

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA.

*La tetraspanina 33 (TSPAN33) en
exosomas generados por células
presentadoras de antígeno.*

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

Presenta:

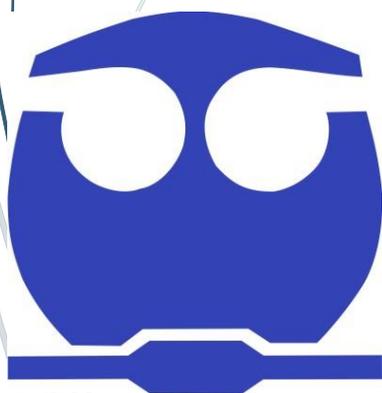
RODRIGO CERVANTES DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS:

JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd.Mx

2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN.

VOCAL: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ.

SECRETARIO: JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO.

1er SUPLENTE: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ.

2do SUPLENTE: ENRIQUE DE LEÓN LARA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL SIGUIENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE LA RED DE
APOYO A LA INVESTIGACIÓN.

COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO.

SUSTENTANTE:

RODRIGO CERVANTES DÍAZ.



AGRADECIMIENTOS.

Investigación realizada gracias al apoyo del programa UNAM.DGAPA-PAPIIT IA204316 al igual que el programa 240314 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.



ÍNDICE.

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Las tetraspaninas.	2
1.2. Estructura de las tetraspaninas.	2
1.3. Microdominios ricos en tetraspaninas (TEMs).	5
1.4. Función de la tetraspaninas.	6
1.5. Los exosomas.	7
1.6. Biogénesis de los exosomas.	8
1.7. Composición de los exosomas.	9
1.8. Función de los exosomas.	10
1.9. Antecedente directo.	12
II. JUSTIFICACIÓN.	14
III. HIPÓTESIS.	14
IV. OBJETIVO GENERAL.	14
4.1. Objetivos particulares.	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	15
5.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH8B.	15
5.2. Obtención de plásmido con Plasmid Maxi-Prep kit.	16
5.3. Análisis de restricción de DNA.	16
5.4. Transfección de células B por electroporación.	17
5.5. Ensayos de fluorescencia de células transfectantes	17
5.6. Cultivos celulares.	18
5.7. Métodos para aislamiento de exosomas.	19
5.8. Microscopia electrónica de exosomas.	20
5.9. Cuantificación de proteínas, SDS-PAGE y Western blot.	20
5.10. Fenotipificación de exosomas a través de FACS.	21



VI. RESULTADOS.	22
6.1. Obtención y digestión de plásmidos pEGFP-N1 y pTSPAN33-EGFP.	22
6.2. Transfección de células Raji y obtención de clonas.	22
6.3. Localización de la TSPAN33 por microscopia confocal.	23
6.4. Aislamiento de exosomas.	24
6.5. Caracterización por microscopia electrónica de exosomas.	26
6.6. Identificación de TSPAN33 en exosomas generados por clonas de la línea celular Raji.	27
6.7. Fenotipificación de MHC II en exosomas.	28
6.8. Cuantificación de exosomas.	28
VII. DISCUSIÓN.	29
VIII. CONCLUSIONES.	35
LISTA DE ABREVIATURAS	36
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	37
IX. BIBLIOGRAFÍA	38

La tetraspanina 33 (TSPAN33) en exosomas generados por células presentadoras de antígeno.

Resumen.

La tetraspanina 33 (TSPAN33), es hasta la fecha, el último miembro de la familia de las tetraspaninas que se ha identificado en humanos y mamíferos. En un inicio, la TSPAN33 fue detectada en una subpoblación de progenitores eritroides de médula ósea de ratón. Al ser evaluado el efecto de la ausencia de la proteína en un modelo murino deficiente de la TSPAN33 se observaron alteraciones en la eritropoyesis, esplenomegalia, así como una considerable disminución de células B [1].

Varios miembros de la familia de las tetraspaninas se han caracterizado en vesículas aisladas de fluidos corporales, pero la presencia de la TSPAN33 en estas vesículas continúa sin aclararse [2].

En esta tesis, se compararon varios métodos para el aislamiento de exosomas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares para seleccionar el método más eficiente, para así estandarizarlo y obtener el mayor rendimiento de los mismos. Las clonas de células utilizadas (generadas a partir de la línea celular Raji), sobre expresaban a la TSPAN33 acompañada de la proteína verde fluorescente (EGFP), debido a la transfección de éstas con un plásmido que les proporcionaba esta característica.

Una vez estandarizado el método de aislamiento de exosomas, se continuó con la caracterización de las vesículas utilizando la técnica de microscopía electrónica (para asegurar la presencia de nano vesículas en las muestras obtenidas), Western blot (para determinar la presencia de la TSPAN33 en los exosomas aislados), y citometría de flujo (para observar la presencia de un marcador de nano vesículas generadas por la línea celular Raji).

Estos experimentos permitieron observar la adecuada purificación de nano vesículas al observar las muestras en el microscopio electrónico, por otro lado en el Western blot realizado a los lisados de exosomas, se observó indirectamente la presencia de la TSPAN33 al emplear un anticuerpo dirigido contra la EGFP, finalmente el análisis fenotípico de nano vesículas a través de citometría de flujo demostró la presencia de HLA-DR (MHC II), marcador expresado en abundancia en nano vesículas generadas por células Raji [3].

1. Introducción.

1.1. Las tetraspaninas.

Las tetraspaninas son una familia de proteínas con cuatro dominios transmembranales (TM), que varían en tamaño, de los 200 a los 300 aminoácidos. Estas proteínas evolutivamente conservadas se encuentran involucradas en la regulación de la morfología celular, motilidad, eventos de fusión y señalización celular [4,5,7].

Hasta la fecha, gracias a la secuenciación genómica de varios organismos, se ha descrito la existencia de un número considerable de miembros pertenecientes a la familia de las tetraspaninas en cada sujeto estudiado, como lo son *Drosophila melanogaster* con 37 miembros, *Caenorhabditis elegans* con 20 miembros y el humano y ratón con 33 miembros [6,8].

1.2. Estructura de las tetraspaninas.

Las tetraspaninas son proteínas que se caracterizan por cruzar la membrana celular cuatro veces, por lo que cuentan con cuatro dominios transmembranales (4-TM). De esta manera el extremo N y C terminal se localizan en la porción citoplasmática de la célula. Debido a este arreglo espacial, las tetraspaninas cuentan con un bucle extracelular pequeño, SEL/ECL1 por sus siglas en inglés, con un tamaño de 13 a 31 aa, entre los dominios TM1 y TM2. Un bucle intracelular pequeño localizado entre los dominios TM2 y TM3, de 4 aa aproximadamente. Por último, presentan un bucle extracelular grande, LEL/ECL2 con un tamaño de 70- 130 aa, situado entre los dominios TM3 y TM4. Sin embargo, la característica que permite diferenciar a las tetraspaninas de otras proteínas que poseen cuatro dominios transmembranales, como CD20, son el residuo de cisteína ubicado cerca del dominio TM4 y los motivos CCG y PxxCC, que están localizados en distintas regiones del LEL.

Tabla 1. Lista de tetraspaninas de humano y sus nombres alternativos. [9]

Nombre oficial (HGNC)	Nombres alternativos
TSPAN1	TM4-C, NET-1, TSP-1
TSPAN2	FLJ12082, TSN2, TSP-2
TSPAN3	TM4-A, TM4SF8.1,2, TSP-3
TSPAN4	TM4SF7, NAG-2, TSP-4
TSPAN5	NET-4, TSP-5
TSPAN6	T245, TM4SF6, TSP-6
TSPAN7	CD231, A15, MXS1, CCG-B7, TALLA-1, TM4SF2, DXS1692E
TSPAN8	TM4SF3, CO-029, D6.1
TSPAN9	NET-5
TSPAN10	Oculospanin (OCSP)
TSPAN11	Human form may not be expressed; mouse only (CD151-like)
TSPAN12	TM4SF12, NET-2
TSPAN13	NET-6, FLJ22934, TM4SF13
TSPAN14	DC-TM4F2, BC002920, NEW2, TMSF14
TSPAN15	NET-7, 2700063A19Rik, TMSF15
TSPAN16	TM4-B, TM-8, TMSF16
TSPAN17	CAD35489, FBox23 (FBX23), SB134, BC067105, NEW3, TM4F17
TSPAN 18	BAB55318, AK027715.1, NEW6
TSPAN19	XP_084868
TSPAN20	Uroplakin lb (UPIb), UPK1
TSPAN21	Uroplakin Ia (UP1a), UPIA, UPKA, MGC14388
TSPAN22	Peripherin, RDS, RP7, AVMD, PRPH, AOFMD, PRPH2
TSPAN23	Rom1, ROSP1
TSPAN24	CD151 (2 variants; UTR) PETA3, SFA1, gp27
TSPAN25	CD53, MOX44
TSPAN26	CD37, GP52-40
TSPAN27	CD82, Kangai1, R2, 4F9, C33, IA4, ST6, GR15, KAI1, SAR2
TSPAN28	CD81, TAPA-1, S5.7
TSPAN29	CD9, BA2, P24, GIG2, MIC3, MRP-1, BTCC-1, DRAP-27
TSPAN30	CD63, MEL1, ME491, granulophysin, LAMP3, OMA81H, MLA1, neuroglandular Ag (NGA) LIMP
TSPAN31	SAS
TSPAN32	TSSC6 (3 variants; UTR) PHEMX, MGC22455
TSPAN33	MGC50844, Penumbra, New7

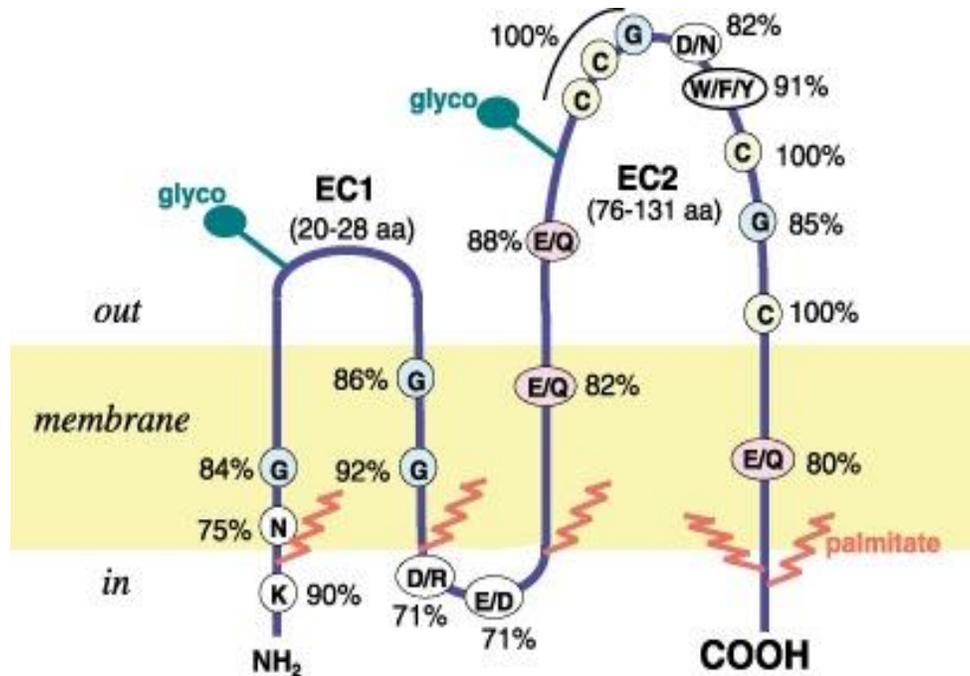


Figura 1 [10]. Estructura de una tetraspanina, donde se indican los dominios conservados, sitios de palmitoilación y glicosilación (glyco). Cabe remarcar que no todas las tetraspaninas sufren estas modificaciones en mismo grado (Lazo PA. 2007)

A estas características se suma el análisis cristalográfico del LEL (a partir de la secuencia de la tetraspanina CD82), que permitió definir una estructura base para este bucle, demostrando que el LEL cuenta con subdivisiones, una región constante que cuenta con 3 α -hélices (A, B y E) y una región variable de baja polaridad (2 α -hélices: C y D) (Figura 2.).

Esta última región, se cree, que es donde ocurren la mayoría de las interacciones proteína- proteína, ya sea TSPAN-TSPAN o TSPAN-otras proteínas. [6,7,11]

Otra característica relevante son las palmitoilaciones que son modificaciones post-traduccionales en las que los residuos de cisteínas, se unen covalentemente a ácidos grasos a través de un enlace tioéster a las que varias tetraspaninas son susceptibles (CD9, CD37, CD53, CD81, CD82 y CD151), dándoles una característica hidrofóbica que les permite estabilizarse, asociarse y organizarse para posteriormente interactuar con complejos ricos en colesterol (Figura 1) [11,13].

Por último, los dominios transmembranales (TM), son las regiones más conservadas entre las tetraspaninas [11]. En ellos se encuentran varios residuos polares con un alto porcentaje de conservación entre miembros de la familia (Figura 1) y a los que se les pueden atribuir las interacciones entre TMs vecinos, así como asociaciones laterales con otras tetraspaninas o con proteínas que no pertenecen a esta familia [6, 11,12].

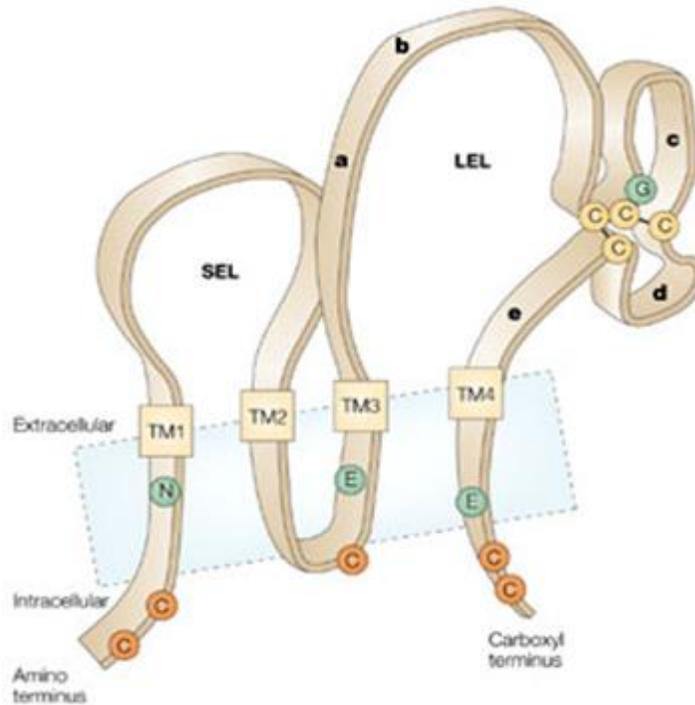


Figura 2 [Modificado de Levy S, 2005] [6]. Estructura del LEL, donde se observa la región constante de las hélices A, B y E, así como la región variable de las hélices C y D flanqueadas por el motivo CCG y residuos de cisteínas.

1.3. Microdominios ricos en tetraspaninas (TEMs).

Los microdominios ricos en tetraspaninas o TEMs, son regiones en la membrana celular que contienen varias tetraspaninas que se encuentran asociadas las unas con las otras, o con proteínas con las que se están relacionando individualmente (no tetraspaninas) [6]. Estos microdominios son muy distintos a las balsas lipídicas (principal tipo de microdominio con el que se comparan), pues estos últimos tienen un contenido de tetraspaninas casi nulo y el contenido alto de colesterol es

fundamental para poder ser formados. A diferencia de las balsas lipídicas, los TEMs poseen un alto número de tetraspaninas asociadas a otras proteínas o a las mismas tetraspaninas (Figura 3); estas interacciones les confieren a los TEMs cierta resistencia a detergentes, como lo son NP-40 y Tritón X-100, siendo estables a bajas concentraciones de colesterol [4,6]. Estas asociaciones ocurren tanto en vesículas de transporte antes de ser incorporadas a TEMs [10], como en la biosíntesis de las vesículas [4].

Debido a que las tetraspaninas se encuentran en distintos tipos celulares [4], la composición de los TEMs es altamente heterogénea, por lo que cada TEM presenta una complejidad y función distinta, dictadas directamente por la capacidad de organización de las tetraspaninas.

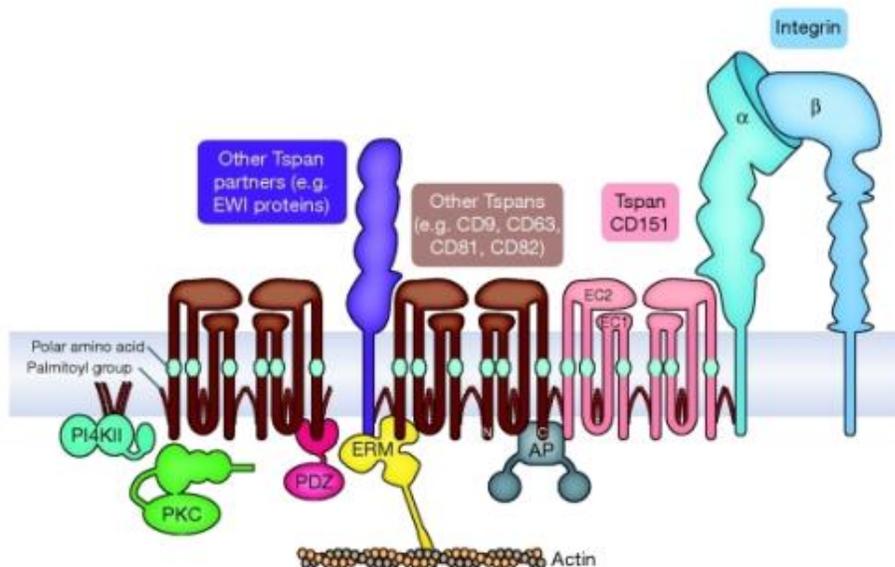


Figura 3. Proteínas que pueden asociarse a las tetraspaninas en un TEM como lo son integrinas; complejos proteicos de señalización como lo son PKC o PI4KII; proteínas de andamiaje como EWI, entre otras [Lazo PA, 2007].

1.4. Función de las tetraspaninas.

Por medio de las asociaciones laterales previamente mencionadas, las tetraspaninas pueden modular, estabilizar o prevenir que las moléculas asociadas a éstas lleven a cabo su función, como lo son penetración celular, invasión y fusión [13].

La relevancia de las tetraspaninas en la motilidad, yace en gran medida a su capacidad de asociarse con integrinas (moléculas de adhesión que modulan interacciones entre células), ya que las tetraspaninas promueven la migración celular a través de la compartimentalización, internalización y reciclaje de las integrinas, así como la modulación de la actividad de las integrinas durante el “spreading” celular [13].

Recientemente, se ha observado que las tetraspaninas se encuentran en vesículas generadas por diversos tipos celulares [2,13]. Estas vesículas denominadas exosomas, pueden realizar diversas funciones como la secreción alternativa de proteínas, presentación de antígeno, servir como transporte de diversos tipos de RNA, entre otras [2]. Debido a que las tetraspaninas se encuentran altamente concentradas en exosomas se puede especular que están involucradas en los fenómenos de migración, fusión de membranas, reciclaje, morfogénesis y señalización que se conservan en los exosomas y que les confieren las funciones previamente mencionadas [13].

1.5. Los exosomas.

En la última década, los estudios enfocados a las vesículas bioactivas han aumentado, especialmente enfocados a la caracterización de exosomas. Estas vesículas se caracterizan por ser formadas en cuerpos multivesiculares (MVB por sus siglas en inglés), que posteriormente se fusionarán con la membrana plasmática para liberar vesículas intraluminares (ILVs), entre ellas, los exosomas. Estudios de microscopía electrónica (EM) han demostrado la fusión de la membrana de los MVB con la membrana plasmática, así como la liberación de ILVs en distintos tipos celulares de origen hematopoyético, como lo son células B transformadas con el virus de Epstein-Barr, mastocitos, células dendríticas, plaquetas, macrófagos y células de origen no hepatopoyético, como neuronas [2,14].

Los exosomas son vesículas con bicapa lipídica que varían en tamaño (de 30 a 200 nm) y que poseen una densidad de 1.13 g/mL (para exosomas derivados de células B). Estas vesículas pueden definirse como porciones citoplasmáticas encapsuladas



en una bicapa lipídica con dominios transmembrales expuestos al ambiente extracelular [2,14]. Los exosomas pueden ser encontrados en constante circulación en fluidos biológicos, incluyendo sangre y linfa, dando como resultado una respuesta sistémica [14]. Sin embargo, los exosomas fueron identificados por primera vez en sobrenadantes de cultivos celulares, específicamente, de reticulocitos. Desde entonces el estudio de exosomas se ha extendido a otros tipos de células (incluyendo eucariontes unicelulares). Lo anterior sugiere que los exosomas son un mecanismo conservado de comunicación entre células [14].

1.6. Biogénesis de exosomas.

Los MVB son un mecanismo importante para la regulación negativa o degradación de receptores de membrana plasmática, llevado a cabo a través de la endocitosis y tránsito hacia MVB, para posteriormente fusionarse a lisosomas y de esta manera degradar las proteínas que ya no están desempeñando su función o que ya no son necesarias. Sin embargo, no todos los MVB que se generan a partir de endosomas se fusionan a lisosomas. Se ha descrito por lo menos una población de MVB que se fusiona a membrana plasmática, lo que resulta en la liberación de vesículas

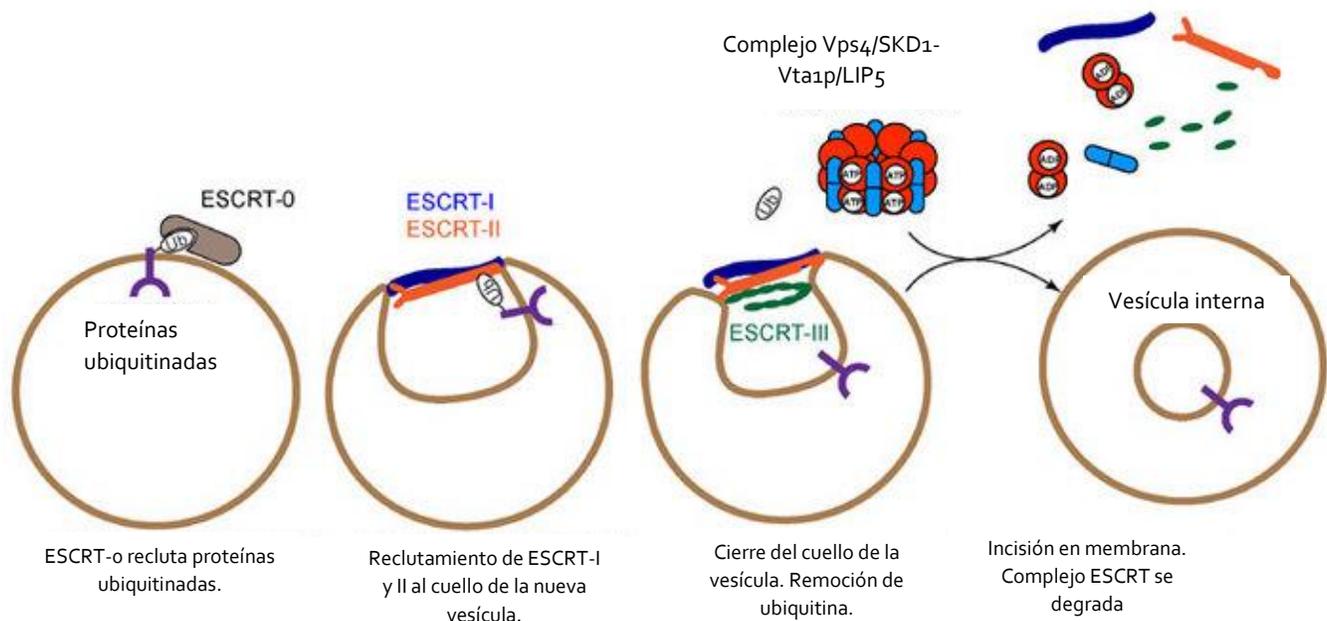


Figura 4 [15]. Modelo simplificado de la formación de MVB mediada por ESCRT y componentes relacionados a ESCRT [Wollert T, 2015].

Se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo por el cual los exosomas pueden formarse. Reportes previos, en los que se analizan levaduras, mostraron que la monoubiquitinación de proteínas endosomales, como las proteínas del complejo ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) principalmente, sirven como señalizadoras para el transporte y tránsito de vesículas, así como mediadoras de la formación de invaginaciones en la membrana celular [2,14,15].

ESCRT-0 interactúa con proteínas monoubiquitinadas a través de dominios que reconocen esta modificación, de esta manera, ESCRT-0 concentra a las proteínas que están ubiquitinadas para agruparlas en MVB. Al mismo tiempo ESCRT-0 recluta a ESCRT-I a la membrana endosomal, que se encarga de reclutar a los componentes restantes del complejo ESCRT (ESCRT-II y ESCRT-III), además de generar la invaginación que resultara en una ILV posteriormente. Finalmente, a través de la polimerización de ESCRT-III, se forman filamentos que finalizan con la invaginación de la membrana para formar una ILV (Figura 4).

1.7. Composición de exosomas.

El análisis extenso por medio de técnicas como el Western blot, la citometría de flujo, la microscopía electrónica y la espectrometría de masas ha permitido identificar que los exosomas son vesículas que contiene carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, siendo los dos últimos los mejor caracterizados por las técnicas previamente mencionadas [14].

La composición de los exosomas depende en gran medida del tipo de célula que los genere [2, 14], el estado fisiológico/patológico en el que se encuentren [14] y hasta del sitio en la célula en donde se generen [14]. No obstante, hay ciertos componentes de los exosomas que son comunes entre ellos sin importar el antecedente fisiológico en el que se encontraron al ser generadas (Figura 5). Las proteínas localizadas en el citoplasma de exosomas incluyen a las proteínas Rab, que promueven el anclaje de exosomas a membranas, así como los eventos de fusión con estas últimas. Las anexinas (I, II, V y VI) que podrían estar involucradas

en eventos de fusión de membrana; también han sido identificadas en lisados de exosomas varias moléculas de adhesión como ICAM-1, CD146, CD9, CD18, CD11a-c, CD166 y CD58. Una de las características principales de los exosomas es la presencia de las tetraspaninas, que incluyen a CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 y CD82, en exosomas derivados de células B, especialmente [3,16]. La presencia de proteínas involucradas en apoptosis, como tioredoxina peroxidasa II, Alix y galectina 3, es considerable al igual que proteínas de choque térmico (Hsp70 y Hsp90) que pueden facilitar el montaje de péptidos en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC I y MHCII).

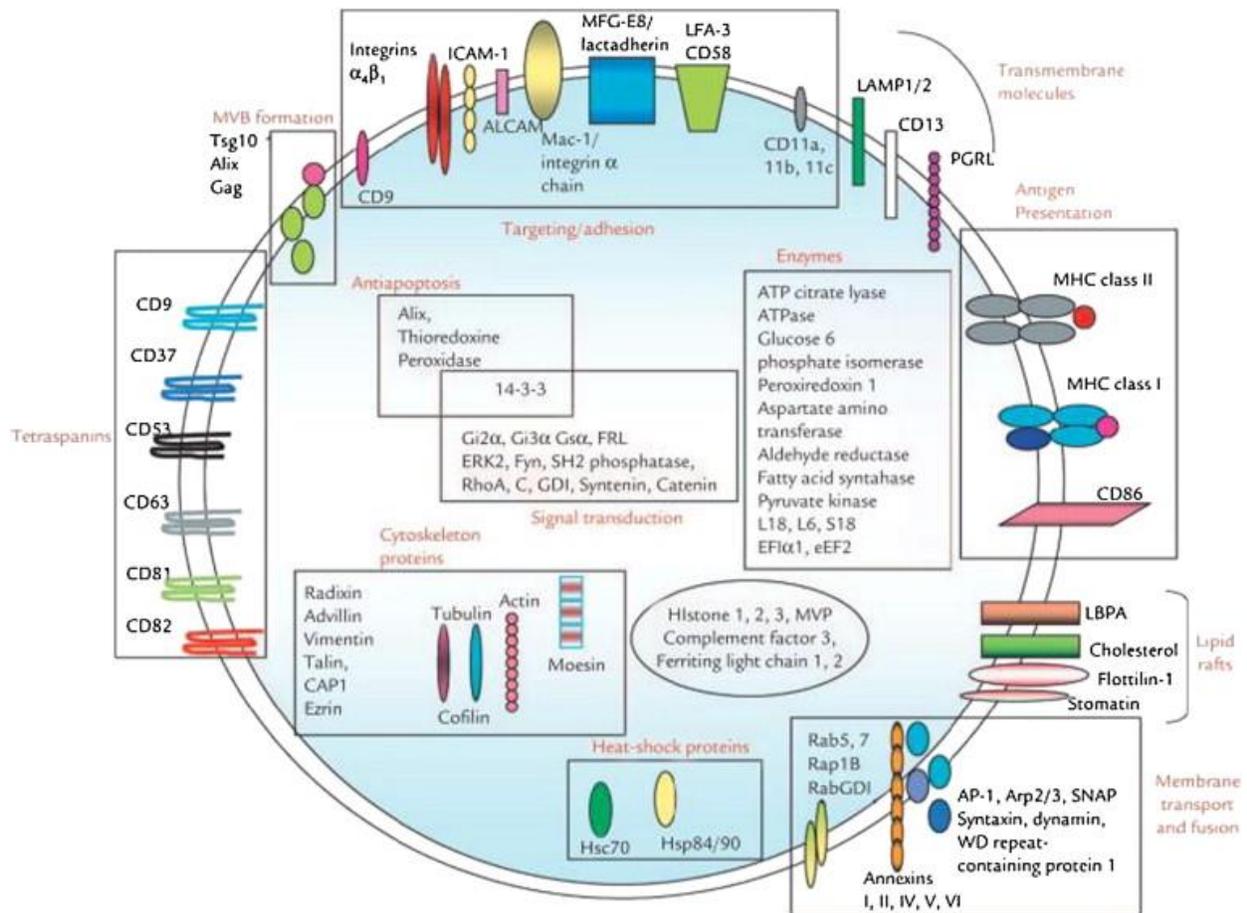


Figura 5 [2]. Composición proteica de los exosomas y su localización [Schorey JS, 2008]

Los exosomas también cuentan con proteínas específicas de células como MHCII y CD86 presentes sólo en exosomas presentes en células presentadoras de antígeno (APC) y MFG-E8/lactadherina presente en células dendríticas inmaduras [2].

Los exosomas también se encuentran enriquecidos con proteínas que participan en la formación de vesículas y en el tránsito vesicular, tal es el caso de la proteína Alix para unión a LPBA. Otras proteínas como peroxidasas, piruvato cinasas, cinasas lipídicas y enolasa-1; es necesario señalar, que debido al origen endosomal de los exosomas, éstos no cuentan con proteínas propias de orgánulos como retículo endoplásmico, núcleo o mitocondrias [2].

Los lípidos que se encuentran en exosomas, así como la proporción de éstos, también dependerán del tipo de célula del que se deriven estas vesículas. La composición lipídica típica de los exosomas incluye a la lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, colesterol y diacilglicerol. Por ejemplo, los niveles de colesterol/fosfolípidos son más altos en exosomas generados por células B comparados con aquellos generados por reticulocitos y mastocitos, por mencionar algunos [2].

1.8. Función de los exosomas.

La liberación de exosomas es considerado como un mecanismo de comunicación intercelular. Debido al amplio espectro de moléculas presentes en los exosomas, éstos cuentan con diferentes mecanismos de anclaje a distintos receptores a los que se pueden acoplar de manera simultánea, y de esta manera facilitar el intercambio de material biológico relevante entre células. A continuación, se mencionan algunas funciones de los exosomas:

Secreción alternativa de proteínas a través de exosomas. Inicialmente la liberación de exosomas era considerado como un mecanismo de eliminación de proteínas, que ya habían cumplido su función durante la maduración de reticulocitos en muestras de cabra [17].

No obstante, se ha demostrado que los exosomas ayudan en la liberación de algunas proteínas reguladoras de p53, lo que ayuda a la regulación positiva de TSAP6 (Tumor supresor activated pathway 6) [18]. Otra función que se atribuye a exosomas es la liberación al medio extracelular del receptor de TNF (tumor Necrosis Factor), lo que establece un mecanismo novedoso para el transporte de receptores de citocinas solubles, que podrían llegar a competir por su ligando [19].

Presentación de antígeno. Existen trabajos en donde se documenta por primera vez, la liberación de MHCII intacto empaquetado en exosomas derivados de líneas celulares de linfocitos B de humano y de ratón. En estos trabajos se observó que los exosomas secretados por células B transformadas con EBV pueden estimular a linfocitos T CD4+ de una manera antígeno-específica [20]. Similar a lo anterior, se ha descrito recientemente que células dendríticas de ratón pulsados con péptidos tumorales inducen el rechazo dependiente de células T de tumores maduros [21]. Adicionalmente, se ha demostrado que en un periodo de 24 horas aproximadamente el 12% del complejo peptídico del MHCII ligado a membrana se endocita, es transportado a MVBs y posteriormente liberado en forma de exosomas, sugiriendo la liberación de exosomas en circulación como mecanismo para transportar antígenos peptídicos ligados a membrana a órganos linfoides secundarios [22].

Transportadores de RNA. Se ha demostrado que exosomas derivados de líneas celulares de células cebadas, contienen abundantes mRNAs y miRNAs, que son transportados a células cebadas vecinas. Los RNAs transferidos a través de exosomas son biológicamente activos y pueden generar cambios y nuevas funciones a las células receptoras [23].

1.9. Antecedente directo.

La información disponible sobre la TSPAN33 es poco hasta el momento debido a que es el último miembro de la familia que ha sido identificado en humanos. El gen encargado de codificar esta proteína se ha aislado en eritroblastos, permitiendo identificar su ubicación en el cromosoma 7. La eliminación de dicha región cromosomal derivaba en síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda.

En un modelo murino deficiente de TSPAN33 se observaron alteraciones como esplenomegalia, glóbulos rojos macrocíticos basofílicos en circulación y en tejidos, desarrollo de tumoraciones hepáticas, así como anemia severa durante la maduración del ratón. También se observó la disminución de las poblaciones leucocitarias IgM+/CD19+ (células B) en bazo de estos ratones [1]. Posteriormente, se observó que la presencia de TSPAN33 en células B sólo era evidente cuando estas células eran estimuladas con LPS para ser activadas. Adicionalmente a esto, análisis de muestras obtenidas de pacientes que presentaban linfomas y cuadros clínicos de enfermedades autoinmunes mostraron la presencia de la TSPAN33 [24].

El hecho de que la TSPAN33 se encuentre presente en linfomas no es una coincidencia, ya que esta proteína está muy relacionada a procesos metastásicos y oncogénicos [10]. Tomando lo anterior en cuenta, la identificación de la TSPAN33 en vesículas generadas por líneas celulares obtenidas de linfomas humanos, ayudaría a entender de mejor manera el papel de esta proteína en la diseminación y comunicación de las células tumorales. Por otro lado, el mecanismo por el cual la TSPAN33 ingresa a exosomas no se ha explicado hasta el momento, por lo que determinar qué mecanismos intervienen en el transporte, reciclaje y eliminación de TSPAN33 (en el ámbito vesicular) derivaría en aplicaciones clínicas que facilitarían el diagnóstico de patologías en las que se ve involucrada la TSPAN33, ya que puede ser utilizada como un nuevo marcador tumoral que sería relativamente sencillo caracterizar en exosomas, que se encuentran en fluidos que se pueden obtener de manera sencilla y poco invasiva (como orina o sangre) y el aislamiento de estas vesículas resulta sencillo una vez estandarizado el método de aislamiento.

2. Justificación.

Varios miembros de la familia de las tetraspaninas han sido caracterizados en exosomas generados por varios tipos celulares (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 y CD82) asociándolas directamente con el intercambio de moléculas bioactivas, que pueden generar cambios en la fisiología de las células receptoras de estas vesículas. Al ser la TSPAN33 el miembro más reciente de la familia de las tetraspaninas en ser identificado (con una alta expresión en células B principalmente, macrófagos y células dendríticas), resulta importante conocer inicialmente si la TSPAN33 se encuentra en exosomas para posteriormente identificar cual es el rol de esta proteína en las vesículas bioactivas previamente mencionadas. Con base en estos antecedentes, una amplia caracterización de la tetraspanina 33 en exosomas generados por líneas celulares de células B, derivaría en el uso de esta proteína como un posible marcador de linfomas de células B.

3. Hipótesis.

La tetraspanina 33 (TSPAN33) se encuentra presente en exosomas generados por células Raji (linfocitos B humanos de linfoma de Burkitt).

4. Objetivo general.

- Caracterizar la presencia de TSPAN33 en exosomas generados por células B provenientes de una línea celular generada a partir de muestras de linfoma humano.

4.1. Objetivos particulares.

1. Estandarizar la metodología para el aislamiento rápido, sencillo y eficiente de exosomas a partir de sobrenadante de cultivo.
2. Observar la presencia de exosomas en las muestras aisladas utilizando microscopía electrónica.

3. Caracterizar a los exosomas aislados por citometría de flujo utilizando como marcador a MHC de clase II.
4. Caracterizar la presencia de la TSPAN33 en exosomas utilizando la técnica de Western blot.

5. Materiales y métodos.

5.1. Transformación de *Escherichia coli* DH8B™.

A un vial de bacterias competentes a temperatura ambiente se le adicionaron 100 ng del plásmido pEGFP-N1 o pTSPAN33-EGFP (figura 6). La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, posteriormente se le sometió a un choque térmico de 42 °C durante un minuto e inmediatamente después se colocó por 2 minutos en hielo. Se adicionaron 250 µL de medio S.O.C (caldo superóptimo con represión por catabolito compuesto de 2 % de triptona, 0.5 % de extracto levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa), para incubarlo en agitación 1 hora a 37°C y a 225 rpm. Al finalizar este tiempo, la mezcla se agregó en cajas Petri con agar LB suplementado con 100 µg/mL de sulfato de kanamicina y se incubó por una noche a 37°C.

Por último, se eligieron dos colonias transformantes positivas, se agregaron a 5 mL de caldo LB suplementado con 100 µg/mL de sulfato de kanamicina y se incubaron a 37°C en agitación durante 12h.

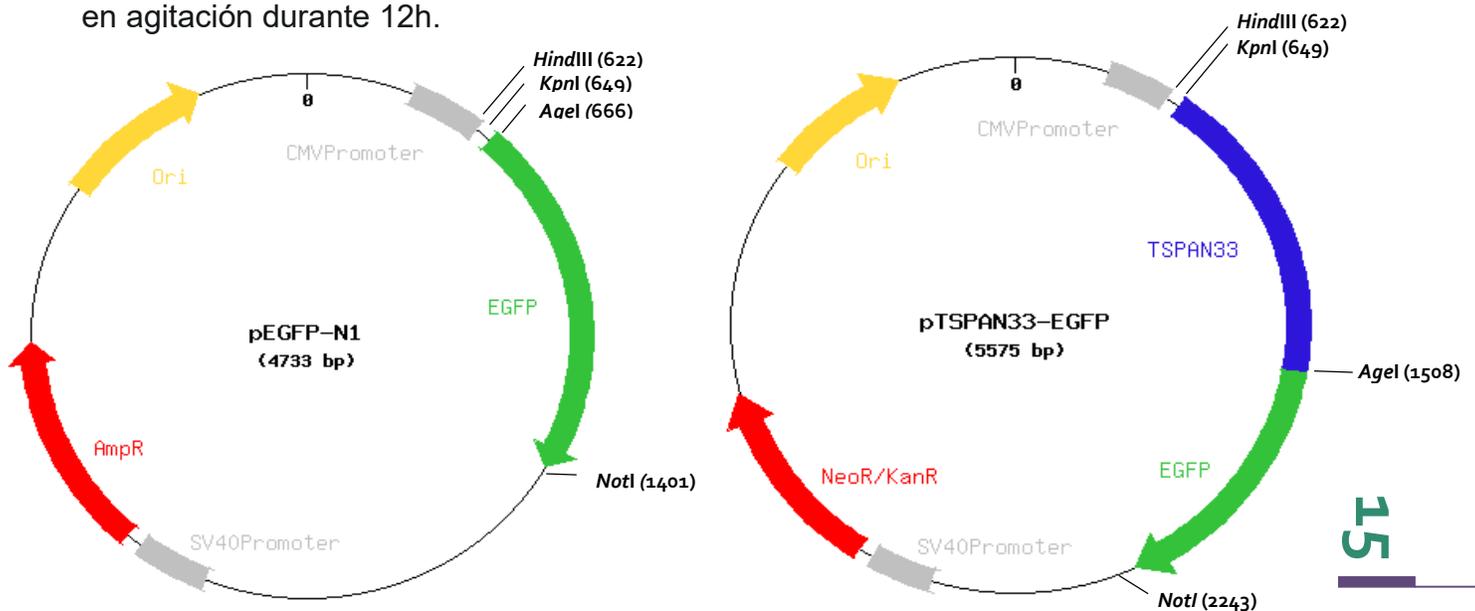


Figura 6. Mapas de los plásmidos pEGFP-N1 y pTSPAN33-EGFP

5.2. Obtención de plásmido a través de lisis celular *Fast-n-Easy Plasmid Maxi-Prep kit*.

Las bacterias obtenidas previamente se centrifugaron por 10 minutos a 3000g, descartando el sobrenadante. Se resuspendió el pellet obtenido y se adicionaron 6 mL de RNAasa A, posteriormente se adicionaron 6mL de amortiguador de lisis (NaOH 0.2M, SDS 1%) que permite destabilizar la membrana o romperla y mantener el pH de la solución estable, incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Para neutralizar se adicionó amortiguador de neutralización (Acetato de sodio 3M a pH 4.8) mezclando cuidadosamente el tubo, para centrifugarlo a 14000g durante 20 minutos. Se colocaron dos columnas para la extracción del DNA, se adicionó el sobrenadante del paso anterior a las columnas, eluyéndolo en ambas usando un sistema de vacío. Se adicionaron 19 mL de amortiguador de lavado A (Gu-HCl 5 M, Isopropanol 30%) y 19 mL de amortiguador de lavado B (Gu-HCl 5 M, EtOH 70%), descartándolo usando vacío. Finalmente se adicionaron 2 mL de amortiguador de elución (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EtOH 80%), para obtener el DNA, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y fue centrifugado a 3000g durante 10 min. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría UV (Thermo Scientific® mod. NanoDrop).

5.3. Análisis de restricción del DNA.

La integridad de los plásmidos se comprobó haciendo uso de cuatro enzimas de restricción: *NotI*, *KpnI*, *AgeI* y *HindIII* (New England Biolabs). Para proceder a realizar la digestión de los plásmidos, se utilizó una combinación de dos enzimas de restricción como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de cada plásmido.

Plásmido	pEGFP-N1	pTSPAN33-EGFP	pTSPAN33-EGFP
Enzimas de restricción	<i>NotI</i> + <i>HindIII</i>	<i>KpnI</i> + <i>AgeI</i>	<i>KpnI</i> + <i>NotI</i>
Amortiguador usado	NEBuffer 2.1	NEBuffer 1.1	NEBuffer 2.1

Cada reacción se llevó a cabo con 3 μL de amortiguador comercial (NEBuffer) 10x suplementado con albúmina sérica bovina, 1 μL de enzima de restricción, 1 μL de DNA plasmídico y agua inyectable en un volumen final de 20 μL . Cada digestión se realizó a 37°C por 1 hora. La selección del amortiguador adecuado para cada digestión enzimática se realizó utilizando el recurso bioinformático *Double Digest Finder de New England BioLabs® Inc.*

5.4. Cultivos celulares y anticuerpos.

Se utilizaron las clonas NC11D3, NC11D4, TD10A2 y TD10F4 de la línea celular Raji en cultivo con medio RPMI 1640 suplementado (Suero fetal bovino descomplementado a 56°C por 30 minutos, L-glutamina 1%, piruvato de sodio 1%, 100 U/mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina). Las condiciones de incubación fueron de 37°C con un 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó retirándolo con centrifugaciones de 1500 RPM X 5 minutos. El sobrenadante obtenido después de cada centrifugación se recolectó en tubos estériles de 50 mL perteneciente a cada clona y almacenado a una temperatura de 4°C.

Para las tinciones del aparato de Golgi se utilizaron las lectinas acopladas a biotina GSII de *Griffonia simplicifolia* y WGA de *Triticum vulgare* (ambas de Sigma).

5.5. Transfección de células B por electroporación.

Partiendo de un cultivo de células Raji con alta densidad celular, se realizó la colecta de células por centrifugación (1500 rpm, 5 minutos, 4°C), se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido y contado mediante el empleo de la cámara de Neubauer. Tres alícuotas con 10×10^6 células se resuspendieron en 500 μL de solución reguladora *Cytomix* (KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 25 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 5mM, pH=7.6) fría, se le adicionaron 20 μg de DNA plasmídico de interés a cada alícuota y se incubó durante 10 minutos en hielo. Posteriormente se realizó la electroporación usando 300 volts y 1200 μF como parámetros.

Las células sometidas a electroporación se cultivaron por 72 horas en medio RPMI 1640 suplementado (10% SFB, 1% glutamina, 1% piruvato de sodio y 1% antibiótico-antimicótico), para permitir la expresión las proteínas fluorescentes y de esta manera

realizar el sorting de las células que sólo presentaban la fluorescencia de la proteína GFP (ya sea sola o fusionada con la TSPAN33).

5.6. Ensayos de fluorescencia de células transfectantes.

Dos volúmenes de cultivo con 3×10^5 células transfectantes de EGFP y de TSPAN33-EGFP se centrifugaron (1500 rpm, 5 minutos, 4°C) y el paquete celular recuperado se lavó 3 veces con PBS. Las células recuperadas se resuspendieron en 500 μ L de PBS frío, y se depositaron en una placa circular con fondo de cristal para ser analizadas inmediatamente por microscopía confocal (Olympus® FV1200™).

5.7. Tinciones por inmunofluorescencia

Se realizaron tinciones con anticuerpos y lectinas específicas contra distintas moléculas. En general, células Raji en suspensión (1×10^6 células) fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% (En el caso de moléculas intracelulares las membranas se permeabilizaron incubando a las células por 5 minutos en 1 mL de Tritón X-100 al 0.1% en PBS y un lavado posterior). Se incubaron las células en hielo y en ausencia de luz por 20 minutos con los anticuerpos purificados se siguió el protocolo anterior y adicionalmente se realizó una segunda incubación con anticuerpos secundarios anti-IgG biotinilados y un lavado entre cada paso. Este tipo de muestras se revelaron añadiendo 5 μ L de una dilución 1:10 de estreptavidina-Cy3 (Zymed) e incubando por 10 minutos a 37°C para inducir el entrecruzamiento. Por último, se realizaron dos lavados con PBS y se montaron en portaobjetos. Todas las tinciones analizadas por microscopía confocal (Olympus® FV1200™).

Tabla 3. Descripción general de los plásmidos utilizados.

Plásmido	Proteínas codificadas
pEGFP-N1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína verde fluorescente mejorada EGFP
pTSPAN3-EGFP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tetraspanina33 fusionada en su extremo C-terminal a EGFP TSPAN33-EGFP

5.8. Métodos para aislamiento de exosomas.

5.8.1. Aislamiento de exosomas por centrifugaciones/ultracentrifugaciones.

Los sobrenadantes recolectados de cada cultivo de las clonas celulares se separaron en alícuotas de 5 mL y se mantuvieron en hielo a lo largo del proceso. Las alícuotas se sometieron a una centrifugación de 400 x g para eliminar células, posteriormente se centrifugaron a 10,000 x g por 30 minutos a 4°C (Beckman Coulter J-265XPI) para eliminar restos celulares y células muertas, el sobrenadante obtenido se filtró a 0.2 µm y ultracentrifugado a 100,000 x g por 70 minutos, a 4° C (Beckman Coulter optima XPN-100 ultracentrifuge), el sobrenadante resultante se descartó con una bomba de vacío y el pellet resultante (poco visible) se resuspendió en 200 µL de solución de PBS estéril filtrada a 0.2 µm. Los pellets resuspendidos se almacenaron en tubos estériles a -70°C.

5.8.2. Aislamiento de exosomas con solución precipitadora de PEG 8,000.

Alicuotas de 10mL de sobrenadante de cada clona de células se filtraron (Corning® Sterile Syringe Filter 0.20 µm) e incubaron por 24 horas con 2 mL de una solución de PEG 8,000 en PBS a 4°C. Al finalizar la incubación las muestras se centrifugan a 1500 x g por 30 minutos, a 4°C. Posteriormente, los sobrenadantes se descartaron y se resuspendieron los pellets con 200 µL de PBS estéril o amortiguador de lisis (dependiendo del uso de la muestra). Los pellets resuspendidos fueron almacenados en tubos estériles a -70°C.

5.8.3. Aislamiento de exosomas por el método de “salting-out”.

De los sobrenadantes de cada clona de células se tomaron 9 mL y se mezclaron con 1 mL de amortiguador de acetato de sodio (1.0 M, pH 4.75), se reposaron en hielo por 60 minutos y se incubaron a 37°C por 5 minutos. La suspensión (turbia) obtenida fue centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4°C, y el pellet resultante fue lavado con un amortiguador de acetato de sodio (0.1 M, pH 4.75) y centrifugado nuevamente. El pellet resultante del lavado se resuspendió en HBS y almacenado en tubos estériles a -70°C.

5.9. Microscopia electrónica de exosomas.

Un pellet de exosomas se fija con 200 µL de paraformaldehído al 4%. Posteriormente se coloca una gota de la muestra (20 µL) en un trozo de parafilm y se deja secar a 70 °C una vez seca la muestra, se agregó una gota de acetato de uridilo, permitiendo su acción por 3 minutos. La muestra se lavó con agua destilada y se dejó secar a 37°C.

5.10. Cuantificación de proteínas, SDS-PAGE y Western blot.

Los exosomas aislados en los pasos anteriores, fueron lisados para cuantificar la cantidad de proteína que contenían con el método de Lowry (Bio Rad, DC protein Assay). Se utilizaron placas de 96 pozos, se colocaron 5 µL de cada lisado en un pozo de la placa y se agregaron 25 µL del reactivo A' y 200 µL del reactivo B. Se incubó la placa por 15 minutos y se realizó la lectura de cada pozo por espectrofotometría (Bio Rad, XMark microplate spectrophotometer).

Una vez cuantificadas las proteínas, se realizó un SDS-PAGE al 12% cargando en cada pozo del gel el volumen de lisado que contenía 50 µg de las proteínas y se les permitió migrar con una corriente de 100 Volts por aproximadamente 70 minutos (Bio Rad, mini-protean tetra system). El gel resultante fue teñido con azul de coomassie y revelado y fotografiado para análisis de los resultados (ChemiDoc MP imaging system).

Al mismo tiempo se migraba un SDS-PAGE al 12% para realizar la electrotransferencia de proteínas por 60 minutos, a una membrana de PVDF activada con metanol por 2 minutos. Al finalizar la transferencia la membrana se bloqueaba con leche descremada al 5% disuelta en TBS-Tween 20 al 0.1% (leche 5 % TBS-T 0.1%) por 1 hora.

Posteriormente la membrana de PVDF se lavó por 15 minutos, 3 veces con leche 1% TBS-T 0.1% y al finalizar los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti-GFP) a 4°C toda una noche. Cuando terminó el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se lavó nuevamente la membrana 3 veces con leche 1% TBS-T 0.1% por 15 minutos. La membrana libre de exceso de anticuerpo primario se incubó con el anticuerpo secundario (HRP-IgG anti cabra) por 1 hora a 37°C, al finalizar este tiempo se volvió a lavar la membrana con leche 1% TBS-T 0.1% por 15 minutos 3 veces. Finalmente, la membrana se reveló con luminol y se capturó la imagen adecuada para analizar la banda que se esperaba encontrar (ChemiDoc MP imaging system).

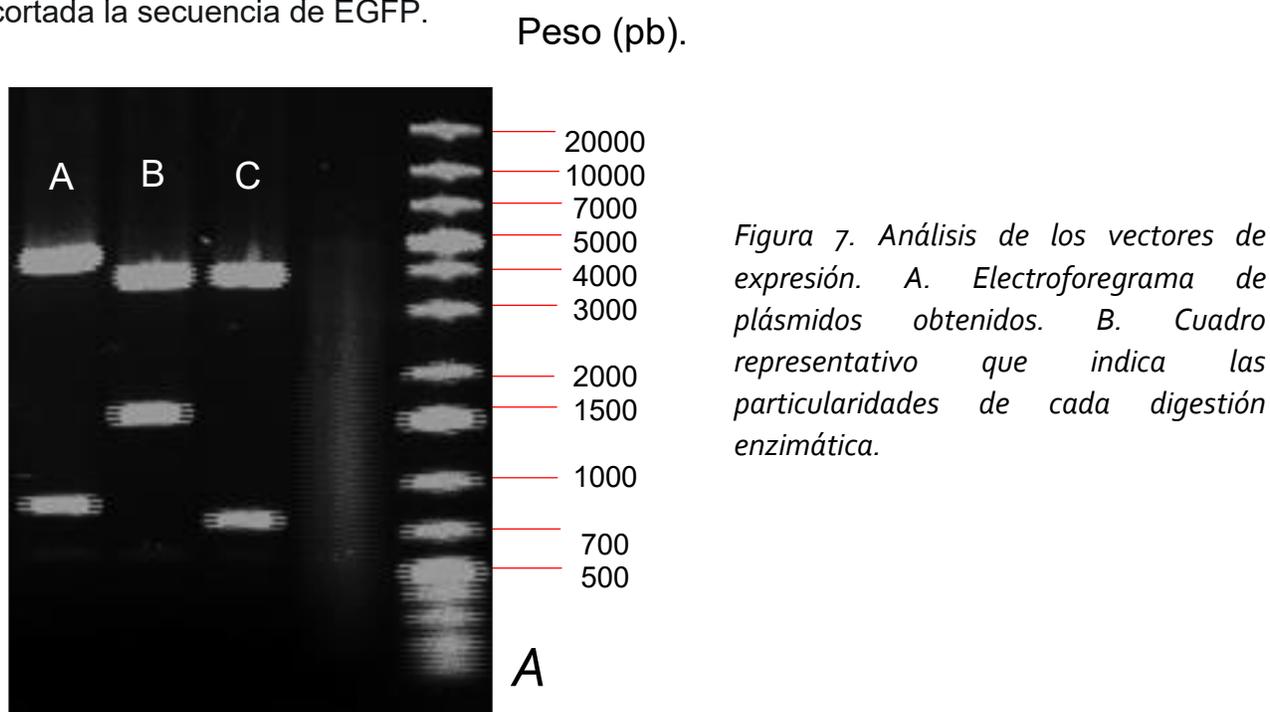
5.11. Fenotipificación de exosomas a través de FACS.

Para determinar la presencia del MHC II en los exosomas aislados, se utilizaron Dynabeads® (Exosome immunoprecipitation protein G, Invitrogen) sensibilizados con anticuerpo dirigido contra HLA-DR, diluido en PBS-Tween 20 (0.05 µg/µL) por 10 minutos en rotación constante y temperatura ambiente. Una vez finalizada la sensibilización, las perlas se lavaron con en PBS-Tween 20 y se pusieron en contacto con 200 µL de suspensión de exosomas para ser incubados a temperatura ambiente, rotando por 10 minutos. Para finalizar, el complejo Dynabead-Anticuerpo- Exosoma se lava con 200 µL PBS, 3 veces y se resuspende el complejo en 300 µL de formaldehído al 1% para ser analizados por citometría de flujo.

6.Resultados.

6.1. Obtención y digestión de plásmidos pEGFP-N1 y pTSPAN33-EGFP.

A partir de las bacterias *E. coli* DH8B transformadas, se obtuvieron los vectores de expresión para ser transfectados a la línea celular Raji. Previo a la transfección, los plásmidos utilizados fueron sometidos a la digestión con varias enzimas de restricción para comprobar su identidad e integridad. Para pTSPAN33-EGFP fueron escindidas las secuencias codificantes TSPAN33-EGFP y TSPAN33 y del plásmido pEGFP-N1 fue cortada la secuencia de EGFP.



Carril	Plásmido	Enzimas	Peso (pb)
A	pTSPAN33-EGFP	<i>KpnI</i> - <i>AgeI</i>	4716 - 859
B	pTSPAN33-EGFP	<i>KpnI</i> - <i>NotI</i>	3981 - 1594
C	pEGFP-N1	<i>NotI</i> - <i>Hind III</i>	3954 - 779

B

6.2. Transfección de células Raji y obtención de clonas.

Se utilizó la línea celular Raji (células de linfoma de Burkitt) que se sabe, expresan muy bajos niveles de TSPAN33 [24], por lo que resultaron ideales para observar una sobreexpresión de la proteína, al ser transfectada con los plásmidos mencionados anteriormente. La transfección por electroporación realizada a las células Raji presentó

una eficiencia mayor al 20%, una eficiencia considerablemente elevada al tratarse de una transfección a células B.

Para verificar la sobreexpresión de la TSPAN33 en las células transfectadas se analizaron células Raji que no se sometieron a transfección por citometría de flujo, donde se observó que las células sin transfectar tenían una intensidad media de fluorescencia menor, que las células transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de TSPAN33.

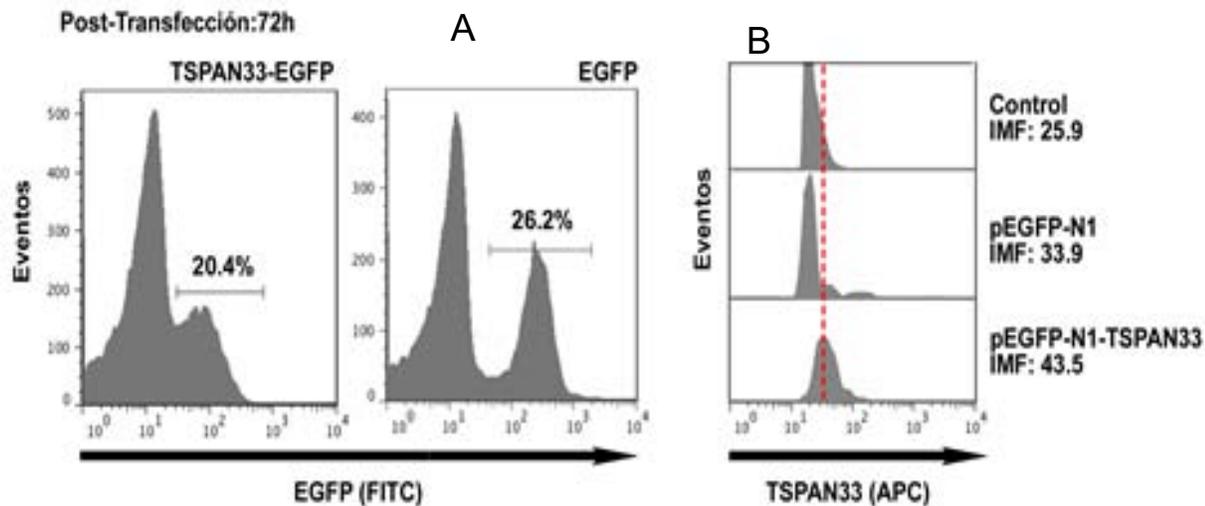


Figura 8. Transfección de la línea celular Raji. A, porcentaje de transfección después de 72 horas. B, Medición de la tetraspanina 33 superficial, utilizando como control células Raji sin transfectar. La separación de células transfectadas se realizó haciendo uso de un separador celular (BD FACSAria III), tomando sólo a la población positiva para EGFP.

6.3. Localización de TSPAN33 por microscopía confocal.

Los estudios de microscopía confocal efectuados en células Raji TSPAN33-EGFP+ y células Raji EGFP+, demostraron la presencia de la TSPAN33 en diversas zonas de las células que eran distintos para las clonas de cada plásmido usado. Se encontró a la proteína en membrana, microvellosidades (proyecciones de la membrana), y en membranas intracelulares que pertenecen al aparato de Golgi y microvesículas en las células Raji TSPAN33-EGFP. Por el contrario, la TSPAN 33 no se encontró en retículo endoplásmico (ER). De diferente manera, las células Raji EGFP mostraron la presencia de la proteína fluorescente en el citoplasma de la célula. Es relevante mencionar que la localización de la TSPAN33 en células con expresión aumentada de la proteína de fusión

EGFP-TSPAN33 se debe únicamente a las propiedades moleculares intrínsecas de la TSPAN33.

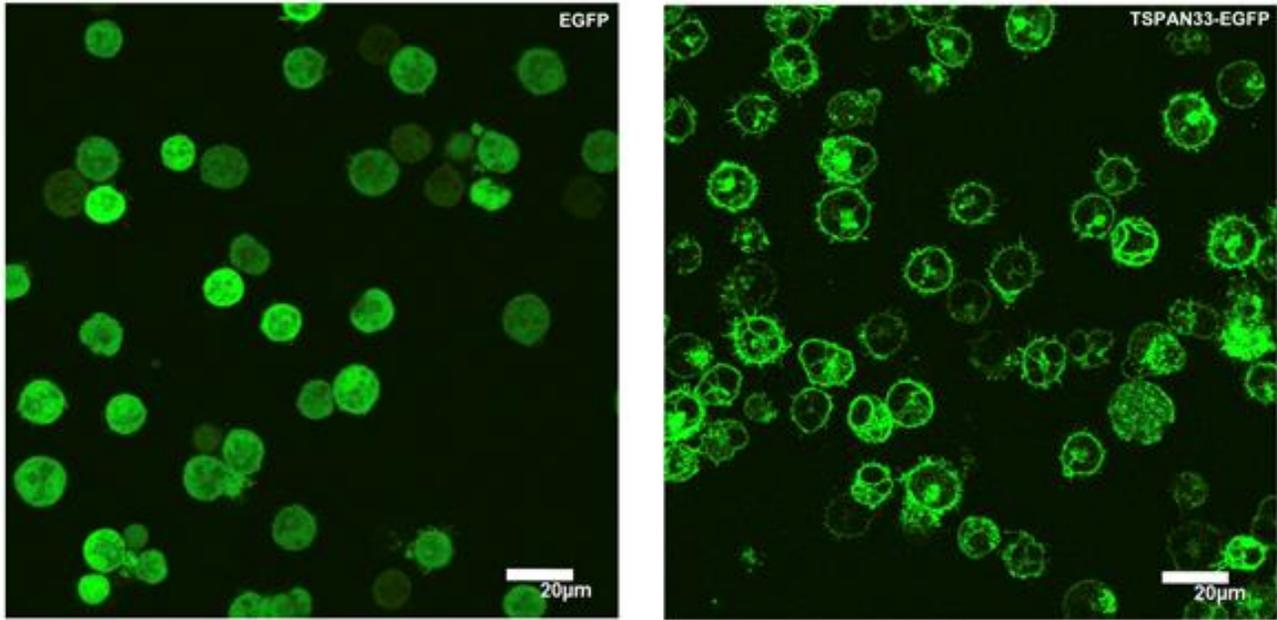


Figura 9. Microscopia confocal de células Raji transfectadas. Del lado izquierdo se muestra la distribución de la EGFP en células Raji, mientras que del lado derecho se muestra la ubicación de la TSPAN₃₃ (membranas, principalmente).

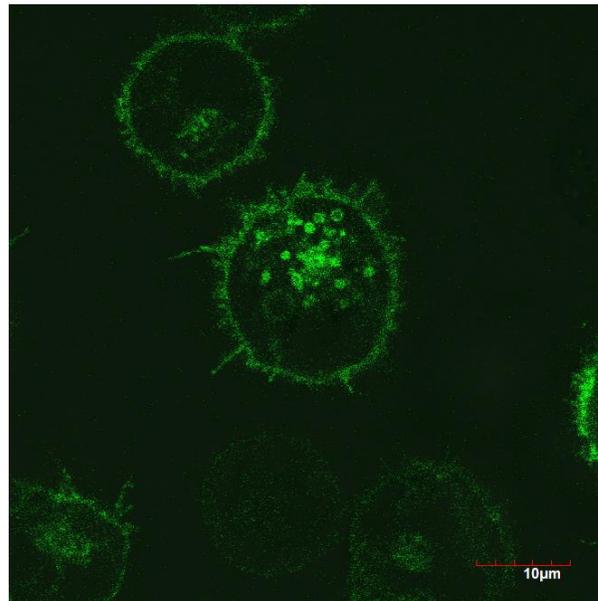


Figura 10. Microscopia confocal de células Raji transfectadas. Se observa la presencia de la TSPAN₃₃ en vesículas localizadas en citoplasma.

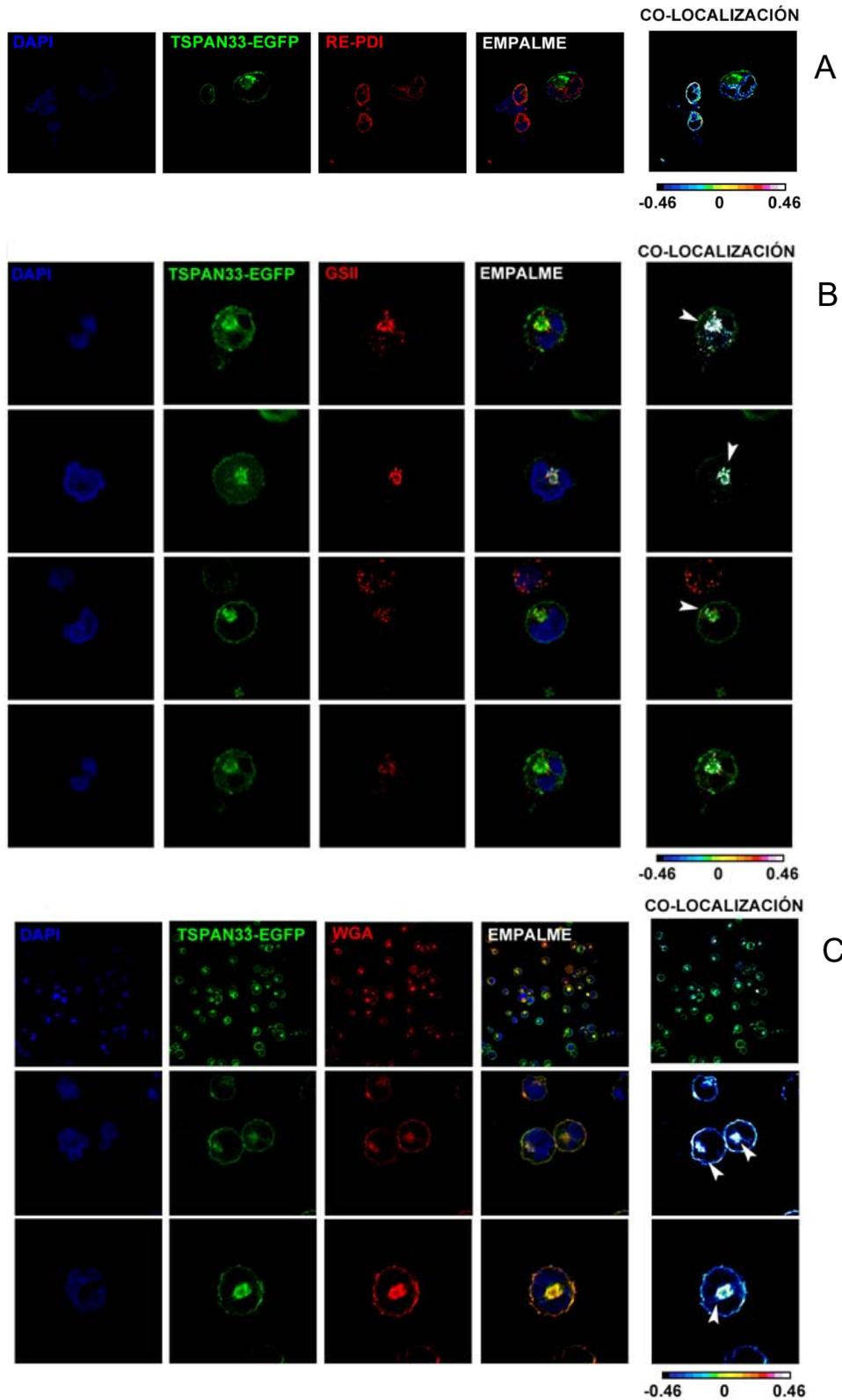


Figura 11. Microscopia confocal de células Raji transfectadas. A. Tinción de ER donde no se observa la co-localización de la TSPAN33 con PDI presente en el orgánulo previamente mencionado. B y C. En esta imagen se muestra la co-localización de la TSPAN33 con lectinas presentes en aparato de Golgi, demostrando la presencia de vesículas que contienen a la TSPAN33.

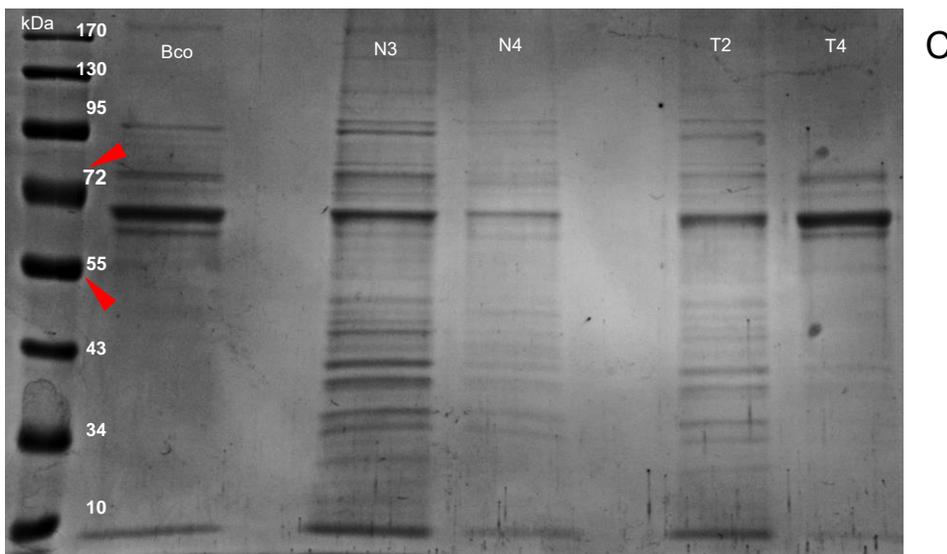
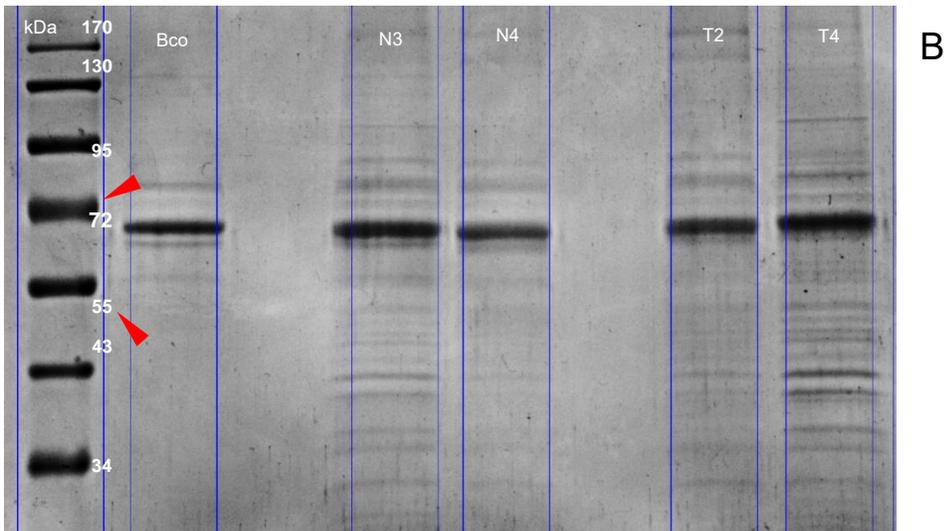
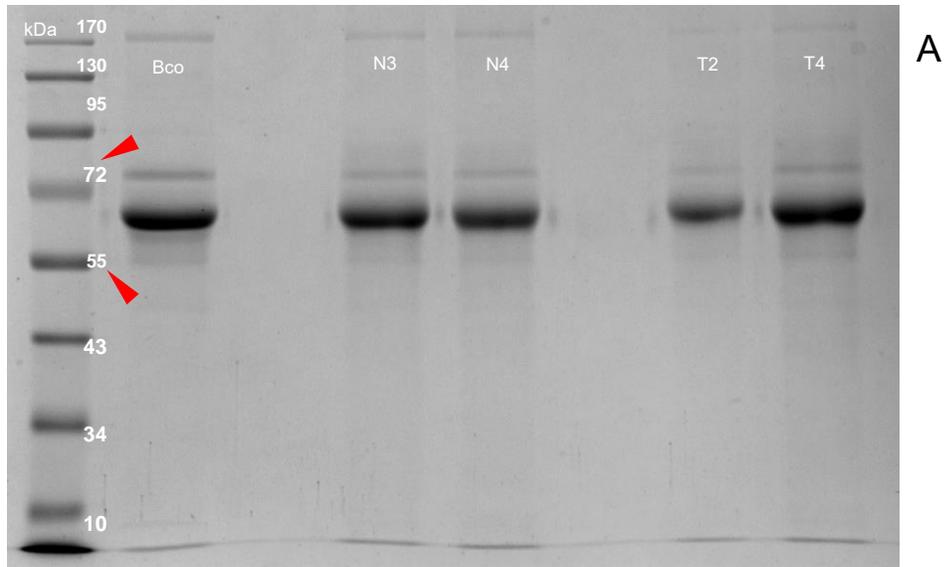


Figura 12. Aislamiento de exosomas y enriquecimiento proteico por diferentes metodologías. A, Ultracentrifugación. B, Precipitación con PEG 8000. C, Salting-Out.

6.4. Aislamiento de exosomas.

Una vez estandarizados los métodos para el aislamiento de exosomas (Ultracentrifugación, precipitación con PEG 8000 y Salting-Out), se realizó el aislamiento de las vesículas extracelulares a partir de sobrenadantes de los cultivos de las clonas N3 y N4 (EGFP+), al igual que las clonas T2 y T4 (TSPAN33-EGFP+). El aislamiento de vesículas resultó ser eficiente para los 3 métodos, ya que al realizar SDS-PAGE y una tinción con azul de coomassie para cada método, se pudo observar un enriquecimiento proteico en las muestras utilizadas. Sin embargo, al realizar un segundo SDS-PAGE para los extractos proteicos del aislamiento por “Salting-Out” se observó que las proteínas en estos habían sido degradadas, por lo que este método no se utilizó en experimentos subsecuentes.

6.5. Caracterización por microscopía electrónica de exosomas.

Utilizando la tinción negativa de exosomas, se observó la pureza y presencia de exosomas por microscopía electrónica. Es así que en muestras de aislados vesiculares de la clona N4 y T2, se observaron cuerpos que mostraron una membrana lipídica con alto contenido proteico y que desplegaban varios tamaños. La clona N4 fue la primera en analizarse y se observó que las vesículas que contenía este extracto, tenían tamaños aproximados desde 250 nm hasta 550 nm, con un tamaño promedio de 380 nm aproximadamente. En cambio, las vesículas generadas por la clona T2 tenían tamaños aproximados de 600 nm a 950 nm, con un tamaño promedio de 800 nm aproximadamente. Cabe mencionar que, por la naturaleza de la tinción realizada a las vesículas (Tinción negativa con acetato de uranilo), se pueden visualizar en ellas estructuras proteicas densas tanto en la membrana como al interior de la vesícula, lo que sugiere la presencia de una gran cantidad de proteínas en membrana y en el espacio intravesicular, así como la presencia de ácidos nucleicos contenidos en las vesículas.

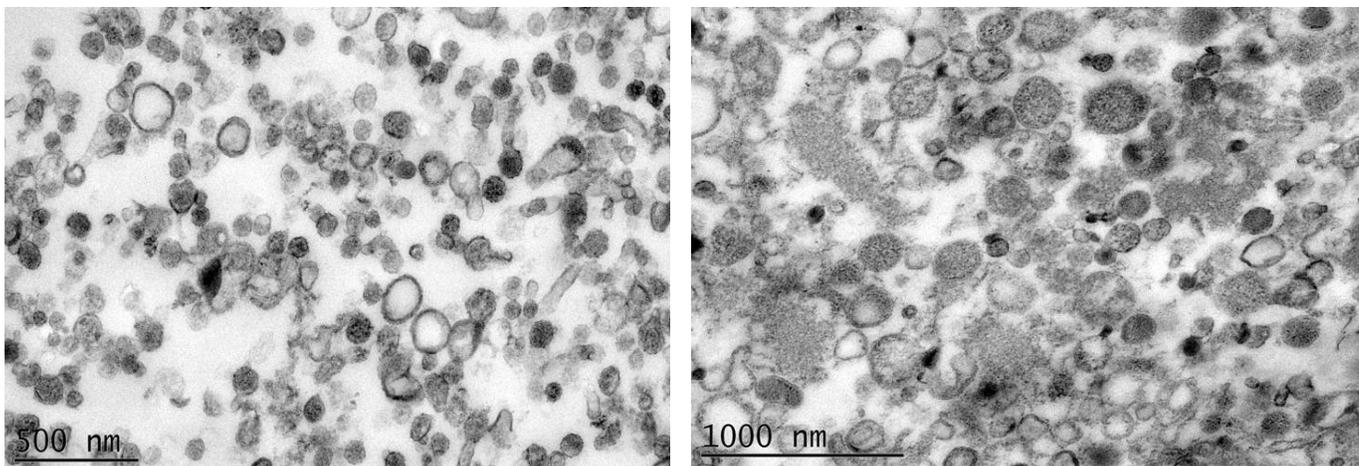


Figura 13. Microscopia electrónica de transmisión. Del lado izquierdo se muestran las vesículas extracelulares generadas por la clona N₄ de células Raji transfectadas con el vector pEGFP-N1. Del lado derecho se muestran las vesículas extracelulares que generó la clona T₂, que se trata de células Raji transfectadas con el vector pTSPAN33-EGFP.

6.6. Identificación de TSPAN33 en exosomas generados por clonas de la línea celular Raji.

Para determinar la presencia de la TSPAN33 en exosomas de las clonas de células Raji transfectadas, se realizó un Western blot a exosomas aislados por precipitación con PEG 8000. La detección de la TSPAN33 fue indirecta, ya que se utilizó un anticuerpo dirigido contra la EGFP fusionada a la TSPAN33. Cuando la membrana generada por el Western blot se reveló, se encontró una banda entre el marcador de peso molecular de 77 kDa y 55 kDa en las muestras pertenecientes a los exosomas aislados de las clonas que generaban la proteína de fusión TSPAN33-EGFP (T2 y T4), mientras que los exosomas aislados de las clonas que solo generaban a la EGFP (N3 y N4) no demostraron presencia de EGFP en vesículas.

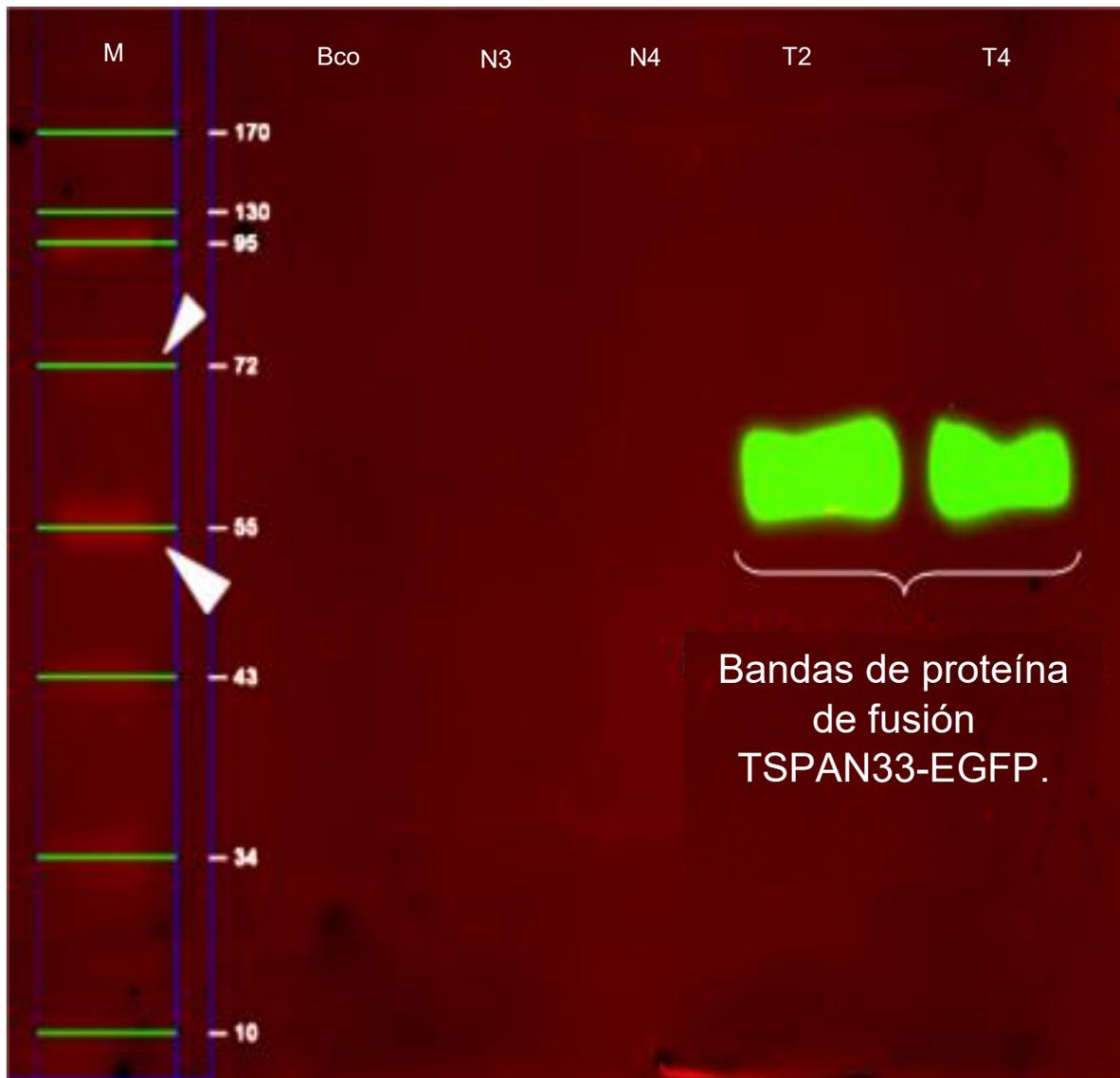


Figura 14. Identificación de la proteína TSPAN₃₃ en exosomas de clonas de la línea celular Raji. Immunoblot que muestra la presencia de la TSPAN₃₃ en exosomas generados por las clonas de células transfectadas con el vector pTSPAN₃₃-EGFP (T₂ y T₄).

6.7. Fenotipificación de MHC II en exosomas.

La presencia de moléculas que forman parte del MHC de clase II se observó a través de citometría de flujo, que se realizó con dynabeads sensibilizadas con anticuerpo dirigido contra HLA-DR. Es así que se pudo observar un aumento en la intensidad media de fluorescencia, que se debe a la presencia de TSPAN33-EGFP generada por los exosomas que se acoplaron a las dynabeads, al ser reconocidas las moléculas de MHC clase II contenidas en la superficie de las vesículas.

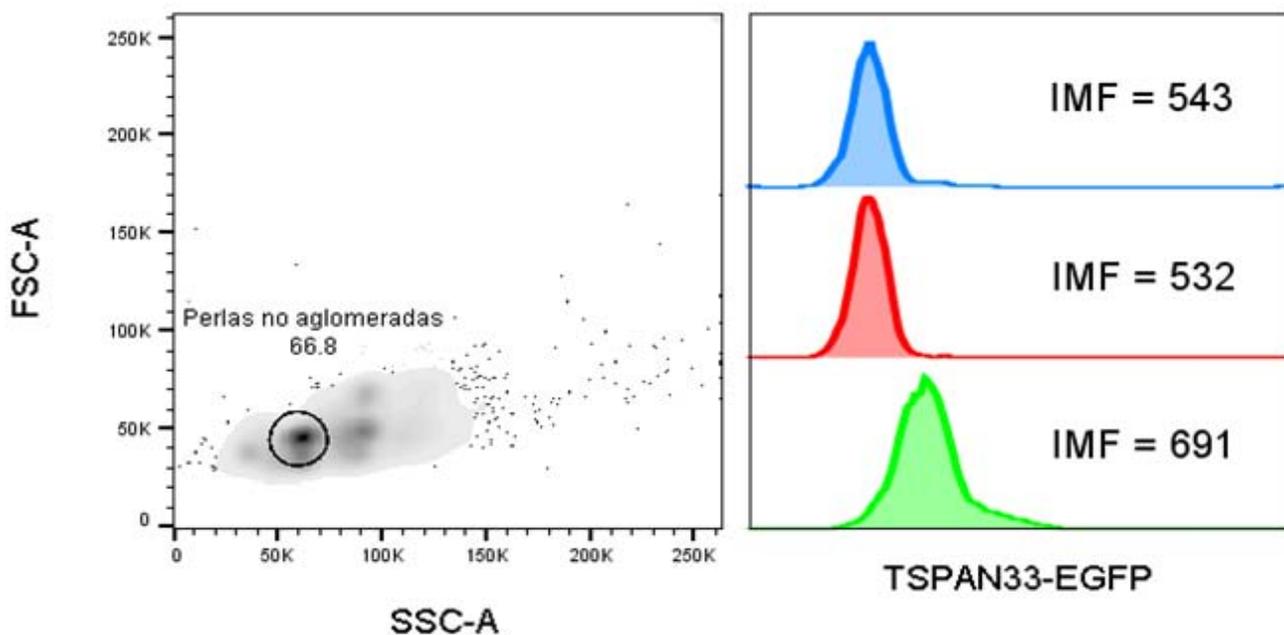


Figura 15. Identificación de MHC II en exosomas de clonas de células Raji. Histogramas que muestran la presencia de MHC II en exosomas generados por las clonas de la línea celular Raji, que fueron transfectadas con el vector pTSPAN33-EGFP.

7. Discusión.

El estudio de las vesículas extracelulares (EV) ha tomado mayor importancia en años recientes debido, en gran medida, a la cantidad de biomoléculas de importancia biológica contenidas en ellas. La composición de las vesículas extracelulares es dependiente del tipo de célula y contexto fisiológico en el que se encuentran, al momento de realizar el aislamiento de las vesículas, por lo que tratar de catalogar a todas las vesículas extracelulares de forma específica y dependiente de su contenido resulta una tarea complicada. Sin embargo, se ha demostrado que las vesículas extracelulares poseen proteínas de la misma superfamilia, tal es el caso de las tetraspaninas, que pueden estar llevando a cabo funciones como el reconocimiento de proteínas (puede tratarse de tetraspaninas) presentes en la membrana de células cercanas (una vez que las vesículas salieron de la célula que las genera), estar involucradas en la invasión de microorganismos a células del hospedero, entre otras. Es por esto que como primer acercamiento se decidió observar la localización de la TSPAN 33 en linfocitos B como célula presentadora de antígeno, debido a que en experimentos previos de nuestro laboratorio se observó una sobreexpresión del MHC II en las células que sobreexpresaban a la TSPAN33 como TSPAN33-EGFP. Como se muestra en la figura 9, la TSPAN33-EGFP se localiza en gran medida en toda la membrana celular (incluyendo proyecciones de la misma membrana, llamadas microvellosidades), pero curiosamente también se encuentra en regiones amplias en el citoplasma, que se sabe, pertenecen al aparato de Golgi y a vesículas extracelulares que este último orgánulo membranoso genera (figura 10). Esto último sugiere la relación estrecha que existe en el procesamiento de la TSPAN33 en aparato de Golgi y su transporte a través de vesículas a la membrana celular (figura 11, B y C). De manera contraria, la ausencia total de TSPAN33 en ER.

La presencia de TSPAN33 en vesículas no es coincidencia, ya que miembros de la misma familia, como CD9, CD63 y CD81, se encuentran ampliamente documentadas como marcadores de vesículas extracelulares generadas por diversos tipos celulares. La mayoría de estas vesículas se encuentran de manera abundante en fluidos corporales (orina, saliva, sangre, etc) para células primarias y

en sobrenadantes de cultivos de líneas celulares (como es el caso de las clonas utilizadas en este trabajo, generadas a partir de la línea celular Raji). Es por esto que la principal fuente de vesículas extracelulares, fue el sobrenadante de los cultivos celulares que se recolectó periódicamente de cada cultivo. De esta manera, se pudo estandarizar el aislamiento de exosomas a partir de un volumen de sobrenadante que permitía el aislamiento de una gran cantidad de exosomas (aproximadamente 50 mL). Como se muestra en la figura 12, el aislamiento de exosomas por ultracentrifugación, precipitación con PEG 8000 y Salting-Out, resultaron ser eficientes en el aislamiento de exosomas. Sin embargo, cada método demostró ventajas y desventajas que deben considerarse antes de realizar algún experimento que involucre exosomas y el contenido de éstos. La ultracentrifugación es un método bastante delicado, ya que, cualquier perturbación al momento de retirar los contenedores donde se encuentra el sobrenadante con exosomas precipitados de las centrifugaciones afectará el rendimiento de exosomas del experimento, por lo que se debe tener cuidado cuando este procedimiento se realiza. Cabe resaltar que la ultracentrifugación es la metodología mayormente empleada cuando se necesita aislar exosomas, puesto que es rápida y los contaminantes en la muestra final (que muchas veces interfieren con la observación, cuantificación y caracterización del contenido de exosomas) son eliminados, optimizando esta metodología si adicionalmente se utilizan membranas para filtrar los sobrenadantes descartando así la contaminación con residuos de las mismas células que generan a los exosomas. La precipitación PEG 8000 resulta ser una metodología rápida que involucra poco material y reactivos inocuos para el usuario. Esta metodología fue ampliamente utilizada en este trabajo, para obtener exosomas que fueron caracterizados por medio de Western blot y citometría de flujo. Cabe mencionar que, los exosomas aislados con esta metodología no resultaban ser del todo útiles cuando se quería realizar microscopia electrónica de transmisión, ya que, esta metodología falla en ser del todo limpia debido a que la viscosidad del PEG hace difícil la eliminación del mismo aun después de ser lavadas las muestras, haciendo difícil la observación al microscopio o por el *software* adecuado, de las vesículas extracelulares. Por último, obtener exosomas por Salting-Out con acetato

de sodio es una metodología barata y que puede ser reproducible en cualquier laboratorio, sin embargo, las vesículas extraídas por esta metodología sufren una desnaturalización acelerada, por lo que estudios de microscopía y citometría son difíciles de realizar con este tipo de aislados. De igual manera, las proteínas que están contenidas en exosomas sufren una desnaturalización acelerada aun en refrigeración, por lo que este método no es útil si se pretende almacenar vesículas extracelulares para su uso o caracterización posterior.

La microscopía electrónica de transición es una herramienta socorrida ampliamente para verificar si el resultado del aislamiento es en realidad material vesicular, y si las vesículas que se están aislando se encuentran en buen estado. De igual manera, esta técnica da un primer acercamiento al contenido de los exosomas que se están observando, ya que, al realizarse una tinción negativa, como en este trabajo, con acetato de uridilo se puede conocer el contenido proteico y la presencia de ácidos nucleicos (como miRNAs) en las vesículas. La figura 13 del lado izquierdo, muestra las vesículas generadas por la clona N4, es decir, una clona que solo expresaba a la EGFP. Estas vesículas tenían tamaños de 250 a 550 nm, por lo que se les considera como vesículas extracelulares donde se podrían encontrar exosomas, cuerpos multivesiculares (MVB) y microvesículas. Cabe destacar que estas vesículas mostraban un alto contenido de proteínas (tanto en membrana como al interior de las vesículas) demostrando así la relevancia de este tipo de orgánulos para el procesamiento y transporte de estas biomoléculas dentro de la célula. De igual manera, la figura 13 en el lado derecho, correspondiente a las vesículas generadas por la clona T2, que expresaba a la proteína de fusión TSPAN33-EGFP, mostró tamaños mayores a los de las vesículas de la clona anteriormente mencionada (N4), con tamaños que se encuentran desde los 600 nm hasta los 900 nm. Dicho efecto puede atribuirse a la sobreexpresión de TSPAN33 en la célula, implicando a esta proteína en el proceso de biogénesis de vesículas extracelulares. El contenido de estas vesículas no mostró ser distinto al de las vesículas de menor tamaño generadas por la clona control, sin embargo, resulta interesante estudiar si el contenido de estas vesículas de mayor tamaño se vio afectado de alguna manera debido a la sobreexpresión de TSPAN33.

Como se mencionó previamente, las tetraspaninas son miembros abundantes de la membrana de las vesículas extracelulares. Estas proteínas de peso molecular de entre 25 a 28 kDa son fáciles de identificar por medio de Western blot, siempre y cuando se tenga el anticuerpo que sea útil para esta metodología. Es por esto que en este trabajo se detectó indirectamente a la tetraspanina usando a la EGFP como bandera. Es así que en la figura 14 se muestra la presencia de una banda entre el marcador de peso molecular de 77 kDa y 55 kDa en los carriles que corresponden a los aislados de exosomas generados por las clonas que fueron transfectadas con el vector pTSPAN33-EGFP, demostrando así la presencia de la proteína de fusión TSPAN33-EGFP en las vesículas extracelulares aisladas. Curiosamente, la EGFP no fue detectada en los carriles correspondientes al control (exosomas de clonas transfectadas con el vector pEGFP-N1, que sólo codifica para la EGFP), esto puede deberse a que, el proceso por el cual se selecciona a las proteínas que se deben integrar a los exosomas es muy complejo e involucra varios mecanismos que regulan este empaquetamiento en exosomas (ESCRT y generación de vesículas por ceramida, por ejemplo), sugiriendo que la mayoría de las proteínas son previamente procesadas para llegar a su destino, y que no cualquier proteína puede llegar a empaquetarse en vesículas extracelulares.

La fenotipificación de moléculas asociadas a ciertos compartimentos de la célula, es una tarea que ayuda a determinar el posible comportamiento de este compartimento o las posibles implicaciones que este tiene, en algún mecanismo de la fisiología de la célula. Debido a esto, y a que en trabajos previos de nuestro grupo de trabajo se ha observado un aumento en la expresión de MHC clase II, al sobreexpresarse la TSPAN33, se consideró relevante determinar la presencia de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II en las vesículas extracelulares extraídas de las clonas de línea celular Raji que sobreexpresaban a la TSPAN33-EGFP. Es así que, como lo muestra la figura 15, los exosomas que estaban formando un complejo con las dynabeads sensibilizadas para reconocer a las moléculas del MHC II de superficie de exosomas mostraban un aumento en la intensidad media de fluorescencia (esto debido a que en los exosomas también se encontraba la EGFP fusionada a la TSPAN33, lo que permitió

detectar a los exosomas, sin necesidad de utilizar algún fluorocromo extra) respecto al control de Dynabeads sin sensibilizar y Dynabeads asociadas sólo con el anticuerpo. Lo anterior confirmó la asociación de la TSPAN33 sobreexpresada con el MHC de clase II como una propiedad intrínseca de la proteína, y una posible implicación de la tetraspanina 33 en la presentación de antígeno por medio de vesículas extracelulares.

Debido a todo lo previamente mencionado, resulta interesante que la TSPAN33 se encuentre asociada a orgánulos celulares y proteínas que son muy relevantes en la fisiología de una célula del sistema inmune, por lo que relacionarla a una posible implicación en el aumento de tumores en humano no es del todo erróneo.

8. Conclusiones.

- Se obtuvieron clones que sobreexpresan a la TSPAN33.
- Se estandarizó la metodología para aislar exosomas de sobrenadantes de cultivos celulares.
- Se demostró que la TSPAN33 se encuentra en exosomas.
- Se demostró la presencia de MHCII en exosomas en los que se encuentra la TSPAN33.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
BCR	Receptor de antígeno del linfocito B
DAPI	4'6-diamino-2-fenil-indol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
ER	Retículo endoplásmico
ESCRT	Complejo de clasificación endosomal requerida para transporte
EV	Vesículas extracelulares
FCS	Espectroscopía de correlación de fluorescencia
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IgSF	Superfamilia de inmunoglobulinas
IMF	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MVB	Cuerpos multivesiculares
PFA	Paraformaldehído
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonio
TEM	Microdominio rico en tetraspaninas
TM	Transmembranales
TSPAN	Tetraspanina

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Lista de tetraspaninas de humano y sus nombres alternativos	3
Figura 1. Estructura de una tetraspanina	4
Figura 2. Estructura del LEL	5
Figura 3. Proteínas que pueden asociarse a las tetraspaninas	6
Figura 4. Modelo de la formación de MVB	8
Figura 5. Composición proteica de los exosomas	10
Figura 6. Mapas de los plásmidos pEGFP-N1 y pTSPAN33-EGFP	15
Tabla 2. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de plásmidos	16
Tabla 3. Descripción general de plásmidos utilizados	19
Figura 7. Análisis de los vectores de expresión	22
Figura 8. Transfección de la línea celular Raji	23
Figura 9. Microscopía confocal de células Raji transfectadas	24
Figura 10. Microscopía confocal de células Raji transfectadas	24
Figura 11. Tinciones de aparato de Golgi y retículo endoplásmico	25
Figura 12. Aislamiento de exosomas y enriquecimiento proteico	26
Figura 13. Microscopía electrónica de transmisión de exosomas	28
Figura 14. Identificación de la TSPAN33 en exosomas de células Raji	29
Figura 15. Fenotipificación de MHCII en exosomas de células Raji	30

9. Bibliografía.

1. **Heikens MJ, Cao TM, Morita C, Dehart SL, Tsai S.** 2007. Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood* **109**:3244-3252.
2. **Schorey JS, Bhatnagar S.** 2008. Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* **9**: 871-881.
3. **Saunderson SC, Schuberth PC, Dunn AC, Miller L, Hock BD, MacKay PA, Koch N, Jack RW, McLellan AD.** 2008. Induction of exosome release in primary B cell stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *Journal of Immunology* **180**: 8146-8152.
4. **Hemler ME.** 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**:801-811.
5. **Monk PN, Partridge LJ.** 2012. Tetraspanins – Gateways for Infection. *Infectious Disorders Drug Targets* **12**:4-17.
6. **Levy S, Shoham T.** 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature reviews. Immunology* **5**:136-148.
7. **Hemler ME.** 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology* **19**:397-422.
8. **Huang S, Yuan S, Dong M, Su J, Yu C, Shen Y, Xie X, Yu Y, Yu X, Chen S, Zhang S, Pontarotti P, Xu A.** 2005. The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* **86**:674-684.
9. **Romanska HM, Berditchevski F.** 2011. Tetraspanins in human epithelial malignancies. *The Journal of pathology* **223**:4-14.
10. **Lazo PA.** 2007. Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer science* **11**: 1666-1677.
11. **Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME.** 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* **28**:106-112.
12. **Levy S, Shoham T.** 2005. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology* **20**:218-224.

13. **Zhang HG (ed).** 2013. Emerging concepts of tumor exosome-mediated cell-cell communication. Springer science +business media. 69-91.
14. **Schorey JS, Cheng Y, Sing PP, Smith VL.** 2015. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports* **16**: 24-41.
15. **Wollert T, Hurley JH.** 2010. ESCRT proteins help create internal vesicles in MVBs and then disconnect from the vesicle when finished. *Nature* **464**, 864-869.
16. Andreu Z, Yáñez-Mó M. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in immunology* **442**:1-12.
17. **Johstone RM, Adam M, Pan BT.** 1984. The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. *Canadian Journal of Biochem and Cell Biology* **62**: 1246-121254.
18. **Yu X, Harris SL, Levine AJ.** 2006. The regulation of exomes: a novel function of the p53 protein. *Cancer research* **66**: 4795-4801.
19. **Zhang HG, Liu C, Su K, Yu S, Zhang L, Zhang S, Wang J, Cao X, Grizzle W, Kimberly RP.** 2006. A membrane form of TNF-alpha presented by exosome delays T cell activation-induced cell death. *Journal of Immunology* **176**: 7385-7393.
20. **Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejdeddekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ.** 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of experimental Medicine* **183**: 1161-1172.
21. **Zitvogel L, Regnault A, Loxier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigonera S.** 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine* **4**: 594-600.
22. **Muntasell A, Berger AC, Roche PA.** 2007. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO Journal* **26**:4263-4272.
23. **Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO.** 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel

mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* **9**: 654-659.

24. **Luu VP, Hevezi P, Vences-Catalan F, Maravillas-Montero JL, White CA, Casali P, Llorente L, Jakez-Ocampo J, Lima G, Vilches-Cisneros N, Flores-Gutierrez JP, Santos-Argumedo L, Zlotnik A.** 2013. TSPAN33 is a novel marker of activated and malignant B cells. *Clinical immunology* **149**:388-399.