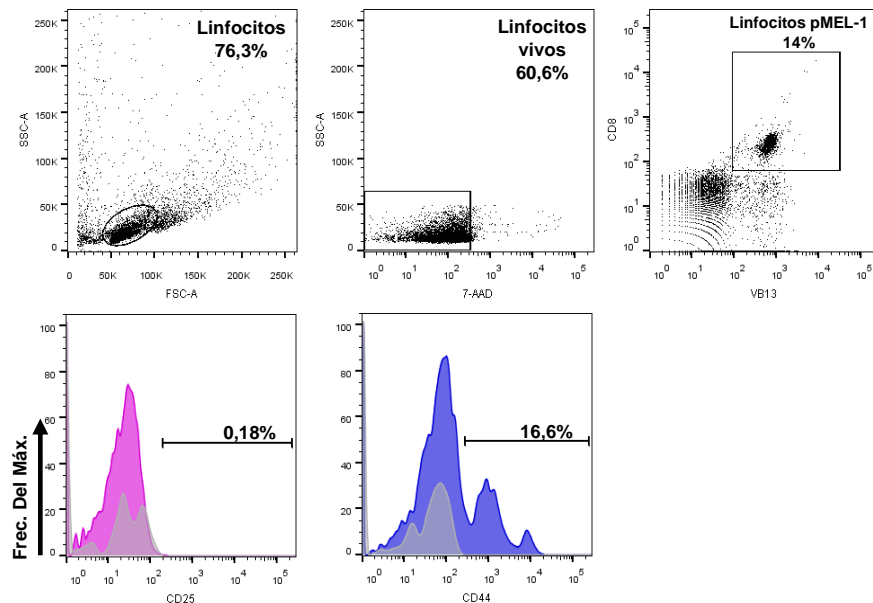
### **CTL generados desde esplenocitos de ratones pMEL-1 expresan marcadores de perfil efector**

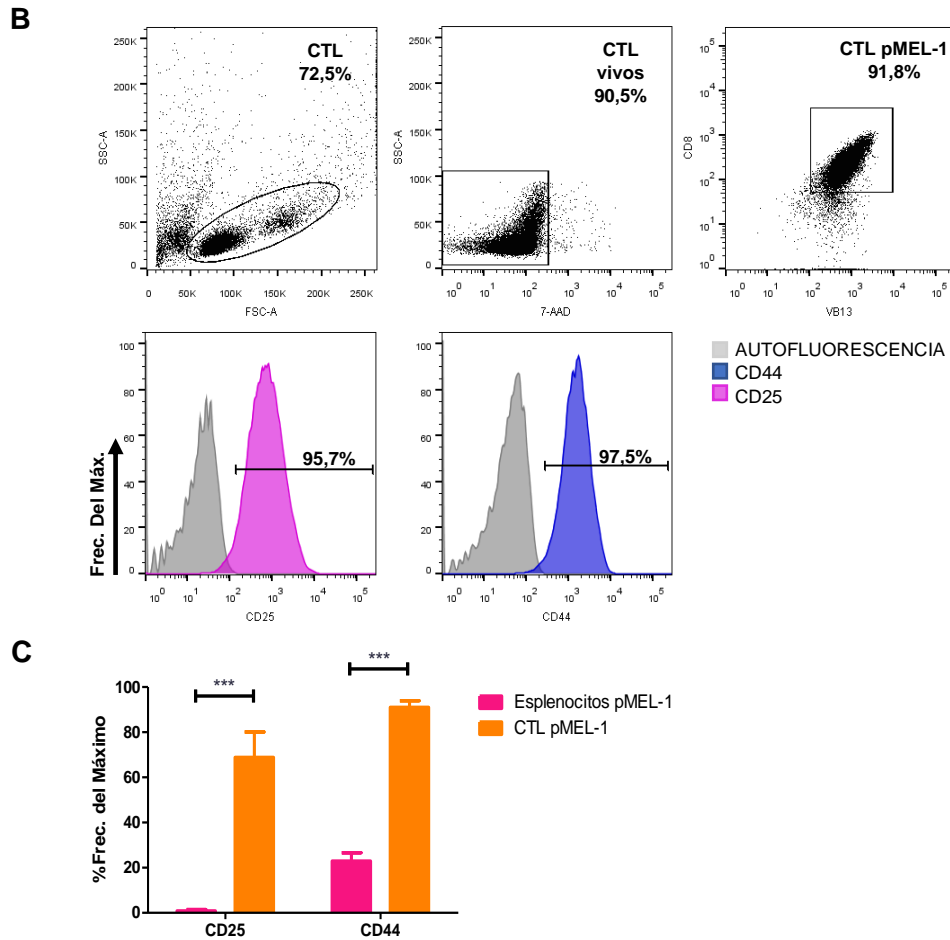
La formación de la sinapsis inmunológica citotóxica ocurre en un contexto antígeno específico (Dieckmann et al., 2016). Por lo tanto, para estudiar este proceso es necesario utilizar LT con la capacidad de reconocer específicamente un antígeno presentado en las células blanco en un contexto MHC-I. Además, es necesario que estos LT se encuentren diferenciados hacia un fenotipo efector, es decir, que tengan la capacidad de reconocer y eliminar las células tumorales blanco. Para ello, en este trabajo se utilizó el modelo murino pMEL-1, que se caracteriza por poseer LT CD8<sup>+</sup> que expresan la cadena transgénica V $\beta$ 13 en su TCR que reconoce específicamente el péptido gp100<sub>25-33</sub> (XXXRNQDWL) de la proteína gp100 unido a moléculas MHC-I H-2 D<sup>b</sup>. La proteína gp100 es considerada un MAA, y se expresa en células de linaje melanocítico y es sobre-expresada en diferentes líneas de melanoma, incluida la línea B16F10 singénica de ratones pMEL-1 (Kawakami et al., 1995; Overwijk et al., 2003).

Para la generación *in vitro* de CTL específicos contra el péptido gp100<sub>25-33</sub>, esplenocitos totales de ratones pMEL-1 fueron estimulados con IL-2 durante 6 días y activados utilizando el péptido hgp100<sub>25-33</sub>. El fenotipo efector de estos CTL fue corroborado mediante el análisis de la expresión de los receptores CD8, CD25 y CD44, además de la cadena V $\beta$ 13 del TCR por citometría de flujo. En la Figura 1 se muestran los gráficos representativos de los resultados obtenidos para esplenocitos totales pMEL-1 (Fig. 1A) y CTL generados *in vitro* (Fig. 1B). La estrategia de análisis consistió en primero seleccionar la población correspondiente a linfocitos de

acuerdo al tamaño (FSC) y granulosidad (SSC). Luego, se seleccionó la población  $CD8^+ V\beta13^+$  correspondiente a los LT  $CD8^+$  que expresan la cadena transgénica  $V\beta13$  del TCR y dentro de esta población se analizó la expresión de  $CD25$  y  $CD44$  (marcadores de activación y de memoria de LT, respectivamente). Cerca del 17% de los esplenocitos totales correspondieron a LT  $CD8^+$  pMEL-1 ( $CD8^+V\beta13^+$ ), los cuales mostraron bajos niveles de expresión de los marcadores  $CD25$  y  $CD44$ . Como se esperaba, luego de 6 días de cultivo, el 90% de la población celular analizada correspondió a LT  $CD8^+$  pMEL-1 ( $CD8^+V\beta13^+$ ). De esta población el 90% resultó  $CD44^+$  y sobre el 60% resultó  $CD25^+$  (Fig. 1C), indicando que estas células fueron activadas y diferenciadas hacia un fenotipo efector (CTL pMEL-1).

**A**

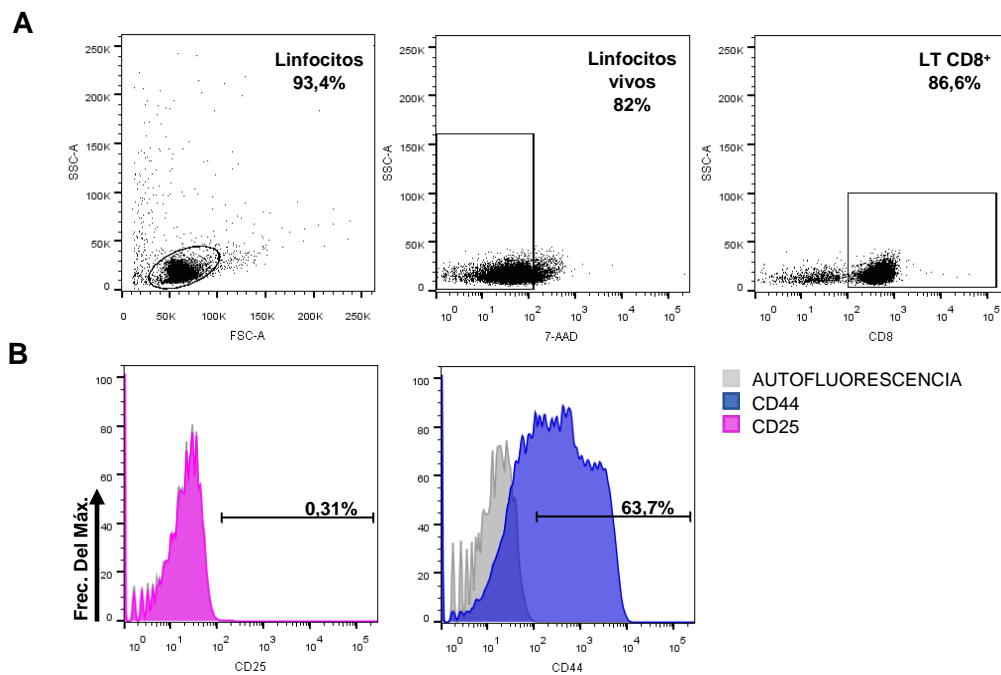




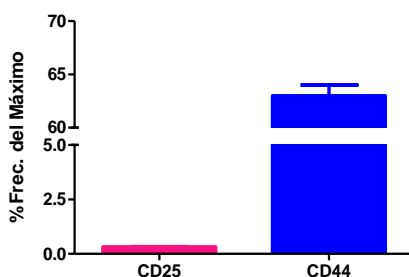
**Figura 1. CTL pMEL-1 generados in vitro expresan marcadores de fenotipo efector CD25 y CD44.**

Se muestran resultados de citometría de flujo de la expresión de marcadores de activación CD25 y de memoria CD44 para precursores de CTL obtenidos desde esplenocitos totales pMEL-1 (A) y CTL pMEL-1 generados in vitro después de 6 días de cultivo en presencia de IL-2 y el péptido hgp100<sub>25-33</sub> (B). C) Comparación de los niveles de expresión de CD25 y CD44 en esplenocitos totales y CTL pMEL-1. Gráfico de barras muestra el promedio  $\pm$  DE; n = 5 experimentos independientes. Significancia estadística fue analizada utilizando la prueba T-Student. \*\*\*p < 0,001.

Por otro lado, como control de activación de CTL generados in vitro, en este trabajo se utilizaron LT CD8<sup>+</sup> vírgenes obtenidos desde ratones C57BL/6 WT. Estos LT fueron purificados mediante selección negativa a partir de esplenocitos totales de ratón. El fenotipo virgen de estas células fue corroborado mediante el análisis de la expresión de los receptores CD8, CD25 y CD44 por citometría de flujo. En la Figura 2 se observa que alrededor del 87% de la población linfocitaria purificada correspondió a LT CD8<sup>+</sup> que expresan nulos niveles del marcador de activación CD25. Además, solo el 65% de esta población expresó el marcador de memoria CD44, un nivel de expresión bajo en comparación a células T activadas (Fig. 1B vs Fig. 2).



C



**Figura 2. LT CD8<sup>+</sup> purificados desde esplenocitos de ratones C57BL/6 WT presentan fenotipo de LT vírgenes.**

Se muestran resultados de la expresión de marcadores de activación CD25 y de memoria CD44 en LT CD8<sup>+</sup> vírgenes purificados desde esplenocitos de ratones C57BL/6 WT analizados mediante citometría de flujo. Gráfico de barras muestra el promedio  $\pm$  DE; n = 3 experimentos independientes.

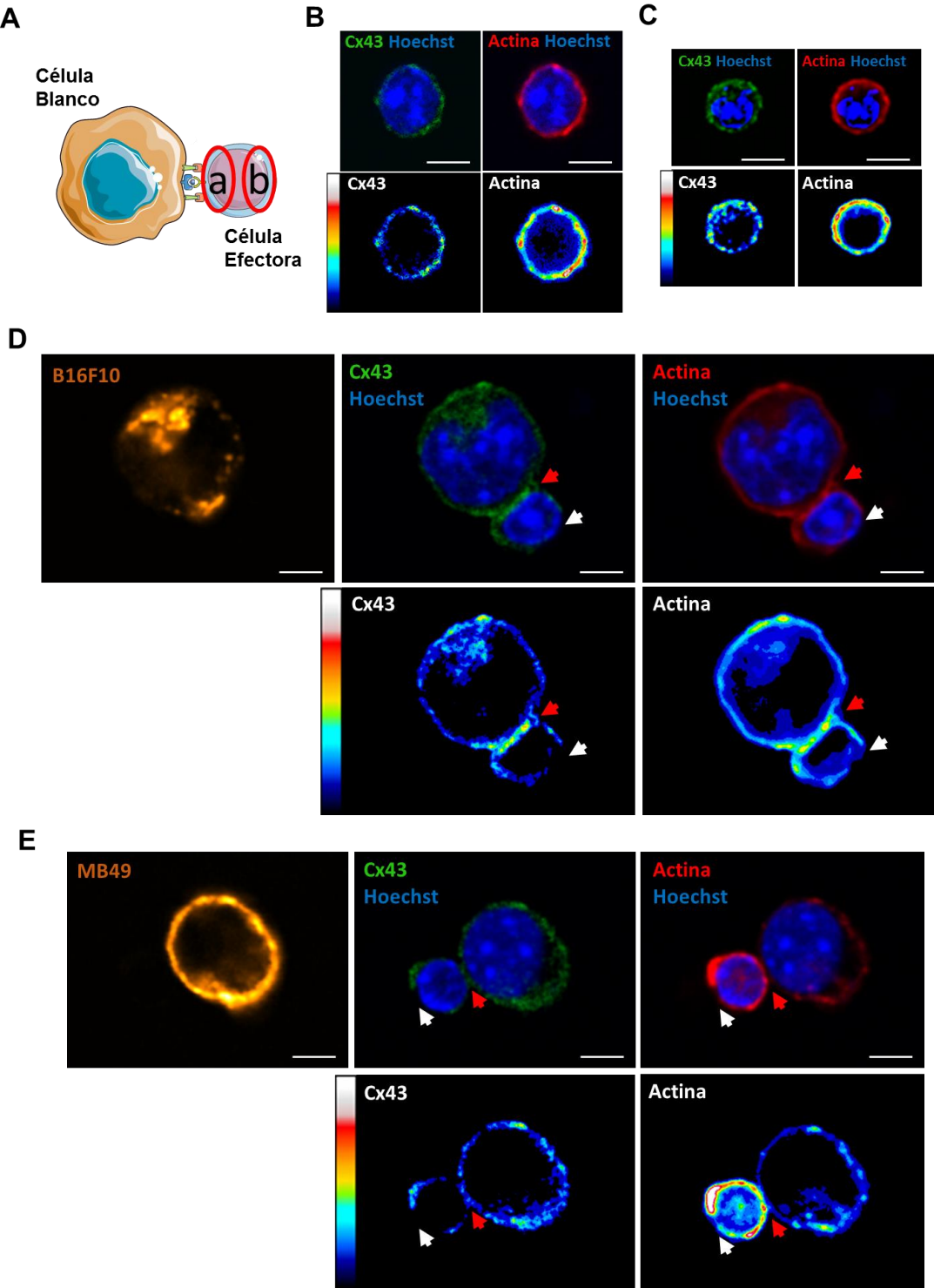
### **Cx43 polariza hacia el sitio de contacto entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 durante la formación de la sinapsis inmunológica citotóxica**

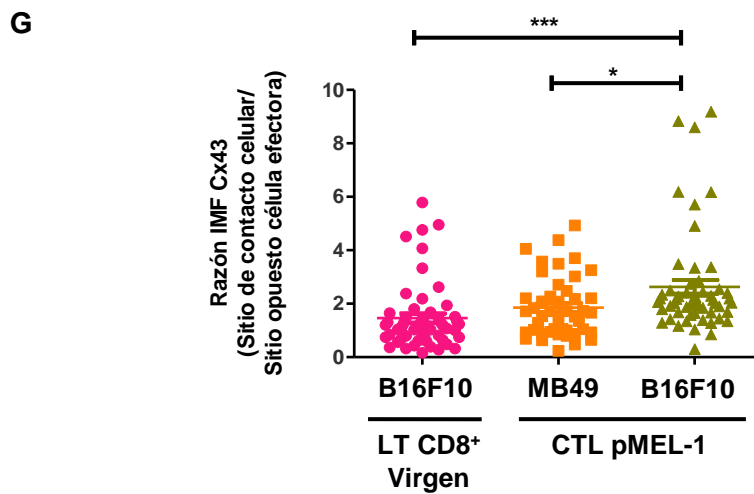
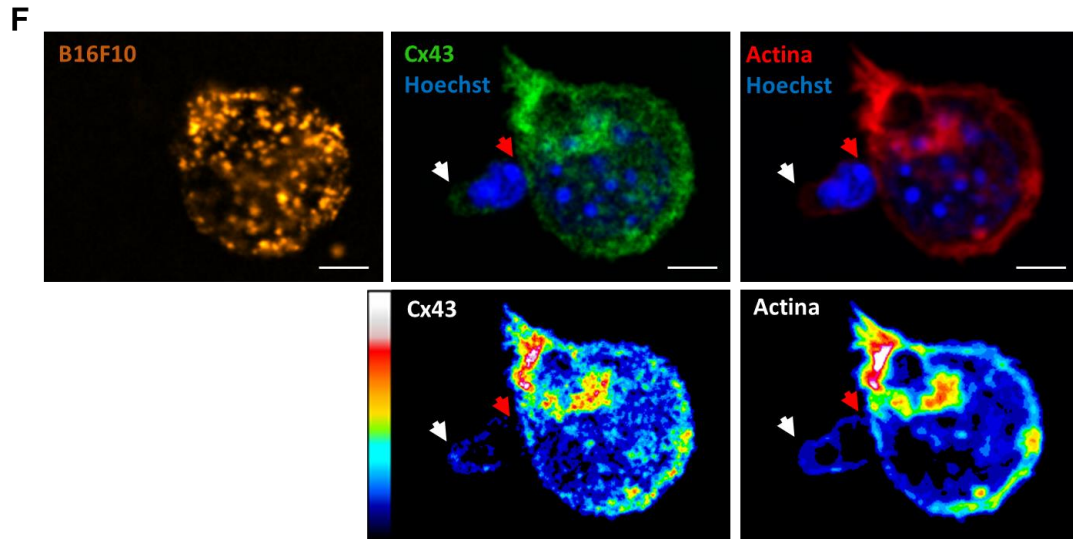
La formación de la SIC implica la reorganización de receptores de reconocimiento, moléculas de adhesión y re-estructuración del citoesqueleto en los CTL (Dieckmann et al., 2016; Monks et al., 1998). Recientemente, se ha descrito la participación de canales GJ formados por Cx43 (GJ-Cx43) en la SI formada entre DC y LT CD4<sup>+</sup> (Mendoza-Naranjo et al., 2011), así como también en la SI formada durante la activación de células NK mediada por DC y entre células NK y células tumorales (Tittarelli et al., 2014). En este trabajo se exploró la participación de los canales GJ-Cx43 en la SIC formada entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10. Para ello, se realizaron co-cultivos de estas células por 30 minutos y se evaluó la localización sub-celular de Cx43 en la célula efectora mediante inmunofluorescencia

y microscopía confocal (Figura 3). La polarización de Cx43 hacia la zona de contacto durante la formación de la CIS se determinó estableciendo el radio de las IMF de Cx43 en la zona de contacto y la zona opuesta de la célula efectora, como se muestra en el esquema de la Fig. 3A. Durante la formación de la SIC entre CTL y células de melanoma B16F10 se observó una clara polarización de Cx43 hacia la zona de contacto entre estas células (Fig. 3D). Por otro lado, la distribución de Cx43 en la membrana celular de los CTL no conjugados con células B16F10 fue prácticamente uniforme (Fig. 3B). Además, durante la formación de la SIC, el citoesqueleto de actina se re-distribuyó hacia la zona de contacto de la célula efectora (Fig. 3D) formando una estructura conocida como “anillo de actina”, la cual se ubica en el dSMAC (Dieckmann et al., 2016). Cuando se utilizaron como células blanco la línea de carcinoma urotelial MB49, una línea celular singénica de ratones pMEL-1 y C57BL/6 que no expresa el antígeno gp100 y que por lo tanto no es reconocida por los CTL pMEL-1, se observó una menor polarización de Cx43 hacia la zona de contacto y una distribución homogénea de actina en comparación a lo observado entre CTL pMEL-1 y B16F10 (Figs. 3E y 3G), sugiriendo que no hay formación de sinapsis y que la polarización de Cx43 es un fenómeno que depende del reconocimiento antigénico. También, se realizaron co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT como células efectoras y células B16F10 como blanco. Los LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT expresaron niveles similares de Cx43 en la membrana celular que CTL pMEL-1 (Fig. 3C). En este caso se observó que la polarización de Cx43 hacia la zona de contacto es menor que en CTL pMEL-1, indicando que la polarización de Cx43 hacia la zona de contacto celular durante la formación de la SIC es un proceso dependiente de la activación de los linfocitos (Figs. 3F y 3G). Además, no se



observó acumulación de actina en el sitio de contacto, sugiriendo que no hay formación de la SI entre LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT y células B16F10 (Fig. 3F).





**Figura 3. Cx43 polariza hacia el sitio de contacto entre CTL y B16F10 durante la formación de la SIC.**

La localización de Cx43 durante la formación de la SIC fue evaluada mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Linfocitos T y células blanco, previamente marcadas con WGA, fueron co-cultivados por 30 minutos en una razón E:B/5:1. A) Esquema de la cuantificación de la polarización de Cx43 hacia la zona de contacto durante la formación de la SIC. El nivel de polarización de Cx43 hacia la zona de contacto se midió como la razón entre la IMF de Cx43 en la zona de contacto (a) sobre la IMF en la zona

opuesta (b) de la célula efectora. Se muestran imágenes representativas de la distribución de Cx43 (verde) y actina (rojo) en células efectoras no conjugadas a células blanco para CTL pMEL-1 (B) y LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT (C), conjugados CTL pMEL-1/B16F10 (D), conjugados CTL pMEL-1/MB49 (E) y conjugados LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT/ B16F10 (F). Las flechas rojas indican las zonas de contacto intercelular y las flechas blancas indican las zonas opuestas. Los núcleos celulares fueron identificados por tinción con Hoechst. Escala de pseudolor; negro IMF mínima; blanco IMF máxima. Barra de escala, 5  $\mu$ m G) Cuantificación de la polarización de Cx43 hacia la zona de contacto entre los distintos tipos de conjugados celulares; n = 60 conjugados por condición; 2 experimentos independientes. Significancia estadística fue analizada utilizando la prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba de múltiples comparaciones Newman-Keuls. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,0001.

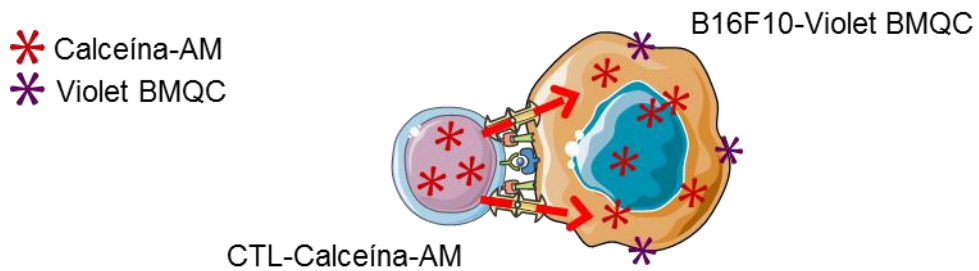
### **La polarización de Cx43 hacia la sinapsis inmunológica citotóxica se asocia a la formación de canales GJ-Cx43 funcionales entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10**

Los canales GJ permiten la comunicación intercelular mediando el traspaso de moléculas pequeñas (< 1.4 nm) como segundos mensajeros, péptidos y miRNAs que regularán diversos aspectos funcionales en las células receptoras (Gleisner et al., 2017). Como se determinó antes, durante la formación de la SIC, Cx43 polariza hacia el sitio de contacto entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 de manera antígeno-específica (Fig. 3), sugiriendo que los canales GJ-Cx43 podrían participar en la comunicación intercelular entre linfocitos y células tumorales durante este proceso. Para determinar si los canales GJ-Cx43 median la comunicación o acoplamiento entre CTL y células tumorales durante la SIC, se evaluó la formación de canales funcionales GJ midiendo la transferencia de calceína desde CTL pMEL-1

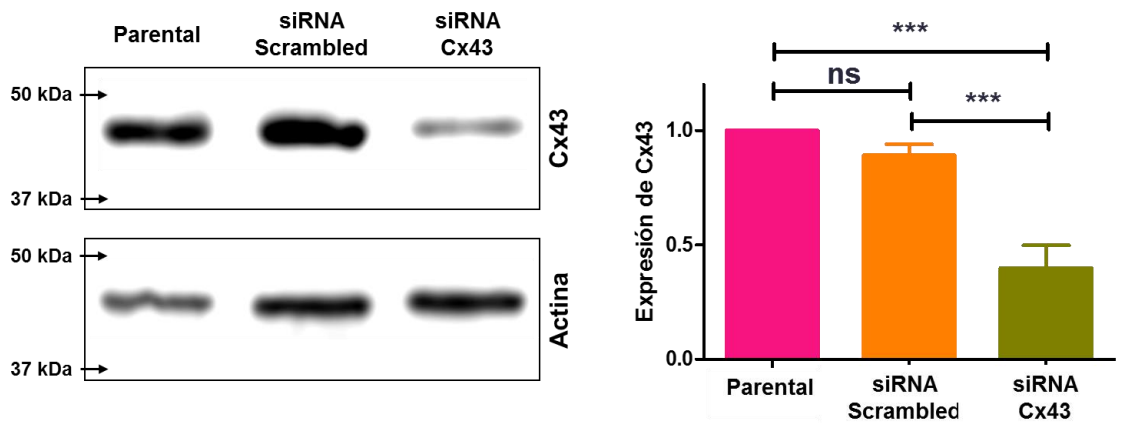
a células B16F10 (Fig. 4A). Primero, se inhibió la expresión de Cx43 en células B16F10 mediante la transfección de siRNAs específicos contra el mRNA de esta proteína (siRNA-Cx43). En la Figura 4B se observa que células B16F10 transfectadas con siRNA-Cx43 expresan bajos niveles de esta proteína en comparación a las células tratadas con siRNA control irrelevante (siRNA-Scrambled) y las B16F10 no transfectadas (parentales). Los niveles de inhibición de la expresión de Cx43 en células B16F10 transfectadas con los siRNA-Cx43 fueron mayores al 50% en diferentes experimentos (Fig. 4B, derecha). Posteriormente, las células de melanoma fueron marcadas con Violet BMQC (no permeable por canales GJ) y se co-cultivaron por 30 minutos con CTL pMEL-1 o LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT previamente cargados con calceína-AM en una razón 1:5/B:E (Fig. 4A). Cuando la calceína-AM ingresa a la célula, es hidrolizada a por estereasas intracelulares no específicas, provocando que se vuelva fluorescente y pueda ser transferida a otra célula solo a través de canales GJ (Abbaci et al., 2008). Así, en este ensayo la detección de calceína mediante citometría de flujo en las células blanco, es un indicativo de la formación de canales GJ entre CTL pMEL-1 y células B16F10. Para analizar los resultados de estos experimentos se seleccionó la población de células B16F10 de acuerdo a tamaño (FSC) y granulosidad (SSC), luego se seleccionaron aquellas células positivas para el marcador Violet BMQC (Violet BMQC<sup>+</sup>) y posteriormente dentro de esta población se seleccionaron aquellas células que recibieron calceína desde los CTL pMEL-1 (Violet BMQC<sup>+</sup> Calceína<sup>+</sup>) (Fig. 4C). Estos resultados mostraron claramente que un mayor porcentaje de células B16F10 que expresan niveles normales de Cx43 (parentales o transfectadas con siRNA-Scrambled), reciben calceína desde los CTL pMEL-1 en comparación a las células B16F10 silenciadas para esta proteína (siRNA-Cx43), en donde el porcentaje de

transferencia de calceína disminuye aproximadamente en un 30-40%. (Figs. 4D y 4E). Estos resultados sugieren que, concomitantemente a la polarización de Cx43 a la SIC entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10, se forman canales GJ-Cx43 funcionales. De manera similar, la transferencia de calceína entre LT CD8<sup>+</sup> WT vírgenes y células B16F10 fue drásticamente menor que entre CTL pMEL-1 y B16F10 (Figs. 4D y 4F), indicando que la formación de canales GJ-Cx43 funcionales es un fenómeno dependiente de la activación de las células efectoras y de la formación de SIC.

**A**



**B**



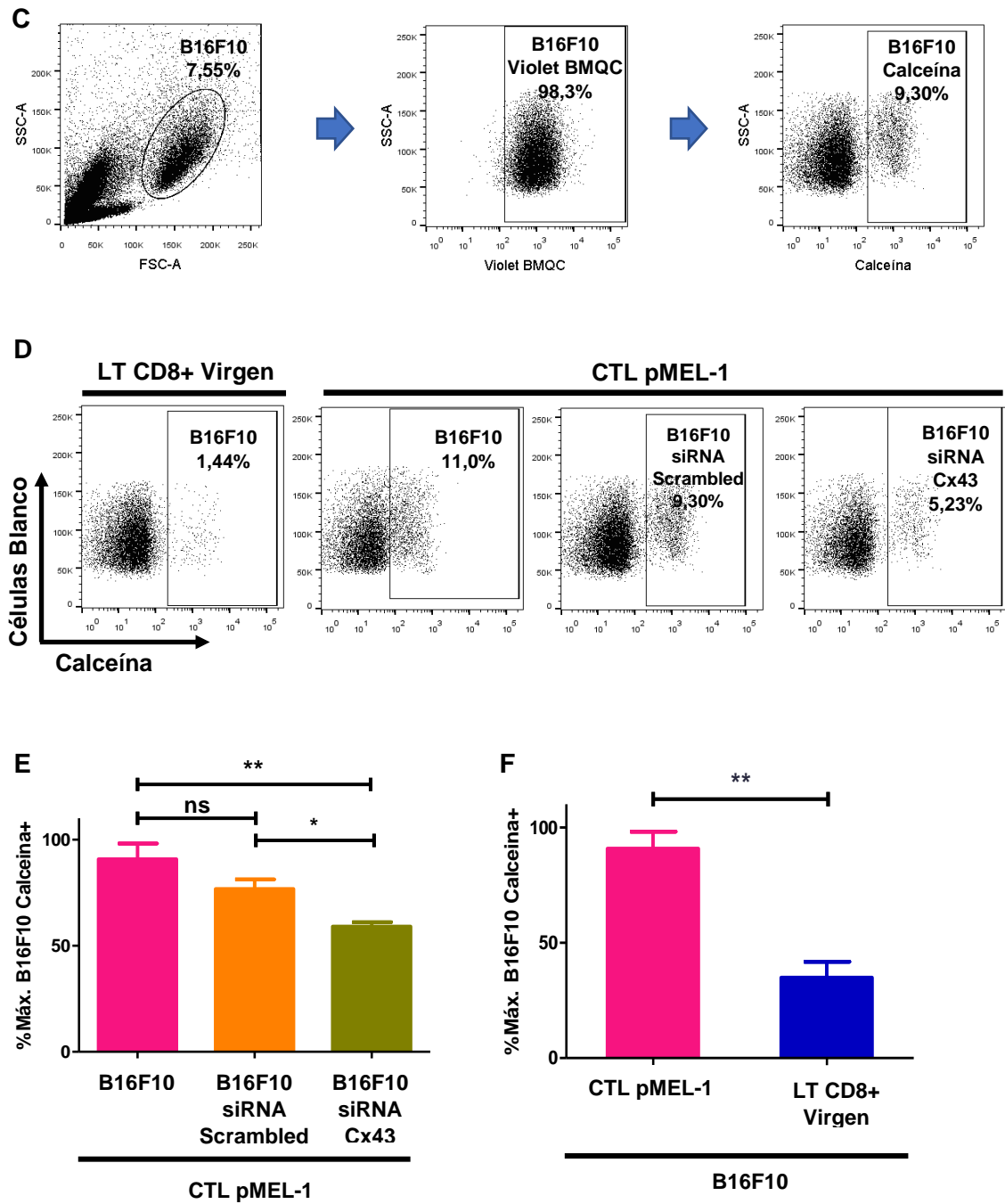


Figura 4. CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 se acoplan mediante canales GJ-Cx43 funcionales durante la formación de SIC.

La formación de canales GJ-Cx43 funcionales se evaluó mediante ensayos de transferencia de calceína. A) Las células efectoras CTL pMEL-1 o LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT fueron cargadas con calceína-AM mientras que las células blanco B16F10 transfectadas o no con siRNA-Cx43 o siRNA-Scrambled, fueron marcadas con Violet BMQC. Luego de 30 minutos de cocultivo de estas células, se analizó la transferencia de calceína desde la célula efectora a la célula blanco mediante citometría de flujo. B) Células B16F10 transfectadas con siRNA-Cx43 expresan bajos niveles de Cx43 en comparación a las células B16F10 transfectadas con siRNA-Scrambled o células B16F10 no transfectadas (parentales). La expresión de Cx43 y actina fue determinada por western blot 3 días después de la transfección. El gráfico de barras muestra la cuantificación densitométrica de Cx43 (normalizada con actina) de cinco ensayos de transfección independientes. C) Estrategia de análisis de transferencia de calceína mediante citometría de flujo. Primero se seleccionó la población de B16F10, luego las B16F10 positivas para Violet BMQC y finalmente aquellas positivas para calceína. D) Resultados representativos de la transferencia de calceína entre CTL pMEL-1 o LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT y células B16F10 (transfectadas o no con siRNA-Cx43 o siRNA-Scrambled). E-F) Gráfico de barras muestra el porcentaje del máximo de calceína transferida desde las células efectoras hacia las células blanco. Resultados corresponden al promedio  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado aplicando la prueba de ANOVA de una vía, seguido de la prueba de múltiples comparaciones Newman-Keuls. ns: no significativo, \*\*  $p < 0,01$ .

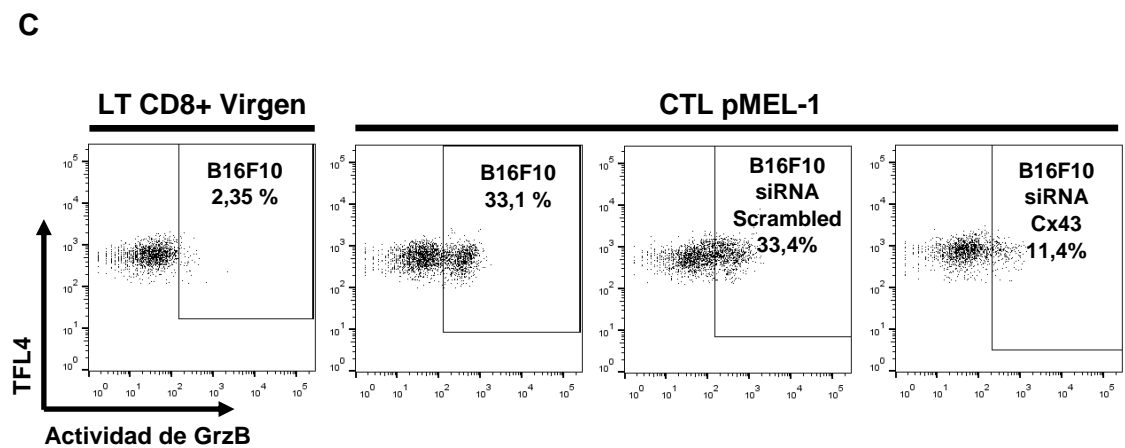
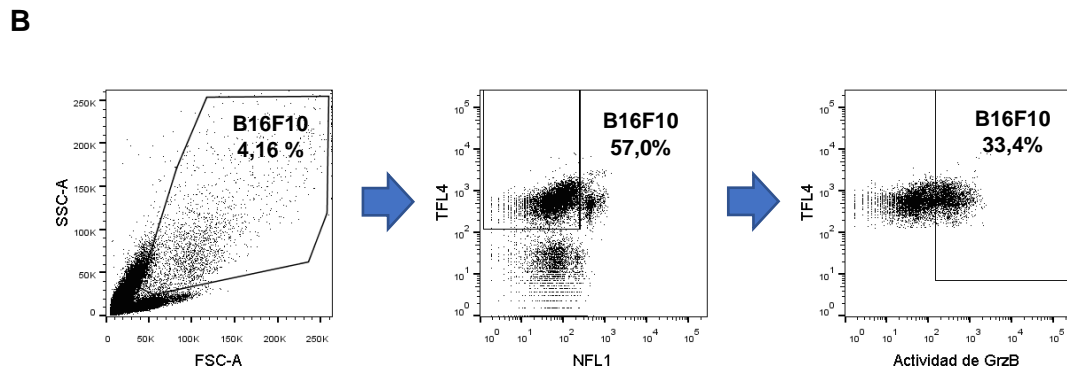
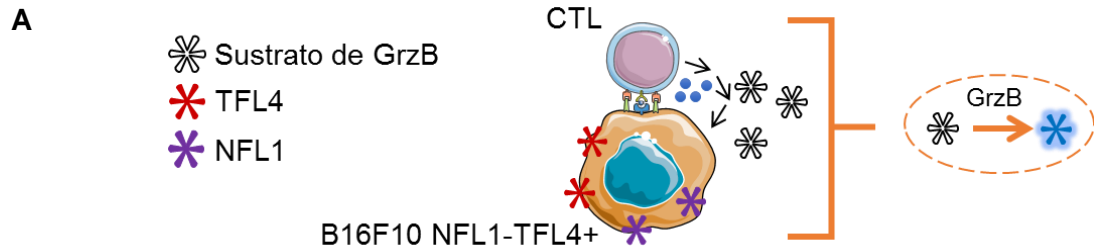
### **La formación de canales GJ-Cx43 funcionales es requerida para una óptima actividad citotóxica de CTL pMEL-1 contra células de melanoma B16F10**

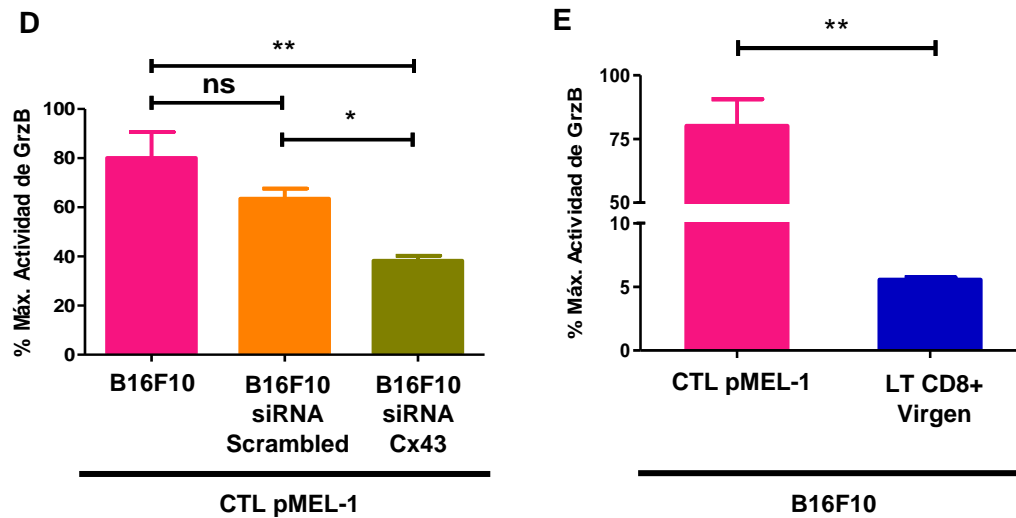
Los canales GJ-Cx43 han sido descritos como mediadores de la comunicación celular entre células NK y células tumorales durante la formación de la SIC.

Trabajos recientes han demostrado que la inhibición de estos canales durante la SIC de células NK disminuye la actividad de GrzB en las células tumorales blanco y con ello la capacidad citotóxica anti-tumoral de células NK (Tittarelli et al., 2014). Al igual que las células NK, los CTL participan en la eliminación de células tumorales o infectadas con virus y además, como lo sugieren los resultados obtenidos en trabajo, forman canales GJ-Cx43 funcionales durante la SIC. Para determinar si los canales GJ-CX43 cumplen un rol en la función citotóxica de los CTL, se evaluó la actividad de GrzB en células B16F10 transfectadas o no con siRNA-Cx43 o siRNA-Scrambled y posteriormente co-cultivadas con CTL pMEL-1. Previamente, células B16F10 fueron incubadas con el marcador de membrana TFL4 y el marcador de viabilidad NFL1, con el objetivo de descartar células que estuviesen muertas antes de realizar el ensayo. Luego, las células B16F10 fueron co-cultivadas con CTL pMEL-1 o LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT en presencia de un sustrato fluorescente de GrzB (PS; Fig. 5A), que permite detectar la actividad de esta enzima mediante citometría de flujo (Packard et al., 2007). La estrategia de análisis de los resultados se muestra en la Figura 5B: primero se seleccionó la población correspondiente a las células blanco según tamaño (FSC) y granulosidad (SSC), luego se seleccionó la población de células B16F10 que se encontraban vivas al inicio del ensayo (TFL4<sup>+</sup> NFL1<sup>-</sup>) y finalmente dentro de esta población se seleccionaron aquellas células positivas para la actividad de GrzB (TFL4<sup>+</sup> NFL1<sup>-</sup> PS<sup>+</sup>). Los resultados obtenidos mostraron una significativa disminución en la actividad de GrzB en células B16F10 silenciadas para Cx43 con respecto a las células blanco que expresan niveles normales de Cx43 (Figs. 5C y 5D), indicando que la formación de canales GJ-Cx43 entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10 cumple un rol importante en la eliminación de células tumorales por parte de los CTL. Como era esperado, los LT CD8<sup>+</sup> vírgenes



WT no mostraron actividad citotóxica contra B16F10, dado que la eliminación de las células tumorales por parte de LT CD8<sup>+</sup> es un fenómeno dependiente de la activación de estas células (Figs. 5C y 5E).





**Figura 5. Inhibición de la formación de canales GJ-Cx43 afecta negativamente la actividad citotóxica de CTL pMEL-1 contra células de melanoma B16F10.**

La participación de los canales GJ-Cx43 en la capacidad citotóxica de los CTL pMEL-1 se evaluó mediante ensayos de actividad de GrzB. A) Las células blanco B16F10 silenciadas o no para Cx43 fueron cargadas con los marcadores de membrana TFL4 y de viabilidad NFL1 y posteriormente incubadas con las células efectoras CTL pMEL-1 o LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT durante 1 hora en presencia de un sustrato fluorescente de GrzB (PS), el cual permite detectar la actividad de esta enzima mediante citometría de flujo. B) Estrategia de análisis de la actividad de GrzB. La actividad de GrzB se analizó en las células B16F10 que se encontraban vivas al inicio del ensayo (TFL4<sup>+</sup>NFL1<sup>+</sup>PS<sup>+</sup>). C) Resultados representativos de la actividad de GrzB en células B16F10 transfectedas o no con siRNA-Cx43 o siRNA-Scrambled, co-cultivadas con CTL pMEL-1 o LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT. D-E) Gráfico de barras muestra la actividad de GrzB en las células B16F10 como porcentaje del máximo observado en el ensayo. Resultados corresponden al promedio  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. Significancia estadística fue analizada mediante prueba de ANOVA de una vía, seguido de la prueba de múltiples comparaciones Newman-Keuls. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## DISCUSIÓN

El desarrollo de una respuesta inmune contra tumores requiere el establecimiento de comunicaciones estrechas entre células del sistema inmunológico. Uno de estos tipos de comunicaciones intercelulares corresponde a la formación de la SI, que tiene lugar durante la activación de LT por las APC, principalmente por DC y durante la fase efectora de la respuesta inmune, entre CTL o células NK y las células tumorales blanco, en donde la SI es conocida como SIC. En ambos contextos, la formación de la SI involucra el reordenamiento del citoesqueleto de las células involucradas, receptores de reconocimiento y moléculas de adhesión. Particularmente la SIC, asegura la liberación polarizada de los gránulos citotóxicos contenedores de enzimas Pfn y Grz que desencadenarán la muerte apoptótica de la célula blanco (Dieckmann et al., 2016; Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). Recientemente, se ha descrito la participación de canales GJ-Cx43 como estructuras funcionales tanto de las SI formadas entre DC y linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y entre DC y células NK, como de la SIC formada entre células NK y células tumorales blanco. Se ha observado que estos canales son necesarios para la activación tanto de LT CD4<sup>+</sup> como de células NK mediada por DC, así como también para la eficiente eliminación de células de melanoma por las células NK (Elgueta et al., 2009; Mendoza-Naranjo et al., 2011; Tittarelli et al., 2014). Considerando que las SIC mediadas por CTL y células NK poseen similitudes funcionales y estructurales (Martínez-Lostao et al., 2015; Thauland & Parker, 2010), en este trabajo se analizó el rol que juegan los canales GJ-Cx43 durante la SIC entre CTL y células blanco de melanoma. Para ello, se utilizaron CTL generados in vitro a partir de esplenocitos totales de ratones pMEL-1, que reconocen específicamente un epítipo del MAA

gp100 (Overwijk et al., 2003). Este péptido antigénico se expresa en la línea de melanoma B16F10 (singénica a los ratones pMEL-1), por lo que esta línea celular es reconocida eficientemente por CTL pMEL-1. Los CTL pMEL-1 generados in vitro presentaron un fenotipo efector caracterizado por altos niveles de expresión de los marcadores de activación y de memoria CD25 y CD44, respectivamente, al contrario de sus precursores (Fig. 1C) y LT CD8<sup>+</sup> vírgenes WT (Fig. 2). El marcador CD25 corresponde a la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (IL-2R) y es expresado en altos niveles en LT luego de la activación del TCR. La expresión de CD25 es importante para la generación de CTL porque incrementa la afinidad del receptor por la IL-2, citoquina necesaria para la expansión y generación de memoria de los LT CD8<sup>+</sup> (Boyman & Sprent, 2012). Por otro lado, CD44 es una glicoproteína de transmembrana con un dominio tipo lectina que se une al ácido hialurónico. Es expresado en altos niveles en LT activados y se ha descrito su participación en la migración y apoptosis de LT (Baaten et al., 2010). Así, la expresión de estos marcadores indica que los CTL pMEL-1 corresponden a células efectoras con capacidad potencial de eliminar células de melanoma que expresen gp100, como la línea celular B16F10, tal como fue descrito por Overwijk et al. en el 2003.

Al igual que en trabajos anteriores, para estudiar la participación de los canales GJ-Cx43 durante la SIC, primero se analizó la distribución de Cx43 en co-cultivos de CTL pMEL-1 y células B16F10 mediante inmunofluorescencia. Imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron que Cx43 se acumula en el sitio de contacto intercelular durante la SIC formada entre CTL pMEL-1 y B16F10, indicando que la comunicación entre estas células podría estar mediada por canales GJ-Cx43 (Fig. 3D) y que este fenómeno sería dependiente tanto la activación del LT como del

reconocimiento antigénico como de la activación del LT, dado que al utilizar como blanco las células MB49, que no expresan el antígeno gp100 (Fig. 3E) o LT no activados (Fig. 3F), esta polarización disminuye significativamente (Fig. 3G). Estos resultados fueron similares a lo observado previamente durante la SIC mediada por células NK (Tittarelli et al., 2014). Además, los LT vírgenes presentan niveles de expresión de Cx43 similares a los CTL (Fig. 3B-C), indicando que la diferencia en la localización sub-celular de Cx43 se debería exclusivamente a una polarización de esta proteína hacia la SIC. Luego de que el CTL reconoce la célula blanco vía interacción del TCR y el complejo pMHC-I, se produce un reordenamiento del citoesqueleto de actina en ésta célula, lo que da lugar a la formación de una estructura de anillo a lo largo del sitio de contacto de las células que indica la formación de la SIC (Dieckmann et al., 2016). Como se esperaba, esta estructura fue observada solo en la condición antígeno-específica CTL pMEL-1/B16F10 (Fig. 3D), lo que indica que la polarización de Cx43 se da solo en el contexto de la formación de la SIC, donde el CTL reconoce específicamente la célula tumoral. Esta estructura tampoco fue observada cuando se utilizaron LT CD8<sup>+</sup> Vírgenes WT, indicando que los LT no activados no pueden formar SI con células tumorales a diferencia de cuando se encuentran con las DC. Se ha descrito que para la formación de la SI durante la activación de LT por DC, solo se necesita la interacción TCR-pMHC y la unión LFA-1-ICAM-1 para inducir el cambio conformacional del citoesqueleto de actina y la polarización de MTOC hacia la SI (Dustin et al., 2010), mientras que las moléculas de co-estimulación aportan fuerza mecánica para mantener la estabilidad de la SI una vez que esta ya se ha formado (Basu & Huse, 2017). Los LT vírgenes utilizados en este trabajo y en general, son una población policlonal, es decir, cada uno de los LT expresan TCR con distintas

especificidades y por lo tanto, la proporción de aquellos específicos para los antígenos presentados por las células B16F10 sería muy baja. Además, aquellos LT vírgenes que expresaran TCR específicos para los antígenos presentados por las células B16F10, tendrían una avidéz por el complejo pMHC-I menor al de los LT activados, requiriendo una mayor concentración del pMHC para desencadenar la formación de la SI y la subsecuente activación del TCR (Dustin & Choudhuri, 2016; Fahmy et al., 2001). Adicionalmente, las células tumorales, a diferencia de las DC, no expresan las moléculas de co-estimulación requeridas por los LT vírgenes para estabilizar sus SI.

Cuando las proteínas de Cx son sintetizadas, éstas se une indirectamente al citoesqueleto a través de la interacción con proteína motoras como miosina, en el caso de actina y kinesinas en el caso de microtúbulos, que se encargarán de transportarlas hacia la membrana plasmática celular para la formación de hemicanales o canales GJ (Epifantseva et al., 2018). Específicamente, la isoforma Cx43 interactúa directamente con la proteína tubulina a través de su dominio C-Terminal (Giepmans et al., 2001). En este trabajo se ha observado que la polarización de Cx43 es concomitante a la polarización de actina exclusivamente en la condición antígeno específica, lo que podría indicar que Cx43 es movilizadada hacia el sitio de contacto a través de filamentos de actina. De hecho, antecedentes publicados por nuestro laboratorio, indican que el reclutamiento de Cx43 a la SI entre LT y beads cargadas con CD3 y CD28, es dependiente del citoesqueleto de actina (Mendoza-Naranjo et al., 2011). Se ha reportado que Cx43 interactúa con las proteínas ocludinas ZO-1 y ZO-2 (Singh & Lampe, 2003). La interacción con ZO-1 ayuda a la estabilización de los canales GJ-Cx43 (Rhett et al., 2008), mientras que

el rol de ZO-2 no se ha determinado totalmente. A su vez ZO-1 y ZO-2 se unen a actina en la membrana plasmática celular para formar las estructuras “Tight Junctions” (Fanning et al., 1998, 2009) lo que permitiría postular que Cx43 interactuaría con ZO-1 y ZO-2, ubicándose en el anillo de actina, hacia el dSMAC durante la SIC para formar canales GJ. Además, recientemente se ha descrito la participación de ZO-2 en la SI entre LT y APC, antecedente que permitía postular que ZO-2 podría también estabilizar la formación de canales GJ durante la SIC (Tello-lafoz et al., 2017). Por otro lado, la interacción TCR-pMHC-1 desencadena la polarización del centrosoma y con ello el movimiento a través de microtúbulos de organelos secretorios contenedores de nuevos TCR y gránulos citotóxicos hacia la grieta sináptica (Stinchcombe et al., 2006). Teniendo en cuenta que Cx43 se mueve a través de microtúbulos hacia la membrana plasmática y en este trabajo se ha observado que solo polariza hacia la zona intercelular cuando se utilizan CTL, se podría postular que la activación del TCR durante la SIC desencadenaría también el movimiento de Cx43 hacia la zona de la SIC dentro de organelos secretorios y posteriormente sería depositada en el anillo de actina para la formación de canales GJ. A través de la utilización de inhibidores específicos de cada tipo de citoesqueleto (por ejemplo, citocalasina o taxol) se podría determinar el papel del citoesqueleto de actina y de tubulina en la polarización y/o reclutamiento de Cx43 en la SIC entre CTL y células de melanoma (Peterson & Mitchison, 2002)

La formación de canales GJ entre células adyacentes permite el traspaso intercelular de moléculas de un tamaño menor a 1,4 nm, como péptidos pequeños, miRNAs y segundos mensajeros (ATP, cAMP,  $Ca^{+2}$ , etc.), regulando diversos procesos biológicos (Gleisner et al., 2017). Particularmente en la respuesta inmune

anti-tumoral, las comunicaciones intercelulares mediadas por GJ participan en diversos procesos (Fig. 6). Por ejemplo se ha descrito que la transferencia de los miRNAs miR-142 y miR-223 mediante GJ desde macrófagos a células de hepatocarcinoma inhiben la proliferación tumoral (Aucher et al., 2014). También, se ha descrito que la transferencia de cGAMP mediante GJ-Cx43 desde células metastáticas en el cerebro, provenientes de carcinoma de mama y pulmón, a astrocitos promueven la metástasis, el crecimiento tumoral y la quimio-resistencia (Chen et al., 2016). Al evaluar la transferencia de calceína, una molécula permeable a canales GJ (Abbaci et al., 2008), desde los CTL pMEL-1 a células B16F10, se logró confirmar que durante la SIC existe comunicación a través de estos canales, sugiriendo que se podrían estar enviando señales moleculares importantes para la eliminación de la célula tumoral. Más aún, al utilizar células B16F10 que expresan bajos niveles de Cx43 (Fig. 4A) como blanco, esta comunicación disminuyó en un 40%, indicando que la polarización de Cx43 hacia la zona intercelular durante la SIC es concomitante a la formación de canales GJ entre CTL pMEL-1 y células B16F10 formados específicamente por la isoforma Cx43. Además, cuando se utilizaron LT CD8<sup>+</sup> Vírgenes como células efectoras se observó que la comunicación con las células B16F10 disminuyó drásticamente en comparación a cuando se utilizaron CTL pMEL-1 (Fig. 4C-E), al igual que la acumulación de Cx43 en la zona de contacto intercelular observada en los resultados de inmunofluorescencia (Fig. 3F-G), corroborando que la activación de las células T es una condición primordial para la formación de canales GJ-Cx43 durante la SIC. La activación de los linfocitos T les otorga un aumento entre 20 y 50 veces en la avidéz del TCR por el péptido antigénico específico, lo que les otorga la capacidad de reconocer el complejo pMHC-I en la célula blanco a concentraciones más bajas que en el contexto de la



activación del LT vírgen por las DC, y con ello desencadenar tanto la formación de la sinapsis como la respuesta citotóxica para eliminar la célula tumoral (Dieckmann et al., 2016; Fahmy et al., 2001). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la polarización de Cx43 y el acoplamiento mediante canales GJ-Cx43 durante la SIC serían un evento que sucedería después del reconocimiento antigénico mediado por la interacción TCR-pMHC-I. Esta condición de reconocimiento específico de la célula blanco por parte del CTL podría asegurar que el traspaso de señales moleculares vía canales GJ-Cx43 ocurra solo durante la fase citotóxica del CTL, sugiriendo que la formación de estos canales jugaría un rol importante en la capacidad de los CTL de eliminar específicamente a la célula blanco. Sin embargo, a pesar de que los experimentos de inmunofluorescencia muestran que al utilizar las células blanco MB49 que no expresan el antígeno gp100, la polarización de Cx43 hacia la zona de contacto con el CTL pMEL-1 es significativamente menor a cuando se utilizan células B16F10, es necesario corroborar que en la condición antígeno-inespecífica disminuye la comunicación mediada por canales GJ-Cx43 para determinar que este se trata de un fenómeno dependiente del reconocimiento de la célula blanco. En ese caso se podría evaluar la transferencia de calceína entre los CTL y la línea celular MB49 con o sin pulsar con el péptido antigénico hgp100, esperando observar que la comunicación vía GJ-Cx43 solo se da cuando el CTL reconoce el antígeno. Además, se podría corroborar la participación de Cx43 al utilizar células MB49 que expresen bajos niveles de esta proteína y sean pulsadas con el péptido antigénico para verificar que la comunicación es mediada por canales GJ-Cx43.

Luego de que el CTL reconoce a la célula blanco, la interacción TCR-pMHC-I desencadena mecanismos de citotoxicidad dependientes e independientes del contacto celular. Dentro de los mecanismos citotóxicos que requieren contacto celular y que por lo tanto podrían relacionarse con la formación de canales GJ-Cx43 durante la SIC, se encuentra la liberación de gránulos citotóxicos en la grieta sináptica, los cuales contienen enzimas proteasas como GrzB, que al encontrarse dentro del citoplasma de la célula blanco activan la vía de las caspasas llevando a la apoptosis celular (Andersen et al., 2006). En este trabajo observamos que al inhibir la comunicación intercelular mediada por canales GJ-Cx43, también existe una disminución significativa en la actividad de GrzB en las células B16F10, indicando que la transferencia de señales moleculares a través de estos canales durante la SIC es importante para la función citotóxica de los CTL (Fig. 5C-D. Por otro lado, al utilizar LT CD8<sup>+</sup> vírgenes se observó una nula actividad de esta enzima (Fig. 5C y 5E), resultado esperable para LT no activadas (Halle et al., 2017).

En conjunto, los resultados expuestos en este trabajo indicarían que existe comunicación mediada por canales GJ-Cx43 durante la SIC entre CTL y células de tumorales y que esta comunicación sería importante para la eliminación de la célula tumoral mediada por CTL. Además, estos resultados sugieren fuertemente que podría existir transferencia de moléculas de señalización desde el CTL a la célula tumoral que serían importantes para la actividad citotóxica mediada por GrzB. En el 2014, Tittarelli et al. describieron que la inhibición de los canales GJ-Cx43 durante la SIC mediada por las células NK, afectaba la actividad de GrzB y el flujo de Ca<sup>+2</sup> hacia las células de melanoma. Ellos postularon que este fenómeno validaría la hipótesis de la adquisición de las enzimas Grz por parte de la célula tumoral

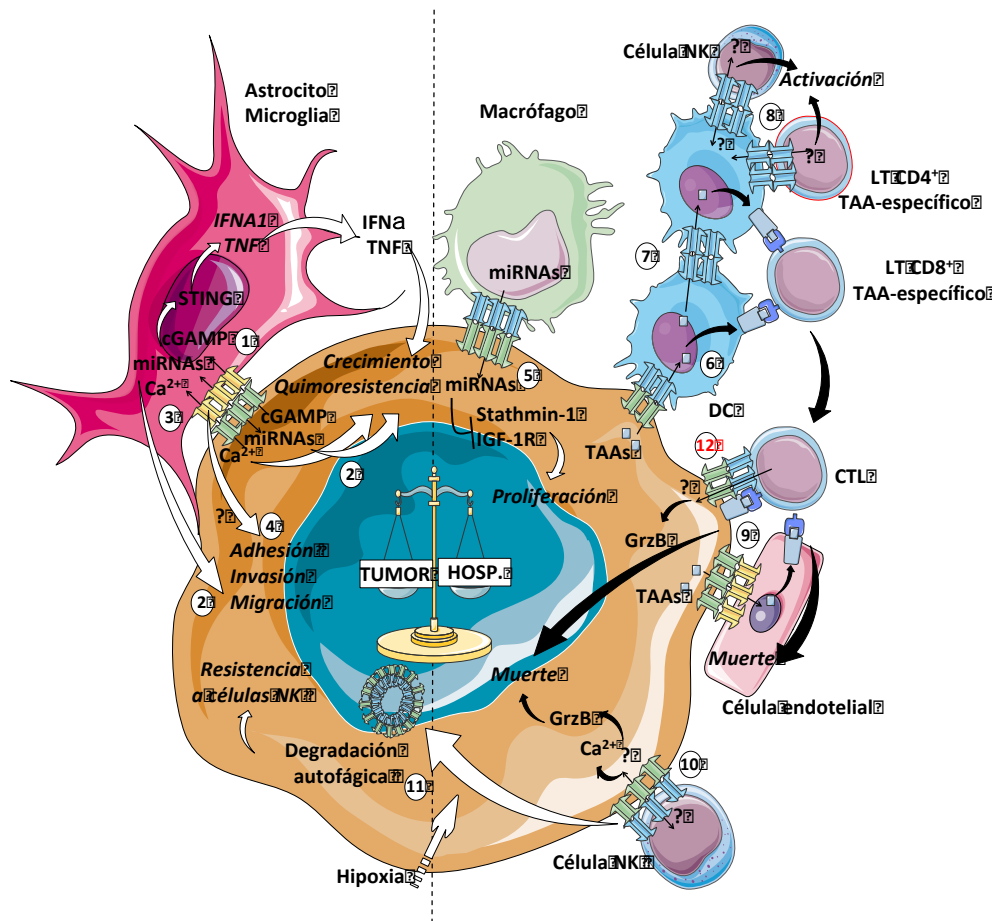
mediante endocitosis, proceso que es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , presentada por Thiery et al. en el 2011. Según este grupo, la proteasa Pfn generaría poros en la membrana de la célula blanco induciendo un flujo transitorio de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el citoplasma que gatillarían el proceso de reparación de daño de membrana. Esta respuesta implica la endocitosis de la membrana dañada, estímulo que guiaría a la internalización de las enzimas Pfn y Grz en endosomas gigantes llamados "gigantosomas". Ellos observaron que una vez que el gigantosoma se encuentra dentro del citoplasma, la enzima Pfn genera poros en esta estructura que permiten la liberación de las enzimas Grz dentro de la célula blanco. Teniendo esto presente, Tittarelli et al., postularon que durante la SIC mediada por células NK, los canales GJ-Cx43 aportarían con flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia la célula tumoral que ayudarían en la formación del gigantosoma y posterior liberación de GrzB. Por otro lado, la formación del gigantosoma también fue descrito durante la SIC mediada por CTL (Keefe et al., 2005; Thiery et al., 2010), lo que sugiere que la disminución en la actividad de GrzB asociada a la inhibición de la comunicación mediante canales GJ-Cx43 entre CTL pMEL-1 y B16F10 observada en este trabajo, podría deberse a un fenómeno similar. Los canales GJ-Cx43 podrían facilitar el flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el CTL hacia la célula tumoral, promoviendo la formación del gigantosoma y con ello la internalización de GrzB. Sin embargo, es necesario realizar experimentos que permitan detectar flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales GJ-Cx43 entre CTL y células tumorales para verificar esta hipótesis. Para ello se podrían utilizar indicadores fluorescentes de calcio como Fluo4-AM o Fura-2, moléculas que al unir calcio incrementan su fluorescencia que puede ser detectada mediante citometría de flujo o microscopía confocal (Paredes et al., 2009). Se podrían realizar cocultivos de CTL con células tumorales que expresen bajos o normales niveles de

Cx43 y hayan sido previamente cargadas con alguno de estos indicadores, esperando verificar una concentración de calcio intracelular menor en las células tumorales que expresan bajos niveles de Cx43 con respecto a aquellas que expresan niveles normales.

Por otro lado, a pesar de los resultados significativos obtenidos en este trabajo, es importante considerar que los efectos obtenidos tanto a nivel de comunicación entre CTL y células de melanoma mediante canales GJ-Cx43, como en la actividad citotóxica mediada por GrzB, fueron consecuencia de la disminución de la expresión de Cx43 solo en las células blanco B16F10. Es decir, los CTL pMEL-1 utilizados en este trabajo expresaban niveles normales de Cx43, pudiendo suplir el rol de los canales GJ-Cx43 mediante la liberación de señales a la grieta sináptica a través de hemi-canales de Cx43 o bien formando canales GJ heterotípicos con hemi-canales de la célula blanco compuestos por otras isoformas de conexina expresadas por las células B16F10, como Cx26 (Kircher et al., 2016). Por ello, para lograr finalmente determinar el rol de los canales GJ-Cx43 durante la SIC mediada por CTL es necesaria la realización de experimentos que consideren el bloqueo simultáneo de Cx43 en la célula efectora y tumoral. Por un lado, se podría disminuir la expresión de Cx43 en CTL pMEL-1 mediante el uso de RNA interferentes para realizar experimentos en donde tanto la célula efectora como la célula blanco no expresen esta proteína, permitiendo descartar la formación de canales GJ heterotípicos y a su vez la participación de hemi-canales de Cx43. Otra forma de descartar la participación hemi-canales y de otras isoformas de la proteína Cx, consiste en el uso de péptidos miméticos inhibitorios de Cx43. Estos péptidos se unen a diferentes dominios de la proteína Cx43, permitiendo inhibir tanto la apertura del hemi-canal

como la formación de canales GJ-Cx43, según el motivo estructural al cual se unen (Evans et al., 2012; Mendoza-naranjo et al., 2011; Tittarelli et al., 2014). También, algunos grupos han desarrollado anticuerpos específicos contra dominios extracelulares de Cx43 que permiten el bloqueo de hemi-canales, sin embargo el acceso a estos anticuerpos sigue siendo de difícil dado que no se encuentran disponibles en el comercio (Riquelme et al., 2013).

Finalmente, en este trabajo se ha realizado un acercamiento hacia el entendimiento del rol que cumplen los canales GJ-Cx43 durante la SIC mediada por CTL que sugieren fuertemente la participación de Cx43 en la capacidad citotóxica de los linfocitos para eliminar células tumorales. Los resultados presentados validan la hipótesis propuesta al inicio de este trabajo y abren la posibilidad a la realización de nuevos trabajos que sustenten con mayor fuerza la participación de canales GJ-Cx43 en la SIC, así como también nuevos experimentos que puedan explicar el mecanismo que subyace la participación de estos canales. La continuación de la investigación en este campo permitiría lograr un mayor entendimiento del funcionamiento de la respuesta inmune anti-tumoral, incorporando los canales GJ como componentes importantes durante la interacción entre los CTL y las células tumorales. (Fig. 6, N°12).



**Figura 6. Participación de canales GJ-Cx43 en la respuesta inmune anti-tumoral.**

Efectos pro-tumorales (izquierda, 1-4, 11) y anti-tumorales (derecha, 5-10, 12). Figura modificada de Gleisner et al., 2017. 1) Interacción entre astrocitos y células de cáncer de mama y pulmón promueven metástasis cerebral mediante la transferencia de cGAMP vía GJ-Cx43 que llevara a la activación de la vía STING y la producción de IFN- $\alpha$  y TNF como señales paracrinas que promueven el crecimiento y la quimioresistencia. 2) Células tumorales de pulmón transfieren miRNAs astrocitos que incrementan la la resistencia a la quimioterapia. También, existe transferencia de miRNAs a través de GJ desde células de glioma a astrocitos que promueven la invasión. 3) Astrocitos reducen la apoptosis de células de melanoma tratadas con diferentes fármacos quimio-terapéuticos mediante el secuestro del calcio intracelular vía GJ. 4) Canales GJ entre células de glioblastoma y astrocitos son

importante para la adhesión, migración e invasión de las células tumorales hacia el parénquima cerebral. 5) Canales GJ median la transferencia de miRNAs desde macrófagos a células de carcinoma hepatocelular regulando la expresión de genes que inhiben la proliferación celular. 6) La expresión de Cx43 en células de melanoma permiten el traspaso de TAA pre-procesados hacia DC, aumentando la activación de LT CD8<sup>+</sup> y la inmunidad anti-tumoral, inducida por la administración de la vacuna anti-tumoral basada en DC. 7) Canales GJ-Cx43 participan en la transferencia de antígenos de melanoma y la presentación cruzada entre DC humanas facilitando una efectiva activación de LT CD4<sup>+</sup> mediada por DC. 8) Canales Cx43-GJ, se acumulan en la SI formada entre DC y NK o LT CD4<sup>+</sup> específicos contra melanoma, siendo importante para la activación de estas células. 9) Canales GJ-Cx43 permite el traspaso de péptidos TAA desde melanoma a células endoteliales autólogas induciendo el reconocimiento cruzado y la eliminación mediante LT CD8<sup>+</sup> específicos contra TAA. 10) Canales GJ-Cx43- se acumulan en la SI entre NK y células de melanoma, contribuyendo al influjo de Ca<sup>+2</sup> y la apoptosis inducida por GrzB. 11) La activación de la autofagia en células de melanoma hipóxicas provoca la degradación selectiva de canales GJ-Cx43, disminuyendo la capacidad citotóxica de las células NK. 12) Canales GJ-Cx43 median la comunicación intercelular durante la SI formada entre CTL pMEL-1 y células de melanoma, siendo importantes para la actividad de GrzB en la célula blanco.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir que la isoforma Cx43 polariza hacia la zona de contacto intercelular durante la SIC entre CTL pMEL-1 y células de melanoma B16F10, siendo un fenómeno dependiente tanto de la activación del linfocito como del reconocimiento antigénico. Una vez en el sitio de contacto intercelular, Cx43 forma canales GJ funcionales entre CTL pMEL-1 y B16F10 que participan activamente en la estructura supramolecular de la SIC permitiendo la comunicación intercelular durante esta interacción. La formación de estos canales resultó ser dependiente de la activación de los linfocitos al igual que la polarización de Cx43, por lo que se sugiere que también podría ser dependiente del reconocimiento específico del antígeno, sin embargo, se hace necesaria la realización de más experimentos para comprobar esta última idea. Luego, la comunicación mediante GJ-Cx43 entre CTL pMEL-1 y B16F10 durante la SIC resultó ser importante para la función efectora de los linfocitos, observando que la inhibición en la formación de estos canales conlleva una disminución en la actividad de GrzB, enzima que es entregada por los CTL a la célula tumoral mediante gránulos citotóxicos, con la facultad de inducir la apoptosis de la célula blanco y con ello permitir su eliminación. Finalmente, los canales GJ-Cx43 presentan un rol importante como mediadores de la comunicación entre CTL y células tumorales, demostrando que participan de la respuesta inmune anti-tumoral durante la SIC mediada por CTL, al igual que en otros procesos inmunológicos dependientes de contacto demostrados por nuestro laboratorio y otros grupos. Además, los resultados obtenidos abren el camino hacia nuevas investigaciones que permitan dilucidar el mecanismo molecular que explica la participación de estos canales



durante la SIC mediada por CTL y con ello un mejor entendimiento del funcionamiento y establecimiento de una correcta respuesta inmune anti-tumoral.

## REFERENCIAS

- Abbaci, M., Barberi-heyob, M., Blondel, W., Guillemin, F., & Didelon, J. (2008).** Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *45*, 33–62.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., & Becker, J.C. (2006).** Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 32–41.
- Aucher, A., Rudnicka, D., & Davis, D.M. (2014).** MicroRNAs Transfer from Human Macrophages to Hepato- Carcinoma Cells and Inhibit Proliferation. *J. Immunol.* *191*, 1–23.
- Baaten, B.J.G., Li, C.R., & Bradley, L.M. (2010).** Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun. Integr. Biol.* *3*, 508–512.
- Basu, R., & Huse, M. (2017).** Mechanical Communication at the Immunological Synapse. *Trends Cell Biol.* *27*, 241–254.
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012).** The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 180–190.
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E.E., Lopez-Soto, A., Jacob, L.S., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., et al. (2016).** Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* *533*, 493–498.
- Cottrell, G.T., & Burt, J.M. (2005).** Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1711*, 126–141.
- Dieckmann, N.M.G., Frazer, G.L., Asano, Y., Stinchcombe, J.C., & Griffiths, G.M. (2016).** The cytotoxic T lymphocyte immune synapse at a glance. *J. Cell Sci.* *129*, 2881–2886.
- Dustin, M.L., & Choudhuri, K. (2016).** Signaling and Polarized Communication Across the T Cell Immunological Synapse. 1–23.
- Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., Shaw, A.S., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., & Shaw, A.S. (2010).** Understanding the Structure and Function of the Immunological Synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1–15.
- Elgueta, R., Tobar, J.A., Shoji, K.F., De, J., Kalergis, A.M., Bono, M.R., Roseblatt, M., & Sáez J.C. (2009).** Gap Junctions at the Dendritic Cell-T Cell Interface Are Key Elements for Antigen-Dependent T Cell Activation. *J. Exp. Med.* *183*, 277–284.
- Elssen, C.H.M.J. Van, Oth, T., Germeraad, W.T. V, Bos, G.M.J., & Vanderlocht, J. (2014).** Natural Killer Cells: The Secret Weapon in Dendritic Cell Vaccination Strategies. *Clin. Cancer Res.* *20*, 1095–1104.

- Epifantseva, I., Shaw, R.M., & Herve, C. (2018).** Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860, 40–47.
- Evans, W.H., Bultynck, G., & Leybaert, L. (2012).** Manipulating connexin communication channels: Use of peptidomimetics and the translational outputs. *J. Membr. Biol.* 245, 437–449.
- Fahmy, T.M., Bieler, J.G., Edidin, M., & Schneck, J.P. (2001).** Increased TCR Avidity after T Cell Activation: A Mechanism for Sensing Low-Density Antigen. *Immunity* 14, 135–143.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., and Melvin, J. (1998).** The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273, 29745–29753.
- Fanning, A.S., Anderson, J.M., Hill, C., & Carolina, N. (2009).** Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 120, 113–120.
- Ferlazzo, G., & Münz, C. (2015).** NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *J. Immunol.* 172, 1333–1339.
- Giepmans, B.N.G., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., & Moolenaar, W.H. (2001).** Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.* 11, 1364–1368.
- Gleisner, M.A., Navarrete, M., Hofmann, F., Salazar-Onfray, F., & Tittarelli, A. (2017).** Mind the gaps in tumor immunity: Impact of connexin-mediated intercellular connections. *Front. Immunol.* 8.
- Grakoui, a, Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, a S., Allen, P.M., & Dustin, M.L. (1999).** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.
- Halle, S., Halle, O., & Förster, R. (2017).** Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol.* 38, 432–443.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., & Rosenberg, S.A. (1995).** Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J. Immunol.* 154, 3961–3968.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., & Lieberman, J. (2005).** Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23, 249–262.
- Kim, H.J., & Cantor, H. (2014).** CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol. Res.* 2, 91–98.
- Kircher, D.A., Silvis, M.R., Cho, J.H., & Holmen, S.L. (2016).** Melanoma brain metastasis: Mechanisms, models, and medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–7.

- Kumar, N.M., & Gilula, N.B. (1996).** Communication Channel. *Cell Press* 84, 381–388.
- Lai, Y.P., Jeng, C.J., & Chen, S.C. (2011).** The Roles of CD4 + T Cells in Tumor Immunity. *ISRN Immunol.* 2011, 1–6.
- Maeda, S., & Tsukihara, T. (2011).** Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1115–1129.
- Martínez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015).** How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin. Cancer Res.* 21, 5047–5056.
- Mendoza-Naranjo, A., Bouma, G., Pereda, C., Ramírez, M., Webb, K.F., Tittarelli, A., López, M.N., Kalergis, A.M., Thrasher, A.J., Becker, D.L., et al. (2011).** Functional Gap Junctions Accumulate at the Immunological Synapse and Contribute to T Cell Activation. *J. Immunol.* 187, 3121–3132.
- Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., & Xiao, Z. (2006).** Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 211, 81–92.
- Monks, C.R.F., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., & Kupfer, A. (1998).** Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86.
- Munhoz, R.R., & Postow, M.A. (2016).** Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Research* 5, 2545.
- Neijssen, J., Pang, B., & Å, J.N. (2007).** Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 207–218.
- Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., et al. (2003).** Tumor Regression and Autoimmunity after Reversal of a Functionally Tolerant State of Self-reactive CD8 + T Cells. *J. Exp. Med.* 198, 569–580.
- Packard, B.Z., Telford, W.G., Komoriya, A., Henkart, P.A., Packard, B.Z., Telford, W.G., Komoriya, A., & Henkart, P.A. (2007).** Granzyme B Activity in Target Cells Detects Attack by Cytotoxic Lymphocytes. *J. Immunol.* 179, 3812–3820.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., & Lechleiter, J.D. (2009).** NIH Public Access. *Methods* 46, 143–151.
- Peterson, J.R., & Mitchison, T.J. (2002).** Small molecules, big impact: A history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem. Biol.* 9, 1275–1285.
- Potter, T.A., Grebe, K., Freiberg, B., & Kupfer, A. (2001).** Formation of supramolecular activation clusters on fresh ex vivo CD8+ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12624–9.

- Rhett, J.M., Jourdan, J., & Gourdie, R.G. (2008).** Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol. Biol. Cell* 22, 1516–1528.
- Riquelme, M.A., Kar, R., Gu, S., & Jiang, J.X. (2013).** Antibodies targeting extracellular domain of connexins for studies of hemichannels. *Neuropharmacology* 75, 525–532.
- Singh, D., & Lampe, P.D. (2003).** Identification of Connexin-43 Interacting Proteins. *Cell Commun. Adhes.* 10, 215–220.
- Söhl, G., & Willecke, K. (2004).** Gap junctions and the connexin protein family. *Goran So. Cardiovasc. Res.* 62, 228–232.
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M., & William, S. (2001).** The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity* 15, 751–761.
- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., & Griffiths, G.M. (2006).** Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462–465.
- Tello-lafoz, M., Martínez-martínez, G., Rodríguez-rodríguez, C., Pablo, J., Morgan, A., Severine, H., & Merida, I. (2017).** Sorting nexin 27 interactome in T-lymphocytes identifies zona occludens-2 dynamic redistribution at the immune synapse. *Traffic* 8, 491–504.
- Thauland, T.J., & Parker, D.C. (2010).** Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* 131, 466–472.
- Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., Kirchhausen, T., & Lieberman, J. (2010).** Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood* 115, 1582–1593.
- Tittarelli, A., Mendoza-naranjo, A., Guerrero, I., Ihara, F., Wennerberg, E., Riquelme, S., Gleisner, A., Kalergis, A., Lundqvist, A., López, M.N., et al. (2014).** Gap Junction Intercellular Communications Regulate NK Cell Activation and Modulate NK Cytotoxic Capacity. *J. Immunol.* 192, 1313–1319.
- Tittarelli, A., Janji, B., Moer, K. Van, Noman, M.Z., & Chouaib, S. (2015).** The Selective Degradation of Synaptic Connexin 43 Protein by Hypoxia-induced Autophagy Impairs Natural Killer Cell-mediated Tumor Cell Killing. *J. Biol. Chem.* 290, 23670–23679.
- Zoidl, G., & Dermietzel, R. (2010).** Gap junctions in inherited human disease. *Eur J Physiol* 460, 451–466.