

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ESTUDIO DE MOLÉCULAS CHAPERONAS HUMANAS INVOLUCRADAS EN LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE PROTEÍNAS MICA Y MICB EN CÉLULAS DE MELANOMA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICA

MARCELA DANIELA GATICA ANDRADES

**Directora de Memoria:
Dra. María Carmen Molina Sampayo**

Programa Disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

Universidad de Chile

**Profesor Patrocinante:
Dr. Javier Puente Piccardo**

Programa de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

SANTIAGO DE CHILE, 2009

Dedicada a mis padres, Dani, Caro.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. María Carmen Molina por haberme aceptado en su laboratorio, ser mi tutora y haberme guiado durante el transcurso de la tesis, corrigiéndome y apoyándome cada vez que fue necesario, junto con haberme otorgado la valiosísima oportunidad de participar en reuniones científicas nacionales, lo cual, sin duda, abrió mi mente a nuevas ideas y desafíos profesionales en el futuro. Además, no puedo dejar de darle las gracias al Dr. Juan Carlos Aguillón por haberme permitido realizar ensayos en su laboratorio y por estar siempre dispuesto a ayudarme cada vez que se lo solicité.

Quiero agradecer a todos(as) y cada uno(a) de los(as) integrantes del Programa Disciplinario de Inmunología por estar siempre dispuestos(as) a tender una mano cada vez que se les solicita, y por tener claro que para avanzar en el camino de la ciencia se debe trabajar en equipo. Dentro de esto, agradecer a los(as) integrantes del Laboratorio de Patología Autoinmune e Inflamatoria, por haberme brindado su ayuda y un grato ambiente de trabajo, en especial a Diego, Roberto, Rodrigo y Nicole, por jamás tener problemas en resolver mis dudas y entregarme su conocimiento en sus respectivas áreas de experticie.

Muy especialmente agradecer a mis compañeros(as) del Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, por todo lo enseñado, el intercambio de ideas, la compañía en aquellas interminables jornadas, el grato ambiente de trabajo, por estar dispuestos(as) a responder a cada una de mis incesantes preguntas y, por sobretodo, por haber tenido siempre muy buen sentido del humor. En especial, dar mis más sinceros agradecimientos a Toño y Evelyn, con quienes fuimos el primer equipo de trabajo del laboratorio. Agradecer también a Maca y Caro, quienes se integraron con posterioridad al equipo, en especial por responder mis diversas inquietudes cada vez que lo necesité y por su permanente alegría. A todo el grupo, muchas gracias por estos dos años de trabajo, sin duda serán un aporte muy importante en mi formación científica y personal.

Agradecer a mis profesores(as) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por haberme guiado y maravillado con el camino de la ciencia. En especial, dar las gracias a mis amigos(as) y compañeros(as) junto a quienes me formé como Bioquímica, muchas gracias por darme la oportunidad de conocerlos(as), por permitirme desarrollarme en un ambiente de excelencia abierto y pluralista, por aquellas memorables jornadas de estudio, reuniones y tantas ocasiones que hicieron más agradable mi paso por la Universidad.

Una mención especial es para mis amigos(as) de la “frate” y, sobretodo, a Los Cóndores, sería imposible tratar de describir en pocas palabras el enorme apoyo que me dieron en esta etapa fundamental de mi vida, convirtiéndose en uno de los pilares principales de mi formación intelectual, valórica y personal. Muchas gracias por haber confiado en mí, brindarme la oportunidad de conocer

el mundo laico de este país y de aprender, en un ambiente tan armónico, valores tan importantes como la fraternidad, tolerancia y libre examen.

Quiero dar las gracias a mis amigos(as) por tantos años de amistad, por tantas anécdotas, aventuras, tantas emociones vividas, por permitirme conocerlos(as) y, en especial, por escucharme. En especial, muchas gracias a Richie e I-Hsiang, por ser mis amigos desde aquella época tan bonita y por siempre estar ahí cuando los necesito. Por su puesto, mis más grandes y sinceros agradecimientos para Lore, Isa, Malú y Chie por casi una vida de incondicional amistad, por su confianza absoluta, su cariño, su apoyo y acertadas críticas cada vez que lo han considerado pertinente, su sentido del humor, y por convertirse casi en mis hermanas, sin duda una parte de lo que soy hoy se los debo a ustedes.

Finalmente, dar las gracias a quienes han sido la base fundamental en mi vida: mi familia. Gracias a mi abuela “mami Mirta” por su apoyo, en todos los ámbitos; a mis tíos(as) por sus consejos, simpatía y calidez; a mis primos(as) por su “buena onda” y por las innumerables aventuras vividas en aquellos inolvidables veranos familiares. Muchas gracias a mi papá, mamá, Dani y Caro, les debo todo, gracias por apoyarme en mis iniciativas, por enseñarme que la base de la familia es querernos unos a otros, por crecer y formarme con tanto cariño, por educarme, por permitir irme de la casa a tan temprana edad para comenzar este camino, y muchas gracias por jamás cortarme las alas e incentivarme a salir al mundo para hacer mi vida y cumplir mis sueños.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT 11060452.

AGRADECIMIENTOS	III
FINANCIAMIENTO	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XIV
SUMMARY	XVI
1. 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Sistema Inmune	1
1.2 Células Natural Killer.....	2
1.3 Ligandos de activación del receptor NKG2D	4
1.4 Mecanismos de Evasión de la Inmunovigilancia	5
1.5 Calreticulina.....	7
1.6 Vasostatina.....	9
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVO GENERAL	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)	11
4.1 La colocación entre Crt, MICA y MICB y el efecto de IL-10 en células de melanoma.....	11
4.2 La formación de complejos proteicos entre Crt, MICA y MICB.....	11
4.3 El efecto de la sobreexpresión de Crt en células de melanoma en el nivel de expresión de MICA y MICB sobre su superficie.	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
MATERIALES	12
5.1 Bacterias.....	12
5.2 Líneas Celulares	12

5.3	Plasmidios	12
5.4	Partidores	13
5.5	Enzimas.....	14
5.6	Marcadores de PM	14
5.7	Anticuerpos (Ac.).....	14
5.8	Otros reactivos y sistemas comerciales.....	14
5.9	Soluciones y Medios de cultivo	15
MÉTODOS		17
5.10	Inmunofluorescencia	17
5.11	Inmunoprecipitación	17
5.12	Electrotransferencia	19
5.13	Extracción y cuantificación de RNA total	19
5.13	Verificación de la integridad del RNA total.....	20
5.14	Síntesis de cDNA por transcripción inversa.....	20
5.15	PCR semicuantitativo	20
5.16	Mutagénesis sitio-dirigida.....	21
5.16.1	PCR para producir mutación en fragmentos de Vasostatina (PCR1 y PCR2).....	22
5.16.2	PCR para unir fragmentos mutados de Vasostatina (PCR3)	22
5.17	Ligación de DNA en vector de clonamiento	23
5.18	Transformación química de bacterias	23
5.19	PCR de colonias.....	24
5.20	Miniprep y secuenciación	24
5.21	Ligación de DNA en vector de expresión.....	25
5.22	Transfección de células eucariontes	25

5.23 Extracción de DNA genómico	26
5.24 Citometría de Flujo	26
6. RESULTADOS.....	28
6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Estudiar la colocalización entre Crt, MICA y MICB y el efecto de IL-10 en células de melanoma.	28
6.1.1 Standarización de la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta.....	28
6.1.2 Analisis de la expresión de MICA y MICB.....	30
6.1.3 Análisis de la colocalización de MICA y MICB con Crt y otras moléculas chaperonas	32
6.1.4 Análisis de la expresión de MICA y MICB en presencia de IL-10.....	35
6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO2: Estudiar la formación de complejos proteicos entre Crt, MICA y MICB.....	37
6.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Estudiar el efecto de la sobreexpresión de Crt en células de melanoma en el nivel de expresión de MICA y MICB sobre su superficie.	39
7. DISCUSIÓN	45
7.1 Distribución citoplasmática de MICA y MICB en células tumorales	45
7.2 Patrón de migración en geles de acrilamida de MICA y MICB proveniente de células de melanoma.....	46
7.3 Interacción de Crt con los ligandos MICA y MICB	48
7.4 Interacción de MICA y MICB con el complejo de chaperonas Crt-Cnx-ERp57	49
7.5 Importancia de Vasostatina en el procesamiento de MICA y MICB.	49
7.6 Función de IL-10 en la movilidad de MICA y MICB en las células de melanoma	52
8. CONCLUSIONES.....	54
9. BIBLIOGRAFIA.....	55

INDICE DE FIGURASPágina

Figura 1. Análisis de Citometría de flujo de células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}2

Figura 2. Esquema de los subtipos de células NK.....3

Figura 3. Representación esquemática del receptor NKG2D.....4

Figura 4. Ilustración esquemática de los NKG2DL.....5

Figura 5. Representación lineal de los dominios de Crt.....8

Figura 6. Modelo en 3D de los dominios N y P de Crt basados en estudios de NMR del dominio P y estudios cristalográficos de Cnx.9

Figura 7. Vectores pGEM-T-Easy y pcDNA3.1(-).....12

Figura 8. Esquema de la unión de los fragmentos generados mediante PCR de extensión por sobreposición.....22

Figura 9. Detección de MICA y MICB en células BL de melanoma mediante IF indirecta.....28

Figura 10. Detección de MICA, MICB y Crt en células BL de melanoma mediante microscopía confocal.....29

Figura 11. Controles negativos de Anticuerpos conjugados para IF directa.....30

Figura 12. MICA y MICB presentan una distribución similar en las células de melanoma en IF directa.....29

Figura 13. MICA y MICB colocalizan con el RE.31

Figura 14. MICA y MICB se encuentran presentes en el núcleo.....31

Figura 15. Crt colocaliza con MICA y MICB.....32

Figura 16. MICA y MICB colocalizan con la proteína ERp57.33

Figura 17. MICB colocaliza con la proteína Cnx..34

Figura 18. MICA y MICB no presentan diferencias en su distribución al comparar dos líneas celulares de melanoma con diferente grado de secreción de IL-10 en IF.....35

Figura 19. MICA y MICB no presentan diferencias en su distribución al comparar células melanoma cultivadas con o sin IL-10..36

Figura 20. MICA y MICB presentan diferencias en su distribución a 24 y 48 hrs de cultivo..37

Figura 21. Lisado celular de proteínas totales de células de melanoma.37

Figura 22. Crt se une a MICA en células de melanoma.....38

Figura 23. Amplificación de Vasostatina y fragmentos de mutantes.39

Figura 24. Generación de mutantes H153A y H153F.....40

Figura 25. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas generadas de Vasostatina, H153A y H153F.....41

Figura 26. Análisis de secuencias nucleotídicas de Vasostatina, H153A y H153F insertadas en vector de expresión eucarionte.....42

Figura 27. Detección de vector de expresión en DNA genómico de células transfectadas..	43
Figura 28. Vasostatina no fue detectada mediante ensayo de WB.	43
Figura 29. Citometría de flujo de MICA, MICB y Crt superficiales en las distintas poblaciones de células de HEK.....	44
Figura 30. MFI de MICA, MICB y Crt en la superficie de las distintas poblaciones de células de HEK.....	44
Figura 31. Mecanismos oncológicos de evasión inmune para MICA y MICB.....	53

ABREVIATURAS

<i>aa</i>	: Aminoácido
<i>Ac</i>	: Anticuerpo
<i>AcMo</i>	: Anticuerpo monoclonal de ratón
<i>AcPo</i>	: Anticuerpo policlonal de ratón
<i>ADCC</i>	: Citotoxicidad natural dependiente de anticuerpos
<i>AP</i>	: Bolas de Avidina
<i>APS</i>	: Persulfato de Amonio
<i>ATP</i>	: Adenosín Trifosfato
<i>BON</i>	: Línea celular de carcinoide humano
<i>BSA</i>	: Albúmina de suero bovino
<i>bp</i>	: Pares de bases
<i>cDNA</i>	: DNA codificante
<i>Cnx</i>	: Calnexina
<i>CO₂</i>	: Monóxido de Carbono
<i>Crt</i>	: Calreticulina
<i>DAP10</i>	: Proteína de activación de DNAX de 10 kDa
<i>DAP12</i>	: Proteína de activación de DNAX de 12 kDa
<i>DAPI</i>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidroclorhidro
<i>DEPC</i>	: Dietilpirocarbonato
<i>DMEM-F12</i>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12
<i>DNA</i>	: Ácido Desoxirribonucleico
<i>dNTPs</i>	: Desoxinucleótidos
<i>EDTA</i>	: Ácido Etilendiaminotetraacético
<i>ERp57</i>	: Proteína del RE, de la familia de las PDI
<i>FITC</i>	: Isocianato de Fluoresceína FITC
<i>GRP58</i>	: Proteína regulada por glucosa 58
<i>GRP78</i>	: Proteína regulada por glucosa 78
<i>GRP94</i>	: Proteína regulada por glucosa 94
<i>HLA</i>	: Antígenos leucocitarios humanos
<i>HRP</i>	: Peroxidasa de rábano picante
<i>Hsp47</i>	: Proteína de shock térmico 47
<i>IF</i>	: Inmunofluorescencia
<i>INF-α</i>	: Interferón α
<i>INF-γ</i>	: Interferón γ

<i>IP</i>	: Inmunoprecipitación
<i>IL-10</i>	: Interleuquina 10
<i>IPTG</i>	: Isopropiltio- β -galactosido
<i>KCl</i>	: Cloruro de Potasio
KDa	: Kilo Dalton
<i>KIR</i>	: Receptores tipo Inmunoglobulina de las células asesinas
<i>LB</i>	: Luria Bertani
<i>MFI</i>	: Intensidad de Fluorescencia Media
<i>MgCl₂</i>	: Cloruro de Magnesio
<i>MgSO₄</i>	: Sulfato de Magnesio
<i>MHC-I</i>	: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
<i>MICA</i>	: Proteína relacionada a la cadena A de MHC-I
<i>MICB</i>	: Proteína relacionada a la cadena B de MHC-I
<i>MOPS</i>	: Acido 3-N-Morfolino Propanosulfónico
<i>mRNA</i>	: RNA mensajero
<i>NaOH</i>	: Hidróxido de Sodio
<i>NK</i>	: Natural Killer
<i>NKG2D</i>	: Receptor de activación de células NK, grupo 2, miembro D
<i>NKG2DL</i>	: Ligandos del receptor NKG2D
<i>NaCl</i>	: Cloruro de Sodio
<i>Na₂ HPO₄</i>	: Fosfato Hidrogenado de Sodio
<i>NMR</i>	: Resonancia Magnética Nuclear
<i>PE</i>	: Ficoeritrina
<i>PBMC</i>	: Células Mononucleares Periféricas
<i>PBS</i>	: Tampón fosfato salino
<i>PCR</i>	: Reacción en cadena de la Polimerasa
<i>PDI</i>	: Proteína Disulfuro Isomerasa
<i>PM</i>	: Peso Molecular
<i>PKR</i>	: Proteína Kinasa R
<i>PMSF</i>	: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
<i>PPis</i>	: Peptidil Prolil Isomerasas
<i>RE</i>	: Retículo Endoplasmático
<i>RNA</i>	: Ácido Ribonucleico
<i>RPMI-1640</i>	: Roswell Park Memorial Institute medium 1640
<i>SDS</i>	: Dodecil Sulfato de Sodio
<i>SI</i>	: Sistema Inmune

<i>SFB</i>	: Suero fetal Bovino
<i>SNC</i>	: Suero Normal de Conejo
<i>SOB</i>	: Caldo Súper Óptimo
<i>SOC</i>	: Super Optimal broth with Catabolite repression
<i>SV40</i>	: Simian Virus 40
<i>sMICA</i>	: MICA soluble
<i>sMICB</i>	: MICB soluble
<i>TBE</i>	: Tris Borato EDTA
<i>TE</i>	: Buffer Tris-EDTA
TEMED	: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
<i>Tris</i>	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
<i>U</i>	: Unidad enzimática
<i>ULBP</i>	: Proteínas de unión a UL16
<i>UV</i>	: Ultravioleta
<i>V</i>	: Volts
<i>WB</i>	: Western Blot
<i>WT</i>	: Wild Type
<i>X-Gal</i>	: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Beta-D-Galactopiranosido

RESUMEN

En Chile, la tasa de mortalidad por enfermedades oncológicas ha ido aumentando año a año, siendo las cifras cada vez más preocupantes. Es por eso, que cualquier aporte que pueda hacerse en este ámbito puede ser fundamental para combatir el cáncer. Uno de los frentes de lucha dentro de la ciencia es la Inmunología, que, mediante la comprensión de los procesos de defensa del cuerpo contra distintos patógenos o agentes causales de enfermedades, estudia como contrarrestar los mecanismos tumorales de evasión inmune. Dentro del Sistema Inmune (SI) una función fundamental la cumplen las células Natural Killers (NK), componentes principales de la respuesta inmune innata antitumoral. Distintos tumores han desarrollado estrategias para evadir esta respuesta.

En este contexto, NKG2D representa uno de los receptores más importantes en la inducción de la respuesta de citotoxicidad por parte de NK humanas. Los principales ligandos de NKG2D humano, NKG2DL, son moléculas no clásicas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, MICA y MICB, que corresponden a la cadena relacionada al MHC clase I (MIC), y se expresan en la superficie de tumores, células infectadas por virus y estresadas.

Pese a la existencia de estos ligandos en la superficie del tumor, que alertan al SI de la existencia de éste, existen mecanismos oncológicos con los cuales se logra evadir la inmunovigilancia. Son varias las formas por las que ocurre este proceso. Se ha descrito la participación de citoquinas que estarían disminuyendo la expresión de los NKG2DL en la superficie, o metaloproteasas que los cortarían liberándolos al medio, procesos que tendrían una relación directa con la disminución del ataque de las células NK al tumor. Al respecto, en nuestro laboratorio hemos detectado que IL-10 disminuye la expresión de MICA en la superficie de las células de melanoma. Además, creemos que otra forma por la cual el tumor podría estar evadiendo la inmunovigilancia por parte de las células NK, sería a través de la retención de los NKG2DL en el interior de la célula tumoral blanco. Al respecto creemos que una candidata a estar involucrada en el proceso es Calreticulina (Crt), que forma parte del complejo de proteínas chaperonas, Calnexina-Calreticulina-ERp57, involucradas en el procesamiento de las moléculas MHC-I.

Crt es una molécula chaperona del Retículo Endopasmático (RE) presente en todas las células del organismo, y cuya función fundamental es unir Calcio y participar en el procesamiento de glicoproteínas. Se ha visto que la sobreexpresión de esta regula negativamente la expresión y capacidad funcional en superficie de algunas proteínas de membrana.

Por ende, bajo la luz de los antecedentes, nuestro objetivo es determinar, en líneas celulares de melanoma, si Crt retiene o altera la expresión de MICA y MICB, y si esto es influenciado de alguna forma por IL-10, como mecanismo de evasión de la inmunovigilancia de las células NK.

Para estudiar esto, en primer lugar, realizamos ensayos de Microscopía Confocal (MC) con el fin de estudiar en células de melanoma la distribución de los ligandos MICA y MICB, y su relación con Crt,

además de ver si su comportamiento era o no influenciado por IL-10. Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) para verificar si existía una interacción directa de Crt con MICA y MICB. Finalmente, y con el fin de estudiar si Crt tenía alguna incidencia en la expresión de MICA y MICB en la superficie de las células, se realizó una mutagénesis sitiodirigida a Vasostatina, fragmento N-terminal de Crt que cumple la función de chaperona, de forma que no pudiese interactuar con ligandos, además de, en forma paralela, sobreexpresarla. Los productos resultantes fueron clonados y expresados en células HEK. Para detectar si existía alguna variación en el patrón de expresión superficial de MICA y MICB en las células, producto de la mutación o sobreexpresión de Vasostatina, se realizó un ensayo de Citometría de Flujo (CF), además de un ensayo de Western Blot (WB) para ver si era posible detectar Vasostatina sobreexpresada en las células a nivel proteico.

En nuestros resultados logramos observar que MICA y MICB se co-expresan frecuentemente en líneas celulares de melanoma, detectándose compartimentalizados en el interior del citoplasma, RE, además de observarse su presencia en el núcleo. Mediante IP observamos que MICA y MICB tienen un patrón de migración de doble banda, además de una tercera banda de mucho menor tamaño, cuando se revela con anticuerpo específico. Lo anterior indicaría que MIC soluble se podría estar generando en el interior de la célula, en forma complementaria a su liberación desde la superficie celular por efecto de metaloproteasas. Por su parte, por IF, observamos que Crt colocaliza con MICA y MICB, en el interior de las células de melanoma, lo cual también se produce en el núcleo. Además, por IP, vimos que Crt que inmunoprecipita con MICA, solamente en la banda que corresponde a la segunda de menor peso molecular.

Por otro lado, mediante IF no logramos detectar que IL-10 afectase la distribución citoplasmática de MICA y MICB.

Finalmente, al sobreexpresar y mutar Vasostatina no logramos apreciar algún efecto importante sobre el nivel de expresión de MICA y MICB en la superficie de las células HEK. Como conclusión podemos decir que MICA y MICB se encuentran agrupados en el interior de las células de melanoma y que interactúan con Crt, requiriéndose estudios posteriores a fin de determinar si esto constituye o no un mecanismo de evasión de la inmunovigilancia de las células NK.

SUMMARY

Study of human accompanists molecules involved in the MICA and MICB proteins surface expression in Melanoma cells

In Chile, the mortality rate for oncological diseases has been increasing year by year, being the statistics increasingly worrisome. Is for this, that any input can be done in this area can be critical for combating cancer. One of the fronts of struggle within science is the Immunology, that, by understanding the process of defending the body against various pathogens or agents that cause diseases, studies how counteract the tumor mechanisms of immune evasion. Within the immune system a crucial role is fulfilled by Natural Killers cells (NK), major components of the innate anti-tumor immune response. Different tumors have developed strategies to evade this response.

In this context, NKG2D represents one of the most important receptors in the induction of the cytotoxic response by humans NK cells. The main ligands of human NKG2D, NKG2DL, are molecules no classics of the Major Histocompatibility Complex Class I, MICA and MICB, which correspond to the chain related with the MHC class I (MIC) and are expressed on the surface of tumors, cells infected by viruses and stressed out cells.

Despite the existence of these ligands on the surface of the tumor, alerting the immune system of the existence of the cancer, there are mechanisms by which this achieve to evade Immunosurveillance. There are several ways in which this process occurs. Has been described the involvement of cytokines that would decrease the expression of NKG2DL on the surface, or metalloproteases that to cut them releasing them to the environment, processes that would a direct relationship with the decrease of attacking tumor NK cells. In this regard, in our laboratory we found that IL-10 reduces the expression of MICA on the surface of melanoma cells. Furthermore, we believe that another way by which the tumor might evade to the Immunosurveillance by the NK cells would be through the retention of NKG2DL within the tumor cell target. In this regard we believe that a candidate to be involved in the process is Calreticulin (Crt), which is part of the complex protein chaperones, Calnexine-Calreticulin-ERp57, involved in the processing of MHC-I molecules.

Crt is a chaperone molecule of Endoplasmic Reticulum (ER) present in all body cells, whose function is bind calcium and participate in the processing of glycoproteins. Has been seen that this over expression negatively regulates the expression and functional capacity on the surface of some membrane proteins.

Therefore, under the light of the background, our aim is to determine, in melanoma cell lines, whether Crt retains or alters the expression of MICA and MICB, and if this is somehow influenced by IL-10, as a escape mechanism of Immunosurveillance of the NK cells.

For this study, first we did assays in Confocal Microscopy (CM) to study in melanoma cells the distribution of ligands MICA and MICB, and their relationship with Crt, in addition to see whether his behavior was or not influenced by IL-10. Subsequently, we did assays of immunoprecipitation (IP) to see if there was a direct interaction of Crt with MICA and MICB. Finally, in order to examine whether Crt had any effect on the expression of MICA and MICB on the surface of cells, a site-directed mutagenesis was done to Vasostatina, N-terminal fragment of Crt that have the chaperone function, so that could not interact with ligands, in addition, in parallel, to overexpress it. The resulting products were cloned and expressed in HEK cells. To detect if there was some variation in the pattern of surface expression of MICA and MICB in HEK cells, as result of mutation or overexpression of Vasostatina, it was performed a test of Flow Cytometry (FC), as well as a Western Blot test (WB) to see if it was possible to detect the Vasostatina overexpressed in the cell in a proteic level.

In our results we observed that MICA and MICB are frequently co-expressed in melanoma cell lines, detecting them compartmentalized within the cytoplasm, RE and also noting its presence in the nucleus. By IP we see that MICA and MICB have a migration pattern of double band, plus a third band much smaller, when is revealed with specific antibodies. This would indicate that soluble MIC could be generated inside the cell, in addition to his release from the cell surface due to metalloproteases. For its part, by IF, we observed that Crt colocalizes with MICA and MICB, inside the melanoma cells, which also occurs in the nucleus. Furthermore, by IP, we found that Crt immunoprecipitate whit MICA, only in the band that corresponds to the second lower molecular weight.

On the other hand, by IF we didn't detect if IL-10 affects the distribution of cytoplasmic MICA and MICB.

Finally, with the overexpression and mutation of Vasostatina we didn't appreciate any significant effect on the level of MICA and MICB expression on the surface of HEK cells. As conclusion we can say that MICA and MICB are clustered inside the melanoma cells and that interact with Crt, requiring further studies to determine whether or not this constitutes a mechanism for evasion of Immunosurveillance of NK cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *El Sistema Inmune*

En Chile, durante las últimas dos décadas, se ha producido un incremento preocupante de las enfermedades oncológicas. Los tumores malignos han aumentado sus tasas de mortalidad de 98 a 118 por cada 100.000 habitantes (Medina E y cols. 2001). Es por esto que cada vez deben ser más los esfuerzos por encontrar soluciones terapéuticas eficientes para combatir el avance de esta enfermedad. En este sentido, un área de acción muy importante es la Inmunología, ya que se centra en poder comprender los mecanismos por los cuales el tumor logra evadir la vigilancia y el ataque por parte del Sistema Inmune (SI), con lo cual logra crecer y expandirse a través del cuerpo (Ebert EC y cols. 2008). Cualquier progreso que se pueda hacer en esta área tiene gran relevancia, ya que puede ser un aporte importante para la implementación futura de terapias destinadas a disminuir el impacto de la enfermedad en la salud pública.

El SI mamífero está compuesto de muchos tipos celulares y moléculas, que interactúan con otros diferentes por medio de una compleja red que permite protegerlo de patógenos externos, células neoplásicas y, a su vez, mantener la tolerancia a los antígenos propios (de Visser KE y cols. 2006), lo cual se debe a que el SI tiene la capacidad de discriminar entre lo que es propio y no propio microbiano, ya que es capaz de reconocer antígenos foráneos. En 1986, por primera vez, se propuso que el SI era capaz de detectar la disminución de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), es decir actuar en ausencia de lo propio, además de la expresión de neo-antígenos, moléculas alteradas o la sobreexpresión de estas (Kärre K y cols. 1986). Basándose en la especificidad del antígeno, la generación de memoria y el momento de la activación, el SI se divide en Innato y Adaptativo. Cada uno presenta diferencias en la composición celular y la especificidad de los antígenos, además de contar con sofisticadas redes de conexión que permiten una rápida respuesta ante un tejido dañado (de Visser KE y cols. 2006). El SI Innato es fundamental para el organismo, ya que cumple una función importantísima en los mecanismos mencionados, de reconocimiento de antígenos, por lo cual tiene una participación clave en los procesos inmunológicos antitumorales y antimetastáticos (Kärre K y cols. 1986).

El SI innato está compuesto de barreras epiteliales, células circulantes y de tejido, y proteínas plasmáticas. Las principales células efectoras son los neutrófilos, fagocitos mononucleares y células Natural Killer (NK). Estas últimas son componente fundamental del SI, ya que atacan a los microbios que logran atravesar las barreras epiteliales y que han entrado a los tejidos o circulación (Abbas AK y cols. 2007).

1.2 Células Natural Killer

Las células NK fueron descritas por primera vez en 1975, viéndose que ratones normales poseían células citolíticas que *In Vitro* mostraban una especificidad hacia células murinas de leucemia Molones (Kießling R y cols. 1975). Las células NK son una población linfoide que corresponde al 10-20% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), son capaces de lisar a los tumores que no presentan en su superficie MHC-I, así como a las células infectadas por virus. Se localizan principalmente en la sangre, los nódulos linfáticos, bazo y médula ósea, pudiendo migrar además a los sitios de inflamación gracias a diferentes quimioattractantes. Las células NK son capaces de matar células blanco sin que haya habido una activación previa. Por estas características, se cree que las células NK tienen una importante participación en el control del crecimiento tumoral y la metástasis (Zamai L y cols. 2007). Fenotípicamente, se caracterizan por la expresión en superficie de los marcadores CD56, CD16 y la baja expresión de CD3. Basándose en la expresión de CD56, a nivel general, se distinguen dos subgrupos de células NK, las CD56^{dim}, altamente citotóxicas, y las CD56^{bright}, que poseen una alta capacidad de liberación de Citoquinas (Cooper MA y cols. 2001) (Figuras 1 y 2)

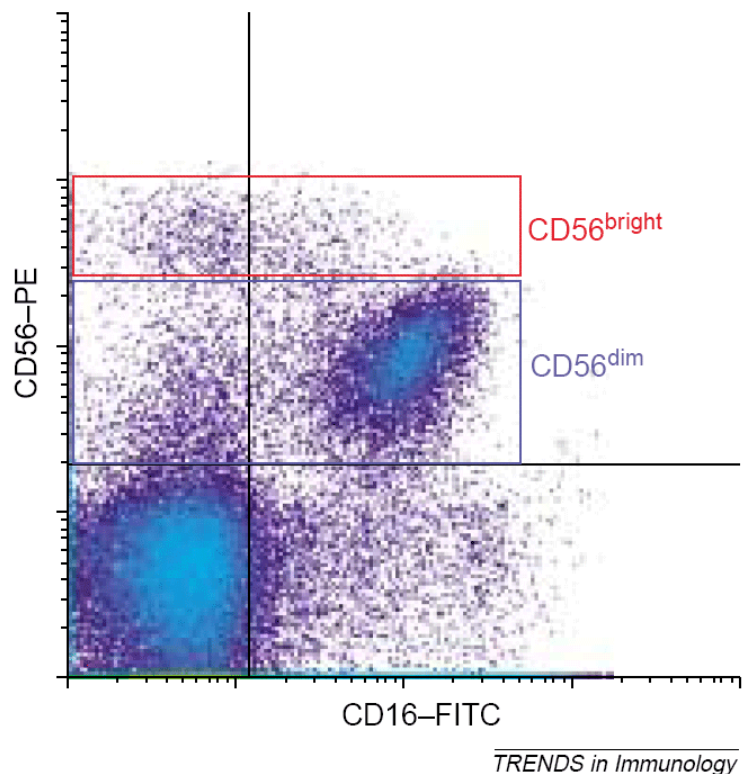


Figura 1. Análisis de Citometría de flujo de células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}. Las células NK CD56^{bright} (cuadro rojo) comprenden el \approx 10% de todas las células NK y son CD16⁻ o CD16^{dim}. La mayoría de las células NK (\approx 90%) son CD56^{dim} (cuadro azul) y tienen una expresión de densidad alta de CD16 (CD16^{bright}). Abreviaciones: FITC, fluoresceína isocianato; PE, ficoeritrina (Adaptado de Cooper MA y cols. 2001).

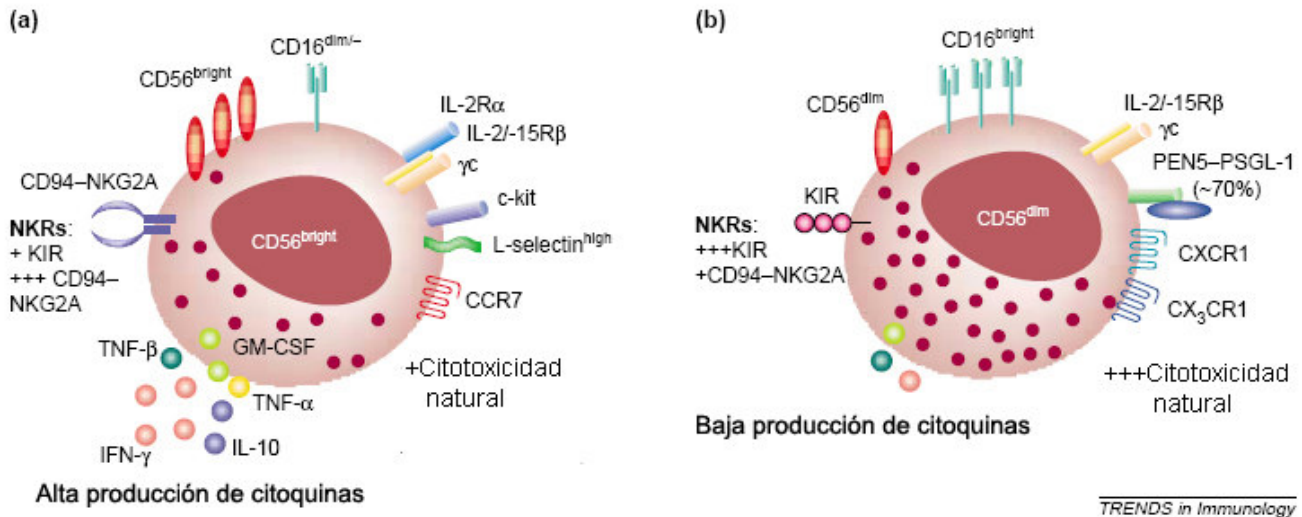


Figura 2. Esquema de los subtipos de células NK. Las Células NK CD56^{Bright} producen altos niveles de citoquinas, tienen una baja expresión de CD16, presentan una baja citotoxicidad natural y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (a). En contraste, las células NK CD56^{dim} producen bajos niveles de citoquinas, pero son potentes mediadoras de ADCC y citotoxicidad natural, además presentan una morfología más granular que las células NK CD56^{Bright} (b). (Adaptado de Cooper MA y cols. 2001).

El tipo de respuesta de una célula NK depende del balance que haya entre las señales de activación e inhibición que reciba, y cual predomine más, ya que no es un “todo o nada”, sino un constante equilibrio de señales.

La activación de las células NK ocurre tempranamente durante la respuesta inmune y, contrariamente a la respuesta inmune adaptativa, no involucra la expansión de células antígeno-específicas. Por lo general, las células NK tienen una fuerte actividad en contra de células tumorales o infectadas con virus. Principalmente, las células NK atacan células que disminuyen la expresión en superficie moléculas MHC-I (hipótesis de la “pérdida de lo propio”), ya que las células tumorales o infectadas con virus usan este mecanismo para que los linfocitos T citotóxicos no las reconozcan (Diefenbach A y cols. 1999). Este reconocimiento por parte de las células NK se debe a que tienen receptores inhibitorios específicos para las moléculas MHC-I, por lo cual, en ausencia de estas, las células NK pueden activarse y lisar a la célula blanco. Estos receptores específicos incluyen a los KIR (receptores del tipo de inmunoglobulinas de células NK) para los humanos, los dímeros Ly49 tipo lectinas para los ratones y los heterodímeros tipo lectina CD94-NKG2A para ambas especies (Vivier E y cols. 2008).

Por otro lado, las células NK cuentan con receptores de activación, en donde se destaca la familia de receptores NKG2D. Estos receptores corresponden a lectinas tipo C, siendo glicoproteínas tipo 2 ancladas a membrana y expresándose en la superficie de las células NK, células T $\gamma\delta$ y en las células T CD8+ como homodímeros unidos por un enlace disulfuro. El receptor NKG2D se asocia con dos homodímeros de DAP10 o DAP12, a través de un hexámero que se usa como péptido señalizador

en la vía de transducción. Específicamente la asociación entre ambas moléculas se daría entre residuos de Arginina y Aspartato presentes en la región transmembranal de NKG2D y DAP10 respectivamente (Lanier y cols. 2008) (**Figura 3**)

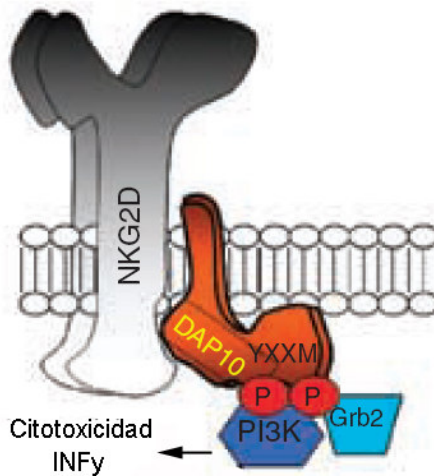


Figura 3. Representación esquemática del receptor NKG2D. Para la transducción de señales, NKG2D se asocia, al igual que otros receptores de activación, con proteínas adaptadoras DAP10 o DAP12 a través de residuos cargados en el dominio transmembrana (Adaptado de Nausch N y cols. 2008).

1.3 **Ligandos de activación del receptor NKG2D**

Una de las características del receptor de activación NKG2D es que posee múltiples ligandos (NKG2DL), los cuales son moléculas del complejo MHC Clase I no clásico (MHC-I) u homólogas de estas proteínas. Los primeros ligandos en ser identificados fueron la proteína relacionada a la cadena A de MHC-I (MICA) y a la cadena B de MHC-I (MICB) (Mistry AR y cols. 2007). Estos ligandos se encuentran codificados en la región HLA de las moléculas del MHC-I. Se ha descrito que poseen tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), un dominio transmembrana y uno citoplasmático. Se diferencian de las moléculas MHC-I clásicas en que no presentan péptidos y no se asocian con β_2 -Microglobulina (Zwirner NW y cols. 1998) (**Figura 4**) .

El otro grupo de NKG2DL descritos son las proteínas de unión a UL16 (ULBPs), las cuales son proteínas de superficie y están relacionadas también con los MHC-I. Primero se identificó a ULBP-1 por su capacidad de unir a la glicoproteína UL16 de Citomegalovirus. A diferencia de las proteínas MHC-I tradicionales, los ULBPs están unidos a un tallo GPI, carecen del dominio α_3 y, al igual que los MICs, no se asocian a β_2 -microglobulina. Estas proteínas son importantes activadores de las células NK, su forma soluble se une a las NK humanas y estimula su citotoxicidad contra las células tumorales. Además, la forma soluble de los ULBPs también induce la producción de citoquinas como INF- γ , GM-CSF y TNF- α (Sutherland CL y cols. 2002) (**Figura 4**).

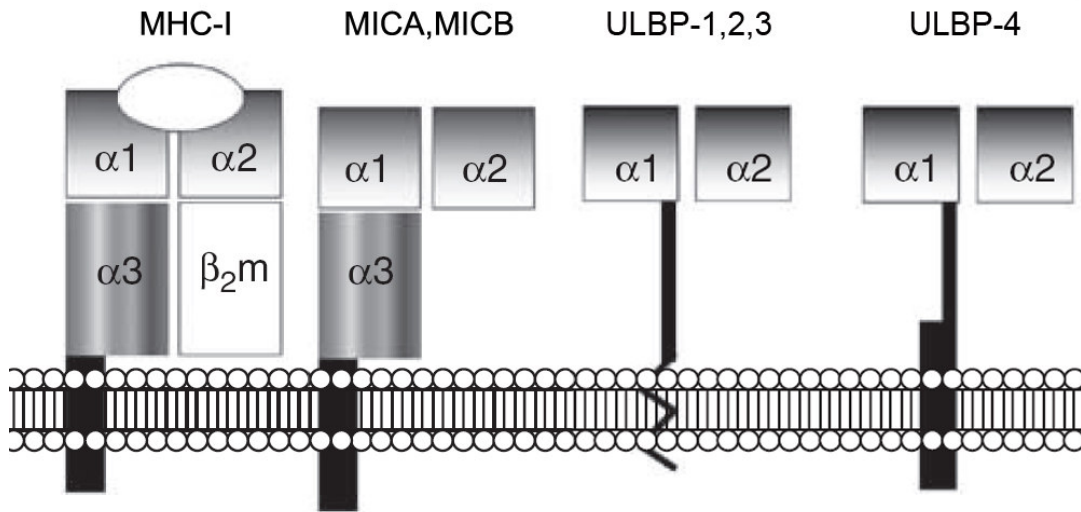


Figura 4. Ilustración esquemática de los NKG2DL. Comparación de MICA, MICB MHC-I y ULBPs (Adaptado de Nausch N y cols. 2008).

En condiciones normales, MICA y MICB estarían siendo expresados solamente por las células epiteliales del intestino, lo cual se debe, probablemente, a la estimulación por parte de la flora bacteriana (Raulet y cols. 2003). Específicamente, se encontrarían principalmente sobre las vellosidades más que en las criptas de las células epiteliales, lo cual podría contribuir a la muerte rutinaria de las vellosidades, favoreciendo la maduración de las criptas (Ebert EC y cols. 2008).

La expresión de MICA y MICB aumenta en muchas líneas celulares tumorales y tumores primarios de origen epitelial. Se piensa que esto es el resultado de la activación de la transcripción de elementos “heat-shock”, lo cual se sabe acompaña a la transformación celular en un proceso tumoral. Además, se ha visto, en Células Dendríticas, que la expresión de MICA y MICB puede ser inducida por INF- α (Raulet y cols. 2003). Por otro lado, en el año 2001, se demostró por primera vez que la expresión de NKG2DL, y la consecuente activación de las células NK, era una barrera para el establecimiento de tumores *In Vivo*. En un modelo murino, se observó que en distintas líneas tumorales la expresión ectópica de NKG2DL (en ratón, Rae1 β o H60) provocaba un potente rechazo de las células tumorales en ratones, lo cual era mediado por células NK y células T CD8+ (Diefenbach A y cols. 2001). En un modelo de Glioblastoma humano, se vio que la sobreexpresión ectópica de MICA producía una mayor sensibilización del glioma a la actividad citolítica de las células NK, por lo cual se postuló que la sobreexpresión de MICA podía ser una estrategia para aumentar la inmunovigilancia del tumor e inhibir el crecimiento de los gliomas (Friese MA y cols. 2003).

1.4 **Mecanismos de Evasión de la Inmunovigilancia**

A pesar de la expresión de estos ligandos en los tumores, los cuales son señales de muerte, ya que le “avisan” a las células NK que están ahí, y, por ende, que los ataquen, cabe preguntarse cómo es posible entonces que un tumor logre sobrevivir y escapar del ataque del SI. Existen diversos fenómenos que se han observado y que podrían explicar en parte la problemática anterior.

Se ha planteado que los NKG2DL asociados al tumor podrían estar siendo liberados a la circulación, debido a la muerte tumoral, secreción de exosomas, proteólisis o una combinación de estos fenómenos. Específicamente, en un modelo tumoral, mediante ensayo de ELISA, se pudo apreciar una presencia importante de MICA soluble (sMICA) en la circulación, lo cual tenía relación con la disminución del receptor NKG2D en la superficie de las células NK. Por esto, se cree que la liberación de NKG2DL en etapas progresivas del tumor podría estar promoviendo la evasión inmune por parte del tumor (Groh V y cols. 2002). Con respecto a lo anterior, hay evidencia que ciertas metaloproteasas, que son sobreexpresadas en los tumores (proteasas ADAM), serían las responsables de la liberación a la circulación de MICA por parte del tumor, las cuales removerían a MICA en la superficie del tumor (Waldhauer I y cols. 2008) .

Se ha planteado también que podría existir una selección negativa sobre los tumores que expresan NKG2DL en su superficie. Se ha observado en melanoma que la expresión de estos ligandos depende del estado de avance en que el tumor se encuentre. Es así como en melanomas primarios existe una alta expresión de estos ligandos, pero disminuye en las lesiones metastásicas. Esto sería una forma de escape de la inmunovigilancia por parte de los tumores, debido a que con el tiempo quedarían sólo los tumores que no expresan o poseen una baja expresión de los NKG2DL (Vetter CS y cols. 2004).

Otro mecanismo que se ha planteado para explicar la evasión de la inmunovigilancia por parte del tumor es a través de citoquinas, las cuales, dependiendo del tipo y del contexto, podrían aumentar o disminuir la expresión en superficie de los NKG2DL. Se ha observado que INF- α aumenta la expresión de MICA en la superficie de células tumorales, y, contrariamente, INF- γ la disminuye (Zhang C y cols. 2008). Por otro lado, en el embarazo se ha detectado la expresión de sMICA y sMICB en la placenta, y se ha observado que la interacción de éstos con NKG2D disminuiría con el paso del tiempo gestacional, como un mecanismo fisiológico para silenciar el SI materno, y, así, promover el escape inmune del feto alogénico (Mincheva-Nilsson L y cols. 2006). Junto a esto, se ha registrado un aumento de IL-10, presentando un alza importante en el primer trimestre. Se ha sugerido que IL-10 es expresada en placenta de una forma dependiente de la edad gestacional, y que disminuiría hacia el final del embarazo, dentro de los cambios asociados con el parto (Hanna N y cols. 2000). Concordante con lo anterior, en nuestro laboratorio, se ha detectado, en líneas de melanoma transfectadas con un vector retroviral que produce IL-10 y/o la adición exógena de esta citoquina, una disminución de MICA en su superficie, en comparación con las líneas control (Serrano AE y cols. 2009).

En nuestro laboratorio creemos que otra explicación, para la evasión de la inmunovigilancia por parte del tumor, es que los NKG2DL estén siendo retenidos de alguna forma en el interior de la célula, ya sea en vesículas, en el aparato de Golgi o en el RE por alguna proteína chaperona o complejo proteico (Gelebart P y cols. 2005; Fuertes MB y cols. 2008).

1.5 *Calreticulina*

El Retículo Endoplásmico (RE) es un organelo esencial para la síntesis y maduración proteica. Es un reservorio y fuente de señales de Calcio. Cualquier perturbación de sus funciones puede resultar en la acumulación de proteínas mal plegadas y posterior falla de su funcionamiento. El RE contiene proteínas chaperonas que están fisiológicamente involucradas en modificaciones post-traduccionales, formación de enlaces disulfuro, plegamiento y control de las nuevas proteínas sintetizadas para preservar la homeostasis celular. En el estrés de Retículo, el aumento de las chaperonas es clave para la supervivencia celular, facilitando el correcto plegamiento de proteínas y previniendo su agregación. Estas pueden organizarse en tres grupos: (a) chaperonas de la familia de las proteínas “heat-shock” (Hsp), que incluye a GRP78, GRP94 y co-chaperonas; (b) chaperonas tipo lectinas como Calnexina (Cnx), Calreticulina (Crt); y (c) chaperonas substrato- específicas como Hsp47. Además, existen dos grupos chaperonas que catalizan el plegamiento proteico, llamadas tioloxidoreductasas de la familia de las PDI, GRP58/ERp57 y PPIs (Ni M y cols. 2007).

En el RE se conocen sistemas de chaperonas, entre ellos se encuentra el sistema Cnx/Crt. Ambas proteínas se asocian con la mayoría de las glicoproteínas que pasan a través del RE, asociándose preferentemente a ellas dado que Cnx y Crt son lectinas específicas para oligosacáridos transientes, que estén en un nivel intermedio de procesamiento y que posean un residuo terminal de glucosa específico. También ligan ATP, Calcio, Zinc y a ERp57, la cual es una de las principales tioreductasas del RE (Williams y cols. 2006). Juntas, Cnx, Crt y ERp57 forman el sistema Cnx/Crt, que es responsable del control de calidad y ensamblaje de las nuevas glicoproteínas sintetizadas. Los substratos para el ensamblaje se asocian de forma transiente con Cnx y Crt, entran a un ciclo de glicosilación/re-glicosilación, proceso que es muy importante en la asociación con chaperonas. Además, Crt es muy importante para la función normal de Cnx como chaperona, ya que, en la ausencia de esta, los substratos de Crt no pueden ser tomados por Cnx, lo que provoca que se acumulen en el lumen del RE, activando el sistema de respuesta a proteínas mal plegadas y, con ello, produciéndose un aumento en la transcripción de chaperonas moleculares localizadas en el RE (Wu JC y cols. 2006).

Crt es una proteína que se distribuye de forma ubicua en las células del organismo, se encuentra presente en un amplio rango de especies y es la principal proteína de unión de Calcio a nivel intracelular. Es una proteína ampliamente conservada, con sobre un 90% de homología aminoacídica entre humanos, conejos, ratas y ratones, además de presentar un alto nivel de homología en su secuencia de cDNA con Crt de *Drosophila* y encontrarse presente en plantas. Estas similitudes sugieren que Crt ha tenido funciones biológicas muy importantes por más de 350 millones de años (Coppolino MG y cols. 1998). Además de las funciones de chaperona tipo lectina, Crt participa en la modulación de la expresión génica, inducción de la fagocitosis de células apoptóticas, procesos autoinmunes, es antiangiogénica, inhibe el crecimiento tumoral, y participa en la actividad lítica de perforinas de células T y células NK (Ferreira V y cols. 2005).

Si bien Crt presenta una secuencia de destinación al RE, KDEL, ha sido detectada en otros compartimentos intracelulares, incluida la superficie celular. En cuanto a su estructura, tiene dominios estructurales y funcionales. Característicamente, todas las proteínas Crt presentan un dominio ácido C-terminal, un dominio P, rico en prolina, y un dominio globular N-terminal. Es importante destacar que (a) existe un dominio S, el cual está incluido en los dominios N y P, y está involucrado en la unión de componentes del Sistema de Complemento; y (b) que el dominio N incluye 60 aminoácidos del dominio C-terminal, los cuales tienen propiedades antiangiogénicas, debido a su capacidad de inhibir la proliferación celular endotelial (Ferreira V y cols. 2005) (**Figura 5**).

El dominio N-terminal (aminoácidos 1-180) presenta una estructura globular, con 8 láminas Beta antiparalelas y un puente disulfuro. Esta región une metales pesados, como Zinc, e interactúa, *In Vitro*, con otras chaperonas de RE, con dominios de unión a DNA de receptores nucleares. Este dominio es muy importante, ya que, junto al dominio P, es responsable de la función de chaperona (Gelebart P y cols. 2005). Se ha visto que mediante mutagénesis sitio-dirigida de un residuo de **Histidina (His¹⁵³)** del dominio N-terminal, se interrumpe la función de chaperona de Crt (Guo L y cols. 2003). La His¹⁵³ se localiza en el extremo de un loop de una lámina Beta corta, la cual se encuentra en la interfase entre los dominios N y P. Este dominio podría influenciar significativamente la forma del bolsillo de unión a substrato (carbohidratos) (Gelebart P y cols. 2005) (**Figura 6**).

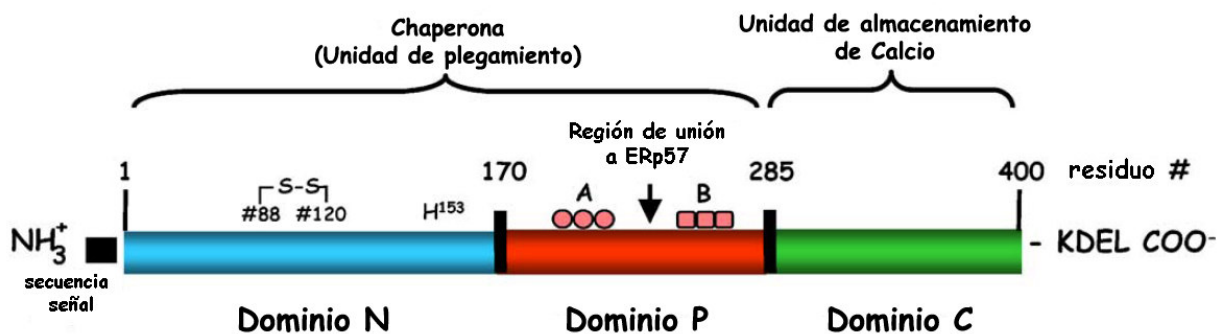


Figura 5. Representación lineal de los dominios de Crt. La proteína contiene una secuencia aminoácida N-terminal (caja negra) y una señal KDEL de RE C-terminal (Adaptado de Gelebart P y cols. 2005).

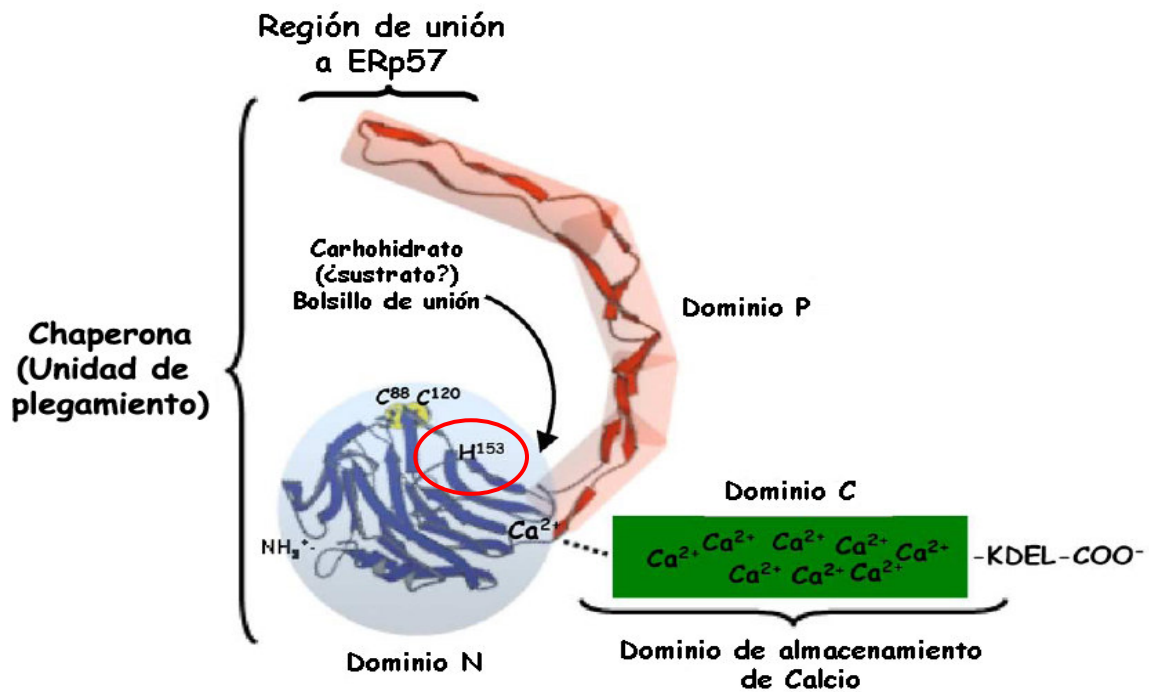


Figura 6. Modelo en 3D de los dominios N y P de Crt basados en estudios de NMR del dominio P y estudios cristalográficos de Cnx. Crt tiene un dominio N globular (en azul) y central, un dominio P rico en prolina (en rojo) que forma el loop característico. Los dominios N y P son responsables de la función chaperona de Crt. El extremo C-terminal contiene una gran cantidad de aminoácidos cargados negativamente y están implicados en la alta capacidad de almacenar Calcio de Crt (Adaptado de Gelebart P y cols. 2005).

1.6 Vasostatina

En 1998 se describió por primera vez que el dominio N-terminal de Crt, el cual recibió el nombre de **Vasostatina**, poseía una fuerte actividad antiangiogénica. En un modelo murino, se vio que al inocular Vasostatina recombinante humana se reducía significativamente el tamaño de linfoma Burkitt humano y de carcinoma de C6lon. Los resultados de este trabajo demostraron que Vasostatina era capaz de inhibir la proliferación celular endotelial *In Vitro*, suprimir la neovascularización *In Vivo*, y prevenir o reducir el crecimiento de tumores experimentales (Pike SE y cols. 1998).

En otro estudio, en el año 2005, se quiso investigar el mecanismo de acción del gen de Vasostatina *In Vivo*, mediante la construcción de un vector adenoviral y su inoculación en un modelo de cáncer pancreático murino. Se observó que las células tumorales infectadas con el adenovirus presentaron una disminución significativa en su crecimiento, neovascularización y volumen (Li L y cols. 2005).

En el mismo año del trabajo anterior, se publicaron los resultados de un estudio que pretendía evaluar los posibles efectos anti-tumorales de Vasostatina en tumores neuroendocrinos. Para ello se estableció una línea celular BON, que fue derivada de metástasis de n6dulo linfático de tumor carcinoide pancreático humano, que expresaba Vasostatina y se estudió su función, tanto *In Vitro* como *In Vivo*, en un modelo murino. Se observó una disminución en la expresión de genes supresores tumorales Rb, nm23, p53 y Vinculina, en la expresión de proteínas regulatorias del ciclo celular, como

p27kip1 y en la expresión de proteínas kinasas relacionadas con la diferenciación celular, como PKR. Además, se detectó un aumento en la adhesión celular, rodamiento, migración e invasión. Adicionalmente, se observó una disminución en la expresión del mRNA de MICA y MICB en las células BON que expresaban Vasostatina y células BON WT que fueron tratadas con Vasostatina. Junto con esto, y contrariamente a lo reportado de forma anterior, se observó que los ratones a los que se les inoculó células BON que expresaban Vasostatina desarrollaron tumores significativamente más grandes que el grupo de ratones inoculados con células BON WT. Por lo tanto, en este trabajo, por primera vez, se evidenció que al transferir el gen de Vasostatina a una línea celular de tumor neuroendocrino, se puede provocar un aumento de la malignidad tumoral, tanto *In Vitro* como *In Vivo* y paralelamente una disminución de la expresión de MICA y MICB (Liu M y cols. 2005).

Finalmente, a modo de síntesis podemos señalar que para el receptor de activación NKG2D de células NK, los ligandos más estudiados corresponden a MICA y MICB, los cuales, al estar presentes en la superficie de la célula blanco, se unen al receptor NKG2D provocando la lisis de ésta por parte de la célula NK. Se ha reportado ampliamente la presencia de estos ligandos en las células tumorales, las cuales han desarrollado mecanismos de forma de evadir la vigilancia por parte de las células NK. Dentro de estos mecanismos destaca la remoción de los ligandos desde la superficie y su liberación como formas solubles, además de su disminución en la superficie por efecto de citoquinas o retención intracelular. Con respecto a esto último, antecedentes de nuestro laboratorio indican que IL-10 provoca una disminución de MICA en la superficie de células de melanoma. Y, además, pensamos que una posible forma en que podría estar ocurriendo la retención intracelular, es que los ligandos estén interactuando con alguna proteína que estaría provocando este efecto. Creemos que la candidata para estar efectuando esta acción es Calreticulina, por su conocida participación en el procesamiento de los MHC-I y porque la sobreexpresión de su fragmento N-Terminal, Vasostatina, provoca un aumento en el volúmen tumoral, además de una disminución de MICA y MICB a nivel de mRNA.

Sobre la base de estos antecedentes se ha propuesto la siguiente hipótesis de trabajo:

2. HIPÓTESIS

“Calreticulina, molécula chaperona del Retículo Endoplasmático, retiene a MICA y MICB como mecanismo de evasión de células Natural Killer en células de melanoma, lo que es potenciado por Interleuquina 10.”

3. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de moléculas involucradas en la regulación de la expresión de ligandos de receptores de activación de células NK en células tumorales.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

Estudiar:

- 4.1** La colocalización entre Crt, MICA y MICB en el interior de células de melanoma en líneas celulares que sobreexpresan IL-10.
- 4.2** La formación de complejos proteicos entre Crt, MICA y MICB.
- 4.3** El efecto de la sobreexpresión de Crt en células de melanoma en el nivel de expresión de MICA y MICB sobre su superficie.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

5.1 Bacterias

- *E. coli* DH5 α

5.2 Líneas Celulares

- **Células HEK 293.T.** donadas por el Dr. Jonas Chnaiderman (Universidad de Chile), estas células expresan el antígeno T largo de SV40.
- **Líneas celulares BL de Melanoma Metastásico y BL transfectadas con retrovirus Hy-Tk:** vacío (BL-P), portando el gen de IL-10 humana (BL-H) y el gen de IL-10 del virus Epstein Barr (BL-V), todas donadas por el Dr. Flavio Salazar (Universidad de Chile).

5.3 Plasmidios

Los plasmidios utilizados se encuentran detallados en la **Tabla 1** y se ilustran en la **Figura 7**.

Vector	Tamaño(pb)	Gen de resistencia	Promotor
pGEM-T-Easy (Promega)	3015	Ampicilina ^r	T7, SP6
pcDNA3,1(-) (Invitrogen)	5428	Ampicilina ^r , Neomicina ^r	T7, CMV

Tabla 1. Vectores utilizados.

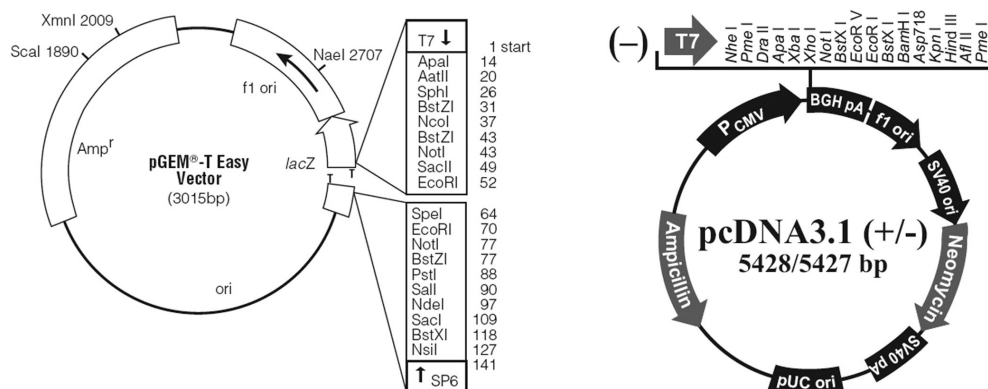


Figura 7. Vectores pGEM-T-Easy (Promega, USA) y pcDNA3.1(-) (Invitrogen, USA).

5.4 Partidores

Los partidores utilizados se obtuvieron de Fermelo (Santiago, Chile) y AlphaDNA (Montreal, Canadá). Se detallan en la **Tabla 2**.

Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Propósito, amplificación por PCR:
Vas-F	AAA <u>GAATTC</u> CACCATGCTGCTATCCGTGCC	De gen de Vasostastina nativa y mutadas (PCR3)
Vas-R	AAA <u>GGATCCT</u> CATTCCAAGGAGCCGG	
VasH1F-F	GAGTTTACAT <u>TCCT</u> GTACACACTGATT	De fragmentos PCR2 durante la mutación de H153F
VasH1F-R	CAGTGTGTACAG <u>GAA</u> TGTAAACTCATCA	De fragmentos PCR1 durante la mutación de H153F
VasH1A-F	GAGTTTACAG <u>CCCT</u> GTACACACTGATT	De fragmentos PCR2 durante la mutación de H153A
VasH1A-R	AATCAGTGTGTACAG <u>GGCT</u> TGTAAACTCATC	De fragmentos PCR1 durante la mutación de H153A
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Promotor T7
pcDNA3,1 rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Vector pcDNA3.1

Tabla 2. Partidores Utilizados. Se subrayan los sitios de restricción de *EcoRI*, para Vas-F, y de *BamHI*, para Vas-R. Además, en el resto de los partidores VasH1F y VasH1A, se subrayan los sitios diseñados para producir las mutaciones deseadas en Vasostastina.

Los partidores Vas-F y Vas-R corresponden a la amplificación Forward y Reverse, respectivamente, del amplificado de Vasostastina. El partidor Vas-F fue diseñado con un sitio de corte *EcoRI* y una secuencia de consenso KOZAK para su correcto procesamiento en el ribosoma. Por su parte, el partidor Vas-R fue diseñado con un sitio de corte *BamHI*. La elección de estos sitios de restricción se hizo pensando en una correcta inserción de Vasostastina en el vector de clonamiento pGEM-T-Easy, que posee sitios de corte para *EcoRI* y que flanquean la zona de la inserción, y, posteriormente, en el vector de expresión pcDNA3.1(-), que posee un sitio de corte para *EcoRI* y *BamHI*. El diseño para estos partidores fue el siguiente:

Vas-F (Forward)

*EcoR*I **Kosak** INICIO

AAAAGAATT**CCACC**ATGCTGCTATCCGTGCC

Vas-R (Reverse)

*Bam*HI TÉRMINO

AAAAGGATCCTCATTCCAAGGAGCCGG

5.5 Enzimas

*Eco*RI, *Bam*HI, T4 DNA ligasa (New England Biolabs, USA)

Pfu DNA Polimerasa (Stratagene, USA)

Scal (Fermentas, USA)

Taq DNA polimerasa, SuperScript II (Invitrogen, USA)

5.6 Marcadores de PM

Marcador de DNA cuantificado, escala de DNA de 100 bp, Marcador de PM para proteínas preteñido (New England Biolabs, USA)

Marcador de DNA Lambda/*Hind*III, Marcador de RNA (Fermentas, USA)

5.7 Anticuerpos (Ac.)

Ac. policlonal de conejo anti Crt humana (donado por Dr. Arturo Ferreira, Universidad de Chile).

Ac policlonal caprino anti: ratón y conejo, conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA), ratón conjugado a Ficoeritrina (Invitrogen, USA), ratón conjugado a FITC (R&D Systems, USA).

Anticuerpo monoclonal de ratón (AcMo) anti: Crt humana (BD Biosciences, USA), MICA y MICB humano (R&D Systems, USA), PDI humana (Abcam, UK), Cnx humana, ERp57 humana y IgG2b (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Kits para conjugación de AcMo con Alexa Flúor 488, Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina (Molecular Probes, USA).

5.8 Otros reactivos y sistemas comerciales

Suero normal de conejo (SNC) (Programa de Inmunología, Universidad de Chile).

Albúmina de suero bovino (BSA) (Rockland, USA).

RPMI-1640, SFB, Penicilina Streptomycin, L-Glutamina (Hyclone, USA).

DAPI, Tripsina, DMEM-F12 (GIBCO, Invitrogen, USA).

Ácido Deoxicólico (United States Biochemical Corporation, USA).
Antibiótico G-418 Solución sulfato (Promega, USA), Ampicilina (BestPharma, Chile).
Tilosina, Tunicamicina, Tween 20, Tritón 100x, Rojo Poceau (Sigma-Aldrich, USA).
Sustrato para WB, Películas de revelado (Pierce, USA), Membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, UK), Soluciones fotográficas de revelado y fijación (Kodak, Brasil).
Solución de montaje para IF (DAKO Cytomation, USA).
Pepstatina, Aprotinina, Leupeptina, PMSF (MPBio, USA).
Solución de Chomczynski, Bromuro de Etidio, Metanol técnico, Acrilamida al 30%, Isopropanol, Glicerol 87%, agua DEPC, etanol (Winkler, Chile).
Sefarosa Proteína A (Amersham Pharmacia Biotech AB, UK).
Persulfato de Amonio (APS) (BioRad, USA).
Temed, Cloroformo, etanol para análisis de Biología Molecular, X-Gal, IPTG (Merk, Alemania).
Agua libre de RNAsa, buffer de carga de DNA 6x y de RNA 2x (Fermentas, USA).
Oligo dT, dNTPs (Bioaxis, Chile).
Agarosa, DMSO (United States Biological, USA).
Kit Purificación de DNA desde gel Ultrafree DA (Millipore, USA), Kit de miniprep Qiaprep Spin, solución para transfectar células eucariontes Superfect Transfection Reagent (Qiagen, USA), Kit de Maxiprep (Jetstar, Alemania).
Todas las sales, ácidos y bases: Winkler, Chile o Merk, Alemania.

5.9 Soluciones y Medios de cultivo

Persulfato de Amonio 10%: APS 0.05 g, agua 0.5 mL.

Buffer de carga de DNA 6x: Tris-HCl 10 mM pH 7.6, Azul de Bromofenol 0.03%, Xilencianol 0.03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM.

Buffer de Carga para proteínas 3x: Tris 1 M pH 6.8 1.9 mL, Glicerol 100% 3 mL, β -Mercapto etanol 1.5 mL, SDS 20% 3 mL, azul de Bromofenol (punta de espátula), agua 600 μ L.

Buffer de Corrida: Tris 250 mM/Glicina 2M 100 mL, SDS 20% 5 mL, agua completar 1 L.

Buffer de lisis RIPA: NaCl 150 mM, Tris pH 7,4 10 mM, EDTA 5 mM, ácido Deoxicólico 1%, SDS 0.1% (luego de ajustar el pH), Tritón 100x 1%, agua csp, ajustar a pH 7,2.

Buffer de Transferencia: Tris 250 mM/Glicina 2 M 100 mL, metanol técnico 200 mL, agua completar a 1 L.

Buffer Gel Resolutivo 1.5 M: SDS 1 g, Tris base 45.5 g, agua 250 mL, pH 8.8.

Buffer MOPS: MOPS 0.2 M, Acetato de Sodio 50 mM, EDTA 10 mM, agua DEPC estéril csp, pH 7 (ajustar con NaOH 2 M). Filtrar solución con filtro milipore 0.45 μ m.

Buffer Stacking Gel de Concentración: SDS 1 g, Tris base 15.5 g, agua 250 mL, pH 6.8.

Buffer TBE 5x: Tris base 89 mM, ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3-8.7.

Buffer TE 20x: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7-pH 8. Se autoclavó.

Cóctel inhibidores de proteasas: Pepstatina 1 ug/mL, Aprotinina 5 ug/mL, Leupeptina 5 ug/mL, PMSF 1 mM/mL (agregar a buffer RIPA justo antes de usar).

Medio DMEN-F12 completo (para el crecimiento de células HEK): DMEN-F12, SFB 10%, L-Glutamina 1%, Penicilina Streptomycin 1%, Tilosina 1 uL/ml de medio.

Medio LB: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 15g/L. Se autoclavó.

Medio RPMI-1640 completo (para el crecimiento de células de melanoma): RPMI-1640, L-Glutamina 1%, Penicilina Streptomycin 1%, Tilosina 1 uL/ml de medio.

Medio LB: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L. Se autoclavó.

Medio SOB: Triptona 2%, Extracto de Levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Agar 1.5%. Se ajustó pH a 7.0 y se autoclavó.

Medio SOC: SOB + glucosa filtrada 20 mM.

PBS: NaCl 250 mM, KCl 20 mM, Na₂HPO₄ 48 mM, K₂HPO₄ 1.5 mM. Se autoclavó.

Placas LB Agar: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 15g/L. Se ajustó a pH 7.0 y se autoclavó.

Rojo Ponceau 1%: Rojo Ponceau 1 g, ácido Acético 10 mL, agua 90 mL.

Solución de Lisis (miniprep): SDS 10% al 10x, NaOH 2 M 10% al 10x, agua csp.

Solución de Neutralización (miniprep): Acetato de Potasio 5 M, pH 4.82.

Solución de suspensión GTE (miniprep): Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM.

Solución de Tinción Azul de Comassie: Azul de Comassie brillante R-250 1 g, metanol 500 mL, ácido Acético 25 mL, agua 400 mL.

Solución destinción Azul de Comassie: Metanol 100 mL, ácido Acético 25 mL, agua 800 mL.

Tampón 1 para preparar bacterias competentes: RbCl 1.2 g, MnCl 0.99 g, Acetato de Potasio 1 M pH 7.5 3 mL, CaCl₂ + 2H₂O 0.15 g, Glicerol 87 % 12.2 mL (ajustar con ácido Acético a pH 5.8 y filtrar).

Tampón 2 para preparar bacterias competentes: Buffer MOPS 0.5 M pH 6.8 1 mL, RbCl 0.06 g, CaCl₂ + 2H₂O 0.55 g, Glicerol 6.1 mL (ajustar con NaOH el MOPS a pH 6.8 y filtrar).

Tris 250 mM/Glicina 2 M: Tris base 30.3 g, Glicina 150.1 g, agua csp, pH 8.15.

MÉTODOS

5.10 *Inmunofluorescencia*

La técnica de inmunofluorescencia (IF) se estandarizó con el fin de estudiar la expresión, distribución citoplasmática de los ligandos MICA, MICB y su colocalización con Crt en las células de melanoma. El ensayo se basó en lo publicado en la literatura (Coligan JE y cols. 1994). Se cultivó un inóculo de 3×10^4 células de melanoma/ml en una botella de cultivo con 10 mL de medio RPMI-1640 completo conteniendo 10% v/v de SFB, en estufa con ambiente húmedo, 5% de CO₂ y 37° C, sin superar la densidad de 10⁶ células/ml de medio de cultivo. Se rasparon las células con un rastrillo para no dañar los ligandos MICA y MICB de la superficie. Se sembraron 300.000 células de melanoma en la mitad de un portaobjeto silanizado o 20.000 células por condición en un portaobjeto de 8 pocillos, y se dejaron con una cantidad mínima de medio RPMI-1640 completo conteniendo 10% v/v de SFB, tal que cubriese el portaobjeto, durante 2 horas dentro de una placa de Petri en la estufa de cultivos (37° C, 5% CO₂). Con esto se logró que las células se adhiriesen en el portaobjeto en forma adecuada (si se usa un portaobjeto con pocillos no es necesario hacer este paso). Posteriormente, se rellenó la placa con cantidad suficiente de medio de cultivo fresco y se dejó en la estufa de cultivos hasta el día siguiente.

Fijación de las células: se sumergió el portaobjeto en metanol a -20° C por aproximadamente 30 segundos, inmediatamente se depositó en una cámara húmeda y se lavó tres veces con PBS 1x. Posteriormente, se incubó con PBS-BSA 1% durante 10 minutos. Luego se incubó con el Ac. primario conjugado (FITC, Alexa Flúor 488 o Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina) o sin conjugar correspondiente a cada condición (MICA, MICB, Crt, PDI, Cnx, ERp57), en una dilución de 1:10 en PBS 1x, durante toda la noche en oscuridad a 4° C. Transcurrido este período se lavó tres veces con PBS 1x (cada lavado fue de 3 minutos) se procedió a aplicar la solución de montaje para IF (DAKO, USA) y finalmente se montó la muestra con un cubreobjetos. Lo anterior fue cuando se utilizó Ac. primario conjugado, de lo contrario, antes de aplicar la solución de montaje, se agregó la inmunosonda (Ac. anti Inmunoglobulina de ratón conjugado a FITC, dilución 1:10), se incubó una hora a temperatura ambiente y se lavó nuevamente. Las muestras fueron guardadas en oscuridad a 4° C en un envase no hermético para permitir la correcta gelificación de la solución de montaje. Al día siguiente, la muestra fue llevada para su análisis a un Microscopio Invertido de Fluorescencia Leica DMIL (Programa Disciplinario de Inmunología, Universidad de Chile) y/o a un Microscopio Confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL (Centro Fondap de estudios moleculares de la célula, Universidad de Chile).

5.11 *Inmunoprecipitación*

La técnica de inmunoprecipitación (IP) se estandarizó para estudiar la formación de complejos entre MICA, MICB y Crt en las células de melanoma. El ensayo se basó en lo publicado en la literatura

(Coligan JE y cols. 1994). Se cultivaron células de melanoma en idénticas condiciones a las descritas en la sección anterior. Se rasparon $0.5-1 \times 10^6$ células con un rastrillo para no dañar los ligandos MICA y MICB de la superficie celular.

Lisis celular: Entre $0.5-1 \times 10^6$ células, luego de ser lavadas tres veces con PBS 1x, se trataron con 200 uL de buffer RIPA junto al cóctel de inhibidores de proteasas y se incubaron en rotación, a 4° C, por 10 minutos. Luego se centrifugaron a 12.000 rpm, a 4° C durante, 10 minutos y se recolectó el sobrenadante.

Preclareado: Al sobrenadante recolectado se le agregó una cantidad mínima de Sefarosa proteína A (punta de espátula) junto con el control de isotipo (Ac. anti IgG2b, 1 ug), se completó a 1 mL con PBS 1x. Se dejó en rotación a temperatura ambiente durante una hora (o toda la noche a 4° C). Se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue aspirado con mucho cuidado para no arrastrar Sefarosa desde el fondo del tubo.

Inmunoprecipitación: Al sobrenadante recolectado se le agregó una cantidad mínima de Sefarosa (punta de espátula) junto con el Ac. Anti MICA, MICB o Crt (1 ug). Se dejó en rotación a temperatura ambiente durante dos horas (o toda la noche a 4° C). Se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó, 5 veces, el pellet agregando 1 mL de PBS 1x e invirtiendo el tubo un par de veces. Posteriormente, se adicionó buffer de carga 3x y se calentó la muestra a 100° C durante 5 minutos. Luego, se procedió a separar las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% p/v en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE), en condiciones reductoras, utilizando cámara de electroforesis vertical de Bio-Rad (Richmond, USA) y el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Cleveland DW y cols. 1977). Para el gel de corrida se usaron 2.31 ml de una solución de Acrilamida al 30% p/v, 2.8 ml de agua desionizada, 1.75 ml solución tampón de gel (Tris 1,5 M, pH 8,8), 70 uL de SDS, 70 uL de APS al 10% p/v y 3 uL de TEMED. La polimerización se realizó a temperatura ambiente, entre placas de vidrio, de aproximadamente 200 x 150 x 1,0 mm y 120 x 80 x 1,5 mm. Una vez polimerizado el gel de corrida se preparó sobre éste el gel concentrador ("stacking") al 4,5% p/v. Para ello se agregaron 0.33 ml de solución de acrilamida al 30% p/v, 1.4 ml de agua desionizada, 0.25 ml de solución tampón de gel (tris 1M, pH 6,8), 20 uL de SDS, 20 uL de persulfato de amonio al 10% p/v y 2 uL TEMED. La polimerización de este gel se realizó alrededor de una peineta de 1,0 o 1,5 mm de espesor con un número variable de dientes. Se aplicó una corriente constante de 25 mA, 4 W y 50 V, durante el recorrido de la muestra por el gel concentrador y 100 V a partir del inicio del gel separador, hasta que el marcador de corrida llegara o superara el borde inferior del gel. Para visualizar las proteínas, los geles fueron transferidos a nitrocelulosa para continuar con la inmunoelectrotransferencia.

5.12 *Electrotransferencia*

Las proteínas, separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, UK), de acuerdo a la metodología descrita por Towbin (Towbin H y cols. 1979), utilizando un sistema húmedo de transferencia horizontal de proteínas de Bio-Rad, USA (Mini-PROTEAN II Cell). Se colocó el gel y la nitrocelulosa entre dos papeles de filtro, a cada lado, orientándose la transferencia hacia el cátodo. Luego, se aplicó una corriente de 100 V, 4 Watts y aproximadamente 0.8 mA, a 4° C, durante 1 hora. Verificada la transferencia con tinción con Rojo Ponceau por 10 minutos y lavado con agua, se bloquearon los sitios libres con proteínas de leche descremada al 5 % p/v en PBS pH 7,2, durante toda la noche en agitación a 4° C. Posteriormente, se lavó tres veces la membrana con PBS-Tween al 0.05% v/v, cada 5 minutos, por 4 veces, agitando constantemente y se agregó el Ac. primario de interés diluido en PBS-leche al 3% p/v (1:500) y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Se lavó 7 veces con PBS-Tween al 0.05% v/v. Se agregó el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido en PBS-leche al 3% p/v (1:500). Se lavó 5 veces con PBS-Tween al 5% v/v. Finalmente, se incubó con sustrato en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos y se montó la membrana para una posterior visualización de la reacción de quimioluminiscencia, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.13 *Extracción y cuantificación de RNA total*

El RNA se purificó con Solución de Chomczynski con Fenol (método TriReagent, Molecular Research Center, Inc, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente un pellet (lo más seco posible) de aproximadamente 1 millón de células fue tratado con 1 mL de solución de Chomczynski, se lisaron y posteriormente homogenizaron. Se incubó a 4° C durante 10 minutos y se adicionaron 200 uL de cloroformo, luego se agitó 30 veces por inmersión y se dejó reposando a 4° C durante 10 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm a 4° C durante 25 minutos. Se extrajo la fase acuosa y se le agregó un volumen igual de isopropanol. Se procedió a incubar a -20° C durante 2 horas a o 2 días (para un rendimiento óptimo). Transcurrido este período se centrifugó a 13.000 rpm a 4° C durante 15 minutos. Se lavó el pellet con etanol al 75% v/v (diluido en agua DEPC), se agitó durante 30 segundos y se centrifugó a 8.000 rpm durante 8 minutos a 4° C. Se dejó secar el pellet durante 5 minutos y se resuspendió en 10-20 uL de agua libre de RNAsa. Se calentó a 65° C durante 10 minutos.

Finalmente la concentración de RNA total se determinó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 260 nm. La fórmula para convertir la Abs_{260} a ug es la siguiente:

$$\text{ug/mL RNA} = (Abs_{260} \text{ medida}) \times (40 \text{ ug/mL}) \times (\text{factor de dilución})$$

La pureza de la solución de RNA se determinó mediante la obtención de la absorbancia a 260 nm/280 nm. Para una solución pura de RNA el valor de la razón debe ser lo más cercano a 2.0. Valores menores son debidos a contaminación con proteínas o fenol.

5.13 Verificación de la integridad del RNA total

La integridad del RNA total extraído se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % p/v en buffer MOPS 1x. Para esto se mezclaron 5 uL del RNA extraído con 5 uL de buffer de carga para RNA 2x y se corrió el gel durante una hora a 80 V. Finalmente, la integridad del RNA se comprobó en un transiluminador UV siguiendo el patrón de migración de los RNAs ribosomales.

5.14 Síntesis de cDNA por transcripción inversa

Para sintetizar cDNA se hizo una mezcla compuesta por 5 uL de RNA, 1 uL de oligo dT 100 uM y 7 uL de agua DEPC. Se realizaron incubaciones a 70° C y a 4° C por 5 minutos. A la mezcla se agregaron 4 uL de buffer StrataScript 5x y 2 uL de dNTPs 10 mM y se incubó a 37° C durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 200 U/uL (1 uL) de Transcriptasa Reversa SuperScript II, y se incubó durante una hora a 37° C y luego a 70° C por 10 minutos. El ensayo se realizó basado en las instrucciones dadas por el fabricante de la enzima (Invitrogen, USA).

5.15 PCR semicuantitativo

Con el fin de estudiar si la sobreexpresión de Vasostatina provoca algún efecto sobre la expresión en superficie de los ligandos MICA y MICB en las células de melanoma, se amplificó Vasostatina mediante PCR semicuantitativo. La mezcla utilizada fue la siguiente: 2.5 uL de cDNA, 2.5 uL de buffer Pfu 10x, 0.5 uL de dNTPs 10 mM, 0.5 uL de cada partidor a 10 mM (Vas-F y Vas-R), finalmente la enzima Pfu DNA Polimerasa 2.5 U/uL (0,5 uL) en un volumen final de 25 uL. El programa de temperaturas utilizado fue el siguiente: 94° C por 2 minutos, 29 ciclos [94° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos] y un ciclo final de 72° C por 10 minutos. El ensayo se realizó basado en las instrucciones dadas por el fabricante de la enzima (Stratagene, USA).

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio. Posteriormente, se procedió a purificar los productos de PCR por electroforesis mediante el siguiente procedimiento: se cargaron, en su totalidad, los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio. Luego, se procedió a cortar las bandas de los amplificados desde el gel, se pusieron en columnas para purificación de DNA y se centrifugó según las instrucciones del fabricante (Millipore, USA). Posteriormente, y debido a que el producto resultante se encuentra en Buffer TBE, con el fin de dejar las muestras en un medio adecuado, éstas fueron resuspendidas en Acetato de Sodio 3 M pH 5.2 (en un volumen equivalente a 1/10 de las muestras de DNA), y luego en etanol al 100% (en un volumen equivalente al doble de las muestras de DNA). Se precipitó a -20° C durante toda la noche o a -80° C durante 15 minutos. Se centrifugó a 13.200 rpm durante 30 minutos, luego de lo cual se resuspendió en 50 uL de etanol al 70% y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente se calentó a 37° C durante 2 minutos y se resuspendió en 30 uL de

agua desionizada. Los productos de la purificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio.

5.16 Mutagénesis sitio-dirigida

Con el fin de estudiar si Histidina 153 es un aminoácido importante en la función de chaperona de Crt con MICA y MICB, se realizó una mutación sitio-dirigida para cambiar esta Histidina por una Alanina (**H153A**) y por una Fenil Alanina (**H153F**).

Para la generación de estas mutaciones, se utilizó la técnica de unión de fragmentos de DNA mediante PCR de extensión por sobreposición (Horton 1995). Brevemente, como se esquematiza en la **Figura 8**, se amplificaron los fragmentos PCR1 y PCR2 utilizando como molde el gen de Vasostastina, previamente clonado, y partidores Forward y Reverse para PCR1 y PCR2, respectivamente, que hibridan con el gen. Los partidores Reverse y Forward, para PCR1 y PCR2 respectivamente, poseen bases nucleotídicas complementarias, entre si, de forma que pueden hibridar entre ellos. Esta secuencia resultante hibrida con el molde del gen que codifica para Vasostastina. Además se incluyó una variación, con respecto al molde de Vasostatina, en el triplete que codifica para el aminoácido a ser cambiado (bases subrayadas en **Tabla 2**, primers VasH1F-F, VasH1F-R, VasH1A-F, VasH1A-R). Primero se generaron, por PCR, los segmentos PCR1 y PCR2, y, posteriormente, se unieron ambos fragmentos tal que PCR1 y PCR2 hibridaron en sus extremos, en donde se diseñaron los partidores complementarios. Luego se realizó un nuevo PCR, utilizando primers complementarios a los extremos 5' y 3' del gen de Vasostatina (Vas-F y Vas-R), tal que se generara el fragmento PCR3.

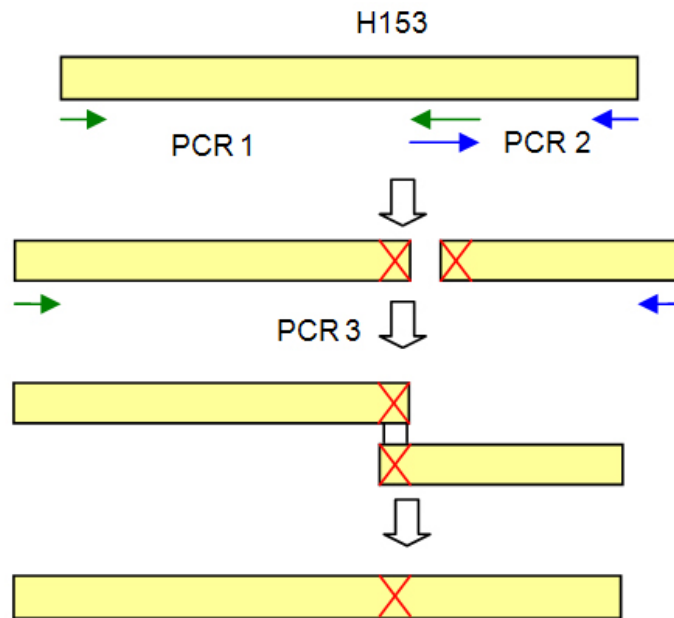


Figura 8. Esquema de la unión de los fragmentos generados mediante PCR de extensión por sobreposición.

5.16.1 PCR para producir mutación en fragmentos de Vasostatina (PCR1 y PCR2)

Los fragmentos PCR1 y PCR2 fueron amplificados utilizando la enzima polimerasa Pfu con la misma mezcla descrita en el punto **5.15**. Los partidores utilizados para generar el fragmento PCR1 de H153A y H153F fueron Vas-F y VasH1A-R, y Vas-F y VasH1F-R, respectivamente. El programa de temperaturas utilizado fue el siguiente: 95° C por 2 minutos, 5 ciclos [95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos], 30 ciclos [95° C por 30 segundos, 65,4° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos] y un ciclo final de 72° C por 5 minutos.

Mientras que los partidores utilizados para generar el fragmento PCR2 de H153A y H153F fueron VasH1A-F y Vas-R y VasH1F-F y Vas-R, respectivamente. El programa de temperaturas fue el siguiente: 95° C por 2 minutos, 5 ciclos [95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos], 30 ciclos [95° C por 30 segundos, 62,5° C por 30 segundos, 72° C por 20 segundos] y un ciclo final de 72° C por 2 minutos. Los ensayos se realizaron en base a las instrucciones dadas por el fabricante de la enzima (Stratagene, USA).

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio. Posteriormente se purificaron los productos de PCR mediante el mismo procedimiento señalado en el punto **5.15**.

5.16.2 PCR para unir fragmentos mutados de Vasostatina (PCR3)

Se procedió a unir los fragmentos generados de las mutantes de Vasostatina mediante una amplificación total. La mezcla utilizada para generar los fragmentos PCR3 fue la siguiente: 2.5 uL de los

fragmentos respectivos a las mutantes, 2.5 uL de buffer Pfu 10x, 0.5 uL de dNTPs 10 mM, 0.5 uL de cada partidor a 10 mM (Vas-F y Vas-R), finalmente la enzima Pfu DNA Polimerasa 2.5 U/uL (1 uL) en un volumen final de 25 uL. El programa de temperaturas utilizado fue el siguiente: 94° C por 2 minutos, 29 ciclos [94° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos] y un ciclo final de 72° C por 10 minutos. El ensayo se realizó en base a las instrucciones dadas por el fabricante de la enzima (Stratagene, USA).

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio. Posteriormente se purificaron los productos de PCR mediante el mismo procedimiento de purificación desde gel señalado en el punto **5.15**.

5.17 Ligación de DNA en vector de clonamiento

Antes de realizar la ligación en el vector de clonamiento pGEM-T-Easy y debido a que la enzima Pfu no adhiere colas poli T a los fragmentos de Vasostatina generados, se procedió a hacerlo según las instrucciones dadas por el fabricante. Posteriormente, los fragmentos de Vasostatina fueron ligados respectivamente en el vector de clonamiento pGEM-T-Easy, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, USA), mediante la siguiente mezcla: 5 uL de buffer 2x, 1 uL vector pGEM-T-Easy, 2 uL de producto de PCR, finalmente enzima T4 DNA Ligasa 400 U/uL (1 uL) en un volumen final de 10 uL.

5.18 Transformación química de bacterias

Se transformaron bacterias, con el fin de, mediante clonamiento, aumentar la cantidad de vector. Se prepararon bacterias competentes *DH5 α* mediante el método RbCl₂: se inocularon las bacterias en 30 mL de medio SOB y se incubó toda la noche a 37° C en agitación. Luego, se tomó una alícuota de 5 mL del medio resultante y se inoculó en 200 mL de medio SOB. Se dejó que las bacterias crecieran hasta obtener una densidad óptica de 0.4 (550 nm). Los cultivos resultantes fueron repartidos en tubos helados de 50 mL, se dejó en hielo por 15 minutos y se centrifugó a 3.500 rpm por 8 minutos. Los pellets resultantes fueron resuspendidos, por separado, con 5 mL de Tampón 1 (frío) y se dejó en hielo por 15 minutos. Finalmente, se centrifugó y resuspendió en 3 mL de Tampón 2 (frío). Se alicuotó y se congeló en Nitrógeno líquido por algunos segundos y se almacenó a -80° C (para más detalles de los tampones consultar Materiales y Métodos, Sección 5). Procedimiento hecho según lo descrito en la literatura (Harwood AJ 1994).

Luego, se tomó una alícuota de 100 uL de las bacterias resultantes y se agregaron 10 uL del producto de la ligación (punto **5.17**). Se incubó en hielo durante 30 minutos, seguido de una incubación a 42° C durante 1,5 minutos y nuevamente en hielo por 2 minutos. Inmediatamente se agregaron 900 uL de medio SOC y se incubó a 37° C durante una hora. Se sembraron 100 uL en una placa agar-LB con ampicilina 300 ug/mL (la concentración es alta debido a la mala calidad del antibiótico con que se contaba). Además, anteriormente, se suplementaron las placas con IPTG 100 mM (100 uL) y X-Gal 50

mg/mL (20 uL) y se dejaron secar a 37° C durante 30 minutos, previo a su uso, según las instrucciones del fabricante del vector pGEM-T-Easy (Promega, USA). Los 900 uL restantes fueron concentrados mediante un spin, se descartó el sobrenadante y el pellet fue sembrado en otra placa en las mismas condiciones de la anterior. Las placas fueron incubadas a 37° C durante toda la noche.

5.19 PCR de colonias

Se seleccionó un número apropiado de colonias de color blanco. Cada colonia fue pinchada y sembrada por separado en una zona de una placa agar-LB ampicilina 300 ug/mL. La placa fue incubada a 37° C durante toda la noche. Sin volver a pinchar, los restos de bacterias que quedaron en la punta fueron disueltos en 50 uL de agua desionizada y se calentó a 99° C durante 5 minutos. El producto resultante fue usado como fuente de vector para la reacción de PCR. La mezcla utilizada fue la siguiente: 5 uL de vector, 2.5 uL de Buffer Taq Polimerasa 10x, 0.5 uL de dNTPs 10 mM, 0.5 uL de cada partidor a 10 mM (Vas-F y Vas-R), finalmente la enzima DNA Polimerasa Taq 5 U/uL en un volumen final de 25 uL. Mezcla hecha según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA).

La reacción para Vasostatina se efectuó bajo el programa de temperaturas descrito en el punto **5.15**.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio. Se seleccionaron las muestras que presentaban una correcta amplificación de Vasostatina y sus respectivas colonias de bacterias para realizar una miniprep. Se pincharon las colonias que habían sido anteriormente aisladas y sembradas, se disolvieron en 20 ml de LB con ampicilina 300 ug/mL y se incubó a 37° C toda la noche en agitación.

5.20 Miniprep y secuenciación

Con el fin de que la miniprep diese el mayor rendimiento posible, en forma previa se realizó una lisis alcalina (Alkaline Lysis Mini-Prep. Molecular Techniques, The Preuss Lab, The Division of Biological Sciences, The University of Chicago). Para esto, se centrifugó el medio resultante del paso anterior a 11.000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 1 mL de solución de suspensión GTE, se agregó 1 mL de Solución de lisis y se agitó fuertemente 2 veces, finalmente se neutralizó con 1,4 mL de Solución de neutralización y se mezcló muy suavemente por algunos segundos (soluciones descritas en el punto **5.9**). Se centrifugó a 11.000 rpm durante 20 minutos, tras lo cual el sobrenadante fue traspasado a otro tubo y se agregó etanol al 100% en un volumen equivalente al doble de la muestra (4° C). Se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 minutos. Se lavó el pellet con etanol al 70% (4° C) y se centrifugó a 13.200 rpm durante 15 minutos. Se secó el pellet durante algunos minutos y éste fue utilizado como si fuesen bacterias para miniprep. La miniprep fue realizada mediante kit según las instrucciones dadas por el fabricante (Qiaprep Spin, Qiagen, USA).

Los productos de la miniprep fueron analizados mediante electroforesis en gel de acrilamida al 0.8% y tinción con Bromuro de Etidio, se cuantificaron mediante el programa computacional Gel-Pro Analyzer.

Finalmente, las muestras fueron analizadas por secuenciación automática utilizando servicios externos (Pontificia Universidad Católica de Chile). Para esto, el servicio utilizó los partidores de los sitios T7 promotor y SP6 promotor, los cuales flanquean el sitio de inserción del vector de clonamiento pGEM-T-Easy y que son proporcionados por el fabricante (Promega, USA).

5.21 Ligación de DNA en vector de expresión

Con el fin de liberar los fragmentos de Vasostatina, H153A y H153F contenidos en el vector de clonamiento pGEM-T-Easy se realizó una digestión enzimática. La mezcla utilizada fue la siguiente: 5 uL de vector, 5 uL de buffer NEB, 5 uL de BSA 10x, enzima *Bam*HI 20 U/uL (2.5 uL), enzima *Eco*RI 20 U/uL (2.5 uL), todo en un volumen final de 30 uL. La digestión se realizó a 37° C durante 4 horas con la enzima T4 DNA Ligasa. (New England Biolabs, USA).

Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con Bromuro de Etidio. Posteriormente se purificaron mediante el mismo procedimiento señalado en el punto **5.15**.

La mezcla para la reacción de ligación en el vector de expresión pcDNA3.1(-) se planificó mediante la siguiente ecuación consignada en manual de pGEM-T-Easy:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \times \frac{3}{1} = \text{ng inserto}$$

La mezcla fue la siguiente: 10 uL de buffer T4 Ligasa 2x, 4 uL vector pcDNA3.1(-), 0.8 uL de inserto, finalmente enzima T4 DNA Ligasa 400 U/uL (1 uL) en un volumen final de 20 uL. La reacción se realizó a 25° C durante una hora, y fue efectuada según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, USA). Se transformaron bacterias con el producto de ligación según el mismo procedimiento señalado en el punto **5.18** y se realizó un PCR de colonias siguiendo el procedimiento señalado en el punto **5.19**. Finalmente, se realizó una miniprep y posterior secuenciación según el procedimiento señalado en el punto **5.20**.

5.22 Transfección de células eucariontes

Con el fin de estudiar si existe algún cambio en el patrón de expresión de MICA y MICB en la superficie de las células, al sobreexpresar Vasostatina nativa o mutada, se procedió a transfectar células HEK 293.T. Primero se linearizaron los vectores para que se insertaran correctamente en el vector. La mezcla de la reacción fue la siguiente: 4 uL de Buffer *Scal*, 30 uL de vector, finalmente enzima *Scal* 10 U/uL (0.5 uL) en un volumen final de 40 uL. Este ensayo se hizo según las instrucciones del fabricante (Fermentas, USA). La transfección de las células se hizo utilizando el

sistema Superfect Transfection Reagent y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (Qiagen, USA). Después del ensayo de linearización, al día siguiente, se lavó con PBS 1x, se tripsinizó a 37° C durante 10 minutos, se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en medio DMEM-F12 con Antibiótico G-418 al 1.75%. Finalmente, las células se dejaron a 4° C durante 15 minutos y se dejó a 37° C durante toda la noche. El medio fue cambiado diariamente, manteniéndose la concentración de antibiótico G-418 y el tiempo de incubación a 4° C durante 15 minutos en cada ocasión. Como control se utilizaron células HEK 293.T sin transfectar, que fueron sometidas a las mismas condiciones de cambio de medio que las transfectadas. De esta forma, al morir las células no transfectadas, por efecto del antibiótico, se asegura que las células transfectadas sobrevivientes, hayan tenido una transfección exitosa.

5.23 Extracción de DNA genómico

Con el fin de corroborar que las células HEK transfectadas incorporaron el vector de expresión, se realizó un análisis de su DNA genómico. El ensayo se basó en lo publicado en la literatura (Coligan JE y cols. 1994). Para esto, el DNA genómico se extrajo tratando a 1 millón de células con 1 mL de solución de Chomczynski y posterior homogenización. Se centrifugó a 1.200 rpm durante 1 minuto, se recolectó el sobrenadante y se agregó 500 uL de isopropanol (-20° C), con posterior homogenización en forma suave. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 minuto. Al pellet se le agregó 1 mL de etanol al 70% (-20° C). Se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores y se secó el pellet durante 15 minutos. Finalmente el pellet fue resuspendido en 30 uL de agua desionizada estéril y se dejó a 37° C durante toda la noche.

5.24 Citometría de Flujo

Para analizar si las células HEK transfectadas con los distintos vectores generados presentaban algún cambio en la expresión en superficie de MICA y MICB, se realizó una Citometría de Flujo. Para esto se cultivaron las distintas células en placas de cultivo de 6 pocillos, estas, posteriormente, fueron recolectadas y sembradas en placas de 96 pocillos de fondo V (1 millón de células por pocillo). Cabe destacar que todo este proceso se realizó siempre en hielo. La placa fue centrifugada a 2.000 rpm a 4° C durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS-SFB al 1%, luego se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores. Este proceso se realizó dos veces. Se agregaron 25 uL de los Acs. primarios en dilución 1:10 y se incubó a 4° C durante 30° C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2.000 rpm a 4° C durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS-SFB al 1%. Este proceso se realizó 3 veces. Se agregaron 25 uL de los Acs. secundarios en una dilución 1:50, y se incubó a 4° C durante 30 minutos. Luego, se centrifugó a 2.000 rpm a 4° C durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS-SFB al 1%. Este proceso se realizó 3 veces. Se fijó con PBS-Paraformaldehído al 2% y se guardó en oscuridad a 4° C hasta la lectura, la cual se

realizó en un Citómetro de Flujo FACScan (Centro Fondap de Estudios Moleculares de la Célula, Universidad de Chile). El ensayo se realizó según lo publicado en la literatura (Coligan JE y cols. 1994).

6. RESULTADOS

6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Estudiar la colocalización entre Crt, MICA y MICB y el efecto de IL-10 en células de melanoma.

6.1.1 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta

Con el fin de estudiar si existe colocalización entre Crt, MICA y MICB en células de melanoma, se procedió a estandarizar la técnica de IF, como se detalla en Materiales y Métodos (Sección N° 5). En primer lugar, se realizaron ensayos preliminares para detectar MICA y MICB en células BL de melanoma, cuyos resultados se muestran en la **Figura 9**, donde se observa claramente que la señal es específica para MICA (**a**) y MICB (**b**), ya que no se detecta señal con el control negativo (**c**).

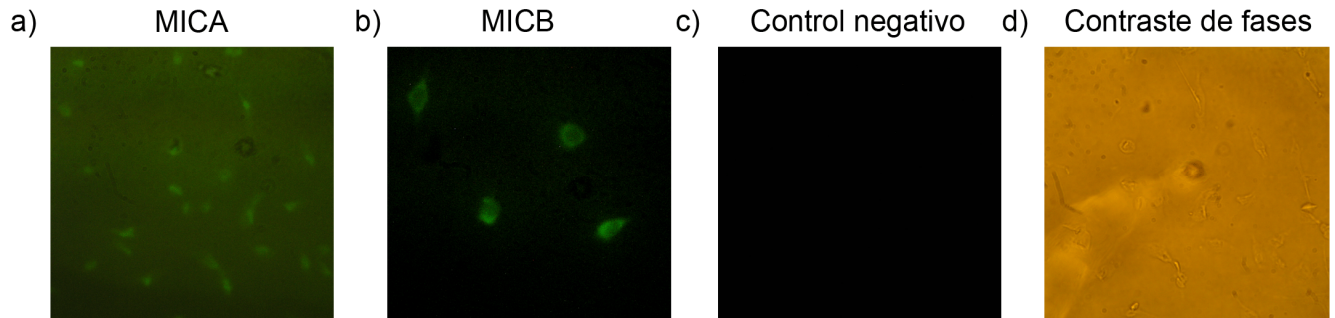


Figura 9. Detección de MICA y MICB en células BL de melanoma mediante IF indirecta. La tinción inmunofluorescente se hizo como se describe en materiales y métodos. Se utilizaron AcMos específicos anti MICA (a) y anti MICB (b) y como inmunosonda AcMo anti inmunoglobulinas de cabra anti ratón conjugado a FITC. Como control negativo se omitió el Ac primario (c) La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMIL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas de cada condición.

Una vez corroborado el correcto funcionamiento de la técnica de IF mediante un microscopio de fluorescencia, se procedió a observar las células mediante microscopía confocal. Las células de melanoma fueron incubadas con AcMos anti MICA, anti MICB y un policlonal de conejo anti Crt. La señal se amplificó mediante un Ac. de cabra anti ratón conjugado a FITC y conejo conjugado a PE. La señal fue detectada con un microscopio confocal. En la **Figura 10** se observa la detección de MICA (**a**) y MICB (**e**) en las células de melanoma mediante microscopía confocal. Ambos ligandos se encuentran agrupados en el interior de la célula, en su zona central, presentando una distribución de tipo “granular”.

Además, se observa la detección de Crt, la cual presenta la distribución esperada para una proteína que se encuentra principalmente en el RE, esto es, mayoritariamente en la zona central de la célula y, aparentemente, rodeando al núcleo (**f**).

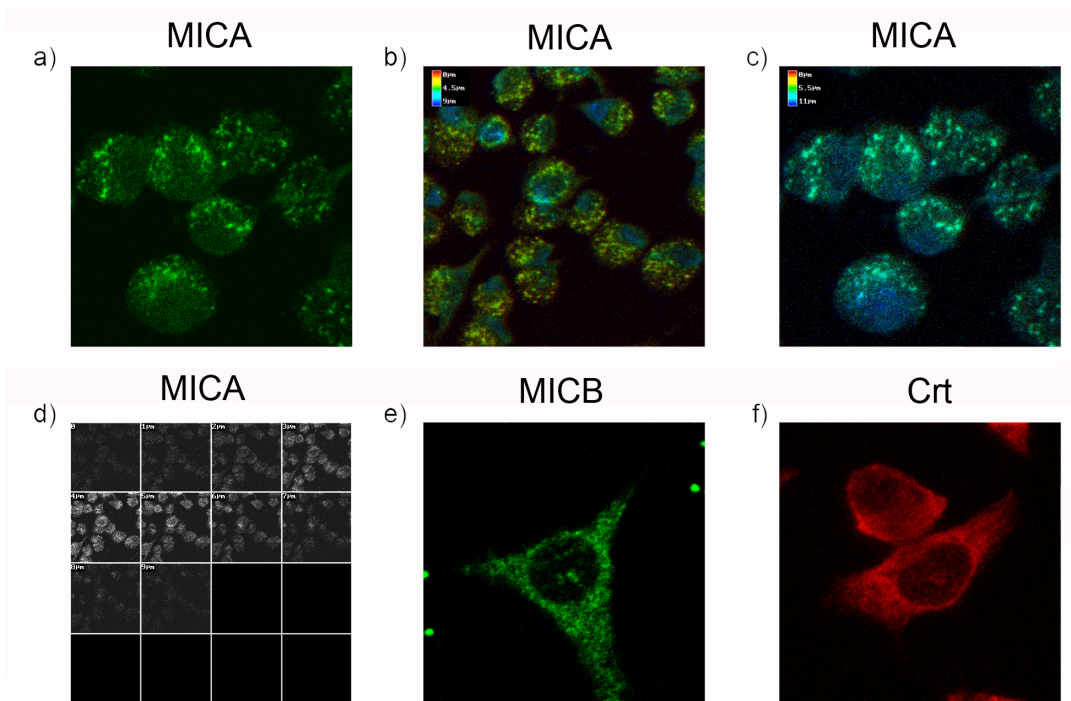


Figura 10. Detección de MICA, MICB y Crt en células BL de melanoma mediante microscopía confocal. La tinción inmunofluorescente se hizo como se describe en materiales y métodos, se utilizaron AcMos específicos anti MICA (a-c), anti MICB (e) y un policlonal de conejo anti Crt (f). La detección de la señal se realizó mediante un Ac. anti ratón conjugado a FITC y un Ac. anti conejo conjugado a PE. Las imágenes corresponden a un corte celular de 4 µm aproximadamente. Se realizó un análisis en profundidad para MICA (b), en donde el color verde corresponde a las zonas céntricas de la célula. Lo anterior se observa con mayor aumento en (c). Además, para MICA, se realizó un panel de las fotografías tomadas a las células mediante el microscopio confocal, que comprenden los distintos cortes desde la zona superior hasta la inferior de éstas (d). Como control negativo se omitió el Ac. primario (datos no mostrados). La detección de la señal se realizó mediante Microscopio Confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas de cada set de fotografías tomadas.

Durante el transcurso de esto ensayos, se concluyó que para una mayor eficacia en la técnica de IF lo mejor era hacer una IF directa, no usar Acs. secundarios marcados, sino conjugar directamente los Acs. primarios con el fluoróforo de interés. De esta forma, se evitarían posibles reacciones cruzadas de los Acs. debido al origen que tuviesen éstos (ratón o conejo). Debido a lo anterior, se procedieron a realizar los respectivos controles negativos de los Acs. conjugados, utilizando anticuerpos irrelevantes de igual isotipo marcado con el mismo fluoróforo, para asegurar de esta forma que la unión al objeto de interés fuese específica. Para esto se conjugó, mediante kit, un AcMo anti IgG2b con Alexa Flúor 488 y suero normal de conejo (SNC) con Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante (Invitrogen, USA). En la **Figura 11** se observa que no se detecta alguna señal relevante para el Ac. anti IgG2b (**a**), como tampoco para el SNC (**b**).

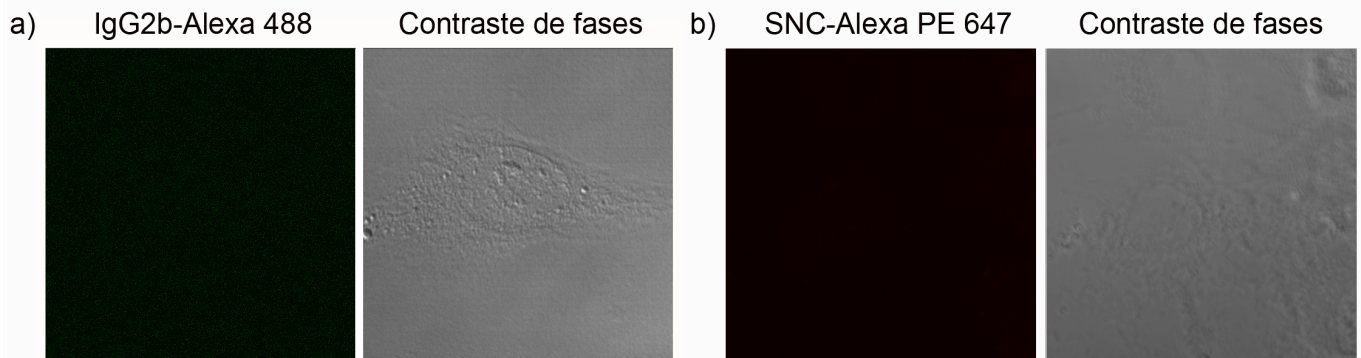


Figura 11. Controles negativos de Anticuerpos conjugados para IF directa. Ensayo realizado con células BL-P de melanoma (células transfectadas con un vector retroviral vacío) y Acs. conjugados en el laboratorio, como se describe en materiales y métodos, (a) AcMo anti IgG2b conjugado con Alexa Flúor 488 y (b) Suero normal de conejo (SNC) conjugado con Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, utilizados como controles negativos en los ensayos de detección de las proteínas MICA/MICB, y Crt, respectivamente. Imágenes obtenidas mediante un Microscopio Confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas en 10 ensayos independientes.

6.1.2 Análisis de la expresión de MICA y MICB.

Con el fin de estudiar la distribución que presentaba MICA y MICB en las células de melanoma, se realizó una IF directa y se analizó si existía colocalización de los ligandos. Para esto, células BLP de melanoma fueron incubadas con el AcMo anti MICA conjugado a Alexa Flúor 488 y anti MICB conjugado a Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina. La señal fue detectada con un microscopio confocal. Cabe destacar que se optó por las células BL-P de melanoma (línea celular BL de melanoma transfectada con constructo retroviral Hy-TK vacío), ya que antecedentes del laboratorio indican que esta línea es la que tiene una mayor presencia de MICA y MICB en su superficie. En la **Figura 12** se observa que MICA (**a**) y MICB (**b**) presentan una distribución similar, colocalizando mayoritariamente (**c**). Sin embargo, se aprecian zonas discretas en las que no existe colocalización (**c**). Llama la atención, la aparente presencia de los ligandos en el núcleo celular.

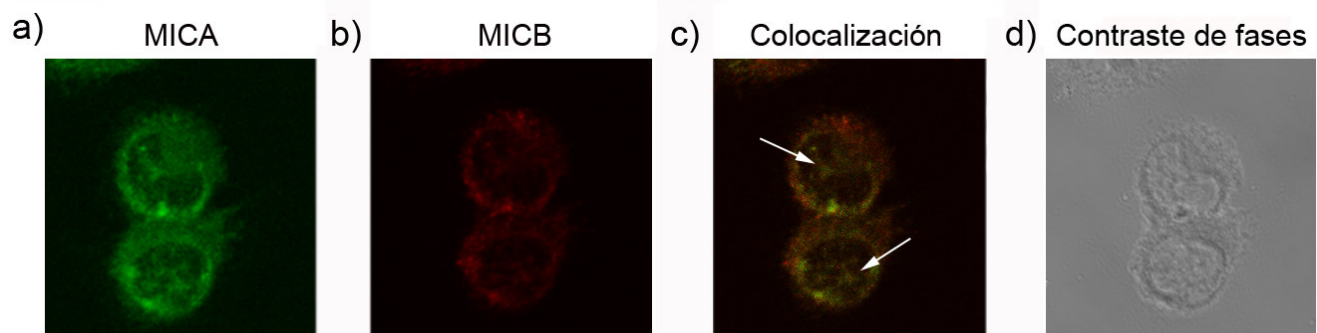


Figura 12. MICA y MICB presentan una distribución similar en las células de melanoma en IF directa. La tinción inmunofluorescente fue hecha como se describe en materiales y métodos. Para la detección de la proteína MICA y MICB se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICA conjugado a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde (a) y anti MICB conjugado a Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja (b). Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la **Figura 11** (datos no mostrados). La colocalización de MICA y MICB fue demostrada por la coloración amarilla en la imagen combinada (c). La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo

de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas en 2 ensayos independientes.

Dado que Crt es una proteína chaperona que se encuentra mayoritariamente en el RE, se quiso corroborar la **presencia de las moléculas MICA y MICB en el RE** como una forma de analizar su distribución celular. Para esto se realizó un ensayo de IF directo en que en células BL-P de melanoma fueron marcadas las proteínas MICA, MICB junto con Disulfuro Isomerasa (PDI), marcador de RE. En la **Figura 13** se observa que la señal del Ac. anti RE presenta la distribución esperada, presentando **éste una colocalización importante con MICA (a) y MICB (b)**.

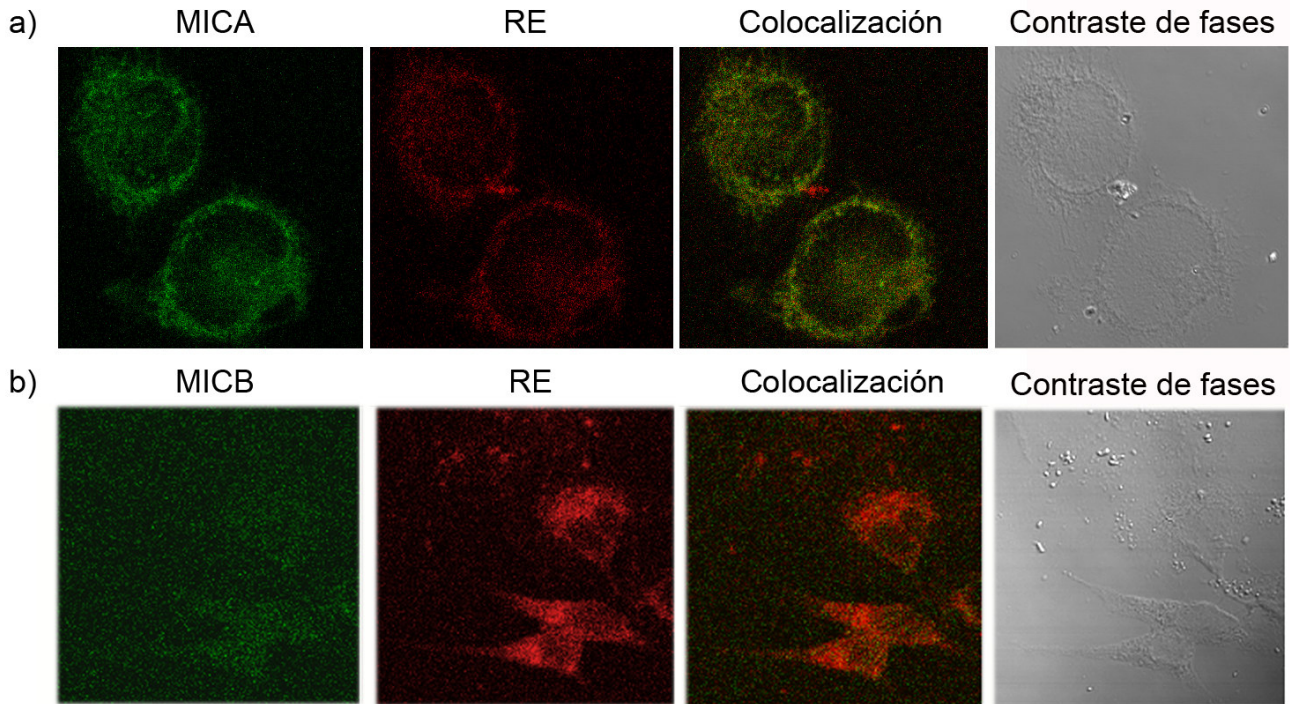


Figura 13. MICA y MICB colocalizan con el RE. Se realizó una IF directa de doble tinción, en células BL-P de melanoma, como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICA o MICB y PDI se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICA o anti MICB conjugado a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde y un AcMo anti PDI (RE) conjugado a Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja. Se incubaron las células con los Acs. anti MICA y anti PDI (a), y otro grupo con anti MICB y anti PDI (b). Como controles de isotipos se utilizaron los **Acs.** descritos en la Figura 11 (datos no mostrados). La colocalización de MICA y MICB con PDI fue demostrada por la coloración amarilla en la imagen combinada. La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas **de 4** ensayos independientes.

Con el fin de observar si **MICA y MICB se encuentran en el núcleo** de las células de melanoma, similar a lo descrito para Crt (Kobayashi S y cols. 2006), se realizó un ensayo de IF directa en células BL-P de melanoma en que estas fueron incubadas con un AcMo anti MICA o anti MICB junto con DAPI, marcador de núcleo. En la **Figura 14** se observa que MICA y MICB se encuentran, mayoritariamente, rodeando al núcleo, en la distribución típica que presenta el RE y además se encuentran presentes en su interior en forma de pequeños gránulos.

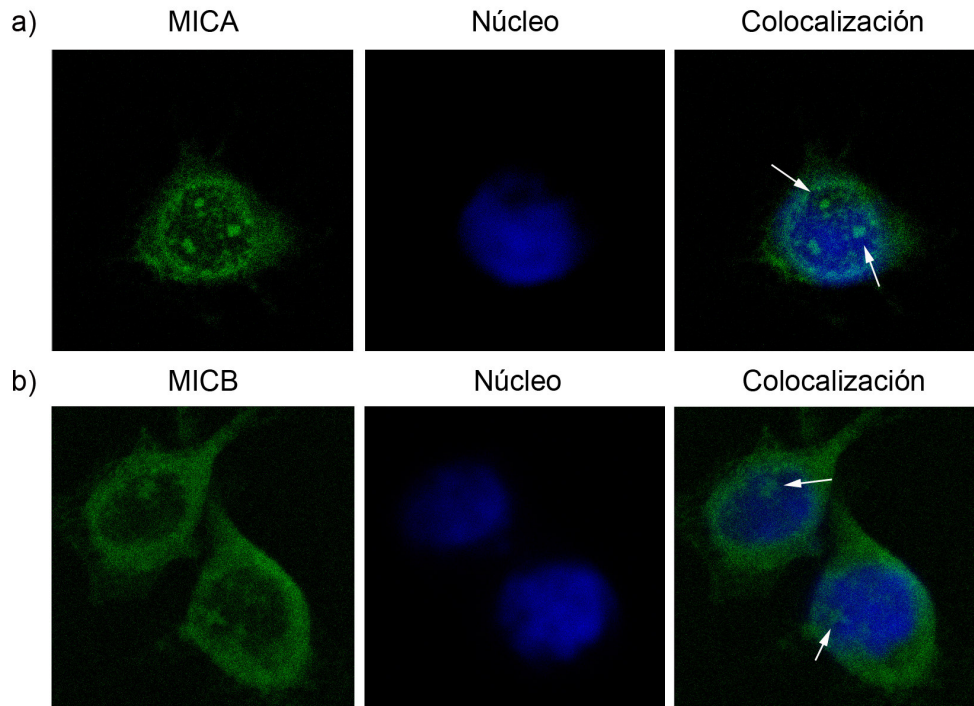


Figura 14. MICA y MICB se encuentran presentes en el núcleo. Se realizó una IF directa de doble tinción, en células BL-P de melanoma, como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICA o MICB se utilizaron AcMos anti MICA (a) y anti MICB (b) conjugados a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde, y DAPI como marcador de núcleo, observándose una fluorescencia azul. Se incubaron las células con DAPI y el Ac. anti MICA (a) y otro grupo con el Ac. anti MICB (b). Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la **Figura 11** (datos no mostrados). Las flechas indican la colocalización de MICA y MICB con DAPI. La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas de 3 ensayos independientes.

6.1.3 Análisis de la colocalización de MICA y MICB con Crt y otras moléculas chaperonas

Primero se **estudió si Crt colocaliza con las moléculas MICA y MICB** en las células BL-P de melanoma. Para ello se realizó un ensayo de IF directa de tinción doble, en que se marcaron las proteínas MICA, MICB y Crt en células BL-P de melanoma. En la **Figura 15** se observa que Crt se encuentra presente en forma importante en el interior de las células de melanoma y colocaliza en forma relevante con MICA (**a**) y MICB (**b**). Se destaca la aparente presencia de Crt en el núcleo, así como que también estaría colocalizando allí con MICA (**a**) y MICB (**b**).

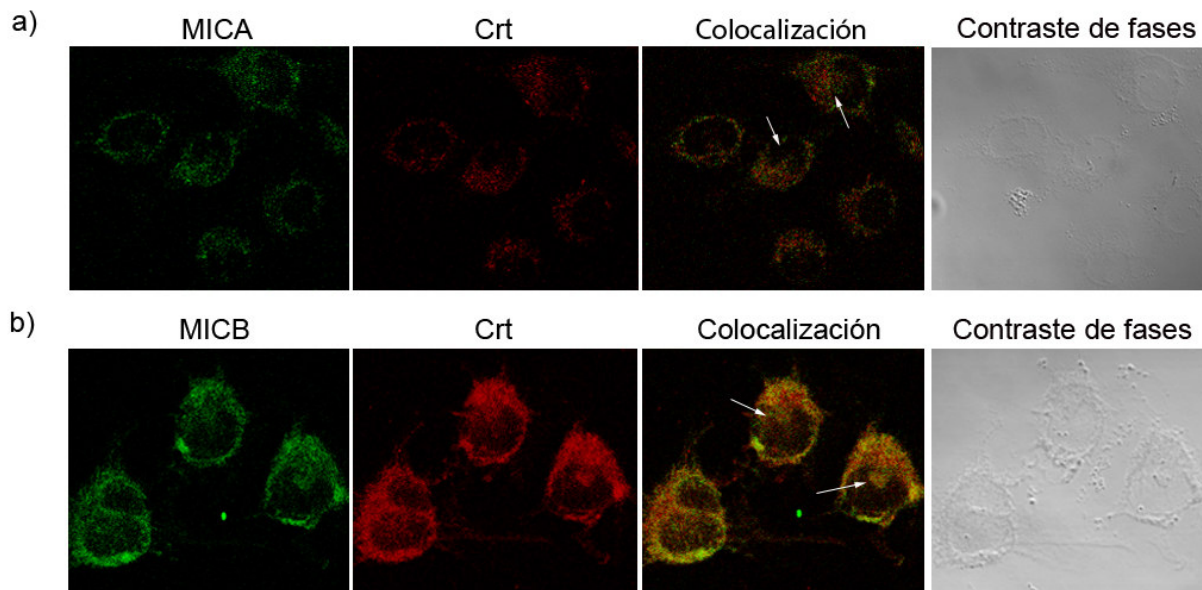


Figura 15. Crt colocaliza con MICA y MICB. Se realizó una IF directa de doble tinción, en células BL-P de melanoma, como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICA o MICB y Crt se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICA o anti MICB conjugado a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde y un Ac. policlonal de conejo anti Crt conjugado a Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja. Se incubaron las células con los Acs. anti MICA y anti Crt (a), y otro grupo con anti MICB y Crt (b). Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la **Figura 11** (datos no mostrados). La colocalización de MICA y MICB con Crt fue demostrada por la coloración amarilla en la imagen combinada. La colocalización asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas de 6 ensayos independientes.

Considerando que Crt por lo general actúa dentro de un complejo de proteínas chaperonas y tomando en cuenta los resultados anteriores acerca de la ubicación citoplasmática de MICA y MICB, se quiso observar si estos ligandos colocalizaban con otras proteínas chaperonas conocidas, que generalmente actúan junto a Crt. Para esto, se realizó un ensayo de IF directa con células BL-P de melanoma en que hizo una marcación doble de las proteínas MICA o MICB con ERp57. En la **Figura 16** se observa que ERp57 presenta una distribución similar a la de Crt y que colocaliza con MICA (**a**) y MICB (**b**). Además, se realizó otro ensayo similar de IF directa con doble tinción de MICB y Calnexina (Cnx). En la **Figura 17** se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que Cnx también colocaliza con MICB. En el caso de MICA, si bien en esta tesis no se pudo apreciar su colocalización con Cnx por ensayo de IF, resultados de nuestro laboratorio muestran que esto sí se produce (datos no mostrados).

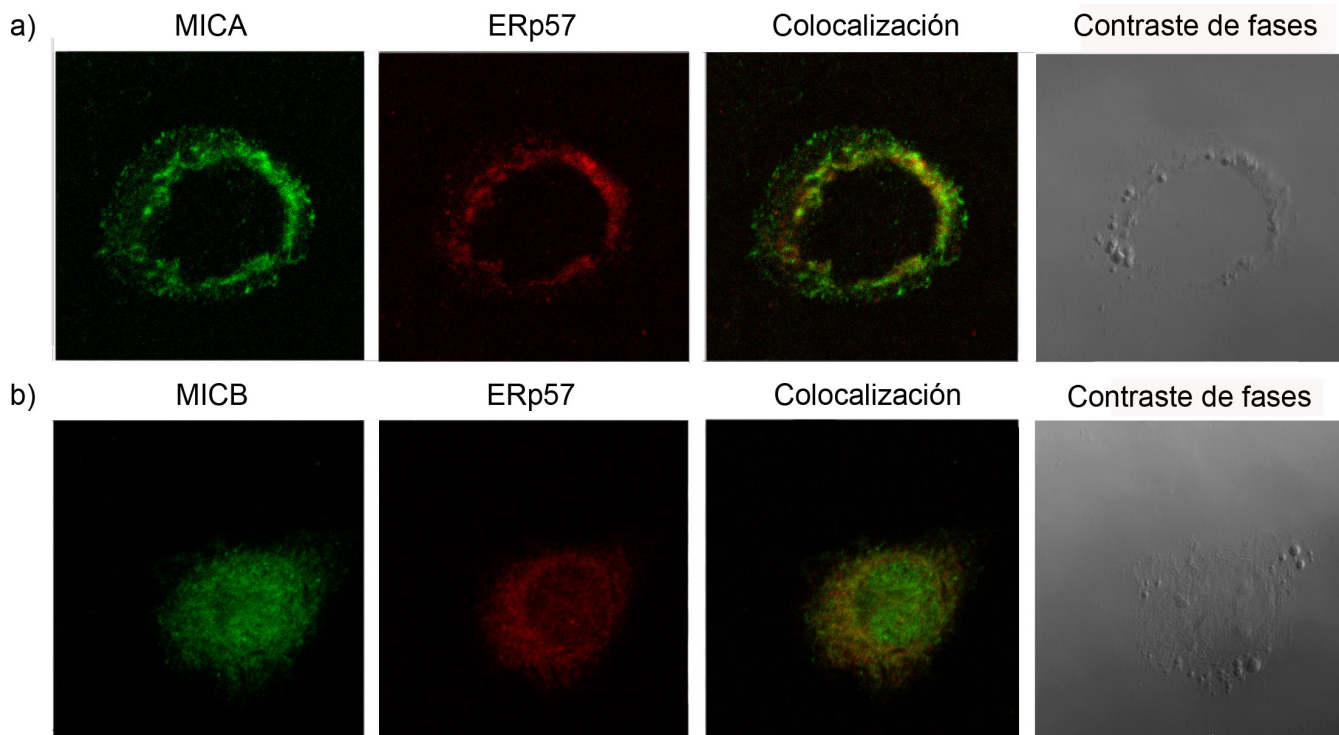


Figura 16. MICA y MICB colocalizan con la proteína ERp57. Se realizó una IF directa de doble tinción, en células BL-P de melanoma, como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICA o MICB y ERp57 se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICA o anti MICB conjugado a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde y anti ERp57 conjugado a Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja. Se incubaron las células con los Acs. anti MICA y anti ERp57 (a), y otro grupo con anti MICB y ERp57 (b). Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la **Figura 11** (datos no mostrados). La colocalización de MICA y MICB con ERp57 fue demostrada por la coloración amarilla en la imagen combinada. La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas.

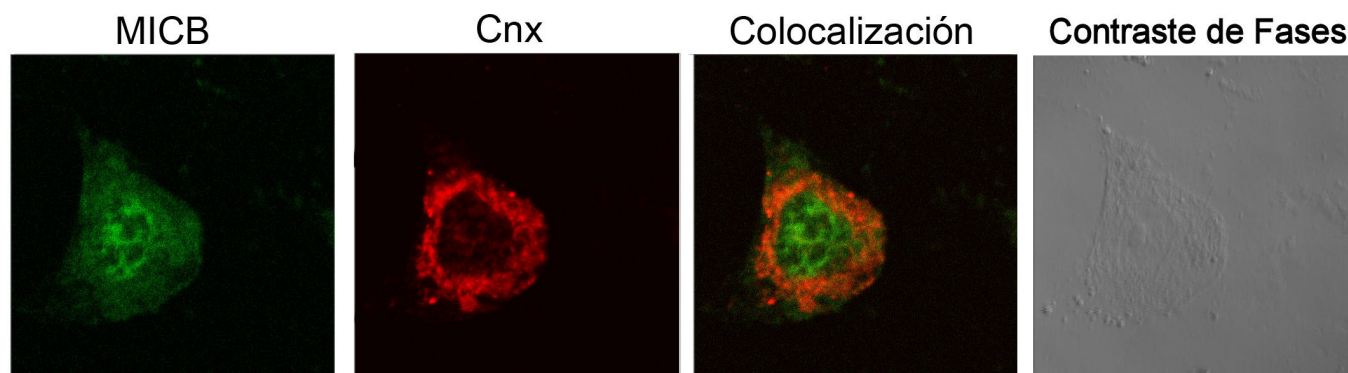


Figura 17. MICB colocaliza con la proteína Cnx. Se realizó una IF directa de doble tinción, en células BL-P de melanoma, como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICB y Cnx se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICB conjugado a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde y anti Cnx conjugado a Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja. Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la **Figura 11** (datos no mostrados). La colocalización de MICA y MICB con Cnx fue demostrada por la coloración amarilla en la imagen combinada. La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas.

6.1.4 Análisis de la expresión de MICA y MICB en presencia de IL-10

En nuestro laboratorio se ha detectado, en líneas de melanoma transfectadas con un vector retroviral que produce IL-10 y la adición exógena de esta citoquina, una disminución de MICA en su superficie, en comparación con las líneas control (Serrano AE y cols. 2009). Es por esto, que se quiso estudiar, mediante ensayos de IF, si existía alguna variación en la distribución de MICA y MICB en las líneas de melanoma transfectadas con el vector retroviral. Para realizar la comparación se realizó un ensayo de IF con las líneas celulares de melanoma, BL-V (transfectadas con un constructo retroviral Hy-TK portador del gen de IL-10 viral (Pettersson y cols. 1998)) y como control BL-P (transfectada con un constructo retroviral vacío). Esta elección se debió a que antecedentes del laboratorio muestran que la línea BL-P es la que presenta una mayor proporción de MICA en su superficie y, de forma contraria, BL-V es la que presenta la menor proporción de este ligando (Serrano AE y cols. 2009). En la **Figura 18** se muestra una imagen con los resultados obtenidos de la IF directa, de doble tinción, realizada con las células BL-P y BL-V donde se marcaron las proteínas MICA y MICB. Podemos observar que no se detectó alguna diferencia relevante en la distribución y colocación de MICA y MICB entre las dos líneas celulares de melanoma mediante esta técnica.

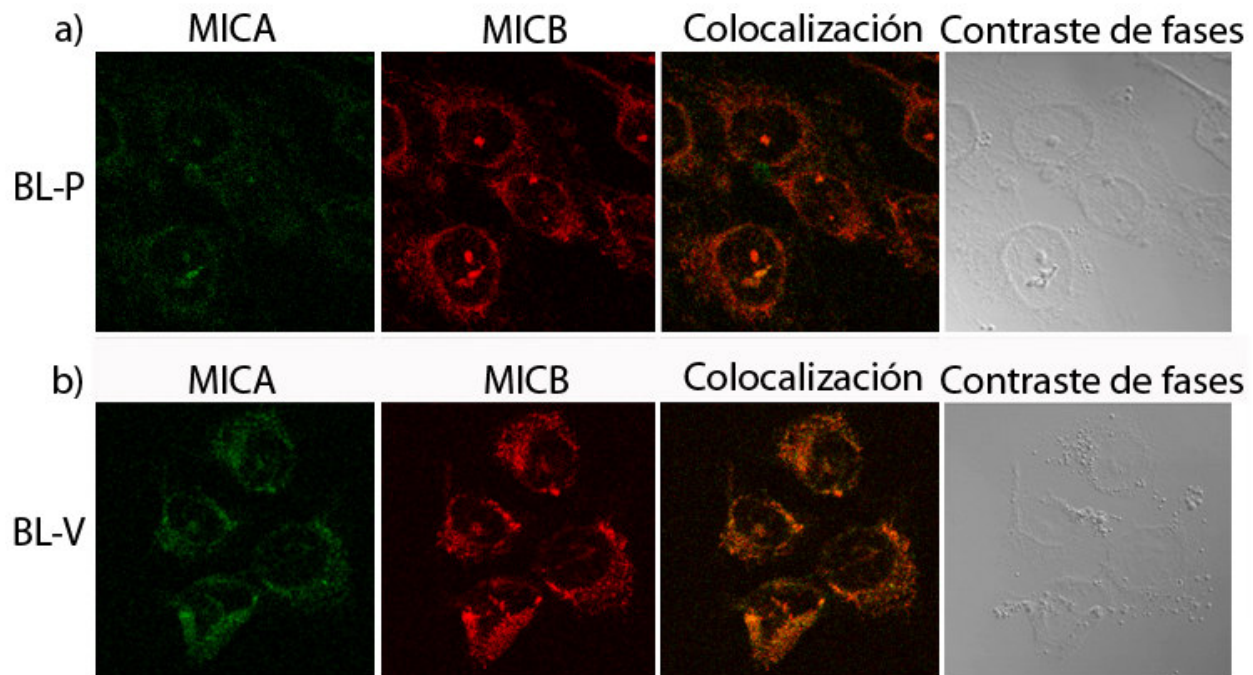


Figura 18. MICA y MICB no presentan diferencias en su distribución al comparar dos líneas celulares de melanoma con diferente grado de secreción de IL-10 en IF. Se realizó una IF directa de doble tinción, en células BL-P (a) y BL-V (b) de melanoma, como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICA y MICB se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICA conjugado a Alexa Fluóor 488, observándose fluorescencia verde y anti MICB conjugado con Zenon Alexa Fluóor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja. Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la Figura 11 (datos nos mostrados). La colocalización entre MICA y MICB fue demostrada por la coloración amarilla en la imagen combinada. La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas de 2 ensayos independientes.

Posteriormente, se estudió si existía alguna diferencia en la distribución de MICA y MICB en células de melanoma cultivadas con IL-10 exógena. Para esto, se utilizaron células BL-P de melanoma y un grupo fue cultivado con 1200 U/mL de IL-10 durante 72 horas. Se realizó un ensayo de IF directa de doble tinción, con líneas celulares de melanoma, en que se marcaron las proteínas MICA, MICB y DAPI, marcador de núcleo. Como se aprecia en la **Figura 19** no se observa alguna diferencia relevante en la distribución celular y colocación de MICA y MICB entre las células de melanoma que fueron cultivadas sin IL-10 **(a)** y en presencia de ella **(b)**.

Por otra parte, se estudió si existía alguna diferencia en la distribución de MICA y MICB en las células de melanoma según el tiempo de cultivo que éstas tuviesen. Esto, ya que los antecedentes del laboratorio han mostrado que existen diferencias en la expresión de los ligandos en la superficie entre las diferentes líneas transfectadas con el vector retroviral, lo cual es producto de los diferentes grados de secreción de IL-10 por parte de las células (Serrano AE y cols. 2009). Es por esto que se estudiaron dos grupos celulares, uno con 24 hrs. de cultivo y el otro con 48 hrs. y se analizó, por IF indirecta, la expresión de MICA y MICB. Como se observa en la **Figura 20**, se detectó una diferencia en la distribución de MICA y MICB. Las células que fueron cultivadas por 24 hrs. tienen una mayor presencia de MICA y MICB en su superficie **(a)**, y, en cambio, las que fueron cultivadas por 48 hrs. presentan mayoritariamente los ligandos en su interior **(b)**.

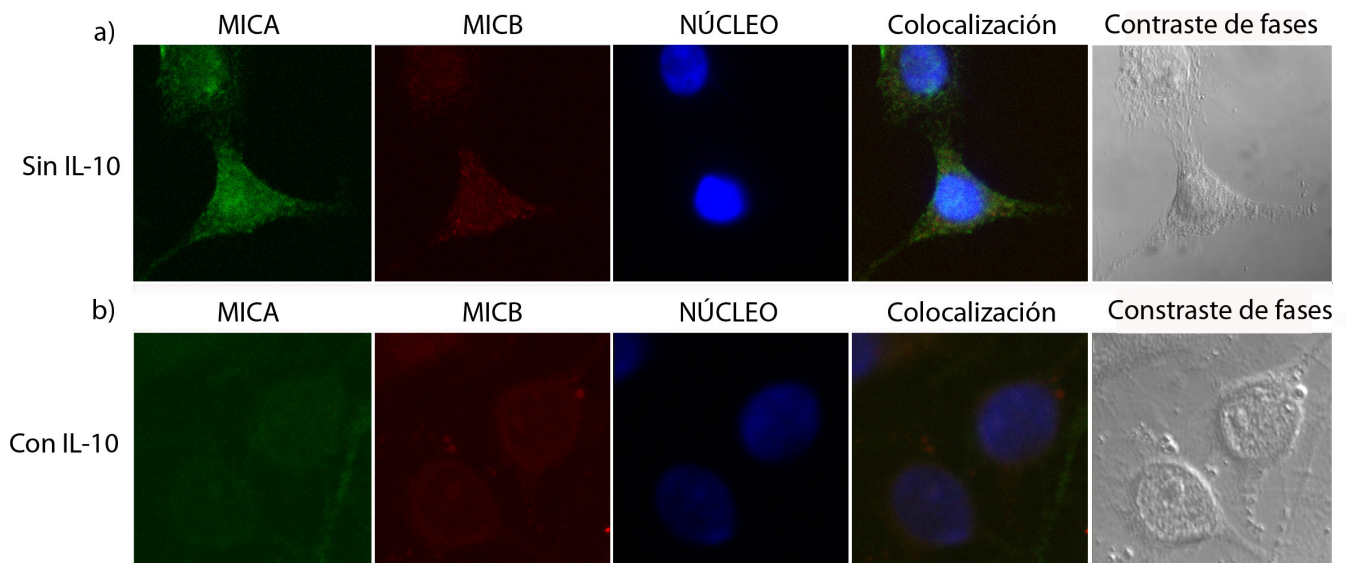


Figura 19. MICA y MICB no presentan diferencias en su distribución al comparar células melanoma cultivadas con o sin IL-10. IF directa de triple tinción, en líneas celulares BL-P de melanoma sin tratar (a) y tratadas con 1200 U/mL de IL-10 durante 72 hrs. (b), como se describe en materiales y métodos. Para la detección de las proteínas MICA y MICB se utilizaron, respectivamente, AcMos anti MICA conjugado a Alexa Flúor 488, observándose fluorescencia verde y anti MICB conjugado con Zenon Alexa Flúor 647-R-Ficoeritrina, observándose fluorescencia roja y con DAPI, marcador de núcleo, fluorescencia azul. Como controles de isotipos se utilizaron los Acs. descritos en la Figura 11 (datos no mostrados). La fluorescencia asociada fue detectada con un microscopio confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas.

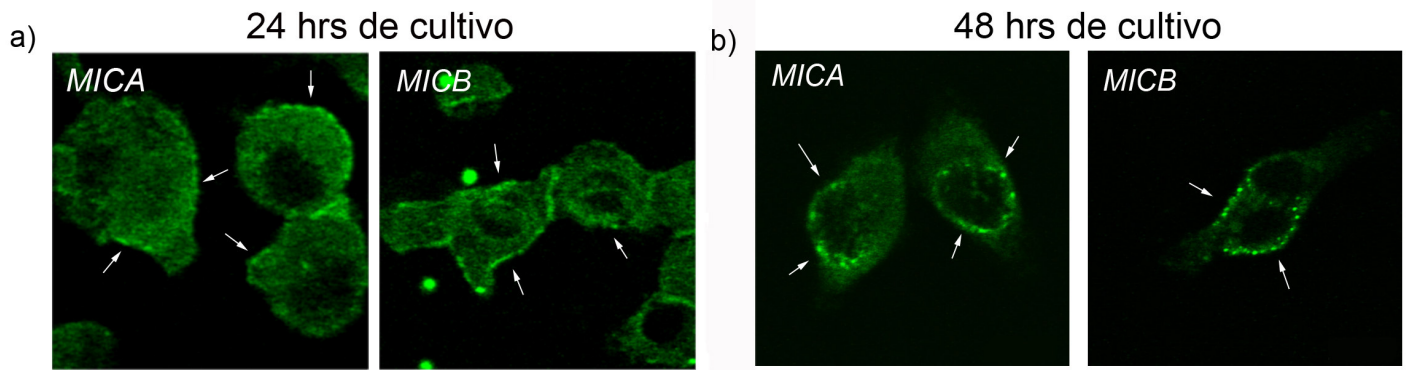


Figura 20. MICA y MICB presentan diferencias en su distribución a 24 y 48 hrs. de cultivo. Se realizó una IF indirecta de tinción simple con un AcMo primario específico anti MICA o anti MICB y, posteriormente, un Ac. policlonal conjugado con FITC, en células de líneas de melanoma cultivadas por 24 y 48 hrs., como se describe en materiales y métodos. Como control negativo se omitió el Ac primario, (datos no mostrados). La detección de la señal se realizó mediante Microscopio Confocal Carl Zeiss, con un módulo de escáner LSM5 PASCAL. Las imágenes presentadas corresponden a las más demostrativas del set de fotografías tomadas.

6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Estudiar la formación de complejos proteicos entre Crt, MICA y MICB.

Con el fin de estudiar si existe alguna interacción entre Crt y los ligandos MICA y MICB en las células BL de melanoma, se procedió a estandarizar la técnica de inmunoprecipitación (IP), tal como se detalla en Materiales y Métodos (Sección 5).

En primer lugar se realizaron pruebas para corroborar la efectividad del Buffer de Lisis RIPA preparado como se detalla en la Sección 5. En la **Figura 21** se muestra un SDS-PAGE con proteínas totales del lisado celular y teñido con azul de Comassie. Como control positivo del gel se utilizó suero normal de conejo (SNC). Además se realizó una curva de Bradford con el fin de conocer la cantidad aproximada de proteínas totales presentes en el lisado, lo que arrojó una concentración aproximada de 2 ug/uL.

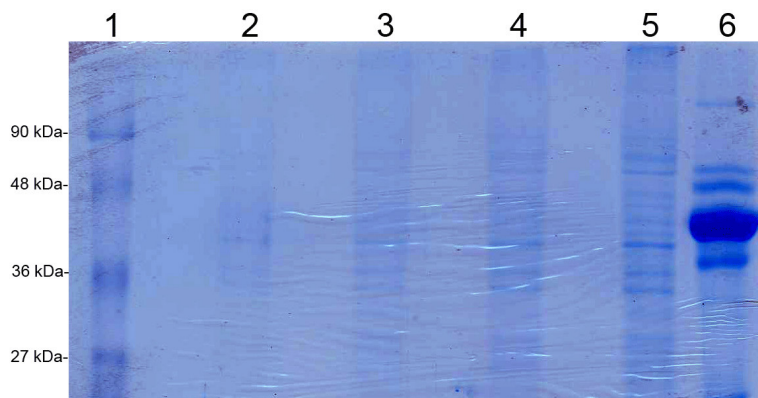


Figura 21. Lisado celular de proteínas totales de células de melanoma. Gel de acrilamida al 10%. Los carriles 2-5 corresponden a concentraciones crecientes de proteínas totales presentes en el lisado: 1 = 1 uL (2 ug), 3 = 2 uL (4 ug), 4 = 4 uL (8 ug), 5 = 8 uL (16 ug). El carril 6 corresponde a 0.25 uL de SNC (dilución 1/60, stock original de una concentración aproximada de 60 ug/uL) que se usó como control positivo. El carril 1 corresponde al marcador de PM. La fotografía corresponde a la más representativa de dos ensayos independientes.

Posteriormente, con el objetivo de estudiar si MICA o MICB inmunoprecipitan Crt o si Crt inmunoprecipita MICA o MICB, se realizó una IP de las moléculas MICA, MICB y Crt con Acs. específicos y Sefarosa Proteína A. Luego, los complejos inmunoprecipitados fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot (WB) usando Acs. específicos anti cada una de la proteínas, como se

describe en Materiales y Métodos (Sección 5). Con el fin de corroborar la especificidad de la unión de Crt y los ligandos MICA y MICB, se utilizó como control negativo un AcMo anti IgG2b, el cual corresponde al mismo isotipo de los Acs. anti MICA y MICB, y SNC como control para el Ac. anti Crt. El WB fue revelado con un Ac. policlonal anti ratón (para MICA, MICB e IgG2b) y anti conejo (para Crt), ambos unidos a Peroxidasa. Como se observa en la **Figura 22**, las proteínas MICA y MICB presentan un patrón de migración de tres bandas, dos de aproximadamente 50 kDa y una tercera banda de bastante menor tamaño, aproximadamente 23 kDa. En los controles negativos no se aprecia la presencia de alguna banda inespecífica, observándose solamente la banda correspondiente a la cadena pesada de Inmunoglobulina, lo cual también se observa en MICA y MICB como corresponde. Con el fin de analizar si este patrón de migración de las proteínas tenía relación con el de una posible glicosilación, se realizó el mismo experimento, pero previamente se trató con Tunicamicina 10 ug/mL, inhibidor de la glicosilación, durante una hora. Como podemos ver en la **Figura 22**, no se observa ninguna diferencia relevante en los patrones de migración de doble banda de MICA y MICB al inhibir la glicosilación celular con Tunicamicina. En la **Figura 22 (b)** podemos observar que, Crt inmunoprecipita con MICA, así como ésta con Crt. Además, Crt es inmunoprecipitada por la forma de menor PM de MICA, presentando un patrón de migración de una sola banda.

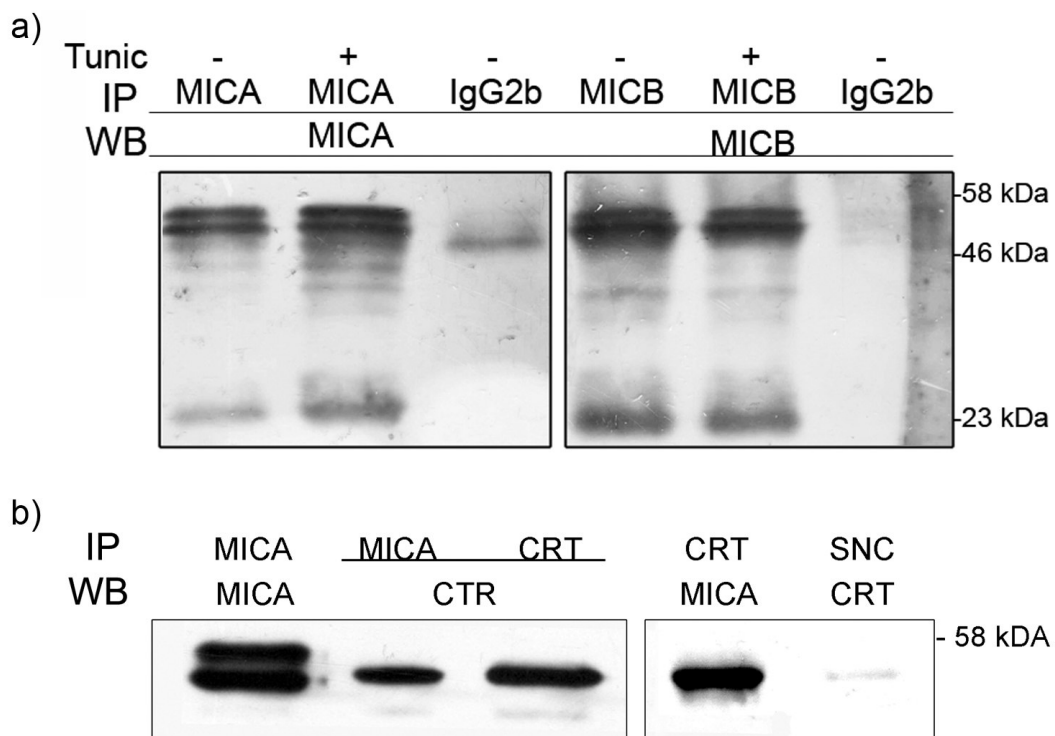


Figura 22. Crt se une a MICA en células de melanoma. a) Proteínas del lisado de células BL de melanoma fueron inmunoprecipitadas (IP) con AcMos anti MICA, MICB (1ug), separadas por SDS-PAGE y luego se realizó un WB usando AcMos anti MICA y MICB (1:500). Se reveló la reacción con un AcMo de cabra anti Inmunoglobulinas de ratón conjugado a peroxidasa (1:500). Se inhibió la glicosilación con Tunicamicina 10 ug/mL en MICA y MICB (b) Las proteínas del lisado celular fueron IP con AcMos anti MICA, MICB y un policlonal de conejo anti Crt (1:500), separadas por SDS-PAGE y se realizó un WB con AcMos anti MICA, MICB y AcPo anti Crt. Se reveló el WB con Acs. policlonales anti ratón y anti conejo. Como control negativo para IP se utilizó un Ac. de ratón anti IgG2b y SNC. Los resultados son representativos de 15 experimentos independientes.

6.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Estudiar el efecto de la sobreexpresión de Crt en células de melanoma en el nivel de expresión de MICA y MICB sobre su superficie.

Con el objetivo de estudiar si la alteración de la interacción entre Crt y los NKG2DL producía algún efecto en la expresión de éstos en la superficie de las células, se procedió a sobreexpresar y, paralelamente, a alterar Vasostatina en las células. Para esto, se realizó un ensayo de mutagénesis sitiodirigida para mutar Vasostatina en su Histidina 153, la que, según los antecedentes (Gelebart P y cols. 2005), cumple un papel muy importante en la función de Crt como chaperona. Se generaron dos mutantes, en la primera una Histidina fue reemplazada por Fenilalanina (**H153F**), de forma de no alterar completamente la hidrofobicidad del ambiente. No así en la segunda mutante, en que la Histidina fue reemplazada por una Alanina (**H153A**). Con respecto a esta última, antecedentes previos indican que el efecto de esta mutación es similar a una delección de la Histidina 153 (Guo L y cols. 2003).

Mediante RT-PCR se procedió a extraer cDNA y a amplificar la Vasostatina desde células BL de melanoma. Paralelamente, se amplificaron por separado los fragmentos de las mutantes H153A y H153F tal como se señala en Materiales y Métodos (Sección 5). En la **Figura 23** se observa la banda correspondiente a la Vasostatina generada como resultado de la amplificación entre los partidores Vas-R y Vas-F (**carril 5**), la cual presenta el tamaño esperado de aproximadamente 618 pb. Además, se observan las bandas correspondientes a los fragmentos PCR1 y PCR2 generados de las mutantes (**Figura 8**). Los fragmentos PCR1 se lograron a partir de la amplificación entre los partidores: Vas-R y VasH1A-F o VasH1F-F (**carriles 2 y 3 respectivamente**), los cuales presentan la banda de menor tamaño, por ser los fragmentos más pequeños; y entre los partidores Vas-F y VasH1A-R o VasH1F-R (**carriles 6 y 7 respectivamente**) obtenemos los fragmentos PCR2, que presentan una banda de mayor tamaño, correspondiente a fragmentos más grandes.

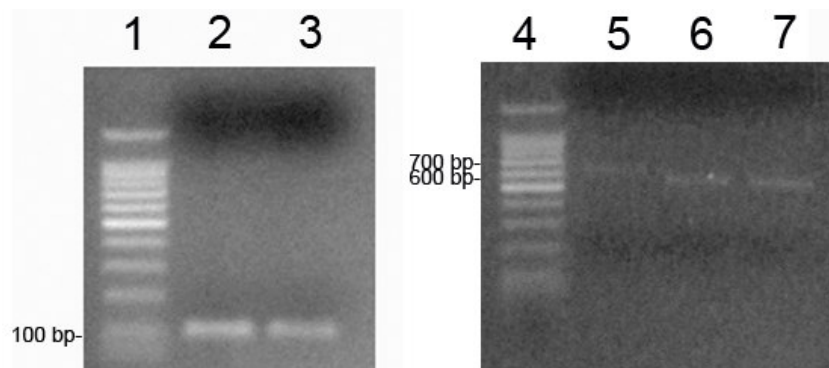


Figura 23. Amplificación de Vasostatina y fragmentos de mutantes. Geles de agarosa al 1.2%. Mediante un ensayo de mutagénesis sitiodirigida por PCR, como se describe en Materiales y Métodos, se generaron los fragmentos respectivos de las mutantes H153A y H153F. Estos corresponden a los fragmentos amplificados entre los partidores Vas-R y VasH1A-F (carril 2), Vas-R y VasH1F-F (carril 3), y entre los partidores Vas-F y VasH1A-R (carril 6), Vas-F y VasH1F-R (carril 7). Se observa el amplificado de Vasostatina amplificada (carril 5). Los carriles 1 y 4 corresponden al ladder de DNA de 100 bp.

Una vez generados los fragmentos de las mutantes, se procedió a purificarlos y luego a unirlos mediante PCR tal como se señala en Materiales y Métodos (Sección 5). En la **Figura 24** se observan las bandas resultantes de la amplificación y purificación de las mutantes H153A y H153F (**carriles 2 y 3 respectivamente**), producto de la ligación de sus respectivos fragmentos mediante PCR con los partidores Vas-R y Vas-F. Ambas bandas presentaron el tamaño esperado, el cual es muy similar al de Vasostatina y corresponden a PCR3 de la **Figura 8**.

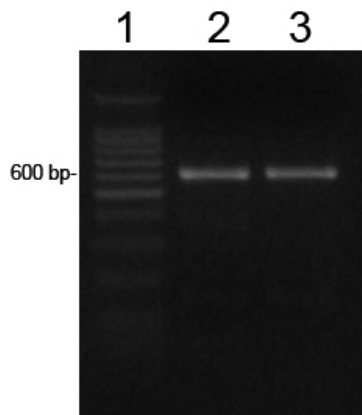


Figura 24. Generación de mutantes H153A y H153F. Gel de agarosa al 1.2%. Con un ensayo de PCR se procedió a unir los fragmentos de las mutantes generados y purificados anteriormente, mediante amplificación con los partidores Vas-R y Vas-F. Los carriles 2 y 3 corresponden a las mutantes H153A y H153F respectivamente. El carril 1 corresponde al ladder de DNA de 100 bp.

Con el fin de generar una cantidad adecuada de Vasostatina y mutantes para secuenciarlas y para ensayos posteriores, se procedió a purificar los amplificados anteriores (Vasostatina, H153A y H153F) y adherirles colas Poli-T, ya que la enzima DNA Polimerasa Pfu no las adhiere. Posteriormente se procedió a clonar los productos resultantes (Vasostatina, H153A y H153F), para lo cual se ligaron en el vector de clonamiento pGEM-T-Easy. Luego, se transformaron bacterias con el producto resultante y se seleccionaron las colonias mediante PCR de colonias. Finalmente, por miniprep se procedió a extraer los distintos vectores desde las bacterias, los cuales fueron cuantificados y, posteriormente, analizados por secuenciamiento automático mediante el uso de partidores específicos para el vector pGEM-T-Easy (T7 y SP6). Todo lo anterior, se realizó según lo señalado en Materiales y Métodos (Sección 5).

En la **Figura 25** se observa el análisis del secuenciamiento para Vasostatina (**a**), H153A (**b**) y H153F (**c**). La Vasostatina amplificada en el laboratorio a partir de células BL de melanoma fue similar a la publicada (NM_004343, National Center for Biotechnology Information), excepto por una mutación encontrada en que una Adenina que fue cambiada por una Timina. Se analizaron los marcos de lectura y se detectó que esta mutación afecta la estructura aminoacídica de Vasostatina, ya que cambia una Metionina por una Lisina. Este ensayo se realizó en numerosas ocasiones, por lo cual se descartó que fuese un problema de tipo experimental, sino que sería una mutación propia de esta línea celular, sin alguna función específica documentada para Crt humana. En las secuencias de las mutantes se detecta también, como es esperable, esta mutación mencionada (**b**) y (**c**). Además, las secuencias de las mutantes H1253A y H153F presentaron los cambios que se buscaba generar en sus secuencias nucleotídicas, lo cual se tradujo en que en sus secuencias aminoacídicas la Histidina 153 fue cambiada por una Alanina (**b**) o una Fenilalanina (**c**).

a) **Secuencia DNA**

VAS PUBLICADA	AGTTTGGACCAGACAGACAATGCACGGAGACTCAGAATACAAACATCATGTTTGGTCCCAG	419
VAS AMPLIFICADA	AGTTTGGACCAGACAGACTTGCACGGAGACTCAGAATACAAACATCATGTTTGGTCCCAG	420

Secuencia aa

VAS PUBLICADA	DHGDSEYNIMFGPDICGPGTKKVHVI FNYKGKNV LNKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDN	180
VAS AMPLIFICADA	DHGDSEYNIMFGPDICGPGTKKVHVI FNYKGKNV LNKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDN	180

b) **Secuencia DNA**

VAS PUBLICADA H153A	AGGCATCCGTTGC AAGGATGATGAGTTTACACCTGTACACACTGATTGTGCGGCCAG	549
	AGGCATCCGTTGC AAGGATGATGAGTTTACACCTGTACACACTGATTGTGCGGCCAG	898

Secuencia aa

VAS PUBLICADA H153A	FYAL SASFE PFSNKGQTLV VQFTVKHEQN IDC GG GYV KL FPNSLDQTDHGDSEYNIMFG	120
	FYAL SASFE PFSNKGQTLV VQFTVKHEQN IDC GG GYV KL FPNSLDQTDHGDSEYNIMFG	120
VAS PUBLICADA H153A	PDICGPGTKKVHVI FNYKGKNV LNKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDMTYEVKIDNSQVES	180
	PDICGPGTKKVHVI FNYKGKNV LNKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDMTYEVKIDNSQVES	180

c) **Secuencia DNA**

VAS PUBLICADA H153F	ATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGATGATGAGTTTACACCTGTACACACTGATTGTG	542
	ATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGATGATGAGTTTACACCTGTACACACTGATTGTG	597

Secuencia aa

VAS PUBLICADA H153F	DHGDSEYNIMFGPDICGPGTKKVHVI FNYKGKNV LNKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDN	180
	DHGDSEYNIMFGPDICGPGTKKVHVI FNYKGKNV LNKDIRCKDDEFTHLYTLIVRPDN	180

Figura 25. Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas generadas de Vasostatina, H153A y H153F. A partir de células BL de melanoma, se extrajo y amplificó Vasostatina (Vas), la cual fue clonada en el vector pGEM-T-Easy. Paralelamente, a partir de Vas, mediante un ensayo de mutagénesis sitio dirigida por PCR, como se describe en Materiales y Métodos, se generaron mutantes H153A y H153F, las que también fueron clonadas en pGEM-T-Easy. Los vectores resultantes fueron analizados mediante secuenciamiento automático. En verde se destacan las mutaciones propias detectadas en las células BL de melanoma, y en fucsia las mutantes que se buscaba generar mediante el ensayo de mutagénesis sitiodirigida. Se compara la secuencia de Vasostatina publicada (NM_004343, National Center for Biotechnology Information) con la amplificada (a), y con las secuencias de las mutantes generadas (b y c). El análisis corresponde al más representativo de 8 secuenciaciones independientes.

Una vez verificado que las secuencias obtenidas no tuviesen otras mutaciones que las planificadas, se procedió a extraer los insertos desde el vector de clonamiento mediante digestión enzimática y a purificar los productos resultantes. Estos fueron nuevamente clonados, ahora en el vector de expresión de células eucariontes pcDNA3.1(-) mediante una reacción de ligación y se transformaron bacterias con el productos resultantes. Se seleccionaron las colonias adecuadas mediante PCR de colonias, se extrajeron los distintos vectores mediante miniprep, se cuantificaron y se verificó la correcta inserción de los productos en los vectores mediante una digestión enzimática. Finalmente, los vectores fueron analizados por secuenciamiento automático. Todo lo anterior se realizó según como se señala en Materiales y Métodos (Sección 5).

La **Figura 26** muestra el análisis resultante de comparar la secuencia de Vasostatina publicada (NM_004343, National Center for Biotechnology Information), con la secuencia de los vectores de expresión eucariontes producidos al ligar Vasostatina (a), H153A (b) y H153F (c). El secuenciamiento

fue hecho con los partidores del vector (T7 y pcDNA3.1 rev). Se observa que la inserción de estos productos fue hecha en forma correcta, ya que los insertos, en comparación con la secuencia publicada, tienen la orientación esperada.

a)

VAS PUBLICADA	GTGAAGCTGTTTCCTAATAGTTTGGACCAGACAGACTTGCACGGAGACTCAGAATACAAC	480
VAS AMPLIFICADA	GTGAAGCTGTTTCCTAATAGTTTGGACCAGACAGACTTGCACGGAGACTCAGAATACAAC	401

b)

VAS PUBLICADA	ACGTGCTGATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGATGATGAGTTTACAGCCCTGTACACAC	600
H153A	ACGTGCTGATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGATGATGAGTTTACACACCTGTACACAC	534

c)

VAS PUBLICADA	GAACGTGCTGATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGATGATGAGTTTACACCTGTACAC	600
H153F	GAACGTGCTGATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGATGATGAGTTTACACCTGTACAC	532

Figura 26. Análisis de secuencias nucleotídicas de Vasostatina, H153A y H153F insertadas en vector de expresión eucarionte. A partir de células BL de melanoma, se extrajo y amplificó Vasostatina (Vas), la cual fue clonada. Paralelamente, a partir de esta, mediante un ensayo de mutagénesis sitio dirigida por PCR, se generaron mutantes H153A y H153F, las que también fueron clonadas. Posteriormente, estos productos fueron insertados en el vector de expresión de células eucariontes pcDNA3.1(-) y analizados por secuenciamiento automático. En verde se destacan las mutaciones propias detectadas en las células BL de melanoma, y en fucsia las mutantes generadas mediante el ensayo de mutagénesis sitiodirigida. Se comparan las secuencias generadas y ligadas en vector de expresión pcDNA con la secuencia de Vasostatina publicada (NM_004343, National Center for Biotechnology Information).

Una vez verificados los vectores de expresión eucariontes, se procedió a linealizarlos y purificarlos para, posteriormente, transfectar células HEK. Se eligieron estas células debido a su conocida permisibilidad para realizar ensayos de transfección y porque mediciones del laboratorio indican que estas células presentan MICA y MICB en su superficie.. La transfección fue realizada según como se señala en Materiales y Métodos (Sección 5). Cuando transcurrieron 10 días aproximadamente, tiempo determinado como suficiente para la selección de las células, en medio con antibiótico G418, se verificó si el vector efectivamente había quedado insertado en las células. Para esto se realizó una extracción de DNA genómico y posterior PCR, tal como se describe en Materiales y Métodos (Sección 5). Se utilizó una temperatura de alineamiento de 55° C. Como se observa en la **Figura 27**, al amplificar con los partidores del vector pcDNA3.1(-), se detecta la presencia efectiva del inserto en las células que sobreexpresan Vasostatina (**2**), las que tienen la mutante H153A (**4**) y el vector vacío (**8**), no así en las células que tienen la mutante H153F (**6**). El inserto tiene un tamaño aproximado de 618 bp y la zona amplificada del vector uno de 136 bp, por lo cual, el vector que tuvo una inserción efectiva debería tener un tamaño de 754 bp. Tomando en cuenta esto, en la **Figura 27** se puede apreciar, además, la presencia de tres poblaciones celulares en el carril **2**, lo que correspondería a dos subpoblaciones de células que sobreexpresan vasostatina y a una que, si bien tiene el vector, no tiene el inserto, lo cual es similar a lo que se observa en el carril **8**, en donde se aprecian dos subpoblaciones. En el caso del carril **6**, que corresponde a las células que tienen la mutante H153F, se observa una población celular que, si bien tiene el vector, no tiene el inserto.

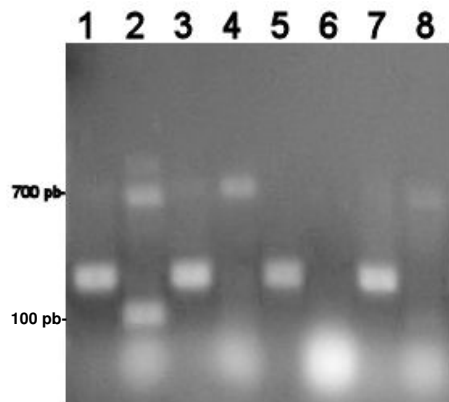


Figura 27. Detección de vector de expresión en DNA genómico de células HEK transfectadas. Gel de agarosa al 1.2 %. Con un ensayo de PCR se procedió a amplificar el vector pcDNA3.1(-). Se usó una temperatura de alineamiento de 55° C. La figura muestra los amplificadores para las células que sobreexpresan Vasostatina (carril 2), mutantes H153A y H153F (carriles 4 y 6 respectivamente), y el vector vacío (carril 8). Los carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a los controles de Beta Actina respectivos.

Paralelamente, se quiso observar si era posible detectar la presencia de Vasostatina a nivel proteico en las células HEK transfectadas, tanto en las que sobreexpresan la WT como la mutantes, mediante un ensayo de WB, ya que esta debería presentar un tamaño aproximado de 22.15 kDa, correspondiente a los 197 aminoácidos teóricos que debería poseer. A partir de 1 millón de células se realizó el lisado celular, en el cual, a diferencia de lo descrito en Materiales y Métodos (Sección 5), se dejó en un volumen total final de 20 uL. Este lisado fue el que se utilizó para el ensayo de WB. Para detectar Vasostatina, se usó un Ac. policlonal de conejo anti Crt humana. El WB fue revelado con un Ac. policlonal anti conejo unido a Peroxidasa. En la **Figura 28** se observa la presencia de Crt tanto en células HEK controles como en las células transfectadas. No se detecta la presencia de Vasostatina en las células que la sobreexpresan (carril 2) ni en las mutantes (carriles 3 y 4).

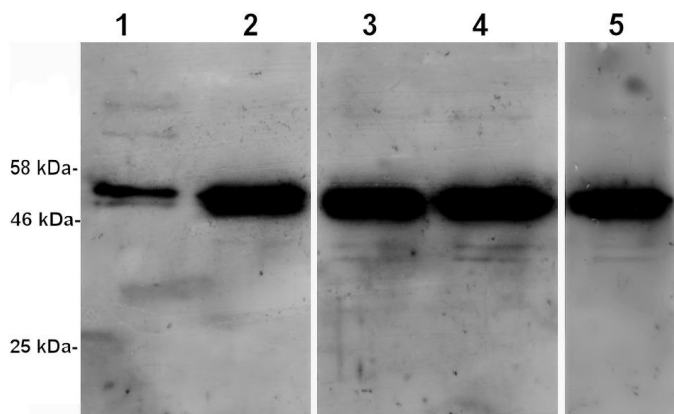


Figura 28. Vasostatina no fue detectada mediante ensayo de WB. Con un Ac. policlonal de conejo anti Crt humana se realizó un ensayo de WB para detectar Vasostatina en las células HEK transfectadas. El WB fue revelado con un Ac. policlonal anti conejo unido a Peroxidasa. Los carriles 2-5 corresponden a las células que sobreexpresan Vasostatina, las mutantes H153A y F, y el vector vacío respectivamente. El carril 1 corresponde a células HEK sin transfectar.

Finalmente, con el fin de observar si existía algún cambio en el nivel de expresión de MICA y MICB en la superficie de las células HEK transfectadas, se realizó una Citometría de Flujo según el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Sección 5). En vista de los resultados anteriores, este ensayo se realizó en las células que sobreexpresaban Vasostatina, las que tenían la mutante H153A y el vector vacío. En la **Figura 29** se observan los histogramas resultantes de la Citometría, en donde no se aprecian diferencias para el caso de MICA y MICB entre las líneas, pero sí para Crt, ya que se observa una tendencia de aumento de esta en la superficie de las líneas que tienen el vector vacío, seguido de las mutantes H153A y de las que sobreexpresan Vasostatina. Es importante destacar que al realizar la detección de Crt, mediante el fluoróforo PE al que se encontraba unida, el porcentaje de

células que dio señal fue de un 41.9% del total de células que sobreexpresaban Vasostatina, 63.3% para las mutantes H153A y 99.8% para las que poseían el vector vacío, respectivamente.

La **Figura 30** grafica la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) detectada para MICA, MICB y Crt en la superficie de las células. No se aprecian diferencias para MICA y MICB. Se observa una tendencia de aumento de Crt en la superficie de las células que sobreexpresan Vasostatina y las mutantes H153A, en comparación con las que tienen el vector vacío. Es importante mencionar que estas células no fueron permeabilizadas, por ende las señales detectadas corresponden solamente a la superficie de estas.

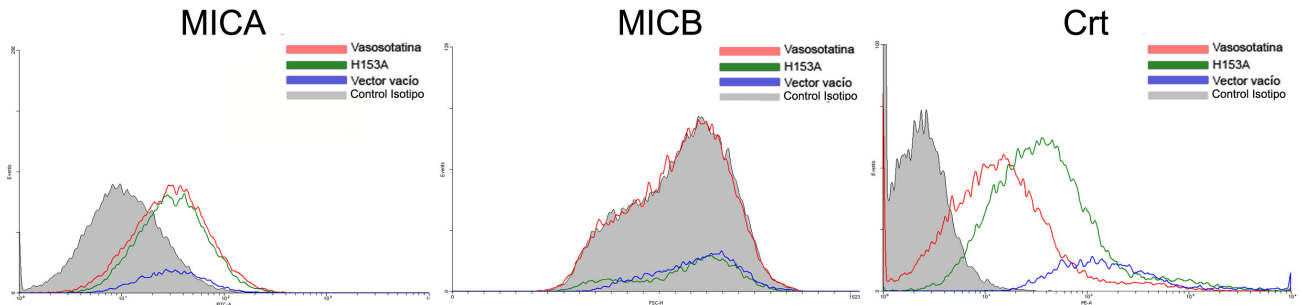


Figura 29. Citometría de flujo de MICA, MICB y Crt superficiales en las distintas poblaciones de células de HEK. Histogramas de los eventos detectados por Citometría de Flujo para la expresión en superficie de MICA, MICB y Crt en las células HEK que sobreexpresan Vasostatina, mutantes H153A y con el vector vacío. Los valores correspondientes a los controles de isotipo ya fueron restados. MICA y MICB fueron detectados a través de Acs. conjugados a FITC y Crt con PE. Para los tres grupos de células se realizaron las siguientes condiciones: detección superficial de MICA, MICB y Crt; control de Isotipo para MICA y MICB; células sin marca (para pasarlas por el Citómetro antes de realizar las lecturas respectivas). Además, se realizó un control de Isotipo para Crt, controles de Ac. secundario (FITC para los MICs y PE para Crt). La lectura se realizó considerando 50.000 eventos por condición (para más detalles ver Materiales y Métodos, sección 5).

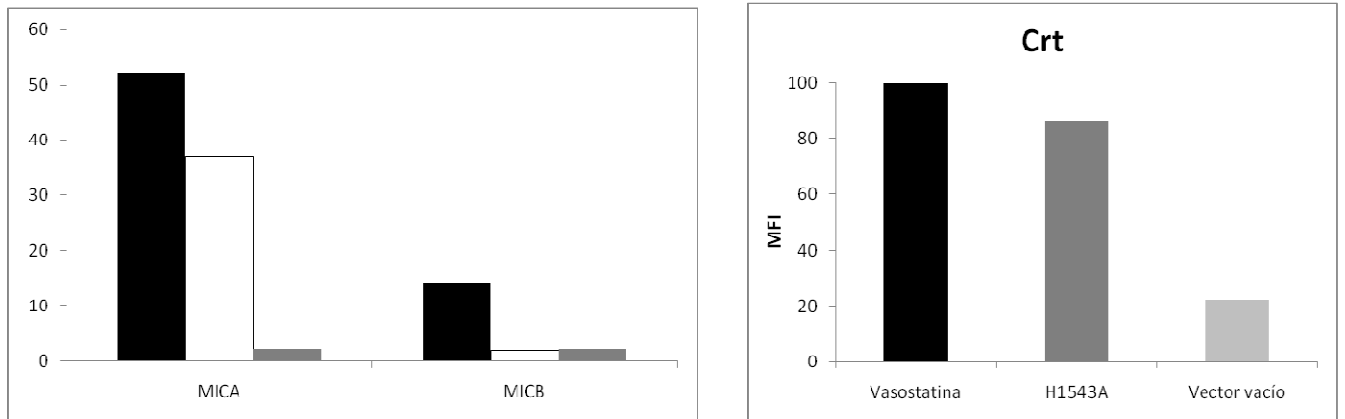


Figura 30. MFI de MICA, MICB y Crt en la superficie de las distintas poblaciones de células de HEK. Los gráficos representan la MFI detectada en un experimento de Citometría de Flujo para observar la expresión en superficie de MICA, MICB y Crt en las células HEK que sobreexpresan Vasostatina, mutantes H153A y células con el vector vacío. El valor de MFI correspondiente al Isotipo para cada condición ya fue considerado y restado (para más detalles ver Materiales y Métodos, sección 5).

7. DISCUSIÓN

En los últimos tres años el conocimiento respecto a los ligandos de activación de células NK ha tenido un aumento enorme, lo cual les ha ido otorgando un papel cada vez más importante en los mecanismos oncológicos de evasión tumoral. Especial énfasis se ha puesto en los ligandos del receptor de activación NKG2D, sobretodo en MICA y MICB, que son los que más se conocen, como candidatos seguros a ser una de las claves para explicar la evasión tumoral de la inmunovigilancia por parte de las células NK. Al respecto, recientemente se ha postulado que la retención intracelular de formas inmaduras de MICA, en células de melanoma, sería un mecanismo para evadir el ataque por parte de las células NK (Fuentes MB y cols. 2008). Es por esto, que el estudio de estos sistemas de retención podría dar pistas clarificadoras para poder llegar a entender los mecanismos mencionados en toda su dimensión.

7.1 *Distribución citoplasmática de MICA y MICB en células tumorales*

Como se mencionó con anterioridad, MICA y MICB se expresan en la superficie celular, principalmente, ante estímulos de estrés, infección viral o en células tumorales. Hasta la hora, las únicas células que estarían expresando estos ligandos de forma normal serían las epiteliales del intestino delgado. Esto, debido al continuo estrés producido por la flora bacteriana, lo cual, debido al ataque inmunológico, les permitiría una renovación constante.

Por estas razones, uno de nuestros primeros objetivos fue estudiar cómo era la distribución citoplasmática de MICA y MICB en las células de melanoma. Hemos observado una distribución principalmente en el interior del citoplasma, específicamente en el centro de la célula, rodeando al núcleo y en forma de pequeños gránulos o compartimentos (**Figura 10 y 12**). Esta distribución granular o compartimentalizada era esperable, si se toma en cuenta de que es muy probable de que gran cantidad de estos ligandos se encuentre distribuido entre el RE, el complejo de Golgi, entre otros compartimentos. Además, al analizar la presencia efectiva de los ligandos en el RE, se observó que estos se encontraban presentes en este organelo de manera importante (**Figura 13**), lo cual concuerda con lo señalado en la literatura (Fuentes MB y cols. 2008).

La distribución mayoritariamente interna de MICA y MICB no nos causó sorpresa debido a que, si bien estos ligandos activan a las células NK desde la superficie de las células blanco, se debe considerar el estado de avance del tumor y su “agresividad”. Es decir, entre más avanzado esté el tumor en su evolución, es más probable que vaya reteniendo estos ligandos en su interior de manera de poder ir escapando del ataque por parte de las células NK, y, por ende, en este caso, al tratarse de líneas tumorales metastásicas, es lógico pensar que el tumor tenga una distribución de MICA y MICB mayoritariamente interna.

Una de las inquietudes siguientes que nos planteamos, fue conocer qué tan similar sería la distribución celular entre MICA y MICB, ya que estos ligandos cuentan con un 80% de homología entre ellos. Además, por esta misma razón, nos preguntamos si la especificidad de los Acs. usados para detectarlos sería óptima, ya que cabía la posibilidad de que existiese reacción cruzada debido a su gran porcentaje de homología. Al conjugar ambos ligandos, en la misma célula, con fluoróforos distintos, observamos que, si bien, la distribución es bastante similar, existen zonas discretas en que no se superponen (**Figura 12**). Hasta el momento, los antecedentes indican que MICA y MICB tendrían funciones similares, lo cual es esperable por su grado de homología, y explicaría la gran similitud en su distribución. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que, si bien su función sea muy similar, su efecto activador sobre las células NK sea selectivo, es decir, que pudiesen ser ligandos activadores de subpoblaciones de células NK distintas. Lo anterior se sustenta en que en nuestro laboratorio hemos detectado diferencias en la distribución superficial de MICA y MICB en células de melanoma según en el contexto en que se encuentren, si se exponen a una u otra citoquina (Serrano AE y cols. 2009). Además, es poco probable que la evolución haya permitido la existencia de ligandos distintos que tengan siempre la misma función, ya que sería muy redundante. Por lo cual, quizás, las pequeñas diferencias que observamos en la distribución de los ligandos en las células de melanoma (**Figura 12**), junto con los antecedentes de nuestro laboratorio (Serrano AE y cols. 2009) estén dando algunas luces acerca de una diferencia en su funcionalidad. Por el momento estas son sólo suposiciones, por lo que creemos muy interesante que se siga ahondando al respecto, ya que tenemos la seguridad de que en el futuro se realizarán hallazgos que permitirán tener una mayor claridad con respecto a las funciones particulares de cada ligando.

7.2 Patrón de migración en geles de acrilamida de MICA y MICB proveniente de células de melanoma

Desde que se describió por primera vez, hasta la hora, MICA, siempre ha mostrado el mismo patrón de migración en geles de acrilamida, el cual corresponde a una sola banda con un tamaño de 60 kDa aproximadamente, lo mismo para MICB. Es por esto, que el resultado mostrado por la **Figura 22** una doble banda para MICA y MICB en un ensayo de IP, además de una tercera de bastante menor tamaño, nos llamó la atención. Al respecto, se descarta que la banda de menor PM, de la doble banda, corresponda a la cadena pesada de Inmunoglobulina, ya que esta se logra apreciar, con menor intensidad, justo por debajo de las 2 bandas de MICA y MICB (**Figura 22 a**). Además, esta banda de la cadena pesada también se logra distinguir, tal como debe ser, en los controles de isotipo, a la misma altura de la presente en MICA y MICB.

Tomando en cuenta la interacción entre Crt y los ligandos MICs (más detalles en punto **7.3**), y que Crt, por lo general, tiene como sustratos a ligandos glicosilados, se pensó que una de las 2 bandas vistas para MICA y MICB podría tratarse de una forma no glicosilada. Esto se sustentaba en que Crt se

une a la banda de MICA de menor PM, tal como se observa en la **Figura 22 (b)**, banda que podría haber correspondido a una forma glicosilada, y, por ende, la otra banda, una no glicosilada. Para comprobar esto, se realizó un control en el que se inhibió la glicosilación a las células de melanoma, proceso que fue hecho en condiciones fuertes, de manera de asegurar una inhibición total. De esta forma, si una de las dos bandas de MICA y MICB efectivamente correspondía a una forma no glicosilada, después de la inhibición, esta debería haber desaparecido. Sin embargo, tal como se aprecia en la figura, no se detectó ninguna diferencia relevante entre las bandas de las condiciones con y sin inhibición de la glicosilación, por lo que descartamos que la explicación de la doble banda vaya por este lado.

En la literatura no existen antecedentes que puedan explicar este patrón de migración, en que las bandas de MICA y MICB presenten una diferencia aproximada de 3 kDa entre ellas respectivamente. Sin embargo, el único antecedente, hasta la hora, que podría dar luces al respecto, es la existencia de un trabajo que reportó la existencia de 2 isoformas de MICA y MICB, las cuales, estaban separadas por una diferencia aproximada de 13 kDa. A partir de una línea de células de carcinoma de colon, los investigadores detectaron que había dos tipos de cDNA codificante para MICA y MICB, uno de 1161 bp y otro de 873 bp. Este último, correspondía a una secuencia que había perdido su exón N° 3. Al transfectar células de ovario de hámster chino, se encontró que ambas isoformas eran presentadas tanto en el citoplasma como en la superficie (Zou Y y cols. 2002). Además, recientemente se publicó una investigación en que caracterizan dos isoformas para un tipo de ULBP, que corresponde a otra familia de NKG2DL (Eagle RA y cols. 2009). A la luz de estos antecedentes, creemos que es probable que algún procesamiento, como un splicing u otro, de MICA y MICB, pueda ser la causal del patrón de migración de bandas que vemos tras realizar ensayos de IP, en células de melanoma. Si bien no existen antecedentes al respecto, no se debe dejar de lado el hecho de que en cáncer muchos procesos son alterados, por lo cual, cabe la posibilidad de que en nuestro modelo, melanoma metastásico humano, el procesamiento de estos ligandos sea a través de una vía algo distinta a lo normal. Además, a esto se le suma que el hallazgo del trabajo citado también fue realizado en células tumorales (Zou Y y cols. 2002).

Además de la doble banda para MICA y MICB detectada tras realizar un ensayo de IP, como muestra la **Figura 22**, se observó la presencia de una tercera banda de un tamaño aproximado de 23 kDa. Al respecto, tal como se mencionó anteriormente en los antecedentes (Sección 1), se ha reportado la existencia de sMICA y sMICB, los cuales, al ser liberados de la célula, provocan una disminución en los receptores NKG2D, y, por tanto, se cree que esto sería un mecanismo de evasión inmune. Considerando la amplia cantidad de reportes al respecto, creemos que esta tercera banda podría corresponder a una fracción soluble de MICA y MICB, ya que nos parece lógico pensar que este fenómeno, de secreción de sMIC, se esté también produciendo en nuestro modelo de melanoma metastásico. Junto con esto, el tamaño de esta tercera banda encontrada es relativamente cercano al

reportado para sMICA, de 36 kDa (Waldhauer I y cols. 2008) y de sMICB, que fue de 33 kDa aproximadamente (Salih HR y cols. 2006).

7.3 Interacción de Crt con los ligandos MICA y MICB

Crt es una chaperona muy importante en el RE, ya que juega un papel fundamental en la unión de Calcio y participa activamente, junto a otras chaperonas, en el proceso de plegado correcto de proteínas. Dado que entre las proteínas que son plegadas con la ayuda de Crt se encuentran los MHC-I (Paulsson 2001), es muy probable que también participe en el procesamiento de MICA y MICB, los cuales son codificados en el mismo HLA de los anteriores. Para comprobar si esto era efectivo, estudiamos el fenómeno por dos frentes: por IF, para estudiar su colocalización, y por IP, para ver su real interacción.

Por IF observamos que Crt efectivamente presenta un grado alto de colocalización con MICA y MICB, mostrando una distribución muy similar en la célula. Esto nos indica que es muy alta la probabilidad de que se esté produciendo una interacción entre Crt y estos ligandos, o que, al menos, se encuentren muy próximos (**Figura 15**). Cabe destacar que al igual que MICA y MICB (**Figura 14**), Crt también se encuentra presente en el núcleo (**Figura 15**), lo cual podría deberse a que, como se ha descrito en la literatura, cumple una función de ayuda en los cromosomas mitóticos, en donde asiste a las histonas en su enrollamiento (Kobayashi S y cols. 2006), por lo cual creemos que no es de extrañar que exista algún tipo de interacción entre Crt con MICA y MICB en esta zona. Para aclarar este fenómeno podría realizarse un fraccionamiento celular, y, con la fracción correspondiente al núcleo, realizar una IP de Crt y los ligandos. Además, si bien en la literatura no hay antecedentes al respecto, en otros trabajos, por ejemplo, también se logra observar la presencia de MICA en el núcleo por IF (Fuertes MB y cols. 2008).

La unión entre Crt y los ligandos se constató por IP, ya que el ensayo permite determinar que existe una interacción efectiva (**Figura 22 b**). Al inmunoprecipitar Crt y, posteriormente, revelar el WB con esta misma, se obtuvo una sola banda de un tamaño aproximado de entre 46-55 kDa, tal como se ha descrito en la literatura (Gelebart P y cols. 2005; Kobayashi S y cols. 2006). Luego, cuando realizamos un ensayo de IP para MICA y revelamos el WB con Crt, obtuvimos una sola banda correspondiente a Crt. Esto nos indica que MICA inmunoprecipita con Crt, por lo cual, efectivamente están interaccionando. Sin embargo, al realizar lo contrario, es decir, realizar un ensayo de IP con Crt y revelar el WB con MICA, obtenemos una sola banda, en vez de las dos esperables para MICA (para más detalles, revisar punto 7.2). Lo anterior, si bien nos confirma aún más la interacción Crt-MICA, ya que este resultado muestra que Crt inmunoprecipita con MICA, indicaría que Crt se une sólo a la banda de menor PM de MICA. En vista de lo tratado en el punto 7.2, este fenómeno no se debería a que la banda de menor PM de MICA corresponde a una forma glicosilada y la otra no, porque Crt prefiere este tipo de ligandos. Y, por tanto, si la doble banda mostrada por MICA se explica por la existencia de

isoformas distintas, es probable que la diferencia de unión a Crt pase por un tema de afinidad por una isoforma u otra. De ser así, probablemente, con un método más cualitativo podría observarse la unión de Crt a la banda de MICA de menor PM.

7.4 Interacción de MICA y MICB con el complejo de chaperonas Crt-Cnx-ERp57

Tal como se trató en los antecedentes (Sección 1), por lo general las chaperonas no actúan solas, y, en este sentido, Crt actúa dentro de un complejo formado con Cnx y ERp57, además de ATP y Calcio. Al respecto, mediante ensayo de IF, logramos detectar que MICA y MICB colocalizan con estas dos últimas chaperonas (**Figura 16 y 17**), y que, por tanto, podrían estar siendo ayudados en su plegamiento por el complejo citado, al igual como le sucede a los MHC-I (Williams 2006).

7.5 Importancia de Vasostatina en el procesamiento de MICA y MICB

Como se trató en los antecedentes (Sección 1), Vasostatina corresponde al fragmento N-terminal de Crt, el cual, se ha descrito, cumple la función de chaperona de la proteína. Específicamente, dentro de esta zona, es la Histidina 153 quien tiene la función clave de ser la fundamental para la formación del bolsillo en que entrará el sustrato (Guo L y cols. 2003).

En un trabajo que estudiaba un regulador de conductancia transmembranal (CFTR) implicado en la Fibrosis Quística, se observó que Crt regulaba en forma negativa la expresión de éste en la superficie celular. Al bloquear Crt mediante RNA de interferencia, se observó que aumentaba la expresión en superficie del CFTR. Y que al sobreexpresar Crt, se observaba en la superficie un aumento en la expresión de ésta y disminución en forma considerable de la expresión del CFTR. Esta disminución se debió a que la sobreexpresión de Crt incentivó la endocitosis de CFTR y su posterior degradación lisosomal. Además, al dejar a Crt sin su dominio C-terminal, se observó un aumento del efecto negativo sobre CFTR, por lo cual se dedujo que Crt podría estar actuando, en el compartimento post RE, como un regulador negativo de la expresión en superficie de CFTR (Harada K y cols. 2006). Por otra parte, como se comentó anteriormente (Sección 1), si bien Crt clásicamente ha sido reconocida como un inhibidor de la angiogénesis, una investigación demostró que al transfectar la Vasostatina en un tumor neuroendocrino, este, en vez de disminuir su tamaño como se esperaba, tuvo un aumento significativo (Liu M y cols. 2005).

La reconocida participación de Crt en el procesamiento de los MHC-I, familia de MICA y MICB, junto a los antecedentes mencionados, nos llevó a pensar que Crt podría ser la chaperona clave que acompañara a estos ligandos en su camino. Y que, por tanto, si alteráramos la expresión de Vasostatina, deberíamos haber podido observar un cambio en la expresión de MICA y MICB en la superficie de las células. Es por esto que procedimos a sobreexpresar y mutar Vasostatina, y, posteriormente, con estos productos, transfectar células HEK. Al analizar si por WB (**Figura 28**) podíamos detectar alguna diferencia entre las distintas células transfectadas (sobreexpresión de Vas,

mutantes y vector vacío), no observamos ningún cambio relevante. Al revelar con un Ac. policlonal anti Crt, esperábamos poder ver una banda, además de Crt, de aproximadamente 22.15 kDa, correspondiente a la Vasostatina que amplificamos. Creemos que el no poder detectar Vasostatina se debió a que, probablemente, utilizamos una cantidad muy baja de proteína para cargar el gel de Acrilamida, en relación a lo señalado en la literatura (Liu M y cols. 2005) o un Ac. que, quizás, no reconocía el epitopo presente en el dominio correspondiente a Vasostatina, por lo cual, se hubiese necesitado una cantidad mayor de este para el ensayo.

Si la Histidina 153 es efectivamente un aminoácido muy importante en la interacción de Crt y MICA y MICB, nosotros esperábamos ver que al sobreexpresarla se produjese un aumento en la interacción Vasostatina-ligando, y, por ende, esto llevarse a una mayor retención de MICA y MICB en el interior de la célula, lo que provocaría su disminución en superficie. Por otro lado, al mutar Vasostatina, se inhibiría la interacción con MICA y MICB, disminuyendo la retención de estos en el interior de la célula, con lo cual aumentaría su expresión en superficie. Tal como se observa en la **Figura 30**, pese a que es un único experimento, la tendencia de nuestros resultados estaría mostrando que estos discrepan de lo esperado. En transfectomas portadores del gen de Vasostatina se observa una tendencia al aumento de Crt. No se observa alguna tendencia de variación de MICA y MICB en ninguna de las condiciones. Al mutar la Histidina 153 por una Alanina (lo cual, según se explicó anteriormente, tiene el mismo efecto que una delección), también se observó una tendencia al aumento de Crt en comparación con las células transfectadas con el vector vacío.

Con respecto a Crt, es esperable que se haya observado esta tendencia al aumento en superficie en la primera condición ya que se está sobreexpresando. En el segundo caso, en que se cambió la Histidina 153 de Vasostatina por una Alanina, era esperable que se observase una tendencia a la disminución en superficie en comparación con la condición anterior. Esto se debe a que aproximaciones tridimensionales indican que mutarla en este sitio lleva a un cambio conformacional en Crt, porque este aminoácido, Histidina 153, está en un sector de “bolsillo” de unión a sustrato, entre las estructuras globular y de cola de Crt, y, al alterarlo, se produce una variación en el contenido de las hélices α y láminas β , provocando una disminución de sus sitios hidrofóbicos y haciéndose más susceptible a digestión por tripsina (Gelebart P y cols. 2005). El aumento de Crt que se observa en este grupo, con respecto a las células transfectadas con el vector vacío, probablemente se deba a que al realizar un análisis nos encontramos con distintas poblaciones celulares (datos no mostrados), lo cual puede estar interfiriendo en la lectura final que hace el Citómetro.

Al respecto, no creemos que esta tendencia de aumento de Crt, en la primera condición se deba a que sobreexpresamos Vasostatina sin adherirle la secuencia de destinación de RE propia de Crt (presente en el dominio C-terminal), y que esto haya provocado la no retención en el interior de la célula, ya que en el trabajo en que se estudió el regulador CFTR, citado anteriormente (Harada K y cols. 2006), en varias condiciones se trabajó sin esta secuencia, obteniendo los resultados antes mencionados.

Para conseguir un análisis más objetivo, se debería mejorar el proceso de selección de las células, además de realizar más citometrías de flujo, tanto para detectar señales superficiales como internas, y así tener un número adecuado de experimentos y condiciones que nos permitan realizar análisis que puedan tener alguna significancia estadística.

Un hecho que nos llamó bastante la atención fue la aparente contrariedad encontrada en los gráficos, al expresar la señal detectada de Crt en la superficie en el gráfico de MIF e histogramas (**Figura 30**). Ya que, por un lado, en el histograma se observa que las células que tienen el vector vacío presentan una mayor cantidad de Crt en superficie, seguidas por las mutantes H153A y las que sobreexpresan Vasostatina. Y, por el contrario, en el gráfico de MFI se observa una mayor señal para Crt en las células que sobreexpresan Vasostatina y las mutantes H153A, en comparación con las que tienen el vector vacío. Creemos que la explicación para esto se encuentra en los porcentajes de células positivas detectadas al medir la señal de PE, ya que, tal como se informa en los Resultados, el mayor es para las células que tiene el vector vacío, seguido de las mutantes H153A y las células que sobreexpresan Vasostatina. Lo cual, al interpretar los resultados en su conjunto, nos dice que, si bien, miradas en su totalidad, las células que tienen el vector vacío tienen una mayor expresión, en porcentaje, de Crt en superficie, éstas, en forma individual, poseen una menor expresión de ésta. Es decir, si bien el citómetro detecta que este grupo celular, en su conjunto, emite una mayor señal para PE, al analizar las células de forma individual, que es lo que muestra la MFI, su señal es baja en comparación con las células que sobreexpresan Vasostatina y H153A. Un fenómeno similar, pero en menor medida, ocurre también para este último grupo. Creemos que la causa de este fenómeno sería el hecho de que al analizar las células con las que trabajamos, nos encontramos con más de una población para las células que sobreexpresan Vasostatina (datos no mostrados). Esto se debe a que, tal como se aprecia en la **Figura 27**, el grupo celular de la línea que sobreexpresa Vasostatina cuenta con células que tienen el vector con el inserto y otras con un vector vacío. Estas últimas, creemos, es esperable que influyan a la hora de detectar la señal total del grupo de células, ya que, si bien, emitirán señal, dado que las células de melanoma poseen de por sí Crt en su superficie, ésta será menor que las que sí tienen el inserto, y, por ende, como son dos poblaciones, el equipo detectará una señal global de similar intensidad que las líneas celulares que hemos utilizado como control (condición de vector vacío), ya que este grupo, si bien, individualmente, tiene una menor señal de PE, posee una población más definida y unificada (datos no mostrados).

Tal como muestran los resultados, MICA y MICB colocalizan con Crt (**Figura 15**) y con otras moléculas chaperonas (**Figura 16 y 17**), posiblemente dentro del complejo Crt-Cnx-ERp57. Por lo tanto, si bien podemos tener la certeza de la existencia de esta interacción, no podemos asegurar, con los resultados que tenemos hasta ahora, que esto se deba principalmente a la Histidina 153 de Vasostatina.

Lo anterior se sustenta en que, hasta la hora, no hay certeza de cómo es exactamente el procesamiento de este tipo de moléculas. En el caso de los MHC-I no se sabe cómo es el orden de unión de éstos con las chaperonas del complejo al ensamblarse. En este sentido, recientemente ha

sido publicado un importante antecedente al respecto, el cual puede dar algunas luces en el fenómeno que estamos estudiando, dada la cercanía de los MHC-I con MICA y MICB. En esta publicación se estudió el grado de participación de Cnx y Crt en la formación de puentes disulfuro por parte de ERp57 en el procesamiento de los MHC-I. Este trabajo demostró que ERp57 no necesitaba de Cnx y Crt para procesar a los MHC-I, ya que la tasa de procesamiento no variaba en ausencia de éstas. Usando mutantes en que ERp57 no se unía o tenía una baja afinidad por Cnx y Crt, se observó que el procesamiento de la cadena pesada ocurría en forma similar al de las células WT. Además, ERp57 interactuaba con Tapasina y promovía que los péptidos se cargaran correctamente en los MHC-I en ausencia de interacciones con Cnx y Crt (Zhang Y y cols. 2009).

Finalmente, a estos antecedentes se suma un trabajo que estudió si existían variaciones de Cnx y Crt en cultivos primarios y lesiones de melanoma metastásico. Como resultado se obtuvo que mientras Crt se encontraba presente en todos los estados de progresión del melanoma, Cnx disminuía en las lesiones de melanoma metastásico en comparación con los cultivos primarios (Dissemond J y cols. 2004).

A la luz de los antecedentes y los nuestros podríamos decir que, si bien Crt se une a MICA y MICB, y puede que afecte la velocidad de su procesamiento, probablemente la chaperona “clave” sea otra y, en futuras investigaciones, deba apuntarse a Cnx y/o ERp57.

7.6 Función de IL-10 en la movilidad de MICA y MICB en las células de melanoma

Tal como se trató en los antecedentes (Sección 1), se ha planteado que las citoquinas tendrían una influencia muy importante en el grado de expresión de MICA y MICB en la superficie celular. En el embarazo se ha detectado la expresión de sMICA y sMICB y que su interacción con NKG2D disminuiría con el paso del tiempo de la gestación (Mincheva-Nilsson L y cols. 2006). Además, se ha registrado un aumento de IL-10 importante en el primer trimestre y que disminuye hacia el final del embarazo (Hanna N y cols. 2000). Junto con esto, en nuestro laboratorio se observó que células transfectadas con un vector retroviral que produce IL-10 experimentaron una disminución de MICA en su superficie (Serrano AE y cols. 2009). Dados estos antecedentes quisimos ver si era posible detectar por IF algún cambio en la ubicación citoplasmática de MICA y MICB, ya que, si nuestra hipótesis es correcta, al aumentar IL-10 MICA, al menos, debería permanecer principalmente en el interior de la célula, y, contrariamente, al disminuir IL-10, debería aumentar su expresión en superficie. Nuestros resultados mostraron que, por la técnica de IF, no fue posible detectar algún cambio relevante en células transfectadas con el vector viral que produce IL-10 (**Figura 18**), ni en células a las que se les agregó esta citoquina en forma exógena (**Figura 19**). Creemos que esto se debió principalmente a la sensibilidad de la técnica, ya que resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que mediante Citometría de Flujo sí fue posible detectar cambios importantes (Serrano AE y cols. 2009).

El único cambio que logramos detectar fue al comparar células que tenían uno o dos días de cultivo, mostrando las primeras mayor presencia de MICA y MICB en su superficie, mientras que en las segundas, el predominio era en su interior. Dado que MICA y MICB son ligandos que se expresan en situaciones de estrés, y, además, tomando en cuenta que entre mayor sea el tiempo de cultivo, más adaptada estará la célula a su entorno, y, por ende menos estresada, nos parece lógico pensar que las células que llevaban un día de cultivo tuviesen mayor expresión de los ligandos en su superficie en comparación con las de dos días. Además, estas células de melanoma son, por sí, secretoras de IL-10, y, por tanto, mientras mayor sea su tiempo de cultivo, más será la cantidad de esta citoquina que se acumule en el medio, por ende, esto también debería haber influido en la distribución de MICA y MICB hallada, lo cual se condice con los antecedentes de nuestro laboratorio (Serrano AE y cols. 2009).

Finalmente, a modo de síntesis, tal como ilustra la **Figura 31**, con nuestros antecedentes y resultados podemos decir que Crt interacciona directamente con MICA y MICB, y que el procesamiento de estos ligandos se realiza probablemente dentro del complejo de chaperonas Cnx-Crt-ERp57. Se necesitan realizar más experimentos con el fin de establecer, con propiedad, si Crt es o no una de las participantes claves en el proceso, y si IL-10, tal como planteamos en nuestra hipótesis, estaría potenciando la interacción de esta chaperona con los MICs. De esta forma, se podría esclarecer si esta interacción, Crt-MICA y MICB, podría llegar a ser un mecanismo de retención de los ligandos, por el cual la célula de melanoma estaría evadiendo a las NK.

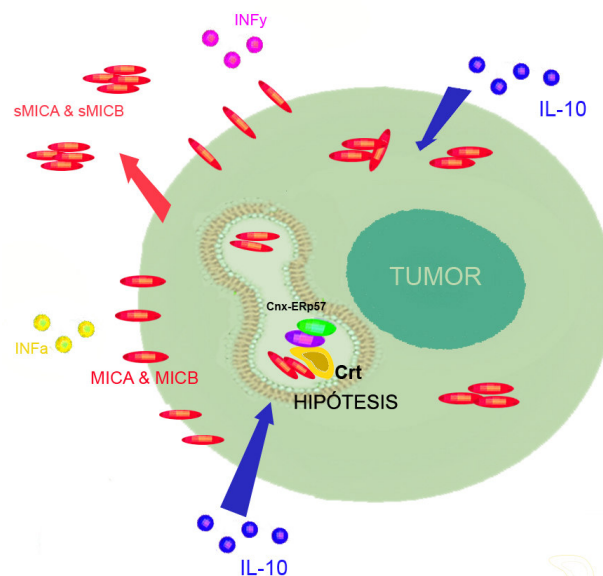


Figura 31. Mecanismos oncológicos de evasión inmune para MICA y MICB. Modelo ilustrativo de los mecanismos de evasión tumoral conocidos, que involucran una disminución (por efecto de citoquinas, como IL-10 o INF γ , y retención intracelular) o liberación de los ligandos MICA y MICB desde la superficie. La figura muestra también la hipótesis planteada en este trabajo, acerca de que Crt estaría reteniendo a los ligandos MICs como forma de evasión de la vigilancia por parte de las células NK, lo que sería potenciado por IL-10.

8. CONCLUSIONES

- MICA y MICB se encuentran agrupados, en el interior de las células de melanoma, preferentemente en el RE. Además, ambos ligandos se encuentran presentes en el núcleo.
- Mediante IP se observa que MICA y MICB tienen un patrón de migración de doble banda, además de una tercera banda de bastante menor tamaño. Esta última podría tratarse de sMIC, que podría estar siendo generado en el interior de la célula como forma complementaria al liberado desde la superficie por efecto de metaloproteinasas.
- Crt interactúa con MICA y MICB en el interior de las células de melanoma, interacción que también se produce en el núcleo. Al realizar un ensayo de IP, se detecta que Crt inmunoprecipita con la segunda banda de menor PM de MICA.
- MICA y MICB interactúan con ERp57 y Cnx, por lo cual la interacción con Crt se produce probablemente dentro del complejo de chaperonas Cnx-Cnx-ERp57.
- Por IF no se detecta que IL-10 afecte la distribución celular de MICA y MICB.

9. BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2007). "Cellular and Molecular Immunology." **6th Ed**: 19-46.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**: 633-640.

Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis." J Biol Chem **252**(3):1102-6.

Coppolino MG, Dedhar S. (1998). "Calreticulin." Int J of Biochem Cell Biol **30**: 553-558.

Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (1994) "Currents Protocols in Immunology." **4th Ed**. Units 5.3, 8.3, 10.2 and 21.3,

de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. (2006). "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nat Rev **6**: 24-37.

Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." Nature **413**(6852): 165-171.

Diefenbach A, Raulet DH. (1999). "Natural killer cells: stress out, turn on, tune in." Curr Biol **9**(22): 851-853.

Dissemond J, Busch M, Kothen T, Mörs J, Weimann TK, Lindeke A, Goos M, Wagner SN (2004). "Differential downregulation of endoplasmic reticulum-residing chaperones calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma." Cancer Lett **203**(2): 225-31.

Eagle RA, Flack G, Warford A, Martínez-Borra J, Jafferji I, Traherne JA, Ohashi M, Boyle LH, Barrow AD, Caillat Zucman S, Young NT, Trowsdale J (2009). "Cellular Expression, Trafficking, and Function of Two Isoforms of Human ULBP5/RAET1G." PLoS ONE **4**(2): 4503.

Ebert EC, Groh V. (2008). "Dissection of spontaneous cytotoxicity by human intestinal intraepithelial lymphocytes: MIC on colon cancer triggers NKG2D-mediated lysis through Fas ligand." Immunology **124**(1): 33-41.

Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A (2005). "Does Trypanosoma cruzi calreticulin modulate the complement system and angiogenesis?." TRENDS in Parasitology **21**(4): 169-174.

Friese MA, Platten M, Lutz SZ, Naumann U, Aulwurm S, Bischof F, Bühring HJ, Dichgans J, Rammensee HG, Steinle A, Weller M (2003). "MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas." Cancer Res **63**(24): 8996-9006.

Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM, Mordoh J, Rabinovich GA, Zwirner NW (2008). "Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity." J Immunol **180**(7): 4606-14.

Gelebart P, Opas M, Michalak M (2005). "Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum." Int J Biochem Cell Biol **37**: 260-266.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-738.

- Guo L, Groenendyk J, Papp S, Dabrowska M, Knoblach B, Kay C, Parker JM, Opas M, Michalak M (2003). "Identification of an N-domain Histidine Essential for Chaperone Function in Calreticulin." J Biol Chem **278**(50): 50645-50653.
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S (2000). "Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts." J Immunol **164**(11): 5721-5728.
- Harada K, Okiyonedo T, Hashimoto Y, Ueno K, Nakamura K, Yamahira K, Sugahara T, Shuto T, Wada I, Suico MA, and Kai H (2006). "Calreticulin Negatively Regulates the Cell Surface Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator." J Biol Chem **281**(18): 12841-12848.
- Harwood AJ (1994). "Protocols for Gene Analysis." Ed. Humana Press 108-109.
- Horton, R. (1995). "PCR-mediated recombination and mutagenesis: SOEing together tailor-made genes." Mol Biotechnol **3**(2): 93-9.
- Medina E, Kaempffer AM. (2001). "Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations." Rev Med Chil **129**(10): 1195-1202.
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-678.
- Kiessling R, Klein E, and Wigzell H (1975). "Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." Eur J Immunol **5**: 112-117.
- Kobayashi S, Uchiyama S, Sone T, Noda M, Lin L, Mizuno H, Matsunaga S, Fukui K (2006). "Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes." Cytogenet Genome Res **115**: 10-15.
- Lanier, L. (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." Nat Immunol **5**: 495-502.
- Li L, Yuan YZ, Lu J, Xia L, Zhu Y, Zhang YP, Qiao MM (2005). "Treatment of pancreatic carcinoma by adenoviral mediated gene transfer of vasostatin in mice." Gut **55**(2): 259-565.
- Liu M, Imam H, Oberg K, Zhou Y (2005). "Gene Transfer of Vasostatin, a Calreticulin Fragment, into Neuroendocrine Tumor Cells Results in Enhanced Malignant Behavior." Neuroendocrinology **82**(1): 1-10.
- Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, Hernestål J, Baranov V (2006). "Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival." J Immunol **176**(6): 3585-3592.
- Mistry AR, O'Callaghan CA. (2007). "Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D." Immunology **121**(4): 439-447.
- Nausch N, Cerwenka A. (2008). "NKG2D ligands in tumor immunity." Oncogene **27**(45): 5944-5958.
- Ni M, Lee AS. (2007). "ER chaperones in mammalian development and human diseases." FEBS Lett **581**(19): 3641-3651.
- Paulsson, K. (2001). "Distinct differences in association of MHC class I with endoplasmic reticulum proteins in wild-type, and beta 2-microglobulin- and TAP-deficient cell lines." Int Immunol **13**(8): 1063-73.

Petersson M, Charo J, Salazar-Onfray F, Noffz G, Mohaupt M, Qin Z, Klein G, Blankenstein T, Kiessling R. (1998). "Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1." J Immunol **161**(5): 2099-105.

Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G (1998). "Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth." J Exp Med **188**: 2349-2356.

Raulet, D. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol **3**(10): 781-790.

Salih HR, Goehlsdorf D, and Steinle A (2006). "Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients." Human Immunology **67**: 188-195.

Serrano AE, Menares-Castillo. E., Garrido-Tapia M, Hernández C, Gatica-Andrades M, Valenzuela R, Zúñiga R, López MN, Salazar-Onfray F, Aguillón JC and Molina MC (2009). "IL-10 Module Differentially MICA And MICB Expression In Melanoma Cell Lines." (enviado a Eur J Immunol).

Sutherland CL, Chalupny N, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, and Cosman D (2002). "UL16-Binding Proteins, Novel MHC Class I-Related Proteins, Bind to NKG2D and Activate Multiple Signaling Pathways in Primary NK Cells." J Immunol **168**: 671-679.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Vetter CS, Lieb W, Bröcker EB, Becker JC (2004). "Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma." Br J Cancer **91**(8): 1495-1499.

Vivier E, Tomasello E, Myriam Baratin, Thierry Walzer and Sophie Ugolini (2008). "Functions of natural killer cells." Nat Immunol **9** (5): 503-510.

Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Rammensee HG, Steinle A (2008). "Tumor-Associated MICA is Shed by ADAM Proteases." Cancer Res **68**(15): 6368-6376.

Williams, D. (2006). "Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **119**(4): 615-623.

Wu JC, Liang ZQ, Qin ZH (2006). "Quality Control System of the Endoplasmic Reticulum and Related Diseases." Acta Biochem Biophys Sin **38**(4): 219-226.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, Cocco L, Vitale M (2007). "NK cells and cancer." J Immunol **178**: 4011-4016.

Zhang C, Niu J, Zhang J, Wang Y, Zhou Z, Zhang J, Tian Z (2008). "Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors." Cancer Sci **99**(6): 1279-1286.

Zhang Y, Kozlov G, Pocanschi CL, Brockmeier U, Ireland BS, Maattanen P, Howe Ch, Elliott T, Gehring K, Williams DB (2009). "ERp57 does not require interactions with Calnexin and Calreticulin to promote assembly of class I Histocompatibility Molecules and it enhances peptide loading independently of its redox activity." J Biol Chem: JBC Papers in Press.

Zou Y, Stastny P. (2002). "Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells." Immunogenetics **54**: 671-674.

Zwirner NW, Fernández.-Viña MA., Stastny P (1998). "MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes." Immunogenetics **47**(2): 139-148.