



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Área de Inmunología

Dpto. de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

**“Estudio del papel de HVEM y su interacción con
BTLA y CD160 en la progresión del linfoma de
células B”**

Autora: Dña. Carla Yago-Díez de Juan

Programa de Doctorado: Biología Molecular y Biotecnología

Directores:

Dr. Jose Ignacio Rodríguez Barbosa

Dra. María Luisa del Río González

León, 2018



universidad
de león

INFORME DEL TUTOR

El **Dr. D. Félix Busto Ortiz** como Tutor de la Tesis Doctoral titulada “Estudio del papel de HVEM y su interacción con BTLA y CD160 en la progresión del linfoma de células B” realizada por Dña. Carla Yago-Díez de Juan en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, regulado por el R.D. 99/2011, de 28 de enero, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a de septiembre de 2018

Fdo. Dr. D. Félix Busto Ortiz



universidad
de león

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El **Dr. D. Jose Ignacio Rodríguez Barbosa** y la **Dra. Dña. María Luisa del Río González** como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Estudio del papel de HVEM y su interacción con BTLA y CD160 en la progresión del linfoma de células B” realizada por Dña. Carla Yago-Díez de Juan en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, en León a de septiembre de 2018

Fdo.

Dr. D. Jose Ignacio Rodríguez Barbosa

Fdo.

Dra. Dña. María Luisa del Río González



universidad
de león

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

La Comisión Académica del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, en su reunión celebrada el día de de ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Estudio del papel de HVEM y su interacción con BTLA y CD160 en la progresión del linfoma de células B”, dirigida por el Dr. D. Jose Ignacio Rodríguez Barbosa y la Dra. Dña. María Luisa del Río González, elaborada por Dña. Carla Yago-Díez de Juan y cuyo título en inglés es el siguiente “Study of the role of HVEM and its interaction with BTLA and CD160 in tumor progression of B-cell lymphoma”.

Lo que firmo, en León a de de 2018.

El Secretario,

Fdo.:

Vº Bº

Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.:

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar agradeciendo a mis directores, el Dr. Jose Ignacio Rodríguez Barbosa y la Dra. María Luisa del Río González, y al Dr. Félix Busto Ortiz, como tutor, por haberme brindado la gran oportunidad de aprender y desarrollarme como investigadora en su laboratorio del Área de Inmunología. Les agradezco muchísimo todos los conocimientos que me han transmitido y la ayuda que me han brindado en todo momento, además de todos los recursos materiales que han puesto a mi disposición para la realización de mi trabajo de tesis doctoral, financiados a través de los siguientes proyectos: Consejería de Educación, Junta de Castilla y León, Referencia LE093U13, Consejería de Sanidad. Gerencia Regional de Salud de Castilla y León. Referencia BIO/LE01/15, y Gerencia Regional de Salud de Castilla y León. Proyectos de Biomedicina, Modalidad A: Atención especializada y emergencias sanitarias. Referencia GRS 1142/A/15.

Agradecer también a la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo por haberme concedido la beca predoctoral: “Ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador cofinanciadas por el Fondo Social Europeo” (ORDEN EDU/310/2015, de 10 de abril) (Programa operativo FSE Castilla y León 2014-2020. Actuación cofinanciada por el Fondo Social Europeo) para la realización de mi tesis doctoral.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por todos los momentos compartidos, los buenos y los no tan buenos, por las risas, los llantos... ¡por todo! A los que ya no están: Ana, que ha creado una familia con René y el pequeño Leo (¡qué guapo es! y listo como sus papás), Fernando, Natalia y Vita (tenemos pendiente un viaje a Italia). A las que aún comparten laboratorio conmigo: las dos Irenes, María y Alexia. Qué haría yo sin las tardes de salir a tomar algo, las cenas en casa de Irene,... y todavía nos quedan planes pendientes.

Gracias a mi pareja, Jose, al que conocí en este mismo laboratorio. Muchas gracias por apoyarme en todo momento, por escucharme y entenderme, en definitiva por estar ahí siempre.

Muchas a gracias a mi tío Gelín, por ser tan generoso y haberme dejado su coche para ir y venir del laboratorio. A mi primo Sergio, por las largas conversaciones por teléfono, por ayudarme a tomarme las cosas con humor (siempre sabes qué decirme para hacerme reír)... ¡no sé qué hubiera hecho sin esos momentos!

Agradecer a mi madre por ser mi apoyo incondicional, por ser la que mejor me entiende, incluso sin decir nada. Muchas gracias por sostenerme cuando he flaqueado, por haberme transmitido unos principios que creo me han servido de mucho, y por acompañarme siempre.

En definitiva, muchas gracias a toda mi familia (mis tíos Ramón y Laura, mi tía Nati, mi primo Guillermin...) porque todos han contribuido a ser la persona que soy.

¡¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS!!!

A mi familia y mi novio

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Tumores hematopoyéticos. Los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria antitumoral	6
1.1.1. Inmunovigilancia frente al cáncer. Antígenos específicos de tumor (TSAs) y antígenos asociados a tumor (TAAs)	6
1.1.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria antitumoral	12
1.1.2.1. Inmunoeedición del cáncer	12
1.1.3. Clasificación de los linfomas y mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en linfomas	15
1.1.3.1. Etapas del desarrollo y diferenciación de las células B. Origen del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)	16
1.1.3.2. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)	21
1.1.3.3. Mecanismos de escape de los linfomas a la respuesta inmunitaria antitumoral	22
1.1.4. Línea celular A20 de linfoma B murino de non-Hodgkin	28
1.1.4.1. Origen y características fenotípicas de la línea celular trasplantable de linfoma B murino A20 y su desarrollo tumoral	29
1.2. Respuesta inmunitaria antitumoral	30
1.2.1. Tipos de respuesta inmunitaria: humoral y celular	31
1.2.1.1. Respuesta inmunitaria humoral	31
1.2.1.2. Respuesta inmunitaria celular	35
1.2.2. Elaboración de la respuesta inmunitaria antitumoral: paradigma de las tres señales	40
1.2.3. <i>Immune checkpoints</i> y el paradigma terapéutico de la interacción PDL-1/PD-1/CD80	44

1.2.4. Receptor TNFRSF14 (HVEM) como molécula diana para potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral	48
1.2.4.1. HVEM y sus ligandos. Patrones de expresión	48
1.2.4.2. Inmunobiología de la vía de interacción HVEM/LIGHT y HVEM-BTLA/CD160: regulación bidireccional de la activación de las células T y de las células NK y NKT	51
1.2.4.3. Función inhibitoria dominante de HVEM como potencial diana terapéutica en la inmunidad antitumoral frente al linfoma B de non-Hodgkin	56
1.2.4.4. Perspectivas terapéuticas en el contexto de los linfomas y la vía de interacción HVEM/BTLA/CD160/LIGHT	58
1.3. Sistema de edición del genoma: CRISPR-Cas	59
1.3.1. Descubrimiento y fundamento de la tecnología CRISPR-Cas	60
1.3.2. Sistema CRISPR de tipo II: endonucleasa Cas9	63
1.3.3. Comparación del sistema CRISPR-Cas con otras tecnologías de edición del genoma	65
1.3.4. Especificidad de la nucleasa Cas9: fenómeno <i>off-target</i>	67
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	70
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	74
3.1. Cepas bacterianas, medios de cultivo y transformación bacteriana	74
3.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	74
3.1.2. Transformación bacteriana por choque térmico	76
3.2. Biología molecular	77
3.2.1. Plásmidos utilizados en este estudio	77
3.2.2. Extracción de plásmido mediante lisis alcalina	83
3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	83
3.2.4. Purificación de bandas de DNA en gel de agarosa	84
3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR	84
3.2.6. Diseño de las secuencias de los sgRNA guías para su clonaje en los vectores de expresión lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657	87
3.2.7. Anillamiento, fosforilación de oligos de la guía y comprobación de los oligos dúplex en gel de agarosa	89
3.2.8. Digestión con enzimas de restricción	90

3.2.9. Defosforilación de los plásmidos lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657	91
3.2.10. Ligación del vector plasmídico y los oligos DNA anillados	91
3.2.11. Tratamiento con DNAsa dependiente de ATP	92
3.2.12. Extracción de DNA genómico	93
3.2.12.1. Extracción de DNA mediante lisis bacteriana por calor	93
3.2.12.2. Extracción de DNA genómico utilizando el kit <i>speedtools DNA extraction</i> (Biotools)	94
3.2.13. Análisis de la actividad <i>off-target</i> del sistema CRISPR-Cas9	94
3.2.14. Secuenciación	95
3.3. Cultivos celulares	96
3.3.1. Líneas celulares y recuento celular	96
3.3.2. Reactivos y medios	97
3.3.3. Expresión transitoria de los genes de interés	97
3.3.3.1. Transfección mediante lipofección	97
3.3.3.2. Transfección mediante electroporación	98
3.3.4. Expresión estable usando vectores lentivirales	99
3.3.4.1. Componentes de los sistemas lentivirales	100
3.3.4.2. Empaquetamiento y producción de las partículas lentivirales	100
3.3.4.3. Concentración por ultracentrifugación de las partículas lentivirales y titulación para determinar la concentración vírica óptima de infección. Procedimiento de infección mediante <i>espinoculación</i>	101
3.3.5. Clonaje de las células transfectadas o transducidas	104
3.4. Análisis de la eficacia de la edición del genoma por el sistema CRISPR-Cas9 mediante el ensayo de la T7 endonucleasa	104
3.5. Análisis de la eficacia de la edición del genoma por el sistema CRISPR-Cas9 mediante el uso del vector pRR-eGFP	106
3.6. Cálculo de la tasa de duplicación de la línea celular de linfoma B murino A20	108
3.7. Citometría de flujo	109
3.7.1. Características fenotípicas obtenidas mediante citometría de flujo de las líneas celulares A20 WT, A20 GFP ⁺ , A20 GFP ⁺ Cas9 ⁺ y A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-}	110

3.7.2. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína fluorescente GFP	110
3.7.3. Análisis por citometría de flujo de la sangre, los órganos linfoides y los nódulos tumorales del hígado	111
3.8. Caracterización de las mutaciones producidas por el sistema CRISPR-Cas9	112
3.9. Modelo animal de linfoma B murino A20	112
3.9.1. Inoculación de células tumorales y seguimiento de la progresión tumoral	112
3.9.2. Procesamiento de los órganos linfoides y de los nódulos tumorales del hígado	113
3.9.3. Histología clásica	113
3.10. Análisis estadísticos	113
4. RESULTADOS	116
4.1. La línea de linfoma B murino A20 expresa los ligandos HVEM y PD-L1 para los receptores co-inhibidores BTLA/CD160 y PD-1 expresados en células T, respectivamente	116
4.2. Transducción estable del gen codificante de la proteína fluorescente GFP mediante un vector lentiviral en la línea celular A20. Trazabilidad <i>in vivo</i> del crecimiento tumoral en ratones singénicos Balb/c	117
4.3. Generación de una línea A20 HVEM deficiente mediante el sistema CRISPR-Cas9	118
4.3.1. Construcción de los vectores lentiCRISPRv2 con sgRNA guías diseñados sobre el exón 1 del gen HVEM	118
4.3.2. Patrón de corte del ensayo T7/EI endonucleasa para los distintos sgRNAs tras su acción mediada por Cas9 sobre HVEM en células eucariotas	121
4.4. Sistema pRR-eGFP. La reparación de la expresión de la proteína GFP mediante recombinación homóloga tras la acción de los distintos sgRNAs guías muestra eficacias de corte similares	124
4.4.1. Clonaje de los diferentes sgRNAs (1, 3, 6 y 13) en el vector de expresión sgRNA-tagRFP567	124
4.4.2. Clonaje del dominio extracelular (ECD) de HVEM en el vector pRR-eGFP	124
4.4.3. Los niveles de expresión de la proteína eGFP reparada tras el corte específico en la secuencia diana de mHVEM por los diferentes sgRNAs son similares	126

4.5. Selección de la guía sgRNA_1 por presentar menor probabilidad de <i>off-targeting</i>	127
4.6. Transducción estable del gen Cas9 en la línea celular A20 GFP⁺	128
4.7. Generación de una línea celular A20 GFP⁺ deficiente en HVEM	129
4.7.1. Pérdida de la expresión de HVEM en la línea A20 GFP ⁺ tras la electroporación con un plásmido codificante para la endonucleasa Cas9 y la guía sgRNA_1 para HVEM murino	129
4.7.1.1. Dos tipos de mutaciones en forma de delección determinan la pérdida completa del exón 1 de HVEM	129
4.7.1.2. Las células A20 GFP electroporadas con el sistema CRISPR-Cas9 y el sgRNA_1 (clones 1F1 y 4D10), presentan la forma truncada de 100 pb de HVEM y no presentan la nucleasa Cas9 integrada en su genoma	131
4.7.1.3. La delección completa del exón 1 de HVEM por el sistema CRISPR-Cas9-sgRNA_1 tiene como resultado la pérdida de la expresión del péptido señal	132
4.7.1.4. La delección de la secuencia codificante para el péptido señal de HVEM por la acción del sistema CRISPR-Cas9-sgRNA_1 impide la expresión en membrana de la proteína en las células tumorales A20 GFP ⁺	133
4.8. Las secuencias con mayor probabilidad de <i>off-targeting</i> por acción del sgRNA_1 no han sido modificadas por el sistema CRISPR-Cas9	134
4.9. Patrón de expresión de moléculas de superficie con función reguladora negativa de las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9 (1D5) y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1)	137
4.10. Patrón de expresión de moléculas de superficie (receptores, moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión) con diversas funciones en las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9 (1D5) y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1)	139
4.11. La línea tumoral A20 GFP⁺ deficiente para la expresión de HVEM presenta la misma tasa de duplicación en cultivo que la línea A20 GFP⁺ WT	143
4.12. Estudio en un modelo de linfoma B murino de la progresión tumoral de la línea A20 GFP⁺ HVEM deficiente en comparación con la línea A20 GFP⁺ WT	144
4.12.1. Cinética de implantación del tumor A20 GFP ⁺ WT y HVEM deficiente en los órganos linfoides primarios y secundarios	144

4.12.1.1. La pérdida de expresión de HVEM en las células tumorales A20 GFP ⁺ no provoca cambios en el patrón metastásico del linfoma en el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea _____	144
4.12.1.2. La colonización tumoral del timo en los estadios más avanzados de la progresión del tumor promueve un incremento en el número de células B endógenas _____	145
4.12.2. Cinética de expresión de BTLA y HVEM por las células T CD8 ⁺ , T CD4 ⁺ , y células B presentes en los órganos linfoides primarios y secundarios y en los nódulos tumorales del hígado _____	147
4.13. La pérdida de expresión de HVEM en el tumor A20 GFP⁺ altera el reclutamiento de las células del sistema inmunitario a los nódulos tumorales del hígado _____	149
4.14. La distribución de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} en los nódulos tumorales del hígado sigue un patrón nodular, en cambio las células A20 GFP⁺ WT presentan una distribución más difusa _____	155
4.15. La infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ en los nódulos linfáticos desplaza y comprime los folículos de células B _____	157
4.16. Histología de la infiltración de células tumorales A20 en el bazo y en el timo _____	158
5.- DISCUSIÓN _____	162
5.1. El linfoma B murino A20 es un tumor de células B inmaduras indiferenciadas _____	162
5.2. La pérdida de expresión de PD-1 en el tumor A20 de las células B podría ser un factor pro-oncogénico como se ha demostrado en las células T _____	164
5.3. La pérdida de la secuencia codificante del péptido señal del gen HVEM es suficiente para impedir la expresión en membrana de la proteína HVEM en el tumor A20 GFP⁺ _____	165
5.4. El sistema pRR-eGFP y el ensayo T7 endonucleasa I muestran una eficacia de corte similar de los diferentes sgRNA guías diseñados _____	166
5.5. La selección de la secuencia guía sgRNA_1 y la expresión transitoria del sistema CRISPR-Cas9 en el tumor A20 GFP⁺ reducen la probabilidad de <i>off-target</i> _____	168
5.6. La expresión estable de Cas9 en la línea A20 permitiría el estudio de la posible	

respuesta inmunitaria <i>in vivo</i> frente a Cas9 y la eliminación simultánea de varios genes utilizando únicamente los sgRNA guías _____	169
5.7. Modulación de la expresión de CD40 en la línea A20 en respuesta a la transducción con Cas9 _____	170
5.8. La ausencia de HVEM en la membrana del tumor A20 condiciona la expresión normal de BTLA, al impedir la formación del complejo <i>cis</i> HVEM-BTLA de membrana _____	172
5.9. Las células A20 GFP ⁺ WT y A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} exhiben la misma tasa de duplicación en cultivo _____	172
5.10. La pérdida de expresión de HVEM por las células A20 GFP ⁺ no provoca cambios en el patrón metastásico de diseminación del tumor en los órganos hematopoyéticos _____	173
5.11. La progresión y diseminación tumoral promueve la linfopoyesis de células B residentes del timo y la colonización del timo por parte del tumor A20 GFP ⁺ en los estadios más avanzados de la enfermedad _____	174
5.12. La ausencia de expresión de HVEM en el tumor limita la infiltración de leucocitos en los nódulos tumorales hepáticos _____	176
5.12.1. Interacción HVEM-BTLA en <i>cis</i> en las células de tumor A20 como mecanismo intrínseco de regulación de su activación y proliferación _____	177
5.12.2. La interacción HVEM-BTLA en <i>trans</i> como mecanismo de inhibición de las células T efectoras _____	180
5.12.3. Perspectivas futuras _____	181
6.- CONCLUSIONES _____	184
7.- BIBLIOGRAFÍA _____	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El IFN- γ es secretado por las células NK como mecanismo de acción antitumoral. __	7
Figura 2. Las tres fases del proceso de inmunoección del cáncer. _____	15
Figura 3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) de los linfomas _____	16
Figura 4. Desarrollo de las células B. _____	18
Figura 5. Células B maduras: células B1 innatas y células B2 adaptativas convencionales. __	20
Figura 6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en linfomas _____	28
Figura 7. Respuesta inmunitaria humoral. _____	34
Figura 8. Respuesta inmunitaria celular _____	40
Figura 9. Paradigma de las tres señales I. _____	43
Figura 10. Paradigma de las tres señales II. _____	43
Figura 11. Estructura molecular de HVEM y sus ligandos. _____	50
Figura 12. Interacción en la configuración <i>cis</i> BTLA/CD160-HVEM. _____	53
Figura 13. Señalización negativa en las células B a través de receptores co-inhibidores. _____	54
Figura 14. Interacciones en la configuración <i>trans</i> LIGHT-HVEM y BTLA/CD160-HVEM. _	55
Figura 15. Co-expresión de las moléculas LIGHT/BTLA/CD160 y HVEM. _____	56
Figura 16. Fases de actuación del sistema inmunitario adaptativo CRISPR-Cas9. _____	63
Figura 17. Organización estructural y fundamento de actuación del sistema CRISPR-Cas9. __	65
Figura 18. Representación esquemática de los ZFNs y las TALENs. _____	66
Figura 19. Dos posibles papeles de HVEM en la progresión del linfoma B. _____	71
Figura 20. Vector plasmídico comercial pJET 1.2/blunt. _____	79
Figura 21. Plásmido pCMV-eGFP. _____	79
Figura 22. Plásmido de expresión lentiviral lentiCRISPRv2. _____	80
Figura 23. Plásmidos de expresión para la formación de las partículas lentivirales (pPAX2 y pVSV-g). _____	81
Figura 24. Plásmido spCas9-PURO ^R . _____	81
Figura 25. Plásmido sgRNA_tagRFP657. _____	82
Figura 26. Plásmido pRR-eGFP. _____	82
Figura 27. Marcadores de peso molecular empleados. _____	84
Figura 28. Organización esquemática de la secuencia de HVEM (cepa de ratón C57BL/6). __	88
Figura 29. Secuencias seleccionadas de RNA guía de 20 pb diseñadas con el programa informático del MIT (<i>Massachusetts Institute of Technology</i>). _____	88
Figura 30. Localización de los distintos sgRNAs (1, 3, 6 y 13) en el exón 1 de HVEM. _____	88
Figura 31. Diseño de las secuencias sgRNAs para su clonaje en los vectores de expresión lentivirales lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657. _____	89

Figura 32. Proceso de producción y concentración de las partículas lentivirales, e infección de la línea A20 mediante espinoculación.	103
Figura 33. Mecanismo de acción de la retronectina.	104
Figura 34. Procedimiento del ensayo de la T7 endonucleasa I.	106
Figura 35. Protocolo para el desarrollo del sistema pRR-eGFP.	108
Figura 36. Análisis por citometría de flujo de la expresión de HVEM/BTLA/CD160 y PD-L1/PD-1 en la línea celular de linfoma B murino A20.	117
Figura 37. Generación de la línea celular A20 GFP ⁺ (clon 2D9).	118
Figura 38. Alineamiento de las secuencias de DNA genómico de HVEM correspondientes al exón 1 e intrón 1-2, procedentes de las cepas de ratón C57BL/6 y Balb/c, y de la línea celular de linfoma B murino A20.	119
Figura 39. Delimitación del péptido señal en la secuencia de la proteína HVEM murina (cepas C57BL/6 y Balb/c).	120
Figura 40. Estrategia de clonaje para la construcción del vector de expresión lentiCRISPRv2-sgRNA (1, 3, 6 y 13).	121
Figura 41. Resultado del ensayo T7/EI endonucleasa.	123
Figura 42. Sitios de corte de los sgRNAs (1, 3, 6 y 13) en el exón 1 de HVEM.	123
Figura 43. Construcción del vector de expresión sgRNA-clonado-tagRFP657.	124
Figura 44. Construcción pJET 1.2-HVEM (ECD).	125
Figura 45. Construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD).	125
Figura 46. Análisis por citometría de flujo de la expresión de auto-fluorescencia eGFP por parte del vector original pRR-eGFP, de la construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD) sola, y de su combinación con el vector spCas9-PURO.	126
Figura 47. Análisis por citometría de flujo de la expresión de fluorescencia verde eGFP por las células HEK 293T transfectadas con las diferentes combinaciones de vectores de expresión del sistema pRR-eGFP.	127
Figura 48. Análisis por PCR de la amplificación de la nucleasa Cas9 en la línea celular A20 GFP ⁺ Cas9 ⁺ (1D5).	129
Figura 49. Comparación de la secuencia HVEM (TNFRSF14) (cepa Balb/c (NM_019418)) con la forma truncada de 100 pb	130
Figura 50. Comparación de la secuencia HVEM (TNFRSF14) (cepa Balb/c (NM_019418)) con la forma truncada de 300 pb	130
Figura 51. Esquema representativo de la disposición de los dos tipos de deleciones sobre el genoma de HVEM.	131
Figura 52. Análisis por PCR de la amplificación de HVEM y la presencia de la nucleasa Cas9 integrada.	132
Figura 53. Comparación de la secuencia de proteína de HVEM WT (<i>wild-type</i>) y truncada.	133

Figura 54. Análisis por citometría de flujo de la expresión de HVEM por las células A20 GFP ⁺ WT y por las células A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} , clones 1F1 y 4D10.	134
Figura 55. Comparación de la secuencia diana sgRNA_1 <i>on-target</i> del exón 1 de HVEM con las cinco primeras secuencias con probabilidades de <i>off-targeting</i> más altas	135
Figura 56. Resultado de la secuenciación de los diferentes genes <i>off-target</i> seleccionados.	136
Figura 57. Histogramas de la expresión de PD-L1, BTLA y HVEM en las células A20 WT, A20 GFP ⁺ (2D9), A20 GFP ⁺ Cas9 ⁺ (1D5), y A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} (1F1).	139
Figura 58. Histogramas de la expresión de ICOS-L, CD19, IgD, IgM, CD21/35, CD40 y MHC de clase II en las células A20 WT, A20 GFP ⁺ (2D9), A20 GFP ⁺ Cas9 ⁺ (1D5), y A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} (1F1).	141
Figura 59. Expresión de CD11a, CD18, CCR9, CCR7, CD49d-VLA-1 y CD44 por las células A20 WT, A20 GFP ⁺ (2D9), A20 GFP ⁺ Cas9 ⁺ (1D5) Y A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} (1F1).	143
Figura 60. Representación de la cinética de infiltración de las líneas tumorales A20 GFP ⁺ WT y A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} en el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea.	145
Figura 61. Representación de la cinética de colonización del timo por parte del tumor a día 34 post-implantación del tumor.	146
Figura 62. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células B y de células tumorales A20 GFP ⁺ en el timo.	147
Figura 63. Representación de la media de expresión de HVEM por las células T CD8 ⁺ , T CD4 ⁺ y células B presentes en los diferentes órganos linfoides y en los nódulos tumorales del hígado durante los días 22, 28 y 34 post-implantación del tumor.	148
Figura 64. Representación de la media de expresión de BTLA por las células T CD8 ⁺ , T CD4 ⁺ y células B presentes en los diferentes órganos linfoides y en los nódulos tumorales del hígado durante los días 22, 28 y 34 post-implantación del tumor.	148
Figura 65. Nódulos tumorales en el hígado formados por la línea tumoral A20 GFP ⁺ .	149
Figura 66. A día 28 post-implantación del tumor, los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} mostraron un menor número absoluto de TILs.	150
Figura 67. Poblaciones estudiadas de los leucocitos infiltrantes (TILs) en los nódulos tumorales del hígado.	151
Figura 68. Representación de las células T CD8 ⁺ y T CD4 ⁺ , células B, células NK y células mieloides CD11b ⁺ infiltrantes en los nódulos tumorales del hígado a día 28 post-implantación del tumor.	152
Figura 69. A día 34 post-implantación del tumor, no hay diferencias significativas en el reclutamiento de los leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs) en los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP ⁺ WT en comparación con los formados por la línea A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-} .	153

Figura 70. A día 34 post-implantación del tumor, la pérdida de expresión de HVEM por las células A20 GFP ⁺ no provoca cambios en el número de células T CD8 ⁺ , T CD4 ⁺ , células B, células NK y NKT presentes en los nódulos tumorales en comparación con la línea A20 GFP ⁺ WT. ____	154
Figura 71. A día 34 post-implantación del tumor, la pérdida de expresión de HVEM por las células A20 GFP ⁺ no provoca cambios en el número de células mieloides CD11b ⁺ , células dendríticas, monocitos y neutrófilos presentes en los nódulos tumorales en comparación con la línea A20 GFP ⁺ WT. _____	155
Figura 72. Distribución de las células tumorales A20 GFP ⁺ en los nódulos tumorales del hígado. _____	156
Figura 73. Organización de los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP ⁺ y zona necrótica. _____	157
Figura 74. Infiltración de las células tumorales A20 GFP ⁺ en los ganglios linfáticos a día 28 post-implantación del tumor. _____	158
Figura 75. La infiltración de las células tumorales A20 GFP ⁺ no es detectable en el bazo y el timo mediante histología clásica _____	159
Figura 76. Análisis de la infiltración de las células A20 GFP ⁺ en el timo y en el bazo por citometría de flujo. _____	160
Figura 77. Perspectivas futuras en la vía de señalización HVEM-BTLA en el contexto del linfoma B murino A20. _____	182

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antígenos tumorales reconocidos por las células T.	8
Tabla 2. Medios de cultivo bacterianos	75
Tabla 3. Plásmidos empleados.	77
Continuación Tabla 3. Plásmidos empleados.	78
Tabla 4. (A) Composición del Tampón Tris Borato EDTA 5X (TBE) y (B) de los geles de agarosa.	83
Tabla 5. Cóctel empleado en cada reacción de PCR.	84
Tabla 6. Construcciones, moldes, <i>primers</i> y condiciones de las PCR.	85
Continuación tabla 6. Construcciones, moldes, <i>primers</i> y condiciones de las PCR.	86
Tabla 7. Secuencias sgRNAs para su clonaje en los plásmidos lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657.	89
Tabla 8. Protocolo del anillamiento de los oligos sgDNA y de la fosforilación de los oligos sgDNA anillados.	90
Tabla 9. Enzimas de restricción empleadas, condiciones de digestión y sitios de corte.	90
Tabla 10. Protocolo de defosforilación de los plásmidos.	91
Tabla 11. Condiciones para las reacciones de ligación.	92
Tabla 12. Reacción con DNAsa dependiente de ATP.	93
Tabla 13. Secuencias <i>off-target</i> seleccionadas a partir del sgRNA_1.	95
Tabla 14. Líneas celulares empleadas y su descripción.	96
Tabla 15. Medios y reactivos de cultivos celulares.	97
Tabla 16. Condiciones para la electroporación de las células A20.	99
Tabla 17. Condiciones para la transfección de las células HEK 293T para la producción de las partículas lentivirales.	101
Tabla 18. Protocolo de la reacción de hibridación.	105
Tabla 19. Sistema pRR-eGFP. Condiciones para la transfección de las células HEK 293T.	107
Tabla 20. Parámetros obtenidos de la semi-cuantificación de las bandas resultantes del ensayo T7/EI endonucleasa.	123
Tabla 21. Tabla comparativa de los porcentajes de eficacia de corte del gen que codifica para HVEM obtenidos por distintos procedimientos, y probabilidad de <i>off-targeting</i> de los sgRNAs	128
Tabla 22. Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF).	138
Tabla 23. Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF).	138
Tabla 24. Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF).	140
Tabla 25. Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF).	141

Tabla 26. Estudio de la expresión de las moléculas CCR7, CCR9, CD11a, CD18, CD49d-VLA-1 y CD44, y su función en la respuesta inmunitaria. _____ 142

Tabla 27. Cálculo de la tasa de duplicación de las líneas celulares A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}. _____ 144

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Concepto
β2m	β2 microglobulina
aa	Aminoácidos
ABC	Célula B activada
ACK	Amoníaco-cloruro-potasio
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo
ALL	Leucemia linfoblástica aguda
AML	Leucemia mieloide aguda
APC	Aloficocianina
APC	Célula presentadora de antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAGE	Antígeno B expresado en melanomas y otros tipos tumorales
BCL6	Factor represor de la transcripción
BCR	Receptor antigénico de células B
BSA	Albúmina sérica bovina
BLNK	Proteína de enlace de célula B
BSAP	Proteína activadora específica del linaje de células B
BTLA	Atenuador de linfocitos B y T
CD40L	CD40 ligando
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CDK4	Quinasa 4 dependiente de ciclina
CDS	Región codificante
cfu	Unidades formadoras de colonias
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (Madrid)
CLL	Leucemia linfocítica crónica
CML	Leucemia mieloide crónica
ConA	Concanavalina A
cPPT	Cola de poli-purinas
CRD	Dominios ricos en cisteína
CRISPR	Secuencias cortas palindrómicas inter-espaciadas
CSR	Proceso de recombinación <i>class-switch</i> de los genes inmunoglobulina
CTCL	Linfoma cutáneo de células T
CTLA-4	Proteína 4 asociada con los linfocitos T citotóxicos
CTLs	Linfocitos T citotóxicos

DARC	Sitio de unión de BTLA, CD160 y gD en el dominio CRD1 de HVEM
DC	Célula dendrítica
DLBCL	Linfoma difuso de células B grandes
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfato
DSB	Corte en las dos hebras del DNA
dsDNA	DNA de cadena doble
DT	Tasa o tiempo de duplicación
DTT	Ditiotreitol
ECD	Dominio extracelular
EFS	Promotor del factor-1 α de elongación corto
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
F	<i>Forward</i>
FasL	Fas ligando
FasR	Fas receptor
FastAP	Fosfatasa alcalina
FBS	Suero fetal bovino
Fc	Fracción constante del anticuerpo
FDCs	Células dendríticas foliculares
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FL	Linfoma folicular
FLAG	Etiqueta octapeptídica
FO	Folicular (célula B de linaje folicular)
FRCs	Fibroblastos reticulares
FSC	<i>Forward scatter</i>
GAGE	Antígeno G expresado en melanomas y otros tipos tumorales
GC	Centro germinal
GCB	Células B del centro germinal
gD	Glicoproteína D
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos-macrófagos
HCMV	Citomegalovirus humano
HDR	Reparación por homología directa (<i>homology-directed repair</i>)
HEV	Vénula de endotelio alto
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HR	Recombinación homóloga

HSC	Célula madre hematopoyética
HSV	Virus <i>Herpes simplex</i>
HVEM	Mediador de la entrada en la célula de los <i>herpesvirus</i>
ICOS	Co-estimulador inducible de células T
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IELs	Linfocitos T intestinales intra-epiteliales
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina
IgSF	Superfamilia de las Inmunoglobulinas
IgH	Cadena de inmunoglobulina pesada
IgL	Cadena de inmunoglobulina ligera
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor IL-2
INDELs	Deleciones e inserciones
IP	Ioduro de propidio
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
IRF4	Factor 4 regulador del interferón
ITAM	Motivos de activación intracelular basado en tirosinas
ITIM	Motivos inhibidores basados en tirosina
LAG-3	Gen de activación de linfocitos tipo-3
LAT	<i>Linker</i> de activación en las células T
LB	Luria y Bertani
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos
LTβR	Linfotoxina- β receptor
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LT- α	Linfotoxina- α
LTRs	Secuencias largas terminales repetidas
MΦ	Macrófago
MAGE	Antígeno de melanoma
MCS	Sitio de clonación múltiple
MDSC	Célula mieloide supresora
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
MMs	Número de nucleótidos no complementarios o <i>mismatches</i>
MOI	Multiplicidades de infección

MTA	Acuerdo de Transferencia de Material
MZ	Zona marginal (célula B de la zona marginal)
NF- κB	Factor de transcripción nuclear <i>kappa</i> B
NHEJ	Recombinación no homóloga (<i>no-homologous end joining</i>)
NHL	Linfomas de células B de non-Hodgkin
NK	Células <i>natural killer</i>
NKT	Células T <i>natural killer</i>
ns	No significativo
nt	Nucleótido
ORF	<i>Open reading frame</i>
P24	Placa de cultivo de 24 pocillos
P9	Placa de cultivo de 90 mm
P96	Placa de cultivo de 96 pocillos
PALS	Vaina linfoide periarteriolar
PAM	Motivo adyacente al protoseparador
PAMPs	Patrones moleculares específicos relacionados con microorganismos patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCs	Células plasmáticas
PD-1	Receptor de muerte celular programada 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1	Ligando 1 de muerte celular programada
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridina-clorofila-proteína
PI3K	Fosfatidilinositol 3-OH quinasa
PLCγ2	Fosfolipasa C γ 2
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PURO	Puromicina
Rc	<i>Reverse</i> complementario
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RRE	Elemento de respuesta Rev
RT	Temperatura ambiente
SA-BV421	Estreptavidina-violeta brillante 421

SA-PE	Estreptavidina-ficoeritrina
SA-PE-Cy7	Estreptavidina-ficoeritrina-cianina 7
scFv	Fracción variable de cadena sencilla de un anticuerpo
SD	Desviación estándar
sgDNAs	Oligos DNA guías
sgRNAs	Secuencias guías o RNAs guías
SHM	Hipermutación somática
SHP-1/2	Fosfatasa 1 y 2 con dominio homólogo Src
SOC	Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito
spCas9	Nucleasa Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
ssDNA	DNA de cadena simple
T2	Célula B transicional 2
T4 PNK	T4 polinucleótido quinasa
T7/EI	T7 endonucleasa I
TAA	Antígenos asociados a tumor
TALE	Dominio de unión al DNA de tipo activador transcripcional
TALEN	Nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción
TAMs	Macrófagos asociados al tumor
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE	Tampón Tris-borato EDTA
TCR	Receptor antigénico de células T
T_{FH}	Célula T <i>helper</i> folicular
TGF-β	Factor de crecimiento transformador-beta
T_H	Célula T CD4 ⁺ <i>helper</i>
T_{H1}	Célula T CD4 ⁺ <i>helper</i> de tipo 1
T_{H2}	Célula T CD4 ⁺ <i>helper</i> de tipo 2
TIGIT	Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM
TILs	Linfocitos/Leucocitos infiltrantes en el tumor
TIM-3	Inmunoglobulina de células T tipo-3
TLR	Receptor tipo-Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFRSF	Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
tracrRNA	Trans-activador del crRNA
TRAF	Factor asociado al receptor TNF
Treg	Célula T reguladora

TSA	Antígenos específicos de tumor
TU	Unidades de transducción
U	Unidad de actividad enzimática
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VSV-G	Glicoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular
WHO	Organización Mundial de la Salud
WPRE	Elemento de regulación post-transcripcional
WT	<i>Wild-type</i>
ZFN	Nucleasa de dedos de zinc

RESUMEN

HVEM (TNFRSF14) pertenece a la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF), que en condiciones de homeostasis, y por tanto en ausencia de respuesta inmunitaria actúa como ligando supresor al unirse en *cis* al receptor BTLA en la superficie de las células T, B y células dendríticas (DCs), inhibiendo su activación, aunque también puede interactuar en *trans* con BTLA, inhibiendo la respuesta inmunitaria.

HVEM parece jugar un papel clave en la progresión y desarrollo de los linfomas difusos de células B grandes (DLBCLs) y de otros tipos de linfomas de células B, como los linfomas B foliculares (FL). Sin embargo, la función de HVEM en estos tumores es muy controvertida. En los FLs, la mayoría de las mutaciones del gen *TNFRSF14* se asocian con la pérdida de función de HVEM y una mayor progresión del tumor. En este caso, la célula B neoplásica ha perdido la capacidad de auto-regular su proliferación y activación, al carecer de la señalización inhibitoria intrínseca de la interacción en *cis* HVEM-BTLA, lo que podría promover el desarrollo tumoral de la célula B. No obstante, la expresión de HVEM en muchos tipos de linfomas B hace pensar que HVEM podría actuar como ligando co-inhibidor al unirse en *trans* a BTLA expresado en las células T, y esto, podría ser empleado por el tumor como mecanismo de evasión inmunitaria. Basándonos en estos antecedentes, nos planteamos estudiar el efecto de la pérdida de expresión de HVEM, mediante el truncamiento del exón 1 codificante del péptido señal de la molécula empleando el sistema CRISPR-Cas9, en la línea de linfoma B murino A20 (perteneciente al grupo de los linfomas DLBCLs). Con esta herramienta de trabajo, hemos estudiado el desarrollo y progresión del tumor, utilizando un modelo experimental animal de linfoma B trasplantable con marcaje estable de GFP para el seguimiento *in vivo* del tumor.

Nuestros resultados revelaron que la pérdida de expresión del péptido señal de la proteína HVEM, tras la delección completa del exón 1 de la molécula por el sistema CRISPR-Cas9, fue suficiente para impedir la expresión en membrana de HVEM en la línea A20 GFP⁺. Además, observamos que la ausencia de HVEM en las células de tumor A20 condujo también al descenso en la expresión de BTLA. En la fase intermedia del desarrollo del linfoma, la pérdida de expresión de HVEM conllevó un menor reclutamiento de leucocitos infiltrantes y una mayor proporción de células tumorales en

los nódulos tumorales hepáticos. Sin embargo, la capacidad replicativa *in vitro* y el patrón metastásico de diseminación *in vivo* en los órganos linfoides primarios y secundarios de las células de tumor A20 deficientes en HVEM no se vieron alteradas con respecto a la línea A20 *wild type* (WT). En las etapas más avanzadas del tumor, un dato llamativo fue la inusual expansión de células B residentes del timo, como respuesta a la diseminación sistémica del tumor y a la invasión tumoral de este órgano linfoide.

En conclusión, la pérdida de expresión de HVEM en las células de tumor A20 no provoca alteraciones en el patrón de diseminación *in vivo* en los órganos hematopoyéticos primarios y secundarios. La deficiencia en la expresión de HVEM por las células B de linfoma A20 altera el reclutamiento de leucocitos infiltrantes en los nódulos tumorales del hígado en la fase intermedia del desarrollo del tumor, lo que podría considerarse una ventaja para el tumor, como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria.

ABSTRACT

HVEM (TNFRSF14) belongs to the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TNFRSF), and under homeostatic conditions, and therefore in the absence of immune response functions as a suppressor ligand by interacting in *cis* with BTLA receptor on the cell surface of T and B cells, and dendritic cells (DCs), inhibiting their activation. It can also interact in *trans* with BTLA, inhibiting the immune response.

HVEM appears to play a critical role in the progression and development of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) and other types of B-cell lymphomas, such as follicular B lymphomas (FL). However, the function of HVEM in these tumors is still rather controversial. In FLs, most mutations of the *TNFRSF14* gene are associated with loss of function of HVEM and increased tumor progression. In this case, the neoplastic B cell has lost the ability to self-regulate its proliferation and activation, lacking the intrinsic inhibitory signaling of the interaction in *cis* HVEM-BTLA, which could promote the tumor development of the B cell. However, the expression of HVEM in many types of B-lymphomas suggests that HVEM could act as a co-inhibitory ligand when binding in *trans* to BTLA expressed in T cells, and this could be used by the tumor as a mechanism of immune evasion. Based on these evidences, we set out to study the effect of the loss of HVEM expression, by knocking-out exon 1 encoding for the signal peptide of HVEM using a CRISPR-Cas9 experimental strategy. With this working tool, we have studied the development and progression of the tumor, using an experimental transplantable murine A20 tumor cell line (belonging to the group of DLBCLs lymphomas) with stable GFP expression, that allowed us in vivo monitoring of tumor growth and tumor progression and dissemination.

Our results revealed that the loss of expression of the signal peptide of HVEM protein, after the complete deletion of exon 1 of HVEM by the CRISPR-Cas9 system, was sufficient to prevent the HVEM membrane expression in the cell membrane of A20 GFP⁺ line. In addition, we observed that the absence of HVEM in A20 tumor cells also led to a decrease in BTLA expression. In the intermediate phase of lymphoma development, the loss of HVEM expression led to a diminished recruitment of infiltrating leukocytes and to a greater proportion of tumor cells in the hepatic tumor nodules. However, the in vitro replicative capacity and the metastatic pattern of in vivo dissemination in the primary and secondary lymphoid organs of A20 tumor cells deficient

in HVEM were not altered with respect to the A20 wild type (WT) line. In the most advanced stage of the disease, a striking fact was the unusual expansion of resident B cells in the thymus, as a response to the systemic spread of the tumor in this lymphoid organ.

In conclusion, the loss of HVEM expression in A20 tumor cells did not alter their pattern of *in vivo* progression and dissemination in the primary and secondary hematopoietic organs. HVEM deficiency in A20 lymphoma cells altered the recruitment of infiltrating leukocytes in the hepatic tumor nodules in the intermediate phase of tumor development, which could be considered an advantage for the tumor, as a mechanism of evasion of the immune response.

I. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tumores hematopoyéticos. Los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria antitumoral

1.1.1. Inmunovigilancia frente al cáncer. Antígenos específicos de tumor (TSAs) y antígenos asociados a tumor (TAAs)

En 1909, Paul Ehrlich formuló la hipótesis que postulaba que los mecanismos inmunitarios del huésped impedían la formación de tumores a partir de células neoplásicas. Más tarde, algunos biólogos sugerían la existencia de un “mecanismo de inmunovigilancia” frente a las células tumorales. En modelos de trasplante de tumores se establecieron evidencias de la represión del tumor por parte del sistema inmunitario (Ryungsa Kim et al. 2007). Lewis Thomas sugirió que el sistema inmunitario tiene la capacidad de eliminar las células tumorales a través del reconocimiento de neoantígenos expresados en la superficie de las células malignas, manteniendo la homeostasis del organismo (Ribatti 2017). Macfarlane Burnet denominó “**inmunovigilancia**” a la capacidad del sistema inmunitario para detectar células tumorales y destruirlas (Ribatti 2017) (Pardoll 2003). Hoy en día se sabe que la relación entre el sistema inmunitario y el cáncer es considerablemente más compleja (Dunn et al. 2004). El interés de la importancia del sistema inmunitario en cáncer se establece sobre la base de observaciones en las que el bloqueo de interferón gamma (IFN- γ) facilitaba el desarrollo tumoral (Dighe et al. 1994), o en ratones inmunodeficientes para el receptor del IFN- γ (IFNGR1) que no son capaces de responder a IFN- γ (Kaplan et al. 1998). El principal efecto del IFN- γ en las células tumorales es la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa a través del aumento de la expresión del MHC de clase I, promoviendo la presentación antigénica de **neoantígenos** tumorales, y por tanto, facilitando su destrucción por las células T CD8⁺ específicas del tumor, y también el aumento de la respuesta de las células NK (**Fig. 1**) (Vesely et al. 2011).

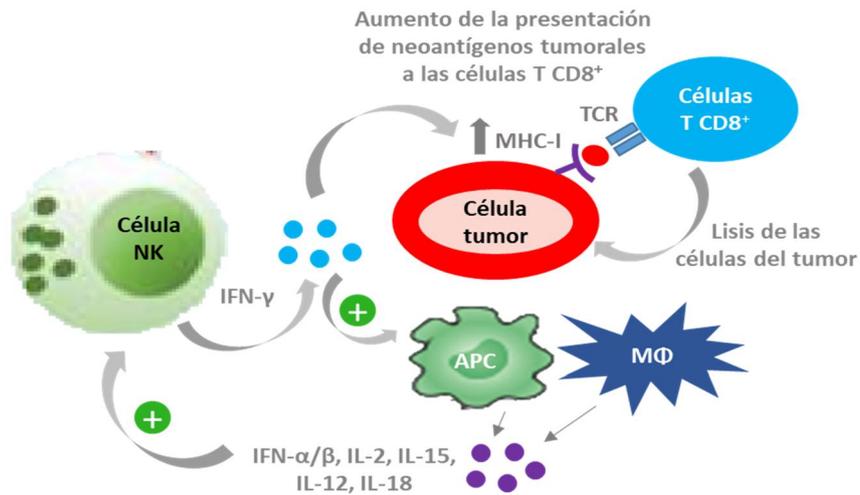


Figura 1. El IFN- γ es secretado por las células NK como mecanismo de acción antitumoral. La liberación de citoquinas (IFN- α/β , IL-2, IL-15, IL-12 e IL-18) por parte de las células del sistema inmunitario (células presentadoras de antígeno (APCs) y macrófagos (M Φ)) y/o por parte de las células tumorales promueve la activación de las células NK y la producción de IFN- γ (Marcus et al. 2014). El IFN- γ secretado por las células NK activadas induce el aumento de la presentación antigénica de neoantígenos tumorales, a través del incremento en la expresión del MHC-I por las células del tumor, conduciendo a la lisis de las células tumorales mediante la acción citotóxica de las células T CD8⁺ (Vesely et al. 2011). A su vez, el IFN- γ promueve la liberación de citoquinas por las células del sistema inmunitario activando a las células NK (Vesely et al. 2011).

El sistema inmunitario tiene tres papeles principales en la prevención de tumores. Primero, puede proteger al hospedador frente a los tumores inducidos por virus mediante la eliminación o supresión de infecciones virales. Segundo, la rápida eliminación de patógenos y la resolución de los procesos inflamatorios pueden prevenir el establecimiento de un ambiente inflamatorio propicio para el desarrollo de un daño colateral en los tejidos afectados que conduzca a una inmunopatología o a la oncogénesis. Finalmente, el sistema inmunitario puede identificar de manera específica y eliminar células tumorales basándose en el reconocimiento de los antígenos tumorales (Vesely et al. 2011).

Los **antígenos tumorales** son clasificados en dos grupos de acuerdo a su distribución: (i) antígenos específicos del tumor (**TSA**), los cuales son expresados exclusivamente por las células tumorales, y se tratan de antígenos nuevos originados por mutaciones en antígenos propios (inducidas por químicos o radiación) u oncogenes de origen viral; y (ii) antígenos asociados al tumor (**TAA**), los cuales no son exclusivos de las células tumorales pudiendo encontrarse también en otros tipos de células normales, y son normalmente expresados en esos tipos celulares durante la embriogénesis, por tanto en las etapas tempranas del desarrollo (Zilberberg et al. 2015). Los TSA son bastante

inmunogénicos y pueden ser únicos, es decir, específicos de un paciente determinado, o bien pueden ser compartidos entre individuos que presenten el mismo tipo de tumor (Zilberberg et al. 2015). Aunque los TSA compartidos constituyen un grupo ideal para el desarrollo de vacunas frente al cáncer, los TSA únicos tienen el potencial para el desarrollo de inmunoterapias personalizadas altamente efectivas frente al cáncer (Zilberberg et al. 2015). Los TAA, al tratarse de antígenos propios y ser expresados también en condiciones normales por el tejido sano, son poco inmunogénicos (Zilberberg et al. 2015). La clasificación de los antígenos tumorales se resume en la siguiente tabla (**tabla 1**) (Zilberberg et al. 2015) (Spurrell & Lockley 2014) (Parmiani 2007):

Tabla 1. Clasificación de los antígenos tumorales reconocidos por las células T.

Clasificación del antígeno tumoral	Mecanismos de activación de la respuesta inmunitaria	Ejemplos
Antígenos específicos del tumor (TSA) únicos	Proceden de mutaciones somáticas puntuales inducidas por carcinógenos y, además, tienen lugar en el contexto de un único tumor de un paciente particular. Los TSA únicos pueden inducir respuestas inmunitarias antitumorales más efectivas que los antígenos compartidos debido a que son más immuno-dominantes, particularmente si la proteína mutada es crítica para la preservación de las células neoplásicas	Mutación puntual en la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) en melanoma (Parmiani 2007)
Antígenos específicos del tumor (TSA) compartidos	Son expresados en diferentes tumores, pero no se expresan en tejidos sanos. A excepción de los testículos y, ocasionalmente la placenta, los cuales son sitios immuno-privilegiados. La expresión de TSA compartidos fuera de los espermatozoides en los testículos conduce a la activación de las células T	Antígeno de melanoma (MAGE) Antígeno B (BAGE) Antígeno G (GAGE) (Spurrell & Lockley 2014)
Antígenos asociados al tumor (TAA) compartidos	Por lo general se expresan en el tejido embrionario y no se expresan o lo hacen en niveles bajos en la mayoría de las células adultas normales. Pero, están sobre-expresados por las células malignas, lo que conduce a la activación de las células T. También pueden tratarse de translocaciones cromosomales y fusiones aberrantes de proteínas que inducen una respuesta inmunitaria. O bien, pueden ser antígenos diferenciados que son expresados tanto por las células normales, como por las células neoplásicas del mismo linaje	TAA sobre-expresados/proteínas fusionadas: leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Zilberberg et al. 2015) TAA diferenciados: cáncer colorrectal, melanoma y cáncer de próstata (Spurrell & Lockley 2014)

El mecanismo originariamente pensado para explicar la inmunogenicidad del tumor fue que el sistema inmunitario es capaz de discriminar entre “los antígenos propios” (antígenos que son expresados por las células normales) y “los antígenos no propios” (antígenos distintos que son específicos del tumor), que se generan como consecuencia de las mutaciones surgidas en las células tumorales durante el proceso de división y diferenciación y en el curso de la progresión tumoral (Blankenstein et al. 2012). Según este mecanismo, la idea central de cualquier respuesta inmunitaria se fundamentaba en el reconocimiento de lo que es extraño: todo elemento que pertenece indiscutiblemente al organismo no induce una respuesta inmunitaria, mientras que todo elemento extraño induce una respuesta inmunitaria (Pradeu & Carosella 2006). Sin embargo, el criterio de distinción entre lo “propio” y lo “no propio” no es el más acertado porque no es capaz de explicar las siguientes evidencias (Blankenstein et al. 2012) (Pradeu & Carosella 2006):

i.- La fagocitosis de células que presentan cambios en sus patrones antigénicos, particularmente, células muertas. A pesar de ser células propias, las células muertas son reconocidas por las células del sistema inmunitario para ser destruidas e inducir una respuesta inmunitaria.

ii.- Las células T reguladoras, cuya función es la de inhibir la activación de los linfocitos participando en el balance de la auto-inmunidad, en la tolerancia en tumores, etc., se tratan de células propias que responden a otras células propias. El criterio propio/no-propio no serviría para explicar el fenómeno de auto-reactividad necesario para la estimulación de las células del sistema inmunitario por componentes endógenos.

iii.- Las células tumorales, a excepción de los tumores derivados de virus oncogénicos, son células propias. En muchas circunstancias, las células tumorales pueden inducir respuestas inmunitarias debido a que presentan patrones moleculares distintos a los de las células normales. Los cambios producidos en las células tumorales son muy diferentes a los cambios en las células normales: el genoma de las células normales es más estable que el de las células cancerígenas que sufre múltiples alteraciones genéticas.

iv.- Los antígenos extraños expresados por las bacterias que residen de manera simbiótica en el intestino de los organismos multicelulares no inducen una respuesta inmunitaria.

Para explicar estas contradicciones, Pradeu y Carosella establecieron el **principio de continuidad** por el cual toda respuesta inmunitaria es debida a una discontinuidad antigénica “abrupta”, es decir, a la aparición en el organismo de patrones antigénicos (epítomos) que son diferentes de aquellos con los que los receptores inmunitarios interaccionan continuamente (Pradeu & Carosella 2006). Los patrones antigénicos son los epítomos a los que se unen los receptores inmunitarios y pueden ser tanto exógenos (patrones patógenos, aloantígenos expresados en un órgano trasplantado, etc.) o endógenos (marcadores tumorales, patrones expresados en células apoptóticas, patrones reconocidos por células T reguladoras, etc.) (Pradeu & Carosella 2006). Por su parte una respuesta inmunitaria no es una simple interacción bioquímica entre los receptores inmunitarios y los patrones antigénicos, sino que es un desencadenamiento de mecanismos efectoros (Pradeu & Carosella 2006). De acuerdo con el criterio de continuidad, una respuesta inmunitaria efectora es debida a diferencias antigénicas, no a la diferencia entre lo endógeno (propio) y lo exógeno (no propio) (Pradeu & Carosella 2006). Sin embargo, el criterio de continuidad no dice que toda modificación, toda discontinuidad antigénica, induzca una respuesta inmunitaria (Pradeu & Carosella 2006). Para que se produzca una respuesta inmunitaria la discontinuidad tiene que ser fuerte, los cambios en los epítomos antigénicos tienen que ser suficientes para desencadenar inmunogenicidad (Pradeu & Carosella 2006). Se necesita que se cumplan unas condiciones (Pradeu & Carosella 2006):

i. La cantidad de antígeno que se está expresando debe ser suficiente, si la cantidad es muy pequeña no se inducirá una respuesta inmunitaria.

ii. Las diferencias moleculares entre el nuevo antígeno y los antígenos que interaccionan de manera rutinaria con los receptores inmunitarios tienen que ser suficientes para generar una respuesta inmunitaria.

iii. La velocidad con la que se introducen los patrones antigénicos nuevos tiene que ser adecuada para inducir una respuesta inmunitaria. Si la aparición de antígenos inusuales en un organismo tiene lugar de manera paulatina induce tolerancia. De la misma forma, si el antígeno sufre mutaciones muy lentas se

producirán modificaciones leves que no desencadenarán una respuesta inmunitaria. La velocidad de aparición de nuevos patrones antigénicos tampoco puede ser demasiado alta porque no activaría la respuesta inmunitaria.

En algunas circunstancias, las células tumorales pueden inducir respuestas inmunitarias porque presentan patrones moleculares que constituyen una discontinuidad antigénica (Pradeu & Carosella 2006). Los antígenos asociados al tumor (TAAs) son una de las dianas fundamentales en la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T CD8⁺ (CTLs) son los encargados de la defensa inmunitaria frente a patógenos o células tumorales (Kurts et al. 2010). Las células T CD8⁺ reconocen péptidos antigénicos asociados con el MHC de clase I, el cual es expresado en la superficie de todas las células del organismo (Kurts et al. 2010). Para evitar la destrucción de células sanas que han endocitado restos o desechos de origen viral o tumoral, el material endocitado generalmente no es procesado por el retículo endoplasmático para ser presentado por el MHC de clase I (Kurts et al. 2010). La vía endógena de presentación a través del MHC de clase I está reservada para los péptidos derivados de las proteínas sintetizadas intracelularmente (Kurts et al. 2010). Sin embargo, los CTLs *naive* necesitan ser activados por células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), normalmente células dendríticas (DCs), para activar sus funciones efectoras citotóxicas (Kurts et al. 2010). Cuando un patógeno intracelular (por ejemplo, un virus) no infecta a las APCs o cuando los tumores no derivan de APCs (es el caso de la mayoría de los tumores), los CTLs pueden ser activados solo si las APCs presentan el antígeno extracelular a través de la vía endógena del MHC de clase I (Kurts et al. 2010). Este fenómeno, por el cual un antígeno exógeno puede ser procesado y presentado a través del MHC de clase I, se denomina ***cross-presentation*** (Kurts et al. 2010). La capacidad de co-estimulación de las respuestas inmunitarias efectoras de las células T CD8⁺ a través de los péptidos exógenos procesados y presentados en el contexto del MHC de clase I de las APCs, se define como ***cross-priming*** (Kurts et al. 2010). Por lo tanto, el ***cross-priming*** es requerido para la defensa frente a muchos sistemas virales y tumores (Kurts et al. 2010). El problema está en que las células tumorales han desarrollado mecanismos de evasión para escapar a la acción de las células del sistema inmunitario.

1.1.2. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria antitumoral

En la actualidad, el concepto de “inmunovigilancia” del tumor se ha modificado y se considera que ocurre en tres etapas que se engloban en el proceso conocido como inmunoedición del cáncer (Dunn et al. 2004) (Zitvogel et al. 2006).

1.1.2.1. Inmunoeedición del cáncer

La **inmunoeedición del cáncer** es un proceso dinámico que está compuesto por tres fases distintas: eliminación, equilibrio y escape (**Fig. 2**) (Ryungsa Kim et al. 2007) (Dunn et al. 2004) (Zitvogel et al. 2006). Una vez que las células normales son transformadas en células tumorales por la combinación de la expresión de oncogenes y el fallo en los mecanismos de supresión de tumores, el sistema inmunitario podría funcionar como un supresor tumoral extrínseco, eliminando las células tumorales o previniendo su desarrollo. Esta primera fase es la eliminación, conocida previamente como la “**inmunovigilancia del cáncer**”, y en ella participan moléculas y células del sistema inmunitario innato y adaptativo que trabajan en estrecha colaboración para detectar la presencia del tumor y destruirlo, antes de que pueda progresar y aparezcan las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Dunn et al. 2004) (Vesely et al. 2011). En el caso de que el tumor sea totalmente destruido, la fase de eliminación representa el final del proceso de inmunoeedición del cáncer (Vesely et al. 2011). Sin embargo, el proceso de eliminación puede no ser del todo satisfactorio y el sistema inmunitario ejercerá un mecanismo de presión de selección, actuando sobre las variantes celulares tumorales que expresan antígenos específicos del tumor (TSA), facilitando la supervivencia de aquellas variantes tumorales menos inmunogénicas (**Fig. 2**) (Ryungsa Kim et al. 2007) (Dunn et al. 2004) (Vesely et al. 2011) (Zitvogel et al. 2006):

- i. Disminución de la capacidad de presentar antígeno debido a la reducción en la expresión de MHC I/II.
- ii. Aumento en la expresión de inhibidores de la apoptosis (Bcl-XL, FLIP), expresión de moléculas inhibitoras de la transmisión de señales a través del TCR en linfocitos T CD8⁺ (PD-L1/PD-1), o expresión de moléculas que promueven la muerte de las células T citotóxicas (FasL-Fas).

iii. Las células tumorales pueden secretar factores que inhiban las funciones efectoras de las células del sistema inmunitario (TGF- β , IL-10, VEGF, LXR-L,IDO, gangliósidos, o MICA soluble) o son capaces de reclutar células reguladoras (Treg) y células mieloides supresoras (MDSC) para generar un microambiente inmunosupresivo (IL-4, IL-13, TGF- β , IL-10 y PDGF). La secreción de las interleucinas IL-4 e IL-13 conduce al reclutamiento y polarización de los macrófagos M2 desde precursores mieloides, los cuales expresan TGF- β , IL-10 y PDGF inhibiendo a las células T. La liberación de factores como IL-1 β , VEGF o PGE₂ por las células tumorales lleva a la acumulación de MDSCs que bloquean la acción de las células T. Las células CD4 Treg, las cuales expresan altos niveles de los marcadores CD25 (IL-2R α) y del factor de transcripción Foxp3, pueden actuar inhibiendo las funciones citotóxicas de las células T CD8⁺ a través de varias vías, incluyendo la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , y la expresión de moléculas co-inhibidoras como CTLA-4 (proteína 4 asociada con los linfocitos T citotóxicos) y PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada), que regulan negativamente la señalización a través del TCR, y disminuyen la proliferación y producción de citoquinas citotóxicas en las células T (Vesely et al. 2011) (Wilson & Schooley 2017).

Las células tumorales que han sido capaces de evadir la primera fase de eliminación pueden pasar a una segunda fase denominada de equilibrio (Vesely et al. 2011). Los tumores en **fase de equilibrio** se pueden equiparar a un estado de latencia, que se extiende desde el final de la fase de eliminación hasta el comienzo de la fase de escape y la detección clínica del cáncer (Dunn et al. 2004). En esta fase de equilibrio, al igual que en los tumores en estado de letargo, mientras el sistema inmunitario restringe el crecimiento de la población de células heterogéneas compuesta por células inestables y de rápida mutación, están surgiendo nuevas variantes de las células tumorales que serán capaces de aumentar su resistencia al ataque inmunitario. De esta manera, la interacción dinámica entre el sistema inmunitario y el cáncer en la fase de equilibrio produce nuevas poblaciones de células tumorales con un mayor potencial para sobrevivir en el individuo inmunocompetente (**Fig. 2**) (Dunn et al. 2004) (Vesely et al. 2011). Hay tres posibles consecuencias para las células tumorales que entran en el periodo de equilibrio (Dunn et al. 2004):

- i. Pueden ser eliminadas por el sistema inmunitario.
- ii. Pueden permanecer en estado latente en fase de equilibrio mediante el control celular y molecular de la respuesta inmunitaria antitumoral.
- iii. Pueden escapar de la presión inmunitaria y pasar a la fase final del proceso de inmunoección, la fase de escape.

Las dos primeras fases de la inmunoección representan las dianas potenciales para la inmunoterapia. La fase de equilibrio es la más hipotética de las tres y fue originariamente postulada para explicar los largos periodos de latencia desde la transformación inicial de las células malignas hasta la fase de escape y aparición clínica de la enfermedad (Dunn et al. 2004) (Vesely et al. 2011).

Tras las fases de eliminación y equilibrio, la última fase del proceso de inmunoección es la **fase de escape** que representa el fallo del sistema inmunitario tanto para eliminar como para controlar las células malignas transformadas, permitiendo la supervivencia de variantes de las células tumorales. El sistema inmunitario contribuye a la progresión del tumor gracias a la selección de las variantes tumorales menos inmunogénicas, suprimiendo la respuesta inmunitaria antitumoral, o promoviendo la proliferación del cáncer (**Fig. 2**) (Vesely et al. 2011). La interacción entre una población heterogénea de células tumorales que están experimentando rápidas modificaciones genéticas y la constante presión inmunológica ejercida por las células inmunitarias conduce a la selección *Darwiniana* de las variantes de las células tumorales mejor adaptadas para sobrevivir y formar un cáncer detectable clínicamente (**Fig. 2**) (Dunn et al. 2004) (Vesely et al. 2011). Por lo tanto, los tumores pueden ser inmunológicamente esculpidos como resultado del proceso de inmunoección del cáncer, dando lugar a consecuencias dramáticas que se producen probablemente antes de que el tumor pueda ser clínicamente detectado (Dunn et al. 2004).

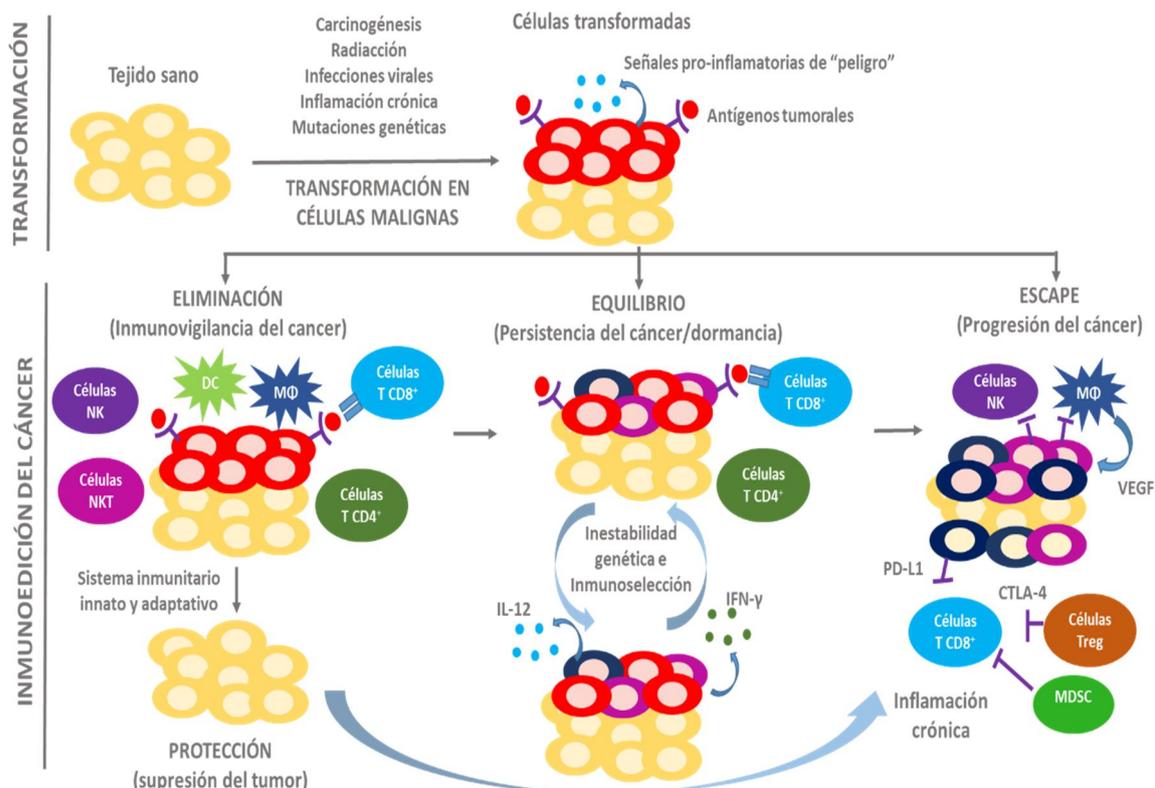


Figura 2. Las tres fases del proceso de inmunoección del cáncer. Las células normales (en amarillo) pueden sufrir modificaciones que las transformen en células tumorales (en rojo). Incluso en estadios tempranos de la oncogénesis, las células transformadas pueden expresar distintos marcadores específicos del tumor y generar un microambiente pro-inflamatorio, lo que inicia el proceso de inmunoección del cáncer. La inmunoección del cáncer está formada por tres fases: eliminación, equilibrio y escape. En la primera fase de eliminación, las células y moléculas del sistema inmunitario innato y adaptativo, que comprenden la “inmunovigilancia del cáncer”, podrían erradicar el desarrollo del tumor. Sin embargo, si la eliminación del tumor no es satisfactoria, las células del tumor podrían entrar en una fase de equilibrio en la que se mantuvieran de manera crónica o bien, podrían ser esculpidas por el sistema inmunitario para generar nuevas variantes de las células tumorales. Estas variantes podrían evadir al sistema inmunitario por el desarrollo de una amplia variedad de mecanismos y la enfermedad sería clínicamente detectable, es lo que se conoce como la fase de escape (Dunn et al. 2004) (Vesely et al. 2011). (Abreviaturas: CTLA-4, proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos; IFN, interferón; IL, interleucina; MΦ, macrófago; MDSC, células supresoras de origen mielóide; NK, natural killer; PD-L1, ligando 1 de muerte celular programada; Treg, célula T reguladora; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial).

1.1.3. Clasificación de los linfomas y mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en linfomas

Los linfomas forman un grupo heterogéneo y amplio que varía dependiendo del tipo de célula maligna y la localización del tumor. Con una mayor frecuencia, tienen su origen en células B y se han descrito dos grupos principales de linfomas: **linfomas de células B de non-Hodgkin (NHL)**, son los más frecuentes, y **linfomas de Hodgkin** (Donnou et al. 2012) (**Fig. 3**). Dentro de los linfomas de células B de non-Hodgkin,

alrededor de la mitad, se clasifican como linfomas difusos de células B grandes (DLBCL), seguido en prevalencia de los linfomas foliculares (FL), los linfomas mediastínicos, los linfomas de la zona marginal y los linfomas de Burkitt (Donnou et al. 2012) (Xie et al. 2015) (**Fig. 3**).

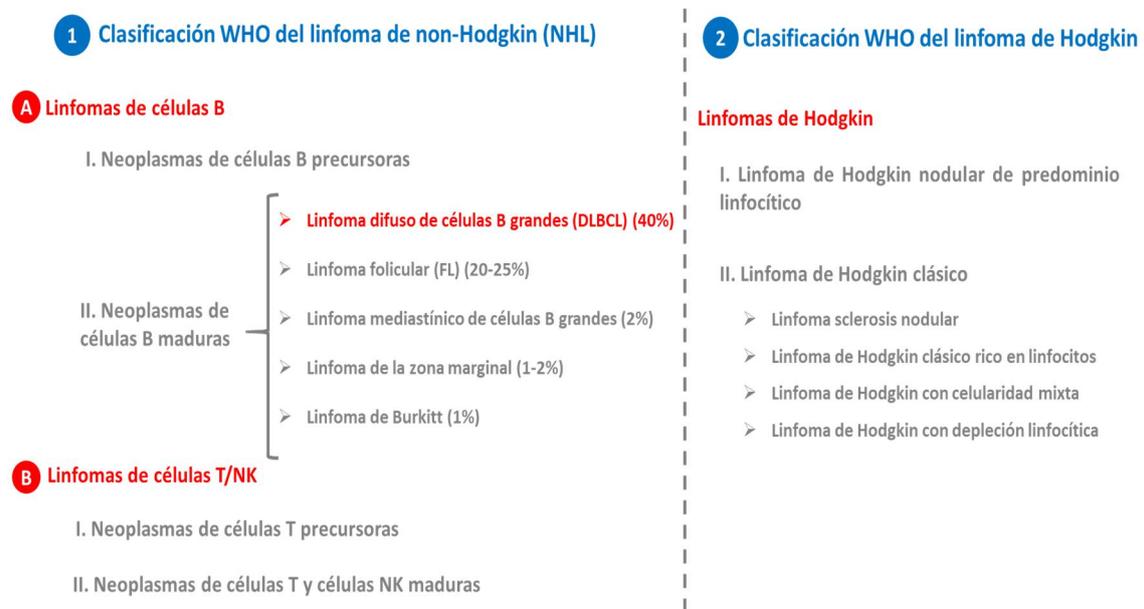


Figura 3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) de los linfomas. La Organización Mundial de la Salud (WHO) clasifica los linfomas en dos grupos principales: (1) linfoma de non-Hodgkin (NHL), que representa el 80%, frente al 15% de los linfomas de Hodgkin (2). Dentro del grupo de los linfomas B de non-Hodgkin, el subtipo más relevante es el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) que aparece en alrededor de un 40% de los casos.

1.1.3.1 Etapas del desarrollo y diferenciación de las células B. Origen del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)

Todos los linajes de linfocitos B surgen de progenitores derivados de células madre hematopoyéticas (HSCs) de la médula ósea (**Fig. 4**) (Janeway A. C., Travers P., Walport M. 2001). El linaje de células B más temprano es conocido como **célula pre-B**, la cual sufre reordenamientos del locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Igs) para convertirse en **célula pro-B**; el segmento D_H se reordena con el segmento J_H para dar lugar a la célula pro-B temprana, a partir de la cual se generará la célula pro-B tardía, en la que el segmento V_H se reorganizará con DJ_H (VDJ_H) (**Fig. 4**) (Busslinger 2004). La unión VDJ_H conduce a la expresión de una cadena pesada μ intacta, dando lugar a la **célula pre-B** que expresa el receptor pre-BCR (pre-receptor de células B) (**Fig. 4**) (Busslinger 2004). La expresión del pre-BCR detiene la reorganización del locus de la

cadena pesada y se inician los reordenamientos de la cadena ligera (Busslinger 2004). Una vez que se ha ensamblado la cadena ligera y que la célula expresa una molécula de IgM completa en su superficie, la célula B se define como **célula B inmadura** (Busslinger 2004). Todas estas etapas del desarrollo tienen lugar en la médula ósea y son independientes de antígeno (Busslinger 2004). Las células B inmaduras se someterán a la selección para garantizar la auto-tolerancia; las células B inmaduras que se unen a antígenos propios en la médula ósea son eliminadas o inactivadas, y posteriormente se seleccionarán en función de su habilidad para sobrevivir en los tejidos linfoides periféricos (Busslinger 2004). Las células B que sobreviven en la periferia se diferenciarán a **células B maduras** que expresan IgD además de IgM (**Fig. 4**) (Busslinger 2004). Estas células B maduras también son llamadas **células B naive o en reposo** hasta que encuentren un antígeno específico, recirculando a través de los tejidos linfáticos periféricos, donde podrían ser activadas de manera apropiada por antígeno (Busslinger 2004).

El marcador B220 (también conocido como CD45R) es expresado a través de los estadios de desarrollo de las células B, desde célula pro-B hasta célula plasmática productora de anticuerpos (**Fig. 4**) (Hardy et al. 2007). B220 es una proteína tirosina fosfatasa que participa en la señalización a través del receptor de células B (Janeway A. C., Travers P., Walport M. 2001). CD19 es otra proteína que también se expresa a lo largo del desarrollo de las células B, y tiene una función similar a B220 (Hardy et al. 2007). Las células pro-B se caracterizan también por la expresión de CD43 (actúa como molécula de adhesión que podría participar en las interacciones célula-célula), la cual se pierde cuando la célula progresa para convertirse en célula B inmadura (**Fig. 4**) (Hardy et al. 2007).

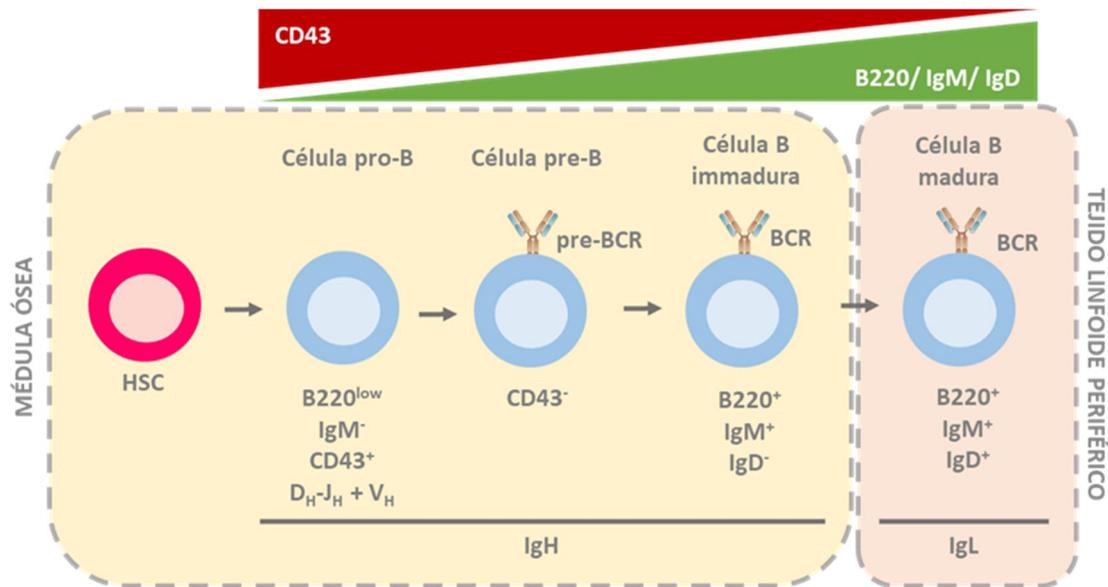


Figura 4. Desarrollo de las células B. Diferentes estadios del desarrollo de las células B a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs) pluripotentes en la médula ósea, desde célula pro-B (B220^{low} IgM⁻ CD43⁺) a célula B inmadura (B220⁺ IgM⁺ IgD⁻) pasando por la célula pre-B (CD43⁻). Las células B inmaduras expresan en su superficie la IgM como receptor de antígeno e interactuarán con antígenos que se encuentren en el ambiente. De esta forma, las células B inmaduras que son estimuladas fuertemente por antígeno son destruidas o inactivadas en un proceso de selección negativa que conduce a la eliminación de las células B auto-reactivas. Las células B inmaduras que sobrevivan a la selección negativa emergen en la periferia y maduran para expresar la IgD además de la IgM. (IgH: cadena de inmunoglobulina pesada e IgL: cadena de inmunoglobulina ligera).

Los linfocitos B se clasifican en base a su ontogenia y localización anatómica principalmente en dos poblaciones: **células B1** (denominadas también células B CD5) y **células B2 o células B convencionales** (denominadas a lo largo del texto como células B) (**Fig. 5**) (Montecino-Rodríguez & Dorshkind 2012) (Hoffman et al. 2016). Las células B1 son una clase de células B atípicas con capacidad de auto-renovación, la mayoría se desarrollan a partir de progenitores B1 en el hígado fetal con escasa aportación de la médula ósea tras el periodo perinatal, y se encuentran con mayor frecuencia en la cavidad peritoneal y pleural en adultos (**Fig. 5**) (Montecino-Rodríguez & Dorshkind 2012). Se diferencian dos subpoblaciones de células B1: las **células B1a** que son CD5⁺ CD11b⁺ IgM⁺ y las **células B1b** que son CD5⁻ CD11b⁺ IgM⁺ (**Fig. 5**) (Montecino-Rodríguez & Dorshkind 2012). Las células B1 presentan un repertorio de reconocimiento mucho más limitado de receptores que las células B2, y responden principalmente a antígenos polisacáridos de bacterias produciendo anticuerpos de clase IgM, sin necesidad de co-estimulación por parte de células T, por lo que forman parte del sistema inmunitario innato (Montecino-Rodríguez & Dorshkind 2012) (Hoffman et al. 2016). Las células B2 o células B convencionales están presentes en los órganos linfoides secundarios y son

considerados mediadores de la inmunidad adaptativa (Montecino-Rodriguez & Dorshkind 2012). Las células B inmaduras IgM^+ migran al bazo donde se convertirán en células B2 transicionales 1 (**T1**) ($CD21^-$ (receptor para el fragmento C3d del complemento, forma parte junto con CD19 y CD81 del receptor de células B), $CD23^-$ (lecitina tipo C) e IgM^{high}) y transicionales 2 (**T2**) ($CD21^+ CD23^+ IgM^{high}$), estas últimas se pueden diferenciar en el linaje de **célula B folicular (FO)** ($CD21^+ CD23^+ IgM^{high}$) en los nódulos linfáticos o en el linaje de **célula B de la zona marginal (MZ)** ($CD21^- CD23^- IgM^{high}$) en el bazo (**Fig. 5**) (Montecino-Rodriguez & Dorshkind 2012) (Hoffman et al. 2016). Las células B de la zona marginal (MZ) de la pulpa blanca del bazo son una población única de células no recirculantes, y a diferencia de las células B foliculares, expresan niveles bajos de CD23 (Batista & Harwood 2009). Las células B foliculares (FO) se tratan de células B en reposo, y cuando son activadas por las células T *helper* foliculares (T_{FH}) dan lugar a la formación de los centros germinales (GC) o folículos secundarios (**Fig. 5**) (Lieping Chen and Dallas B. Flies 2013). Las células B del centro germinal (GC) pueden diferenciarse en **células B de memoria y células plasmáticas (PCs)** productoras de anticuerpos de vida larga o corta (**Fig. 5**) (De Silva & Klein 2015). Las células B de memoria son células de vida larga y antígeno específicas que presentan una tasa de división muy baja (De Silva & Klein 2015). Las células B de memoria expresan anticuerpos de alta afinidad y se pueden diferenciar rápidamente en células plasmáticas en respuestas de recuerdo a antígeno (De Silva & Klein 2015).

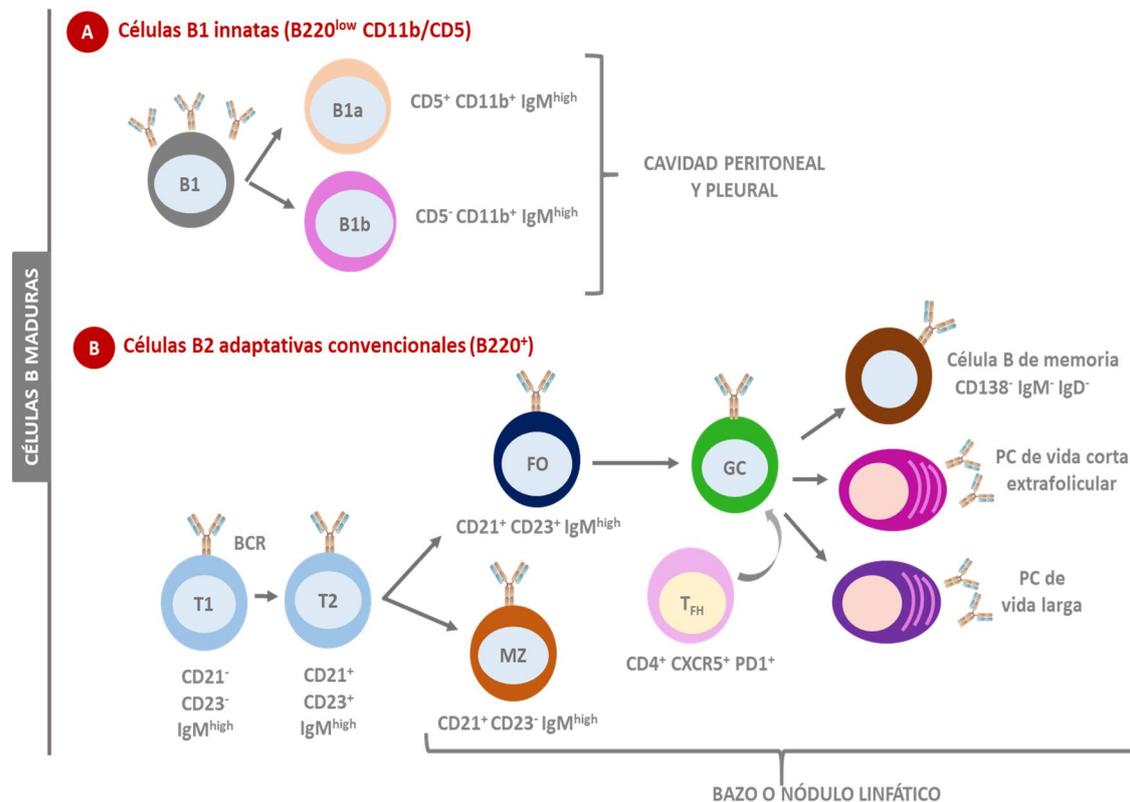


Figura 5. Células B maduras: células B1 innatas y células B2 adaptativas convencionales. Los linfocitos B se diferencian en dos linajes: el linaje de las células B1 innatas y el linaje de las células B2 adaptativas convencionales. Las células B1 se pueden diferenciar en dos tipos, las células B1a (CD5⁺ CD11b⁺ IgM^{high}) y las células B1b (CD5⁻ CD11b⁺ IgM^{high}). Las células B2 adaptativas convencionales (B220⁺) se pueden diferenciar a células B foliculares (FO) (CD21⁺ CD23⁺ IgM^{high}) en el bazo o nódulo linfático y a célula B de la zona marginal (MZ) (CD21⁺ CD23⁻ IgM^{high}) en el bazo. Las células B foliculares (FO) pueden ser activadas mediante el reconocimiento de antígeno y la acción de las células T *helper* foliculares (T_{FH}) (CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺) para dar lugar a la formación de las células B del centro germinal (GC), las cuales se podrán diferenciar en células B de memoria (CD138⁻ IgM⁺ IgD⁻), en célula plasmática (PC) de vida larga o de vida corta extracelular.

El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (apartado 1.1.3.2) es el grupo al que pertenece la línea celular A20 de linfoma B murino (apartado 1.1.4.) objeto de estudio de mi tesis doctoral, y deriva de células B maduras que expresan los marcadores CD19, CD20, CD22, CD79a, y el factor de transcripción PAX5 (Boyd et al. 2013) (Li et al. 2018). CD19 es un marcador expresado por las células B en las etapas tempranas de su desarrollo, forma parte del co-receptor de células B (CD19/CD21/CD81) y contribuye a la señalización mediada por el receptor (Cherukuri et al. 2001). CD20 es una proteína de transmembrana que podría formar canales de Ca²⁺ y jugar un papel en la regulación de la activación de las células B (Cherukuri et al. 2001). La ausencia de expresión de CD20 en una pequeña proporción de los DLBCLs está relacionado con una mayor agresividad y resistencia a los tratamientos quimioterápicos, y un peor pronóstico de la enfermedad

(Castillo et al. 2015). CD22 es un receptor inhibitor de la señalización a través del BCR y es expresado en etapas tempranas, después de la expresión de B220 pero antes de la expresión de IgM e IgD (Moyron-Quiroz et al. 2002). En el 50-70% de los casos de DLBCL expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas, con mayor frecuencia IgM seguido por IgG e IgA (Li et al. 2018). La línea celular de linfoma B murino A20 (apartado 1.1.4), objeto de estudio de mi tesis doctoral, expresa en su superficie la inmunoglobulina IgG1 (Todo et al. 2014). CD79a (Ig α) y CD79b (Ig β) se asocian con IgM para formar el complejo del receptor de células B funcional (Lebien et al. 2008). CD79a y CD79b transducen señales desde el receptor mediante la interacción con tirosinas quinasas a través de su dominio citoplasmático que contiene dominios ITAM (Vendel et al. 2009). Los dominios ITAM, una vez fosforilados, reclutan la proteína tirosina quinasa Syk, la cual es fosforilada por la proteína tirosina quinasa Lyn y media la señalización *downstream* que conduce a la activación de la proliferación y diferenciación de las células B (Vendel et al. 2009). CD79a (Ig α) y CD79b (Ig β) son expresados desde el estadio de célula pro-B hasta la muerte de la célula o su diferenciación en célula plasmática productora de anticuerpos (Koyama et al. 1997) (Luger et al. 2013). PAX-5 es un factor de transcripción importante, conocido como la proteína activadora específica del linaje de células B (BSAP), necesario para la diferenciación de las células pro-B a los diferentes linajes de célula B (Lebien et al. 2008).

1.1.3.2. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)

El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) es la forma más común y agresiva de los linfomas de non-Hodgkin, y tiene su origen en los linfocitos B maduros (Alizadeh et al. 2000). La reorganización de los genes de inmunoglobulinas en DLBCL y en la mayoría de los linfomas de non-Hodgkin presentan mutaciones características del proceso de hipermutación somática y los mecanismos normales de diversificación para la producción de anticuerpos, que ocurren en los centros germinales (GCs) de los órganos linfoides secundarios (punto que desarrollamos con más detalle en el apartado 1.2.1.1) (Alizadeh et al. 2000). Estas evidencias sugieren que el DLBCL procede de células B del centro germinal o de células B en el último estadio de diferenciación (Alizadeh et al. 2000). Este tipo de linfoma puede aparecer de *novo* o ser el resultado de la progresión o transformación de una célula B maligna de bajo grado, como ocurre en el linfoma folicular (FL) o en la leucemia linfocítica crónica (CLL). Los pacientes pueden presentar

enfermedades en los nódulos linfáticos o de manera extranodal. Los sitios extranodales suelen incluir el tracto gastrointestinal y el hígado, los huesos, los testículos, el bazo, el tiroides, y los pulmones (Xie et al. 2015) (Loddenkemper et al. 2007). Podemos establecer tres **subtipos de DLBCL** desde el punto de vista del patrón de expresión de genes indicativos de los diferentes estadios de diferenciación de las células B (Xie et al. 2015) (Alizadeh et al. 2000):

i. DLBCL formados por células del centro germinal (GCB). Casi todos los genes que definen estas células están altamente expresados en las células normales del centro germinal. Se caracterizan por expresar altos niveles del factor represor de la transcripción (BCL6) e hipermutaciones en genes de las inmunoglobulinas.

ii. DLBCL formados por células B activadas (ABC) que muestran funcionales las vías de señalización a través de BCR y NF- κ B, y un aumento en la expresión de los genes requeridos para la diferenciación plasmocítica, como es el factor 4 regulador del interferón (IRF4). La expresión de IRF4 es inducida de manera transitoria durante la activación linfocitaria normal y es crítico durante la proliferación de los linfocitos B en respuesta a la señal procedente del receptor de antígeno. La expresión constitutiva de IRF4 en este tipo de tumores contribuye a la proliferación descontrolada de las células malignas.

iii. DLBCL que presentan células B derivadas del timo. Estas células expresan CD20 y CD79a (marcadores de células B), pero no expresan inmunoglobulinas de superficie.

1.1.3.3. Mecanismos de escape de los linfomas a la respuesta inmunitaria antitumoral

Las interacciones entre las células de linfoma y el microambiente contribuyen al escape de la respuesta inmunitaria por parte de las células tumorales. Estos mecanismos de evasión incluyen alteraciones en la expresión de moléculas de superficie capaces de modular la interacción con las células implicadas en la respuesta inmunitaria antitumoral (Scott & Gascoyne 2014). Los cánceres del linaje hematopoyético se desarrollan en microambientes de tejidos especializados, tales como la médula ósea u otros órganos linfoides. Este microambiente está caracterizado por diferentes poblaciones de células estromales y células leucocitarias que interactúan con las células malignas y

promueven su crecimiento. Las células malignas del linaje hematopoyético presentan diferentes grados de dependencia de las señales del microambiente. Además, la afinidad y dependencia de las **células del estroma** para el crecimiento y progresión del tumor puede cambiar con el tiempo, con la evolución de sub-clones dependientes o independientes del estroma (Burger et al. 2009). Las diferentes **formas de escape** a la acción del sistema inmunitario características de los linfomas son las siguientes (**Fig. 6**):

i. **Alteraciones en la maquinaria de presentación antigénica.** Una de las estrategias más comunes de los tumores para escapar al reconocimiento por parte de las células T efectoras es la alteración en la presentación antigénica (Upadhyay et al. 2015). Las células de linfoma de tipo B pueden actuar como células presentadoras de antígeno profesionales que expresan MHC de clase II en su superficie, lo que permite la presentación de antígeno y la re-estimulación de las células T CD4⁺ antígeno específicas, si bien generalmente han adquirido alteraciones genéticas que disminuyen o eliminan la expresión de la maquinaria de presentación antigénica (**Fig. 6**) (Upadhyay et al. 2015). La pérdida de expresión del MHC de clase II contribuye a la evasión del sistema inmunitario al disminuir la presentación de los antígenos asociados al tumor por las células de linfoma B a las células T CD4⁺ *helper*, las cuales a su vez, activan a las células T CD8⁺ citotóxicas. Más de la mitad de los linfomas difusos de células B grandes (DLBCL) presentan una pérdida parcial o completa de la expresión de MHC de clase I y II; este hecho está correlacionado con el bajo número de linfocitos T infiltrantes en el tumor (TILs) y es uno de los principales mecanismos de evasión inmunitaria en linfomas (**Fig. 6**) (Scott & Gascoyne 2014) (Upadhyay et al. 2015). También han sido identificadas mutaciones en la $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$) en el 75% de los casos de DLBCL, que se asocia con la cadena α del MHC de clase I (requerido para el reconocimiento de las células tumorales por parte de las células T CD8⁺) y es necesaria para su expresión en membrana para conferir estabilidad a la hendidura de unión del péptido (**Fig. 6**) (Scott & Gascoyne 2014). El 75% de los tumores DLBCLs muestran la eliminación de la expresión en superficie de $\beta 2m$ (Scott & Gascoyne 2014) (Upadhyay et al. 2015). Las células NK (*natural killer*) son linfocitos derivados de la médula ósea, distintos de las células T y B, capaces de lisar células tumorales y patógenos sin necesidad de sensibilización previa; y por ello son considerados como la primera línea de defensa innata (Yokoyama & Kim 2006). Debido a esta capacidad intrínseca, las células NK deben ser controladas para impedir la destrucción de células normales y para el mantenimiento de la tolerancia

(Yokoyama & Kim 2006). Las funciones efectoras de las células NK son inhibidas por el reconocimiento de moléculas de MHC de clase I, expresadas por las células normales, por parte de receptores inhibidores en la superficie de las células NK (Yokoyama & Kim 2006). La ausencia o la disminución de los niveles de expresión de moléculas de MHC de clase I por ciertos tipos celulares, como las células tumorales, conduce a su destrucción por las células NK (Ljunggren & Karre 1990). Este hecho fue observado por primera vez en el rechazo mediado por las células NK de trasplantes alogénicos de linfoma y médula ósea (por ejemplo un individuo con haplotipo H-2^{a/a} rechaza trasplantes con haplotipo H-2^{b/b}), y en el fenómeno denominado “**resistencia híbrida**” descrito inicialmente por Cudkowitz y Bennett (Ljunggren & Karre 1990) (Rolstad 2014) (Bennett et al. 1995). La “resistencia híbrida” hace referencia al rechazo, mediado por las células NK de un animal híbrido F1, de trasplantes de médula ósea o de linfoma procedentes de cualquiera de los progenitores parentales (Yokoyama & Kim 2006) (Ljunggren & Karre 1990) (Rolstad 2014). Las células NK del hospedador con haplotipo H-2^{a/b} son capaces de lisar las células de médula ósea o de linfoma trasplantadas con haplotipo H-2^{b/b} (Yokoyama & Kim 2006) (Ljunggren & Karre 1990) (Rolstad 2014). El injerto no expresa al menos uno de los alelos H-2 de clase I del hospedador, lo que es suficiente para su reconocimiento y eliminación por las células NK activadas a través de la señalización positiva mediada por el alelo H-2^a “no propio” (Ljunggren & Karre 1990) (Bennett et al. 1995). Muchos de los linfomas han perdido también la expresión en superficie de CD58, un ligando del receptor CD2 involucrado en el reconocimiento y destrucción de las células tumorales a través de la activación de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos. La ausencia de manera conjunta de $\beta 2m$ y de CD58, sugiere que estas modificaciones han sido co-seleccionados durante el proceso de evasión del sistema inmunitario (Scott & Gascoyne 2014).

ii. **Moléculas co-estimuladoras y receptores co-inhibidores.** Una vez que las células tumorales han sido reconocidas por los linfocitos, las vías co-estimuladoras son otras de las dianas clave en el fallo de la respuesta inmunitaria antitumoral (**Fig. 6**). Los linfomas buscan inhibir la activación citotóxica de las células T empleando las moléculas y receptores inhibitorios, cuya expresión es inducida en condiciones fisiológicas para detener la respuesta inmunitaria manteniendo el balance entre la activación de la respuesta inmunitaria y la supresión de la autoinmunidad. La familia de moléculas B7 es una de las más importantes mediadoras en la co-estimulación de las células T, durante la segunda señal de activación, después del reconocimiento antigénico. Los niveles de expresión de

las moléculas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), ligandos para la activación del receptor CD28 (la interacción entre CD80/CD86 con el receptor CD28 en las células T induce la expresión de la subunidad α del receptor IL-2R y de IL-2, que actúa como factor autocrino estimulando la expansión clonal, diferenciación y adquisición de funciones efectoras por las células T (Jain & Pasare 2017)), varían dependiendo del tipo de linfoma (Upadhyay et al. 2015). Por ejemplo, en el modelo de linfoma murino A20, las células B no expresan CD80 en su superficie (Upadhyay et al. 2015). En los linfomas DLBCL, la pérdida de expresión de CD86 está relacionada con el descenso en el número de linfocitos infiltrantes del tumor (Upadhyay et al. 2015). Otro de los mecanismos empleados por el tumor es inducir una mayor expresión de CTLA-4 en las células T; la afinidad de CTLA-4 por su unión a CD80/CD86 es entre 10-40 veces mayor que la del receptor de activación CD28 (Mocellin et al. 2013), inhibiendo las repuestas mediadas por las células T efectoras (**Fig. 6**).

Hay un receptor que posee un interés especial como diana terapéutica porque se ha visto frecuentemente mutado en DLBCLs, y estas mutaciones se han relacionado directamente con un peor pronóstico de la enfermedad (Upadhyay et al. 2015) (Sun et al. 2009) (Pasero et al. 2012) (Pasero & Olive 2013). Se trata del mediador de la entrada en la célula de los *herpesvirus*, HVEM (perteneciente a la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral, TNFRSF14) (Upadhyay et al. 2015) (M. L. del Rio et al. 2010). HVEM puede actuar como una molécula señalizadora bidireccional, interactuando con ligandos como el atenuador de linfocitos B y T (BTLA), TNFSF14 (LIGHT), y CD160 expresados en los linfocitos T y células NK (Upadhyay et al. 2015). Una característica clave de HVEM es su predominante función inhibidora de la activación de las células T promoviendo la tolerancia inmunitaria cuando se une a BTLA y CD160 (**Fig. 6**) (Wang et al. 2005). Por el contrario, la interacción HVEM-CD160 en las células NK activadas promueve su función citotóxica a través de la estimulación de la producción de citoquinas, como IFN- γ , que activan a su vez a otras células NK, linfocitos, macrófagos, y neutrófilos (Tu et al. 2015). Las formas solubles de BTLA y CD160 pueden estimular la expresión de NF- κ B en las células T que expresan HVEM (de manera similar al ligando canónico LIGHT), promoviendo su supervivencia (Cheung et al. 2009). La vía HVEM/BTLA/CD160 es un mecanismo de escape a la respuesta inmunitaria muy empleado por los linfomas. Por esta razón, HVEM y su vía de señalización inhibitoria

son el objeto de mi estudio y sobre ellos entraré mucho más en detalle en el apartado 1.2.4.

iii. **Moléculas efectoras.** Tras la activación de las células blanco T efectoras, uno de los principales mecanismos por el cual se induce la apoptosis es la vía de interacción Fas ligando (FasL)-Fas receptor (FasR) (CD95L-CD95) (Upadhyay et al. 2015) (**Fig. 6**). Los linfomas de células B que se desarrollan en ratones inmunocompetentes expresan niveles bajos del receptor Fas comparado con lo que ocurre en ratones inmunodeficientes (Upadhyay et al. 2015). Estas observaciones indican que la interacción FasL-FasR es importante en la eliminación de los linfomas por parte de las células T citotóxicas, y los linfomas pueden volverse más resistentes a la apoptosis mediante la disminución en la expresión del receptor Fas (Upadhyay et al. 2015). Por otro lado, el aumento de la expresión del FasR en las células T tras la activación antigénica y la expansión clonal puede ser empleado por los linfomas, los cuales aumentan la expresión de FasL, induciendo la apoptosis de los linfocitos infiltrantes (Upadhyay et al. 2015) (**Fig. 6**).

iv. **Células inmunosupresoras en el microambiente del tumor.** El microambiente tumoral de los linfomas de células B presenta un amplio número de células inmunitarias, células del estroma, vasos sanguíneos y matriz extracelular. La relación entre las células de la sangre neoplásicas y el microambiente tiene tres principales patrones (Scott & Gascoyne 2014) (Burger et al. 2009):

- El primer patrón denominado “**re-educación**” tiene como ejemplo el linfoma folicular que afecta predominantemente a los nódulos linfáticos, en los cuales las células malignas presentan un grado sustancial de dependencia por el microambiente, del que recibe señales de supervivencia y proliferación desde el principio de la enfermedad. En muchos casos, la composición y organización del microambiente tumoral se parece a la del tejido linfoide normal, con nódulos neoplásicos surgiendo de los centros germinales reactivos acompañadas de células dendríticas foliculares y células T *helper* foliculares.
- El segundo patrón conocido como “**reclutamiento**” se observa en el linfoma clásico de Hodgkin, en el que el microambiente tumoral está formado por células no malignas que apoyan el desarrollo del linfoma y que son diferentes de las que componen el tejido normal. Las células

neoplásicas participan en interacciones con el estroma que les proporcionan señales de proliferación.

- El tercer patrón llamado “**borrado**” podría ser referido como la pérdida de la interacción con el microambiente. Ocurre cuando las células transformadas son provistas de anormalidades genéticas que les otorgan una gran ventaja proliferativa, haciéndolas en gran parte autónomas e independientes de las señales del microambiente. Un ejemplo típico es el linfoma de Burkitt, donde prácticamente todas las células B malignas tienen mayor capacidad de proliferación debido a translocaciones cromosomales que conducen a la activación permanente de genes mitóticos como *c-myc*.

La composición del microambiente del tumor está definida por remanentes del tejido linfoide normal, junto con células malignas y la respuesta inmunitaria inflamatoria del hospedador. Las evidencias muestran que las células malignas influyen activamente en la composición del microambiente tumoral colonizando nichos que presentan células de apoyo y reclutando células inmunosupresoras y/o afectando a su diferenciación (**Fig. 6**) (Scott & Gascoyne 2014).

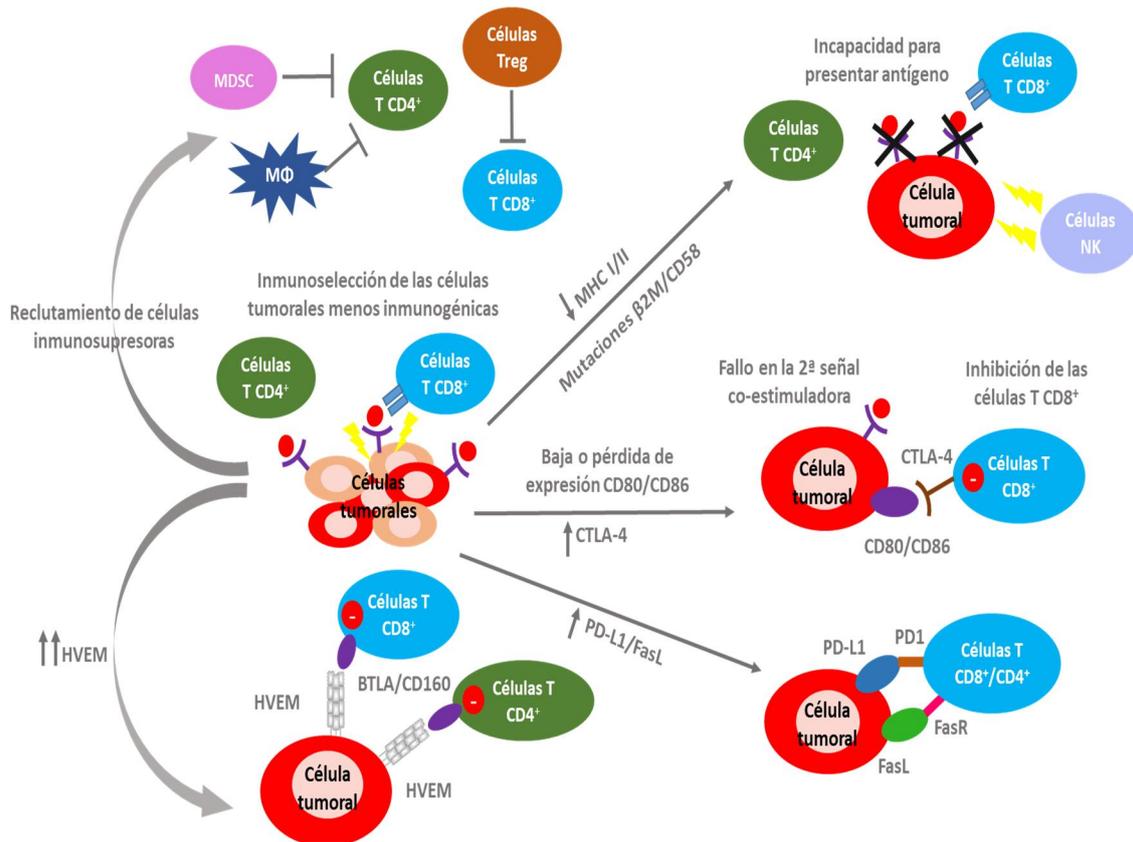


Figura 6. Mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en linfomas. El sistema inmunitario ejerce una presión selectiva sobre el tumor, eliminando aquellas células que son más inmunogénicas y dejando otras variantes de células tumorales más resistentes a la acción del sistema inmunitario (inmunoselección). Las modificaciones que adquieren las células tumorales para evadir la acción del sistema inmunitario son: la disminución en la capacidad de presentación antigénica (a través del descenso en la expresión de MHC I/II), aunque la disminución en la expresión o la eliminación del MHC de clase I puede conducir a la lisis mediada por la activación de las células NK; incapacidad para la activación de las células T efectoras debido al fallo en la segunda señal co-estimuladora, a causa de una disminución o falta de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86; aumento de la expresión en los linfocitos T CD8 de la molécula inhibidora CTLA-4 que se unirá a CD80/CD86 con una gran afinidad inhibiendo la acción de las células T CD8; incremento de la expresión por parte de las células tumorales de PD-L1 y Fas-L que inducen la apoptosis de las células T. Por otro lado, el receptor co-inhibidor de células T HVEM (vía HVEM/BTLA/CD160) es una diana potencial de estudio, ya que se encuentra sobre-expresado en muchos tipos de linfomas difusos de células B grandes y está directamente relacionado con una mayor progresión de la enfermedad. También tiene lugar un reclutamiento de células inmunosupresoras como son las células supresoras de origen mieloide (MDSC), los macrófagos (MΦ) polarizados a M2, y por lo tanto, capaces de inhibir a las células T o las células T reguladoras (Tregs) que pueden también inhibir a las células T CD8 mediante la expresión de CTLA-4.

1.1.4. Línea celular A20 de linfoma B murino de non-Hodgkin

La línea celular utilizada en el desarrollo de mi tesis es la línea de linfoma B murino A20, que fue establecida y caracterizada por primera vez en 1979 por K. Jin Kim et al. (Kim et al. 1979). Se trata de un tumor de linfocitos B cuyo origen es espontáneo a

partir de una célula neoplásica aislada de un ratón Balb/cAnN de edad avanzada, y pertenece al grupo de linfomas difusos de células B grandes (DLBCL) (Donnou et al. 2012) (Passineau 2005).

1.1.4.1. Origen y características fenotípicas de la línea celular trasplantable de linfoma B murino A20 y su desarrollo tumoral

El modelo animal de linfoma B murino A20 se desarrolla al inyectar por la vía intravenosa la línea celular trasplantable a ratones singénicos Balb/c que mimetiza el crecimiento histopatológico y las características citomorfológicas de los linfomas de célula B humanos (Passineau 2005). Los modelos singénicos preservan el sistema inmunitario natural del hospedador, esto es una consideración importante en el contexto de los linfomas, ya que están estrechamente relacionados con el sistema inmunitario (Passineau 2005). La inoculación intravenosa de la línea celular A20 murina se asemeja a la agresiva distribución de los linfomas humanos. Las células de linfoma B A20 invaden de manera masiva e inmediata los órganos linfoides secundarios, al contrario de lo que ocurre en los modelos de inoculación subcutánea (Chaise et al. 2007). En el hígado, se detectan nódulos blancos prominentes en la superficie, así como en el bazo en los estadios avanzados de la diseminación tumoral. Dependiendo del tamaño y su localización, estas lesiones pueden causar un agrandamiento del abdomen, palpable sobre todo en los últimos estadios de la enfermedad (Chaise et al. 2007). Anatómicamente, la difusión del linfoma de células B en los huesos involucra el fémur, la pelvis y la columna vertebral, en orden de frecuencia. La parálisis de los miembros posteriores en estadios tardíos es un indicativo de la compresión de los nervios periféricos producida por el desarrollo del tumor en el sistema linfático (Passineau 2005). Histológicamente, el patrón de diseminación del tumor consiste en una infiltración homogénea y difusa de células tumorales grandes y cohesivas que presentan un citoplasma moderado y núcleo pleomórfico que contiene cromatina clara y múltiples nucléolos de tamaño medio (Chaise et al. 2007).

Las células de linfoma B A20 se caracterizan por presentar elevados niveles de expresión del MHC de clase II, similares a los de las células dendríticas (las células presentadoras de antígeno por excelencia) (Sotomayor et al. 2001), altos niveles de expresión de CD40 y CD86 y niveles bajos de expresión de moléculas co-estimuladoras como 4-1BBL involucradas en la co-estimulación secundaria de las células T (Elpek et

al. 2007). Sin embargo, la expresión de CD80 en la superficie de las células A20 no ha sido detectada (Elpek et al. 2007). La ausencia de expresión de CD80 es muy significativa porque se ha visto que su expresión forzada en superficie mediante manipulación genética resulta en una elevada inmunogenicidad y regresión del tumor en modelos murinos Balb/c singénicos (Elpek et al. 2007). Las células A20 también se caracterizan por expresar elevados niveles de la molécula co-inhibidora PD-L1, que está implicada en los mecanismos de evasión del sistema inmunitario por parte del tumor (Elpek et al. 2007). Además, las células A20 expresan bajos niveles de citoquinas como IL-2, IL-4, e IFN- γ , niveles moderados de TGF- β y altos niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Elpek et al. 2007).

1.2. Respuesta inmunitaria antitumoral

A William B. Coley, un cirujano de Nueva York, se le atribuye con frecuencia el mérito de ser el primero en reconocer el potencial papel del sistema inmunitario en el tratamiento del cáncer (Adam et al. 2003), al observar que algunos de sus pacientes con sarcoma experimentaban una regresión espontánea de la enfermedad tras la inoculación intratumoral de las bacterias *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* muertas (también conocida bajo el nombre de la toxina de Coley) (Schuster et al. 2006). Sin embargo, no fue hasta 1976 cuando se empezaron a hacer estudios más detallados de cómo se producía el reconocimiento y rechazo del tumor a nivel molecular y celular (Adam et al. 2003).

El sistema inmunitario de mamíferos está compuesto por muchos tipos celulares y mediadores que interaccionan con las células no-inmunitarias para asegurar la protección frente a patógenos extraños, mientras que simultáneamente mantienen la tolerancia frente a los antígenos propios (De Visser et al. 2006). Basándose en la especificidad por el antígeno y en el momento de la activación, el sistema inmunitario se puede diferenciar en innato y adaptativo (De Visser et al. 2006). Los macrófagos y los neutrófilos del sistema inmunitario innato conforman la primera línea de defensa frente a microorganismos y son esenciales para el control de las infecciones bacterianas comunes (Jain & Pasare 2017). Las células del sistema inmunitario adaptativo (linfocitos T y B) proporcionan una defensa más versátil e incrementan la protección frente a una segunda infección por el mismo patógeno (Jain & Pasare 2017). Por su parte, las células del sistema inmunitario innato juegan un papel crucial en la eliminación de los patógenos y en la iniciación de la

respuesta inmunitaria adaptativa. Además, la respuesta inmunitaria adaptativa tarda una media de 4-7 días en producirse, por lo que el sistema inmunitario innato es crítico para el control de procesos infecciosos y contener al patógeno mientras se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa (De Visser et al. 2006).

1.2.1. Tipos de respuesta inmunitaria: humoral y celular

1.2.1.1. Respuesta inmunitaria humoral

La respuesta inmunitaria humoral está formada por dos componentes principales que son los anticuerpos producidos por los linfocitos B y las proteínas de la cascada de complemento (Wilson & Schooley 2017) (Tan & Coussens 2007). Los **anticuerpos** pertenecen a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF) y se caracterizan por presentar una región constante y otra variable, que se organizan adquiriendo la forma Y (Schroeder & Cavacini 2010). La región variable establece la especificidad de unión por el antígeno (está formada por los dos brazos de la configuración Y del anticuerpo y se trata de dos sitios de unión al antígeno idénticos) (Schroeder & Cavacini 2010). La región constante determina cómo será eliminado el patógeno una vez que se ha unido al anticuerpo, es decir, establece la actividad efectora del anticuerpo (isotipo de las Igs) (Schroeder & Cavacini 2010). Cada anticuerpo se caracteriza por presentar dos lados simétricos formados por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Ambas cadenas, pesada y ligera, forman los dominios variable y constante; las regiones variables combinan la cadena pesada y la ligera para formar el sitio de unión del antígeno (Schroeder & Cavacini 2010). Los anticuerpos son producidos por las células B activadas y tienen como misión destruir microorganismos patógenos extracelulares y prevenir su entrada en el interior de la célula (Schroeder & Cavacini 2010). La entrada en los nódulos linfáticos de células presentadoras de antígeno (APCs) portadoras de péptidos antigénicos procesados y presentados a través del MHC de clase II, o bien de antígenos conformacionales que no han sido procesados que migran pasivamente por el drenaje linfático aferente (Scott & Gascoyne 2014). Los nódulos linfáticos están formados por folículos (zona B) (compuestos mayoritariamente por células B *naive*) y áreas ricas en células T (zona T) bordeando los folículos (Scott & Gascoyne 2014). Los centros germinales (GCs) o folículos secundarios son estructuras transitorias que se forman dentro de los folículos primarios de los órganos linfoides periféricos en respuesta a

antígeno y juegan un papel crítico en la respuesta inmunitaria humoral (De Silva & Klein 2015). En los folículos primarios, las células B pueden interactuar a través de su receptor de tipo inmunoglobulina (BCR) con estructuras conformacionales del antígeno que configuran epítomos o determinantes antigénicos (**Fig. 7A**) (Scott & Gascoyne 2014) (De Silva & Klein 2015). En el contexto de la inmunidad humoral antitumoral, las células B pueden ser activadas a través del reconocimiento de epítomos no propios presentes en las células tumorales (Adam et al. 2003). El BCR de las células B lleva a cabo la señalización intracelular cuando se une el antígeno, y lo conducirá al interior de la célula para ser degradado y presentado como péptidos en el contexto del MHC de clase II (Batista & Harwood 2009). Las células B internalizan antígeno soluble, lo procesan y presentan a las células T CD4⁺ *helper* antígeno-específicas a través del MHC de clase II (*cognate recognition*), estimulando la producción de citoquinas que inducirán la proliferación de las células B y posterior diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (**Fig. 7A**) (Batista & Harwood 2009). Para que las células T CD4⁺ *helper* puedan inducir la maduración de las células B, necesitan haber sido previamente activadas a través del reconocimiento del mismo péptido en el contexto del MHC de clase II en las células dendríticas (DCs) (Batista & Harwood 2009). Las células dendríticas (DCs) son las únicas células presentadoras de antígeno (APCs) capaces de estimular a las células T *naive* y, una vez estimuladas, las células B podrían re-estimular a las células T (Batista & Harwood 2009). La competición de las células B con distintas afinidades por diferentes epítomos de un antígeno determina la selección de las células B, cuyo BCR presente una mayor afinidad y por tanto una ventaja competitiva de supervivencia, para su completo desarrollo en los centros germinales (GCs) (**Fig. 7B**) (Scott & Gascoyne 2014). Los GCs son sitios de maduración de la afinidad, en los cuales se produce la proliferación de células B antígeno específicas, la hipermutación somática (SHM) de genes de inmunoglobulinas (proceso por el cual son introducidas mutaciones puntuales en la cadena pesada o ligera de regiones variables (IgV) que pueden resultar en un cambio en la expresión de la proteína que altere la afinidad o especificidad por el antígeno), la selección de las variantes de células B que expresen BCR de alta afinidad y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (**Fig. 7C**) (De Silva & Klein 2015). Las células B proliferan en la zona oscura del GC, y son seleccionadas para mejorar su afinidad de unión por antígeno (diferenciación completa) a través de interacciones con células dendríticas foliculares (FDCs) y células T *helper* foliculares (T_{FH}) dentro de la zona clara (**Fig. 7C**) (De Silva & Klein 2015). Tras la selección positiva, una subpoblación de células

B de la zona clara es instruida para re-circular a la zona oscura, mientras que otras células B incapaces de capturar suficiente antígeno son eliminadas mediante apoptosis (**Fig. 7C**) (De Silva & Klein 2015). El proceso de re-circulación es llevado a cabo a través de la expresión de receptores de quimiocinas en las células B (CXCR4 o CXCR5) y el enriquecimiento en sus respectivos ligandos (CXCL12 y CXCL13) producidos por las células del estroma, en las zonas clara y oscura, respectivamente (Scott & Gascoyne 2014) (De Silva & Klein 2015). Las células B de la zona clara pueden ser sometidas a un proceso de recombinación *class-switch* de los genes inmunoglobulina (CSR) (por el cual, las células B cambian el isotipo de las inmunoglobulinas para generar anticuerpos con diferentes funciones efectoras) antes del proceso de re-circulación zona clara-zona oscura (De Silva & Klein 2015). El proceso de re-circulación facilita que se produzcan rondas de mutación y selección, que en un corto periodo de tiempo, conducen a la generación de células B de memoria de alta afinidad y células plasmáticas (**Fig. 7C**) (De Silva & Klein 2015). La salida de los GCs como células plasmáticas productoras de anticuerpos involucra la estimulación de la expresión del factor regulador de interferón 4 (IRF4), que conduce a la disminución de la expresión de BCL-6 (represor transcripcional de la activación de las células B, y regulador negativo de la diferenciación de las células B en células B de memoria y células plasmáticas) y al aumento en la expresión de factores de transcripción (Scott & Gascoyne 2014) (De Silva & Klein 2015).

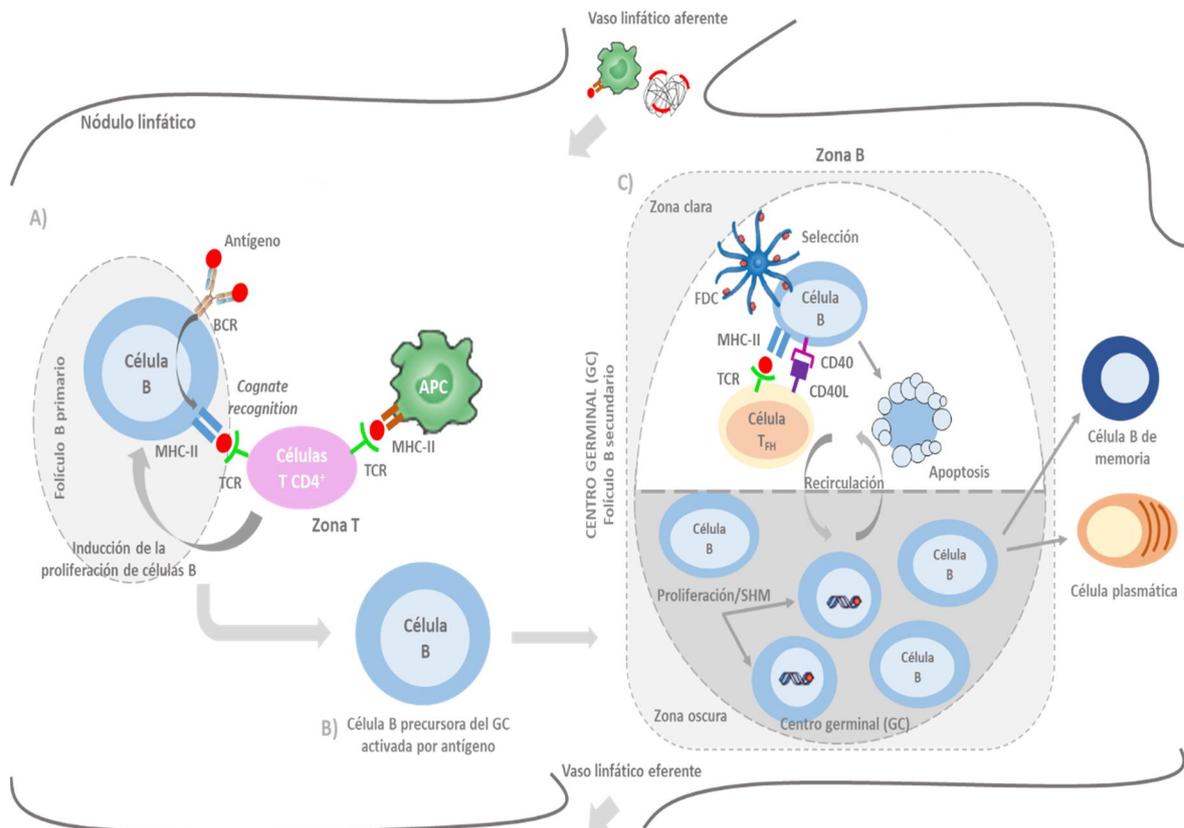


Figura 7. Respuesta inmunitaria humoral. La respuesta inmunitaria humoral depende de los procesos que tienen lugar en los centros germinales (GCs) de los folículos de los órganos linfoides periféricos, que conducen a la formación de células B de memoria de alta afinidad y células plasmáticas (productoras de anticuerpos) (De Silva & Klein 2015). (Abreviaturas: MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; BCR, receptor de células B; TCR, receptor de células T; SHM, hipermutación somática; GC, centro germinal; CD40L, CD40 ligando; Célula T_{FH}, célula T *helper* folicular; FDC, célula dendrítica folicular).

Los anticuerpos pueden contribuir a la inmunidad de tres maneras diferentes, que denominamos **funciones efectoras** de los anticuerpos:

- (i) **Neutralización:** Los anticuerpos se unen al patógeno e impiden su entrada en la célula huésped, este proceso es conocido como neutralización del patógeno (Schroeder & Cavacini 2010).
- (ii) **Opsonización:** Los anticuerpos se unen al patógeno y la fracción constante del anticuerpo (Fc) será reconocida por los receptores Fc en la superficie de células fagocíticas, uniéndose y promoviendo la fagocitosis del patógeno. Este fenómeno es conocido como opsonización (Schroeder & Cavacini 2010).
- (iii) Activación de la cascada del **complemento:** La unión del anticuerpo al patógeno puede activar el sistema del complemento. Esta activación resulta en la formación de proteínas del complemento que se unen al patógeno, promoviendo

la fagocitosis de los microorganismos opsonizados a través de su unión a los receptores del complemento en los fagocitos (Schroeder & Cavacini 2010).

Otro fenómeno en el que participan los anticuerpos es la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) (Schroeder & Cavacini 2010). El fenómeno ADCC consiste en la destrucción de las células diana, mediante el reconocimiento de los anticuerpos unidos a antígenos en su superficie por los receptores FcγRs presentes en las células efectoras (macrófagos y células NK) (Adam et al. 2003). Los receptores son clasificados en cuatro grupos (FcγRI/CD64, FcγRII/CD32, FcγRIII/CD16 y el recientemente clasificado FcγRIV) de acuerdo con sus distintas afinidades por IgG, distribución y funciones en las células (Bruhns 2012). FcγRI y sobre todo FcγRIII, median la activación de las respuestas inmunitarias a través de la cadena γ de FcR que contiene un motivo de activación intracelular basado en tirosinas (ITAM). La activación de las señales mediada por ITAM conduce al estrés oxidativo, liberación de citoquinas, fagocitosis mediada por macrófagos y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) por parte de las células NK (Tan & Coussens 2007). Por el contrario, la unión a través de FcγRII (presenta motivos inhibidores basados en tirosina (ITIM)) inhibe las respuestas inflamatorias (Tan & Coussens 2007). Estas dos vías opuestas coexisten en las células inmunitarias innatas y determinan la magnitud de las respuestas inmunitarias inflamatorias (Tan & Coussens 2007). En el microambiente tumoral, el proceso ADCC aumenta la actividad de los linfocitos T, que juegan un papel clave en la destrucción de las células tumorales no solo a través de su acción directa; sino también, a través de la liberación de quimiocinas que movilizan y activan a las células B conduciendo a su diferenciación (Adam et al. 2003).

1.2.1.2. Respuesta inmunitaria celular

Si hablamos de respuesta inmunitaria celular, el tipo de célula más frecuente en el microambiente del tumor son los macrófagos asociados al tumor (TAMs) y los linfocitos T (**Fig. 8**) (Grivennikov et al. 2010).

(i) Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Los linfocitos T maduros se pueden dividir en dos grupos principales basándose en el tipo de receptor (TCR): γδ y αβ. Las células αβT se clasifican de acuerdo a sus funciones efectoras como células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) y células T CD4⁺ *helper*

(T_H), y las células T *natural killer* (NKT) (Grivennikov et al. 2010). Dada su diversidad, las células T pueden suprimir o promover el desarrollo del tumor. Las células T $CD8^+$ están principalmente encargadas de la destrucción de la célula diana mediante la secreción de perforinas y granzimas B (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Por su parte, las células T $CD4^+$ desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria induciendo la producción de anticuerpos por las células B promoviendo la actividad antitumoral mediada por macrófagos, reclutando neutrófilos, eosinófilos, y basófilos a las zonas de inflamación y, a través de la liberación de citoquinas y quimiocinas (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Las células T $CD4^+$ fueron en un primer momento definidas como células T *helper* (T_H) para distinguirlas de las células T $CD8^+$ citotóxicas (Zhi-Zhang Yang 2012). Basándose en los perfiles de secreción de citoquinas, las células T_H se dividen en células T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} y células T reguladoras (Treg) (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Las células T_{H1} producen citoquinas como IFN- γ , TGF- β , e IL-2, favoreciendo la capacidad fagocítica de macrófagos y citotóxica de las células T $CD8^+$ (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Las células T_{H2} secretan citoquinas tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, y median la respuesta inmunitaria humoral estimulando la proliferación y producción de anticuerpos por las células B (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Las células T_{H17} producen IL-17 e IL-22, promoviendo los procesos inflamatorios mediante la producción de citoquinas inflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Las células Treg ($CD4^+ CD25^+$) son quizás las mejores estudiadas en los linfomas (representan aproximadamente el 5-10% de las células T $CD4^+$ periféricas en ratón y humano) (Zhi-Zhang Yang 2012). Inicialmente, las células Treg fueron identificadas como supresoras de las células T; sin embargo, se ha visto que son capaces de suprimir la acción de otros tipos celulares como las células B o las células NK (**Fig. 8**) (Upadhyay et al. 2015) (Zhi-Zhang Yang 2012). En el modelo de linfoma B murino A20, la modulación negativa o depleción de las células Treg ha resultado en un significativo aumento de las respuestas inmunitarias antitumorales por parte de los linfocitos T, lo que se traduce en muchos casos en la eliminación del tumor (Upadhyay et al. 2015) (Curran et al. 2017).

(ii) Macrófagos

La progenie de las células del linaje monocítico (macrófagos y células dendríticas) juegan un papel esencial en las respuestas inmunitarias innatas como primera línea de defensa frente a patógenos y activando las respuestas inmunitarias adaptativas (Zhi-

Zhang Yang 2012). Los macrófagos pueden polarizarse en dos tipos dependiendo del estímulo: macrófagos M1 (fenotipo pro-inflamatorio) o M2 (fenotipo anti-inflamatorio) (Zhi-Zhang Yang 2012). Los macrófagos M1 resultan de la activación por la vía clásica, a través del IFN- γ secretado por las células T CD4⁺ *helper* de tipo 1 (T_H1) o por estímulos microbianos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (**Fig. 8**) (Kiss et al. 2018). Estos macrófagos M1 se caracterizan por secretar citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-12, y TNF), por la elevada producción de especies reactivas del oxígeno/nitrógeno, y por altos niveles de expresión de MHC de clase II y de moléculas co-estimuladoras (CD40 y CD86) (Kiss et al. 2018). Estos cambios moleculares permiten a los macrófagos destruir a patógenos intracelulares, presentar antígeno de manera eficiente y promover las respuestas mediadas por las células T_H1 (Kiss et al. 2018). Por el contrario, los macrófagos M2 son el resultado de la activación alternativa a través de las citoquinas IL-4 o IL-13 secretadas por las células T CD4⁺ *helper* de tipo 2 (T_H2) (**Fig. 8**) (Kiss et al. 2018). Los macrófagos M2 están caracterizados por la secreción de la citoquina inmunosupresora IL-10, y el aumento en la expresión de receptores *scavenger* o recolectores (median la unión, la internalización y el procesamiento de una amplia gama de macromoléculas), como CD204 y CD163, y de receptores de manosa (CD206) y arginasa-1 (Kiss et al. 2018). Los macrófagos M2 promueven la supresión de la inflamación, la reparación/remodelación de tejido, y las respuestas mediadas por las células T_H2 (Kiss et al. 2018).

En estadios tempranos del tumor, los macrófagos M1 son reclutados al microambiente tumoral en respuesta a señales pro-inflamatorias, y se liberan citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas que promueven la proliferación y diferenciación de las células T y NK (Zhi-Zhang Yang 2012). En los estadios tardíos del desarrollo del tumor, los macrófagos se diferencian a una subpoblación denominada macrófagos asociados al tumor (TAMs) (Zhi-Zhang Yang 2012). El tumor probablemente está formado por un mosaico de macrófagos en diferentes estados de activación (los TAMs co-expresan marcadores de los fenotipos M1 (CD38, CD40 y CD169) y M2 (CD163, CD204, CD206), siendo el efecto resultante inmunosupresor (Upadhyay et al. 2015) (Kiss et al. 2018). El microambiente tumoral parece favorecer la transición de los TAMs del fenotipo M1 al M2, gracias a la liberación de citoquinas (IL-4 e IL-13) por las células T CD4⁺ *helper* infiltrantes del tumor (Grivennikov et al. 2010). Los macrófagos M2 pueden inhibir la inmunidad antitumoral a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras como

TGF- β e IL-10, y pueden promover el desarrollo de las células del estroma y la angiogénesis mediante la secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Vesely et al. 2011). Además, ha sido observada la correlación entre los TAMs y la presencia de células T exhaustas que expresan altos niveles de PD-1 (Kiss et al. 2018). Las células T exhaustas son aquellas que han sido expuestas a antígeno de manera crónica, particularmente durante una infección vírica crónica o dentro de microambientes tumorales, y como consecuencia han desarrollado un fenotipo alterado con una capacidad proliferativa y una actividad efectora muy reducidas, además de un aumento en la expresión de múltiples moléculas co-inhibidoras (Lieping Chen and Dallas B. Flies 2013). Por otro lado, la eliminación de macrófagos M2 en modelos pre-clínicos de linfoma de células T cutáneo (CTCL) tiene como resultado un menor desarrollo del tumor (Grivennikov et al. 2010). Todo indica que la presencia de TAMs contribuye a un mayor desarrollo del tumor, y por lo tanto a un peor pronóstico en la mayoría de los cánceres, incluyendo el linfoma de células B de Hodgkin y non-Hodgkin (Grivennikov et al. 2010) (Zhi-Zhang Yang 2012).

(iii) Células supresoras de origen mieloide (MDSCs).

Otro tipo celular importante en el microambiente tumoral son las células supresoras de origen mieloide (MDSCs). Las MDSCs representan una población heterogénea de células mieloides inmaduras que todavía no se han diferenciado en macrófagos, células dendríticas, o granulocitos, y están normalmente presentes en la médula ósea de individuos sanos (Zhi-Zhang Yang 2012). Generalmente, las MDSCs se dividen en dos subpoblaciones: monocitos y granulocitos (Zhi-Zhang Yang 2012). Las MDSCs (CD11b⁺ Gr1⁺) se acumulan en los tumores y órganos linfoides (De Visser et al. 2006) y son conducidas por factores derivados del tumor (TGF- β e IL-13) inhibiendo las respuestas citotóxicas mediadas por las células T y NK mediante la disminución de nutrientes, la generación de estrés oxidativo, la interferencia con el tráfico de linfocitos al microambiente del tumor, y la activación de las células Tregs (**Fig. 8**) (Upadhyay et al. 2015). En el modelo de linfoma de tipo B murino A20, las MDSCs inducen la activación y proliferación de las células Tregs antígeno-específicas, dando lugar a la supresión y estado de anergia de las células T efectoras antitumorales (Upadhyay et al. 2015). La célula T anérgica es resistente a la activación por antígeno específico, incluso cuando el antígeno es presentado por una célula presentadora de antígeno (APC), que expresa moléculas co-estimuladoras (Reiser & Banerjee 2016). Además, se ha demostrado que la

mayoría de los antígenos tumorales son procesados por células que presentan un fenotipo de MDSC, lo que sugiere que estas células no solo inducen tolerancia, sino que también limitan la cantidad de antígeno que puede ser procesado por las células dendríticas (Upadhyay et al. 2015). Además, se ha observado que la depleción de MDSCs en un modelo de linfoma murino inhibe el crecimiento del tumor (Upadhyay et al. 2015).

(iv) Células *natural killer* (NK).

Las células NK son un tipo de linfocitos citotóxicos críticos para la inmunidad innata que no requieren del reconocimiento a través del MHC (**Fig. 8**) (Zhi-Zhang Yang 2012). Las células NK pueden eliminar de manera espontánea células tumorales deficientes en MHC de clase I *in vivo*, y suprimir la metástasis en ratón (Ryungsa Kim et al. 2007) (Street et al. 2004). Se piensa que las células NK, junto con las células T $\gamma\delta$, juegan un papel clave en la polarización de las células T CD4⁺ *naive* a células T CD4⁺ *helper* de tipo 1 (T_H1) o 2 (T_H2); a través de la secreción de citoquinas como IFN- γ e IL-4, durante los primeros días de la respuesta inmunitaria innata (Corthay 2006).

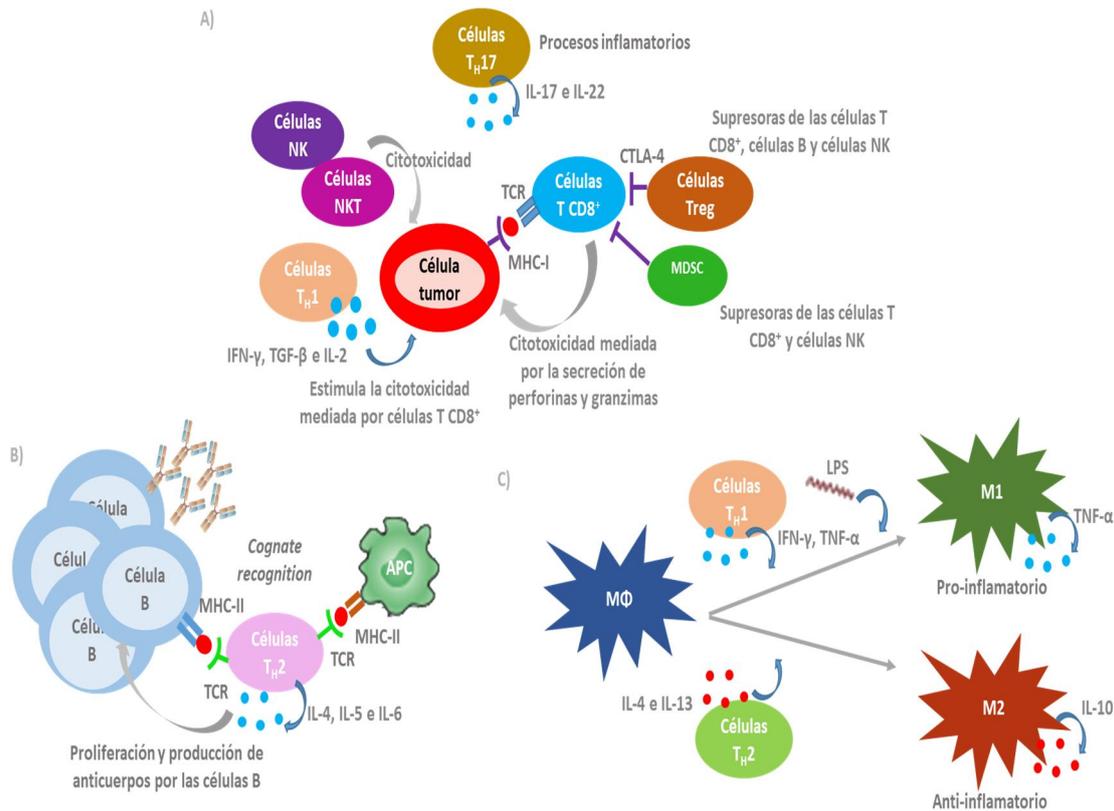


Figura 8. Respuesta inmunitaria celular. (A) Las células NK, NKT y los linfocitos T CD8⁺ tienen un papel citotóxico sobre la célula diana conduciendo a su eliminación. Las células T *helper* de tipo 1 (células T_{H1}) estimulan la actividad citotóxica de las células T CD8⁺, a través de la liberación de IFN-γ, TGF-β e IL-2. Las células T *helper* 17 (células T_{H17}) participan en procesos inflamatorios a través de la liberación de IL-17 e IL-22. Por otro lado, las células mieloides supresoras (MDSCs) y las células Tregs actúan inhibiendo las funciones efectoras de los linfocitos y las células NK. (B) Las células T *helper* de tipo 2 (células T_{H2}), activadas a través de la interacción TCR-MHC de clase II (presente en células presentadoras de antígeno (APCs)), inducen la proliferación y producción de anticuerpos por las células B activadas que han internalizado y presentado antígeno a través del MHC de clase II a las células T_{H2} (*cognate recognition*), mediante la secreción de IL-4, IL-5 e IL-6. (C) Los macrófagos (MΦ) pueden polarizarse a macrófagos de tipo 1 (M1) o de tipo 2 (M2) en función de los estímulos que reciban. La liberación de moléculas como el IFN-γ y el TNF-α por las células T_{H1} o el LPS conducen a la adquisición por parte de los macrófagos del fenotipo M1, pro-inflamatorio. Por el contrario, la liberación de IL-4 e IL-13 por las células T_{H2} polariza a los macrófagos hacia el fenotipo M2, anti-inflamatorio.

1.2.2. Elaboración de la respuesta inmunitaria antitumoral: paradigma de las tres señales

La activación óptima de las células T requiere de tres señales: el reconocimiento por parte del receptor de las células T (TCR) de los antígenos peptídicos presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que constituye la primera señal; una segunda señal co-estimuladora derivada de la interacción entre co-receptores en las células T y co-ligandos expresados en las células presentadoras de antígeno (APCs)

que induce la entrada en el ciclo celular y la secreción de la interleucina 2 (IL-2) (Cai & Freeman 2009). La IL-2 actúa como un factor autocrino sobre el receptor IL-2R, que induce o promueve la expansión clonal y la diferenciación hacia célula T con función efectora (señal 3) (Del Rio et al. 2008) (**Fig. 9**). El balance entre las señales co-estimuladoras y co-inhibidoras que reciben las células T determinan el resultado de la respuesta inmunitaria (M. del Rio et al. 2010). La activación del TCR sin la posterior co-estimulación conduce a la estimulación sub-óptima de las células T y la imposibilidad de respuesta citotóxica al antígeno, fenómeno que se conoce como anergia de las células T (Cai & Freeman 2009). Las moléculas co-señalizadoras implicadas en la modulación de la activación de las células T son moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras que pertenecen a dos superfamilias: la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF) y la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF) (Del Rio et al. 2008). La IgSF se caracteriza por presentar dominios extracelulares de tipo Ig variable. A esta familia pertenecen las moléculas co-estimuladoras CD28 y el co-estimulador inducible de células T (ICOS); y otros miembros que están involucrados en la inhibición o atenuación de la activación de las células T a través del TCR (M. L. del Rio et al. 2010). Los miembros inhibidores de la IgSF incluyen CTLA-4, PD-1, BTLA, CD160, TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) y LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene 3*) (M. L. del Rio et al. 2010) (Anderson et al. 2016). Los miembros de la familia CD28 interactúan principalmente con los miembros de la familia B7, pero hay dos excepciones: el receptor co-inhibidor atenuador de linfocitos T y B (BTLA) se une a un miembro de la TNFRSF, que se trata del mediador de la entrada en la célula del herpes virus (HVEM, también conocido como TNFRSF14); y B7-H6 (también conocido como NCR3LG1) se une a la proteína relacionada con p30 en las células NK (NKp30, también conocida como NCR3) de la familia de receptores citotóxicos en humanos (Lieping Chen and Dallas B. Flies 2013). La interacción CD28/B7 es la más ampliamente estudiada y promueve la señalización positiva de las células T (Del Rio et al. 2008). Tras la unión con sus ligandos, CD28 induce una señalización co-estimuladora promoviendo la supervivencia, proliferación y producción de citoquinas en las células T. La interacción CD28/B7 en presencia de la estimulación a través del TCR incrementa la expresión de la subunidad α del IL-2R (receptor IL-2), que junto con IL-2R β/γ configuran el receptor de alta afinidad de unión por IL-2; y de CD40L, e induce la producción de citoquinas, como la IL-2 e IFN- γ (**Fig. 9**) (M. L. del Rio et al. 2010). CD28 se expresa de manera constitutiva en las

células T de ratón, en el 90% de las células T CD4⁺ y en el 50% de las células T CD8⁺ en humanos (Peggs & Allison 2005). CD28 se une a la pareja de ligandos estructuralmente homólogos B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) expresados por las APCs, tales como las células dendríticas (DCs), los macrófagos y las células B activadas (Peggs & Allison 2005). CD86 es expresado en niveles bajos por las DCs no-activadas y sus niveles de expresión pueden aumentar rápidamente debido a una gran variedad de estímulos (infección, daño tisular, y citoquinas inflamatorias) tras la interacción de las DCs con las células T activadas que expresan CD40L (CD40 ligando) (Peggs & Allison 2005). En humanos, CD80 no es detectado en las DCs no-activadas, su expresión se produce bajo estímulos similares a los de CD86, pero es expresada en la superficie celular más tarde que CD86. Además, CD28 se une a CD86 con mayor afinidad que a CD80 (Peggs & Allison 2005). La complejidad de la vía CD28-CD80/86 es mayor porque comparte los ligandos con el receptor inhibitorio CTLA-4, el cual presenta afinidades mucho más altas por CD80/CD86 que CD28. Una vez que el estímulo antigénico de la respuesta inmunitaria ha sido eliminado, el sistema inmunitario debe volver a los niveles basales de activación para reestablecer la homeostasis (M. L. del Rio et al. 2010). Para ello, se induce la expresión de moléculas inhibitorias como CTLA-4 que actúa como un regulador negativo de las respuestas mediadas por las células T (Peggs & Allison 2005), inhibiendo la síntesis de IL-2 y la progresión del ciclo celular (Del Rio et al. 2008) (**Fig. 10**). Las moléculas co-inhibidoras y la señalización negativa no solo contribuyen a la atenuación de la activación inicial de las células T mediada por el TCR, sino que también modula el proceso de diferenciación de las células T limitando su proliferación y supervivencia (M. L. del Rio et al. 2010). La señalización co-inhibidora contribuye a la regulación de la fase de contracción de la respuesta inmunitaria mediante la inhibición directa de las células T y promoviendo de manera indirecta la supresión de las células T a través de la expresión de ligandos en las células Tregs para los receptores co-inhibidores (M. L. del Rio et al. 2010). En definitiva, la modulación de la respuesta inmunitaria depende de la expresión constitutiva o inducida de las parejas de ligandos/receptores co-estimuladores y co-inhibidores (M. L. del Rio et al. 2010).

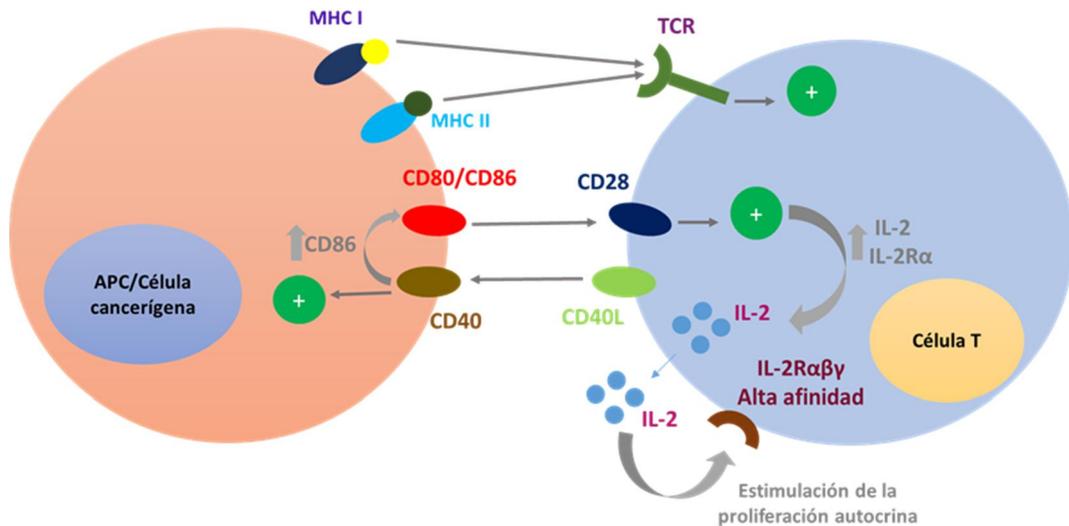


Figura 9. Paradigma de las tres señales I. En primer lugar, la iniciación de la respuesta inmunitaria tiene lugar a través de la unión de los péptidos antigénicos presentados en el contexto del MHC de clase I o II por las APCs al TCR de las células T CD8⁺ o CD4⁺, respectivamente. Esta constituye la primera señal de activación que es necesaria, pero no suficiente para la activación óptima de las células T. Para la completa activación de las células T, se requiere de la acción de moléculas co-estimuladoras. Es el caso de la interacción entre CD28 y CD80/CD86 (pertenecen a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas), y entre CD40 y CD40L (pertenecen a la superfamilia del receptor factor de necrosis tumoral). La interacción CD40-CD40L induce un aumento en la expresión de CD86. Estas interacciones forman parte de la segunda señal co-estimuladora. La señalización co-estimuladora induce la expresión autocrina de IL-2 y aumenta la expresión de la subunidad α del IL-2R para formar el receptor IL-2R $\alpha\beta\gamma$ de alta afinidad, produciéndose la expansión clonal y la diferenciación a células T efectoras.

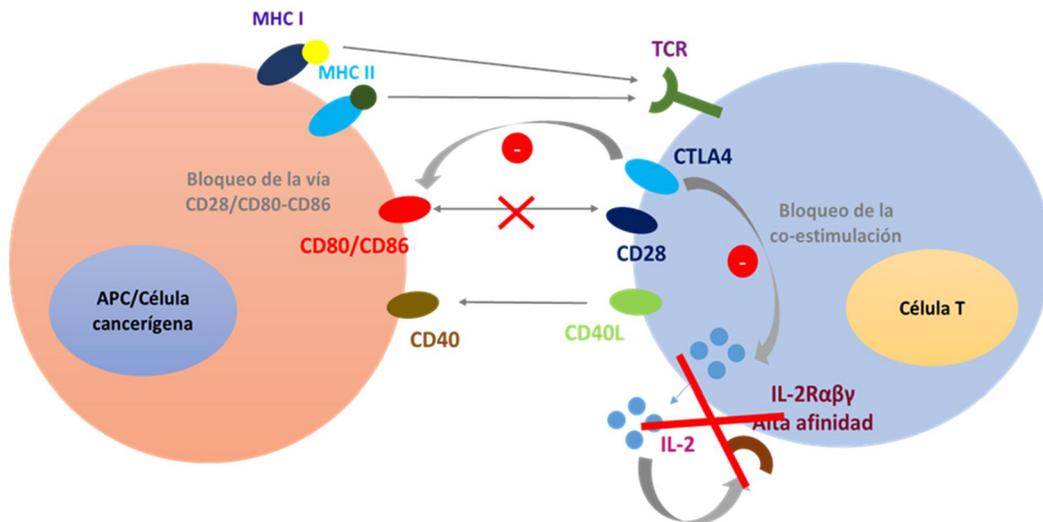


Figura 10. Paradigma de las tres señales II. Tras la proliferación de las células T, se activa la fase de contracción de la respuesta inmunitaria que se caracteriza por la co-expresión de moléculas inhibitorias, como es el caso de CTLA-4. CTLA-4 pertenece a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas y presenta una afinidad de unión 10-40 veces mayor por CD80/CD86, que CD28. De esta forma, se une a CD80/CD86 y compite con CD28 frenando el proceso de co-estimulación. Todo ello, tiene como resultado la inactivación de la respuesta inmunitaria y la restauración de la homeostasis del organismo (contracción de la respuesta inmunitaria).

1.2.3. *Immune checkpoints* y el paradigma terapéutico de la interacción PDL-1/PD-1/CD80

El tipo de respuesta inmunitaria que se produce tras la primera activación de las células T a través del reconocimiento de antígeno por el TCR, depende del balance entre las señales co-estimuladoras y co-inhibidoras, lo que se conoce como *immune checkpoints* (Pardoll 2012). En condiciones fisiológicas normales, los *immune checkpoints* son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia, que previene la autoinmunidad y también para proteger a los tejidos del daño que se produciría si la respuesta inmunitaria se mantuviera de forma crónica (Pardoll 2012). La expresión en los tumores de los ligandos para receptores co-inhibidores presentes en los linfocitos T, les permite resistir y modular la respuesta inmunitaria antitumoral (Pardoll 2012). Los ligandos y receptores co-inhibidores que regulan las funciones efectoras de las células T en los tejidos son comúnmente sobre-expresados en células tumorales o en células no transformadas que residen en el microambiente del tumor (Pardoll 2012). Hay dos receptores co-inhibidores que han sido ampliamente estudiados en el contexto de la inmunoterapia del cáncer: CTLA-4 y PD-1 (Pardoll 2012). Como ya habíamos visto, CTLA-4 es un regulador negativo de las células T que actúa controlando su activación compitiendo con la molécula co-estimuladora CD28 por su unión a los ligandos CD80/CD86 y, por tanto, inhibiendo la co-estimulación (Daniel S. Chen and Ira Mellman 2017). CTLA-4 no es expresado por las células T *naive*, pero su expresión se induce rápidamente tras la activación de las células T (McGrath & Najafian 2012). CTLA-4 es expresado constitutivamente en niveles altos por las células Tregs, jugando un papel importante como molécula inmunosupresora y manteniendo la tolerancia periférica (McGrath & Najafian 2012). La unión de CTLA-4 expresado en las células Tregs con las moléculas CD80/CD86 de células dendríticas (DCs) induce la expresión de IFN- γ , el cual actúa como un factor autocrino aumentado los niveles de la molécula indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (McGrath & Najafian 2012). La enzima IDO inhibe las respuestas inmunitarias a través de la depleción local del triptófano, el cual es esencial para las funciones anabólicas en los linfocitos (en particular en las células T) (Pardoll 2012). Por lo tanto, esta enzima metabólica puede ser inhibida para potenciar la acción de las células T (Pardoll 2012).

Inicialmente, la estrategia de bloqueo de CTLA-4 fue cuestionada porque los ratones CTLA-4^{-/-} presentaban un fenotipo letal autoinmune e hiper-reactivo (Pardoll

2012). Sin embargo, Allison y colaboradores consiguieron respuestas inmunitarias significativas empleando anticuerpos anti-CTLA-4, sin manifestar toxicidad inmunitaria (Pardoll 2012). En el caso de los tumores pobremente inmunogénicos, se ha observado que responden mejor a la combinación del anticuerpo anti-CTLA-4 con una línea celular de melanoma murino transducida con el factor estimulador de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e irradiada (fuente de antígenos tumorales y de GM-CSF, para facilitar la maduración de las células dendríticas (DCs)) (Pardoll 2012). Estos hallazgos sugieren que el bloqueo de CTLA-4 mediante el uso de anticuerpos y su posible combinación con células que expresan de manera estable GM-CSF, podrían inducir una respuesta inmunitaria fuerte y suficiente para ralentizar el crecimiento del tumor y en algunos casos eliminar tumores establecidos (Pardoll 2012).

Los ligandos de PD1, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), pertenecen a la familia B7 (Pardoll 2012) (Daniel S. Chen and Ira Mellman 2017). El ligando PD-L1 para el receptor de superficie de muerte celular programada PD-1, es altamente expresado tanto en células hematopoyéticas como en células no hematopoyéticas y, limita la actividad de las células T efectoras en procesos inflamatorios en los tejidos periféricos como respuesta a una infección, reduciendo fenómenos de respuesta inmunitaria exacerbada (Pardoll 2012). Las células tumorales y las células del sistema inmunitario pueden expresar PD-L1 tras la exposición a citoquinas tales como el IFN- γ , sin embargo PD-L2 es expresado principalmente en las células dendríticas en los tejidos normales (Daniel S. Chen and Ira Mellman 2017). Muchos tipos tumorales presentan una elevada infiltración de células Treg y células mieloides supresoras que expresan PD-L1 pudiendo suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales a través del receptor PD-1. El bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 podría potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales por parte de las células T efectoras (Pardoll 2012). Por otro lado, en los linfomas se ha visto un aumento en la expresión del ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1) en la superficie de las células cancerígenas (Upadhyay et al. 2015). PD-L1 interacciona con el receptor de muerte celular PD-1 expresado por las células T CD8 citotóxicas, inhibiendo su acción, promoviendo directamente su apoptosis o induciendo la expresión de citoquinas inmunosupresoras (Upadhyay et al. 2015). El bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1 mediante el uso de anticuerpos, aumenta la proliferación y la secreción de citoquinas inflamatorias por las células T (Upadhyay et al. 2015). La expresión de PD-1 es más amplia que la de CTLA-4, ya que no solo es expresado por las células T activadas, sino

también es expresado por células B y células NK (limitando su actividad lítica) (Pardoll 2012) (Daniel S. Chen and Ira Mellman 2017). Por lo tanto, el bloqueo de PD-1 también puede derivar en una mayor actividad de las células NK y la estimulación de la producción de anticuerpos a través de la activación de las células B PD-1⁺ (Pardoll 2012).

Hay muchos pacientes que no responden a las inmunoterapias frente a los receptores co-inhibidores CTLA-4 y PD-1 y algunos tipos tumorales se muestran refractarios a estas terapias (Anderson et al. 2016). Esto ha promovido la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, entre las que se encuentran los receptores co-inhibidores LAG-3, TIM-3, y TIGIT (Anderson et al. 2016).

El gen de activación de linfocitos (LAG-3) es expresado en niveles altos en las células T CD4⁺ y T CD8⁺ activadas y en un sub-grupo de células NK (Anderson et al. 2016). LAG-3 inhibe a las células T efectoras y promueve la supresión mediada por las células Treg (Anderson et al. 2016). LAG-3 y PD-1 están co-expresados en los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ infiltrantes en el tumor (TILs) en varios modelos murinos pre-clínicos de cáncer, y se ha observado que el co-bloqueo de la señalización mediada por LAG-3 y PD-1 sinergiza para potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por las células T CD8⁺ (Anderson et al. 2016). El bloqueo conjunto de LAG-3 y PD-1 mejora la proliferación y la producción de citoquinas por las células T CD8⁺ específicas del tumor (Anderson et al. 2016).

La inmunoglobulina de células T tipo-3 (TIM-3) fue identificada como una molécula que se expresaba de manera selectiva en la superficie de las células T CD4⁺ helper 1 (T_{H1}) productoras de IFN- γ y en las células T CD8⁺ citotóxicas (Anderson et al. 2016). TIM-3 es un marcador de células T CD8⁺ disfuncionales o exhaustas en cáncer (Anderson et al. 2016). En realidad, la expresión de TIM-3 y PD-1 podría utilizarse para definir las poblaciones de TILs CD8⁺ que exhiben diferentes fenotipos (Anderson et al. 2016). Las células T CD8⁺ TIM-3⁺ PD-1⁺ exhiben una disfuncionalidad severa, mientras que las células T CD8⁺ TIM-3⁻ PD-1⁺ muestran una disfuncionalidad débil y las células CD8⁺ TIM-3⁻ PD-1⁻ presentan una buena actividad efectora (Anderson et al. 2016). En base a estas afirmaciones, el co-bloqueo de TIM-3 y PD-1 es superior al bloqueo único de la vía PD-1 potenciando la función efectora antitumoral y suprimiendo el crecimiento del tumor en modelos pre-clínicos de cáncer como el linfoma folicular de células B de non-Hodgkin (Anderson et al. 2016). TIM-3 puede también suprimir la respuesta inmunitaria indirectamente a través de la promoción de las células mieloides supresoras

(MDSC) (Anderson et al. 2016). En los ratones transgénicos para TIM-3 exhibían un desarrollo tumoral acelerado y un descenso de la auto-inmunidad (Anderson et al. 2016).

TIGIT (inmunoglobulina de célula T y dominio ITIM) fue identificado como miembro de la familia CD28 y es expresado en células NK, células T efectoras y de memoria, y células Treg (Anderson et al. 2016). Los ligandos de TIGIT, CD155 y CD112, están ampliamente expresados en las células tumorales (Anderson et al. 2016). TIGIT regula negativamente las respuestas antitumorales a través de mecanismos como la supresión directa de las células T CD8⁺ efectoras y la supresión indirecta promoviendo la acción de las células Treg (Anderson et al. 2016). Dentro del microambiente tumoral, TIGIT está expresado en niveles altos en los TILs humanos y murinos en una gran variedad de tumores (Anderson et al. 2016). Ha sido demostrado que el bloqueo conjunto de TIGIT y PD-1 aumenta la proliferación, producción de citoquinas, y desgranulación de los TILs CD8⁺ (Anderson et al. 2016). El co-bloqueo de TIGIT con PD-1 o de TIGIT con TIM-3 promueve la inmunidad antitumoral e induce la regresión del tumor (Anderson et al. 2016).

CTLA-4 y PD-1 representan un primer nivel de receptores co-inhibidores que son responsables en primera instancia del mantenimiento de la inmuno-tolerancia y de las condiciones homeostáticas, y LAG-3, TIM-3, y TIGIT representan un segundo nivel de receptores co-inhibidores que juegan papeles específicos en la regulación de la respuesta inmunitaria, particularmente en los sitios de inflamación en los tejidos.

Recientemente han adquirido una gran importancia los miembros de la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF) en la modulación de las respuestas del sistema inmunitario (Pasero et al. 2012). Entre los miembros de esta superfamilia, la molécula HVEM ha sido establecida como un regulador inmunológico bidireccional único, porque tiene la capacidad de inducir la activación de procesos inflamatorios y la transcripción de genes de supervivencia; y además, puede activar la señalización inhibitoria a través de su unión a BTLA (Pasero et al. 2012) (Shui et al. 2011). La manipulación y estudio de las vías de señalización mediadas por HVEM y sus ligandos (LIGHT, BTLA y CD160) se revela de gran interés en enfermedades como el cáncer, la autoinmunidad y en trasplantes de órganos (Pasero et al. 2012). En el contexto de los linfomas de non-Hodgkin de tipo B, se ha establecido la importancia de este receptor co-inhibidor HVEM como molécula diana para su bloqueo y posible

potenciación de la acción efectora de las células T CD8⁺ frente al tumor (Upadhyay et al. 2015) (Pasero et al. 2012).

1.2.4. Receptor TNFRSF14 (HVEM) como molécula diana para potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral

1.2.4.1. HVEM y sus ligandos. Patrones de expresión

HVEM fue inicialmente descubierto como mediador de la entrada en células humanas y de ratón del virus *Herpes simplex* (HSV). Forma parte de la Superfamilia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF14) e interacciona con los ligandos convencionales de la superfamilia TNF, la linfotóxina- α (LT- α) y LIGHT (es homóloga a las linfotóxicas, presenta expresión inducible y compite con la glicoproteína D del HSV por su unión con HVEM, receptor expresado por linfocitos T) (TNFRSF14) (Park et al. 2012) (Steinberg et al. 2011). Sin embargo, HVEM tiene la particularidad de poder unir miembros de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF), el atenuador de linfocitos T y B (BTLA) y CD160, así como la glicoproteína D de HSV (Pasero et al. 2012) (Steinberg et al. 2011) (**Fig. 11**). El citomegalovirus humano (HCMV) expresa la proteína viral UL144 homóloga a HVEM (Šedý et al. 2008) (Sedy et al. 2015). Esta proteína no puede interactuar con LIGHT o la LT- α , porque carece de los dominios ricos en cisteína (CRD) tercero y cuarto presentes en HVEM, tampoco se puede unir a CD160, pero sí a BTLA (Sedy et al. 2015). La proteína UL144 de citomegalovirus actúa inhibiendo la proliferación de las células T al unirse a través del CRD1 a BTLA, evitando la co-estimulación a través de CD160 de la función citotóxica y la liberación de citoquinas por parte de las células NK (Sedy et al. 2015) (Sedy et al. 2013).

La capacidad de HVEM para unir diferentes ligandos reside en las dos diferentes regiones topográficas de su dominio extracelular: los dominios CRD1/CRD2 para la unión de BTLA y CD160, y los dominios CRD2/CRD3 para la unión de HVEM y LIGHT; y además, le confieren la habilidad para activar las vías co-estimuladora e inhibidora (Steinberg et al. 2011). HVEM es un interruptor molecular que puede funcionar como receptor para la transducción de señales y como ligando induciendo la señalización (Steinberg et al. 2011). HVEM presenta 8 exones que codifican para una glicoproteína transmembrana de tipo I (de 283 aa en el caso de la proteína de humanos y 276 aa en la especie murina) con cuatro dominios ricos en cisteína (CRD) en el dominio

extracelular, característicos de la TNFRSF (M. L. del Rio et al. 2010) (Steinberg et al. 2011) (el cuarto dominio CRD presenta solo dos de los tres puentes disulfuro que forman un CRD) (Pasero et al. 2012) (M. L. del Rio et al. 2010) (Steinberg et al. 2011) (**Fig. 11**). Las uniones por puentes disulfuro en los dominios CRD forman una estructura alargada de tipo escalera (**Fig. 11**) (Steinberg et al. 2011). La señalización se produce a través del extremo corto citoplasmático, el cual presenta sitios de unión para las ligasas ubiquitina E3 de la familia de factores asociados a los receptores TNF (TRAF), que inician la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) crítico para el control de los genes involucrados en la supervivencia celular y la inflamación (**Fig. 11**) (Steinberg et al. 2011). En su ectodominio, HVEM tiene dos regiones de unión de ligandos espacialmente diferenciadas: los dominios CRD2 y CRD3 son las regiones características de unión de los ligandos de la familia TNF (LIGHT y LT- α) mientras que los dominios CRD1 y CRD2 son las zonas de interacción con BTLA, CD160 y la glicoproteína D (gD) (Steinberg et al. 2011) (**Fig. 11**). CRD1 es el dominio crítico para la unión de BTLA, CD160 y gD (Steinberg et al. 2011). La región donde BTLA, CD160, y el ligando viral gD se unen a HVEM es conocida como el sitio DARC (sitio de unión de BTLA, CD160 y gD en el dominio CRD1 de HVEM) y se encuentra en la cara opuesta del sitio de unión de LIGHT (Steinberg et al. 2011). Los sitios de unión de BTLA, CD160, y gD parecen estar topográficamente próximos unos de otros, lo que impediría la unión simultánea de estas moléculas, de hecho se ha demostrado que gD bloquea la unión de BTLA y CD160 a HVEM (Cai & Freeman 2009) (Steinberg et al. 2011) (Kojima et al. 2011). La forma soluble de LIGHT no compite con la unión de BTLA o CD160 a HVEM; sin embargo, la forma LIGHT de membrana impide la interacción HVEM-BTLA, posiblemente debido a impedimentos estéricos (Steinberg et al. 2011). CRD1 es esencial para la señalización inhibitoria inducida por la proteína de fusión recombinante HVEM-Ig, ya que su eliminación conduce a la co-estimulación a través de HVEM-Ig (Pasero et al. 2012) (M. L. del Rio et al. 2010). Los miembros de la familia del TNFR adquieren una configuración trimérica cuando se unen a los ligandos TNF, como muestra la estructura cristalina de LIGHT y la LT- α (Murphy et al. 2006), dando lugar a un complejo 3:3 (Cai & Freeman 2009). Esto deja al dominio CRD1 de HVEM accesible para la interacción con CD160 o BTLA (Pasero et al. 2012) (Cai & Freeman 2009). Por el contrario, BTLA y CD160 interaccionan con HVEM formando complejos 1:1, puesto que presentan un único dominio de tipo inmunoglobulina (Pasero et al. 2012) (Cai & Freeman 2009) (**Fig. 11**).

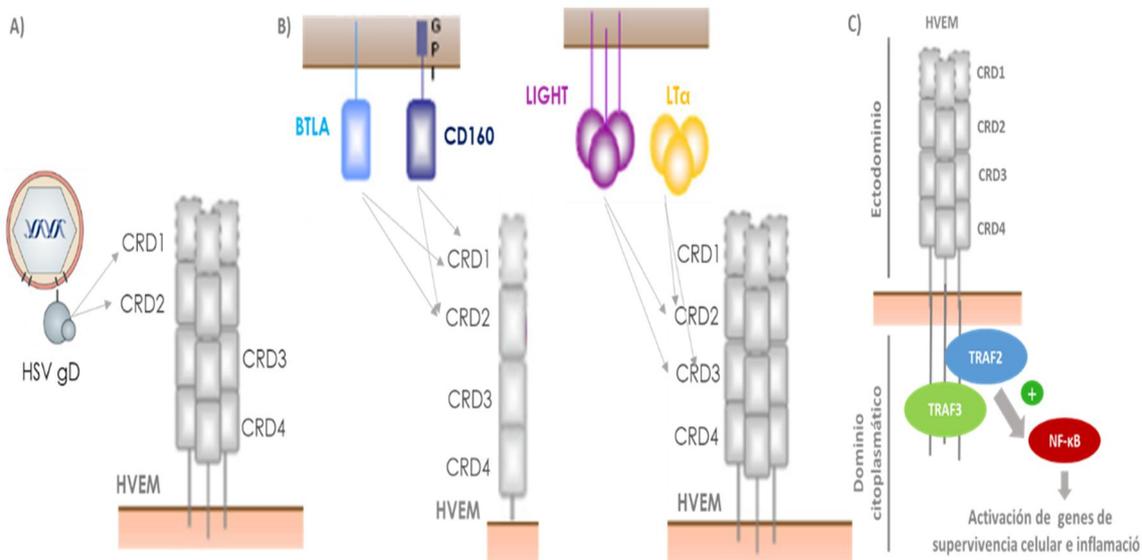


Figura 11. Estructura molecular de HVEM y sus ligandos. (A) HVEM fue inicialmente descubierta como mediadora de la entrada de los *herpesvirus* a través de la unión de la glicoproteína D (gD) de tipo I. gD es una proteína de membrana con un dominio Ig amino-terminal y comparte los mismos dominios de unión que BTLA y CD160 (CRD1 y CDR2) (Cai & Freeman 2009). Se caracteriza por presentar cuatro dominios ricos en cisteína (CRDs) en el extremo extracelular. (B) Los ligandos BTLA y CD160 se unen a los dominios CRD1 y CRD2 en la forma monomérica de HVEM, mientras que LIGHT y la LT- α se unen a los dominios CRD2 y CRD3 en la forma trimérica de HVEM. (C) La activación de HVEM a través de la unión de cualquiera de sus ligandos, conduce a la activación de la vía de las ligasas ubiquitina E3 de la familia de factores asociados a los receptores TNF (TRAF2/3) promoviendo la supervivencia celular y la diferenciación a través de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Ward-Kavanagh et al. 2016).

El patrón de expresión de HVEM es muy amplio, se expresa tanto en células hematopoyéticas (células T y B, monocitos, células dendríticas inmaduras, células Treg, neutrófilos, y células NK) como en células no hematopoyéticas (células del parénquima y células del estroma que sintetizan el tejido conectivo de la matriz extracelular) (Pasero et al. 2012). La expresión de LIGHT y HVEM es regulada de manera recíproca en la misma célula (M. L. del Rio et al. 2010). La expresión de HVEM en las células T y B es modulada durante la activación linfocitaria: las células T en reposo o *resting* presentan elevados niveles de expresión de HVEM, su expresión disminuye tras la activación de las células T; y se re-establecen los valores de expresión iniciales cuando las células T vuelven al estado de activación basal (células T *resting* o *naive*) (Pasero et al. 2012). La expresión de HVEM es alta en las células B *naive* y de memoria, pero no se detecta en las células B activadas con LIGHT en los centros germinales (Pasero et al. 2012) (Murphy et al. 2006). La expresión de HVEM en las DCs inmaduras desciende tras la unión con LIGHT exógena, con o sin activación de las DCs a través de CD40L (Murphy et al. 2006). De manera general, las células *naive* o *resting* parecen expresar niveles altos de HVEM,

mientras que las células activadas presentan niveles bajos o indetectables de HVEM como resultado de su interacción directa con LIGHT (Murphy et al. 2006).

La molécula BTLA se expresa en las células T en el timo durante la selección positiva, y en niveles bajos por las células B en la médula ósea durante los estados de célula B progenitora (célula pro-B) y célula B precursora (célula pre-B), con una mayor expresión en la célula B inmadura (Murphy et al. 2006). BTLA es expresado por las células linfoides y mieloides, con la particularidad de expresar niveles altos en las células B periféricas y bajos niveles en las DCs CD11c⁺ y células T *naive* (Murphy et al. 2006).

La expresión de LIGHT ha sido descrita en una amplia variedad de células hematopoyéticas (células T, DCs, células NK, plaquetas y células B) y en ciertos estadios de diferenciación celular (M. L. del Rio et al. 2010). La expresión de LIGHT es inducida de manera transitoria en niveles altos en las células T durante su activación (Murphy et al. 2006), con mayores niveles en las células T CD8⁺ que en las células T CD4⁺ (M. L. del Rio et al. 2010). LIGHT es expresado en niveles altos por las DCs inmaduras, al contrario de lo que ocurre en las células T *naive*, mientras que los niveles de expresión de HVEM son bajos (M. L. del Rio et al. 2010). El proceso de maduración de las DCs está asociado con un descenso de la expresión de LIGHT y un aumento la expresión en superficie de HVEM (M. L. del Rio et al. 2010) (Murphy et al. 2006). Las células B no parecen expresar LIGHT *in vivo*, sin embargo, su estimulación con LIGHT (puede liberarse de la membrana por acción de una metaloproteasa y funcionar como una citoquina soluble) y CD40L podrían inducir la expresión de LIGHT (Murphy et al. 2006).

1.2.4.2. Inmunobiología de la vía de interacción HVEM/LIGHT y HVEM-BTLA/CD160: regulación bidireccional de la activación de las células T y de las células NK y NKT

En condiciones de homeostasis, es decir en ausencia de respuesta inmunitaria e inflamación, HVEM y BTLA se expresan de manera constitutiva en la superficie de las células T, B y DCs (Murphy et al. 2006) interaccionando en *cis* (en la misma célula), lo que conduce a la inhibición de la actividad funcional de dichas células, a la supresión de la activación de la señalización mediada NF-κB, y al bloqueo de la interacción en *trans* (entre células adyacentes) de BTLA y CD160 (su expresión es muy restringida a células citotóxicas (CTLs, células NK y NKT) con HVEM (**Fig. 12**) (Pasero et al. 2012) (Shui et

al. 2011) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011). En la configuración *cis*, BTLA actúa como un receptor inhibitor mediando la señalización a través del reclutamiento de tirosina fosfatasas (**Fig. 13**) (Steinberg et al. 2011). El dominio citoplasmático de BTLA está formado por tres motivos conservados basados en tirosina (dos motivos inmunoreceptores inhibidores basados en tirosinas (ITIMs) y una zona de reconocimiento Grb-2) (**Fig. 13**) (Steinberg et al. 2011). Los ITIMs en BTLA son importantes para el reclutamiento de las fosfatasas 1 y 2 con dominio homólogo Src (SHP-1 y SHP-2) (**Fig. 13**) (Steinberg et al. 2011). La unión de BTLA a HVEM conduce al reclutamiento de SHP-1 y SHP-2 a la cola citoplasmática de BTLA, limitando la acción estimuladora de las tirosina quinasas asociadas a los receptores de antígeno en las células T y B (**Fig. 13**) (Steinberg et al. 2011). Ratones deficientes en BTLA son más susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes, y muestran una respuesta inflamatoria más prolongada debido a una mayor proliferación y supervivencia de las células T, en respuesta a la estimulación por mitógeno o a la activación mediada por anticuerpos anti-CD3, lo que refuerza las evidencias de que BTLA actúa como receptor inhibitor de la activación de las células T y B (Steinberg et al. 2011) (Watanabe et al. 2003).

Tras la activación de la respuesta inmunitaria, los niveles de HVEM disminuyen y aumentan los de BTLA (Murphy et al. 2006), además se induce la expresión transitoria de LIGHT de membrana que conduce a la disociación del complejo *cis* HVEM-BTLA permitiendo la interacción HVEM-LIGHT en *trans* activando la respuesta inmunitaria (**Figs. 12 y 14**) (Murphy et al. 2006) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011). Al volver al estado de quiescencia, las células T recuperan los altos niveles de expresión de HVEM, y los bajos niveles de expresión de LIGHT (Murphy et al. 2006). La forma soluble de LIGHT es incapaz de disociar el complejo *cis* HVEM-BTLA, pero actúa potenciando la unión entre HVEM y BTLA (**Fig. 12**) (Steinberg et al. 2011). Estos resultados indican que LIGHT tiene cuatro funciones en la señalización: (i) activación de HVEM, (ii) disociación del complejo *cis* HVEM-BTLA, (iii) activación del LT β R, (iv) y en la forma soluble potenciar la formación del complejo *cis* HVEM-BTLA (Ware & Sedy 2011).

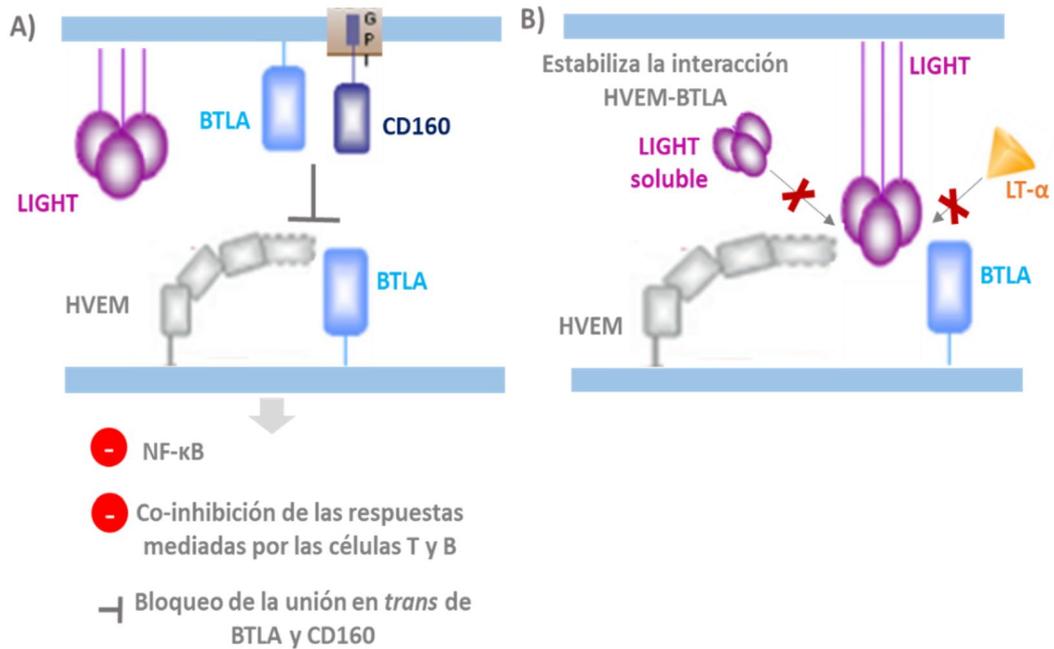


Figura 12. Interacción en la configuración *cis* BTLA/CD160-HVEM. (A) En condiciones de homeostasis, HVEM y BTLA se expresan de manera constitutiva en la misma célula e interactúan en *cis* inhibiendo las respuestas mediadas por las células T, e impidiendo la activación del factor de transcripción NF-κB. El complejo *cis* HVEM-BTLA bloquea también la interacción en *trans* con BTLA/CD160 (Shui et al. 2011) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011). (B) Tras la activación de las células T se induce la expresión transitoria de la forma LIGHT de membrana, la cual es capaz de disociar la interacción en *cis* HVEM-BTLA (Steinberg et al. 2011). La forma soluble de LIGHT y LT-α (presenta muy baja afinidad por HVEM) no son capaces de interrumpir la unión *cis* HVEM-BTLA, pero la forma soluble de LIGHT actúa potenciando la interacción HVEM-BTLA (Steinberg et al. 2011).

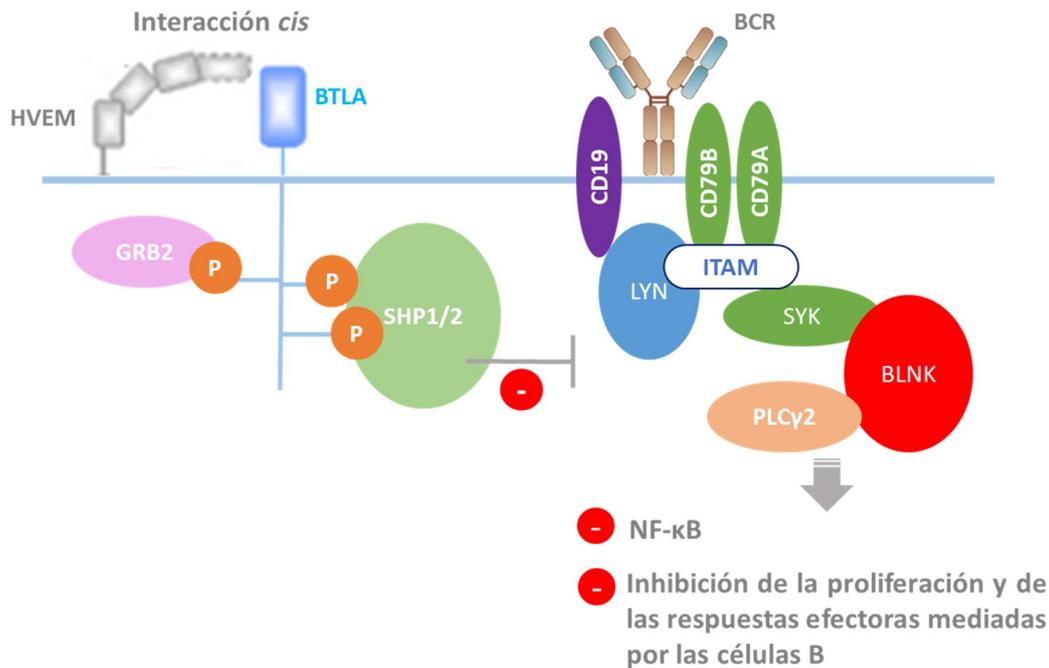


Figura 13. Señalización negativa en las células B a través de receptores co-inhibidores. La activación de BTLA por HVEM induce la fosforilación de los dominios ITIMs de su región citoplasmática, lo que conduce al reclutamiento de las proteínas tirosina fosfatasas 1 y 2 (SHP-1/2) en las células T y B (Vendel et al. 2009). Aunque BTLA se asocia con los miembros del complejo BCR, IgM y CD79a/b, no actúa directamente sobre él. Una vez fosforilados, los dominios ITAM de CD79a/b reclutan la proteína tirosina quinasa Syk, la cual es fosforilada a su vez por otra proteína tirosina quinasa denominada Lyn (Vendel et al. 2009). Syk fosforila a su vez a la proteína de enlace de célula B (BLNK) y la fosfolipasa C γ 2 (PLC γ 2), mediando un papel crítico en la cascada de señalización que conduce a la activación de la proliferación y la diferenciación de las células B a través de la activación del factor NF- κ B (Vendel et al. 2009).

Después de la activación de las células T, la unión de HVEM a LIGHT o a la LT- α en *trans* estimula la respuesta inmunitaria, potenciando la co-estimulación de las células T, la co-estimulación de las células B en cooperación con CD40/CD40L, la diferenciación plasmática y la secreción de inmunoglobulinas, y la maduración de DCs (**Fig. 14**). Mientras que la unión a BTLA y CD160 da lugar a una señalización co-inhibitoria de las células T y B (**Fig. 14**) (Pasero et al. 2012) (Shui et al. 2011). Basándonos en la estructura conservada del complejo ligando-receptor de la familia TNF, la unión de HVEM con LIGHT debería ser en *trans* entre células adyacentes (**Fig. 14**) (Pasero et al. 2012) (Ware & Sedy 2011). Sorprendentemente, las formas solubles de BTLA y CD160 también son capaces de activar la señalización a través de HVEM en la configuración *trans* induciendo la expresión de NF- κ B (**Fig. 14**) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011).

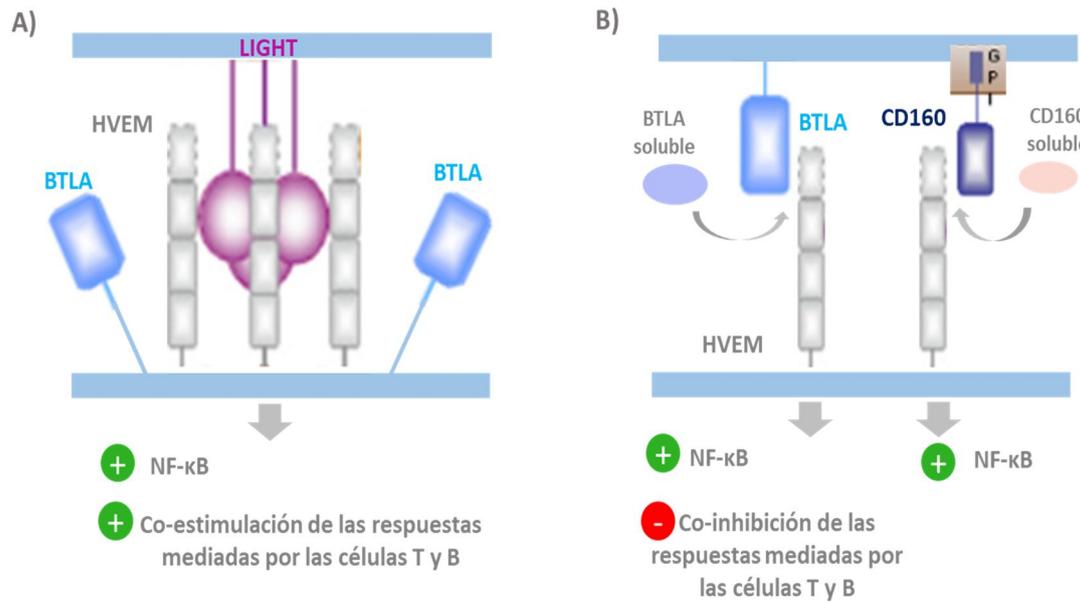


Figura 14. Interacciones en la configuración *trans* LIGHT-HVEM y BTLA/CD160-HVEM. (A) Si se está expresando LIGHT, pero no se expresan BTLA/CD160 o lo hacen en niveles bajos, tendrá lugar la interacción en *trans* LIGHT-HVEM activando las funciones efectoras de las células T y B. La interacción de LIGHT de membrana con HVEM desplaza a BTLA fuera de la zona de contacto (Pasero et al. 2012) (Ware & Sedy 2011). (B) Si por el contrario, BTLA/CD160 se expresan pero LIGHT está ausente o bien los niveles de expresión son bajos; se puede producir la interacción en la configuración *trans* BTLA-HVEM entre células adyacentes inhibiendo las respuestas mediadas por las células T y B (Pasero et al. 2012) (Shui et al. 2011) (Steinberg et al. 2011). (A) y (B) La unión en *trans* de cualquiera de los ligandos LIGHT, BTLA y CD160 desencadena la activación transcripcional mediada por NF-κB. Las formas solubles de BTLA y CD160 pueden actuar también induciendo la expresión de NF-κB (Cheung et al. 2009).

Hay autores que defienden la posibilidad de que LIGHT y BTLA/CD160 se estuvieran expresando de manera equivalente formando un complejo con HVEM (**Fig. 15**) (Croft 2005). Pero esta idea no está clara y requiere de la comprobación de si las tres moléculas pueden interactuar simultáneamente (Croft 2005). Sin embargo, otros autores afirman que la interacción en *trans* HVEM-BTLA es impedida por la forma de membrana de LIGHT unida a HVEM, y se cree que es debido a impedimentos estéricos (Steinberg et al. 2011). Además, la afinidad de unión de LIGHT por HVEM es mayor que la de HVEM por BTLA, lo que podría conducir a la disociación de la unión HVEM-BTLA en *trans* (Steinberg et al. 2011). Si LIGHT y BTLA se expresan de manera equivalente en la misma célula, podrían formar un complejo con HVEM expresado por otra célula adyacente, limitándose la cantidad disponible de LIGHT para activar las respuestas inmunitarias a través de LTβR. En este contexto, BTLA podría establecer una señalización supresora, o bien, podría actuar neutralizando la posible acción co-estimuladora de LIGHT (**Fig. 15**) (Croft 2005).

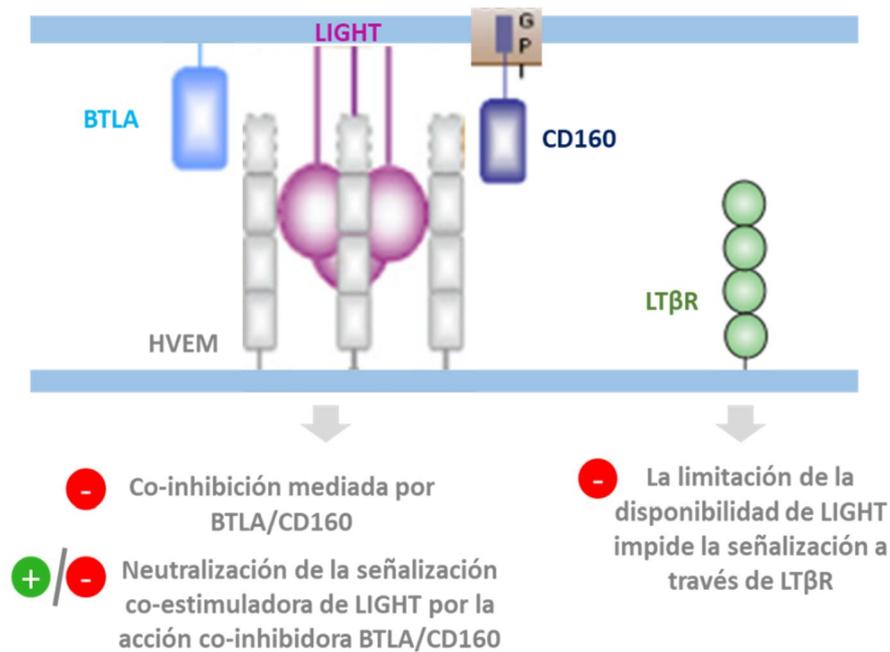


Figura 15. Co-expresión de las moléculas LIGHT/BTLA/CD160 y HVEM. Si se pudiera dar el caso de que se co-expresaran de manera simultánea BTLA/CD160, LIGHT y HVEM, probablemente se produciría una señalización inhibitoria a través de BTLA/CD160 por limitación de la disponibilidad de unión de LIGHT al LTβR; o bien, la acción estimuladora de la unión LIGHT-HVEM se vería anulada por la acción inhibitoria de BTLA/CD160 (Croft 2005).

1.2.4.3. Función inhibitoria dominante de HVEM como potencial diana terapéutica en la inmunidad antitumoral frente al linfoma B de non-Hodgkin

HVEM es expresada en todos los linfocitos B normales y tumorales (Pasero et al. 2012). Las células B no expresan LIGHT, pero presentan altos niveles de expresión de BTLA, el ligando de HVEM (Pasero et al. 2012). Recientemente, se ha puesto de manifiesto la importancia de la relación entre mutaciones que afectan al gen *TNFRSF14* que codifica para HVEM (sobre todo las que aumentan sus niveles de expresión) con una mayor progresión y un peor pronóstico de los linfomas de células B, lo que podría sugerir un papel de HVEM en la evasión de la respuesta inmunitaria antitumoral (Pasero et al. 2012) (Cheung et al. 2010). Esta relación directa, plantea a HVEM como molécula diana cuyo bloqueo potenciaría la respuesta inmunitaria antitumoral (Pasero et al. 2012).

Antes del descubrimiento de la interacción entre BTLA y HVEM, se pensaba que HVEM actuaba solo como activador de la co-estimulación de las células T (Murphy et al. 2006). De hecho, en las células epiteliales del intestino, HVEM funciona como un receptor co-estimulador que al interactuar con CD160 altamente expresado por los

linfocitos T intestinales intra-epiteliales (IELs), induce la liberación de péptidos antimicrobianas que controlan a los microorganismos potencialmente patógenos de la microbiota intestinal (McGrath & Najafian 2012). Posteriormente, se descubrió que los ratones deficientes para la expresión de HVEM (HVEM^{-/-}) exhibían una mayor respuesta por parte de las células T a diferentes estímulos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y eran más susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Estos hechos, revelan el potencial papel dominante de HVEM como inhibidor de las respuestas mediadas por las células T, frente a su función estimuladora (Wang et al. 2005). Células T deficientes para HVEM (y células T deficientes para BTLA) muestran hiper-reactividad tras haber sido estimuladas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 *in vitro* (Sun et al. 2009) (Wang et al. 2005) (Steinberg et al. 2011). En condiciones no inflamatorias, tanto en ratones HVEM^{-/-} como BTLA^{-/-}, se ha observado un incremento de las células T de memoria, lo que sugiere que la interacción BTLA-HVEM regula negativamente la expansión homeostática de las células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria *in vivo* (Shui et al. 2011) (Steinberg et al. 2011). Además, las células T HVEM^{-/-} presentan un incremento en su proliferación y en la producción de citoquinas si lo comparamos con las células T *wild-type* (WT), en respuesta a la estimulación *in vitro* con concanavalina A (ConA) (potente mitógeno de las células T) (Wang et al. 2005) (Steinberg et al. 2011). Por el contrario, las células T deficientes en la expresión de LIGHT no mostraban una mayor proliferación o producción de citoquinas en respuesta a ConA (Murphy et al. 2006). LIGHT es un potente modulador de las respuestas inmunitarias y su expresión forzada mediante modificación genética en las células T conduce a enfermedades inflamatorias y auto-inmunitarias (Wang et al. 2005) (Murphy et al. 2006). El bloqueo de LIGHT por la proteína recombinante soluble HVEM (HVEM-Ig) reduce la proliferación de las células T, y por lo tanto, reduce la incidencia de las enfermedades mediadas por las células T (Wang et al. 2005). Recientemente, ha sido descubierto un anticuerpo monoclonal antagonista de las interacciones LIGHT/HVEM y LIGHT/LTβR que modula de manera negativa la respuesta inmunitaria alogénica mediada por linfocitos T CD8⁺, que adquieren un fenotipo similar a las células T deficientes para LIGHT cuando se bloquea la interacción HVEM/LIGHT/LTβR mediante un anticuerpo monoclonal antagonista (del Rio et al. 2016). Además, se ha visto que *in vitro* la unión de LTβR a LIGHT inhibe de manera competitiva el reconocimiento de HVEM por LIGHT cuando ambos receptores se están expresando en la misma célula, lo que sugiere que el bloqueo de LTβR/LIGHT por el

anticuerpo anti-LIGHT es más crítico que el bloqueo de HVEM/LIGHT (del Rio et al. 2016).

1.2.4.4. Perspectivas terapéuticas en el contexto de los linfomas y la vía de interacción HVEM/BTLA/CD160/LIGHT

En el contexto de la terapia antitumoral, el objetivo fundamental es potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral (Pasero et al. 2012). De manera similar a lo que ocurre en los tumores sólidos, la vía de señalización PD1/PD-L1 promueve el escape del sistema inmunitario en tumores de origen hematopoyético (Curran et al. 2017). Por ejemplo, se ha observado el incremento en la expresión de PD-L1 en blastocitos leucémicos y en células mononucleares periféricas de la sangre en pacientes con síndrome mielodisplásico o con leucemia mielomonocítica crónica (Curran et al. 2017). Ratones con leucemia deficiente para la expresión de PD1 (PD1^{-/-}) presentan células T CD8⁺ específicas del tumor que exhibían una mayor respuesta y supervivencia, y esto también se conseguía con el bloqueo de la vía PD1/PD-L1 mediante el uso de anticuerpos anti-PD-L1 (Curran et al. 2017). Otras de las moléculas sobre-expresadas en malignidades hematopoyéticas son CTLA-4 y LAG-3 (Curran et al. 2017). CTLA-4 es sobre-expresado por las células Tregs residentes en el microambiente del linfoma, y se ha observado que el bloqueo de CTLA-4 *in vitro* mediante el uso de anticuerpos impide la supresión de las células T efectoras mediada por las células Tregs (Curran et al. 2017). Sin embargo, el bloqueo de CTLA-4 en modelos de linfoma *in vivo* no tuvo efecto sobre la progresión de la enfermedad (Curran et al. 2017). LAG-3 es otro receptor co-inhibidor expresado en las células T activadas (Curran et al. 2017). A diferencia de los ratones PD1^{-/-} y CTLA-4^{-/-}, los ratones LAG-3^{-/-} no desarrollan auto-inmunidad (Curran et al. 2017). Sin embargo, LAG-3 es un claro regulador negativo de las células T efectoras y media la supresión de las células Tregs (Curran et al. 2017). LAG-3 está sobre-expresado en las células T CD8⁺ específicas del tumor en un modelo murino de leucemia mieloide aguda (AML), y se ha demostrado que el uso de anticuerpos anti-LAG-3 en combinación con el bloqueo de CTLA-4 y PD-1 potencia la expansión y las funciones citotóxicas de las células T CD8⁺ específicas de la AML, lo cual está asociado con un mejor pronóstico de la enfermedad (Curran et al. 2017).

Otros tratamientos que pueden ser utilizados para modular la respuesta inmunitaria antitumoral o inducir la muerte de las células tumorales son (Pasero et al. 2012):

i. Bloqueo de la vía inhibitoria del BTLA en linfomas que expresan HVEM, sola o en combinación con el bloqueo de la vía del PD1 en linfocitos específicos de tumor, usando anticuerpos antagonistas (Pasero & Olive 2013).

ii. Bloqueo del dominio de unión CRD1 de HVEM a BTLA y CD160 potenciando la respuesta inmunitaria antitumoral (Cai & Freeman 2009).

iii. Inducción de la apoptosis de las células tumorales, basándonos en la idea de que HVEM puede promover la apoptosis en células de linfoma del manto y en la leucemia linfocítica crónica (CLL) a través de receptores de muerte (Lohr et al. 2012).

iv. Potenciación de la vía co-estimuladora LIGHT/HVEM. La expresión de LIGHT en las células tumorales estimula la producción de quimiocinas por parte de las células del estroma; y junto con la interacción de LIGHT con LT β R expresado también por las células del estroma, forman un microambiente tumoral que atrae a las células T *naive*. Una vez en el contexto del tumor, las células T *naive* pueden ser activadas a células T CD8⁺ efectoras mediante la interacción co-estimuladora LIGHT-HVEM, conduciendo a la erradicación del tumor (Murphy et al. 2006).

Basándonos en el papel dominante de HVEM como receptor co-inhibidor de las respuestas mediadas por las células del sistema inmunitario (apartado 1.2.4.3), nos planteamos estudiar el papel de HVEM y su vía de señalización a través de BTLA como interesantes dianas de intervención terapéutica en un modelo de linfoma de tipo B de non-Hodgkin.

1.3. Sistema de edición del genoma: CRISPR-Cas

En 1970, el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante marcó el comienzo de una nueva era para la biología (Mojica et al. 2005). Los biólogos moleculares adquirieron la capacidad para manipular el DNA, introduciendo la ingeniería genética y haciendo posible el estudio de genes y su aplicación para el desarrollo de la medicina y la biotecnología (Mojica et al. 2005). El genoma de organismos eucariotas contiene billones de bases de DNA y son difíciles de manipular. Uno de los avances en la

manipulación genética ha sido el desarrollo de la tecnología de la recombinación homóloga (HR), por la cual la reparación del DNA diana tiene lugar a través de la recombinación entre secuencias homólogas presentes en el DNA exógeno que incluyamos (Mojica et al. 2005). Esta tecnología ha permitido el desarrollo de modelos animales *Knock-in* y *Knock-out* a través de la manipulación genética de las células madre de la línea germinal (Mojica et al. 2005). Sin embargo, aunque la recombinación homóloga produce alteraciones precisas, los fenómenos de recombinación homóloga son extremadamente infrecuentes (ocurren en 1 de cada 10^6 - 10^9 células), por lo que en la mayoría de los casos se produciría una recombinación al azar (Mojica et al. 2005). Para superar este problema, fue descubierta la aplicación de mecanismos de defensa inmunitaria adaptativos presentes en organismos procariotas, conocido como el sistema CRISPR-Cas, para la edición específica del genoma (Mojica et al. 2005).

1.3.1. Descubrimiento y fundamento de la tecnología CRISPR-Cas

Las bacterias y arqueas han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en ambientes dinámicos con factores de estrés y fluctuaciones (Bhaya et al. 2011) (Horvath & Barrangou 2010). La constante exposición a DNA exógeno procedente de infección viral, conjugación, y/o transformación ha forzado el desarrollo por parte de los organismos procariotas de mecanismos de defensa que permitan a la célula reconocer y distinguir el DNA o RNA “extraño” del “propio” y sobrevivir a la exposición de elementos invasores (Horvath & Barrangou 2010). Recientemente, estos mecanismos de defensa en procariotas han sido reconocidos como parte del sistema inmunitario adaptativo y consisten en una agrupación de secuencias cortas palindrómicas inter-espaciadas (CRISPR) que confieren inmunidad frente a fagos (Horvath & Barrangou 2010). El locus CRISPR fue identificado por primera vez en 1987 por Nakata y colaboradores en *Escherichia coli* (Mojica et al. 2005). En los 10 años siguientes, Mojica y colaboradores clasificaron estas secuencias repetidas inter-espaciadas como una única familia presente en más del 40% de las bacterias y en el 90% de las arqueas (Mojica et al. 2005) (Rath et al. 2015). El CRISPR típico está formado por varias repeticiones directas no contiguas separadas por tramos de secuencias variables llamados *separadores* (se corresponden a los segmentos capturados de los virus o de las secuencias de los fagos patógenos) (Horvath & Barrangou 2010). Los *separadores* son usados como elementos de reconocimiento de las zonas de complementariedad en el genoma de virus u otros

elementos patógenos, para poder así destruirlos (Rath et al. 2015). El genoma del hospedador es modificado gracias a la adquisición de los *separadores* y su descendencia heredará esa protección inmunitaria adquirida (Bhaya et al. 2011) (Rath et al. 2015). La actividad del sistema CRISPR requiere de la presencia de un conjunto de genes asociados denominados *cas* (sistema CRISPR-Cas), los cuales se encuentran normalmente adyacentes al CRISPR. Los genes *cas* codifican para las proteínas que presentan dominios funcionales típicos de las nucleasas, helicasas, polimerasas, y proteínas de unión a polinucleótidos (Horvath & Barrangou 2010) (Rath et al. 2015). El mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas puede ser dividido en tres fases: adaptación, expresión y maduración, e interferencia (**Fig. 16**) (Bhaya et al. 2011) (Amitai & Sorek 2016). En la primera fase de **adaptación**, también conocida como **inmunización o adquisición del *separador***, las proteínas Cas identifican al DNA diana y adquieren una nueva secuencia *separadora* que se integrará en el *array* CRISPR (**Fig. 16**) (Amitai & Sorek 2016). Para referirnos a la secuencia *separadora* en el genoma viral o patógeno, usaremos la denominación **protoseparador** (Bhaya et al. 2011). En la mayoría de los casos, es imprescindible la presencia de una secuencia corta de nucleótidos conservados que se sitúan en la proximidad de la secuencia del *protoseparador* (Bhaya et al. 2011). Esta secuencia se denomina el motivo adyacente al **protoseparador** (PAM) y es necesaria para el reconocimiento, y corte mediado por la endonucleasa Cas9 (Bhaya et al. 2011). En esta primera fase, se requiere de dos nucleasas, Cas1 y Cas2, claves para el funcionamiento del sistema (Bhaya et al. 2011). En la segunda **fase de expresión y maduración**, el *array* CRISPR es transcrito en un precursor RNA (pre-crRNA) por la RNA polimerasa (Bhaya et al. 2011). A continuación, el pre-crRNA será cortado por endoribonucleasas específicas en unidades más pequeñas conocidas como CRISPR RNAs (crRNAs) o RNA guías (sgRNAs) (**Fig. 16**) (Bhaya et al. 2011). Cada sgRNA contiene una única secuencia *separadora* flanqueada por una secuencia corta repetida (Amitai & Sorek 2016). Estos sgRNAs son combinados con una o más proteínas Cas, para formar el complejo Cas-sgRNA (**Fig. 16**) (Amitai & Sorek 2016). En la tercera fase, denominada como **interferencia o inmunidad**, el sgRNA se une a un complejo multiproteico Cas-sgRNA. El **complejo CRISPR-Cas-sgRNA** se encargará de buscar zonas de complementariedad en el material genético extraño y el reconocimiento se llevará a cabo gracias a la secuencia PAM (**Fig. 16**) (Amitai & Sorek 2016). Si hay disparidad entre el *separador* y el DNA diana o si hay mutaciones en la secuencia PAM, no se producirá el corte (Bhaya et al. 2011). En este caso, el DNA no será destruido, el proceso de replicación viral continuará,

y el hospedador no será inmune al ataque mediado por el virus (Bhaya et al. 2011). Sin embargo, la nucleasa Cas puede mediar el corte de secuencias que no son totalmente complementarias, lo que se denomina actividad *off-target* (apartado 1.3.4). La nucleasa Cas puede reconocer de manera inespecífica nucleótidos no complementarios dependiendo de la cantidad, la posición, y la identidad de las bases no complementarias (Sun et al. 2016). Los nucleótidos no complementarios próximos a la región PAM (alrededor de 6-11 pares de bases *upstream* de la secuencia PAM) disminuyen la probabilidad de que la nucleasa Cas medie el corte inespecífico en esa secuencia, en comparación con los nucleótidos no complementarios alejados situados en el extremo 5' (Peng et al. 2016). Por otro lado, normalmente más de 3-4 nucleótidos no complementarios impiden el corte inespecífico por la nucleasa Cas (Peng et al. 2016). El sistema CRISPR-Cas puede ser dividido en dos subsistemas parcialmente independientes (Bhaya et al. 2011). El primer subsistema está formado por las proteínas, Cas1 y Cas2, las cuales son esenciales para la adquisición de nuevos *separadores*; y no parecen tener algún papel en las fases de expresión y maduración o en la de interferencia (Bhaya et al. 2011) (Amitai & Sorek 2016). El segundo subsistema, es requerido para el procesamiento de los transcritos primarios del *array* CRISPR (sgRNA), y el reconocimiento y degradación del material genético extraño (Bhaya et al. 2011).

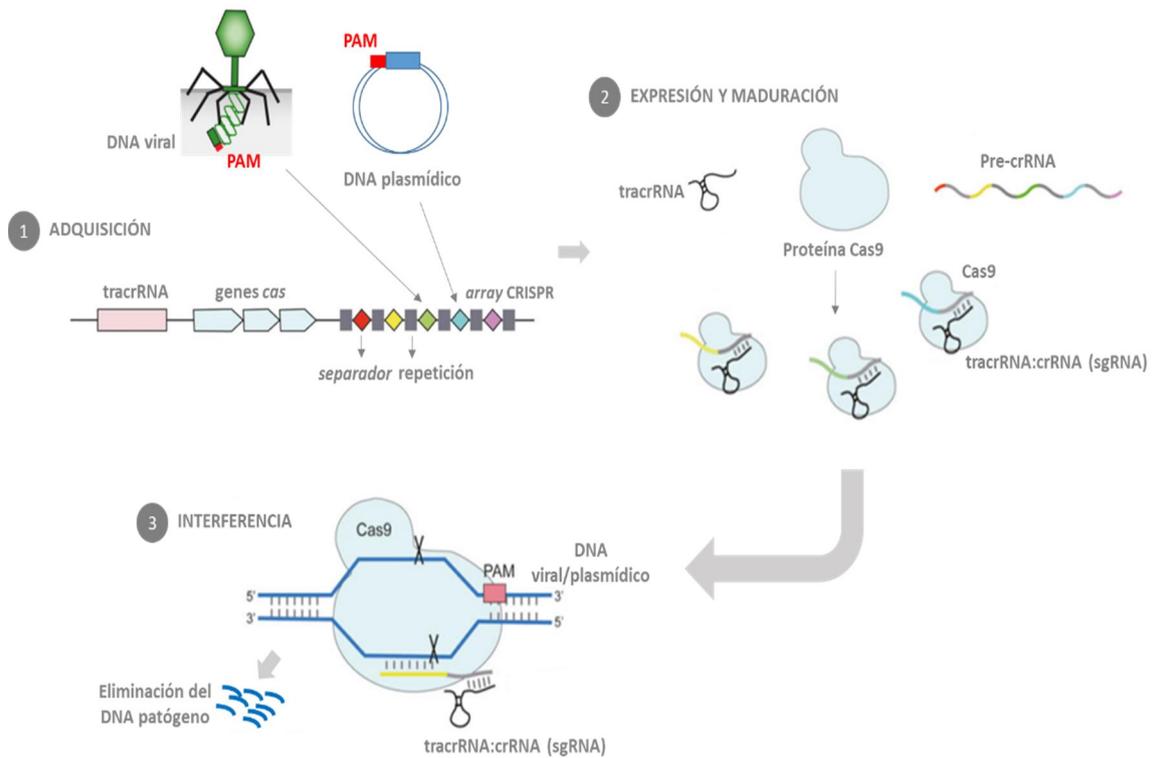


Figura 16. Fases de actuación del sistema inmunitario adaptativo CRISPR-Cas9. (1) **Adquisición.** Primera fase de adquisición de los elementos *separadores*, procedentes de las secuencias *proto-separadoras* del genoma viral de fagos infectivos reconocidas a través de la secuencia PAM. Los *separadores* son incluidos en el *array CRISPR*. (2) **Expresión y maduración.** La segunda fase consiste en la transcripción y maduración de los componentes del sistema CRISPR-Cas9: el pre-crRNA es transcrito en los diferentes crRNA, y junto con el *tracrRNA* formarán el complejo híbrido sgRNA que guiará a la endonucleasa Cas9 a la zona específica del genoma. (3) **Interferencia o inmunidad.** El sgRNA presenta una secuencia de 20 nucleótidos no codificante complementaria a una zona específica del genoma viral o del plásmido. Una vez que se establece la complementariedad, Cas9 mediará el corte en la doble hebra de DNA a través del reconocimiento previo de la secuencia PAM, conduciendo a la eliminación del DNA patógeno.

1.3.2. Sistema CRISPR de tipo II: endonucleasa Cas9

Han sido identificados tres tipos de sistemas CRISPR-Cas: Tipo I, Tipo II y Tipo III, y estos, pueden ser subdivididos considerando su diversidad estructural y funcional (Amitai & Sorek 2016). El sistema **CRISPR Tipo II** es el mejor caracterizado y el más usado, está formado por la endonucleasa Cas9, el *array crRNA* que codifica para los RNAs guías (sgRNAs) y requiere de un elemento auxiliar para la trans-activación del crRNA (*tracrRNA*) que facilita el procesamiento del *array crRNA* en las distintas unidades (**Fig. 17**) (Ran et al. 2013). Cada unidad sgRNA presenta una secuencia guía de 20 nucleótidos y una secuencia directa corta parcialmente repetida, que será reconocida por Cas9, permitiendo que se establezca la complementariedad Watson-Crick entre las

20pb (Ran et al. 2013). En el sistema CRISPR-Cas derivado de *Streptococcus pyogenes*, la secuencia de DNA diana debe estar precedida por la **secuencia PAM** 5'-NGG y la endonucleasa Cas9 realizará el corte 3 pares de bases *upstream* de PAM (Ran et al. 2013). La nucleasa Cas9 se caracteriza por presentar dos dominios nucleasa, RuvC y HNH, denominadas así en base a su homología con otros dominios nucleasa estructurales conocidos (Mojica et al. 2005). Para que el sistema CRISPR-Cas procariota funcione en células de mamífero, ha sido optimizado el uso de codones para humanos en la nucleasa Cas9; además, el crRNA y el tracrRNA pueden ser fusionados para formar una quimera, el RNA guía (**sgRNA**) (Ran et al. 2013). El resultado de la edición del genoma con el sistema CRISPR-Cas depende de los procesos de reparación del DNA que ocurran en la célula tras la rotura producida en la doble hebra (DBS) del locus diana (Seruggia & Montoliu 2014). En el caso de ausencia de DNA molde, la reparación se producirá por recombinación no homóloga del DNA (**NHEJ**, *non-homologous end joining*) (Seruggia & Montoliu 2014). Si por el contrario, incluimos DNA molde, la reparación tendrá lugar de manera homóloga (**HDR**, *homology-directed repair*) (Seruggia & Montoliu 2014). En la reparación vía NHEJ, pueden aparecer mutaciones en forma de cambios en un único nucleótido, deleciones o inserciones (**Fig. 17**) (Seruggia & Montoliu 2014). Si la mutación está localizada en uno de los primeros exones codificantes del gen, es probable que se produzca un corrimiento en el marco de lectura o la generación de codones stop prematuros, que conduzcan a la pérdida de expresión de la proteína (*Knock-out* del alelo) (Ran et al. 2013) (Seruggia & Montoliu 2014). La reparación HDR puede hacerse de manera convencional incluyendo DNA de doble cadena con extremos flanqueantes homólogos a la secuencia donde se van a insertar; o bien, se puede emplear DNA de cadena simple (**Fig. 17**) (Ran et al. 2013) (Seruggia & Montoliu 2014). Este último caso es una forma eficaz y simple de generar pequeñas mutaciones en el genoma, como modificaciones en un único nucleótido (Ran et al. 2013). El fenómeno de reparación HDR ocurre en una frecuencia sustancialmente más baja que la reparación NHEJ (Ran et al. 2013).

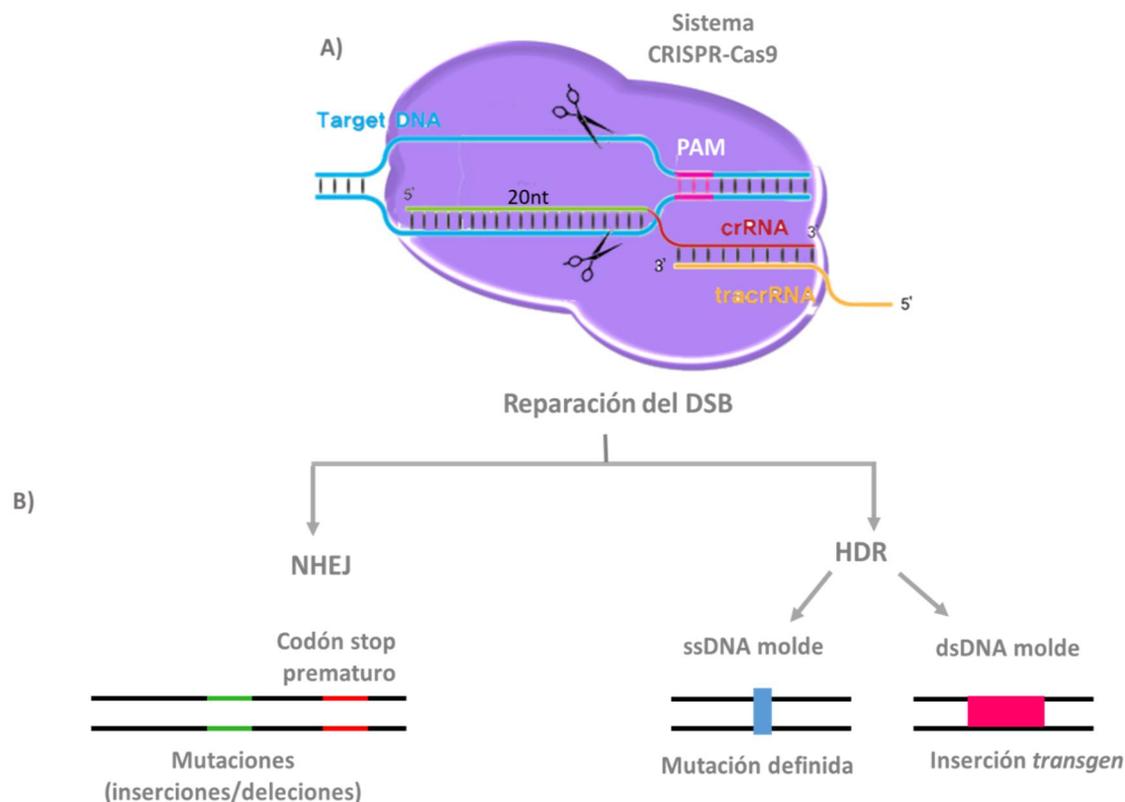


Figura 17. Organización estructural y fundamento de actuación del sistema CRISPR-Cas9. (A) El sistema CRISPR-Cas9 de Tipo II de *Streptococcus pyogenes* está formado por el complejo crRNA-tracrRNA y la nucleasa Cas9. El híbrido crRNA-tracrRNA, RNA guía (sgRNA), dirige a la enzima Cas9 a la secuencia diana dentro del genoma, mediante el uso de una secuencia de 20 nucleótidos no codificante complementaria al sitio de unión específico. Cas9 mediará el corte de la doble hebra de DNA a través del reconocimiento de secuencia 5' NGG (PAM), que está *downstream* de la secuencia diana en el genoma. El corte es efectuado 3 pares de bases *upstream* de PAM. (B) La reparación del corte de la doble hebra de DNA por parte del sistema CRISPR-Cas9 puede suceder mediante el fenómeno de reparación no homóloga (NHEJ) generando mutaciones o codones stop prematuros; o mediante la reparación homóloga, en el caso de que incluyamos DNA molde (HDR) (DNA de cadena simple (ssDNA) o doble (dsDNA)).

1.3.3. Comparación del sistema CRISPR-Cas con otras tecnologías de edición del genoma

Al igual que otras nucleasas diseñadas para la edición del genoma como son los dedos de zinc (ZFNs) y las TALENs (nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción) (Fig. 18), Cas9 puede generar un corte en las dos hebras del DNA (DSBs) en un loci específico en el genoma y modificarlo a través de la reparación vía NHEJ o HDR (Ran et al. 2013). Sin embargo, Cas9 ofrece una serie de ventajas frente a los ZFNs y las TALENs, como son la fácil customización y la elevada especificidad de la nucleasa, y la habilidad para la edición múltiple del genoma (Ran et al. 2013). Los ZFNs son

quimeras artificiales formadas por la fusión del dominio de dedos de zinc de unión al DNA y del dominio de la endonucleasa FokI (enzima de restricción que corta el DNA de manera inespecífica) (**Fig. 18**) (Sun et al. 2016). En los ZFNs se requiere la dimerización de los dominios para el corte de las dos hebras del DNA, esto implica que las zonas diana para la escisión estén accesibles cada 500 pares de bases, mientras que el sistema CRISPR-Cas9 puede hacer diana en 1 de cada 8 pares de bases en la secuencia genómica (Sun et al. 2016). Además, este problema no se podría solucionar empleando varias unidades de ZFNs porque se reduce la eficacia de unión al DNA (Sun et al. 2016). Debido a las limitaciones en el reconocimiento de las secuencias diana por parte de los ZFNs, surge otra nucleasa artificial mejorada denominada TALEN (similar a ZFN) (Sun et al. 2016). TALEN está formado por un dominio de unión al DNA de tipo activador transcripcional (TALE) y corta el DNA de manera inespecífica (**Fig. 18**) (Sun et al. 2016).

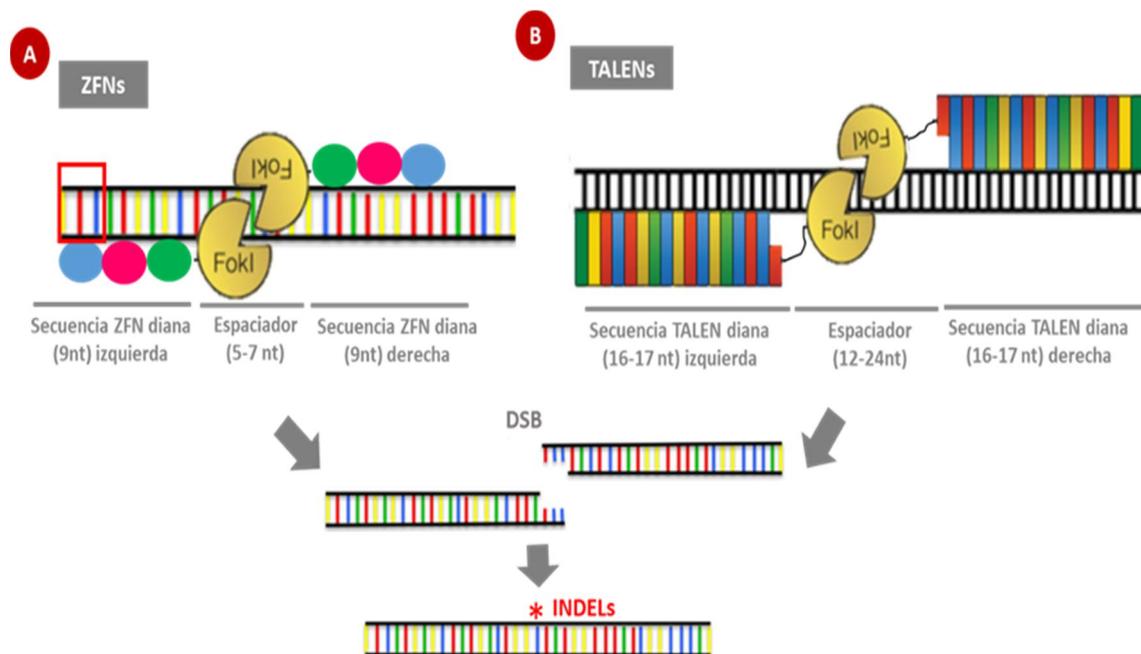


Figura 18. Representación esquemática de los ZFNs y las TALENs. (A) Los ZFNs están compuestos de tres dominios de dedos de zinc de reconocimiento del DNA y por un dominio catalítico de la nucleasa FokI (Mahfouz et al. 2014). Cada dominio de dedo de zinc se une a 3-4 pares de bases, por lo que los ZFNs reconocen secuencias de 9-12 nt (Mahfouz et al. 2014). El corte de la doble hebra del DNA (DSB) se producirá tras la dimerización de los dominios FokI, por lo que se requieren de dos ZFNs para activar la función catalítica de la nucleasa (Mahfouz et al. 2014). El corte mediado por los ZFNs se producirá en la región conocida como espaciado de 5-7nt (Mahfouz et al. 2014). (B) Las TALENs están formados por un dominio de unión al DNA derivado de efectores de tipo activador de la transcripción (TALE) y un dominio de la nucleasa FokI (Mahfouz et al. 2014). Las TALENs median el corte tras la dimerización de los dominios FokI, al igual que los ZFNs, pero lo hace en una región espaciadora de mayor tamaño (12-24 nt) (Mahfouz et al. 2014).

Descartando los ZFNs por su complejidad de uso, y a continuación comparamos el sistema CRISPR-Cas9 con las TALENs (Ran et al. 2013):

- Fácil customización. Cas9 puede ser fácilmente re-programada diseñando nuevas parejas de oligos guías de 20 nucleótidos complementarios a la zona del genoma de interés (Ran et al. 2013). Por el contrario, en el caso de las TALENs se requiere del diseño de dos nuevos genes *TALEN* (Ran et al. 2013).
- Patrón de corte. La endonucleasa Cas9 corta la doble hebra de la secuencia diana de DNA entre la base 17 y la 18, es decir 3 pares de bases *upstream* de PAM (Ran et al. 2013). Sin embargo, las TALENs cortan de manera inespecífica en los pares de bases 12-24 situadas entre las zonas de unión de la pareja de monómeros TALEN (Ran et al. 2013).
- Eficiencia del proceso de edición. Tanto Cas9 como las TALENs, son capaces de editar de manera eficaz el genoma en una gran variedad de tipos celulares y organismos. Sin embargo, Cas9 puede ser usada para la edición de múltiples loci de manera simultánea, mediante la combinación de varios sgRNA para la célula de interés (Ran et al. 2013).

1.3.4. Especificidad de la nucleasa Cas9: fenómeno *off-target*

La especificidad del sistema CRISPR-Cas9 está definida por los 20 nucleótidos localizados en el extremo 5' del sgRNA, los cuales se unen a través de la complementariedad Watson-Crick entre sus bases y las de una secuencia diana del genoma (Wiles et al. 2015). A pesar de la alta especificidad de Cas9, el corte se puede producir aunque la complementariedad no sea del 100% (Wiles et al. 2015) (Hsu et al. 2014). Los sitios que están fuera de la secuencia diana, y que además, presentan la secuencia PAM 5' NGG, son denominados sitios *off-target* (Hsu et al. 2014). El fenómeno por el cual Cas9 reconoce estas zonas *off-target* y lleva a cabo el corte es conocido como *off-targeting* (Hsu et al. 2014). La concentración enzimática y la duración de expresión de Cas9 son factores importantes en el fenómeno *off-targeting* (Hsu et al. 2014). Parece ser que si Cas9 está presente en concentraciones altas, su actividad nucleasa es menos específica cortando con mayor facilidad nucleótidos no complementarios o *mismatches*, aumentando las probabilidades de que el fenómeno *off-targeting* ocurra (Hsu et al. 2014). Por otra parte, la duración de la expresión de Cas9 afecta a la actividad *off-targeting* y su contribución en modelos *in vivo* está siendo investigada (Hsu et al. 2014).

Hay dos consideraciones principales en la elección de la secuencia guía de 20 nucleótidos: (i) la secuencia PAM 5' NGG para la Cas9 de *S. pyogenes* y (ii) la minimización de la actividad *off-targeting* (Ran et al. 2013). Los programas informáticos de diseño de las secuencias guías nos permitirán predecir las zonas de *off-target* y elegir los que menores probabilidades tengan de que se produzca este fenómeno (Ran et al. 2013). Para incrementar la especificidad, una estrategia alternativa es la forma mutada de **Cas9 D10A** (Ran et al. 2013). Una mutación de cambio de aminoácido de aspartato a alanina en el dominio catalítico RuvC convierte a Cas9 en una **nikasa** capaz de escindir cada cadena de DNA simple de manera simultánea con dos sgRNA (Ran et al. 2013). El uso de una pareja de sgRNA por la Cas9 D10A incrementa la especificidad de reconocimiento de la diana, aunque la eficiencia es menor (Ran et al. 2013).

II. Hipótesis de trabajo y objetivos

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El papel de las mutaciones en el gen *TNFRSF14* (codificante para HVEM) presentes en los dos subtipos más comunes de linfoma de células B, el linfoma folicular (FL) y el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), es muy controvertido. Algunos autores afirman que la pérdida de expresión de HVEM como resultado de mutaciones (sobre todo deleciones del alelo *wild-type*) se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad, es decir, la pérdida de HVEM promovería la progresión y supervivencia del tumor (Upadhyay et al. 2015) (Bjordahl et al. 2014) (Ward-Kavanagh et al. 2016) (Lohr et al. 2012) (Launay et al. 2012). La mayoría de las mutaciones encontradas del gen *TNFRSF14* en el linfoma folicular (FL) conducen a la pérdida del dominio transmembrana, con el consiguiente fallo en el anclaje de la proteína a la membrana (Launay et al. 2012). Como consecuencia de ello, la célula B pierde la acción co-inhibidora intrínseca que proporciona la interacción *cis* HVEM/BTLA en las células B, disminuyendo el umbral de activación que promueve el desarrollo de linfomas de células B del centro germinal (**Fig. 19A**) (Boice et al. 2016). Otra posible razón sería que la pérdida de expresión de HVEM en las células B de linfoma, impediría la interacción inhibitoria con BTLA expresado por las células T *helper* foliculares (T_{FH}) (Launay et al. 2012) (Sedy et al. 2015). Por otro lado, otras mutaciones podrían afectar a la afinidad de unión del receptor a sus diferentes ligandos (Launay et al. 2012). Así, las deleciones en el gen *TNFRSF14* pueden ser utilizadas por el tumor como mecanismo para prevenir la activación de las células NK co-estimuladas a través de la interacción CD160-HVEM (Sedy et al. 2015).

Sin embargo, la expresión de HVEM en muchos tipos de linfoma de células B (Pasero et al. 2012) (Pasero & Olive 2013) hace que cobre mayor importancia la idea del papel de HVEM como co-inhibidor al unirse en *trans* a BTLA expresado en las células T, lo que podría ser empleado como mecanismo de evasión inmunitaria por parte de los linfomas (**Fig. 19B**) (Upadhyay et al. 2015). La posible función inhibitoria dominante de HVEM en las respuestas de las células T se apoya en los estudios con ratones HVEM deficientes (HVEM^{-/-}) que exhibían un aumento de las respuestas inmunitarias mediadas por las células T, haciéndolos más susceptibles al desarrollo de enfermedades auto-inmunitarias (Wang et al. 2005). También, ha sido demostrado que la interacción HVEM-BTLA es una de las vías principales de inhibición utilizadas por las células de linfoma B

(tanto dependiente como independiente de la señalización a través del TCR) de la proliferación de un subgrupo de células T $V\gamma9V\delta2^+$ (representan la subpoblación mayoritaria de células T de la sangre en humanos, y juegan un papel clave en la lucha frente a patógenos microbianos y células tumorales); además, las células de linfoma folicular (FL) HVEM positivas inhiben de manera eficiente la proliferación de estas células T (Gertner-Dardenne et al. 2013). El bloqueo de la interacción HVEM-BTLA mediante el uso de anticuerpos antagonistas frente a BTLA tiene como resultado un fuerte incremento de la proliferación de las células T $V\gamma9V\delta2^+$ en co-cultivo con células de linfoma HVEM positivas, lo que permite la expansión clonal y el reclutamiento de células T frente al tumor a través de la vía BTLA/HVEM (Gertner-Dardenne et al. 2013).

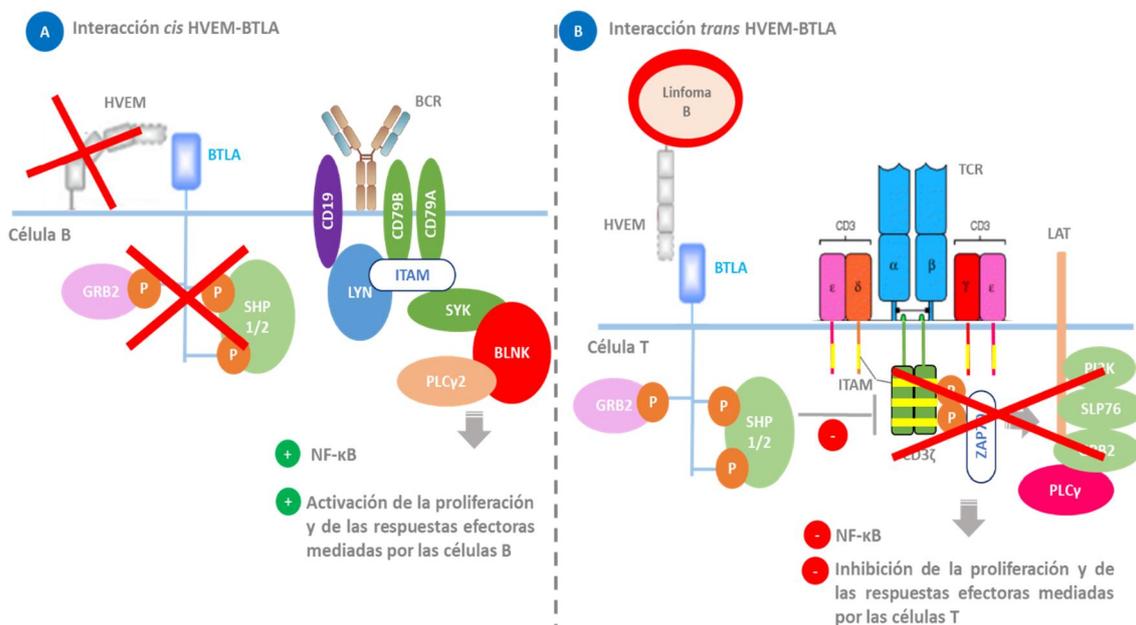


Figura 19. Dos posibles papeles de HVEM en la progresión del linfoma B. (A) La pérdida de expresión de HVEM en las células de linfoma B murino A20 como mecanismo utilizado por el tumor para promover su proliferación y desarrollo. Si HVEM no se expresa en la superficie de las células B de linfoma no interactuará en *cis* con BTLA, el cual no podrá activar su cascada de señalización inhibitoria, permitiendo la señalización mediada por BCR, activando una serie de proteínas como Syk, la cual es fosforilada por Lyn. Syk fosforila a su vez a BLNK y la fosfolipasa $C\gamma2$ ($PLC\gamma2$), activando finalmente el factor $NF-\kappa B$ y la proliferación y las respuestas efectoras mediadas por las células B (Boice et al. 2016). (B) La interacción en *trans* de HVEM, expresado en las células B de linfoma, y BTLA, expresado en las células T, conduce a la inhibición de la señalización mediada por el TCR en las células T (Wu et al. 2007). La activación de BTLA, tras la unión de HVEM, conduce a la defosforilación de los motivos de activación basados en tirosinas (ITAMs) del complejo $CD3\zeta$ del TCR, impidiendo la activación de la proteína tirosina quinasa ZAP70. De esta forma, ZAP70 no podrá fosforilar y activar a LAT (*linker* de activación en las células T), lo que impedirá la activación de una serie de proteínas (PI3K, SLP76, GRB2 y $PLC\gamma$). Todo ello tiene como resultado la inhibición de la activación del factor de transcripción $NF-\kappa B$, y la inhibición de la proliferación y de las respuestas mediadas por las células T (Lieping Chen and Dallas B. Flies 2013).

Por lo tanto, basándonos en la actividad inhibitoria dominante de HVEM (expresado por muchos tipos de células B malignas) tanto en *cis* en las células B, como en *trans* en las células T efectoras, y apoyándonos en los estudios que afirman que HVEM juega un papel en el desarrollo de los linfomas de células B (Pasero et al. 2012) (Pasero & Olive 2013) (Launay et al. 2012), planteamos estudiar el efecto de la pérdida de expresión de la proteína HVEM en la línea de linfoma B murino A20 en la progresión y desarrollo del tumor.

El **objetivo general** es estudiar el papel funcional de HVEM en la progresión tumoral de linfoma B. Para conseguir este objetivo, en este trabajo hemos propuesto dos sub-objetivos específicos:

Sub-objetivo específico 1.- Creación y caracterización de una línea celular de linfoma B murino A20 (H-2^d) que sea deficiente para la expresión de HVEM, mediante el truncamiento del exón 1, que codifica junto con parte del exón 2 para el péptido señal de HVEM, utilizando la tecnología de edición del genoma CRISPR-Cas9.

Sub-objetivo específico 2.- Utilización de un modelo experimental animal de linfoma B trasplantable para estudiar si la pérdida de expresión de HVEM en células tumorales, afecta al desarrollo y a la progresión tumoral.

III. Material y métodos

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas, medios de cultivo y transformación bacteriana

3.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para la transformación de los plásmidos de expresión en células eucariotas se emplearon dos cepas bacterianas competentes: *E. coli* TOP10 (Invitrogen) y *E. coli* Stbl3 (Invitrogen).

La bacteria *E. coli* TOP10 es empleada de rutina para clonajes sencillos en plásmidos de tamaño pequeño o intermedio, y tienen las siguientes características:

- i. Gen *hsdR*: confiere una transformación eficiente de DNA no metilado procedente de amplificación por PCR.
- ii. Gen *mcrA*: para una transformación eficiente de DNA metilado procedente de preparaciones genómicas.
- iii. Gen *lacZΔM15*: usado para la selección de los clones recombinantes por el color azul/blanco.
- iv. Gen *endA1*: empleado para la eliminación de digestiones no específicas producidas por la endonucleasa I.
- v. Gen *recA1*: tiene como objetivo reducir la recombinación no específica con el DNA clonado.
- vi. Gen *StrR*: gen de resistencia a estreptomicina.

La bacteria *E. coli* Stbl3 deriva de la cepa *E. coli* HB101 y se recomienda su uso para clonajes inestables que requieran de una eficiencia de transformación alta, por ejemplo el clonaje de insertos en plásmidos de expresión retroviral/lentiviral (Ran et al. 2013). Por lo tanto, la bacteria *E. coli* Stbl3 suele emplearse para el clonaje de genes que presenten secuencias con repeticiones directas e invertidas (Ran et al. 2013). La bacteria competente *E. coli* Stbl3, a diferencia de las TOP10, reduce la frecuencia de recombinación homóloga de secuencias largas terminales repetidas (LTRs) que se pueden encontrar en vectores de expresión retrovirales y lentivirales (Ran et al. 2013). La eficiencia de transformación de la bacteria competente Stbl3 es 10 veces mayor que la TOP10 ($> 1 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (cfu)/ μg de DNA plasmídico) (Ran et al. 2013).

La bacteria *E. coli* Stb13 presenta las siguientes características:

- i. Gen *hdsS20*: permite la transformación eficiente de DNA generado mediante PCR. Se trata de mutaciones en el sistema de metilación y restricción que permiten a *E. coli* el reconocimiento de DNA como extraño.
- ii. Gen *mcrB/mrr*: mutaciones que confieren el reconocimiento de DNA metilado como no extraño. Este genotipo es necesario para el clonaje de DNA genómico o DNA complementario metilado.
- iii. Gen *lacZΔM15*: gen presente también en la bacteria *E. coli* TOP10 para la selección de las colonias recombinantes.
- iv. Gen *endA*: gen presente también en la bacteria *E. coli* TOP10 que elimina la actividad inespecífica de la actividad endonucleasa.
- v. Gen *recA13*: mutación en el gen responsable de la recombinación del DNA; es recomendable para el clonaje de genes con repeticiones directas.
- vi. Gen *StrR*: como en el caso de la bacteria *E. coli* TOP10, la bacteria *E. coli* Stb13 expresa el gen de resistencia a estreptomicina.

Los medios de cultivo bacterianos empleados, se resumen en la siguiente tabla (tabla 2):

Tabla 2. Medios de cultivo bacterianos

Medio de cultivo	Casa comercial	LB + TB (medio líquido)	LB + TB + Agar (medio sólido)
Medio SOC (20 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura; 4,8 g/L MgSO ₄ ; 3,603 g/L dextrosa; 0,5 g/L NaCl y 0,186 g/L KCl)	Roth	-	-
Luria y Bertani (LB) (10 g/L peptona; 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl)	Roth	12,5 g/L	12,5 g/L
Terrific Broth (TB) (23,6 g/L extracto de levadura; 11,8 g/L triptófano; 9,4 g/L K ₂ HPO ₄ y 2,2 g/L KH ₂ P0 ₄)	Roth	25,4 g/L	25,4 g/L
Agar	Roth	-	20 g/L

Los diferentes medios de cultivo bacteriano fueron usados con diferentes fines:

- i. El medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (SOC) es utilizado para la recuperación de la bacteria *E. coli* competente tras el proceso de transformación. El medio SOC maximiza la eficacia de transformación de las células competentes.
- ii. El medio líquido LB + TB es usado para el crecimiento de la bacteria *E. coli* en suspensión en condiciones aeróbicas (agitación a 250 rpm) a 37 °C durante 12-16 horas. Se usa preferentemente para la extracción de plásmidos.
- iii. El medio sólido LB + TB + Agar es empleado para el crecimiento de la bacteria *E. coli* a 37 °C (12-16 horas).

Para el crecimiento selectivo de aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido, se utilizó el antibiótico carbenicilina (cuya concentración stock es de 100 mg/mL) diluido a una concentración de trabajo final de 50 µg/mL.

3.1.2. Transformación bacteriana por choque térmico

La transformación bacteriana se realizó mediante el protocolo de choque térmico, empleando la bacteria competente *E. coli* TOP 10 o Stbl3 (Hanahan 1983). El procedimiento fue el siguiente:

- i. Descongelación de la bacteria competente *E. coli* TOP 10/Stbl3 en hielo.
- ii. Una vez descongelada, se añadieron entre 50-100 ng/µL del plásmido circular, o bien el total del volumen, si se trataba de una reacción de ligación.
- iii. Se mantuvo en hielo durante 15 minutos.
- iv. Se aplicó el choque térmico a 42 °C durante 45 segundos.
- v. Tras el choque térmico, se puso la célula bacteriana de nuevo en hielo durante un minuto. Después, se añadieron 400 µL de medio de recuperación SOC, previamente atemperado y se recuperó en agitación a 37 °C, durante 45 minutos.
- vi. Por último, se sembró la transformación en placas de LB más TB con agar y carbenicilina, dejándolas en la estufa a 37 °C durante la noche.

3.2. Biología molecular

3.2.1. Plásmidos utilizados en este estudio

Los plásmidos utilizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, su descripción y procedencia se resumen en la siguiente tabla (**tabla 3**) y sus mapas están representados en las figuras (**Figs. 20-26**).

Tabla 3. Plásmidos empleados. MTA: Acuerdo de Transferencia de Material.

Plásmidos	Descripción	Procedencia
pJET 1.2/blunt	Plásmido de clonaje comercial para la ligación de productos de PCR o cualquier fragmento de DNA con extremos cohesivos o romos. Los plásmidos pJET1.2/blunt presentan un gen letal (enzima de restricción letal codificada por el gen <i>eco471R</i>), cuya expresión es interrumpida por la ligación del inserto de DNA en el sitio de clonación. Esta selección positiva facilita la identificación de colonias que presenten el plásmido pJET1.2/blunt con nuestro inserto de interés clonado. El sitio de clonación múltiple (MCS) tiene dos secuencias de reconocimiento <i>BglII</i> que flanquean el sitio de inserción. Presenta el gen <i>bla</i> de resistencia a ampicilina, el origen de replicación del plásmido pMB1 y promotor de la RNA polimerasa T7.	ThermoFisher Scientific
pCMV-eGFP	Plásmido de expresión lentiviral que codifica para la proteína fluorescente eGFP (<i>enhanced green fluorescent protein</i>) bajo el control del promotor CMV, presenta un <i>cassette</i> de selección de resistencia a puomicina y las secuencias virales 5'LTR y 3'LTR.	Addgene MTA
LentiCRISPRv2	Plásmido lentiviral de tercera generación, de expresión en mamíferos y alto número de copias. Presenta un <i>cassette</i> de expresión para la nucleasa Cas9 de <i>S.pyogenes</i> (SpCas9) bajo el control del promotor del factor-1 α de elongación corto (EFS), y otro para la expresión de la quimera del RNA guía (tracrRNA:crRNA) dirigida por el promotor U6. Empleamos la enzima de restricción <i>BsmBI</i> para el clonaje de los oligos de 20 pares de bases (pb) de la secuencia diana. Tras el corte del plásmido lentiviral con <i>BsmBI</i> se libera una secuencia de 2 Kb (<i>filler</i>) (Sanjana et al. 2015).	Addgene MTA

Continuación Tabla 3. Plásmidos empleados.

Plásmidos	Descripción	Procedencia
pPAX2	Plásmido de empaquetamiento lentiviral de segunda generación (puede ser empleado con vectores plasmídicos de 2nd o 3rd generación). Contiene los genes que codifican para las proteínas estructurales del virus: <i>gag</i> , codifica para las proteínas de la matriz, de la cápsida y de la nucleocápsida; <i>pol</i> , codifica para la retro-transcriptasa reversa y componentes de la integrasa; <i>rev</i> , codifica para la proteína Rev que se une al elemento de respuesta Rev (RRE) y facilita la exportación nuclear de los transcritos; y por último, <i>tat</i> , codifica para el trans-activador que actúa activando la transcripción desde el promotor LTR.	Dr. P. Schneider, MTA
pVSV-g	Plásmido de la envoltura lentiviral que presenta el gen <i>env</i> que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. Esta proteína que forma la envoltura de las partículas lentivirales es de tropismo amplio (Stewart et al. 2003).	Dr. P. Schneider, MTA
spCas9-PURO^R	Plásmido lentiviral que codifica para la expresión de la nucleasa Cas9 (bajo el control del promotor EFS) y para el gen de resistencia a puromicina (bajo el control de un sitio interno de entrada al ribosoma, IRES) (D. Heckel et al. 2014)	Dr. Dirk Heckel, MTA (Universidad de Hannover)
sgRNA_tagRFP657	Plásmido lentiviral que presenta un sitio de clonaje <i>BsmBI</i> para los oligos del DNA guía y está bajo el control del promotor U6. Presenta el gen <i>RFP657</i> que codifica para una proteína que emite fluorescencia en el canal APC, bajo el control del promotor EFS.	Dr. Dirk Heckel, MTA (Universidad de Hannover)
pRR-eGFP	Plásmido de comprobación de la eficacia de corte mediado por la nucleasa Cas9 dirigida por la secuencia guía. Se trata de un sistema de expresión que presenta la proteína fluorescente eGFP dividida. Por un lado, tenemos el extremo 5' terminal del gen que codifica para la proteína eGFP de 200 pb, y por otro, está el resto de la región codificante (CDS). Ambas secuencias están flanqueadas por codones stop (UAA), y entre ellas hay un MCS para el clonaje de la secuencia diana de la nucleasa Cas9. De tal manera, que si la nucleasa Cas9 media la escisión efectiva de la secuencia genómica diana, se reestructura la expresión de la proteína GFP mediante recombinación homóloga entre extremos complementarios (Flemer & Bu 2015), pudiendo ser reportada la fluorescencia verde por citometría de flujo o bien mediante microscopía de fluorescencia.	Addgene MTA

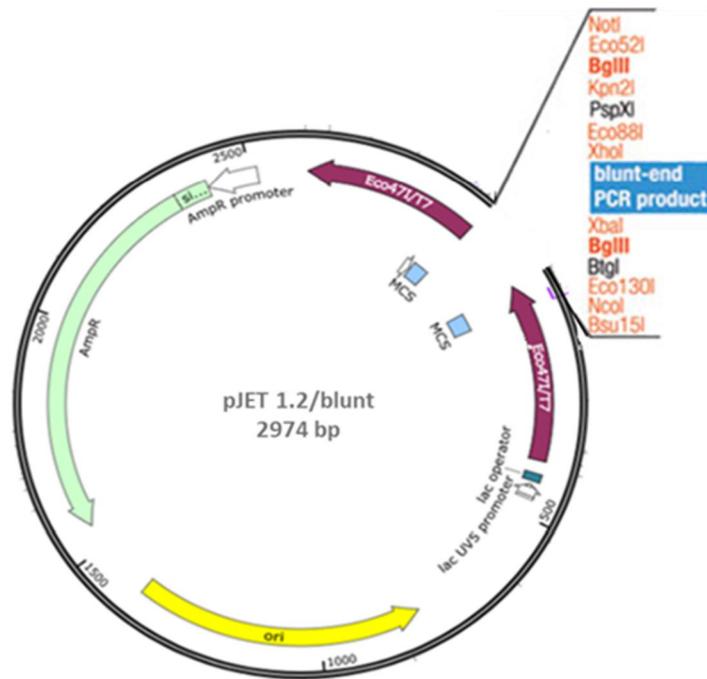


Figura 20. Vector plasmídico comercial pJET 1.2/blunt.

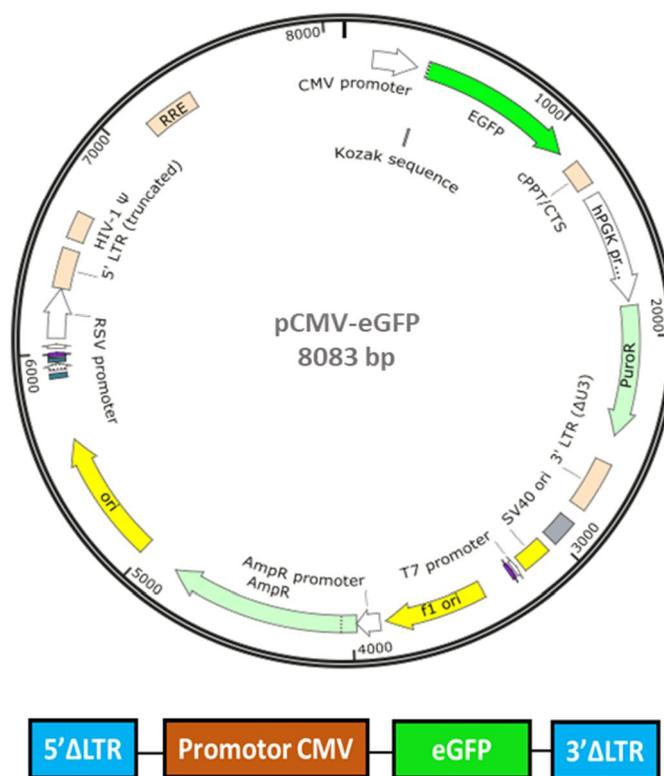


Figura 21. Plásmido pCMV-eGFP. Codifica para la proteína eGFP. Fue empleado como control del proceso de producción de las partículas lentivirales e infección de las células diana.

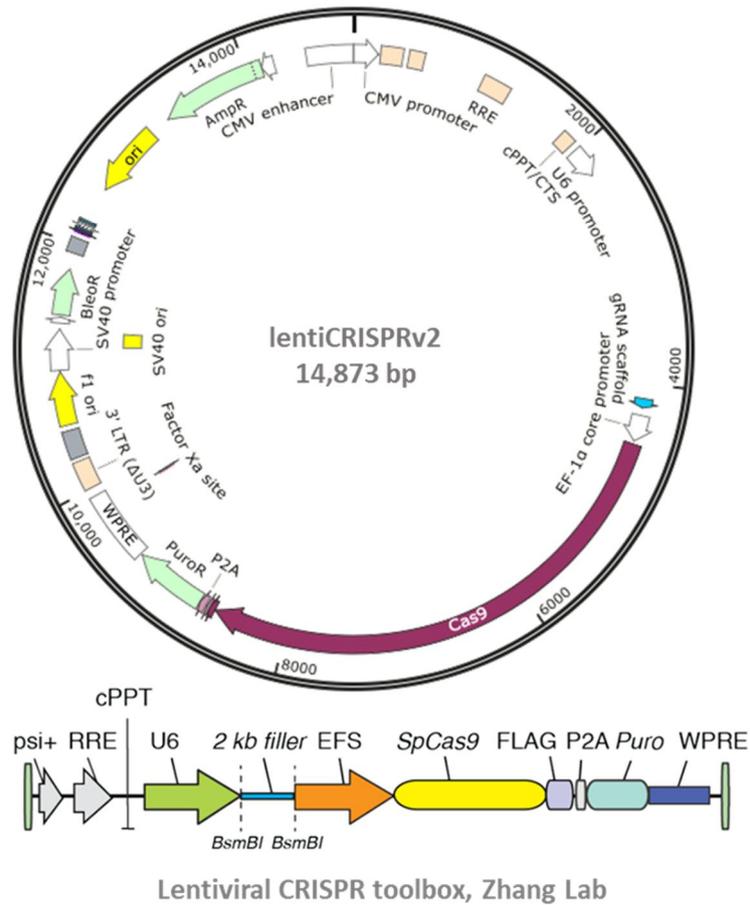


Figura 22. Plásmido de expresión lentiviral lentiCRISPRv2. Abreviaturas: señal de empaquetamiento Psi (ψ^+), cola de poli-purinas (cPPT) que ayudarían a la entrada del virus a través de la membrana nuclear, elemento de respuesta rev (RRE), promotor del factor-1 α de elongación corto (EFS), etiqueta octapeptídica (FLAG), péptidos 2A que facilitan el corte de polipéptidos durante la transducción en células eucariotas (P2A), marcador para selección con puromicina (PURO), elemento de regulación post-transcripcional (WPRE) (Sanjana et al. 2015).

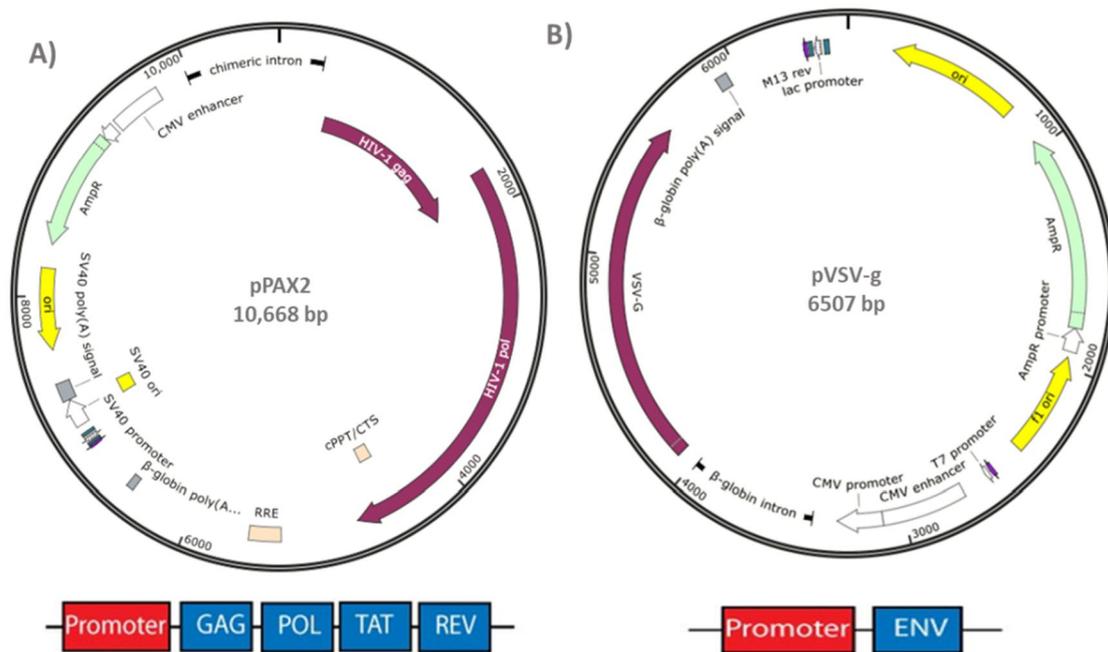
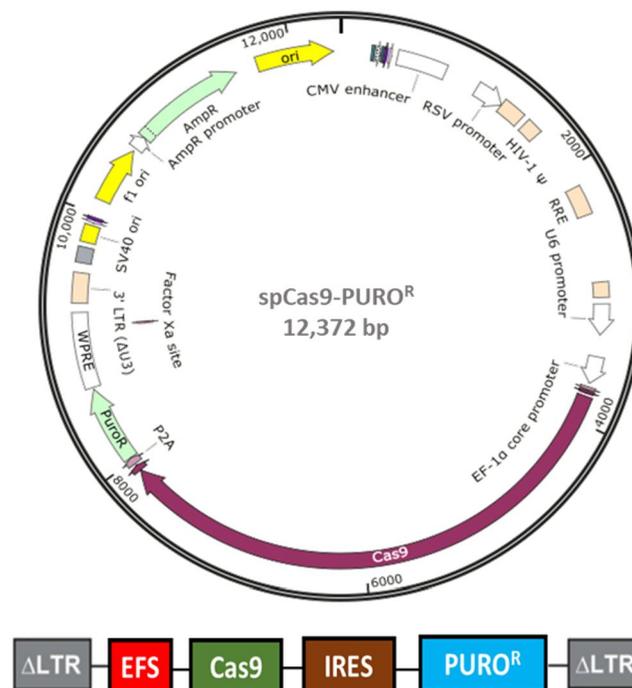
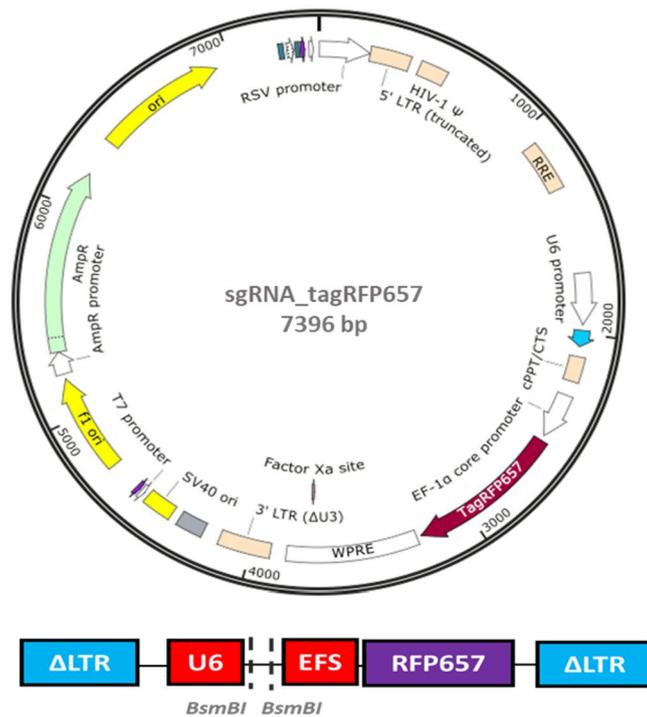


Figura 23. Plásmidos de expresión para la formación de las partículas lentivirales (pPAX2 y pVSV-g). (A) pPAX2. Plásmido de expresión lentiviral que codifica para las proteínas de empaquetamiento del virus. (B) pVSV-g. Plásmido de expresión lentiviral que codifica para la envoltura del virus.



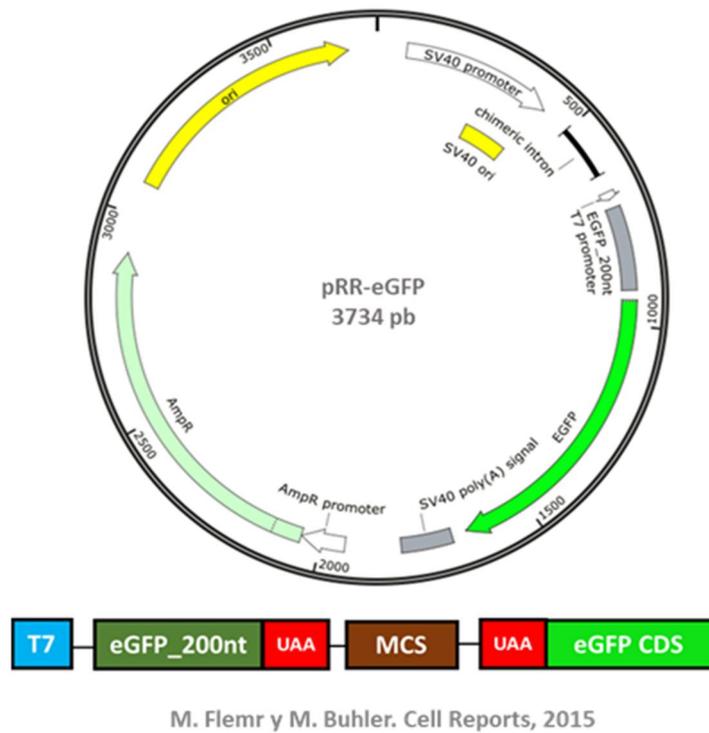
D. Heckl et al. Nat Biotechnol, 2014

Figura 24. Plásmido spCas9-PURO^R. Codifica para la expresión de la nucleasa Cas9.



D. Heckl et al. Nat Biotechnol, 2014

Figura 25. Plásmido sgRNA_tagRFP657. Se empleó para el clonaje y expresión de la secuencia RNA guía de 20 pb.



M. Flemr y M. Buhler. Cell Reports, 2015

Figura 26. Plásmido pRR-eGFP. Fue empleado para la comprobación de la eficacia de edición del sistema CRISPR-Cas9.

3.2.2. Extracción de plásmido mediante lisis alcalina

El DNA plasmídico se extrajo mediante el método de lisis alcalina utilizando los kits comerciales *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAgen) para los procedimientos de biología molecular, y el *GeneJET Plasmid Midiprep Kit* (ThermoFisher Scientific) para las transfecciones de células eucariotas, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar de forma cualitativa y semi-cuantitativa las extracciones de DNA, se empleó la electroforesis en gel de agarosa. Se prepararon geles a diferentes concentraciones de agarosa, entre 0,8-2%, dependiendo del peso molecular del fragmento de DNA problema. Se usaron porcentajes de agarosa mayores para fragmentos de peso molecular más pequeño, consiguiendo así una mayor resolución. Para la extracción de bandas de DNA a partir del gel, se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (Sigma). Los geles se prepararon disolviendo la agarosa en tampón Tris-borato EDTA (TBE) a una concentración final de 0,5x (**tabla 4**), y este mismo tampón TBE 0,5x fue utilizado para la electroforesis, aplicando un voltaje que osciló entre los 80-100v. Se emplearon los marcadores de peso molecular *KAPA DNA ladder* (100-10.000pb) (Kapa Biosystems), *100 pb ladder* (1000-100bp) (ThermoFisher Scientific) o *100 bp PLUS ladder* (3000-100pb) (ThermoFisher Scientific) (**Fig. 27**). Como agente intercalante para el marcaje del DNA usamos *RedSafe* (iNtRON Biotechnology) y las muestras se cargaron con el tampón *Orange* (ThermoFisher Scientific), que está compuesto por los colorantes azul de bromofenol y *orange G*. Los geles se fotografiaron con la cámara *Chemidoc* y el programa informático *Quantity One* (Biorad).

Tabla 4. (A) Composición del Tampón Tris Borato EDTA 5X (TBE) y (B) de los geles de agarosa.

(A) Tampón Tris Borato EDTA 5X (TBE)	
Trizma Base (Sigma)	54 g
Ácido bórico (Sigma)	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0	2 mL
Agua destilada	hasta 1 L

(B) Gel de agarosa (para 1%)	
Agarosa (Sigma)	1 g
TBE 0,5X	100 mL
<i>RedSafe</i>	1 µL

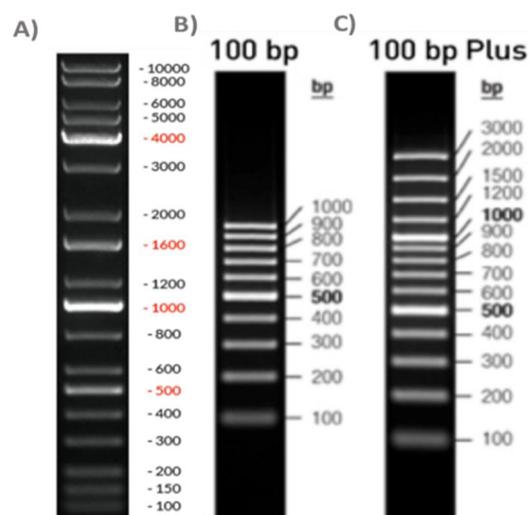


Figura 27. Marcadores de peso molecular empleados. (A) *Kapa DNA Ladder* (100-10.000 pb), (B) *100 pb ladder* (ThermoFisher Scientific), (C) *100 pb PLUS ladder* (ThermoFisher Scientific).

3.2.4. Purificación de bandas de DNA en gel de agarosa

Para la purificación de DNA en gel de agarosa de bajo punto de fusión se empleó el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador de Biometra modelo *T.Professional Basic Gradient*. Para cada unidad de reacción se preparó el siguiente cóctel (**tabla 5**):

Tabla 5. Cóctel empleado en cada reacción de PCR. Reactivos empleados en cada unidad de reacción de PCR, indicando las cantidades empleadas y la casa comercial de procedencia. Abreviaturas: U (unidad de actividad enzimática).

Reactivos	Unidad de reacción		Casa Comercial
	PCR normal	PCR <i>Pfu</i>	
Agua libre de nucleasas	Hasta un volumen final de 25 μ L		Braun Medical
Taq Buffer Regular 10x	2,5 μ L	-	Biotools
Taq Buffer <i>Pfu</i> 10x	-	2,5 μ L	
dNTPs mix (25 mM)	0,25 μ L		GeneOne
Oligonucleótido 5'-3' (10 μ M)	0,5 μ L (5 pmoles)		Sigma
Oligonucleótido 3'-5' (10 μ M)	0,5 μ L (5 pmoles)		
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L)	0,125 μ L	-	Biotools
<i>Proof Reading pfu</i> polimerasa (2,5 U/ μ L)	-	0,25 μ L	ThermoFisher Scientific
DNA molde	50-100 ng		-

Las reacciones de PCR realizadas se describen a continuación (**tabla 6**):

Tabla 6. Construcciones, moldes, primers y condiciones de las PCR. En las condiciones de las PCR se muestran las diferentes fases: desnaturalización inicial, seguido de desnaturalización, alineamiento y extensión (estas tres últimas fases, se repiten 30 ciclos), y una extensión final. Los *primers* se sintetizaron en la casa comercial Sigma-Aldrich. ECD (dominio extracelular). La secuencia GAGCTC se corresponde con el sitio de corte de la enzima *Eco53KI*, empleada para el clonaje del extremo extracelular (ECD) de la molécula HVEM murina (mHVEM). Abreviaturas: F (*forward*) y RC (*reverse* complementario).

Construcción	Molde	Primers	Condiciones de la PCR
pJET 1.2-HVEM (ECD)	pJET 1.2/blunt	pJET 1.2 F 5'CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC3'	95°C 2'; (95°C 20''; 60°C 20''; 72°C 1') x 30; 72°C 3'
		pJET 1.2 RC 5'AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3'	
mHVEM (ECD)	mHVEM (ECD)	HVEM(ECD)-F 5' <u>GAGCTC</u> CATGGAACCTCTCCCAG 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 63°C 20''; 72°C 1') x 30; 72°C 3'
		HVEM(ECD)-RC 5' CTGGGAGAGGTTCCAT <u>GAGCTC</u> 3'	
LentiCRISPR v2-sgRNA	LentiCRISP Rv2	LentiCRISPRv2-F 5'ATATCTTGTGGAAAGGACGAAA 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 48°C 20''; 72°C 1') x 30; 72°C 3'
		LentiCRISPRv2-RC 5'AGTTGATAACGGACTAGCCT 3'	
pRR-eGFP-mHVEM (ECD)	pRR-eGFP	HVEM(ECD)-F 5' <u>GAGCTC</u> CATGGAACCTCTCCCAG 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 63°C 20''; 72°C 1') x 30; 72°C 3'
		HVEM(ECD)-RC 5' CTGGGAGAGGTTCCAT <u>GAGCTC</u> 3'	
Amplificación de la nucleasa Cas9	DNA genómico células A20 GFP Cas9 ⁺	Cas9 F 5'CTGAAGAGAACCGCCAGAAG 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 57°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		Cas9 RC 5'AGCTGGGCGATCAGATTTT 3'	
Amplificación de la región diana del HVEM para el sistema CRISPR-Cas9	DNA genómico células A20	HVEM <i>up</i> 5' TGAGGCTCTGTTTGGACTTTAG 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 57°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		HVEM <i>bottom</i> 5' CTTGAGCAAACAGGATAGACAC 3'	

Continuación tabla 6. Construcciones, moldes, *primers* y condiciones de las PCR.

Construcción	Molde	Primers	Condiciones de la PCR
Amplificación de la región <i>off-target</i>	Gen <i>Hpgd</i> NM_008278	278 F 5' GCACGGAGTGGGCTATAAAA3'	95°C 2'; (95°C 20''; 58°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		278 RC 5' GTCACAGCTTCCCGTGAGA 3'	
Amplificación de la región <i>off-target</i>	Gen <i>Gpsm1</i> NM_153410	410 F 5'CCTGGCGGCGGTGACATC3'	95°C 2'; (95°C 20''; 57°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		410 RC 5' GCCATGCTACACCAACACC 3'	
Amplificación de la región <i>off-target</i>	Gen <i>Sipal13</i> NM_001081 1028	028 F 5' CCCTCACAAGACACAGATGG 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 57°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		028 RC 5' CCATGGTCTGCTGGCTTC 3'	
Amplificación de la región <i>off-target</i>	Gen <i>Neto1</i> NM_144946	946 F 5' CTCCTTTTCCTGCAAGATCG 3'	95°C 5'; (95°C 20''; 50°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		946 RC 5' CATGTCTGTGCGTTACACCA 3'	
Amplificación de la región <i>off-target</i>	Gen <i>Oplah</i> NM_153122	122 F 5' GTTCAAGGCTAAGCCACCAG 3'	95°C 2'; (95°C 20''; 58°C 20''; 72°C 1') x 45; 72°C 3'
		122 RC 5' TGTGATGACAGTCAGGTCAGG 3'	

3.2.6. Diseño de las secuencias de los sgRNA guías para su clonaje en los vectores de expresión lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657

Las secuencias que servirán de guía a la nucleasa Cas9, denominadas sgRNA, fueron diseñadas sobre el exón 1 del HVEM murino, el cual codifica junto con parte del exón 2 para el péptido señal de la proteína (**Fig. 28**), mediante el programa informático del MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) (laboratorio Zhang, 2015). En primer lugar, se buscó la secuencia de los exones e intrones de la secuencia de DNA genómico de la molécula HVEM murina con la información recogida en el Pubmed (NM_178931) y el Ensembl (referencia: ENSMUSG00000042333). La molécula HVEM murina presenta 8 exones que codifican para un transcrito de 1018 pares de bases y una proteína de 275 aminoácidos (**Fig. 28**). La secuencia del exón 1 tiene un tamaño de 69 pb. El programa informático para el diseño de los sgRNA se fundamenta en la generación de secuencias de 20 pb complementarias a la zona del genoma de interés. Para ello, debe estar presente *downstream* en el DNA genómico la secuencia PAM 5' NGG. La nucleasa Cas9 mediará el corte tres pares de bases *upstream* de la secuencia PAM 5'-NGG, a través del reconocimiento y complementariedad de bases que se establece entre la secuencia guía (sgRNA) y la secuencia diana dentro del genoma. Se seleccionaron aquellos sgRNA que presentaban menor probabilidad de *off-targeting* (probabilidad de que el RNA guía haga complementariedad con otras secuencias no deseadas dentro del genoma) (**Figs. 29 y 30**). Para el clonaje de los sgRNAs, los vectores de expresión lentiCRISPRv2 o sgRNA-tagRFP657 incluyen los extremos complementarios resultantes de la acción de la enzima de restricción *BsmBI* (CACC/CAAA) (**Fig. 31**) (**tabla 7**). Además, para el inicio de la transcripción el promotor U6 de la RNA polimerasa III necesita de la adición de una guanina (G) extra en el extremo 5' de los sgRNA (Ran et al. 2013) (**Fig. 31**) (**tabla 7**). Los oligos sgDNA fueron sintetizados por la casa comercial Sigma-Aldrich.

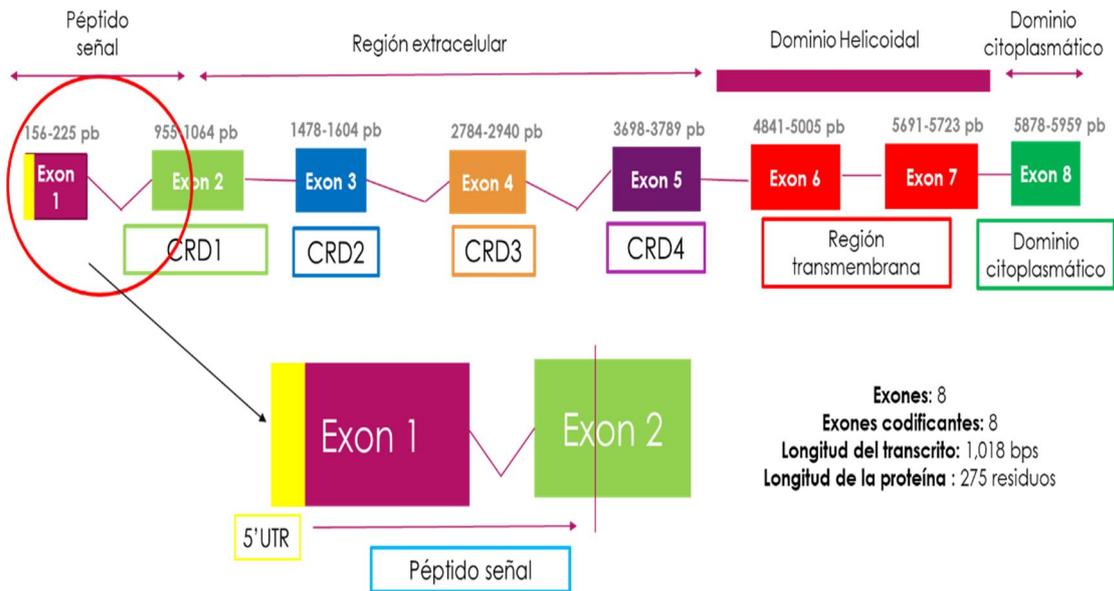


Figura 28. Organización esquemática de la secuencia de HVEM (cepa de ratón C57BL/6). La secuencia HVEM está formada por 8 exones codificantes. El exón 1 fue empleado como diana del sistema CRISPR-Cas9. El péptido señal de la proteína está codificado por el exón 1 y parte del exón 2. La parte restante del exón 2, y los exones 3, 4 y 5 forman la región extracelular de la molécula. Los exones 6 y 7 codifican para la región transmembrana, y el exón 8 codifica para el dominio citoplasmático. La secuencia tiene una longitud de 1018 pares de bases y da lugar a una proteína de 275 residuos de aminoácidos.

sgRNA_1: 5' CAGGATGGGGGTCGGCACCC**TGG** 3' → *cadena forward*

sgRNA_3: 5' CAGGGTGCCGACCCCCATCCT**TGG** 3' → *cadena reverse*

sgRNA_6: 5' GCCTGAAGGTGTTGTCTGTAG**GGG** 3' → *cadena reverse*

sgRNA_13*: 5' TGGAACCTCTCCAGGATGG**GGG** 3' → *cadena forward*

Figura 29. Secuencias seleccionadas de RNA guía de 20 pb diseñadas con el programa informático del MIT (Massachusetts Institute of Technology). Elegimos las secuencias de sgRNA que presenten menor probabilidad de *off-targeting*. *Con excepción del sgRNA_13 que fue elegido con el objetivo de abarcar mejor el exón 1.



Figura 30. Localización de los distintos sgRNAs (1, 3, 6 y 13) en el exón 1 de HVEM. Los sgRNAs 1 y 13 están diseñados sobre la cadena *forward* 5'-3'; mientras que los sgRNAs 3 y 6 están diseñados sobre la cadena *reverse* 3'-5'.

Tabla 7. Secuencias sgRNAs para su clonaje en los plásmidos lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657. En azul están representadas las secuencias complementarias a las secuencias resultantes del corte con *BsmBI*. En rojo están marcadas las guaninas (G) y su nucleótido complementario cisteína (C). Abreviaturas: F (*forward*) y RC (*reverse* complementario).

sgRNA-1	<i>Primer F:</i> 5' CACCG CAGGATGGGGGTCGGCACCC 3' <i>Primer RC:</i> 5' AAACGGGTGCCGACCCCCATCCTGC 3'
gRNA-3	<i>Primer F:</i> 5' CACCG CAGGGTGCCGACCCCCATCC 3' <i>Primer RC:</i> 5' AAACGGATGGGGGTCGGCACCCCTGC 3'
sgRNA-6	<i>Primer F:</i> 5' CACCG GCCTGAAGGTGTTGTCTGTA 3' <i>Primer RC:</i> 5' AAACTACAGACAACACCTTCAGGCC 3'
sgRNA-13	<i>Primer F:</i> 5' CACCG TGGAACCTCTCCAGGATGG 3' <i>Primer RC:</i> 5' AAACCCATCCTGGGAGAGGTTCCAC 3'

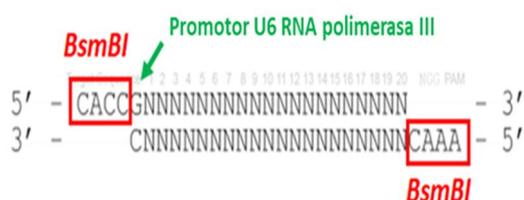


Figura 31. Diseño de las secuencias sgRNAs para su clonaje en los vectores de expresión lentivirales lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657. Para el clonaje de las secuencias de sgRNA necesitamos añadir las secuencias complementarias resultantes del corte con la enzima *BsmBI* (CACC/CAAA) (recuadros rojos) e incluir una guanina (G) para el inicio de transcripción del sgRNA. Las "N" representan las 20 pb de la secuencia sgRNA.

3.2.7. Anillamiento, fosforilación de oligos de la guía y comprobación de los oligos dúplex en gel de agarosa

En primer lugar, se realizó el anillamiento de las parejas de oligos sgDNA y en segundo lugar, se llevó a cabo la fosforilación de los oligos sgDNA anillados siguiendo los protocolos descritos en la tabla (tabla 8).

Tabla 8. Protocolo del anillamiento de los oligos sgDNA y de la fosforilación de los oligos sgDNA anillados. ¹La T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK) cataliza la transferencia de γ -fosfatos desde el ATP a los grupos 5'-OH de cadenas simples y dobles de DNAs o RNAs, oligonucleótidos o nucleósidos 3'-monofosfatos. La T4 PNK también tiene actividad 3'-fosfatasa (ThermoFisher Scientific). ²El T4 PNK buffer A 10x está compuesto de 500 mM Tris-HCl (pH 7.6 a 25°C), 100 mM MgCl₂, 50 mM ditioneitol (DTT) y 1 mM espermidina (ThermoFisher Scientific). ³El ATP tiene que ser añadido porque el T4 PNK buffer A 10x no lo lleva incluido. U: unidad de actividad enzimática.

(i) Anillamiento de los oligos sgDNA		(ii) Fosforilación de los oligos sgDNA anillados	
Reactivos	Condiciones	Reactivos	Condiciones
10 μ l oligo 1 (100 μ M)	4 min a 95°C 10 min a 70°C Dejar enfriar a temperatura ambiente (RT)	5 μ l oligos sgDNA dúplex (2,5 μ M)	30 min a 37°C 20 min a 65°C Dejar enfriar a temperatura ambiente (RT)
10 μ l oligo 2 (100 μ M)		1 μ l T4 PNK ¹ (1U)	
20 μ l Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA)		5 μ l T4 PNK buffer A 10x ² (1x)	
	5 μ l ATP 10 mM ³		
	34 μ l ddH ₂ O		

Por último, se cargaron 10 μ l de los oligos dúplex y fosforilados en un gel de electroforesis al 2% de agarosa (apartado 3.2.3) con el fin de comprobarlos.

3.2.8. Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión para liberar los insertos y linearizar los vectores destino se llevaron a cabo con las siguientes indicaciones (**tabla 9**):

Tabla 9. Enzimas de restricción empleadas, condiciones de digestión y sitios de corte. La concentración de DNA empleada en las digestiones fue de entre 1 y 10 μ g. La enzima *Eco53KI* da lugar a extremos romos, mientras que la enzima *FastDigest BsmBI (Esp3I)* genera extremos protuberantes. Tras el tiempo de digestión, no se necesitó la inactivación de las enzimas de restricción, porque inmediatamente después se cargaron los productos de digestión en geles de agarosa de bajo punto de fusión, para su posterior purificación. U: unidad de actividad enzimática.

Enzima de restricción	Concentración de uso	Buffer de digestión	Condiciones de digestión	Sitio de corte
<i>Eco53KI</i> (10U/ μ L)	1 μ L de la enzima digieren hasta 10 μ g de DNA	Buffer único 10x (1x)	90 min a 37°C	5' G A G / C T C 3' 3' C T C / G A G 5'
<i>FastDigest BsmBI (Esp3I)</i> (10U/ μ L)		Buffer <i>Fastdigest</i> 10x (1x)	30 min a 37°C	5' C G T C T C N ₁ 3' 3' G C A G A G N ₅ 5'

3.2.9. Defosforilación de los plásmidos lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657

Para la defosforilación de los vectores lentiCRISPRv2 y sgRNA-tagRFP657 digeridos y purificados se siguió la reacción descrita a continuación (**tabla 10**):

Tabla 10. Protocolo de defosforilación de los plásmidos. ¹La fosfatasa alcalina (FastAP) cataliza la liberación de grupos 5' y 3' fosfatos desde el DNA, RNA y nucleótidos, y también de proteínas (ThermoFisher Scientific). ²El FastAP buffer A 10x está compuesto de 100 mM Tris-HCl (pH 8.0 a 37°C), 50 mM MgCl₂, 1 M KCl, 0.2% Triton X-100 y 1 mg/mL BSA. U: unidad de actividad enzimática.

Reacción de defosforilación de los plásmidos	
Reactivos	Condiciones
0,5-1 µg plásmido digerido y purificado	30 min a 37°C 5 min a 70°C Dejar enfriar a temperatura ambiente (RT)
1 µl FastAP ¹ (1U)	
2 µl FastAP buffer 10x (1x) ²	
x µl ddH ₂ O (hasta 20 µl)	

3.2.10. Ligación del vector plasmídico y los oligos DNA anillados

Para la reacción de ligación, no fue necesario extraer la FastAP de la reacción anterior porque había sido precisamente inactivada (70°C, 5 min). Las condiciones para las reacciones de ligación se muestran en la siguiente tabla (**tabla 11**):

Tabla 11. Condiciones para las reacciones de ligación. (A) Ligación en el vector pJET 1.2/blunt. Se muestran los diferentes reactivos (ThermoFisher Scientific) y volúmenes empleados en la reacción. (B) Ligación estándar. La relación inserto (fragmentos de 0.5-2 Kb): vector utilizada fue 5:1, ya que el factor limitante es el inserto. Si se trata de una ligación entre extremos protuberantes, el tiempo de la reacción de ligación fue de 20 minutos a 23 °C. En cambio, si los extremos eran romos, tuvimos que aumentar el tiempo de ligación a 1 hora. (C) Ligación de los oligos sgDNAs. Los oligos sgDNA anillados y fosforilados fueron diluidos al 1/200 para hacer la ligación con el vector digerido y defosforilado a una concentración final de 50 ng. Al tratarse de una ligación entre extremos protuberantes el tiempo de la reacción fue de 20 minutos. U: unidad de actividad enzimática.

(A) Ligación en el vector pJET 1.2/blunt		(B) Ligación estándar		(C) Ligación de los oligos sgDNA	
Inserto	8µL (100-500ng)	Inserto: Vector destino	5:1	Oligos sgDNA anillados y fosforilados (12,5 nM)	2µl
pJET 1.2/blunt	1µL (20-100ng)			Vector digerido y defosforilado	50ng
Tampón ligación 2x	10µL	Tampón ligación 10x	2 µL	T4 DNA ligasa buffer 5x	4µl
T4 DNA ligasa (5U/µL)	1µL	T4 DNA ligasa (5U/µL)	1 µL	T4 DNA ligasa (5U/µL)	1µL
15 min a 22°C		20 min a 23°C (extremos protuberantes)/ 1h a 23°C (extremos romos)		20 min a 23°C	

3.2.11. Tratamiento con DNAsa dependiente de ATP

Se trató la ligación con la DNAsa dependiente de ATP (*PLasmid-safe*, Epicentre), la cual elimina de manera selectiva el DNA cromosómico bacteriano contaminante, minimizando su probabilidad de clonaje (Ran et al. 2013). La DNAsa actúa hidrolizando el DNA lineal de doble cadena a desoxinucleótidos a un pH ligeramente alcalino. También hidroliza, aunque con baja eficacia, DNA lineal y circular de cadena simple. El protocolo seguido para el tratamiento con DNAsa dependiente de ATP se resume en la siguiente tabla (**tabla 12**):

Tabla 12. Reacción con DNAsa dependiente de ATP. ¹Reacción de ligación del apartado anterior 3.2.10. ²El buffer *Plasmid-Safe* está formado por una solución al 50% de glicerol que contiene 50mM Tris-HCL (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM ditiotretitol (DTT), y 0.1% Triton X-100. U: unidad de actividad enzimática.

Reacción con DNAsa dependiente de ATP	
Reactivos	Condiciones
21 µl Reacción de ligación ¹	37°C 30 min 70°C 30 min Dejar enfriar a temperatura ambiente (RT)
3 µl Buffer <i>Plasmid-Safe</i> 10x (1x) ²	
3 µl ATP 10mM	
1 µl Exonucleasa <i>Plasmid-Safe</i> (10 U)	

3.2.12. Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico se recurrieron a dos procedimientos diferentes, mediante la lisis de las células por hervido y la liberación del DNA al sobrenadante o empleando el kit de extracción de DNA de Biotools. En ambos casos, se cuantificó el DNA extraído empleando el espectrofotómetro NanoDrop 100 (ThermoFisher Scientific). El ratio de absorbancia a 260/280 nm es utilizado para determinar la pureza del DNA y el RNA (Desjardins & Conklin 2010). En el caso del DNA, el ratio 260/280 aceptado como “puro” debe situarse entre los valores 1.8-2.0; y para el RNA, el valor del ratio 260/280 “puro” debe ser alrededor de 2.0 (Desjardins & Conklin 2010). Si el ratio 260/280 es más bajo, podría indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que presentan absorbancia a 280 nm (Desjardins & Conklin 2010). El ratio 260/230 es empleado como segunda medida de la pureza de los ácidos nucleicos, y los valores esperados están en el rango 2.0-2.2 (Desjardins & Conklin 2010). El ratio 260/230 nos proporciona información acerca de la calidad de nuestra muestra, indicando la presencia de posibles contaminantes derivados, por ejemplo, de los procedimientos de extracción (como pueden ser restos fenólicos o restos de guanidina, que presentan absorbancia a 230 nm) (Desjardins & Conklin 2010).

3.2.12.1. Extracción de DNA mediante lisis bacteriana por calor

Se extrajo el DNA genómico mediante el hervido de 100.000 células (95°C, 10 minutos) y el empleo de la resina Chelex 100 (5% buffer Chelex 100, 0,1% SDS, 1% NP-40 alternativo, 1% Tween 20 y agua miliQ estéril). El Chelex 100 es una resina intercambiadora de iones que funciona realizando una limpieza de los iones metálicos divalentes, los cuales pueden inhibir procesos como la PCR.

3.2.12.2. Extracción de DNA genómico utilizando el kit *speedtools DNA extraction* (Biotools)

Para procedimientos que requieran de una extracción de DNA con mayor pureza y rendimiento se empleó el kit de extracción *Speedtools DNA Extraction* (Biotools), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.2.13. Análisis de la actividad *off-target* del sistema CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 puede originar cortes inespecíficos en otras regiones del genoma diferentes a la región diana, es lo que se conoce como actividad *off-target* (Ran et al. 2013). Dicho de otra manera, el fenómeno *off-target* se define como la probabilidad de que el RNA guía (sgRNA) haga complementariedad con otras secuencias no deseadas dentro del genoma (Ran et al. 2013). El sgRNA empleado para generar la línea A20 GFP deficiente para la expresión en membrana de la proteína HVEM (tanto mediante electroporación como por infección) fue el sgRNA_1. Por lo tanto, para el estudio de la actividad *off-target* se seleccionaron los 5 primeros genes correspondientes al sgRNA_1 que presentaban una mayor probabilidad de que se produjera el fenómeno de *off-target* (valores más altos) (**tabla 13**). Los valores de cada secuencia *off-target* fueron calculados en función de la posición de los nucleótidos no complementarios o *mismatches* (MMs) en relación a la secuencia PAM (**tabla 13**). De esta manera, las secuencias *off-target* que presentasen los MMs más alejados de la región PAM tendrán valores más altos y aumentarán la probabilidad de actividad *off-target* de la nucleasa Cas9. Por otro lado, también había que tener en cuenta si las secuencias *off-target* pertenecen a regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones). De las 5 secuencias *off-target* analizadas, solo dos de ellas (correspondientes al gen *Sipa113* y al gen *Oplah*), están localizadas en regiones codificantes. Se amplificaron las regiones *off-target* de los diferentes genes mediante PCR con *primers* flanqueantes (apartado 3.2.5) a partir del DNA genómico extraído de las células A20 GFP deficientes en HVEM (clon 1F1 y clon 1F10) (apartado 3.2.12.2) y fueron comparadas con las secuencias WT (*wild type*) depositadas en la base de datos Ensembl mediante el programa informático de alineamiento online Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Tabla 13. Secuencias *off-target* seleccionadas a partir del sgRNA_1. MMs: hace referencia al número de nucleótidos no complementarios o *mismatches*. Los números que aparecen entre corchetes se refieren a las posiciones que ocupan los MMs en relación a la secuencia PAM. Por ejemplo, la secuencia *off-target* del gen que codifica para la deshidrogenasa hidroxiprostaglandina (NM_008278) presenta la probabilidad de *off-targeting* más alta (valor más alto) porque los 4 MMs están situados más alejados de la secuencia PAM (posiciones 1, 4, 5 y 11) con respecto al resto de las secuencias *off-target* analizadas.

Gen	Referencia	Secuencia/número y posición de los MMs	Valor	Locus /región
Deshidrogenasa hidroxiprostaglandina (gen <i>Hpgd</i>)	NM_008278	GAGCCTGGGGCTCGGCACCCCAG 4MMs [1:4:5:11]	0.8	chr8:-58773546 (región intrónica)
Modulador 1 de la señalización de la proteína G (gen <i>Gspm1</i>)	NM_153410	CGGGAGGGGCGGCGGCACCCCAG 4MMs [2:6:10:12]	0.4	chr2:+26171021 (región intrónica)
Señal 1 asociada a la inducción de la proliferación (gen <i>Sipa1l3</i>)	NM_001081028	CGGTAGGGGGGTCTGGCCCCCAGG 4MMs [2:4:6:17]	0.4	chr7:+30151733 (región exónica)
Neuropilina (NRP) y tolloide (TLL) de tipo I (gen <i>Neto1</i>)	NM_144946	CATGGTGGCGGTCTGGCGCCCGGG 4MMs [3:5:9:17]	0.4	chr18:+86565000 (región intrónica)
5-oxoprolinasa (gen <i>oplah</i>)	NM_153122	CAGGATGGAGGTCTGGCTCCTAAG 3MMs [9:17:20]	0.3	chr15:+76131592 (región exónica)

3.2.14. Secuenciación

La secuenciación del DNA se realizó mediante el kit *Thermosequenase cycle sequencing* y el secuenciador automático (Amersham Biosciences), en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de León por el técnico Dr. Benjamín Rabanal.

3.3. Cultivos celulares

Todo el trabajo relativo al crecimiento, expansión, transfección y transducción de las células eucariotas se llevó a cabo en una cabina de seguridad biológica de flujo laminar (Telstar BIOSTAR) y con un incubador con filtro HEPA a 37°C y 5% de CO₂ (ThermoFisher Scientific).

3.3.1. Líneas celulares y recuento celular

Las líneas celulares empleadas en el trabajo se resumen en la siguiente tabla (**tabla 14**):

Tabla 14. Líneas celulares empleadas y su descripción.

Línea celular	Descripción
HEK 293T	Derivadas de riñón de embriones humanos (ATCC) (Kabadi et al. 2014).
Linfoma B A20 murino	Linfocitos B de origen espontáneo a partir de una célula del retículo de ratones Balb/cAnN de edad avanzada (Passineau 2005). Utilización bajo acuerdo de transferencia (MTA, Dr. Arnab Ghosh, Nueva York).
Hepa 1-6	Derivadas de carcinoma hepático de ratón (MTA, Dr. I. Anegon, Nantes) (Darlington et al. 1980).
NIH 3T3	Fibroblastos originarios de tejido embrionario murino (ATCC) (Forrest et al. 2008).

Para el recuento celular se empleó el azul de tripán, el cual nos permite descartar las células muertas, tiñendo de azul las células no viables que han perdido la integridad de la membrana plasmática (Phelan & Lawler 2001). Para el recuento, se empleó la cámara de Neubauer y se aplicó la siguiente fórmula (*Neubauer Chamber Cell Counting, Celeromics Technologies*) (Phelan & Lawler 2001):

$$N^{\circ} \text{ células} = \frac{\text{Recuento células vivas}}{N^{\circ} \text{ células de 16 cuadrados cada una}} \times 10^4 \times \text{volumen (mL)} \times \text{factor de dilución}$$

El factor de dilución es el inverso de la dilución empleada para teñir las células con el azul de tripán.

3.3.2. Reactivos y medios

Los medios y reactivos empleados en cultivos celulares fueron los siguientes (tabla 15):

Tabla 15. Medios y reactivos de cultivos celulares.

Medio	Componentes
RPMI 1640	RPMI 1640 (Gibco) 10,92g, NaHCO ₃ (Sigma) 2g, agua Mili-Q hasta 1 L. pH 7,4. Filtrado en cabina con filtro de 0,2 µm.
RPMI 1640 completo	Contiene 7% suero fetal bovino (FBS), 2mM L-glutamina, 1mM piruvato sódico, 10mM HEPES, 50 µg/mL gentamicina y 5 x 10 ⁻⁵ M β-mercaptoetanol y RPMI 1640 (Gibco) hasta 1 L. Filtrado en campana con filtro de 0,2 µm.
ISCOVE	Es una modificación del medio Eagle Dulbecco (DMEM) que contiene selenio, aminoácidos adicionales y vitaminas, piruvato sódico, buffer HEPES, y nitrato potásico en lugar de nitrato férrico. (Gibco)
ISCOVE completo	Medio ISCOVE suplementado con 10% de FBS
PBS Dulbecco's	Libre de Mg ²⁺ y Ca ²⁺ . KCl (Sigma) 200 mg, KH ₂ PO ₄ (Sigma) 200 mg, NaCl (Sigma) 8000 mg, Na ₂ HPO ₄ (Sigma) 1150 mg y agua Mili-Q hasta 1L.
Opti-MEM (Gibco)	Se trata de una modificación del medio mínimo esencial de Eagle al que se le ha añadido HEPES, bicarbonato sódico, hipoxantina, timidina, piruvato sódico, L-glutamina y factores de crecimiento.
Tripsina/EDTA	Tripsina (1:250) al 0.25% y EDTA al 0.02%.
Congelación	Suero fetal bovino más dimetilsulfóxido (Sigma) al 10%.

3.3.3. Expresión transitoria de los genes de interés

Para la expresión transitoria de los genes de interés en el citoplasma de las células, se usaron dos procedimientos: la lipofección y la electroporación. La máxima expresión se produce a las 48-72 horas después de la transfección, descendiendo luego de manera drástica y perdiéndose por completo a los 6-7 días (Clontech Laboratories 2015). Por lo tanto, los análisis por citometría de flujo o la visualización con microscopio de fluorescencia se realizaron a las 48-72 horas post-transfección.

3.3.3.1. Transfección mediante lipofección

La lipofección se fundamenta en el uso de liposomas catiónicos que acomplejan el DNA con carga negativa, el cual será incorporado por la célula por fenómenos como

endocitosis y se expresará de manera transitoria en el citoplasma por la maquinaria ribosomal. El método de lipofección fue empleado con las células HEK 293T (apartado 3.3.4.2 y 3.5) y con las células de hepatocitos Hepa 1-6 (apartado 3.4). Las células deben ser mantenidas en cultivo en condiciones adecuadas a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/mL. El día previo a la lipofección, las células se deben subcultivar para que estén en crecimiento exponencial. En el momento de la lipofección, la confluencia de las células tiene que ser del 70-80% para que el procedimiento sea óptimo porque así lo determina el protocolo de utilización de la lipofectamina (Invitrogen). Para conseguir mejores rendimientos, es aconsejable cambiar el medio completo dos horas antes de la transfección. Los plásmidos fueron purificados con el kit *GeneJET Plasmid Midiprep* (ThermoFisher Scientific) para evitar la presencia de inhibidores, y el medio empleado para la transfección fue el Opti-MEM (Gibco). En primer lugar, se formaron los complejos DNA-liposomas empleando 3 μg de DNA por pocillo y liposomas (lipofectamina, Invitrogen) a una relación 1:3 (por cada 1 μg de DNA se incluyeron 3 μg de liposomas). Se incubó la mezcla de DNA y liposomas durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. Mientras tanto, se lavaron las células con RPMI 1640 basal atemperado. En segundo lugar, se aspiró el medio RPMI 1640 y se añadió la mezcla de los complejos DNA-liposomas, y se incubó durante 6-16 horas. En este paso, se añadió medio completo RPMI 1640/ISCOVE para que las células se encontrasen en las mejores condiciones de viabilidad. Al día siguiente de la transfección, se aspiró el medio y se añadió medio completo RPMI 1640/ISCOVE (7-10% FBS).

3.3.3.2. Transfección mediante electroporación

La electroporación es un procedimiento de transfección transitoria, por el cual las células son sometidas a una corriente eléctrica que conducirá a la formación de poros en la membrana celular, y a la generación de una diferencia de potencial que facilitará la entrada del DNA con carga negativa (Potter & Heller 2003). Este método de expresión transitoria fue empleado para las células de linfoma B murino (línea celular A20) con crecimiento en suspensión. El electroporador utilizado fue el *Gene Pulser Xcell* de BioRad y las cubetas de electroporación de 0.4 cm (para células eucariotas) fueron de la misma casa comercial. Las células A20 fueron mantenidas en cultivo a una densidad de 1×10^6 células/mL y el día previo a la electroporación fueron subcultivadas para que

estuvieran en fase de crecimiento exponencial. Las condiciones para la electroporación de las células A20 se indican en la **tabla 16**:

Tabla 16. Condiciones para la electroporación de las células A20.

Voltaje	280 V
Capacitancia	950 μ F
Resistencia	Infinito
Concentración plásmido	30 μ g
Número de células	1 x 10 ⁷
Temperatura	Ambiente
Medio de electroporación	RPMI 1640 + 10% FBS
Cubeta/volumen óptimo de electroporación	0.4 cm/400 μ l

Después de la electroporación, se transfirieron las células rápidamente a una placa de cultivo de 90 mm (P9) con medio completo RPMI 1640 suplementado con 14% FBS (porcentaje superior al habitual para favorecer la recuperación de un mayor número de células).

3.3.4. Expresión estable usando vectores lentivirales

Para la expresión estable, se emplearon los sistemas lentivirales basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Mientras que los sistemas retrovirales solo son capaces de infectar células que se encuentren en división activa, los sistemas lentivirales tienen la ventaja de poder transducir células que no están en división (quiescentes) (Serafini et al. 2004). Además, para la formación de las partículas lentivirales se utilizó la glicoproteína de la envoltura procedente del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), lo que les confirió de un tropismo (tipos de tejidos o células huésped en los cuales la partícula viral es capaz de replicarse) amplio, pudiendo infectar células de mamífero (Cann 2005). La proteína VSV-G es también más estable para los procedimientos de concentración de las partículas lentivirales por centrifugación (Cann 2005). En nuestro trabajo, se utilizaron los plásmidos lentivirales para infectar las células de linfoma B A20 con las diferentes secuencias guías de DNA del sistema CRISPR-Cas9, y para generar la línea tumoral A20 con expresión estable de la nucleasa Cas9. Por otro lado, con el objetivo de monitorizar la progresión y desarrollo de la línea de linfoma B A20 en un modelo murino *in vivo*, se emplearon las partículas lentivirales codificantes

para la proteína fluorescente verde (GFP), las cuales fueron cedidas gracias a la colaboración con el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) de Madrid (España).

3.3.4.1. Componentes de los sistemas lentivirales

Para la formación de las partículas lentivirales, se empleó el sistema de **empaquetamiento de segunda generación** que se caracteriza por presentar los diferentes componentes necesarios para la generación de los sistemas lentivirales divididos en tres plásmidos diferentes, para incrementar la bioseguridad (Cribbs et al. 2013):

(A). **Plásmido lentiviral de transferencia** que codifica para el inserto de interés. La secuencia del transgen está flanqueada por las secuencias repetidas largas terminales (LTR), las cuales facilitan la integración del material genético de interés en el genoma del hospedador. Para una mayor seguridad, los vectores de transferencia son sistemas defectivos con capacidad de infectar pero no de replicación; además, muchos presentan una delección adicional en el 3'LTR que conduce a la inactivación del virus tras la integración. En nuestro caso, se utilizó el vector spCas9-PURO^R para la expresión estable de la nucleasa Cas9 (línea A20 GFP⁺ Cas9⁺ clon 1D5) y el vector lentiCRISPRv2-sgRNA (sgRNA 1) para la expresión estable del sistema CRISPR-Cas9-sgRNA1 (línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} clon 1F10).

(B). **Plásmido de empaquetamiento pPAX2** de lentivirus de segunda generación (MTA, Dr. P. Schneider) (**tabla 3, Fig. 23A**).

(C). **Plásmido de la envoltura pVSV-g** (MTA, Dr. P. Schneider) (**tabla 3, Fig. 23B**).

3.3.4.2. Empaquetamiento y producción de las partículas lentivirales

La producción de las partículas lentivirales se llevó a cabo empleando las células HEK 293T como empaquetadoras. Las células HEK 293T fueron transfectadas usando el método de lipofección con las siguientes cantidades (**tabla 17**) (**Fig. 27**):

Tabla 17. Condiciones para la transfección de las células HEK 293T para la producción de las partículas lentivirales. ¹Número de células por placa P9 subcultivadas el día previo a la transfección tras tratamiento con Tripsina-EDTA, para que se encuentren individualizadas y favorecer el procedimiento. En el momento de la transfección, la confluencia tiene que estar de alrededor del 80%. ²Los plásmidos de transferencia empleados fueron el spCas9-PURO^R o el lentiCRISPRv2-sgRNA1. ³Plásmido empleado para incrementar el rendimiento de producción lentiviral. ⁴El medio ISCOVE con 10% de FBS descomplementado a 56°C durante 30 minutos se empleó para la producción de las partículas lentivirales.

Número de células/placa P9 ¹	5-6 x 10 ⁶ /placa 90 mm
pPAX2	6 µg/placa 90 mm
pVSV-g	3 µg/placa 90 mm
Plásmido de transferencia ²	9 µg/placa 90 mm
Plásmido adyuvante ³	4,5 µg/placa 90 mm
Liposomas (1:3)	67,5 µg/placa 90 mm
OPTI-MEM	0.650 ml/placa 90 mm
Medio completo ⁴	ISCOVE + 10% FBS (sin complemento)

3.3.4.3. Concentración por ultracentrifugación de las partículas lentivirales y titulación para determinar la concentración vírica óptima de infección. Procedimiento de infección mediante *spinoculación*

A las 48 horas post-transfección, se recolectó el sobrenadante en el que se encuentran las partículas lentivirales y se filtró a través de filtros de 0.45 µm (Millipore) (**Fig. 27**). Las células A20 de linfoma B murino son difíciles de transfectar y/o transducir, ya que presentan multiplicidades de infección (MOI) (número de partículas virales necesarias por célula) altas de entre 50-100 (Serafini et al. 2004) (Anastasov et al. 2009). Por esta razón, fueron requeridos títulos virales elevados iguales o superiores a 10⁷ unidades de transducción (TU)/mL (Kutner et al. 2009). La unidad de transducción (TU) es la cantidad mínima de partículas virales necesarias para infectar un tipo celular determinado, y para su cálculo empleamos la siguiente fórmula (Kutner et al. 2009):

$$\frac{TU}{mL} = n^{\circ} \text{ células momento transducción} \times \% \text{ células GFP} \times \text{factor de dilución}$$

% células GFP se refiere al porcentaje de células transducidas con el vector control lentiviral pCMV-eGFP (**tabla 3, Fig. 16**) analizadas mediante citometría de flujo.

El factor de dilución hace referencia al inverso de la dilución a partir de los virus obtenidos tras el proceso de ultracentrifugación, empleada para infectar las células.

Para conseguir el título viral adecuado se recurrió al proceso de concentración de las partículas lentivirales mediante ultracentrifugación a 20.000 rpm durante 2 horas a 4°C (**Fig. 32**). Después de la ultracentrifugación, tuvimos que re-hidratar el pellet re-suspenderlo de manera adecuada. La infección fue realizada en placas de 96 pocillos (P96) tapizadas previamente con Retronectina (Clontech Laboratories 2015). La Retronectina es un fragmento de fibronectina recombinante humana que actúa favoreciendo la co-localización de las células diana y los virus, potenciando el proceso de transducción (Clontech Laboratories 2015) (Kitamura et al. 2003) (**Fig. 33**). Se emplearon diluciones seriadas 1/5 de las partículas lentivirales concentrados hasta la dilución final 1/3125 para infectar 16.000 células A20/pocillo P96 (**Fig. 32**). Con el objeto de favorecer el contacto y la entrada de las partículas lentivirales a través de su unión a los receptores en la membrana celular, se utilizó polibrene (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 8 µg/mL. El polibrene es un polímero catiónico que actúa contrarrestando las cargas electrostáticas entre el virus y la membrana celular, ambas con carga negativa, incrementando la eficiencia de la transducción (Davis et al. 2002). Además, al tratarse de células en suspensión, el procedimiento de infección fue complementado mediante *espinoculación*. La *espinoculación* durante la transducción es un procedimiento de centrifugación a 2400 rpm durante 1 hora y 30 minutos (a temperatura ambiente) que favorece el contacto entre las partículas lentivirales y las células en suspensión (**Fig. 32**) (Clontech Laboratories 2015). Las células A20 transducidas fueron seleccionadas durante 15 días con 1,5 µg/mL de puromicina (ThermoFisher Scientific). Tras la selección, se clonaron las células por dilución límite y se seleccionaron el/os clon/es de interés analizados por citometría de flujo.

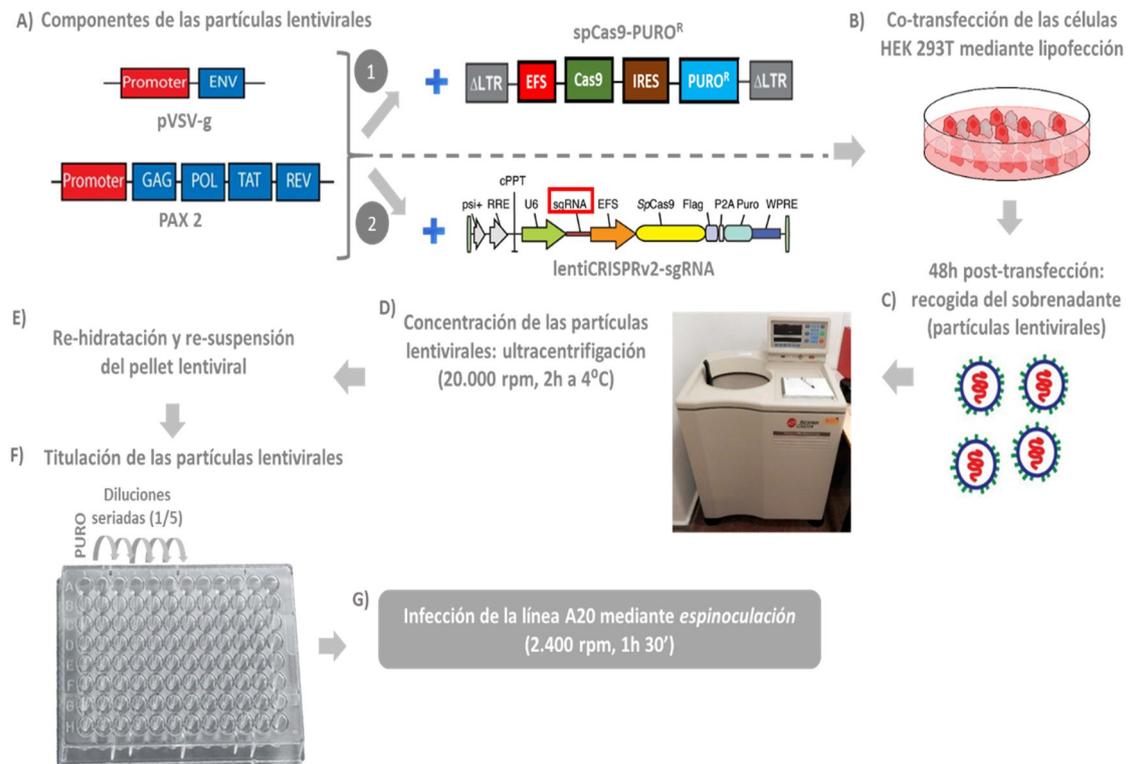


Figura 32. Proceso de producción y concentración de las partículas lentivirales, e infección de la línea A20 mediante espinoculación. (A) Para la formación de las partículas lentivirales se emplearon los plásmidos: pVSV-g (codifica para la envoltura), PAX 2 (codifica para las proteínas estructurales), y los plásmidos lentivirales de transferencia (el spCas9-PURO^R que codifica para la nucleasa Cas9 (1) o el lentiCRISPRv2-sgRNA que codifica para la nucleasa Cas9 y la secuencia guía (2)). (B) Se co-transfectaron mediante lipofección las células HEK 293T, con la combinación de los plásmidos pVSV-g, PAX-2 y el plásmido lentiviral que codifica para el transgen de interés; de manera que, las células HEK 293T nos servirían como empaquetadoras de las partículas lentivirales. (C) 48 horas después de la transfección, se recogió el sobrenadante donde habían sido liberados los sistemas lentivirales. (D) Para obtener el título viral óptimo para infectar a la línea celular A20, se recurrió a la concentración de las partículas lentivirales mediante ultracentrifugación (20.000 rpm durante 2 horas y a 4°C para mantener la viabilidad de los sistemas lentivirales). (E) Tras el proceso de ultracentrifugación, fue necesaria la re-hidratación y re-suspensión del pellet lentiviral. (F) Se titularon las partículas lentivirales mediante diluciones seriadas 1/5, para conocer la concentración mínima de partículas lentivirales con la que infectar las células A20. (G) Por último, la línea celular A20 fue infectada mediante *espinoculación* (centrifugación a 2.400 rpm, 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente) y en presencia de polibrene.

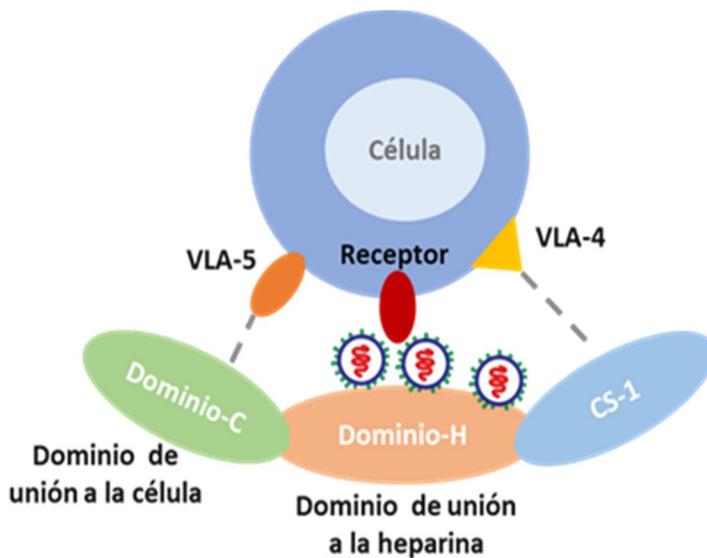


Figura 33. Mecanismo de acción de la retronectina. La retronectina está formada por tres dominios: el dominio de unión de la célula (dominio-C), el dominio de unión de heparina (dominio-H) y la secuencia CS-1. Las partículas virales se unen a la retronectina interactuando con el dominio-H, y las células se unen a través de la interacción de los receptores de integrina, VLA-5 y VLA-4, con el dominio-C de la fibronectina y el sitio CS-1, respectivamente. Con ello se consigue potenciar la colocalización de las partículas virales y las células, mejorando la eficacia de la transducción.

3.3.5. Clonaje de las células transfectadas o transducidas

Para conseguir una línea celular que derive de una única célula, a la cual nos referimos como clon, se recurrió al proceso de clonación. En primer lugar, se realizó el recuento de la población de células heterogénea (apartado 3.3.1). En segundo lugar, se sub-cultivaron las células a razón de 1-2 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se hizo una primera selección con ayuda del microscopio óptico de aquellos pocillos que presenten un único clon. Se analizaron los pocillos seleccionados mediante citometría de flujo (apartado 3.7) y se expandieron los clones de interés.

3.4. Análisis de la eficacia de la edición del genoma por el sistema CRISPR-Cas9 mediante el ensayo de la T7 endonucleasa

La T7 endonucleasa reconoce y corta zonas del genoma que no presentan una complementariedad perfecta (Guzzardo et al. 2015). Se empleó el ensayo de la T7 endonucleasa para determinar la eficacia de la edición del genoma mediada por el sistema CRISPR-Cas9 y los sgRNAs elegidos. Se utilizaron las células de hepatocitos Hepa 1-6 porque expresaban nuestra molécula de interés HVEM, su adherencia y porque son fáciles de transfectar.

El protocolo seguido para el ensayo de la T7 endonucleasa fue el siguiente (**Fig. 34**):

(i) Transfección de células de hepatocito con el sistema CRISPR-Cas9-sgRNA. En primer lugar, se transfectaron mediante lipofección (apartado 3.3.3.1) las células de hepatocitos Hepa 1-6 con las diferentes construcciones del sistema CRISPR-Cas9 y los sgRNA 1, 3, 6 ó 13 (clonados por separado en el vector sgRNA-tagRFP657). Se dejó que el sistema de edición del genoma se expresase e hiciese su función durante 5-6 días. Tras este periodo de tiempo, se extrajo el DNA genómico de las células de hepatocitos Hepa 1-6 transfectadas para amplificar por PCR.

(ii) Extracción del DNA genómico y amplificación por PCR de la zona del genoma diana del CRISPR-Cas9. Se extrajo el DNA genómico mediante el hervido de las células y el empleo de la resina Chelex 100. A continuación, se amplificó la zona diana del HVEM a partir del DNA genómico extraído, usando el *primer forward* HVEM *up* (**tabla 6**) y el *primer reverse* HVEM *bottom* (**tabla 6**). Se comprobaron las secuencias amplificadas mediante electroforesis en gel al 2% de agarosa.

(iii) Reacción de hibridación. Para el anillamiento de las diferentes parejas de DNA resultantes de la amplificación por PCR se utilizó la siguiente reacción y condiciones de hibridación (**tabla 18**):

Tabla 18. Protocolo de la reacción de hibridación.

Reacción de hibridación	
Reactivos	Condiciones
200 ng DNA (producto de PCR)	5min a 95°C 5min 95-85°C → -2°C/s 85-25°C → -0,1°C/s Mantener a 4°C
2 µl NEB Buffer 2	
x µl ddH ₂ O (hasta un volumen final de 19 µl)	

(iv) Reacción de digestión con la T7 endonucleasa. Se añadieron 10 Unidades de la T7 endonucleasa I (M0302) al DNA anillado del paso anterior y se incubó 30 minutos a 37°C.

(v). Cálculo del porcentaje de corte del total del gen. Inmediatamente después, se comprobó el producto de la digestión mediante electroforesis en un gel al 2% de agarosa. Para el análisis de la imagen se empleó el programa informático *Quantity One* (Biorad) y se calculó la modificación estimada del gen siguiendo la fórmula (Guschin D.Y., Waite A.J., Katibah G.E., Miller J.C., Holmes M.C. 2010) :

$$\% \text{ Corte del total del gen} = 100 \times (1 - (1 - \text{fracción cortada})^{\frac{1}{2}})$$

La fracción cortada resulta de la suma de los picos del producto cortado dividido entre la suma del producto cortado más los picos parentales.

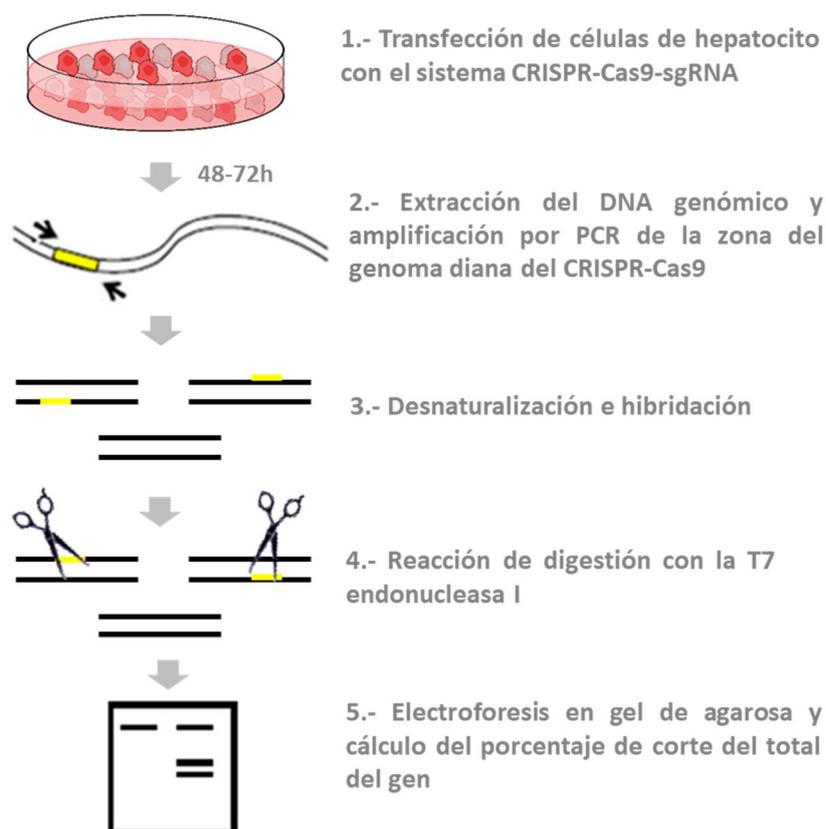


Figura 34. Procedimiento del ensayo de la T7 endonucleasa I. Protocolo para el estudio de la eficacia de la edición del genoma por el sistema CRISPR-Cas9 mediante el ensayo de la T7 endonucleasa I.

3.5. Análisis de la eficacia de la edición del genoma por el sistema CRISPR-Cas9 mediante el uso del vector pRR-eGFP

Se utilizó el plásmido de expresión pRR-eGFP para determinar la eficacia de acción de los diferentes sgRNAs elegidos. El sistema pRR-eGFP se caracteriza por presentar el extremo N-terminal (200 nt) de la proteína EGFP interrumpido de manera prematura por un codón stop, seguido de un sitio de clonación múltiple (MCS), y de la secuencia completa codificante para la proteína eGFP precedida de otro codón stop (Flemer & Bu 2015). El fundamento del sistema pRR-eGFP se basa en el restablecimiento de la fluorescencia emitida por la proteína EGFP, a través de la reparación por recombinación homóloga de los extremos, tras el corte mediado por la nucleasa Cas9 (o cualquier otro tipo de nucleasa, como las TALENs) guiada por el sgRNA (**Fig. 35**) (Flemer & Bu 2015).

Para el desarrollo del sistema pRR-eGFP, se transfectaron mediante lipofección las células HEK 293T de manera conjunta con los plásmidos pRR-eGFP-HVEM (ECD) (codifica para el dominio extracelular de HVEM (ECD) y spCas9-PURO^R (codifica para la nucleasa Cas9), y de manera separada con los plásmidos sgRNA-clonado-tagRFP657 que presentan clonados los sgRNA 1, 3, 6 ó 13 (**tabla 19**) (**Fig. 35**). Además, se transfectaron las células HEK 293T de manera separada con los plásmidos pRR-eGFP-HVEM (ECD) y el pRR-eGFP para analizar la posible fluorescencia basal de la proteína eGFP truncada (**tabla 19**). A las 48 horas después de la transfección, se analizó mediante citometría de flujo la intensidad de fluorescencia emitida como consecuencia de la reparación de la expresión de la proteína eGFP (**Fig. 35**). La eficacia de la edición de HVEM viene determinada por la intensidad media de fluorescencia, de tal manera que a mayores niveles de fluorescencia más eficaz será el sgRNA empleado (Flemr & Bu 2015).

Tabla 19. Sistema pRR-eGFP. Condiciones para la transfección de las células HEK 293T. Para la comprobación de la eficacia de la acción del sistema CRISPR-Cas9 se emplearon los plásmidos pRR-eGFP-HVEM (ECD), spCas9-PURO^R (codifica para la nucleasa Cas9), y sgRNA_clonado-tagRFP657 correspondiente a las diferentes secuencias sgRNA guías (1, 3, 6 y 13). Como control de la posible fluorescencia basal de la proteína eGFP truncada se transfectaron las células HEK 293T por separado con los plásmidos pRR-eGFP-HVEM (ECD) y con el pRR-eGFP.

		PLÁSMIDOS UTILIZADOS						
		pRR-eGFP-HVEM (ECD)	spCas9-PURO ^R	sgRNA guía 1	sgRNA guía 3	sgRNA guía 6	sgRNA guía 13	pRR-eGFP
POCILLOS CULTIVOS	1	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	4	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	5	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	6	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	7	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	8	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	9	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	10	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	11	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

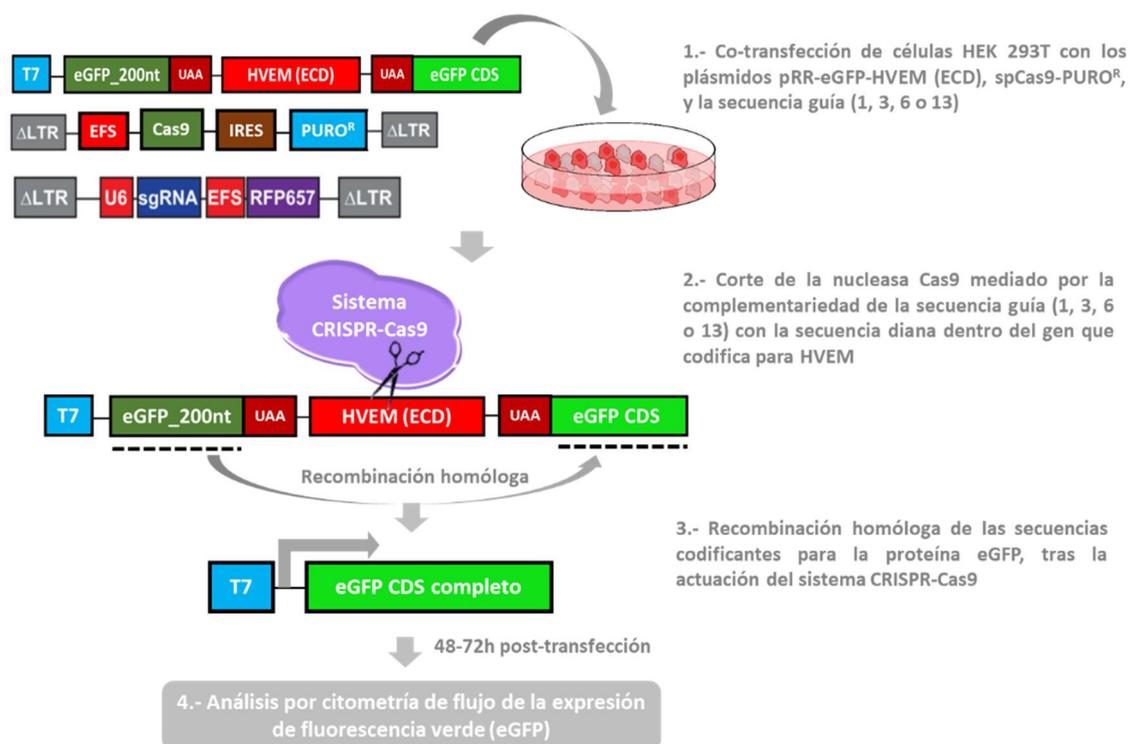


Figura 35. Protocolo para el desarrollo del sistema pRR-eGFP. Procedimiento para el análisis de la eficacia de edición del gen que codifica para HVEM por el sistema CRISPR-Cas9 y las diferentes secuencias guías (1, 3, 6 ó 13). El sistema pRR-eGFP se basa en el restablecimiento de la expresión de fluorescencia verde, tras la acción de la nucleasa Cas9 dirigida por la secuencia guía, como resultado de la recombinación homóloga entre los extremos de las secuencias codificantes para la proteína eGFP. UAA: codón stop, eGFP_200nt: secuencia del extremo N-terminal de 200 nucleótidos (nt) que codifica para la proteína eGFP, eGFP CDS: resto de la secuencia codificante (CDS) para la proteína eGFP.

3.6. Cálculo de la tasa de duplicación de la línea celular de linfoma B murino A20

El tiempo o tasa de duplicación (*Doubling Time*, DT) de una línea celular se define como el tiempo empleado por las células para duplicar en número *in vitro* (ATCC (University Blvd. Manassas) 2014). Se utilizó el cálculo de la tasa de duplicación para comparar el tiempo que necesitaba la línea celular A20 GFP⁺ WT para duplicar su población en cultivo en comparación con el tiempo de duplicación que requerían las células A20 GFP⁺ deficientes para la expresión de HVEM de membrana. Un aspecto importante a tener en cuenta es que las células deben mantenerse en todo momento en crecimiento exponencial (fase logarítmica del crecimiento), por lo que no deben llegar al estado de confluencia para evitar que detengan el ciclo de división y entren en estado de latencia (ATCC (University Blvd. Manassas) 2014).

El protocolo utilizado para el cálculo de la tasa de duplicación de las líneas A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM deficientes fue el siguiente:

1.- En primer lugar, fueron contadas $2,5 \times 10^4$ células y sub-cultivadas en placa de 24 pocillos (P24) (1 mL de medio completo/pocillo). Se incluyeron 3 réplicas de cada línea celular por pocillo.

$$Xb = \text{número de células inicialmente} = 2,5 \times 10^4$$

2.- En segundo lugar, se contaron las células resultantes cada 24 horas. En nuestro caso, se realizaron dos recuentos a tiempos de incubación (T) de 1 y 2 días. Por cada tiempo de incubación, se incluyeron 3 réplicas de recuento para cada tipo celular y se comparó la tasa de replicación de ambas líneas celulares mediante el análisis estadístico *unpaired Student's t test* (considerando estadísticamente significativo un valor p menor de 0,05) (Kim 2015).

$$Xe = \text{media del recuento del número de células al final}$$

3.- Con estos datos se calculó la tasa de duplicación para las líneas celulares A20, utilizando la siguiente fórmula (ATCC (University Blvd. Manassas) 2014):

$$\text{Tasa de duplicación} = \frac{T(\ln 2)}{\ln\left(\frac{Xe}{Xb}\right)}$$

Donde Xb es el número inicial de células y Xe es la media del número final de células a tiempo de incubación (T) determinado (en nuestro caso T= 1 y 2 días). La unidad para la tasa de replicación es el día (la misma unidad utilizada para el tiempo de incubación (T)).

3.7. Citometría de flujo

Para el análisis de las células por citometría de flujo se utilizó el citómetro CyAn ADP *Flow Cytometer* (Beckman Coulter) que está compuesto por tres láseres (405, 488 y 642 nm) que permite evaluar hasta nueve fluorocromos diferentes simultáneamente. Empleamos del orden de $50\text{-}100 \times 10^3$ células/pocillo P96, con un tiempo de incubación con los anticuerpos primarios de 15-20 minutos, y con el anticuerpo secundario de 8-10 minutos. Entre incubaciones, se realizaron lavados con *FACS buffer* (pH 7,2-7,4) (*Hanks Balanced Salt Solution* (libre de Mg^{2+} y Ca^{2+}) 1x, 0,1% albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, 5 mM EDTA $2Na_2H_2O$, 1% de FBS descomplementado, solución de rojo fenol al 0,5%, 0,02% de azida sódica y agua Milli-Q hasta 1L) para eliminar el exceso de

anticuerpo que no se hubiera unido. Al final de la tinción, para poder excluir las células muertas, se añadieron 10µL/pocillo de ioduro de propidio (IP), el cual marca las células no viables que presentan alterada su membrana plasmática (Riccardi & Nicoletti 2006).

3.7.1. Características fenotípicas obtenidas mediante citometría de flujo de las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺, A20 GFP⁺ Cas9⁺ y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}

Comparamos el fenotipo de diferentes marcadores de superficie expresados en las células A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5) y A20 GFP⁺ deficientes para HVEM (HVEM^{-/-}) (1F1), con el objetivo de estudiar si habían sufrido alteraciones como consecuencia de la manipulación genética. Previamente al marcaje con los distintos anticuerpos, se bloquearon los receptores FcγR incubando durante 10-15 minutos con sobrenadante 2.4G2 (CD16/CD32). Los anticuerpos primarios marcados con biotina y usados a una concentración final de 1 µg/mL, salvo el anti-HVEM (Pasero et al. 2012) que fue empleado a 4 µg/mL, fueron: anti-BTLA (Pasero et al. 2012), anti-CD160 (Pasero et al. 2012), anti-PD1, anti-PD-L1, anti-B7 DC (PD-L2), anti-B220, anti-α-CD40, anti-CD80, anti-B7x, anti-CCR7, anti-CCR9, anti-CD83, anti-CD122 (IL-2Rβ), anti-CD119, anti-CD121a, anti-ICOS-Ligando, anti-CD49d-VLA-1 (cadena α de la integrina α₄β₁), anti-CD44, y anti-FasL. Para revelar los anticuerpos biotinilados se utilizó estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (1/800). Los anticuerpos marcados con el fluorocromo ficoeritrina (PE) y empleados a una dilución final 1/300 fueron: anti-CD132 (IL-2Rγ), anti-Fas, anti-LTβR, anti-CD21/35, anti-CD160, anti-CD11a, anti-CD223 (LAG3), anti-CD19, anti-CD23, anti-CD18 (β₂-integrina), anti-CD11a (cadena LFA-1α y subunidad α_L), anti-IgM y anti-MHC-II (IA^d). El anticuerpo anti-IgD marcado con PerCP (proteína peridina-clorofila) se utilizó a una dilución final 1/400. Como controles, se emplearon los isotipos rata IgG2a-biotinilado (1 µg/mL), el isotipo-PE (1/300), y el isotipo-PerCP (1/400).

Por último, se añadieron 10µL/pocillo de ioduro de propidio a cada tubo antes de la adquisición de los datos.

3.7.2. Análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína fluorescente GFP

Se analizó la expresión de la proteína fluorescente verde GFP por parte de las células A20 infectadas con las partículas lentivirales GFP cedidas por el CIEMAT y de las células HEK 293T transfectadas con los diferentes plásmidos del sistema pRR-eGFP.

Dada la expresión endógena de la fluorescencia verde, no fue requerido el marcaje con ningún anticuerpo. Solo se añadieron 10 μL /pocillo de yoduro de propidio a las células para excluir las células muertas.

3.7.3. Análisis por citometría de flujo de la sangre, los órganos linfoides y los nódulos tumorales del hígado

Las células procedentes del procesamiento de la sangre de los ratones inoculados con los diferentes tratamientos fueron teñidas con el marcador de células B anti-CD19-PE (1/300), con el fin de poder distinguir las células B propias del ratón (CD19^+ GFP⁻) de las células de linfoma B A20 (CD19^+ GFP⁺).

Las células procedentes de los diferentes órganos linfoides (timo, bazo, ganglios y médula ósea) y los nódulos tumorales del hígado fueron teñidas con la siguiente combinación de anticuerpos: anti-CD19-PE (1/300, marcador de células B), anti-CD4-Percp (1/400, marcador de células T CD4^+), anti-CD8-APC (1/400, marcador de células T CD8^+), anti-HVEM-Biotina, clon 6C9 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-BTLA-Biotina, clon 4G12b (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para revelar los anticuerpos marcados con biotina, se utilizó estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (1/800) o estreptavidina-ficoeritrina-cianina 7 (SA-PE-Cy7) (1/500). Para terminar, se añadieron 10 μL /pocillo de yoduro de propidio.

Con el objetivo de estudiar las poblaciones de leucocitos infiltrantes (TILs) en los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ WT en comparación con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-CD19-PE (1/300, marcador de células B), anti-DX5-APC (1/400, marcador de células NK), anti-TCR- β -Biotina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, marcador junto con anti-DX5-APC de las células NKT), anti-CD11b-Percp-Cy5 (1/400, marcador de células mieloides monocito/macrófago/DC), anti-Ly6-C-Biotina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, marcador de monocitos), anti-Ly6-G-PE (1/500, marcador solo de neutrófilos junto con anti-Ly6-C-Biotina), anti-CD3-FITC (1/300, marcador de células T), anti-CD8-PE (1/500, marcador de células T CD8^+), anti-CD4-APC (1/400, marcador de células T CD4^+), anti-CD11c-Biotina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, marcador de células dendríticas junto con anti-CD11b-Percp-Cy5), anti-F4/80-PE (1/500, marcador de macrófagos). Para revelar los anticuerpos marcados con biotina, se utilizó estreptavidina-Violeta brillante 421 (SA-BV421) (1/800). Para poder excluir las células muertas de la tinción, se añadieron 10 μL /pocillo de yoduro de propidio.

3.8. Caracterización de las mutaciones producidas por el sistema CRISPR-Cas9

Se caracterizaron la/s mutación/es producidas por el sistema CRISPR-Cas9 mediante secuenciación del DNA genómico extraído usando el Kit *Speedtools DNA extraction* (Biotools) (apartado 3.2.12.2) a partir de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}. Se empleó el DNA genómico de las células A20 GFP sin modificar como control de secuenciación. Para el análisis y comparación de las secuencias de nucleótidos y de proteínas, se utilizaron las herramientas bioinformáticas *Clustal* (EMBL-EBI).

3.9. Modelo animal de linfoma B murino A20

La generación del modelo animal de linfoma B murino A20 fue desarrollado en ratones Balb/c singénicos con haplotipo H-2^d (Kim et al. 1979). Los ratones fueron utilizados como receptores para la inoculación de diferentes líneas tumorales de linfoma B A20 y el estudio *in vivo* de la progresión y desarrollo del tumor. Los animales fueron albergados en el animalario de la Universidad de León (España) en condiciones estándar con ciclos de luz/oscuridad controlados y con acceso libre a comida y agua. Todos los experimentos con ratones han sido realizados de acuerdo con las Directrices Europeas para el Cuidado y Manejo de los Animales de Laboratorio.

3.9.1. Inoculación de células tumorales y seguimiento de la progresión tumoral

Se inocularon 1×10^6 células de linfoma B murino (A20 GFP⁺ (clon 2D9) o A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (clon 1F1)) en 1mL de medio RPMI 1640 más 1% de FBS, por separado y por vía intravenosa en la cola de ratones Balb/c hembra de 6 a 8 semanas de edad. A día 15 post-trasplante, se analizó mediante citometría de flujo la progresión del tumor extrayendo entre 200-300 μ L de sangre practicando una escisión en la cola de los ratones. Para la recogida de la sangre se utilizaron 10 μ L de heparina/tubo evitando que se coagule durante su manipulación. Para extraer las células mononucleares de la sangre (linfocitos B, T y células NK; monocitos y células dendríticas), se sometió a la muestra de sangre a un gradiente de densidad denominado Ficoll (ThermoFisher Scientific) por centrifugación a 1200 rpm durante 20 minutos (sin deceleración para evitar que se rompiera la interfase). De esta forma, se consiguió separar las diferentes capas (de arriba a abajo): plasma, células mononucleares, Ficoll, granulocitos y eritrocitos. Se aisló el

anillo de células mononucleares con cuidado de no arrastrar los granulocitos/eritrocitos depositados en el fondo. Se centrifugó a 2000-3000 rpm, y se lisaron los posibles eritrocitos con el buffer de lisis ACK (amoníaco-cloruro-potasio) (durante 2 minutos a temperatura ambiente y se paró la reacción con *FACS buffer* o PBS). Posteriormente, se analizaron las células por citometría de flujo (apartado 3.7).

3.9.2. Procesamiento de los órganos linfoides y de los nódulos tumorales del hígado

El sacrificio de los ratones fue realizado mediante inhalación de CO₂ en los días 22, 28 y 34 post-trasplante. Se analizaron los órganos linfoides primarios: timo y médula ósea (correspondiente a las dos tibias) y los órganos linfoides secundarios: bazo y nódulos linfáticos periféricos; y los nódulos tumorales del hígado. El bazo, primero fue procesado mecánicamente en el buffer de lisis de eritrocitos ACK, y luego se añadió *FACS buffer* para parar la reacción. El timo, los nódulos linfáticos periféricos y los nódulos tumorales del hígado fueron procesados mecánicamente en *FACS buffer*. La médula ósea fue tratada también con el buffer de lisis de eritrocitos ACK. Las células resultantes de los diferentes órganos fueron filtradas usando mallas de nylon, contadas y las células en suspensión se analizaron mediante citometría de flujo.

3.9.3. Histología clásica

La histología clásica es una técnica que nos permite el estudio de la morfología del tejido, y de la distribución (local o difusa) y el grado de infiltración de las células tumorales (Neeson & Paterson 2004). El bazo, timo, ganglios periféricos y nódulos tumorales del hígado de los diferentes ratones fueron fijados con una solución de formalina al 10%, para ser embebidos en parafina y cortados en secciones de un grosor de 4-5 µm, que fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Este abordaje experimental se llevó a cabo con la ayuda y colaboración de la Unidad de Anatomía Patológica del departamento de Sanidad Animal (Universidad de León). Finalmente, las preparaciones fueron analizadas mediante microscopía óptica.

3.10. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de los experimentos fueron analizados usando el programa GraphPad Prism versión 6.01. Los análisis estadísticos fueron realizados aplicando el

unpaired Student's t test que compara las medias de dos grupos, asumiendo que los valores siguen una distribución Gaussiana. Un valor p menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Por otro lado, para la identificación y eliminación de los valores atípicos se utilizó el método de Grubb, el cual puede identificar solo un valor atípico en cada grupo de datos. El método de Grubb se basa en el descarte de los datos que no presentan una distribución Gaussiana tomando como referencia el valor $\alpha = 0.05$. Esto quiere decir que si no hay valores atípicos, hay un 5% de probabilidad de que el test Grubb identificara el valor más alejado de la media como un valor atípico.

IV. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. La línea de linfoma B murino A20 expresa los ligandos HVEM y PD-L1 para los receptores co-inhibidores BTLA/CD160 y PD-1 expresados en células T, respectivamente

El análisis mediante citometría de flujo nos permitió identificar la expresión de los ligandos HVEM y PD-L1 de los receptores co-inhibidores BTLA/CD160 y PD-1, respectivamente, en la línea de linfoma B murino A20 (**Fig. 36B**). La línea celular tumoral A20 expresaba igualmente niveles altos de BTLA. Sin embargo, no expresaba el receptor co-inhibidor CD160 que forma parte de la misma vía de señalización HVEM/BTLA (**Fig. 36B**). Tampoco expresaba el receptor de PD-L1, PD-1, ya que los niveles de expresión de las moléculas CD160 y PD-1 fueron similares a los niveles de expresión del isotipo control (**Figs. 36A y B**). Los niveles de expresión de las moléculas BTLA y PD-L1 fueron altos y similares, con intensidades medias de fluorescencia (MFI, calculadas para una distribución normal o *Gaussiana*) de 177 y 178, respectivamente, mientras que los niveles de expresión de HVEM resultaron inferiores (MFI: 25,7) (**Fig. 36B**).

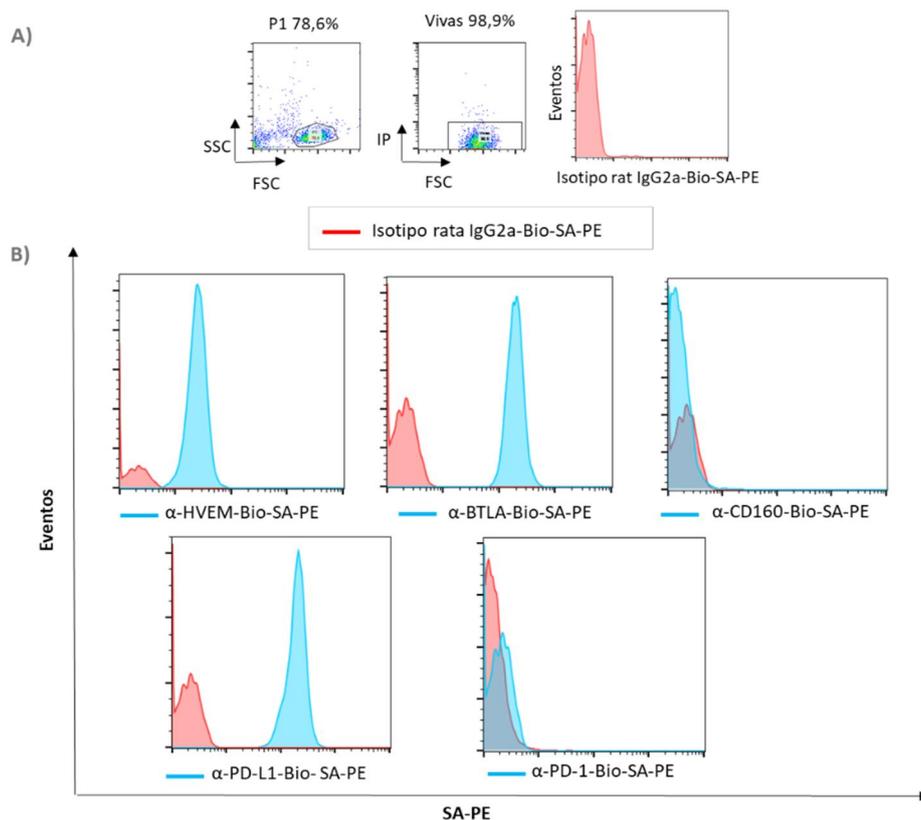


Figura 36. Análisis por citometría de flujo de la expresión de HVEM/BTLA/CD160 y PD-L1/PD-1 en la línea celular de linfoma B murino A20. (A) Primera selección de nuestra población de células A20 (P1: 78,6%) en el *plot* FSC/SSC (*forward scatter/side scatter*) que enfrenta los parámetros tamaño (FSC) y complejidad (SSC). A partir de la población P1, se seleccionaron las células vivas (98,9%) descartando las células muertas con yoduro de propidio (IP) (agente intercalante del DNA que atraviesa la membrana de las células muertas y emite en los canales FL2/FL3). Como isotipo control, se utilizó un anticuerpo rata IgG2a biotinilado revelado con estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (rojo). (B) Los histogramas muestran los diferentes niveles de expresión de las distintas moléculas (HVEM, BTLA, CD160, PD-L1 y PD-1) (azul), empleando anticuerpos biotinilados que fueron revelados con SA-PE, con respecto al isotipo control (rojo).

4.2. Transducción estable del gen codificante de la proteína fluorescente GFP mediante un vector lentiviral en la línea celular A20. Trazabilidad *in vivo* del crecimiento tumoral en ratones singénicos Balb/c

Para poder distinguir por citometría de flujo las células B (CD19⁺) propias de ratones Balb/c, de la línea celular de linfoma B murino A20 en los estudios *in vivo* de progresión y desarrollo del tumor, se generó la línea celular A20 para que expresase de manera estable la proteína fluorescente verde (GFP) (A20 GFP⁺, clon 2D9) (**Fig. 37**). Para ello, la línea celular A20 fue transducida con partículas lentivirales del gen codificante para la proteína GFP. Antes de la transducción, las células A20 no expresaban

GFP (**Fig. 37A**). Después de la transducción con las partículas lentivirales GFP⁺, obtuvimos una población heterogénea formada por células A20 que expresaban GFP (54,4% A20 GFP⁺) y células A20 que no expresaban fluorescencia verde (45,6% A20 GFP⁻) (**Fig. 37B**). Se clonó mediante dilución límite la población heterogénea de células A20 resultante del proceso de infección con las partículas lentivirales GFP⁺ y se seleccionó el clon 2D9, que expresaba uniformemente la proteína verde GFP con una intensidad media de fluorescencia del orden de 10²-10³ (**Fig. 37C**).

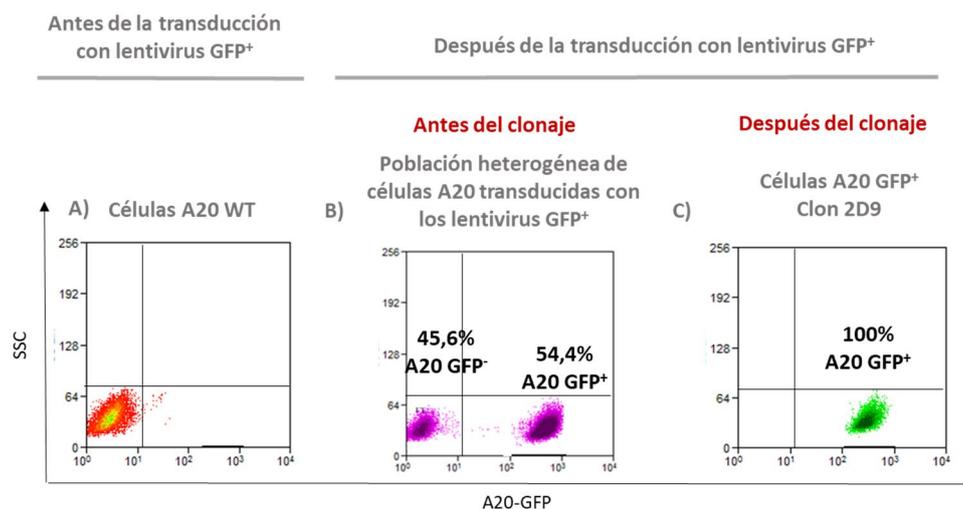


Figura 37. Generación de la línea celular A20 GFP⁺ (clon 2D9). (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de GFP por las células A20 WT (*wild-type*) (antes de la transducción). (B) Expresión de GFP por las células A20 después de la transducción con los lentivirus GFP⁺ y antes del proceso de clonación. (C) Tras el proceso de clonación, se seleccionaron las células A20 GFP⁺, clon 2D9, 100% GFP positivas.

4.3. Generación de una línea A20 HVEM deficiente mediante el sistema CRISPR-Cas9

4.3.1. Construcción de los vectores lentiCRISPRv2 con sgRNA guías diseñados sobre el exón 1 del gen HVEM

La línea celular de linfoma B murino A20 procede de ratones Balb/c (Kim et al. 1979). Se comparó el grado de similitud de las secuencias de DNA genómico del HVEM murino entre las cepas de ratón C57BL/6 (ENSMUSG00000042333) y Balb/c (ENSMUST00000045919) depositadas en la base de datos Ensembl, y la línea celular A20; comprobando que son idénticas, lo que indica que se trata de un gen conservado en estas dos cepas de ratones (**Fig. 38**).

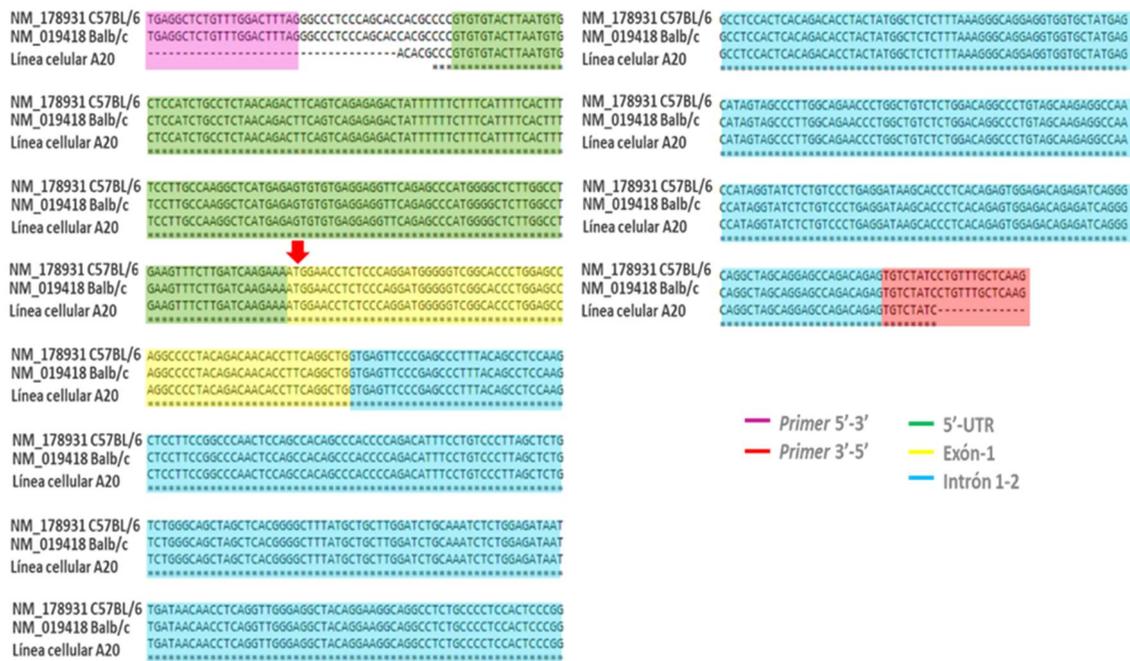


Figura 38. Alineamiento de las secuencias de DNA genómico de HVEM correspondientes al exón 1 e intrón 1-2, procedentes de las cepas de ratón C57BL/6 y Balb/c, y de la línea celular de linfoma B murino A20. Las secuencias de HVEM de las cepas de ratón C57BL/6 (NM_178931) y Balb/c (NM_019418) proceden de las bases de datos, mientras que la secuencia de HVEM de la línea celular de linfoma B murino A20 ha sido secuenciada por nuestra cuenta. La flecha roja indica el punto de inicio de la transcripción (ATG) en el exón 1. *Primer 5'-3'* (rosa), *primer 3'-5'* (rojo), 5'-UTR (verde), exón-1 (amarillo) e intrón 1-2 (azul).

Con ayuda del programa bioinformático de predicción del péptido señal N-terminal (*UniProt Signal Peptide*, <https://www.uniprot.org/help/signal>), se determinó que el péptido señal (necesario para la expresión en membrana de la proteína HVEM) se situaba del aminoácido 1 al 38, y estaba codificado por el exón 1 (del aminoácido 1 al 23) y por parte del exón 2 (del aminoácido 24 al 38) (Fig. 39).

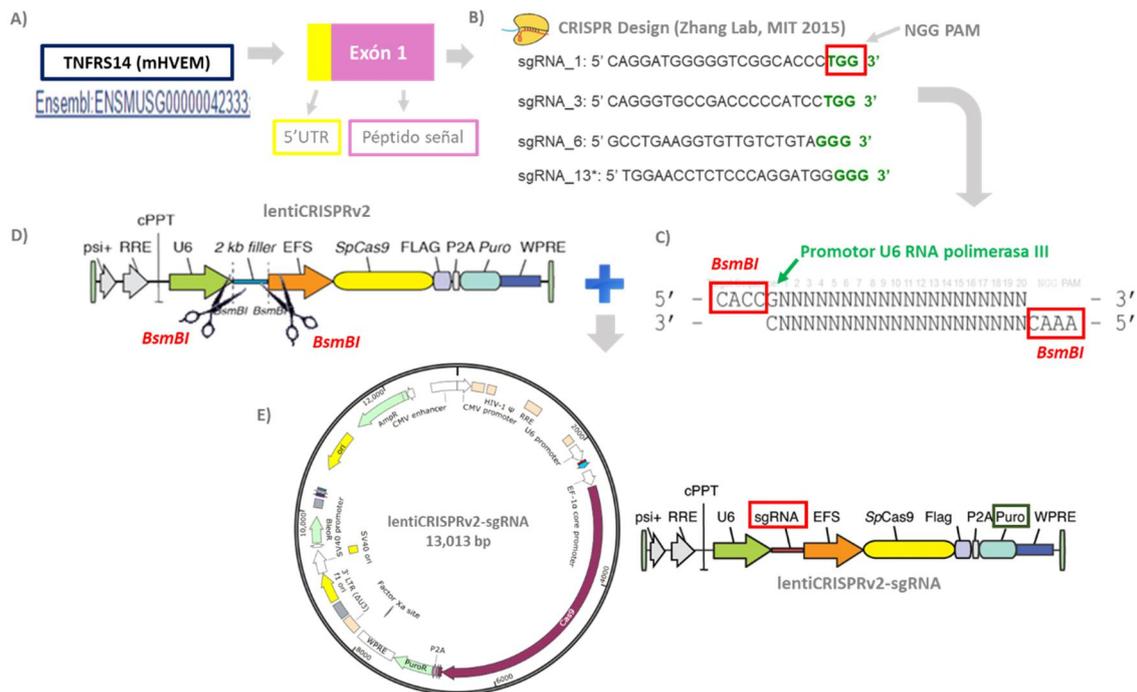


Figura 40. Estrategia de clonaje para la construcción del vector de expresión lentiCRISPRv2-sgRNA (1, 3, 6 y 13). (A) y (B) Diseño y selección de los oligos sgDNAs 1, 3, 6 y 13. (C) Generación de los oligos sgDNAs dúplex que llevaban las secuencias complementarias resultantes del corte con la enzima *BsmBI* (CACC/CAAA) y el nucleótido guanina (G) en el extremo 5' para el inicio de la transcripción. Las secuencias PAM (NGG) no fueron incluidas para generar los oligos sgDNAs dúplex. (D) Digestión del vector destino lentiCRISPRv2 con la enzima *BsmBI* (presenta dos sitios de corte para *BsmBI* liberándose un fragmento de 2Kb). (E) Ligación de los sgDNAs (1, 3, 6 y 13) por separado en el vector final lentiCRISPRv2 digerido y purificado para obtener la construcción recombinante lentiCRISPRv2-sgRNA que codifica para la nucleasa Cas9 (*SpCas9*), para el sgRNA (1, 3, 6 o 13) y presenta un *cassette* de resistencia a puromicina (PURO).

4.3.2. Patrón de corte del ensayo T7/EI endonucleasa para los distintos sgRNAs tras su acción mediada por Cas9 sobre HVEM en células eucariotas

La T7 endonucleasa reconoce y corta secuencias de DNA de cadena doble que no presentan una complementariedad perfecta, es decir, donde existen bases desaparejadas. Tras la acción de la nucleasa Cas9 guiada por los diferentes sgRNAs (1, 3, 6 y 13) sobre el exón 1 de HVEM en un ensayo *in vitro* de transfección de cada una de las construcciones genéticas recombinantes en células eucariotas, se aisló el DNA genómico y se amplificó por PCR el exón 1 del gen HVEM utilizando *primers* flanqueantes, dando como resultado una mezcla de cadenas de DNA: hebras de DNA *wild-type* homodúplex, hebras de DNA mutado homodúplex, y hebras de DNA mutado/*wild-type* heterodúplex. A continuación, se sometió a la mezcla de hebras de DNA a una reacción de hibridación

para conseguir la formación de cadenas de DNA heterodúplex (mutada/*wild-type*). Las cadenas de DNA heterodúplex fueron digeridas con la T7 endonucleasa. Posteriormente, se visualizaron las reacciones de digestión en un gel de agarosa al 2% (**Fig. 41**), y se semi-cuantificó la densidad (densidad relativa/distancia de migración (mm²)) de las bandas de DNA resultantes de la reacción de digestión con la T7 endonucleasa empleando el programa informático de análisis de imagen *Quantity One* (BioRad) (**tabla 20**). La densidad del producto sin cortar (control) fue mayor que la densidad de los picos parentales (sin cortar) resultantes del ensayo T7/EI endonucleasa, aunque las diferencias entre las densidades se movieron dentro del mismo rango (**tabla 20**). Por otro lado, las densidades de los picos parentales (sin cortar) resultantes del experimento fueron más altas que las densidades del producto cortado (**tabla 20**). Para determinar la eficacia de acción de cada sgRNA, se aplicó la fórmula del % corte del total del gen = $100 \times (1 - (1 - \text{fracción cortada})^{1/2})$, donde la *fracción cortada* = $\text{densidad del producto cortado} / (\text{densidad del producto cortado} + \text{densidad de los picos parentales})$; se obtuvieron los valores de 26,80% para el sgRNA_1; 26,66% para el sgRNA_3; 26,44% para el sgRNA_6; y 25,20% para el sgRNA_13 (**Fig. 41**) (**tabla 20**). La semi-cuantificación de las bandas resultantes de la acción de la T7 endonucleasa mostró valores muy parecidos entre sí para los diferentes sgRNAs, revelando una eficiencia de corte similar (**Fig. 41**) (**tabla 20**). Este patrón de corte común puede ser debido a que los sgRNAs elegidos están diseñados muy próximos entre sí sobre el exón 1 de 69 pb (**Fig. 35**). La T7 endonucleasa media el corte en las zonas del DNA donde no haya una complementariedad perfecta como resultado de la reparación no homóloga (NHEJ), la cual introduce deleciones e inserciones (INDELs), del corte mediado por el sistema CRISPR-Cas9 y el sgRNA tres pares de bases *upstream* de la secuencia PAM (**Fig. 42**).

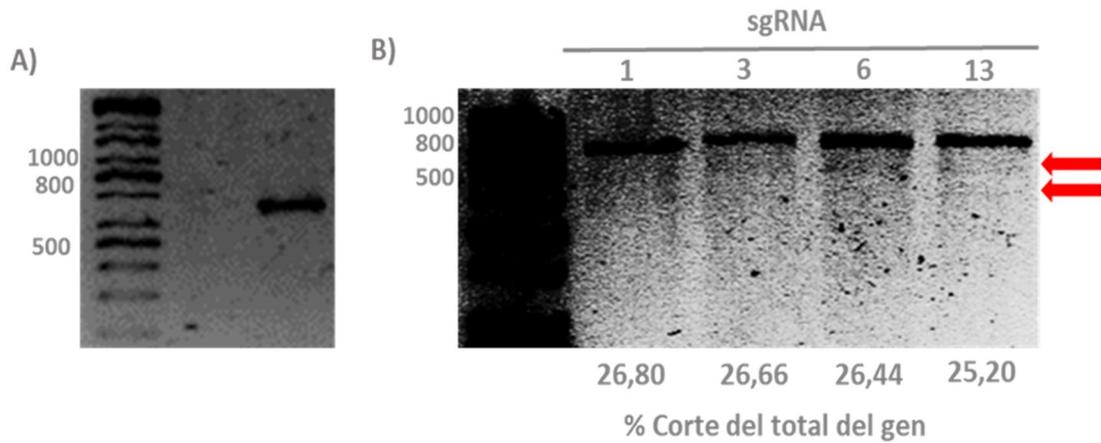


Figura 41. Resultado del ensayo T7/EI endonucleasa. (A) Banda amplificada de HVEM sin digerir por la T7 endonucleasa. (B) Los porcentajes de corte del total del gen codificante para HVEM de los diferentes sgRNAs son similares (26,80% para el sgRNA_1; 26,66% para el sgRNA_3; 26,44% para el sgRNA_6 y 25,20% para el sgRNA_13).

Tabla 20. Parámetros obtenidos de la semi-cuantificación de las bandas resultantes del ensayo T7/EI endonucleasa. % corte del total del gen = $100 \times (1 - (1 - \text{fracción cortada})^{1/2})$

sgRNA	Densidad producto sin cortar (Control)	Densidad picos parentales	Densidad producto cortado	Densidad total (producto cortado + picos parentales)	Fracción cortada	% Corte del total del gen
(-)	3723,25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1	(-)	3556,29	3081,39	6637,68	0,4642	26,80%
3	(-)	3324,32	2855,64	6179,96	0,4621	26,66%
6	(-)	3383,96	2869,36	6253,32	0,4589	26,44%
13	(-)	3383,36	2529,96	5913,32	0,4405	25,20%

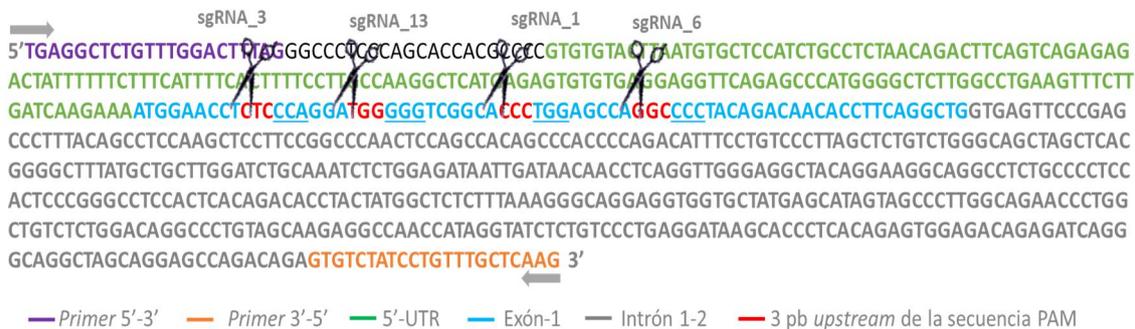


Figura 42. Sitios de corte de los sgRNAs (1, 3, 6 y 13) en el exón 1 de HVEM. El corte mediado por la nucleasa Cas9 guiada por cada sgRNA se produce un codón *upstream* (rojo) de la secuencia PAM (azul subrayado). Los sgRNAs 1 y 13 están diseñados sobre la cadena 5'-3' y los sgRNAs 3 y 6 sobre la cadena 3'-5'.

4.4. Sistema pRR-eGFP. La reparación de la expresión de la proteína GFP mediante recombinación homóloga tras la acción de los distintos sgRNAs guías muestra eficacias de corte similares

4.4.1. Clonaje de los diferentes sgRNAs (1, 3, 6 y 13) en el vector de expresión sgRNA-tagRFP567

Para obtener las construcciones recombinantes sgRNA-clonado-tagRFP567, se clonaron los oligos sgDNA anillados y fosforilados (apartado 4.3.1) en el vector sgRNA-tagRFP567 que codifica para una proteína que emite fluorescencia en el canal APC, ya que al igual que el vector lentiCRISPRv2, el vector sgRNA-tagRFP567 presentaba dos secuencias de corte para la enzima *BsmBI* (Fig. 43). Finalmente, las construcciones recombinantes fueron transformadas en bacterias competentes *E. coli* Stbl3.

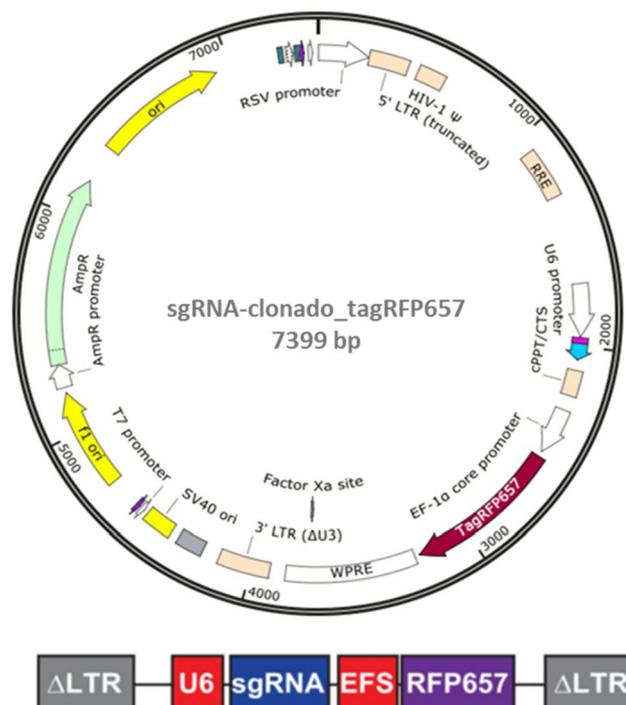


Figura 43. Construcción del vector de expresión sgRNA-clonado-tagRFP657. La expresión del sgRNA correspondiente (1, 3, 6 o 13) está dirigida por el promotor U6.

4.4.2. Clonaje del dominio extracelular (ECD) de HVEM en el vector pRR-eGFP

En primer lugar, se amplificó el dominio extracelular (ECD) de HVEM murino por PCR usando la *proof Reading pfu* polimerasa, y se emplearon los *primers* (5'-3' y 3'-5') que presentaban el sitio de restricción para la enzima *Eco53KI* (GAGCTC). Aunque

la diana del sistema CRISPR-Cas9 fue el exón 1, se clonó el dominio extracelular (ECD) de HVEM debido al pequeño tamaño de nuestro exón diana (69 pares de bases). Una vez amplificado, se clonó en el vector comercial pJET 1.2/blunt (ThermoFisher Scientific CloneJET PCR Cloning Kit) generando el vector pJET 1.2-HVEM (ECD) (Fig. 44), el cual fue transformado por choque térmico en bacterias competentes *E. coli* TOP 10. Después, se digirió el vector pJET1.2-HVEM (ECD) con la enzima de corte *Eco53KI*, liberando el inserto HVEM (ECD), que fue cortado a partir de un gel de agarosa al 1%, y posteriormente purificado. A continuación, se clonó en el vector destino pRR-eGFP, previamente digerido con *Eco53KI*, y en presencia de la T4 DNA ligasa, dando lugar a la construcción recombinante final pRR-eGFP-HVEM (ECD) (Fig. 45). Para la transformación de la construcción pRR-eGFP-HVEM (ECD), fueron empleadas las bacterias competentes *E. coli* TOP10.

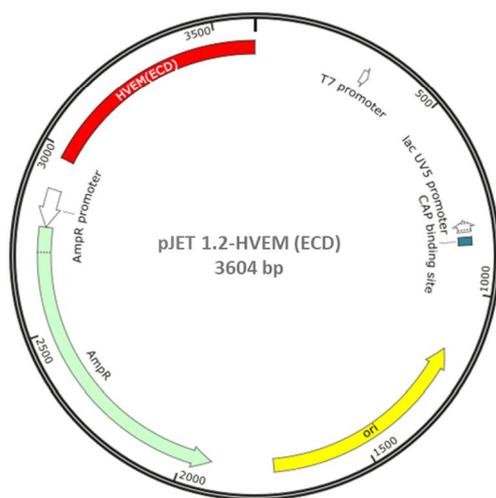


Figura 44. Construcción pJET 1.2-HVEM (ECD). Clonaje del HVEM (ECD) murino en el vector pJET 1.2/blunt.

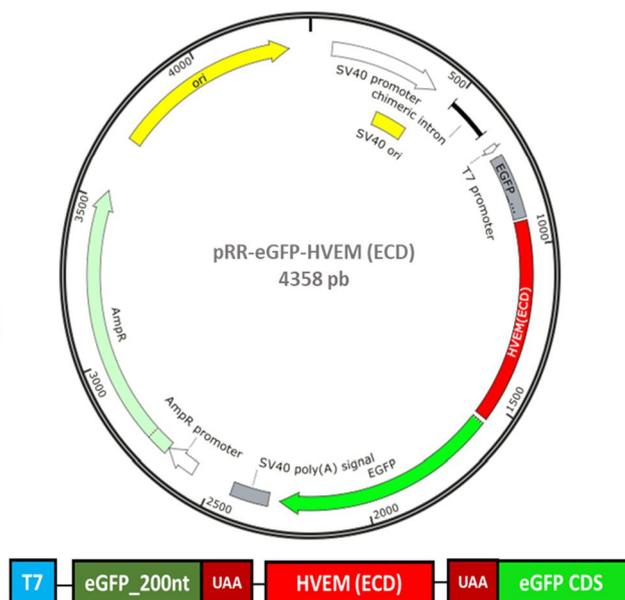


Figura 45. Construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD). Resultado del clonaje del HVEM (ECD) murino entre dos secuencias necesarias para la expresión de la proteína eGFP (eGFP_200nt: secuencia de 200 pb correspondiente al extremo N-terminal de la proteína eGFP y eGFP CDS: resto de la secuencia codificante (CDS) para la proteína eGFP). UAA: codón stop.

4.4.3. Los niveles de expresión de la proteína eGFP reparada tras el corte específico en la secuencia diana de mHVEM por los diferentes sgRNAs son similares

Se empleó el sistema pRR-eGFP para comprobar la eficacia de corte mediada por los diferentes sgRNAs sobre el exón 1 del HVEM. El sistema pRR-eGFP se basa en el restablecimiento de la expresión de fluorescencia verde por la proteína eGFP mediante la reparación homóloga (HR) de sus secuencias tras el corte en el gen que codifica para HVEM mediado por la nucleasa Cas9 guía por el sgRNA (Flemr & Bu 2015). El vector original pRR-eGFP (presenta la proteína eGFP truncada) y la construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD) (apartado 4.4.2) transfectada sola o con el vector spCas9-PURO (codifica para la nucleasa Cas9) presentaban auto-fluorescencia verde basal procedente de la proteína eGFP truncada (**Fig. 46**).

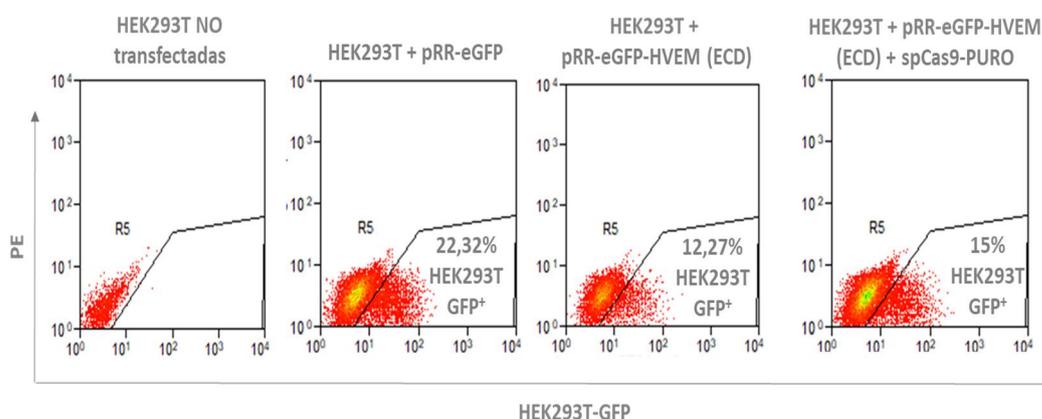


Figura 46. Análisis por citometría de flujo de la expresión de auto-fluorescencia eGFP por parte del vector original pRR-eGFP, de la construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD) sola, y de su combinación con el vector spCas9-PURO. Las células HEK 293T transfectadas con el vector original pRR-eGFP mostraban una expresión de GFP basal del 22,32%; las células transfectadas con la construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD) presentaban una expresión de fluorescencia verde basal del 12,27%; y la combinación del vector pRR-eGFP-HVEM (ECD) junto con el vector spCas9-PURO dio lugar a un 15% de expresión eGFP basal.

Se transfectaron células HEK 293T con la construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD) y con cada una de las construcciones que codifican para los diferentes sgRNAs (1, 3, 6 ó 13) (sgRNA-clonado-tagRFP657) (apartado 4.4.1), en ausencia del vector spCas9-PURO, obteniendo los porcentajes de tinción verde basal (entre el 8,55% y el 22,32%) (**Fig. 47**). Si restamos los porcentajes de auto-fluorescencia de la construcción recombinante pRR-eGFP-HVEM (ECD) transfectada junto con los distintos sgRNAs, los porcentajes de reparación homóloga de la expresión de la proteína eGFP fueron: 25,97% para el sgRNA_1; 29,58% para el sgRNA_3; 28,14% para el sgRNA_6;

y 24,82% para el sgRNA_13 (**Fig. 47**). Los resultados de la reparación homóloga de la expresión de la proteína eGFP por acción de la nucleasa Cas9 guiada por los diferentes sgRNAs (1, 3, 6 ó 13) sobre el exón 1 de HVEM muestran porcentajes de reparación de la expresión muy parecidos (**Fig. 47**). Esto parece indicar que la eficacia de acción de los sgRNAs elegidos sobre HVEM es similar.

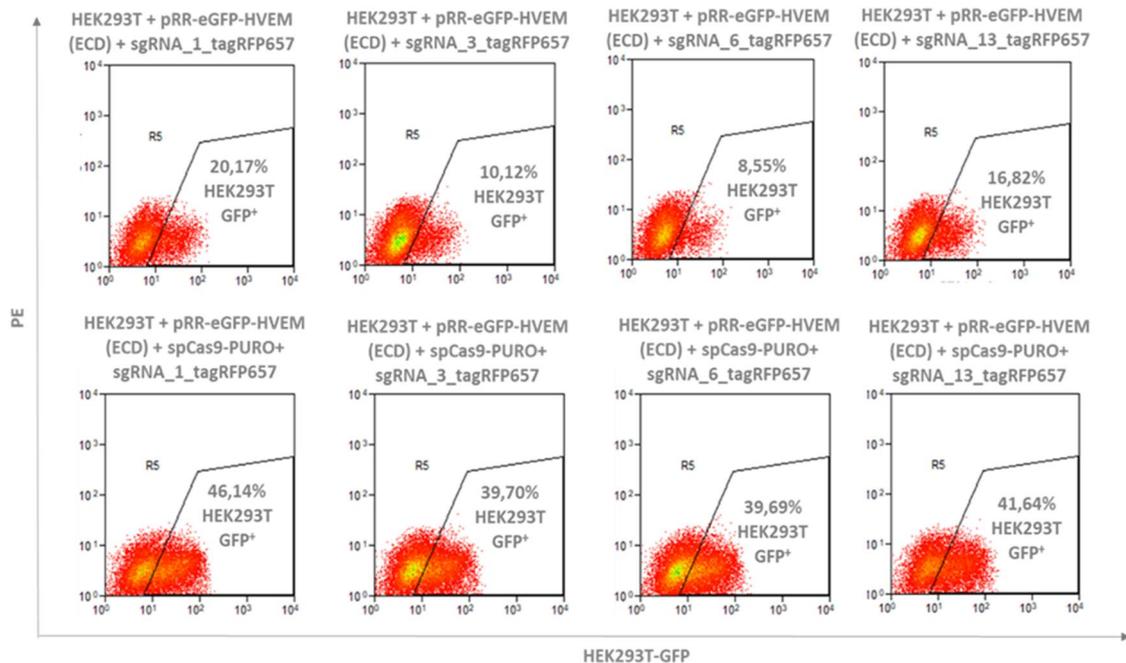


Figura 47. Análisis por citometría de flujo de la expresión de fluorescencia verde eGFP por las células HEK 293T transfectadas con las diferentes combinaciones de vectores de expresión del sistema pRR-eGFP. La combinación del vector de expresión pRR-eGFP-HVEM (ECD) junto con los diferentes sgRNAs (sin incluir el vector spCas9-PURO) dio lugar a diferentes porcentajes de tinción GFP basal: 20,17% para el sgRNA_1; 10,12% para el sgRNA_3; 8,55% para el sgRNA_6; y 16,82% para el sgRNA_13. Las células HEK 293T transfectadas con el conjunto pRR-eGFP-HVEM (ECD), spCas9-PURO y cada uno de los vectores de expresión sgRNA-clonado-tagRFP657 (1, 3, 6 y 13) presentaban los siguientes porcentajes de reparación homóloga de la expresión de la proteína eGFP: 46,14% para el sgRNA_1; 39,70% para el sgRNA_3; 39,69% para el sgRNA_6; y 41,64% para el sgRNA_13.

4.5. Selección de la guía sgRNA_1 por presentar menor probabilidad de *off-targeting*

Los resultados de la eficacia de acción de los sgRNAs analizados mediante el ensayo T7 endonucleasa y sistema pRR-eGFP (apartados 4.3.2 y 4.4, respectivamente), mostraban valores muy similares entre los diferentes sgRNAs diseñados (1, 3, 6 ó 13) y entre los dos métodos de estudio (**tabla 21**). Elegimos el sgRNA_1 porque es el que presentaba menor probabilidad de *off-targeting*, es decir, menor probabilidad de que la

guía sgRNA estableciera complementariedad con otras secuencias no deseadas dentro del genoma (**tabla 21**). La probabilidad de *off-targeting* de cada sgRNA resulta del cálculo con un algoritmo matemático empleado por el programa informático de diseño de sgRNA del MIT (Hsu et al. 2013). El cálculo se basa en la diferencia de la actividad *on-target*, es decir la probabilidad de que el sgRNA se una por complementariedad a la secuencia diana específica del genoma y se establece como el 100%, menos la suma ponderada de las puntuaciones obtenidas de la actividad *off-target* para ese sgRNA (Hsu et al. 2013). Lo que resumimos en la siguiente fórmula: $\text{probabilidad } off\text{-targeting } (\%) = 100\% - (\sum \% \text{ actividad } off\text{-target de cada sgRNA})$. Por lo que, cuanto más alto sea el porcentaje de probabilidad de *off-targeting* para un sgRNA determinado, más alta será la probabilidad de que el corte mediado por la Cas9 guiada por dicho sgRNA sea *on-target* (corte específico), reduciendo la actividad *off-target* (corte inespecífico) (**tabla 21**) (Hsu et al. 2013).

Tabla 21. Tabla comparativa de los porcentajes de eficacia de corte del gen que codifica para HVEM obtenidos por distintos procedimientos, y probabilidad de *off-targeting* de los sgRNAs. Porcentajes de corte de los sgRNAs (1, 3, 6 ó 13) analizados mediante el ensayo T7 endonucleasa y el sistema pRR-eGFP. El sgRNA_1 presentaba la menor probabilidad de *off-targeting* (obtenida con el programa informático de diseño de sgRNA del MIT), es decir, la probabilidad más alta (85%) de que el corte sea *on-target*. $\text{Probabilidad } off\text{-targeting } (\%) = 100\% - (\sum \% \text{ actividad } off\text{-target de cada sgRNA})$.

sgRNA	T7 endonucleasa	Sistema pRR-eGFP	Probabilidad <i>off-targeting</i>
sgRNA_1	26,80%	25,97%	85%
sgRNA_3	26,66%	29,58%	81%
sgRNA_6	26,44%	28,14%	69%
sgRNA_13	25,20%	24,82%	55%

4.6. Transducción estable del gen Cas9 en la línea celular A20 GFP⁺

Se partió de la línea celular A20 GFP⁺ (clon 2D9) (apartado 4.2) para generar la línea que expresase de manera estable la endonucleasa Cas9, línea A20 GFP⁺ Cas9⁺ (clon 1D5) (**Fig. 48**). Para ello, se infectó mediante *espinoculación* la línea celular A20 GFP⁺ (clon 2D9) con partículas lentivirales que codifican para la nucleasa Cas9 y para el *cassette* de resistencia a puomicina. Tras la transducción, se seleccionaron con puomicina durante 15 días las células que habían sido infectadas. Después de la selección, se clonaron las células y se analizaron los clones por PCR para la amplificación

de Cas9. Finalmente, se seleccionó el clon 1D5 que presentaba integrada en su genoma la nucleasa Cas9 (Fig. 48).

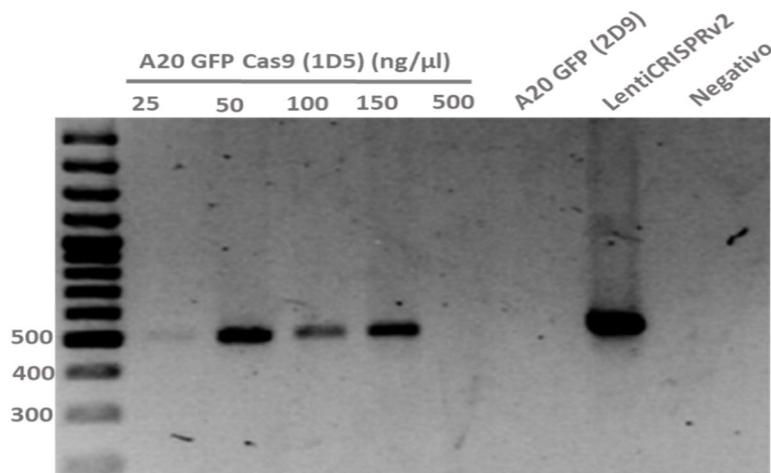


Figura 48. Análisis por PCR de la amplificación de la nucleasa Cas9 en la línea celular A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5). A20 GFP⁺ (2D9) como control negativo y el vector lentiCRISPRv2 como control positivo de la amplificación de Cas9.

4.7. Generación de una línea celular A20 GFP⁺ deficiente en HVEM

4.7.1. Pérdida de la expresión de HVEM en la línea A20 GFP⁺ tras la electroporación con un plásmido codificante para la endonucleasa Cas9 y la guía sgRNA₁ para HVEM murino

4.7.1.1. Dos tipos de mutaciones en forma de deleción determinan la pérdida completa del exón 1 de HVEM

El análisis mediante PCR y posterior secuenciación del DNA genómico de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} revelaron la aparición de dos tipos de mutaciones en forma de deleción de HVEM, una de 100 pares de bases y otra de 300 pares de bases (Figs. 49, 50 y 51). Ambas formas mutadas de HVEM, se caracterizaron por la desaparición del exón 1 completo (diana del sistema CRISPR-Cas9) (Figs. 49, 50 y 51). La **forma truncada de HVEM de 100 pares de bases** se caracterizaba por presentar parte de la secuencia del 5'UTR (35 pb de las 156 pb totales) y parte de la secuencia del intrón 1-2 (66 pb de las 731 pb totales), y por la pérdida completa del exón 1 (Figs. 49 y 51). La **forma truncada de HVEM de 300 pares de bases** presentaba 242 pb de las 731 pb totales del intrón 1-2, habiendo perdido por completo el 5'UTR y exón 1 (Figs. 50 y 51).

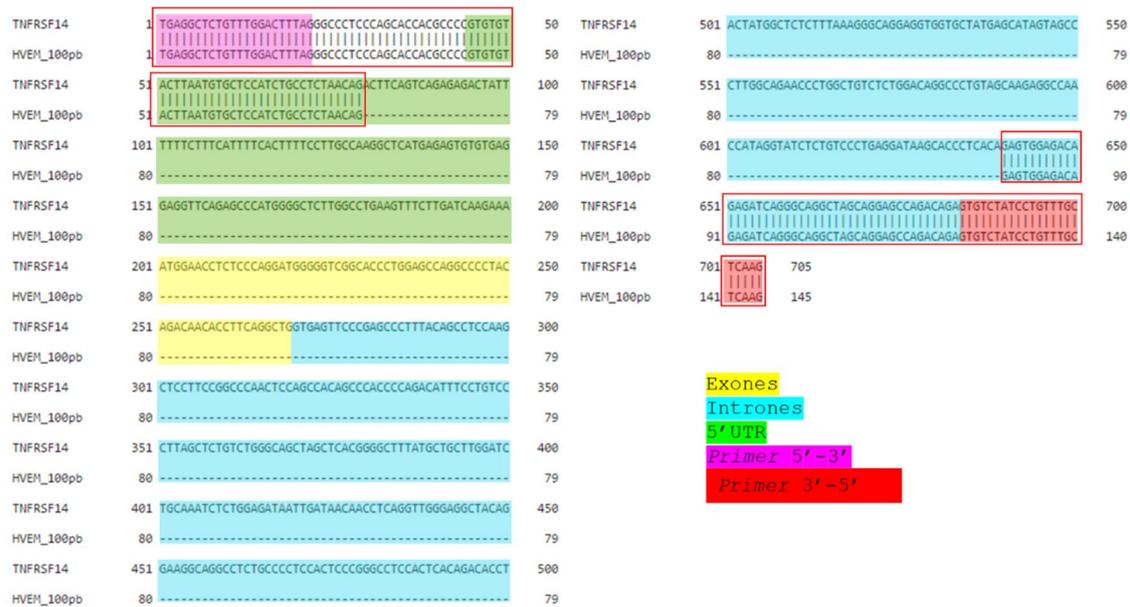


Figura 49. Comparación de la secuencia HVEM (TNFRSF14) (cepa Balb/c (NM_019418)) con la forma truncada de 100 pb. La forma mutada de HVEM de 100 pb había perdido el exón 1 completo (amarillo), y presentaba parte del 5'UTR (verde, recuadrado en rojo) y parte de la secuencia del intrón 1-2 (azul, recuadrado en rojo). Las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar y secuenciar la molécula HVEM se muestran en rosa (5'-3') y en rojo (3'-5').

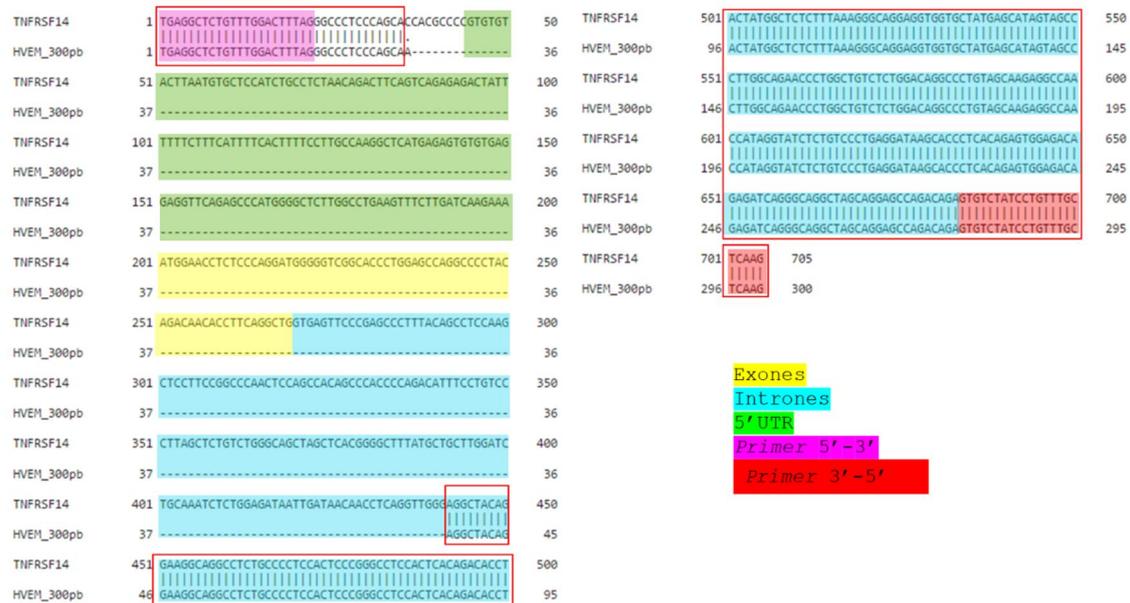


Figura 50. Comparación de la secuencia HVEM (TNFRSF14) (cepa Balb/c (NM_019418)) con la forma truncada de 300 pb. La forma mutada de HVEM de 300 pb había perdido el exón 1 completo (amarillo) y el 5'UTR (verde); pero, presentaba parte de la secuencia del intrón 1-2 (azul, recuadrado en rojo). Las secuencias de los *primers* utilizados para amplificar y secuenciar la molécula HVEM se muestran en rosa (5'-3') y en rojo (3'-5').

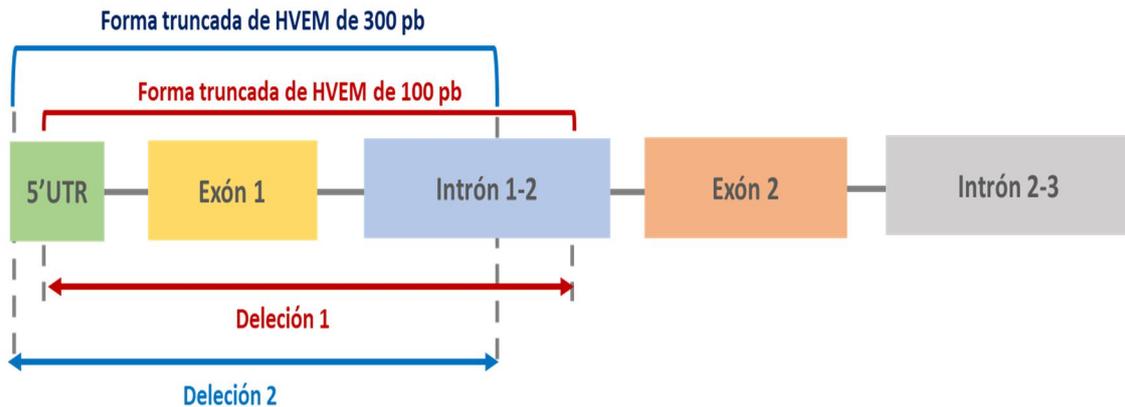


Figura 51. Esquema representativo de la disposición de los dos tipos de deleciones sobre el genoma de HVEM. La forma truncada de HVEM de 100 pb (delimitada por las flechas rojas), se caracteriza por la deleción completa del exón 1 (amarillo), por la deleción de parte del 5'UTR (verde) y parte del intrón 1-2 (azul), dando lugar a una secuencia truncada de HVEM de un tamaño aproximado de 100pb. La forma truncada de HVEM de 300 pb (delimitada por las flechas azules), se caracteriza por la pérdida completa del exón 1 (amarillo) y del 5'UTR (verde), y por la pérdida de parte del intrón 1-2 (azul), dando lugar a una secuencia truncada de HVEM de un tamaño de alrededor de 300 pb.

4.7.1.2. Las células A20 GFP electroporadas con el sistema CRISPR-Cas9 y el sgRNA_1 (clones 1F1 y 4D10), presentan la forma truncada de 100 pb de HVEM y no presentan la nucleasa Cas9 integrada en su genoma

La amplificación por PCR del HVEM a partir del DNA genómico extraído de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, clones 1F1 y 4D10, obtenidas mediante electroporación con la construcción recombinante lentiCRISPRv2-sgRNA_1 (apartado 4.3.1), reveló que presentaban la forma mutada de HVEM de 100 pb (**Fig. 52**). Además, la reacción de amplificación por PCR del gen que codifica para la nucleasa Cas9 a partir del DNA genómico de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (clones 1F1 y 4D10) mostró que no habían integrado en su genoma la nucleasa Cas9 (**Fig. 52**). Antes del proceso de clonación, la población heterogénea de las células A20 GFP⁺ electroporadas con el vector de expresión lentiCRISPRv2-sgRNA_1 estaba formada por células que tenían la secuencia de HVEM *wild-type*, células que presentaban la forma mutada de HVEM de 300 pb, y células que presentaban la forma mutada de 100 pb (**Fig. 52**).

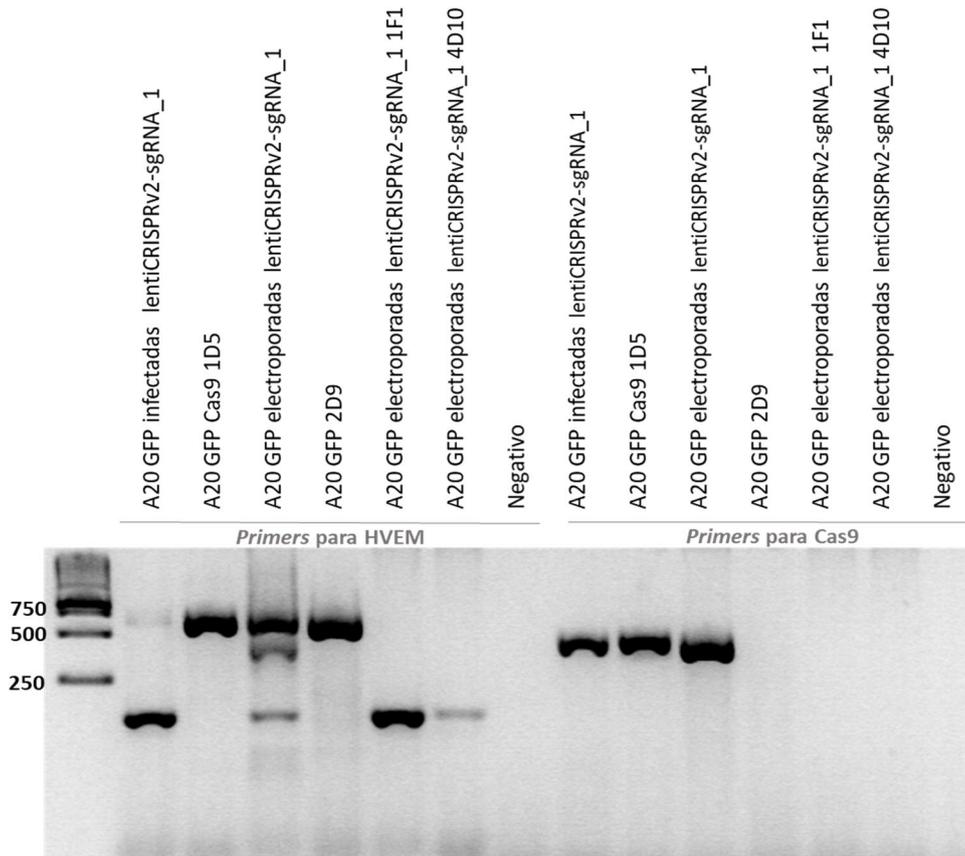


Figura 52. Análisis por PCR de la amplificación de HVEM y la presencia de la nucleasa Cas9 integrada. Las células A20 GFP infectadas con partículas lentivirales que codifican para lentiCRISPRv2-sgRNA_1 presentaban ambas formas truncadas de HVEM (100 y 300 pb), y también la nucleasa Cas9. Antes del proceso de clonación, las células A20 GFP electroporadas con el vector recombinante lentiCRISPRv2-sgRNA_1 tenían la forma *wild-type*, y las dos formas mutadas de HVEM y presentaban células con la nucleasa Cas9 integrada en su genoma. Tras la clonación, las células A20 GFP electroporadas con el vector lentiCRISPRv2-sgRNA_1 (clones 1F1 y 4D10) presentaban la forma mutada de HVEM de 100 pb y no tenían la nucleasa Cas9 integrada. Como controles positivos de la amplificación de HVEM se utilizaron las células A20 GFP Cas9 (1D5) y A20 GFP (2D9). Como controles positivos de la integración de Cas9 fueron usadas las células A20 GFP infectadas con los lentivirus que codifican para lentiCRISPRv2-sgRNA_1 y la línea A20 GFP Cas9 (1D5).

4.7.1.3. La delección completa del exón 1 de HVEM por el sistema CRISPR-Cas9-sgRNA_1 tiene como resultado la pérdida de la expresión del péptido señal

Al comparar la secuencia de aminoácidos de los dos tipos de mutaciones por delección de la molécula HVEM (100 y 300 pb) (apartado 4.7.1.1) resultantes de la acción del sistema CRISPR-Cas9 y el sgRNA_1 con la secuencia del HVEM *wild-type*, se observó que la pérdida del exón 1 en ambas formas truncadas de HVEM conlleva que el ORF (*open reading frame*) o marco abierto de lectura comenzara en la metionina (M) situada en la posición 56 (**Fig. 53**), y no se expresara el péptido señal (que está formado

por la secuencia de aminoácidos del 1 al 38 y está codificado por el exón 1 y parte del exón 2); y además, se perdiera la expresión de una parte codificante del inicio del extremo extracelular (Figs. 39 y 53).

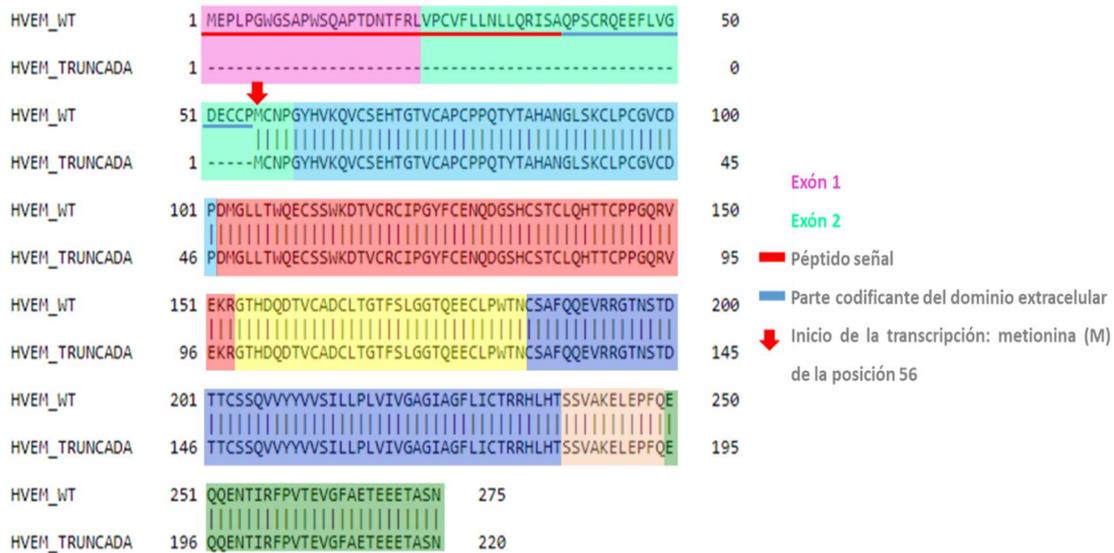


Figura 53. Comparación de la secuencia de proteína de HVEM WT (*wild-type*) y truncada. Los 8 exones de la molécula HVEM están delimitados por colores. El exón 1 (rosa) fue eliminado por acción del sistema CRISPR-Cas9 y del sgRNA_1. El péptido señal de la proteína HVEM está formado por el aminoácido 1 al 38 (subrayado en rojo) y está codificado por el exón 1 (rosa) y parte del exón 2 (verde claro). El ORF de la proteína HVEM mutada pasó a situarse en la metionina (M) de la posición 56 (señalada con una flecha roja y que se corresponde con el final del exón 2 (verde claro)) en comparación con lo que ocurría con la proteína HVEM WT, cuyo ORF comenzaba en la metionina (M) de la posición 1 (correspondiente al inicio del exón 1). Subrayado en azul se indica la parte codificante del extremo extracelular, cuya expresión se pierde en la forma truncada de HVEM.

4.7.1.4. La delección de la secuencia codificante para el péptido señal de HVEM por la acción del sistema CRISPR-Cas9-sgRNA_1 impide la expresión en membrana de la proteína en las células tumorales A20 GFP⁺

Para comprobar si la eliminación del exón 1 de la molécula HVEM por acción del sistema de edición CRISPR-Cas9 y el sgRNA_1 en las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (clones 1F1 y 4D10) fue capaz de impedir la expresión en membrana de la proteína, las células fueron teñidas con el anticuerpo α -HVEM-Biotina (clon 6C9), que fue revelado con SA-PE. Como control positivo de la expresión de HVEM en membrana, se utilizaron las células A20 GFP⁺ (clon 2D9) (Fig. 54). Los resultados del análisis por citometría de flujo demuestran que la pérdida del exón 1, que desplazaba el inicio de transcripción a la metionina (M) situada en la posición 56 impidiendo la expresión del péptido señal

(codificado por los aminoácidos del 1 al 38) (**Fig. 53**) en las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (clones 1F1 y 4D10), conlleva la pérdida de expresión en membrana de la proteína HVEM (**Fig. 54**). Ambos clones, 1F1 y 4D10, presentaban patrones de expresión para HVEM semejantes, por lo que elegimos para los posteriores estudios la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} clon 1F1 porque mostraba un mejor crecimiento en cultivo.

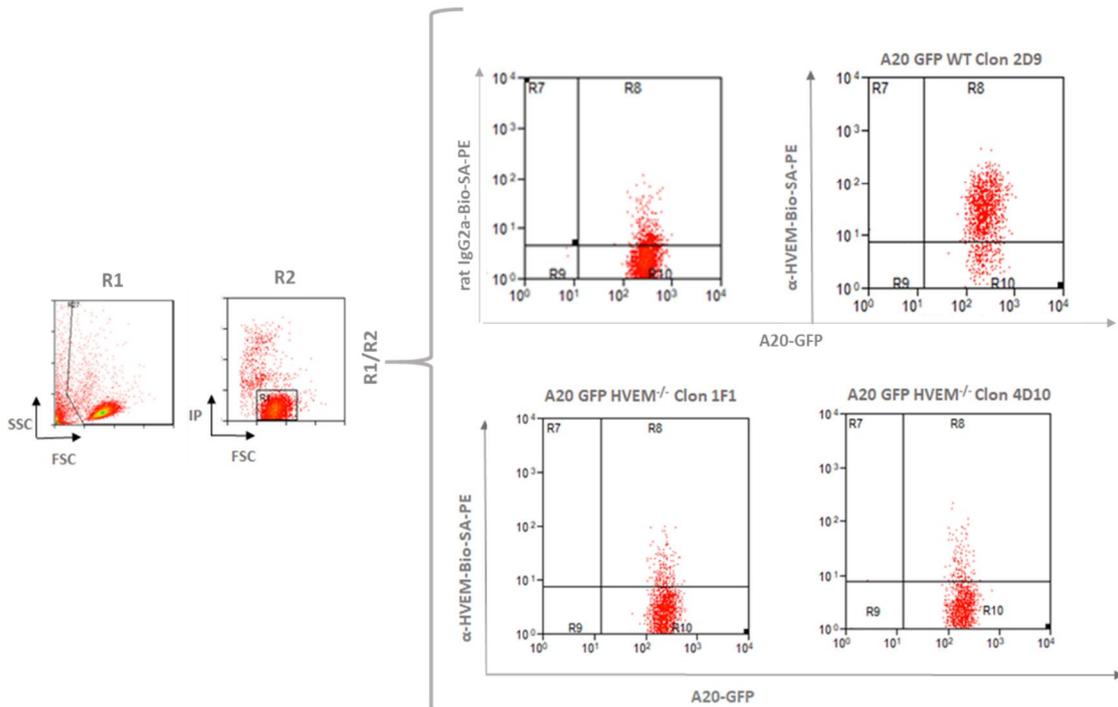


Figura 54. Análisis por citometría de flujo de la expresión de HVEM por las células A20 GFP⁺ WT y por las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, clones 1F1 y 4D10. La expresión de HVEM por las células A20 GFP WT (2D9) tuvo una intensidad de fluorescencia entre 10¹-10². Las células A20 GFP HVEM^{-/-} (clon 1F1 y 4D10) no expresaban HVEM si lo comparamos con las células A20 GFP WT, sino que presentaban un patrón de expresión para HVEM similar al isotipo control. α-HVEM-Bio-SA-PE: anticuerpo anti-HVEM marcado con biotina y revelado con estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). Como control negativo de la tinción, se utilizó el isotipo rata IgG2a-biotinilado y revelado con SA-PE. FSC: *forward scatter*, SSC: *side scatter*, IP: yoduro de propidio. R1: ventana de la población inicial, R2: ventana de la población de células vivas a partir de población R1 y R1/R2: combinación de las ventanas R1 y R2.

4.8. Las secuencias con mayor probabilidad de *off-targeting* por acción del sgRNA_1 no han sido modificadas por el sistema CRISPR-Cas9

Se analizaron los cinco primeros genes con mayor probabilidad de ser modificados por la acción de la nucleasa Cas9 y el sgRNA_1; es decir, aquellos genes que presentaban los valores más altos de *off-targeting* (**tabla 13, material y métodos**). La probabilidad de *off-targeting* depende de la localización de el/los nucleótido/s no complementarios en las secuencias *off-target* con respecto a la región PAM (Ran et al.

2013) (Hsu et al. 2014) (**Fig. 55**). El fenómeno *off-targeting* es más improbable cuanto más próximos estén situados los nucleótidos no complementarios a la secuencia PAM; es decir, la nucleasa Cas9 cortará peor los nucleótidos no complementarios situados más próximos al extremo 3', donde se encuentra la región PAM (Ran et al. 2013) (**Fig. 55**).



Figura 55. Comparación de la secuencia diana sgRNA_1 *on-target* del exón 1 de HVEM con las cinco primeras secuencias con probabilidades de *off-targeting* más altas. Las secuencias *off-target* aparecen en orden descendente de probabilidad de *off-targeting*, la cual está determinada por la proximidad de las pares de bases no complementarias (señaladas en rojo) a la región PAM (señalada en verde). Las pares de bases no complementarias que se encuentran en la zona próxima a la región PAM (8-10 pares de bases *upstream* de la secuencia PAM) reducen la actividad *off-target* de la nucleasa Cas9.

Para el estudio de la actividad *off-targeting*, se secuenció el DNA genómico extraído de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, clon 1F1, para cada uno de los genes seleccionados demostrando que no habían sido modificados de manera inespecífica por el sistema CRISPR-Cas9 y el sgRNA_1 (**Fig. 56**).

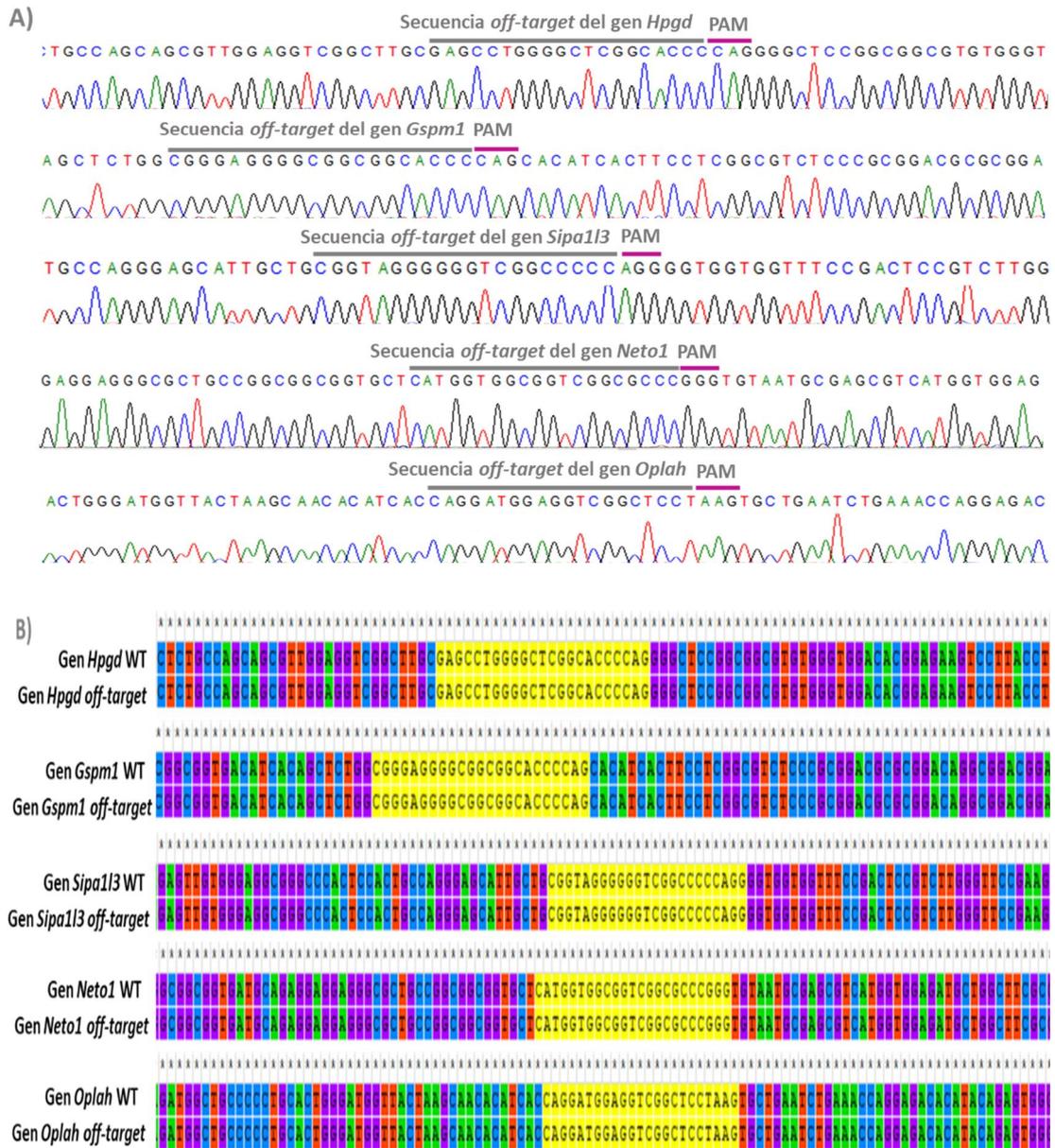


Figura 56. Resultado de la secuenciación de los diferentes genes *off-target* seleccionados. (A) Resultado de la secuenciación de los genes *off-target* *Hpgd* (NM_008278), *Gspm1* (NM_153410), *Sipa113* (NM_001081028), *Neto1* (NM_144946) y *Oplah* (NM_153122). (B) La comparación de las diferentes secuencias *off-target* obtenidas con la secuencia correspondiente del gen *wild type* (WT) (ambas señaladas en amarillo) reveló que no habían sido modificados por la acción del sistema CRISPR-Cas9 y la guía sgRNA_1. El programa utilizado para el alineamiento de las secuencias fue el MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, versión 6).

Los genes estudiados tienen diversas funciones: el gen *Hpgd* (NM_008278) presentaba la probabilidad de *off-targeting* más alta (0.8) y codifica para la enzima deshidrogenasa hidroxiprostaglandina en humanos y se encarga de la regulación de los niveles de prostaglandinas (UniprotKB-P15428). El gen *Gspm1* (NM_153410) codifica para el modulador 1 de la señalización de la proteína G en ratones y se trata de un

inhibidor de la disociación del nucleótido guanina actuando como un receptor activador de la señalización a través de la proteína G (UniprotBK-Q6IR34). El gen *Sipa113* (NM_001081028) codifica para la proteína 3 asociada a una señal 1 de inducción de la proliferación, y juega un papel crítico en la morfogénesis de las células epiteliales, la polaridad, la adhesión y la organización del citoesqueleto (UniprotKB-G3X9J0). El gen *Neto1* (NM_144946) codifica para la proteína neuropilina y tolloide de tipo 1 en humanos, que están involucradas en el desarrollo y/o mantenimiento del circuito neuronal. Los genes *Gpsm1*, *Sipa113*, y *Neto1* presentaban el mismo valor de *off-target* (0.4) (**tabla 13, material y métodos**). Por último, el gen *Oplah* (NM_153122) codifica para la 5-oxoprolinasa que se caracteriza por su capacidad para hidrolizar ATP, y tenía un valor de *off-target* de 0.3 (**tabla 13, material y métodos**). Los genes *Hpgd*, *Gpsm1*, y *Neto1* se tratan de secuencias intrónicas, mientras que los genes *Sipa113* y *Oplah* son secuencias exónicas (**tabla 13, material y métodos**).

4.9. Patrón de expresión de moléculas de superficie con función reguladora negativa de las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9 (1D5) y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1)

Se realizó un estudio comparativo por citometría de flujo de la expresión de diferentes moléculas que actúan como moduladores negativos de la respuesta inmunitaria en las cuatro líneas celulares A20: A20 *wild-type* (WT), A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5), y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1). De las moléculas estudiadas, que pertenecen a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF) (**tabla 22**), las cuatro líneas A20 analizadas mostraban niveles de expresión altos para el ligando PD-L1 del receptor co-inhibidor (PD-1) de las células T, y para BTLA que actúa como regulador negativo de la activación de las células T (**Fig. 57**). Los niveles de expresión de PD-L1 para cada una de las líneas celulares fueron similares, en cambio en cuanto a la expresión de BTLA, las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1) presentaban niveles de expresión más bajos, semi-cuantificados a partir de la intensidad media de fluorescencia (MFI), de 45,58; frente al resto de líneas celulares (A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9) y A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5)) que mostraban valores de MFI mayores entre 72,54-77,50 (**Fig. 57**). Por otro lado, no expresaban el ligando PD-L2 que comparte receptor PD-1 con el PD-L1; tampoco expresaban el marcador B7x, que inhibe la proliferación de las células T, ni tampoco CD160 que se trata de un receptor co-inhibidor de la vía de señalización HVEM/CD160

en las células T activadas y que actúa como co-estimulador en las células NK (**tabla 22**). Otros marcadores de la IgSF ausentes en estas células fueron LAG-3 (se expresa en células T y células NK activadas, y en células T CD4⁺ reguladoras) y CD83 (se expresa en células dendríticas maduras) (**tabla 22**).

Tabla 22. Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF). Moléculas moduladoras negativas de la respuesta inmunitaria de la IgSF estudiadas y sus funciones.

SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS (Ig SF)		
Molécula	Expresión	Función en la respuesta inmunitaria
PD-L2 (CD273, B7-DC)	No	Ligando 2 de muerte celular programada que se une al receptor PD-1 inhibiendo la activación de las células T. También se ha visto que puede actuar activando a las células T al unirse a un receptor alternativo, promoviendo la inmunidad anti-tumoral
PD-L1 (CD274, B7-H1)	Sí	Ligando del receptor PD-1 y CD80. Regulador negativo de la respuesta inmunitaria
PD-1 (CD279)	No	Receptor negativo de los ligandos PD-L1 y PD-L2. Está involucrado en la tolerancia periférica
B7x (B7-H4)	No	Inhibe la proliferación de las células T, la secreción de citoquinas, y el desarrollo de la citotoxicidad
BTLA (CD272)	Sí	Regulador negativo de la activación de las células T
CD160 (BY55, NK28)	No	Regulador negativo de las células T y co-estimulador de las células NK
LAG-3 (CD223)	No	Se expresa en células T y NK activadas; y en las células T CD4 ⁺ reguladoras. CD223 se une a moléculas MHC de clase II, al igual que CD4 pero con mayor afinidad, promoviendo las respuestas inmunitarias. En asociación con el complejo CD3, CD223 actúa como modulador negativo inhibiendo la señalización mediada a través del TCR regulando de manera homeostática la expansión de las células T
CD83	No	Se piensa que puede tener un papel en la presentación antigénica y/o activación linfocitaria, pero su función concreta es desconocida. Se expresa en células B y T activadas, siendo un marcador útil de células dendríticas (DCs) maduras

De la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF), las líneas A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), y A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5) expresaban HVEM (en niveles intermedios-bajos); y se confirmó que la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1) no expresaba en membrana la proteína HVEM (**Fig. 57**). Las cuatro líneas celulares no expresaban las moléculas de la vía de apoptosis Fas/Fas-L, ni tampoco el receptor LTβR, ambos de la familia del TNFRSF/TNFSF (**tabla 23**).

Tabla 23. Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF). Moléculas moduladoras de la respuesta inmunitaria de la familia del TNFRSF estudiadas y sus funciones.

SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNFRSF)		
Molécula	Expresión	Función en la respuesta inmunitaria
HVEM (TNFRSF14, CD270)	Sí	Modulador de la respuesta inmunitaria. Forma parte de la vía LIGHT/BTLA/CD160
Fas (CD95) /Fas-L (CD187, TNFSF6)	No	Interacción ligando (FasL)-receptor con dominio de muerte (Fas). Media apoptosis
LTβR (TNFRSF3)	No	Receptor de la LTβ (citoquina citotóxica secretada por las células T CD4 ⁺)

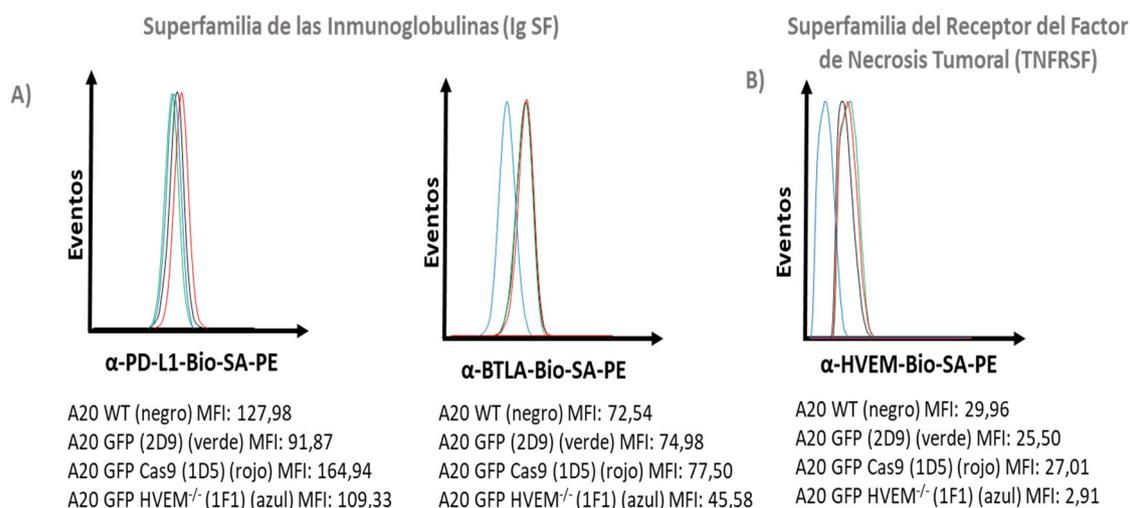


Figura 57. Histogramas de la expresión de PD-L1, BTLA y HVEM en las células A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5), y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1). (A) **Moléculas de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF).** Las diferentes líneas celulares analizadas presentaban niveles de expresión de PD-L1 similares. La expresión de BTLA en la línea celular A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1) fue menor si la comparamos con las otras tres líneas celulares. (B) **Molécula de la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF).** Las líneas A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), y A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5) expresaban la proteína HVEM con intensidades de fluorescencia (MFI) entre 25,50 y 29,96. Mientras que, para la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1) no se detectó la expresión en membrana de la proteína HVEM (MFI: 2,91).

4.10. Patrón de expresión de moléculas de superficie (receptores, moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión) con diversas funciones en las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9 (1D5) y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1)

Se estudió por citometría de flujo la expresión de diferentes moléculas con diversas funciones (receptores, moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión) en las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5), y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1) (**tablas 24, 25 y 26**). De las moléculas analizadas de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF), las cuatro líneas celulares expresaban el ligando co-estimulador de las células T, ICOS-L; y el co-receptor de células B, CD19 (**tabla 24**) (**Fig. 58**). Sin embargo, no expresaban las inmunoglobulinas de superficie IgM e IgD, ni el miembro del co-receptor de células B CD21/35, moléculas características de células B maduras (**tabla 24**) (**Fig. 58**). Tampoco expresaban otras moléculas de la IgSF que juegan un papel importante como moduladores positivos de la respuesta inmunitaria y/o en procesos inflamatorios como CD80, CD23, CD122 (IL-2R β), CD132 (IL-2R γ), CD121 (IL-1R) y CD119 (IFN- γ R α) (**tabla 24**).

Tabla 24. Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF). Moléculas estudiadas de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF) y sus funciones.

SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS (Ig SF)		
Molécula	Expresión	Función en la respuesta inmunitaria
CD80 (B7-1)	No	La unión de CD28 expresado por las células T con CD80 y CD86 (B7-2) expresado en células presentadoras de antígeno (APCs) conduce a la co-estimulación de las células T
ICOS-L (CD275, B7-H2)	Sí	Molécula co-estimuladora inducida en células T activadas. La interacción de ICOS-L con su receptor ICOS juega un importante papel en la co-estimulación de las células T
CD19	Sí	CD19 se asocia con CD21 y CD81 para formar un co-receptor de las células B. La unión del ligando con el co-receptor CD19/CD21/CD81 incrementa las respuestas a antígeno alrededor de 100 veces
CD23	No	Receptor de baja afinidad para IgE. Ligando para el co-receptor de células B CD19/CD21/CD81. Se expresa en células B maduras
CD21/35 (CR2/CR1)	No	CD21/CD35 forma parte del complejo del receptor de antígeno de las células B junto con CD19 y CD81, y está involucrado en la transducción de señales
CD122 (IL-2R β)	No	Cadena β del IL-2R (receptor que une IL-2 estimulando la proliferación clonal de células T)
CD132 (γ_c)	No	Dominio γ del IL-2R (receptor que une IL-2 estimulando la proliferación clonal de células T)
CD121 (IL-1R)	No	Receptor IL-1R1 media inflamación
CD119 (IFN- γ R α)	No	Forma parte junto con la cadena β (IFN- γ R β) del receptor para el IFN- γ
IgD	No	Inmunoglobulina de superficie de las células B maduras
IgM	No	Es la primera inmunoglobulina en aparecer en las células B y la primera en ser secretada. Se co-expresa junto con la IgD en las células B maduras.

De la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF), se analizó la expresión del marcador CD40, importante como receptor co-estimulador de la activación de células B y células dendríticas a través de CD40L expresado transitoriamente tras la activación temprana de las células T (**tabla 25**). Fueron observadas diferencias de expresión para CD40 entre las diferentes líneas estudiadas, siendo los niveles de expresión más altos en la línea A20 GFP⁺ Cas9⁺ (MFI: 24,48), mientras que el resto de las líneas analizadas (A20 WT, A20 GFP⁺ y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}) mostraban niveles de expresión más bajos (MFI: 13,14-6,70) (**Fig. 58**). Por otro lado, las diferentes líneas celulares A20 estudiadas se caracterizaban por los altos niveles de expresión de MHC de clase II (**Fig. 58**).

Tabla 25. Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF). Molécula estudiada de la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF) y su función.

SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNFRSF)		
Molécula	Expresión	Función en la respuesta inmunitaria
CD40 (gp39)	Sí	Regula la maduración y el desarrollo de las células B, participa en el cambio de clase del isotipo de las Igs. En combinación con otras señales, como IL-4, protege a las células B de la apoptosis mediada por Ig y promueve la proliferación. La interacción de CD40 con su ligando CD154 (expresado en las células T activadas) es importante en la co-estimulación de las células B y la expansión clonal y diferenciación a células plasmáticas

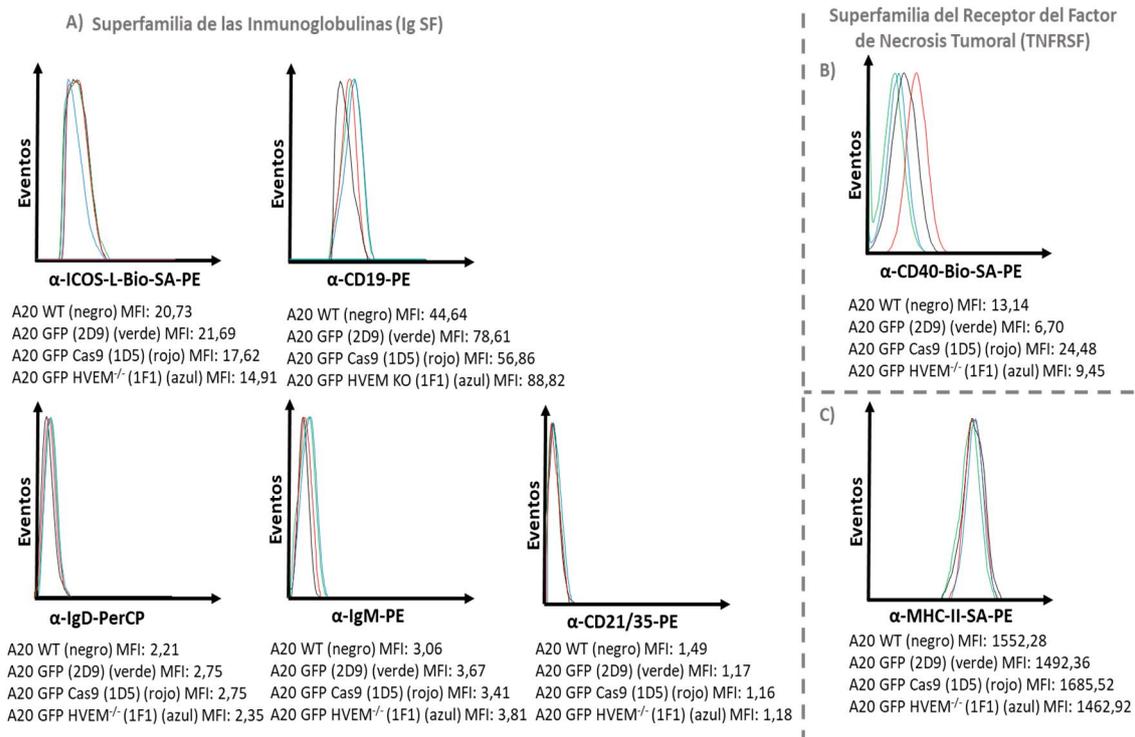


Figura 58. Histogramas de la expresión de ICOS-L, CD19, IgD, IgM, CD21/35, CD40 y MHC de clase II en las células A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5), y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1). (A) **Moléculas de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF).** Las cuatro líneas celulares analizadas expresaban ICOS-L en niveles similares. Las cuatro líneas celulares expresaban el marcador típico de células B, CD19. Sin embargo, no expresaban IgD, IgM y CD21. (B) **Molécula de la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF).** Las cuatro líneas celulares expresaban el receptor co-estimulador CD40, pero la línea A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5) presentaba niveles de expresión más altos. (C) Las cuatro líneas celulares mostraron altos niveles de expresión de la molécula MHC de clase II (valores de MFI entre 1462,92 y 1685,52).

Por último, se estudió también la expresión de moléculas como CD11a y CD18 (participan en la adhesión al endotelio), CCR9 (receptor de quimiocinas con tropismo por CCL25, quimiocina del epitelio intestinal) y CCR7 (receptor de quimiocinas que se

expresa en las células B activadas), CD49d-VLA-1 (cadena α de la integrina $\alpha_4\beta_1$) y CD44 (glicoproteína), que participan en el reclutamiento de células del sistema inmunitario (células T, macrófagos y neutrófilos) en los sitios de infección (**tabla 26**). Las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5), y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1) expresaban la molécula CD11a que participa facilitando la adhesión de las células a la pared del vaso (endotelio); pero no expresaban el resto de moléculas estudiadas CD18, CCR9, CCR7, CD49d-VLA-1 y CD44 (**tabla 26**) (**Fig. 59**).

Tabla 26. Estudio de la expresión de las moléculas CCR7, CCR9, CD11a, CD18, CD49d-VLA-1 y CD44, y su función en la respuesta inmunitaria.

Molécula	Expresión	Función en la respuesta inmunitaria
CCR7	No	Receptor de quimiocinas expresado en las células T, y en niveles más bajos en las células B activadas. Participa en la migración de los linfocitos a las zonas T de los órganos linfoides secundarios
CCR9 (CD199)	No	La interacción de CCR9 con su ligando CCL25 puede dirigir el tráfico de células T en desarrollo en el timo y la generación de células T de memoria específicas del intestino
CD11a (cadena LFA-1α y subunidad α_1)	Sí	Se asocia con la integrina β_2 (CD18) para formar LFA-1. Juega un papel central en las interacciones célula-célula en leucocitos y es importante en la co-estimulación linfocitaria
CD18 (integrina β_2)	No	Se asocia con CD11a para formar la integrina LFA-1
CD49d-VLA-1 (cadena α de la integrina $\alpha_4\beta_1$)	No	Se asocia con la cadena β para formar la integrina $\alpha_4\beta_1$, también denominada VLA-4
CD44	No	Glicoproteína que participa en los procesos de adhesión de los leucocitos

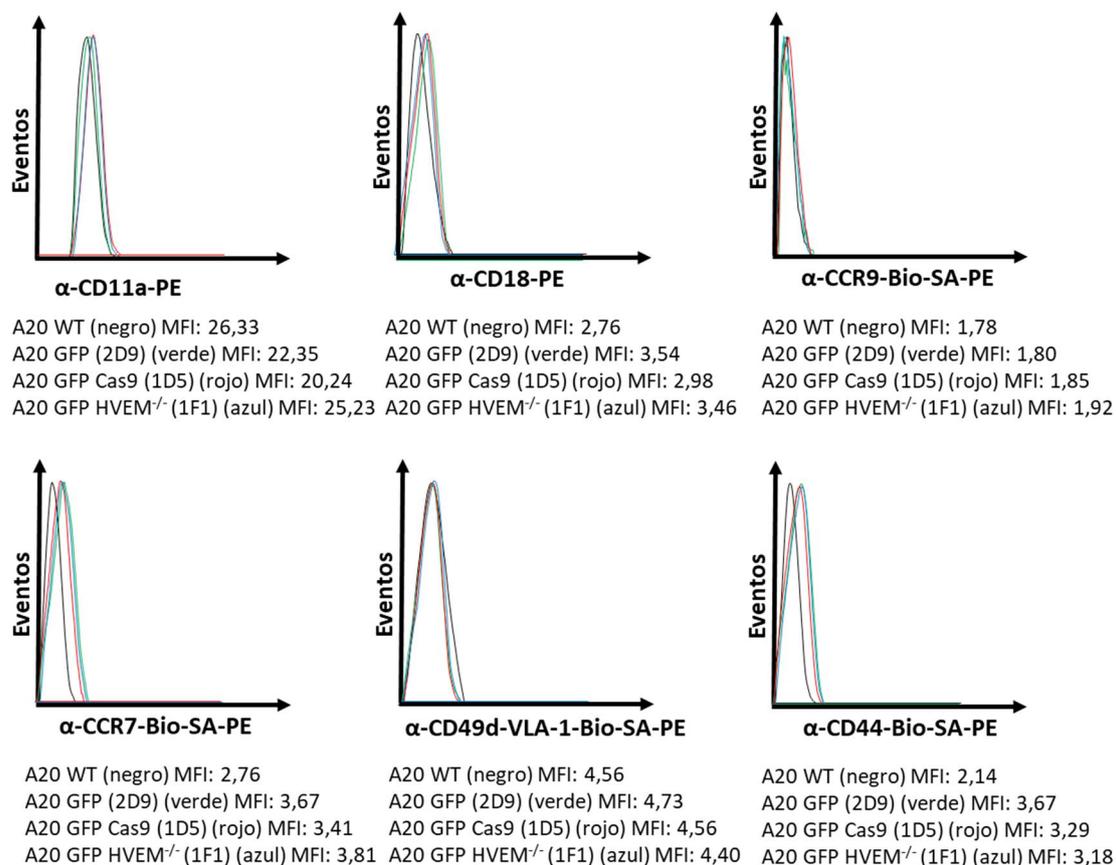


Figura 59. Expresión de CD11a, CD18, CCR9, CCR7, CD49d-VLA-1 y CD44 por las células A20 WT, A20 GFP⁺ (2D9), A20 GFP⁺ Cas9⁺ (1D5) Y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (1F1). Las cuatro líneas celulares estudiadas presentaban niveles de expresión de CD11a similares. Pero, no expresaban las moléculas CD18, CCR9, CCR7, CD49d-VLA-1 y CD44.

4.11. La línea tumoral A20 GFP⁺ deficiente para la expresión de HVEM presenta la misma tasa de duplicación en cultivo que la línea A20 GFP⁺ WT

Se calculó la tasa de duplicación *in vitro* de las líneas celulares A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} con el objetivo de determinar si la pérdida de expresión de HVEM afectaba a la replicación en cultivo de la línea tumoral. Para ello, se realizaron recuentos del número de células A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} a los tiempos de incubación de 24 y 48 horas, observando que no hay diferencias significativas (aplicando el estudio estadístico *unpaired Student's t test* con un *p value* < 0,05) entre los recuentos para ambos tipos celulares (**Tabla 27**). Finalmente, con los datos del recuento del número de células a los distintos tiempos y aplicando la fórmula de la tasa de duplicación (apartado 3.6), se determinó que las líneas celulares A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} mostraban la

misma tasa de duplicación *in vitro* de 1 día (**Tabla 27**). Por lo tanto, podemos afirmar que la pérdida de expresión de HVEM en las células A20 GFP⁺ no afecta a su tasa replicación *in vitro* al compararla con la línea A20 GFP⁺ WT.

Tabla 27. Cálculo de la tasa de duplicación de las líneas celulares A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}. La tasa de duplicación de las dos líneas celulares A20 fue calculada con la fórmula del apartado 3.6, para lo que se utilizaron los valores X_b : número de células inicialmente y la media de los valores X_e (\bar{X}_e): recuento del número de células a tiempo de incubación (T) determinado. La desviación estándar (SD) de cada valor (\bar{X}_e) fue calculada para determinar el grado de significación estadístico empleando el método *unpaired Student's t test*, considerando un *p value* menor de 0,05 como estadísticamente significativo (Kim 2015).

Tipo celular	X_b	$\bar{X}_e \pm SD$ (T)	Tasa de duplicación
A20 GFP ⁺ WT	2,5 x 10 ⁴	4,8533 x 10 ⁴ ± 4,6372 x 10 ³ (T= 1 día)	1,04
		7,5583 x 10 ⁴ ± 9,2680 x 10 ³ (T= 2 días)	1,25
A20 GFP ⁺ HVEM ^{-/-}	2,5 x 10 ⁴	4,7917 x 10 ⁴ ± 9,5478 x 10 ³ (T= 1 día)	1,07
		7,3667 x 10 ⁴ ± 1,6479 x 10 ⁴ (T= 2 días)	1,28

4.12. Estudio en un modelo de linfoma B murino de la progresión tumoral de la línea A20 GFP⁺ HVEM deficiente en comparación con la línea A20 GFP⁺ WT

4.12.1. Cinética de implantación del tumor A20 GFP⁺ WT y HVEM deficiente en los órganos linfoides primarios y secundarios

A día 15 post-implantación del tumor, se inició el seguimiento de la progresión y diseminación tumoral en la sangre, previo al sacrificio de los animales a días 22, 28 y 34 post-inoculación de las líneas tumorales, analizando la presencia de las células A20 GFP⁺ WT y células A20 GFP⁺ HVEM deficientes mediante citometría de flujo en la sangre de los ratones Balb/c. Se observó que no había presencia de ambos tipos celulares a etapas tempranas del desarrollo tumoral.

4.12.1.1. La pérdida de expresión de HVEM en las células tumorales A20 GFP⁺ no provoca cambios en el patrón metastásico del linfoma en el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea

La colonización por parte del linfoma A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} del bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea fue detectable solo a partir del día 28 post-

implantación del tumor, cuando los nódulos tumorales del hígado estuvieron lo suficientemente desarrollados para su extracción.

En cuanto a la eficacia de colonización del bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea por la línea A20 GFP⁺ deficiente para la expresión de HVEM no se detectaron diferencias significativas en comparación con las células A20 GFP⁺ WT, lo que indica que la pérdida de expresión de HVEM por parte del linfoma no provoca cambios significativos en la diseminación y la formación de metástasis del tumor en estos órganos linfoides (Fig. 60).

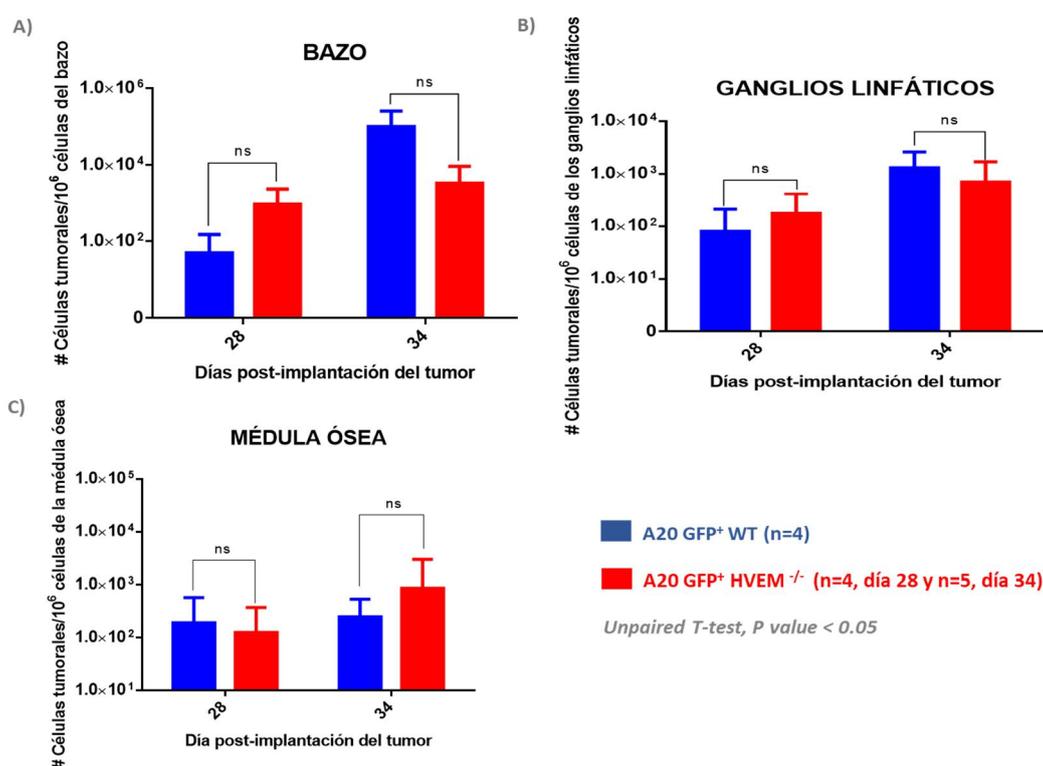


Figura 60. Representación de la cinética de infiltración de las líneas tumorales A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} en el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Representación del número absoluto (#) de células tumorales por 1 x 10⁶ células del órgano linfático correspondiente. Los resultados se expresan como media±SD (desviación estándar). No fueron observadas diferencias significativas (ns) (estudio estadístico *unpaired T-test*, *p value* < 0,05) entre las células tumorales A20 GFP⁺ WT (azul, n=4 (días 28 y 34)) y las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (rojo, n=4 (día 28) y n=5 (día 34)) infiltrantes en el bazo (A), los ganglios linfáticos (B) y la médula ósea (C) a días 28 y 34 post-implantación del tumor.

4.12.1.2. La colonización tumoral del timo en los estadios más avanzados de la progresión del tumor promueve un incremento en el número de células B endógenas

La colonización del timo por parte de las células tumorales A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} fue observada solo en las etapas más avanzadas de la progresión del

linfoma, a día 34 post-implantación del tumor (**Fig. 61**), a diferencia de lo que ocurre en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea en los que la infiltración de las células tumorales fue detectada antes, alrededor del día 28 post-implantación del tumor. Además, en el timo tampoco fueron observadas diferencias significativas en cuanto a la eficacia de colonización entre las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} y la línea A20 GFP⁺ WT (**Fig. 61**).

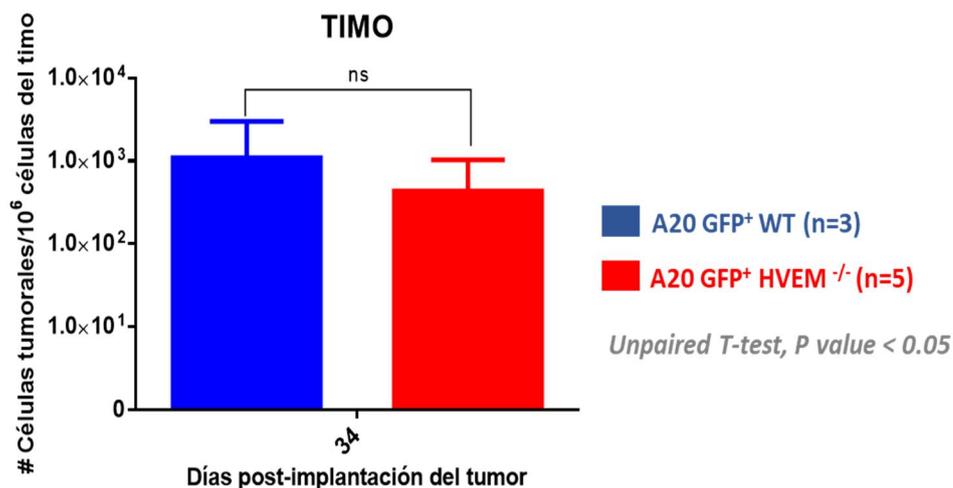


Figura 61. Representación de la cinética de colonización del timo por parte del tumor a día 34 post-implantación del tumor. Representación del número absoluto (#) de células tumorales por 1×10^6 células del timo. Los resultados se expresan como media \pm SD. No fueron observadas diferencias significativas (ns) (estudio estadístico *unpaired T-test*, p value < 0,05) entre las células tumorales A20 GFP⁺ WT (azul, n=3) y las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (rojo, n=5) infiltrantes en el timo a día 34 post-implantación del tumor.

En condiciones homeostáticas el porcentaje normal de células B en el timo fue menor del 0,5% (**Fig. 62**), por lo que nos llamó especialmente la atención el aumento en el número de células B observado tanto en los ratones inoculados con la línea A20 GFP⁺ WT como los ratones inoculados con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (**Fig. 62**). A día 28 post-implantación del tumor, antes de que el tumor A20 GFP⁺ pudiera ser detectado en el timo, el número de células B había comenzado a aumentar de manera inusual (**Fig. 62**). Sin embargo, fue finalmente en los estadios más avanzados del desarrollo del linfoma en los que el tumor A20 GFP⁺ coloniza el timo (día 34), cuando se alcanzaron los porcentajes de células B más altos (**Fig. 62**). Estos datos sugieren una correlación directa entre la colonización tumoral ectópica del timo y la diseminación sistémica del tumor.

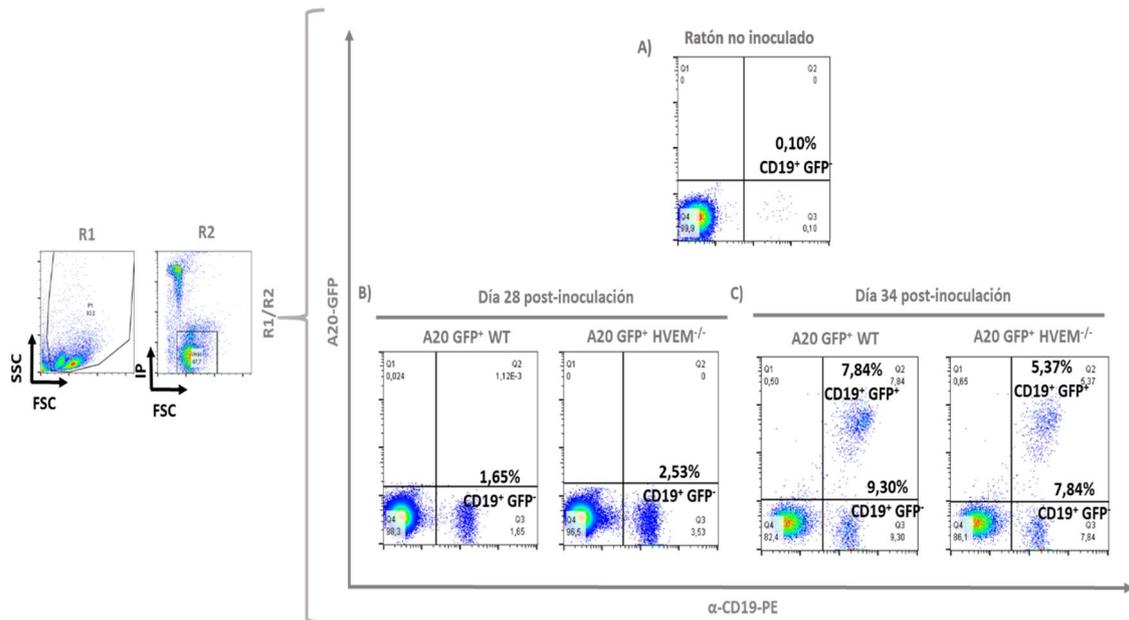


Figura 62. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células B y de células tumorales A20 GFP⁺ en el timo. (A) En el timo de un ratón control, no inoculado con la línea tumoral A20, la población de células B (CD19⁺ GFP⁻) fue del 0,1%. (B) A día 28 post-inoculación de las líneas tumorales A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, en el timo se observó un aumento del número de células B con respecto a la población de células B del timo del ratón control. (C) A día 34 post-inoculación, cuando los tumores A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} son detectables en el timo, aparecieron los porcentajes más altos de células B. R1: ventana en la población inicial y R2: ventana en la población de células vivas.

4.12.2. Cinética de expresión de BTLA y HVEM por las células T CD8⁺, T CD4⁺, y células B presentes en los órganos linfoides primarios y secundarios y en los nódulos tumorales del hígado

Las medias de la expresión de HVEM y BTLA en los días 22, 28 y 34 post-implantación del tumor por las células T CD8⁺, T CD4⁺ y células B (CD19⁺ GFP⁻) presentes en el timo, el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y los nódulos tumorales del hígado de los ratones inoculados con las células A20 GFP⁺ WT y los ratones inoculados con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} no presentaban diferencias significativas entre ambos grupos experimentales de estudio (Figs. 63 y 64).

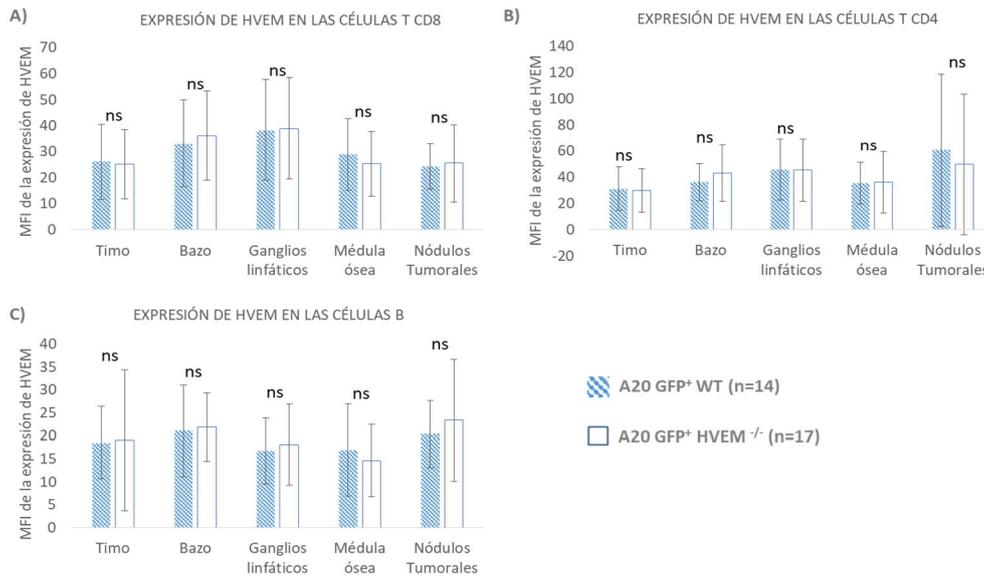


Figura 63. Representación de la media de expresión de HVEM por las células T CD8⁺, T CD4⁺ y células B presentes en los diferentes órganos linfoides y en los nódulos tumorales del hígado durante los días 22, 28 y 34 post-implantación del tumor. No fueron observadas diferencias significativas (ns) (estudio estadístico *unpaired T-test*, *p value* < 0,05) en la expresión de HVEM en las células T CD8⁺ (A), T CD4⁺ (B) y células B (B) en los diferentes compartimentos entre los ratones inoculados con la línea A20 GFP⁺ WT (n= 14) (líneas azules) y los ratones inoculados con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n= 17) (blanco). Los resultados se muestran como media±SD. MFI: intensidad media de fluorescencia.

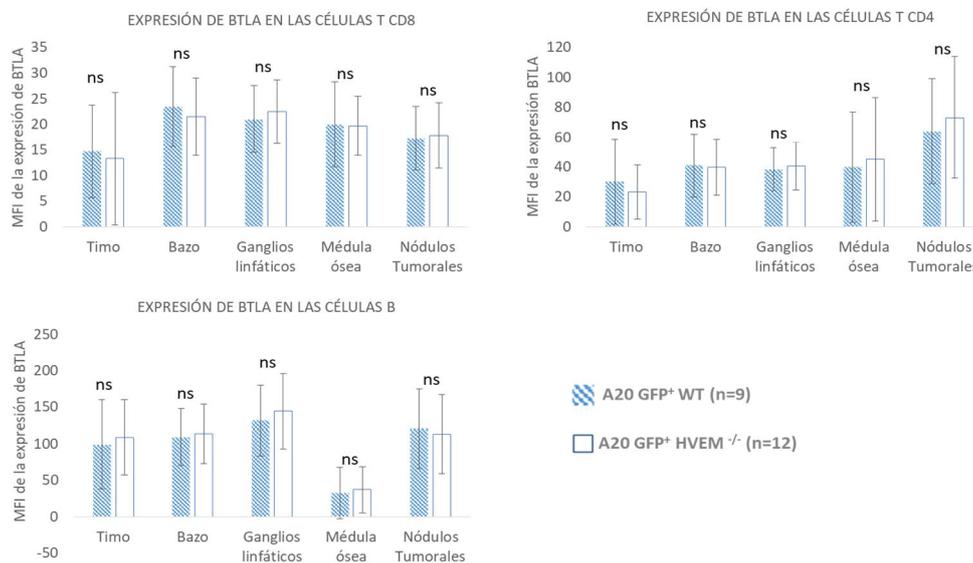


Figura 64. Representación de la media de expresión de BTLA por las células T CD8⁺, T CD4⁺ y células B presentes en los diferentes órganos linfoides y en los nódulos tumorales del hígado durante los días 22, 28 y 34 post-implantación del tumor. No fueron observadas diferencias significativas (ns) (estudio estadístico *unpaired T-test*, *p value* < 0,05) en la expresión de BTLA en las células T CD8⁺ (A), T CD4⁺ (B) y células B (B) en los diferentes compartimentos entre los ratones del grupo control inoculados con la línea A20 GFP⁺ WT (n= 9) (líneas azules) y el grupo problema inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n= 12) (blanco). Los resultados se expresan como media±SD. MFI: intensidad media de fluorescencia.

4.13. La pérdida de expresión de HVEM en el tumor A20 GFP⁺ altera el reclutamiento de las células del sistema inmunitario a los nódulos tumorales del hígado

Se utilizaron los nódulos tumorales del hígado para el estudio del grado de infiltración de las células del sistema inmunitario en el tumor (**Fig. 65**), y determinar si la pérdida de expresión de HVEM por parte de las células de linfoma B A20 GFP⁺ afectaba al reclutamiento de los leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs) con respecto a la línea A20 GFP⁺ WT control.

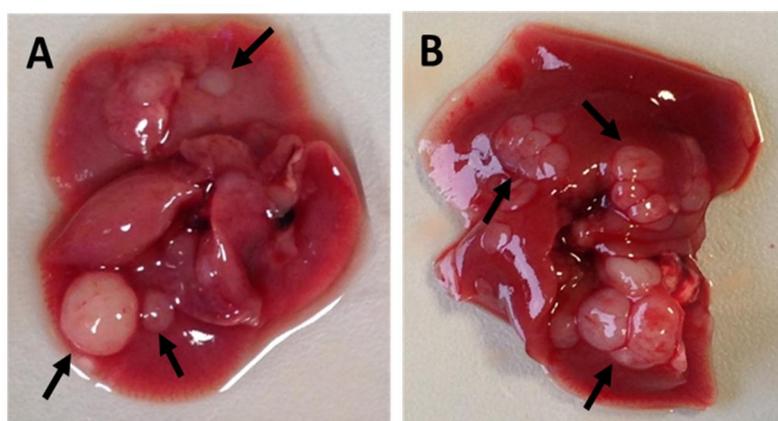


Figura 65. Nódulos tumorales en el hígado formados por la línea tumoral A20 GFP⁺. Las flechas negras señalan los nódulos tumorales del hígado formados a días 28 (A) y 34 (B) post-implantación del tumor.

A día 28 post-implantación del tumor, al descartar el valor atípico (mediante el método de Grubb, $\alpha = 0.05$) en el grupo de ratones inoculados con la línea tumoral A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, se observó un número significativamente menor de leucocitos infiltrantes (TILs) en los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, en comparación con los formados por la línea A20 GFP⁺ WT (**Fig. 66**). Además, los nódulos tumorales hepáticos mostraban una mayor proporción de células tumorales A20 GFP⁺ deficientes en la expresión de HVEM en comparación con los nódulos tumorales hepáticos formados por la línea A20 GFP⁺ WT (**Fig. 66**). Sin embargo, solo disponemos de $n = 4$ ratones/grupo inoculado con la línea A20 GFP⁺ WT y $n = 3$ ratones/grupo inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (**Fig. 66**). Por lo que, sería conveniente aumentar el número de ratones por grupo para poder concluir estas diferencias preliminares entre ambos grupos experimentales de estudio.

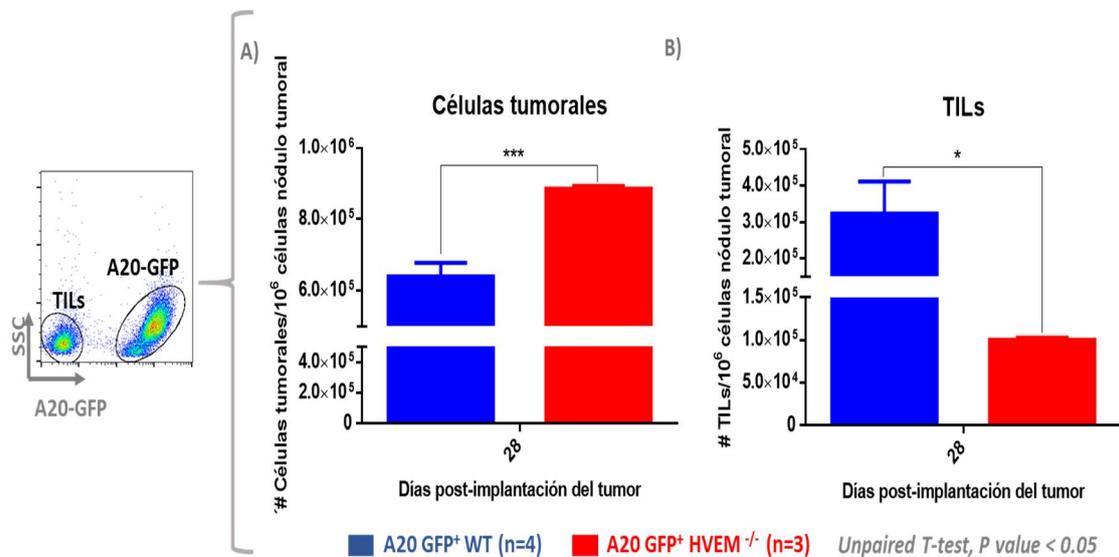


Figura 66. A día 28 post-implantación del tumor, los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} mostraron un menor número absoluto de TILs. Representación del número absoluto (#) de células tumorales (A) y de leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs) (B) por 1 × 10⁶ células de los nódulos tumorales del hígado a día 28 post-implantación del tumor tras la eliminación del valor atípico (método de Grubb, $\alpha = 0.05$) del grupo de ratones inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}. Azul: grupo control inoculado con la línea A20 GFP⁺ WT (n=4) y rojo: grupo problema inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n=3). Las diferencias estadísticas resultantes de un *unpaired Student's t test* se indican como: extremadamente significativo (***) (p value = 0.0001-0.001) y significativo (*) (p value = 0.01-0.05). Los resultados se muestran como media±SD.

Al estudiar las poblaciones de las que estaban compuestas los TILs (**Fig. 67**) de los nódulos tumorales del hígado formados a día 28 post-implantación del tumor en estos dos grupos de estudio, se observó que existía un número significativamente mayor de células T CD8⁺ y T CD4⁺, células B, células NK y células mieloides CD11b⁺ que fueron reclutados por la línea A20 GFP⁺ WT en comparación con línea tumoral deficiente para la expresión de HVEM (**Fig. 68**). Estos datos sugieren la idea de que la pérdida de expresión de HVEM en el tumor A20 GFP⁺ condiciona el reclutamiento de células del sistema inmune.

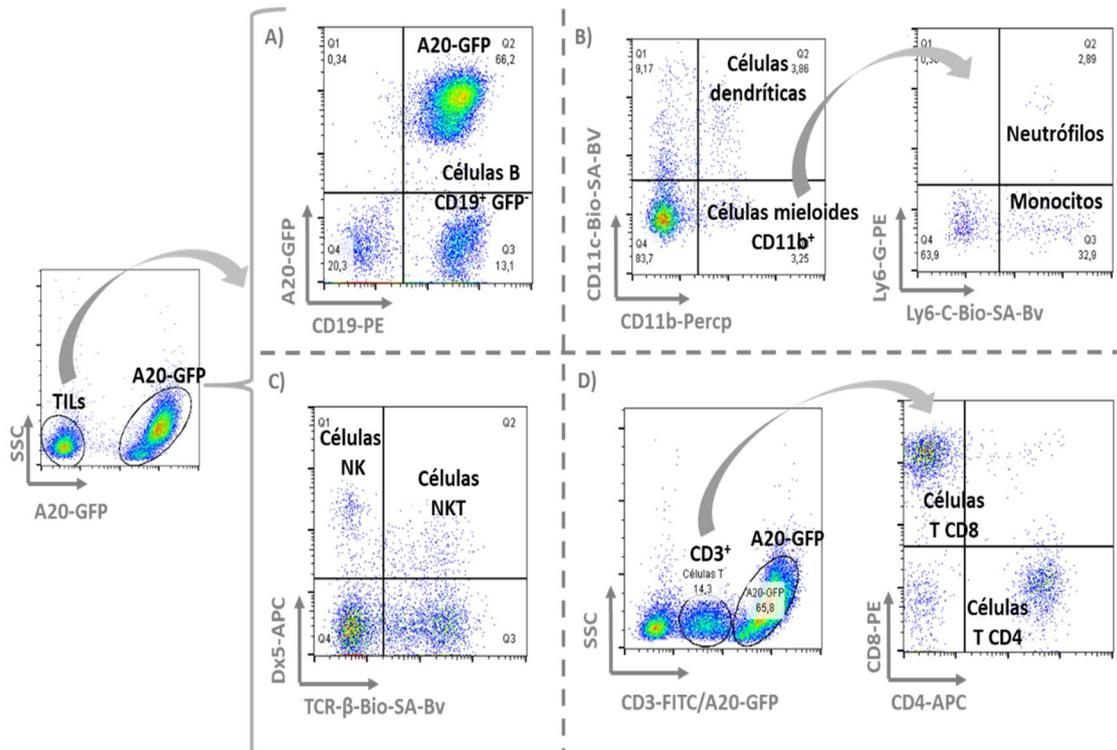


Figura 67. Poblaciones estudiadas de los leucocitos infiltrantes (TILs) en los nódulos tumorales del hígado. (A) Población de células B ($CD19^+ GFP^+$) y células de tumor A20 GFP^+ . (B) Las células dendríticas ($CD11b^+ CD11c^+$) y las células mieloides ($CD11b^+ CD11c^-$) fueron representados a partir de la población de TILs. A partir de la población de células mieloides que expresaban el marcador $CD11b$ obtuvimos las poblaciones de neutrófilos ($CD11b^+ Ly6-G^+ Ly6-C^+$) y de monocitos ($CD11b^+ Ly6-G^- Ly6-C^+$). (C) Las células NK ($DX5^+ TCR-\beta^-$) y las células NKT ($DX5^+ TCR-\beta^+$) fueron obtenidas a partir de los TILs. (D) A partir de las células T $CD3^+$, se representaron las células T $CD8^+$ y T $CD4^+$.

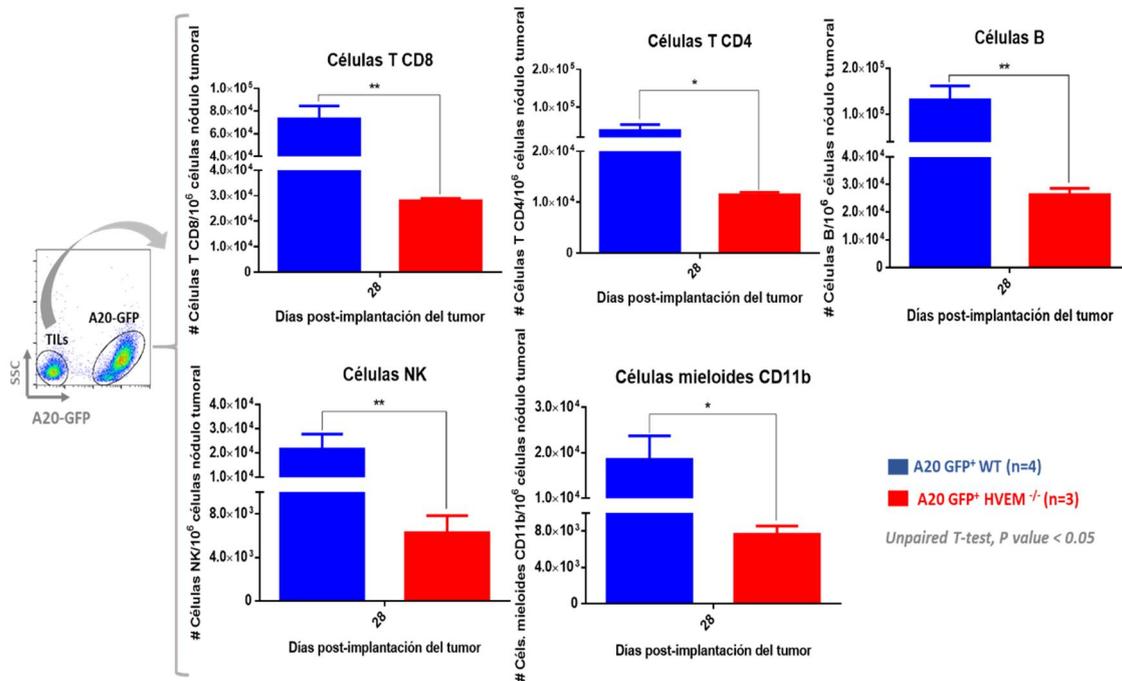


Figura 68. Representación de las células T CD8⁺ y T CD4⁺, células B, células NK y células mieloides CD11b⁺ infiltrantes en los nódulos tumorales del hígado a día 28 post-implantación del tumor. Azul: grupo control inoculado con la línea A20 GFP⁺ WT (n=4). Rojo: grupo problema inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n=3). (#) Número absoluto de células referido por 1 x 10⁶ células de los nódulos tumorales del hígado. Los resultados se expresan como media±SD. Las diferencias estadísticas resultantes de un *unpaired Student's t test* se indican como: muy significativo (**) (*p value* = 0.001-0.01) y significativo (*) (*p value* = 0.01-0.05).

En la última fase de estudio de la progresión de la enfermedad, a día 34 post-implantación del tumor, no fueron observadas diferencias significativas en el reclutamiento de células del sistema inmunitario por parte del linfoma B A20 GFP⁺ deficiente para la expresión de HVEM en comparación con el linfoma B A20 GFP⁺ WT (Fig. 69).

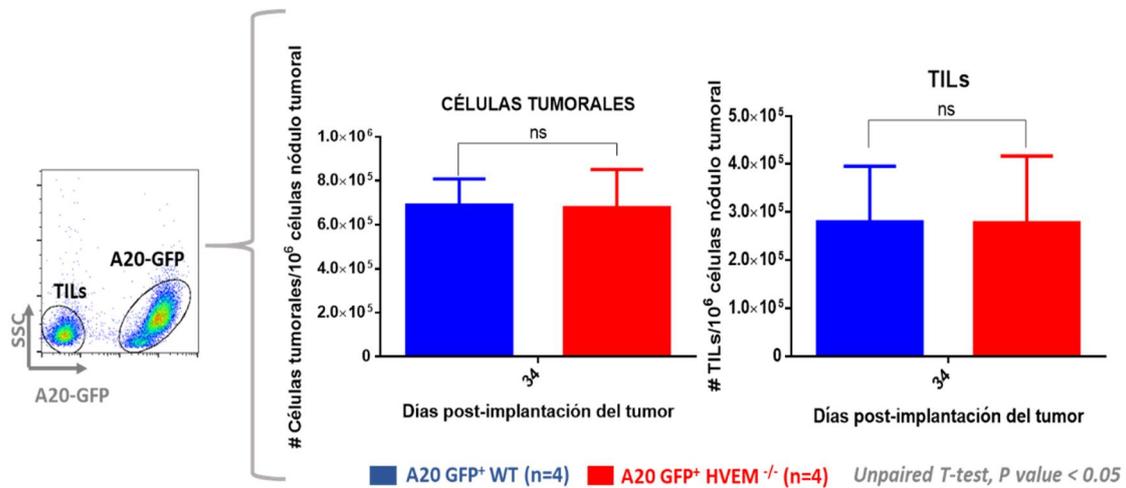


Figura 69. A día 34 post-implantación del tumor, no hay diferencias significativas en el reclutamiento de los leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs) en los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ WT en comparación con los formados por la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}. Las diferencias estadísticas resultantes de un *unpaired Student's t test* se indican como: no significativo (ns) (p value ≥ 0.05). Azul: grupo control inoculado con la línea A20 GFP⁺ WT (n=4) y rojo: grupo problema inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n=4). Los resultados se expresan como media \pm SD. (#) Número absoluto de células referido por 1 x 10⁶ células de los nódulos tumorales del hígado.

Al analizar las poblaciones de células T CD8⁺ y T CD4⁺, células B, células NK y NKT, células mieloides CD11b⁺, células dendríticas, monocitos y neutrófilos que conforman los nódulos tumorales del hígado generados por los tipos celulares A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, se comprobó que en la fase tardía de la progresión del linfoma, a día 34 post-implantación del tumor, la pérdida de expresión de HVEM por las células tumorales A20 GFP⁺ no conducía a un reclutamiento diferente de leucocitos infiltrantes en el tumor del promovido por las células A20 GFP⁺ WT (Figs. 70 y 71).

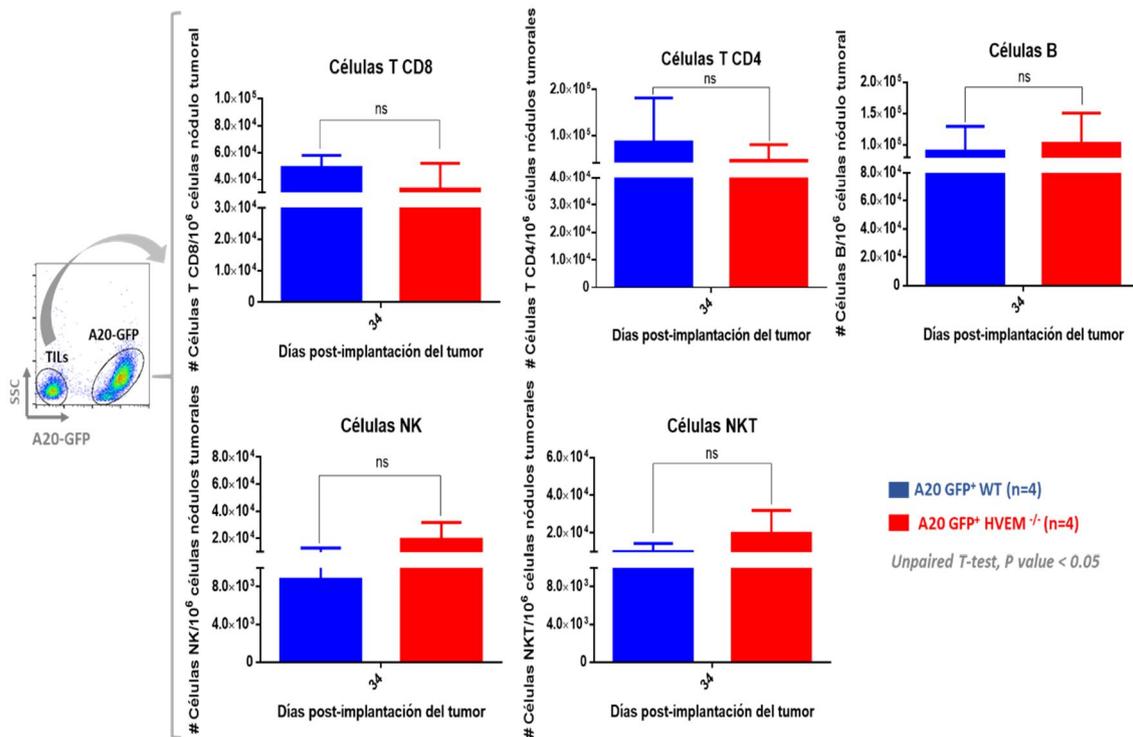


Figura 70. A día 34 post-implantación del tumor, la pérdida de expresión de HVEM por las células A20 GFP⁺ no provoca cambios en el número de células T CD8⁺, T CD4⁺, células B, células NK y NKT presentes en los nódulos tumorales en comparación con la línea A20 GFP⁺ WT. Las diferencias estadísticas resultantes de un *unpaired Student's t test* se indican como: no significativo (ns) ($p \text{ value} \geq 0.05$). Azul: grupo control inoculado con la línea A20 GFP⁺ WT (n=4) y rojo: grupo problema inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n=4). (#) Número absoluto de células referido por 1×10^6 células de los nódulos tumorales del hígado. Los resultados se muestran como media \pm SD.

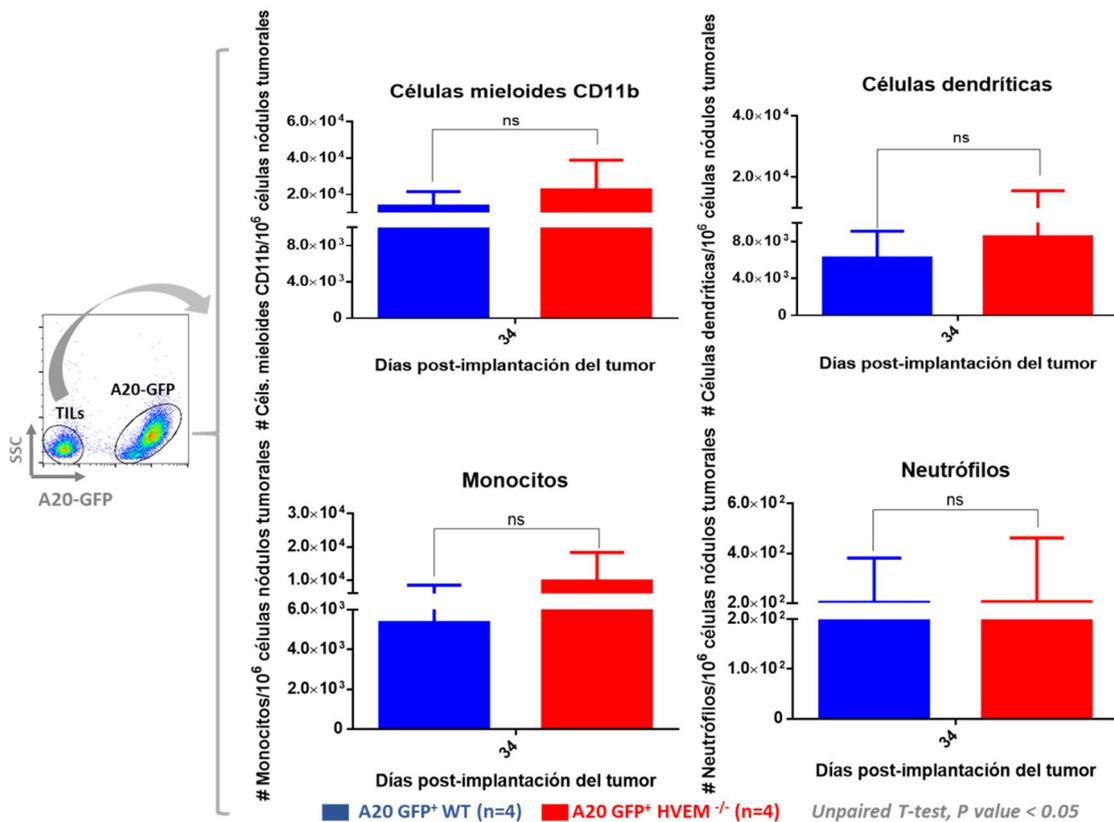


Figura 71. A día 34 post-implantación del tumor, la pérdida de expresión de HVEM por las células A20 GFP⁺ no provoca cambios en el número de células mieloides CD11b⁺, células dendríticas, monocitos y neutrófilos presentes en los nódulos tumorales en comparación con la línea A20 GFP⁺ WT. Las diferencias estadísticas resultantes de un *unpaired Student's t test* se indican como: no significativo (ns) ($p \text{ value} \geq 0.05$). Azul: grupo control inoculado con la línea A20 GFP⁺ WT (n=4) y rojo: grupo problema inoculado con la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (n=4). (#) Número absoluto de células referido por 1 x 10⁶ células de los nódulos tumorales del hígado. Los resultados se muestran como media±SD.

4.14. La distribución de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} en los nódulos tumorales del hígado sigue un patrón nodular, en cambio las células A20 GFP⁺ WT presentan una distribución más difusa

La infiltración de las células A20 GFP⁺ WT en los nódulos tumorales del hígado a día 28 post-implantación del tumor presentaba una distribución más difusa, en comparación con la distribución de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} que mostraba un patrón más nodular (**Fig. 72**).

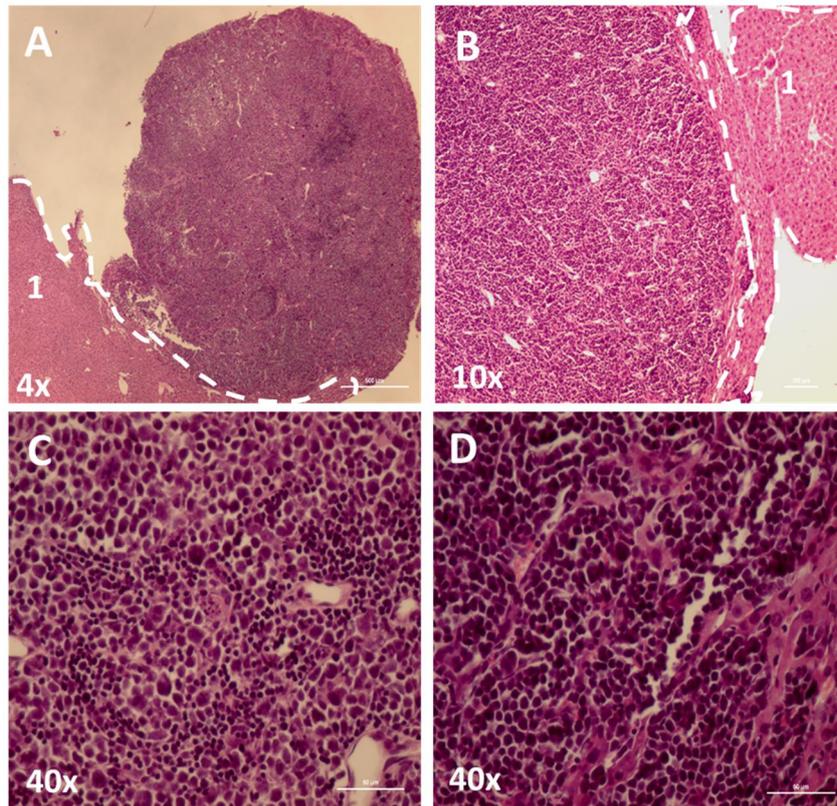


Figura 72. Distribución de las células tumorales A20 GFP⁺ en los nódulos tumorales del hígado. Nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ WT (A) y por la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (B) a día 28 post-implantación del tumor. Patrón de infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ WT (C) y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} (D) en los nódulos tumorales. El tejido hepático está delimitado por una línea punteada blanca.

Los linfocitos normales mostraron una tendencia a posicionarse en torno al tumor A20 GFP⁺ en los nódulos del hígado, en lugar de entremezclarse con las células del tumor (**Figs. 73A y B**). Esto podría tratarse de un mecanismo de escape de la acción del sistema inmunitario por parte de las células del tumor, reduciendo las posibles interacciones entre los leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs) y las células del tumor que conducirían a su eliminación. En cuanto a la morfología de las células tumorales A20 GFP⁺ se distinguieron dos tipos de variantes: (i) variante centroblastica: que se caracteriza por presentar cromatina vesicular y varios nucleolos unidos por membrana, y (ii) variante inmunoblástica: células redondas con un nucleolo central prominente (Gatter & Pezzella 2009) (Xie et al. 2015) (**Fig. 73B**). Dentro de los nódulos tumorales se apreciaron zonas necróticas resultantes del desarrollo tumoral (**Figs. 73C y D**).

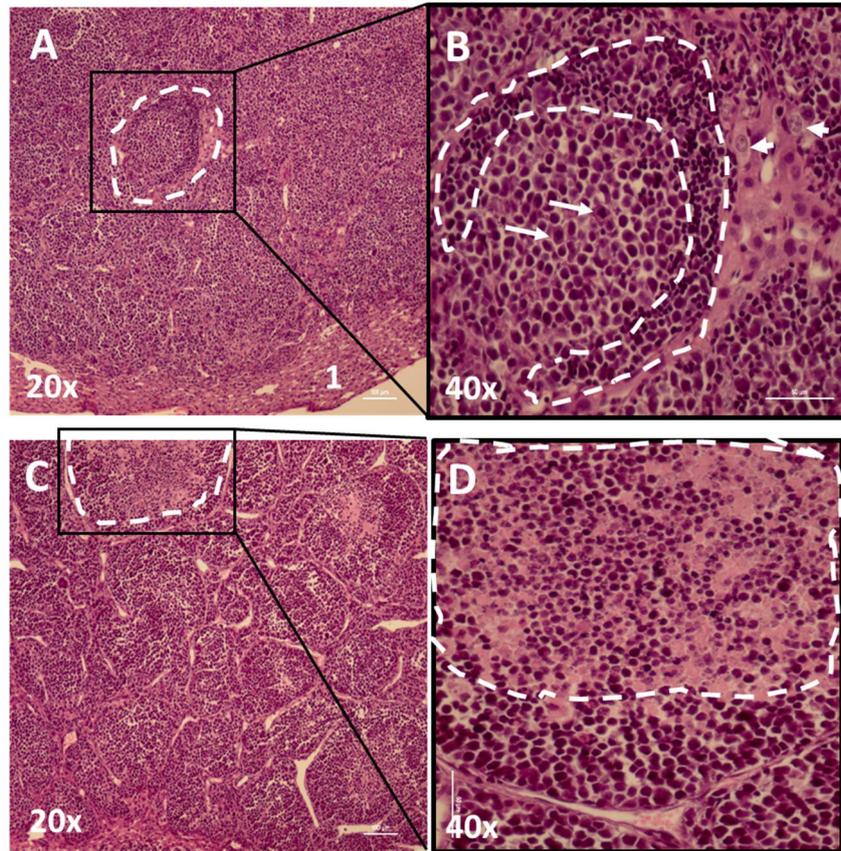


Figura 73. Organización de los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ y zona necrótica. (A) y (B) Distribución de las células B A20 neoplásicas y de los leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs). (B) Los TILs (células de menor tamaño que las células B A20 neoplásicas grandes) se distribuyen en torno al tumor (zona delimitada por un punteado blanco). Las flechas cortas señalan las células A20 GFP⁺ con morfología centroblástica y las flechas largas señalan las células tumorales con morfología inmunoblástica. (C) Organización estructural de los nódulos tumorales del hígado (zona necrótica punteada en blanco). (D) Vista ampliada 40x de la zona necrótica punteada en blanco.

4.15. La infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ en los nódulos linfáticos desplaza y comprime los folículos de células B

La infiltración de las células tumorales y la formación de nódulos tumorales aislados en los ganglios linfáticos comprimieron los folículos de células B en la zona de la corteza, perdiendo su forma esférica original y adquiriendo una forma achatada, debido al efecto de compresión que ejerció el tumor sobre el folículo (**Fig. 74**). Al igual que en los nódulos tumorales del hígado, los TILs se disponían alrededor de las células tumorales A20 GFP⁺ colonizantes del ganglio linfático (**Fig. 74**).

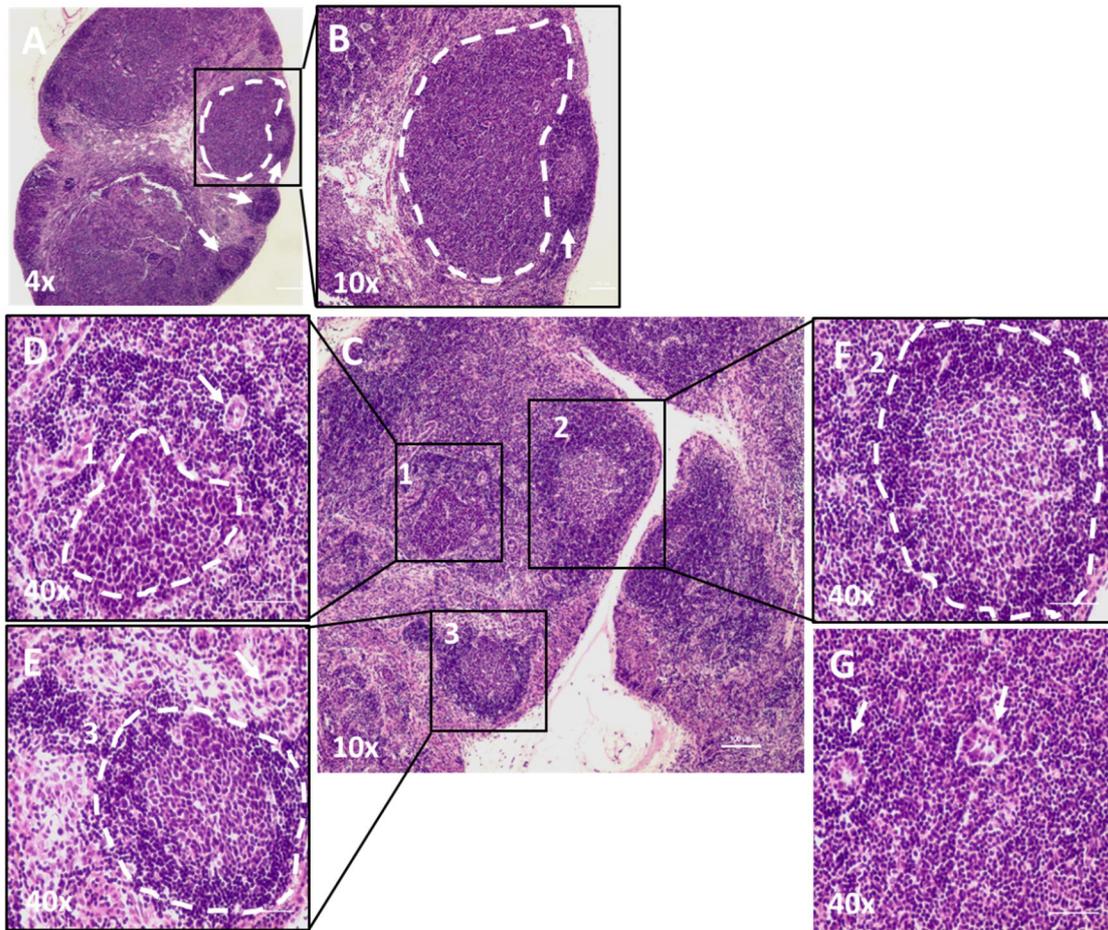


Figura 74. Infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ en los ganglios linfáticos a día 28 post-implantación del tumor. (A) y (B) Las células tumorales A20 GFP⁺ (zona punteada en blanco) comprimen los folículos sobre la corteza del ganglio linfático adquiriendo una forma más ovalada (flecha blanca). (C) Imagen en la que se aprecian las ¹células tumorales A20 GFP⁺, y ^{2,3}folículos con morfología normal. (D) Imagen ampliada 40x de la infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ (zona punteada en blanco) formando una masa y los TILs distribuidos alrededor de ella. (E) y (F) Imágenes ampliadas 40x de los folículos de células B con morfología normal. La parte más clara del folículo se trata del centro germinal, en el que las células B proliferan y se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos. (D) y (G) Las flechas blancas señalan las vénulas de endotelio alto (HEVs) (sección transversal). Las HEVs presentan células endoteliales inusualmente altas y a través de ellas entran los linfocitos desde la sangre hasta el nódulo linfático.

4.16. Histología de la infiltración de células tumorales A20 en el bazo y en el timo

En el bazo y en el timo no se detectó mediante histología la infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ en la fase intermedia-tardía de progresión del tumor (Figs. 75), debido al bajo número de células tumorales que se evidenciaron mediante citometría en estos órganos (Fig. 76).

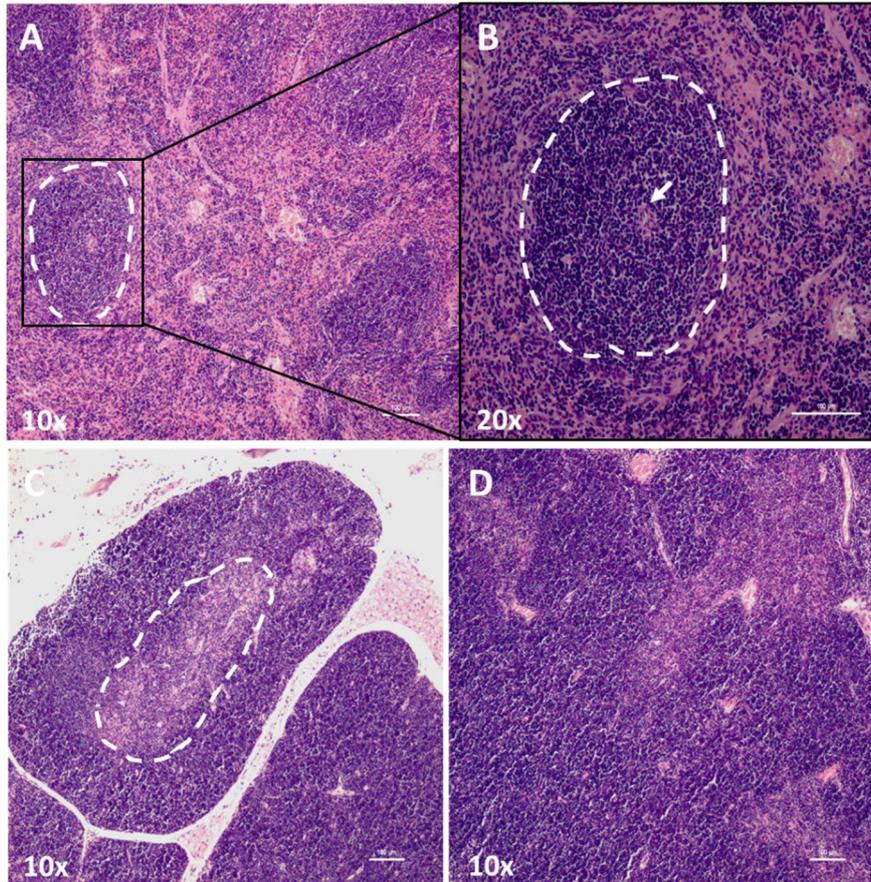


Figura 75. La infiltración de las células tumorales A20 GFP⁺ no es detectable en el bazo y el timo mediante histología clásica. En el bazo (imágenes A y B) y el timo (imágenes C y D) no se observó la infiltración de las células de tumor A20 GFP⁺ mediante histología clásica en la fase intermedia-tardía de la progresión del tumor. En la imagen (A) aparece señalada la pulpa blanca del bazo delimitada por una línea punteada blanca. La imagen (B) muestra la vista aumentada 20x de la pulpa blanca de bazo, la cual se dispone alrededor de arteriolas centrales (señalada por la flecha blanca). La pulpa blanca incluye dos regiones: los folículos de células B, denominada corona de célula B y el área de las células T, llamada vaina linfoide periarteriolar (PALS). Bordeando la pulpa blanca del bazo se encuentra la zona marginal (MZ), la cual contiene una población única de células B (células B de la zona marginal). (C) Lóbulos del timo en los que podemos distinguir la zona de la corteza (zona más exterior y oscura) que es la región donde se encuentran los linfocitos grandes, y la zona medular (zona más interior y clara, punteada en blanco) donde se encuentran los linfocitos T maduros antes de migrar a la periferia. (D) Corteza del timo en la que no apreciamos la infiltración de células tumorales A20 GFP⁺.

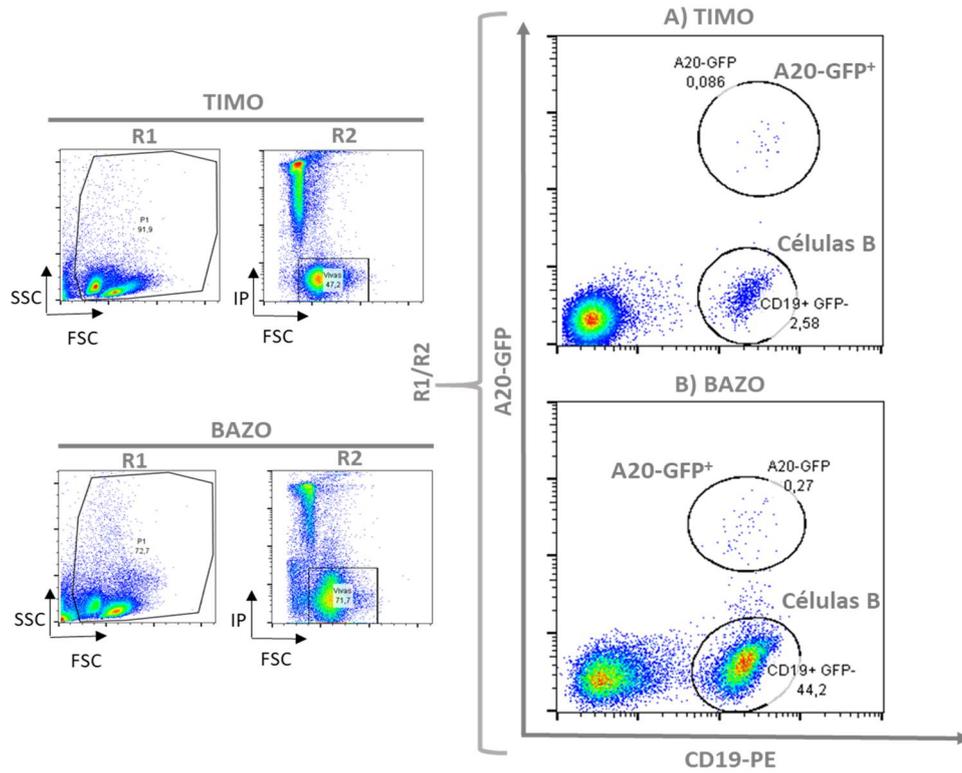


Figura 76. Análisis de la infiltración de las células A20 GFP⁺ en el timo y en el bazo por citometría de flujo. La infiltración de las células de tumor A20 (CD19⁺ GFP⁺) en el timo (A) y en el bazo (B) fue escasa en la fase intermedia-tardía de la progresión del tumor. FSC: *forward scatter*, SSC: *side scatter*, IP: yoduro de propidio. R1: ventana de la población inicial, R2: ventana de la población de células vivas a partir de población R1 y R1/R2: combinación de las ventanas R1 y R2.

V. Discusión

5.- DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos caracterizado fenotípicamente las células de tumor A20 en base a la expresión de moléculas de superficie y nuestros datos indican que presentan un fenotipo de células B inmaduras indiferenciadas. A través de la eliminación de la secuencia codificante del péptido señal de HVEM mediante la expresión transitoria del sistema CRISPR-Cas9 (evitando las posibles respuestas inmunitarias derivadas de la integración de la nucleasa Cas9) y la elección de la secuencia guía con menor probabilidad de *off-target*, impedimos la expresión en membrana de la proteína HVEM en el tumor A20. Como resultado, las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} mostraban una disminución en la expresión de BTLA, pero no presentaban alterada su capacidad replicativa *in vitro*. Tampoco se observaron diferencias en la eficacia de diseminación *in vivo* del tumor A20 deficiente en HVEM en los órganos linfoides primarios y secundarios. Sin embargo, en las etapas más avanzadas de la progresión tumoral, el microambiente del timo sufrió cambios que condujeron a la implantación del tumor y al incremento en células B residentes. Observamos igualmente que nódulos tumorales del hígado de ratones, en los que se implantó el tumor A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}, mostraban un menor reclutamiento de células infiltrantes del sistema inmunitario que los ratones inoculados con el tumor A20 WT, en la fase intermedia del desarrollo tumoral.

5.1. El linfoma B murino A20 es un tumor de células B inmaduras indiferenciadas

La expresión de CD19 por parte de las células A20 de linfoma B murino indica que pertenecen al linaje de células B porque se trata de un marcador común en todas las etapas de su desarrollo (Busslinger 2004). Las células B que no expresan CD19 presentan fallos en la proliferación en respuesta a antígeno y en la señalización intracelular a través del co-receptor de células B (Busslinger 2004). La importancia de CD19 ha sido demostrada también en ratones deficientes para CD19, que muestran deficiencias en las respuestas mediadas por las células B para la mayoría de antígenos (Cherukuri et al. 2001). Sin embargo, las células de tumor A20 carecen de la expresión de marcadores asociados a células B maduras como CD21, y las inmunoglobulinas de superficie IgM e IgD.

CD21 (también conocido como receptor 2 del complemento, CR2) es un receptor para el fragmento C3d del complemento (Azuma et al. 1998). Las células B emigrantes desde la médula ósea a la periferia presentan un fenotipo transitorio que va desde la baja expresión de CD21 hasta alcanzar niveles de expresión altos (Suryani et al. 2010). Esta etapa de maduración está acompañada de un aumento de la supervivencia y un aumento de la capacidad para proliferar y diferenciarse a células B maduras y plasmáticas secretoras de anticuerpos (Suryani et al. 2010). Finalmente, las células B maduras expresan niveles altos de CD21, constituyendo en su superficie el co-receptor de células B formado por el complejo de moléculas CD19, CD21 y CD81, el cual sería el equivalente a los co-receptores CD4 y CD8 en las células T (Suryani et al. 2010) (Azuma et al. 1998). CD21 es expresado en etapas más tardías que CD19 y CD81 durante la diferenciación de las células B, y su expresión se pierde con la activación de las células B (mientras que CD19 y CD81 continúan expresándose) (Otsuka et al. 2004). CD21 también juega un papel en la inducción de la respuesta inmunitaria en las células B como se ha visto en experimentos *in vivo*, en los que ratones deficientes para CD21 presentaban una respuesta inmunitaria humoral pobre a los antígenos T-dependientes (Cherukuri et al. 2001). Esto quiere decir que los antígenos pueden activar directamente la cascada del complemento, o bien CD21 puede potenciar la señalización de la unión del antígeno al BCR al formar parte del co-receptor CD19/CD21/CD81, el cual se une también al antígeno e interaccionará a su vez con BCR. Esto conduce a la fosforilación de la cola citoplasmática de CD19 por las tirosina quinasas asociadas al receptor de célula B, lo que provoca la unión de las quinasas de la familia Src y el reclutamiento de una quinasa lipídica llamada fosfatidilinositol 3-OH quinasa (PI3K) (Azuma et al. 1998) (Cherukuri et al. 2001). La activación de esta cascada modula la función de numerosos substratos implicados en una amplia variedad de fenómenos biológicos como la adhesión celular, el ciclo celular y la proliferación celular (Otsuka et al. 2004).

Estudios previos han mostrado que la sobre-expresión de CD21 mediante manipulación genética en células B de linfoma se asocia *in vivo* con una disminución de la progresión del tumor, e incluso algunos tumores eran rechazos tras su inoculación en ratones, en comparación con las células B de linfoma no modificadas (Otsuka et al. 2004). Además, se observó que las células B de linfoma modificadas para sobre-expresar CD21 se agregaban en medio de cultivo, y el uso de anticuerpos anti-CD21 no conseguía inhibir la agregación, sugiriendo la participación de otras moléculas (Tanimoto et al. 2009). Se

observó que CD21 inducía la expresión de LFA-1 (integrina que juega un papel central en las interacciones célula-célula) (Tanimoto et al. 2009). Hay evidencias que afirman que la activación de las células B de linfoma induce la señalización mediada por CD21, la cual estimula la expresión de LFA-1 (Tanimoto et al. 2009). El aumento en la expresión de LFA-1 explica la agregación de las células B de linfoma, lo que limita su proliferación y progresión (Tanimoto et al. 2009). Por lo tanto, la ausencia de expresión de CD21 en las células A20 de linfoma B constituye una ventaja para el tumor. LFA-1 está formado por CD11a (cadena LFA-1 α y subunidad α_L) y CD18 (integrina β_2), y nuestros datos muestran que la línea tumoral A20 solo expresa CD11a. Lo que sugiere que las células de tumor A20 han seleccionado la pérdida de expresión de la integrina β_2 (CD18) y de CD21 de manera conjunta como ventaja para la proliferación y diseminación del tumor, limitando las posibles interacciones célula-célula y reduciendo la agregación entre ellas.

Por otro lado, nuestros resultados revelan que las células de tumor A20 no expresan las Igs de superficie, IgM e IgD. Al no expresar IgD, marcador de maduración junto con IgM (sirve como receptor BCR), las células B de linfoma A20 presentan un grado de inmadurez previo al estado de célula B *naive* madura, por lo que no podrán ser activadas por un antígeno específico en un órgano linfoide secundario.

5.2. La pérdida de expresión de PD-1 en el tumor A20 de las células B podría ser un factor pro-oncogénico como se ha demostrado en las células T

Nuestros resultados muestran que la línea de linfoma B A20 expresa elevados niveles de PD-L1, sin embargo no expresa su receptor co-inhibidor PD-1. Tampoco expresa la molécula co-estimuladora CD80, a la cual se puede unir también PD-L1 (Xu-Monette et al. 2018). Estudios previos han demostrado que las células B *naive* expresan niveles basales de PD-1, y que estos niveles de expresión aumentan tras la activación de las células B dependiente de antígeno a través del receptor BCR (IgM) (Agata et al. 1996) (Thibult et al. 2013). Lo que sugiere que PD-1 tiene un papel en la regulación de la activación de las células B, y en la prevención de las enfermedades inflamatorias y auto-inmunitarias (Thibult et al. 2013). En los linfomas de non-Hodgkin de células T ha sido demostrado que PD-1 actúa inhibiendo la vía de señalización a través de TCR al interaccionar en *cis* con PD-L1 expresado en la misma célula (Wartewig et al. 2017).

Estos autores han demostrado que PD-1 actúa potenciando la actividad de la fosfatasa supresora de tumores PTEN, la cual atenúa la señalización mediada por proteínas quinasas claves, en último término, de la activación de los genes de supervivencia y proliferación a través de la activación del factor NF- κ B (Wartewig et al. 2017). Estos estudios sugieren que PD-1 podría tener un papel similar en el contexto de los linfomas de células B, inhibiendo la señalización mediada por el BCR. De esta forma, la eliminación de la expresión de PD-1 en las células de tumor A20 constituiría una ventaja para el tumor, al promover su proliferación, como consecuencia de la pérdida de la señalización inhibitoria del PD-1 en *cis* (PD-L1/PD-1) sobre la vía del BCR.

Por otro lado, la vía de señalización PD-L1/PD-1 es clave en la inhibición de la activación de las células T (Xu-Monette et al. 2018). En la respuesta inmunitaria antitumoral, los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes secretan IFN- γ y poseen actividad citotóxica, lo que induce en el tumor un mecanismo de resistencia adaptativa que consiste en el aumento de la expresión de PD-L1, que al interactuar con PD-1 en los linfocitos T CD8 infiltrantes del tumor inhibiría su función, incluyendo la producción de IFN- γ (Xu-Monette et al. 2018). Por lo tanto, la expresión de altos niveles de PD-L1 en las células de tumor A20 sería empleado como mecanismo de escape del tumor a la acción del sistema inmunitario. Esto es apoyado por estudios previos, en los que el bloqueo temprano de PD-L1 expresado en células de leucemia linfocítica crónica (CLL) restablece la función efectora de las células T CD8⁺ y previene el desarrollo del tumor (Xu-Monette et al. 2018). También ha sido demostrado que el bloqueo de PD-L1, mediante el uso de anticuerpos anti-PD-L1 en DLBCL, resulta en un aumento en la secreción de IFN- γ por las células T (Xu-Monette et al. 2018).

5.3. La pérdida de la secuencia codificante del péptido señal del gen HVEM es suficiente para impedir la expresión en membrana de la proteína HVEM en el tumor A20 GFP⁺

HVEM (TNFRSF14) es una glicoproteína transmembrana de tipo I cuyo péptido señal N-terminal es eliminado tras su síntesis, siendo retenida la proteína HVEM en la membrana a través de una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos situados cerca del extremo C-terminal (Hooper et al. 1997). De esta manera, HVEM dispone su estructura en la membrana celular formada por un dominio extracelular o ectodominio (N-terminal)

con cuatro dominios ricos en cisteína (CRD), una región transmembrana, y una cola citoplasmática (C-terminal) con sitios de unión para factores asociados a los receptores TNF (TRAF) (Stiles et al. 2010). Los TRAFs inician la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) que controla la expresión de genes de supervivencia y relacionados con inflamación (Stiles et al. 2010). Por lo tanto, seleccionando como diana del sistema CRISPR-Cas9 la secuencia del exón 1, que codifica junto con parte del exón 2 para el péptido señal de HVEM, impedimos la expresión funcional de HVEM dirigida por el péptido señal en la membrana celular.

5.4. El sistema pRR-eGFP y el ensayo T7 endonucleasa I muestran una eficacia de corte similar de los diferentes sgRNA guías diseñados

Para la comprobación de la eficacia de acción de los sgRNA guías seleccionados (1, 3, 6 y 13), empleamos dos técnicas diferentes: el sistema pRR-eGFP y el ensayo de la T7 endonucleasa I (T7/EI). La técnica pRR-eGFP se fundamenta en la reparación no homóloga (NHEJ) de la expresión de fluorescencia eGFP tras el corte mediado por la Cas9 y el sgRNA guía sobre la secuencia diana del HVEM. El ensayo de la T7 endonucleasa se basa en la eficacia de corte mediada por la T7 endonucleasa en la zona del DNA que no presenta una complementariedad perfecta, resultado de la reparación no homóloga (NHEJ), tras la acción de la nucleasa Cas9 guiada por el sgRNA guía. En el caso del sistema pRR-eGFP, estudiamos la acción directa de la nucleasa Cas9 mediada por el sgRNA guía sobre el genoma. Sin embargo, en el ensayo T7 endonucleasa, analizamos el corte efectuado por Cas9 de una manera indirecta a través del resultado de la digestión con la T7 endonucleasa. El ensayo T7 endonucleasa es el más empleado para determinar la eficacia de edición del genoma por el sistema CRISPR-Cas9 (Guzzardo et al. 2015) (Tsai et al. 2014) (Yang et al. 2016). Se trata de un ensayo más largo que el sistema pRR-eGFP, porque no solo requiere de la transfección de células eucariotas con el sistema CRISPR-Cas9, sino que también requiere de la posterior digestión con la T7 endonucleasa del producto amplificado por PCR, desnaturalizado y rehibridado, de la secuencia exónica diana del DNA genómico extraído de las células transfectadas. Por su parte, el sistema pRR-eGFP es más rápido, ya que los porcentajes de corte del total del gen mediados por la nucleasa Cas9 guiada por los diferentes sgRNA guías pueden ser determinados pasadas 48-72 horas de la transfección de células eucariotas mediante la cuantificación por citometría de flujo de la intensidad media de fluorescencia (MFI)

verde. Pero, el sistema pRR-eGFP presenta el problema de la emisión de auto-fluorescencia verde basal, por parte tanto del vector pRR-eGFP original (codifica para la forma truncada de la proteína eGFP), como del vector pRR-eGFP-HVEM (ECD) donde hemos clonado la secuencia extracelular (ECD) de HVEM entre los dos extremos (el extremo N'-terminal y el resto de la secuencia codificante de la proteína eGFP) de la proteína eGFP truncada. Para obtener los porcentajes de eficacia de corte del total del gen tenemos que restar la auto-fluorescencia verde basal a la fluorescencia verde resultante de la acción de la Cas9 junto con los distintos sgRNA guías. Aunque los métodos para determinar los porcentajes de corte del total del gen para los distintos sgRNA guías son diferentes: (i) utilizando el ensayo T7 endonucleasa obtenemos los porcentajes mediante semicuantificación de la densidad de las bandas resultantes de la digestión con la enzima T7, mientras que con (ii) el sistema pRR-eGFP, los porcentajes se obtienen de la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por la proteína eGFP, si bien en nuestro caso con ambas técnicas se consiguieron porcentajes de eficacia de corte del total del gen para cada sgRNA guía muy similares.

El exón 1 del gen *TNFRSF14*, elegido como diana del sistema CRISPR-Cas9, tiene un tamaño pequeño de 69 pares de bases (pb) con lo que los diferentes sgRNA guías (1, 3, 6 y 13) sugeridos por el programa estaban próximos entre sí. La nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* media el corte de las dos cadenas de DNA tres pares de bases *upstream* de la secuencia PAM 5'-NGG del genoma, la cual es esencial para el reconocimiento y acción de la Cas9 (Ran et al. 2013). La eficacia de corte está determinada por la accesibilidad de la proteína Cas9 al punto de corte en el genoma, la cual resulta del estado conformacional del material genético en la cromatina y del estado de metilación del DNA (Cong et al. 2013). Esta eficacia de corte se traduce en los diferentes tamaños de los fragmentos resultantes tras la acción del sistema CRISPR-Cas9. Dependiendo de la sgRNA guía utilizada se pueden generar los fragmentos con los siguientes tamaños: para el sgRNA_1 de 230/475 pb, para el sgRNA_3 de 209/496 pb, para el sgRNA_6 de 241/464 pb y para el sgRNA_13 de 218/487 pb. Esto es apoyado por los resultados obtenidos tras el análisis con la T7 endonucleasa y el sistema pRR-eGFP, con los que se obtienen valores de eficacia de corte del gen que codifica para HVEM muy similares entre los distintos sgRNA guías (1, 3, 6 y 13), y entre las dos técnicas utilizadas.

5.5. La selección de la secuencia guía sgRNA_1 y la expresión transitoria del sistema CRISPR-Cas9 en el tumor A20 GFP⁺ reducen la probabilidad de *off-target*

La identificación del corte inespecífico o actividad *off-target* mediada por el sistema CRISPR-Cas9 en un genoma es de gran importancia, especialmente en el tratamiento de enfermedades humanas y en la creación de modelos animales, debido a que el corte *off-target* puede resultar en mutaciones, deleciones, inversiones, y/o translocaciones provocando un detrimento biológico o posibles enfermedades y mutaciones en genes no deseables (Cradick et al. 2014). Para fines clínicos, es esencial que los efectos *off-target* sean minimizados y sus potenciales impactos sean conocidos y/o eliminados (Wiles et al. 2015). Por el contrario, si el objetivo es desarrollar modelos animales, en este caso, las variantes alélicas indeseadas como consecuencia del *off-target* se perderán por retrocruzamientos con la cepa WT y selección de la descendencia mediante genotipado (Wiles et al. 2015).

El análisis *off-target* del genoma completo es muy costoso, por lo que para la selección del sgRNA guía adecuado recurrimos a la predicción de la actividad *off-target* de cada secuencia guía mediante el uso de herramientas bioinformáticas como el programa de diseño CRISPR del MIT (Cradick et al. 2014). La especificidad del sistema CRISPR-Cas9 está definida por los 20 nucleótidos localizados en el extremo 5' del sgRNA, los cuales interaccionan mediante complementariedad de bases *Watson-Crick* con el DNA diana en el genoma (Wiles et al. 2015). Estudios previos demuestran que el corte mediado por la nucleasa Cas9 puede ser inhibido por un único nucleótido no complementario a la secuencia del sgRNA, situado especialmente en la región próxima a la secuencia PAM (Peng et al. 2016). Pero, la actividad *off-target* es un concepto más amplio y depende de una combinación de factores como (i) la posición: las 8-14 pares de bases situadas en el extremo 3' de la secuencia guía son peor reconocidos por la Cas9 que los nucleótidos no complementarios situados en el extremo 5', aunque Cas9 puede reconocer con baja frecuencia la secuencia PAM alternativa 5'-NAG (Ran et al. 2013) (Cradick et al. 2014) (Lin et al. 2014), (ii) la cantidad: por lo general, más de tres nucleótidos no complementarios impedirían el corte *off-target* por la Cas9, (iii) la secuencia guía (sgRNA): algunas secuencias guías son menos susceptibles al corte *off-target* que otras, y (iv) la concentración: el fenómeno *off-target* es muy sensible a la

concentración de la enzima Cas9, así como a los ratios de Cas9 y sgRNA (Peng et al. 2016). Los nucleótidos no complementarios parecen ser reconocidos mejor de manera inespecífica cuando la nucleasa Cas9 está presente en concentraciones altas, lo que conduce a una elevada actividad *off-target* (Hsu et al. 2014). De esta manera, el descenso en la concentración de Cas9 aumenta el ratio de corte *on/off-target*, mejorando la eficiencia de corte *on-target* (Hsu et al. 2014). La duración de la expresión de la nucleasa Cas9 es un factor adicional en el fenómeno *off-target*, cuya contribución tiene que ser investigada (Hsu et al. 2014). En nuestro estudio, conseguimos limitar la concentración de la nucleasa Cas9, y por lo tanto, reducimos las probabilidades de actividad *off-target* mediante la expresión transitoria por electroporación del sistema CRISPR-Cas9 en la línea celular A20.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos sobre el fenómeno *off-target* y dada la dificultad mencionada de la secuenciación del genoma completo de la línea A20 para el análisis *off-target*, seleccionamos el sgRNA_1 porque es el que presenta la probabilidad más alta de que el corte mediado por la Cas9 sea *on-target*. Esta probabilidad resulta de la diferencia de la actividad *on-target* (referida como el 100%) menos la suma de las actividades *off-target* empleando esa secuencia guía en particular que se fundamenta en el algoritmo del programa informático de diseño CRISPR del MIT (<http://crispr.mit.edu>) (Hsu et al. 2013). Este programa cuantifica las actividades *off-target* de las secuencias guías teniendo en cuenta el número de nucleótidos no complementarios, y su posición con respecto a la secuencia PAM y la distancia entre los nucleótidos no complementarios, que determina los efectos estéricos de la cercanía o no de los nucleótidos no complementarios en la interacción entre la secuencia *off-target* y el DNA genómico (Hsu et al. 2013).

5.6. La expresión estable de Cas9 en la línea A20 permitiría el estudio de la posible respuesta inmunitaria *in vivo* frente a Cas9 y la eliminación simultánea de varios genes utilizando únicamente los sgRNA guías

El sistema de edición del genoma CRISPR-Cas9 deriva del sistema inmunitario adaptativo de bacterias, y al tratarse de una proteína extraña (no propia) y de gran tamaño (> 4 kDa) puede desencadenar respuestas inmunitarias en el hospedador (Wang et al. 2015) (Hsu, Lander, Zhang, et al. 2014) (Dai et al. 2016). Estudios previos han

demostrado la inducción de una respuesta inmunitaria humoral frente a la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), incluyendo la generación de anticuerpos frente a Cas9 *in vivo*, así como el aumento en la secreción de IL-2 por esplenocitos estimulados *in vitro* con la proteína Cas9 (Wang et al. 2015). También ha sido observada la inducción de la respuesta inmunitaria celular *in vivo* por parte de la nucleasa Cas9, a través de la expansión clonal de células T citotóxicas antígeno específicas (Wang et al. 2015) (Chew et al. 2016). Las respuestas inmunitarias a la nucleasa Cas9 podrían atenuar los posibles efectos terapéuticos y causar reacciones secundarias indeseadas, resultando en un efecto terapéutico transitorio y no permanente (Dai et al. 2016). Por lo tanto, para la traslación del sistema CRISPR-Cas9 a la clínica sería necesario un estudio mucho más profundo acerca de cómo prevenir la inmunogenicidad de la nucleasa Cas9 (Dai et al. 2016). La generación de la línea A20 GFP⁺ Cas9⁺ que expresa de manera estable Cas9 mediante transducción con sistemas lentivirales nos podría ser útil también para definir los epítomos inmunogénicos de Cas9 que nos permitan monitorizar la respuesta inmunitaria humoral y celular *in vivo* inducidas por Cas9 (Sun et al. 2016). Así mismo, nos permitiría la generación de líneas celulares con múltiples mutaciones, de manera simultánea o gradualmente, empleando únicamente diferentes secuencias guías sgRNA (Prashant Mali, Kevin M Esvelt 2013).

5.7. Modulación de la expresión de CD40 en la línea A20 en respuesta a la transducción con Cas9

La inmunogenicidad potencial, dado su origen bacteriano, de la proteína o péptidos de la nucleasa Cas9 (Sun et al. 2016) (Dai et al. 2016) podría ser la causa del aumento en los niveles de expresión de la molécula co-estimuladora de la respuesta inmunitaria, CD40, en las células A20 GFP⁺ Cas9⁺ (presentan integrado en su genoma el gen que codifica para la proteína Cas9) en comparación con las líneas celulares A20 que no expresan de manera constitutiva la nucleasa Cas9 (A20 WT, A20 GFP⁺ y A20 GFP⁺ HVEM deficiente).

Los receptores de tipo Toll (TLR) reconocen patrones moleculares específicos relacionados con microorganismos patógenos (PAMPs) (Hua & Hou 2013). El TLR-9 es intracelular y se dispone en los endosomas actuando como sensor de señales de alerta, como pueden ser secuencias CpG no metiladas que son mucho más comunes en el DNA

bacteriano que en el de los mamíferos (Hua & Hou 2013). Una vez que se produce el reconocimiento de las señales de alerta por el sensor-receptor TLR-9 en el interior de la célula B, se desencadena una señal co-estimuladora que junto con la señal del receptor de célula B (BCR), activa a la célula B. Esta célula B activada puede producir auto-anticuerpos anticromatina y también funcionar como célula presentadora de antígeno (APC) para las células T autorreactivas (Hua & Hou 2013). La estimulación por bacterias o por ligando del TLR-9 en las células B inmaduras produce un aumento en los niveles de expresión del MHC de clase II y CD40 (Jiang et al. 2007). Los mayores niveles de expresión del receptor co-estimulador CD40 en la línea A20 GFP⁺ Cas9⁺ podrían ser resultado del reconocimiento por parte del TLR-9 de patrones asociados a patógenos de la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, lo que conduciría al aumento de la expresión de CD40 en las células B. Se piensa que las células B requieren de tres señales diferentes para la activación inicial *in vivo*: (i) activación a través del BCR por la unión de antígeno, (ii) co-estimulación por las células T (previamente activadas por el reconocimiento del mismo antígeno en el contexto del MHC de clase II de las células B, lo que se conoce como reconocimiento ligado o *cognate recognition*) a través de la interacción del ligando CD40 expresado en las células T CD4⁺ foliculares y el receptor CD40 expresado por las células B (la interacción CD40-CD40L ayuda a impulsar a la célula B en reposo hacia el ciclo celular, y es esencial para las respuestas de célula B a antígenos dependientes del timo, también hace que la célula B incremente la expresión de moléculas co-estimuladoras, en especial de la familia B7), y (iii) la activación inmunitaria innata a través de la unión de ligando patógeno al TLR (Browne 2012). De esta manera, la activación de las células B puede ser cuidadosamente regulada para que se produzca solo en el contexto de infección, evitando la activación en respuesta a antígenos propios (Browne 2012).

Dada la capacidad inmunogénica de la nucleasa Cas9, ha sido de gran importancia la generación de la línea A20 GFP⁺ HVEM deficiente (clon 1F1) que no presentara integrada en su genoma el gen que codifica para Cas9 (Zakrzewski et al. 2008). De lo contrario, la expresión constitutiva de Cas9 en las células de linfoma B murino A20 podría dar lugar a una mayor respuesta inmunitaria por parte de las células T, lo que nos impediría evaluar de manera correcta el papel de la pérdida de expresión de la proteína HVEM en las células A20, en la modulación de las respuestas inmunitarias producidas

por las células T efectoras. De todas formas, aun integrándose y resultando inmunogénica contamos con la célula A20 libre de Cas9 que serviría de control.

5.8. La ausencia de HVEM en la membrana del tumor A20 condiciona la expresión normal de BTLA, al impedir la formación del complejo *cis* HVEM-BTLA de membrana

La expresión de BTLA en la línea celular A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} disminuye en comparación con la expresión de BTLA en las líneas celulares A20 WT, A20 GFP⁺ y A20 GFP⁺ Cas9⁺ que expresan HVEM. La razón del descenso en la expresión de BTLA por las células A20 GFP⁺ deficientes para la expresión en membrana de HVEM, podría deberse a la imposibilidad para la formación del complejo *cis* HVEM-BTLA (Pasero et al. 2012) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011). La ausencia de la proteína HVEM en la superficie de las células A20 impediría la unión con BTLA, expresado en la misma célula, en la configuración *cis* (Steinberg et al. 2011). La interacción HVEM-BTLA en la configuración *cis* es muy estable y su disociación solo puede ser mediada por el ligando LIGHT de membrana en *trans* (Pasero et al. 2012) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011). Estos complejos *cis* HVEM-BTLA serían los responsables de los mayores niveles de expresión de BTLA en las líneas A20 que expresan HVEM, si lo comparamos con la línea celular HVEM deficiente. Puede además que la estabilidad de la expresión en superficie dependa de su unión a BTLA o que la expresión de RNA mensajero sea corregulada.

5.9. Las células A20 GFP⁺ WT y A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} exhiben la misma tasa de duplicación en cultivo

La señalización a través de HVEM mediada por BTLA en *trans* activa la expresión de genes de supervivencia e inflamación a través del factor de transcripción nuclear NF- κ B, el cual co-estimula la proliferación de las células B y la secreción de inmunoglobulinas (McGrath & Najafian 2012) (Adam et al. 2003) (Murphy et al. 2006). Basándonos en el papel de HVEM como receptor que promueve la supervivencia de las células al unirse a su ligando BTLA, se estudió si la pérdida de la expresión en membrana de HVEM por las células A20 GFP⁺ afectaba a su tasa de replicación en cultivo, si lo comparábamos con la línea A20 GFP⁺ WT. Comprobamos que la deficiencia en la

expresión de HVEM no provocaba cambios en la tasa de duplicación de las células B de linfoma *in vitro*. Esto podría ser debido a que HVEM expresado en las células A20 GFP⁺ WT se encontrara en su mayoría formando el complejo *cis* HVEM-BTLA, impidiendo la interacción en *trans* HVEM-BTLA (Shui et al. 2011) (Steinberg et al. 2011) (Ware & Sedy 2011), lo que limitaría la activación del factor NF- κ B a través de la señalización mediada por HVEM en las células del tumor. De ser así, la pérdida de la expresión de HVEM en las células de linfoma B A20 conllevaría sobre todo la disrupción del complejo *cis* HVEM-BTLA, lo que conduciría a la pérdida de la señalización inhibitoria de la activación del BCR. Sin embargo, *in vitro* posiblemente careceríamos de la estimulación vía BCR y de la posible acción co-estimuladora de las células T CD4⁺ *helper*, que tendrían lugar *in vivo*. Por lo tanto, la posible explicación de que las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} no exhibieran una tasa de duplicación en cultivo diferente en comparación con la línea A20 GFP⁺ WT, podría ser que el papel de HVEM en las células de tumor A20 no fuera el de receptor del ligando BTLA activando la expresión del factor nuclear NF- κ B, sino que HVEM estaría actuando como ligando del receptor co-inhibidor BTLA expresado en la misma célula.

5.10. La pérdida de expresión de HVEM por las células A20 GFP⁺ no provoca cambios en el patrón metastásico de diseminación del tumor en los órganos hematopoyéticos

Nuestros resultados revelan que las células de linfoma B A20 no expresan marcadores claves en el reclutamiento de las células B normales. Las células de tumor A20 no expresan LFA-1 (integrina $\alpha_L\beta_2$ de leucocitos) porque carecen de la subunidad β_2 (CD18), aunque sí expresan la subunidad α_L (CD11a). La deficiencia de la expresión de la subunidad β_2 impide la emigración de los leucocitos desde la sangre a los sitios de inflamación, resultando en una severa inmunodeficiencia (Drillenburg & Pals 2000). Tampoco expresan la integrina $\alpha_4\beta_1$, otra integrina importante en la metástasis a los sitios de inflamación, porque no presentan la cadena α (CD49d-VLA-1). La integrina $\alpha_4\beta_1$ junto con LFA-1 median la unión de los linfocitos B del centro germinal (GC) a las células dendríticas foliculares (FDCs) (Drillenburg & Pals 2000). Esta interacción es crucial para la selección de las células B y para la maduración de la afinidad (Drillenburg & Pals 2000). En cuanto a la expresión de receptores de quimiocinas, las células de tumor A20 no expresan el receptor CCR7 necesario para la diseminación a los nódulos linfáticos

periféricos (Pals et al. 2007). CD44, una glicoproteína clave implicada en la unión de los linfocitos a las vénulas endoteliales altas (HEV) y en la migración a los lugares de inflamación (Drillenbug & Pals 2000), tampoco se expresa en las células de linfoma B A20.

Estos resultados sugieren que las células B de tumor A20 han evolucionado para perder la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas, los cuales se expresan en las células B normales, alterando el tráfico de las células B neoplásicas a los órganos linfoides periféricos con respecto a las células B normales. HVEM, por tanto, no tendría un papel en la diseminación de las células B de tumor A20. Esta podría ser la explicación de que no se observaran diferencias significativas en el patrón metastásico de diseminación del tumor A20 GFP⁺ WT frente al tumor A20 GFP⁺ deficiente para la expresión de HVEM.

5.11. La progresión y diseminación tumoral promueve la linfopoyesis de células B residentes del timo y la colonización del timo por parte del tumor A20 GFP⁺ en los estadios más avanzados de la enfermedad

En estadios tardíos del linfoma B, en el timo de los ratones inoculados con la línea celular A20 GFP⁺ (tanto WT como HVEM deficiente) tiene lugar la aparición de porcentajes inusuales de células B. La presencia en el timo de células B parece estar promovida por las células tumorales, porque al prosperar la diseminación tumoral y aumentar el porcentaje de células tumorales que colonizan el timo, se incrementa también el porcentaje de células B presentes en este órgano linfoide primario. Sin embargo, el aumento en el número de células B comienza a producirse antes incluso de la detección del tumor A20 en el timo (a día 28 post-implantación del tumor). Podría ser que se estuvieran produciendo cambios en el microambiente del timo que promovieran el desarrollo de células B, lo que facilitaría a su vez la implantación del tumor en este órgano.

Normalmente, el timo contiene una pequeña población de células B que representan alrededor del 0,1-0,5% de los timocitos, un porcentaje similar al de las células dendríticas (DCs) (Perera et al. 2013). En nuestros estudios comprobamos que en el timo del ratón normal, que no había sido inoculado con las líneas tumorales, el porcentaje de células B se mantenía dentro de este rango (0,1-0,5%). El desarrollo de células B en el

timo es bloqueado, en etapas relativamente tempranas, por la generación de un microambiente inhibitorio (Hashimoto et al. 2002). En el timo, se acumulan los progenitores de células B en estadios tempranos del desarrollo (célula pro-B) y fallan en el proceso de diferenciación a células B maduras (Hashimoto et al. 2002). Este fenómeno podría estar relacionado con la reducida capacidad de respuesta de las células pro-B a IL-7, que estaría producido por el descenso en la expresión de la cadena α del receptor de la IL-7 (IL-7R α) (Hashimoto et al. 2002). Las células B del timo se encuentran preferentemente en la región cortico-medular, lo cual sugiere el papel potencial de estas células en la eliminación de las células T auto-reactivas (selección negativa) (Perera et al. 2013). Las células B del timo presentan un fenotipo diferente al de otros conjuntos de células B (Perera & Huang 2015). Primero, las células B residentes en el timo fueron detectadas en etapas muy tempranas en la ontogenia, incluso durante la vida fetal, lo que implica una migración temprana al esbozo tímico en desarrollo. Segundo, estas células B están altamente activadas expresando moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40, y altos niveles de MHC de clase II. A pesar de este fenotipo activado, las células B del timo muestran una reducida capacidad proliferativa y productora de anticuerpos *in vitro* en respuesta a los mitógenos clásicos de las células B. Tercero, las células B del timo residen exclusivamente en la región cortico-medular. La función de estas células B no está clara, pero podrían actuar de manera muy eficiente como células presentadoras de antígeno (APC) capturando e internalizando antígenos propios a través del receptor BCR y presentándolos de manera eficiente a través del MHC de clase II a las células T CD4⁺ auto-reactivas previamente estimuladas con el mismo tipo de antígeno, conduciendo a su eliminación (Perera et al. 2013) (Lu et al. 2015). La expresión de niveles altos de moléculas MHC de clase II y de moléculas co-estimuladoras por parte de las células B, las convierte en excelentes candidatos para la presentación de antígenos a las células T nacientes en el timo (Grey et al. 2014).

Por otro lado, se ha demostrado el importante papel de las células B del timo en el desarrollo de las células T reguladoras (Treg) (Lu et al. 2015). En el timo, las células B se co-localizan también con las células Tregs en la región medular (Lu et al. 2015). Además, se ha observado que la deficiencia de células B del timo tiene como resultado un descenso significativo en la frecuencia y número de células Tregs en el timo (Lu et al. 2015). Las células B del timo contribuyen al número de células Tregs a través de dos vías: (i) en la primera, las células B del timo promueven la generación de células pre-Tregs

desde células T CD4. (ii) Segundo, las células B del timo promueven directamente la proliferación de las células Tregs del timo *in vivo* e *in vitro* a través de las interacciones TCR-MHC de clase II, CD28-CD80/CD86 y CD40-CD40L (Lu et al. 2015). La ausencia de expresión de MHC de clase II por las células B conduce a la disminución de la maduración de las células Treg (Grey et al. 2014). Además, las células B regulan la población de células Tregs a través de la producción de varios factores, como IL-10, TGF- β y el ligando GITR (Lu et al. 2015).

En nuestros estudios *in vivo*, hemos podido determinar que en los estadios más avanzados de la progresión del tumor tiene lugar la colonización del timo por parte del linfoma B A20, tanto WT como deficiente para la expresión de HVEM. Además, parece ser que la implantación del tumor en este órgano estuviera promovida por cambios en el microambiente del timo, que conducen a una población de células B mayor en comparación con la población de células B del timo en condiciones normales. Sin embargo, nos quedaría por determinar cuál es el fenotipo de esta población inusual de células B. Para ello, podríamos emplear los marcadores IgM e IgD, ya que las células B del timo en su mayoría presentan un fenotipo IgM^{high} IgD^{high}, mientras que las células B maduras foliculares (FO) tienen un fenotipo IgM^{low} IgD^{high} (Perera et al. 2013). Además, sería interesante estudiar si esta población de células B nueva, que aparece en el timo como consecuencia de la diseminación del tumor A20, actuaría promoviendo la formación de las células Tregs (al igual que las células B propias del timo), para modular la respuesta inmunitaria antitumoral.

5.12. La ausencia de expresión de HVEM en el tumor limita la infiltración de leucocitos en los nódulos tumorales hepáticos

Empleamos los nódulos tumorales del hígado para el estudio de los leucocitos infiltrantes en el microambiente tumoral (TILs) generado por el linfoma B A20, debido a que en los órganos hematopoyéticos no se pueden distinguir las células del sistema inmunitario residentes en el tejido de los leucocitos atraídos que infiltran esos tejidos en respuesta al desarrollo y diseminación tumoral.

En la fase intermedia del desarrollo del linfoma, a día 28 post-implantación del tumor, observamos indicios de que la deficiencia en la expresión de HVEM por parte de las células de linfoma B A20 GFP⁺ altera el reclutamiento de los leucocitos infiltrantes

(TILs) en los nódulos tumorales del hígado con respecto a la línea A20 GFP⁺ WT. Sin embargo, estos datos deben ser tomados como preliminares y corroborados en futuros experimentos con un número mayor de animales. Estudios recientes han demostrado que la vía de interacción HVEM-BTLA está interrumpida en un 75% de los linfomas foliculares (FLs) y que HVEM es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en los FLs y en los linfomas difusos de células B grandes (DLBCLs), indicando que es una vía crítica para el desarrollo del linfoma (Boice et al. 2016). En ausencia de HVEM, el linfocito B pierde los mecanismos intrínsecos de control de la activación a través del BCR, y aumenta la predisposición a alterarse la proliferación en respuesta a un estímulo antigénico y a transformarse en célula tumoral. Nuestro objeto de estudio es la línea de linfoma B A20, que pertenece al grupo de los DLBCLs, que pueden originarse al igual que los FLs a partir de células B del centro germinal (GC) (Boice et al. 2016).

Nuestra hipótesis de partida se centra en el estudio de cómo afectaría la pérdida de expresión de HVEM a la activación o inhibición de las células del sistema inmunitario presentes en el microambiente del tumor, si bien debemos considerar que la pérdida de expresión de HVEM en las células de linfoma B A20 podría afectar en primer lugar al propio tumor. Por lo tanto, tenemos dos escenarios de estudio: (i) la interacción HVEM-BTLA en *cis*, como mecanismo intrínseco de regulación del estado basal de reposo y modulador de la activación en las células B, y (ii) la interacción HVEM-BTLA en *trans*, que previene la activación de las células T y B en respuesta a la carga antigénica del tumor.

5.12.1. Interacción HVEM-BTLA en *cis* en las células de tumor A20 como mecanismo intrínseco de regulación de su activación y proliferación

En las células T, la interacción HVEM/BTLA en *cis* ayuda a mantener un estado de inactividad funcional. De manera similar, se ha demostrado que HVEM atenúa la proliferación de las células B mediada por el BCR al interactuar con el receptor co-inhibidor BTLA en la configuración *cis* (Vendel et al. 2009). Ratones deficientes en la expresión de BTLA exhiben un desarrollo normal de los linfocitos, pero muestran un fenotipo hiperproliferativo de las células T y B tras la activación a través del TCR y del BCR, respectivamente (Vendel et al. 2009). La activación de BTLA por HVEM induce la fosforilación de los dominios ITIM de su región citoplasmática, lo que conduce al reclutamiento de las proteínas tirosina fosfatasas 1 y 2 (SHP1/2) en las células T y B

(Vendel et al. 2009). Aunque BTLA se asocia con los miembros del complejo BCR, IgM y CD79a/b, no actúa directamente sobre él (Vendel et al. 2009). Una vez fosforilados, los dominios ITAM de CD79a/b reclutan la proteína tirosina quinasa Syk, la cual es fosforilada a su vez por otra proteína tirosina quinasa denominada Lyn (Vendel et al. 2009). Syk media un papel crítico en la cascada de señalización que conduce a la activación de la proliferación y la diferenciación de las células B (Vendel et al. 2009). El tratamiento de células B primarias con HVEM activa el mecanismo inhibitorio de BTLA disminuyendo los niveles de fosforilación de la proteína tirosina quinasa Syk, reduciendo su actividad (Vendel et al. 2009). *Downstream* de Syk, la proteína de enlace de célula B (BLNK) y la fosfolipasa $C\gamma 2$ ($PLC\gamma 2$) también muestran niveles de fosforilación más bajos tras la señalización mediada por BTLA, lo que indica que se reduce la actividad de la cascada de señalización mediada por el BCR (Vendel et al. 2009). Para apoyar la idea de que BTLA atenúa la señalización a través del BCR mediada por Syk y BLNK, ha sido demostrado que la interacción HVEM-BTLA reduce la activación del factor NF- κ B que es dependiente de la señalización a través del BCR mediada por Syk y BLNK (Vendel et al. 2009). NF- κ B es un factor transcripcional requerido para la activación, la proliferación, y la respuesta inmunitaria efectora de las células B (Vendel et al. 2009). NF- κ B es traslocado al núcleo desde el citoplasma, al liberarse de I κ B con el que forma un complejo inactivo, tras la estimulación del BCR con anti-IgM. Este proceso se reduce en células tratadas con HVEM, indicando que BTLA bloquea la activación de NF- κ B reduciendo su localización nuclear (Vendel et al. 2009). Estos resultados apoyan el papel de HVEM como ligando supresor de la señalización mediada por BCR, al unirse al receptor co-inhibidor BTLA en *cis*, lo que conduce a la inhibición de la proliferación de las células B (Vendel et al. 2009).

Podría ser que las células de linfoma B A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} hubieran perdido la capacidad de auto-regular su crecimiento a través de la señalización negativa mediada por el receptor inhibitorio BTLA al unirse en *cis* con HVEM, lo que conduciría finalmente a una mayor proliferación *in vivo* del tumor. Esto podría explicar los datos preliminares que obtuvimos a día 28 post-implantación del tumor, en los que observamos un mayor número de células tumorales y un menor reclutamiento de leucocitos infiltrantes (TILs) en los nódulos tumorales del hígado formados por la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}. Aunque no hemos observado diferencias en la progresión del tumor A20 GFP⁺ WT en comparación con el tumor A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} en los órganos linfoides primarios y secundarios. Una

interpretación alternativa sería que el proceso de diseminación del tumor A20 estuviera gobernado por moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas, y que HVEM no jugase un papel en dicho proceso de diseminación de las células del tumor a los órganos linfoides (como discutimos en el punto 5.10). Además, hemos demostrado que la pérdida de expresión de HVEM en las células A20 GFP⁺ conduce a un descenso en la expresión de BTLA. Al reducirse los niveles de expresión de BTLA, disminuirían también las posibles interacciones en *trans* BTLA-HVEM que junto con la ausencia de la señalización en *cis* HVEM-BTLA, contribuirían a la pérdida del control intrínseco de la activación a través del BCR en respuesta a antígeno, y como resultado la célula tumoral estará más predispuesta a descontrolarse. Por lo que, la pérdida de expresión de HVEM impediría la señalización inhibitoria HVEM-BTLA en la configuración *cis* y limitaría la señalización en la configuración *trans*. Sin embargo, no hemos visto diferencias significativas *in vitro* en la tasa de duplicación de las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} en comparación con el linfoma B A20 GFP⁺ WT. Podría ser que las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} necesitaran no solo de la falta de señalización inhibitoria a través de BTLA, sino también de la estimulación antigénica *in vivo* del BCR y de la participación de otras células de apoyo como las células T CD4⁺ *helper* (T_H).

En las últimas fases del desarrollo del linfoma, a día 34 post-implantación del tumor, no fueron observadas diferencias en el número de células tumorales y de TILs en los nódulos tumorales hepáticos formados por la línea A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} en comparación con la línea A20 GFP⁺ WT. Esto puede ser debido a que las células A20 GFP⁺ WT, en etapas avanzadas del desarrollo del tumor, hayan conseguido escapar al control inhibitorio mediado por la interacción en *cis* HVEM-BTLA, y no veamos diferencias con respecto a las células de tumor A20 deficientes para HVEM. Además, las células A20 GFP⁺ WT expresan de por sí niveles relativamente bajos de HVEM, lo que les servirían como control intrínseco de su activación y proliferación en las etapas tempranas-intermedias del desarrollo del tumor, pero no les servirían en las etapas más avanzadas en las que el tumor habría evolucionado siendo capaz de rebasar este umbral de inactivación y asemejarse a las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-}.

Por otro lado, hay autores que han demostrado que la pérdida de expresión de HVEM cambia el microambiente apoyando el desarrollo del linfoma a través del incremento en la liberación de citoquinas de la familia del TNF (TNF- α , LT- α y LT- β) que son claves en la activación de células del estroma linfoide tales como las células

dendríticas foliculares (FDCs) y los fibroblastos reticulares (FRCs) (Boice et al. 2016). Estos autores han observado que el déficit en la expresión de HVEM por las células B promueve el reclutamiento de células T *helper* foliculares (T_{FH}), que expresan elevados niveles de BTLA, a través del aumento en la expresión de IL-4, TNF- α , y la linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ (Verdière et al. 2018). El TNF- α y la linfotóxina $\alpha 1\beta 2$ están involucrados en la diferenciación y mantenimiento del estroma linfoide, mientras que la IL-4 induce el aumento de la expresión del ligando CXCL12 en las células del estroma linfoide (Verdière et al. 2018). Estos estudios previos apoyarían el resultado del mayor número de células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} observado en los nódulos tumorales del hígado en comparación con la línea tumoral A20 GFP⁺ WT. Pero, no hemos estudiado el reclutamiento de células T_{FH} a los nódulos tumorales del hígado.

5.12.2. La interacción HVEM-BTLA en *trans* como mecanismo de inhibición de las células T efectoras

La vía de señalización HVEM-BTLA tiene un papel en la progresión y el desarrollo del linfoma B, pero el tema sigue siendo muy controvertido. Hay estudios que respaldan la idea de que la expresión de HVEM en las células de linfoma B constituye un mecanismo de escape del tumor a la acción del sistema inmunitario, al inhibir la acción citotóxica de las células T antitumorales a través de la señalización inhibitoria en *trans* de la unión de HVEM, expresado por las células del tumor, al receptor co-inhibidor BTLA, expresado en las células T (Upadhyay et al. 2015) (Lohr et al. 2012) (Bjordahl et al. 2014) (Launay et al. 2012). Nuestros resultados revelan que en la fase intermedia del desarrollo del tumor (a día 28 post-implantación), los nódulos tumorales del hígado formados por la línea tumoral A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} presentan un mayor número de células tumorales y un menor número de leucocitos infiltrantes en el tumor (TILs), con respecto a los nódulos formados por la línea tumoral A20 GFP⁺ WT. Lo que sugiere que la pérdida de expresión de HVEM le confiere una ventaja intrínseca al tumor A20, desde el punto de vista de la señalización HVEM-BTLA en *cis*, como explicamos en el punto 5.12.1. Pero, no podemos explicar qué ocurre con la pérdida de la señalización HVEM-BTLA en *trans* y su relación con las células del sistema inmunitario. Si HVEM fuera empleado por el tumor A20 para evadir la acción del sistema inmunitario, actuando como ligando supresor de la activación de las células T al unirse a BTLA expresado en estas células, su pérdida constituiría una desventaja para el tumor. Sin embargo, nuestros resultados

evidencian lo contrario porque el tumor A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} exhibe un menor reclutamiento de TILs y una mayor proporción de células tumorales en los nódulos tumorales del hígado en la fase intermedia del desarrollo del tumor, con respecto al tumor A20 GFP⁺ WT.

5.12.3. Perspectivas futuras

Las células de linfoma B A20 GFP⁺ WT tienen la peculiaridad de presentar niveles relativamente bajos de expresión de HVEM, lo que podría considerarse como una ventaja para su desarrollo, sin embargo expresan altos niveles del receptor BTLA. Hay autores que afirman que la estimulación del receptor BTLA en las células B de linfoma HVEM deficientes y que expresan altos niveles de BTLA, mediante células que expresan en su superficie HVEM o mediante la proteína HVEM soluble, conduce a la inhibición de la señalización a través del BCR (**Fig. 77**) (Boice et al. 2016) (Vendel et al. 2009). Quedan muchas incógnitas abiertas que requieren de estudio: ¿la pérdida de expresión de HVEM por las células de linfoma B murino A20 se puede considerar como una ventaja para el tumor? ¿El descenso en la expresión de BTLA tras la pérdida de expresión de HVEM podría considerarse una consecuencia indirecta que otorga mayor ventaja para la progresión del linfoma B A20 al disminuir las posibles interacciones inhibitorias HVEM-BTLA en *trans*? Las células A20 GFP⁺ WT expresan HVEM, pero lo hacen en niveles relativamente bajos y similares a las células B convencionales, ¿estimulando las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} con los niveles adecuados de HVEM se conseguiría reducir de manera significativa su proliferación y por lo tanto la progresión del tumor? (**Fig. 77**) (Boice et al. 2016).

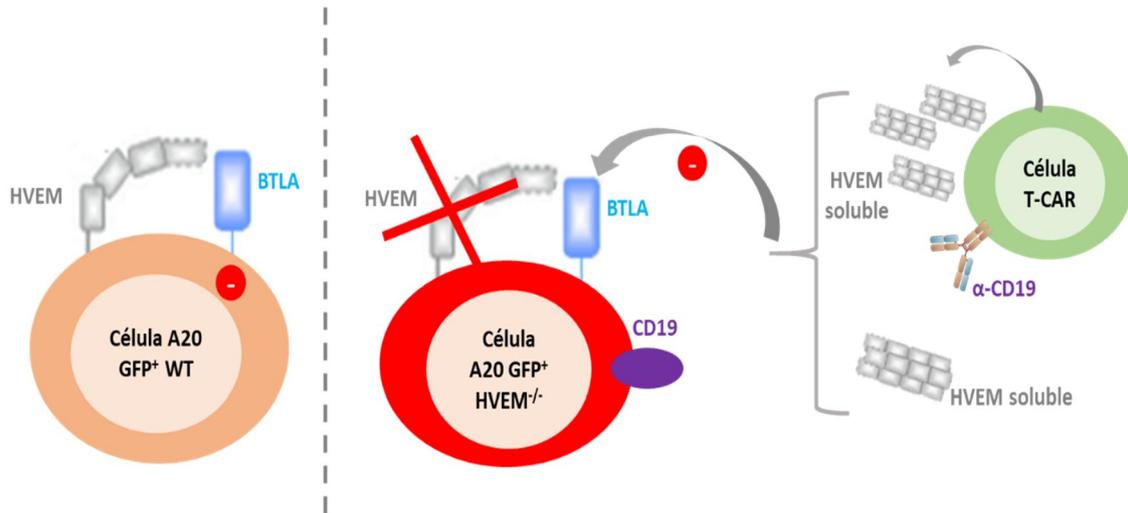


Figura 77. Perspectivas futuras en la vía de señalización HVEM-BTLA en el contexto del linfoma B murino A20. Las células A20 GFP⁺ WT expresan niveles relativamente bajos de HVEM y niveles altos de expresión de BTLA. En las células A20 GFP⁺ deficientes para la expresión de HVEM se ha observado una menor expresión de BTLA con respecto a las líneas A20 *wild type* para la expresión de HVEM. Nos planteamos si estimulando las células A20 GFP⁺ HVEM^{-/-} con los niveles adecuados de HVEM empleando la proteína HVEM soluble o células T modificadas para expresar la molécula HVEM soluble denominadas células T-CAR (receptor de antígeno quimérico), se podría revertir los efectos derivados de la pérdida de HVEM. Estas células T-CAR se unirían al receptor CD19 expresado en la superficie de las células de linfoma B murino mediante la expresión del anticuerpo anti-CD19, liberando localmente el ligando HVEM del receptor co-inhibidor BTLA (Boice et al. 2016). Nuestras pretensiones futuras serían inhibir la proliferación de las células tumorales y conseguir una menor progresión y desarrollo de la enfermedad, como ocurre en los estudios realizados con células de linfoma folicular (Boice et al. 2016).

VI. Conclusiones

6.- CONCLUSIONES

6.1. Establecimiento de un biomodelo murino tumoral hematopoyético con marcaje estable de GFP que permite monitorizar la progresión tumoral *in vivo*.

6.2. La eliminación del péptido señal de la proteína HVEM mediante CRISPR-Cas9 impide la expresión de HVEM de membrana en el tumor A20.

6.3. La ausencia de expresión de HVEM no altera la actividad replicativa *in vitro* del tumor A20, pero reduce su expresión en BTLA.

6.4. La pérdida de expresión de HVEM en el tumor no modifica el patrón de diseminación y progresión tumoral en los diferentes órganos hematopoyéticos primarios y secundarios.

6.5. La diseminación sistémica del tumor en la fase tardía del desarrollo tumoral promueve la linfopoyesis de células B residentes del timo.

6.6. La deficiencia en la expresión de HVEM por las células B de linfoma A20 altera el reclutamiento de leucocitos infiltrantes en los nódulos tumorales del hígado en la fase intermedia del desarrollo del tumor.

VII. Bibliografía

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Adam, J.K., Odhav, B. & Bhoola, K.D., 2003. Immune responses in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 99, pp.113–132.
- Agata, Y. et al., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8(5), pp.765–772.
- Alizadeh, A.A. et al., 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769), pp.503–11.
- Amitai, G. & Sorek, R., 2016. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, pp.1–10.
- Anastasov, N. et al., 2009. Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer. *Journal of Hematopathology*, 2(1), pp.9–19.
- Anderson, A.C. et al., 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*, 44(5), pp.989–1004.
- ATCC (University Blvd. Manassas), 2014. *ANIMAL CELL CULTURE BASICS: tips and techniques for continuous cell lines*,
- Azuma, T. et al., 1998. Cross-Linking CD21/CD35 or CD19 Increases Both B7-1 and B7-2 Expression on Murine Splenic B Cells. *The Journal of Immunology*, 160, pp.1565–1572.
- Batista, F.D. & Harwood, N.E., 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*, 9(1), pp.15–27.
- Bennett, M. et al., 1995. Hybrid resistance: “Negative” and “positive” signaling of murine natural killer cells. *Seminars in Immunology*, 7(2), pp.121–127.
- Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R., 2011. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*, 45, pp.273–97.
- Bjordahl, R.L. et al., 2014. Lymphotoxin Network Pathways Shape the Tumor Microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 25(2), pp.222–229.
- Blankenstein, T. et al., 2012. The determinants of tumour immunogenicity. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp.307–313.
- Boice, M. et al., 2016. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell*, 167(2), pp.405–418.

- Boyd, S.D. et al., 2013. Selective immunophenotyping for diagnosis of B-cell neoplasms: immunohistochemistry and flow cytometry strategies and results. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*, 21(2), pp.116–131.
- Browne, E.P., 2012. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*, 136(4), pp.370–9.
- Bruhns, P., 2012. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 119(24), pp.5640–9.
- Burger, J.A. et al., 2009. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*, 114(16), pp.3367–3375.
- Busslinger, M., 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol*, 22, pp.55–79.
- Cai, G. & Freeman, G.J., 2009. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunological Reviews*, 229(1), pp.244–258.
- Cann, A.J., 2005. *Principles of Molecular Virology Department of Microbiology and Immunology. University of Leicester*,
- Castillo, J.J. et al., 2015. CD20-negative diffuse large B-cell lymphomas: Biology and emerging therapeutic options. *Expert Review of Hematology*, 8(3), pp.343–354.
- Chaise, C. et al., 2007. [F-18]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography as a tool for early detection of immunotherapy response in a murine B cell lymphoma model. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 56(8), pp.1163–71.
- Cherukuri, A. et al., 2001. The CD19/CD21 Complex Functions to Prolong B Cell Antigen Receptor Signaling from Lipid Rafts. *Immunity*, 14, pp.169–179.
- Cheung, K.-J.J. et al., 2010. Acquired TNFRSF14 Mutations in Follicular Lymphoma Are Associated with Worse Prognosis. *Cancer Research*, 70(22), pp.9166–9174.
- Cheung, T.C. et al., 2009. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), pp.6244–9.
- Clontech Laboratories, 2015. *Lenti-X™ Lentiviral Expression System User Manual*,
- Cong, L. et al., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), pp.819–823.
- Corthay, A., 2006. A Three-cell Model for Activation of Naïve T Helper Cells.

- Scandinavian Journal of Immunology*, 64(2), pp.93–96.
- Cradick, T.J. et al., 2014. COSMID: A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Molecular therapy. Nucleic Acids*, 3, pp.1–10.
- Cribbs, A.P. et al., 2013. Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC Biotechnology*, 13(98), pp.1–8.
- Croft, M., 2005. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA. *Trends in Immunology*, 26(6), pp.292–294.
- Curran, E.K., Godfrey, J. & Kline, J., 2017. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends in Immunology*, 38(7), pp.513–525.
- D. Heckel et al., 2014. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Biotechnology*, 32(9), pp.941–946.
- Dai, W.-J. et al., 2016. CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 5(8), p.e349.
- Daniel S. Chen and Ira Mellman, 2017. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541, pp.321–330.
- Darlington, G.J. et al., 1980. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 64(4), pp.809–19.
- Davis, H.E., Morgan, J.R. & Yarmush, M.L., 2002. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical chemistry*, 97(2–3), pp.159–72.
- Desjardins, P. & Conklin, D., 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, (45), pp.1–4.
- Dighe, A.S. et al., 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6), pp.447–56.
- Donnou, S. et al., 2012. Murine Models of B-Cell Lymphomas: Promising Tools for Designing Cancer Therapies. *Advances in Hematology*, 2012(July 2015), pp.1–13.
- Drillenburg, P. & Pals, S.T., 2000. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*, 95(6), pp.1900–1910.
- Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D., 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, pp.137–148.

- Elpek, K.G. et al., 2007. CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *The Journal of immunology*, 178(11), pp.6840–6848.
- Flemr, M. & Bu, M., 2015. Single-Step Generation of Conditional Knockout Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, 12, pp.709–716.
- Forrest, J.C. et al., 2008. Establishment of B-Cell Lines Latently Infected with Reactivation-Competent Murine Gammaherpesvirus 68 Provides Evidence for Viral Alteration of a DNA Damage-Signaling Cascade. *Journal of Virology*, 82(September 2016), pp.7688–7699.
- Gatter, K. & Pezzella, F., 2009. Diffuse large B-cell lymphoma. *Diagnostic Histopathology*, 16(2), pp.69–81.
- Gertner-Dardenne, J. et al., 2013. The co-receptor BTLA negatively regulates human V γ 9V δ 2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood*, 122(6), pp.922–931.
- Grey, S.T. et al., 2014. A Role for Intrathymic B Cells in the Generation of Natural Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 193(193), pp.170–176.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), pp.883–899.
- Guschin D.Y., Waite A.J., Katibah G.E., Miller J.C., Holmes M.C., R.E.J., 2010. A Rapid and General Assay for Monitoring Endogenous Gene Modification. In *Engineered Zinc Finger Proteins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 649. Humana Press, Totowa, NJ.
- Guzzardo, P.M. et al., 2015. A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nature Communications*, pp.4–10.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), pp.557–80.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W. & Dorshkind, K., 2007. The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage. *Immunity*, 26(6), pp.703–714.
- Hashimoto, Y. et al., 2002. B-cell development in the thymus is limited by inhibitory signals from the thymic microenvironment. *Blood*, 100(10), pp.3504–11.
- Hoffman, W., Lakkis, F.G. & Chalasani, G., 2016. B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 11(1), pp.137–54.

- Hooper, N.M., Karran, E.H. & Turner, a J., 1997. Membrane protein secretases. *The Biochemical journal*, 321, pp.265–279.
- Horvath, P. & Barrangou, R., 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), pp.167–170.
- Hsu, P.D. et al., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.827–832.
- Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157, pp.1262–1278.
- Hua, Z. & Hou, B., 2013. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(2), pp.103–106.
- Jain, A. & Pasare, C., 2017. Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *The Journal of Immunology*, 198(10), pp.3791–3800.
- Janeway A. C., Travers P., Walport M., S.M., 2001. *Immunobiology of Janeway*,
- Jiang, W. et al., 2007. TLR9 stimulation drives naive B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *European Journal of Immunology*, 37(8), pp.2205–2213.
- Kabadi, A.M. et al., 2014. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Research*, 42(19), pp.1–11.
- Kaplan, D.H. et al., 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp.7556–61.
- Kim, K.J. et al., 1979. Establishment and Characterization of BALB/c Lymphoma Lines with B Cell Properties. *The Journal of Immunology*, 122, pp.549–554.
- Kim, T.K., 2015. T test as a parametric statistic. *Korean Journal of Anesthesiology*, 68(6), pp.540–6.
- Kiss, M. et al., 2018. Myeloid cell heterogeneity in cancer: not a single cell alike. *Cellular Immunology*, 330, pp.188–201.
- Kitamura, T. et al., 2003. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics. *Experimental Hematology*, 31(11), pp.1007–1014.
- Kojima, R. et al., 2011. Molecular basis for herpesvirus entry mediator recognition by the human immune inhibitory receptor CD160 and its relationship to the cosignaling molecules

- BTLA and LIGHT. *Journal of molecular biology*, 413(4), pp.762–72.
- Koyama, M. et al., 1997. CD79 alpha/CD79 beta heterodimers are expressed on pro-B cell surfaces without associated mu heavy chain. *International immunology*, 9(11), pp.1767–72.
- Kurts, C., Robinson, B.W.S. & Knolle, P.A., 2010. Cross-priming in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 10(6), pp.403–414.
- Kutner, R.H., Zhang, X. & Reiser, J., 2009. Production , concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature protocols*, 4(4), pp.495–505.
- Launay, E. et al., 2012. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia*, 26(3), pp.559–562.
- Lebien, T.W., Thomas & Tedder, F., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112, pp.1570–1580.
- Li, S., Young, K.H. & Medeiros, L.J., 2018. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*, 50, pp.74–87.
- Lieping Chen and Dallas B. Flies, 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4), pp.227–242.
- Lin, Y. et al., 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 42(11), pp.7473–7485.
- Ljunggren, H.G. & Karre, K., 1990. In search of the missing self: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11(7), pp.237–244.
- Loddenkemper, C. et al., 2007. Frequency and diagnostic patterns of lymphomas in liver biopsies with respect to the WHO classification. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 450(5), pp.493–502.
- Lohr, J.G. et al., 2012. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), pp.3879–84.
- Lu, F.T. et al., 2015. Thymic B cells promote thymus-derived regulatory T cell development and proliferation. *Journal of Autoimmunity*, 61, pp.62–72.
- Luger, D. et al., 2013. Expression of the B-cell receptor component CD79a on immature myeloid cells contributes to their tumor promoting effects. *PloS one*, 8(10), p.e76115.
- Mahfouz, M.M., Piatek, A. & Stewart, C.N., 2014. Genome engineering via TALENs and

- CRISPR/Cas9 systems: Challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8), pp.1006–1014.
- Marcus, A. et al., 2014. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Advances in immunology*, 122, pp.91–128.
- McGrath, M.M. & Najafian, N., 2012. The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. *Frontiers in Immunology*, 3, pp.1–17.
- Mocellin, S., Benna, C. & Pilati, P., 2013. Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 24(2), pp.147–161.
- Mojica, F.J.M. et al., 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp.174–182.
- Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K., 2012. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*, 36(1), pp.13–21.
- Moyron-Quiroz, J.E. et al., 2002. Expression and function of CD22, a B-cell restricted molecule. *Scandinavian Journal of Immunology*, 55(4), pp.343–351.
- Murphy, K.M., Nelson, C. a & Sedý, J.R., 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nature reviews. Immunology*, 6(9), pp.671–81.
- Neeson, P. & Paterson, Y., 2004. A new multi-parameter flow cytometric assay for monitoring lymphoma growth and spread in a pre-clinical murine model for human lymphoma. *Cytometry Part A*, 60(1), pp.8–20.
- Otsuka, M. et al., 2004. Role of CD21 antigen in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical significance. *British Journal of Haematology*, 127(4), pp.416–424.
- Pals, S.T., De Gorter, D.J.J. & Spaargaren, M., 2007. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood*, 110(3), pp.3102–3111.
- Pardoll, D., 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp.807–839.
- Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp.252–264.
- Park, J.J. et al., 2012. Expression of anti-HVEM single-chain antibody on tumor cells induces tumor-specific immunity with long-term memory. *Cancer Immunol Immunother*, 61(2), pp.203–214.
- Parmiani, G. et al., 2007. Unique Human Tumor Antigens: immunobiology and use in

- clinical trials. *The Journal of Immunology*, 178, pp.1975–1979.
- Pasero, C. et al., 2012. The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(4), pp.478–485.
- Pasero, C. & Olive, D., 2013. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunology Letters*, 151(1–2), pp.71–75.
- Passineau, M. et al, 2005. The natural history of a novel, systemic, disseminated model of syngeneic mouse B-cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, 46(11), pp.1627–1638.
- Peggs, K.S. & Allison, J.P., 2005. Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. *British journal of haematology*, 130(6), pp.809–824.
- Peng, R., Lin, G. & Li, J., 2016. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS Journal*, 283(7), pp.1218–1231.
- Perera, J. et al., 2013. Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *PNAs*, 110(42), pp.17011–17016.
- Perera, J. & Huang, H., 2015. The development and function of thymic B cells. *Cell Mol Life Sci*, 72(14), pp.2657–2663.
- Phelan, M.C. & Lawler, G., 2001. Cell Counting. In *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. Appendix 3A.
- Potter, H. & Heller, R., 2003. Transfection by electroporation. *Current protocols in Molecular Biology*, 9, p.Unit 9.3.
- Pradeu, T. & Carosella, E.D., 2006. On the definition of a criterion of immunogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp.17858–61.
- Ran, F.A. et al., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), pp.2281–308.
- Rath, D. et al., 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 17, pp.119–128.
- Reiser, J. & Banerjee, A., 2016. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *Journal of Immunology Research*, pp.1–14.
- Ribatti, D., 2017. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget*, 8(4), pp.7175–7180.

Riccardi, C. & Nicoletti, I., 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), pp.1458–1461.

del Rio, M., Kaye, J. & Rodriguez-Barbosa, J.I., 2010. Detection of protein on BTLA low cells and in vivo antibody-mediated down-modulation of BTLA on lymphoid and myeloid cells of C57BL/6 and BALB/c BTLA allelic variants. *Immunobiology*, 215(7), pp.570–578.

del Rio, M.L. et al., 2010. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *Journal of leukocyte biology*, 87(2), pp.223–235.

del Rio, M.L. et al., 2016. Immunotherapeutic targeting of LIGHT/LT β R/HVEM pathway fully recapitulates the reduced cytotoxic phenotype of LIGHT-deficient T cells. *mAbs*, 8(3), pp.478–490.

Del Rio, M.L. et al., 2008. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. *Transplant International*, 21, pp.1015–1028.

Rolstad, B., 2014. The early days of NK cells: An example of how a phenomenon led to detection of a novel immune receptor system - lessons from a rat model. *Frontiers in Immunology*, 5, pp.1–8.

Ryungsa Kim et al., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121, pp.1–14.

Sanjana, N.E., Shalem, O. & Zhang, F., 2015. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, 11(8), pp.783–784.

Schroeder, H.W. & Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), pp.41–52.

Schuster, M. et al., 2006. Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*, 1(2), pp.138–147.

Scott, D.W. & Gascoyne, R.D., 2014. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nature Reviews Cancer*, 14(8), pp.517–534.

Sedy, J., Bekiaris, V. & Ware, C.F., 2015. Tumor Necrosis Factor Superfamily in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 23, pp.1–18.

Sedy, J.R. et al., 2013. CD160 Activation by Herpesvirus Entry Mediator Augments Inflammatory Cytokine Production and Cytolytic Function by NK Cells. *The Journal of Immunology*, 191(2), pp.828–836.

Šedý, J.R., Spear, P.G. & Ware, C.F., 2008. Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nat Rev Immunol*, 8(11), pp.861–873.

- Serafini, M., Naldini, L. & Introna, M., 2004. Molecular evidence of inefficient transduction of proliferating human B lymphocytes by VSV-pseudotyped HIV-1-derived lentivectors. *Virology*, 325(2), pp.413–24.
- Seruggia, D. & Montoliu, L., 2014. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic research*, 23(5), pp.707–716.
- Shui, J.-W., Steinberg, M.W. & Kronenberg, M., 2011. Regulation of inflammation, autoimmunity, and infection immunity by HVEM-BTLA signaling. *Journal of leukocyte biology*, 89(4), pp.517–523.
- De Silva, N.S. & Klein, U., 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), pp.137–148.
- Sotomayor, E.M. et al., 2001. Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Immunobiology*, 98, pp.1070–1077.
- Spurrell, E.L. & Lockley, M., 2014. Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics. *ecancermedicalscience*, 8, p.441.
- Steinberg, M., Cheung, T.C. & Ware, C.F., 2011. The Signaling Networks of the Herpesvirus Entry Mediator (TNFRSF14) in Immune Regulation. *Immunological Reviews*, 244(1), pp.169–187.
- Stewart, S.A. et al., 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 9(4), pp.493–501.
- Stiles, K.M. et al., 2010. Herpes simplex virus glycoprotein D interferes with binding of herpesvirus entry mediator to its ligands through downregulation and direct competition. *Journal of virology*, 84(22), pp.11646–60.
- Street, S.E.A. et al., 2004. Innate Immune Surveillance of Spontaneous B Cell Lymphomas by Natural Killer Cells and $\gamma\delta$ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(6), pp.879–884.
- Sun, L., Lutz, B.M. & Tao, Y.-X., 2016. The CRISPR/Cas9 system for gene editing and its potential application in pain research. *Transl Perioper Pain Med*, 1(3), pp.22–33.
- Sun, Y. et al., 2009. B and T Lymphocyte Attenuator Tempers Early Infection Immunity. *The Journal of Immunology*, 183, pp.1946–1951.
- Suryani, S. et al., 2010. Differential expression of CD21 identifies developmentally and

- functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood*, 115(3), pp.519–529.
- Tan, T.-T. & Coussens, L.M., 2007. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 19, pp.209–216.
- Tanimoto, K. et al., 2009. Clinical significance of co-expression of CD21 and LFA-1 in B-cell lymphoma. *International Journal of Hematology*, 89, pp.497–507.
- Thibult, M.-L. et al., 2013. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *International Immunology*, 25(2), pp.129–137.
- Todo, K. et al., 2014. IgG1 cytoplasmic tail is essential for cell surface expression in Ig β down-regulated cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(3), pp.572–577.
- Tu, T.C. et al., 2015. CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(3), pp.415–429.
- Upadhyay, R. et al., 2015. Lymphoma: Immune evasion strategies. *Cancers*, 7(2), pp.736–762.
- Vendel, A.C. et al., 2009. B and T Lymphocyte Attenuator Regulates B Cell Receptor Signaling by Targeting Syk and BLNK. *The Journal of Immunology*, 182(3), pp.1509–1517.
- Verdière, L., Mourcin, F. & Tarte, K., 2018. Microenvironment signaling driving lymphomagenesis. *Current Opinion in Hematology*, 25(4), pp.335–345.
- Vesely, M.D. et al., 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp.235–271.
- De Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M., 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6, pp.24–37.
- Wang, Y. et al., 2005. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *The Journal of clinical investigation*, 115(3), pp.711–717.
- Ward-Kavanagh, L. et al., 2016. The TNF Receptor Superfamily in Costimulating and Coinhibitory Responses. *Immunity*, 44(5), pp.1005–1019.
- Ware, C.F. & Sedy, J., 2011. TNF SUPERFAMILY NETWORKS: Bidirectional and Interference Pathways of the Herpesvirus Entry Mediator (TNFSF14). *Current Opinion in Immunology*, 23(5), pp.627–631.
- Wartewig, T. et al., 2017. PD-1 is a haploinsufficient suppressor of T cell lymphomagenesis. *Nature*, 552(7683), pp.121–125.

- Watanabe, N. et al., 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature Immunology*, 4(7), pp.670–679.
- Wiles, M. V et al., 2015. CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design. *Mammalian Genome*, 26(9), pp.501–510.
- Wilson, C.C. & Schooley, R.T., 2017. Host Responses to Infection. In *Introduction to Infectious Diseases*. pp. 26–39.
- Wu, T.H. et al., 2007. B and T lymphocyte attenuator interacts with CD3 ζ and inhibits tyrosine phosphorylation of TCR ζ complex during T-cell activation. *Immunology and Cell Biology*, 85(8), pp.590–595.
- Xie, Y., Pittaluga, S. & Jaffe, E.S., 2015. The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Semin Hematol.*, 52(2), pp.57–66.
- Xu-Monette, Z.Y., Zhou, J. & Young, K.H., 2018. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*, 131, pp.68–83.
- Yokoyama, W.M. & Kim, S., 2006. How Do Natural Killer Cells Find Self to Achieve Tolerance? *Immunity*, 24, pp.249–257.
- Zakrzewski, J.L. et al., 2008. Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nature biotechnology*, 26(4), pp.453–61.
- Zhi-Zhang Yang, and S.M.A., 2012. The Tumor Microenvironment in Follicular Lymphoma. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 10(12), pp.810–818.
- Zilberberg, J., Feinman, R. & Korngold, R., 2015. Strategies for the identification of T cell-recognized tumor antigens in hematological malignancies for improved graft-versus-tumor responses after allogeneic blood and marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(6), pp.1000–7.
- Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G., 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), pp.715–727.