

GENERACIÓN DE 2 LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN OVOALBÚMINA

Con el objetivo de generar una herramienta que permita estudiar la respuesta anti-tumoral de células T CD8+ con un TCR específico para un antígeno expresado por el tumor, se planea generar 2 líneas celulares tumorales: MC38-OVA y EL4-OVA que expresen ovoalbúmina (OVA) constitutivamente

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Michelle Téllez-Sütterlin, Rosa M. Rubio, José C. Crispín, Florencia Rosetti

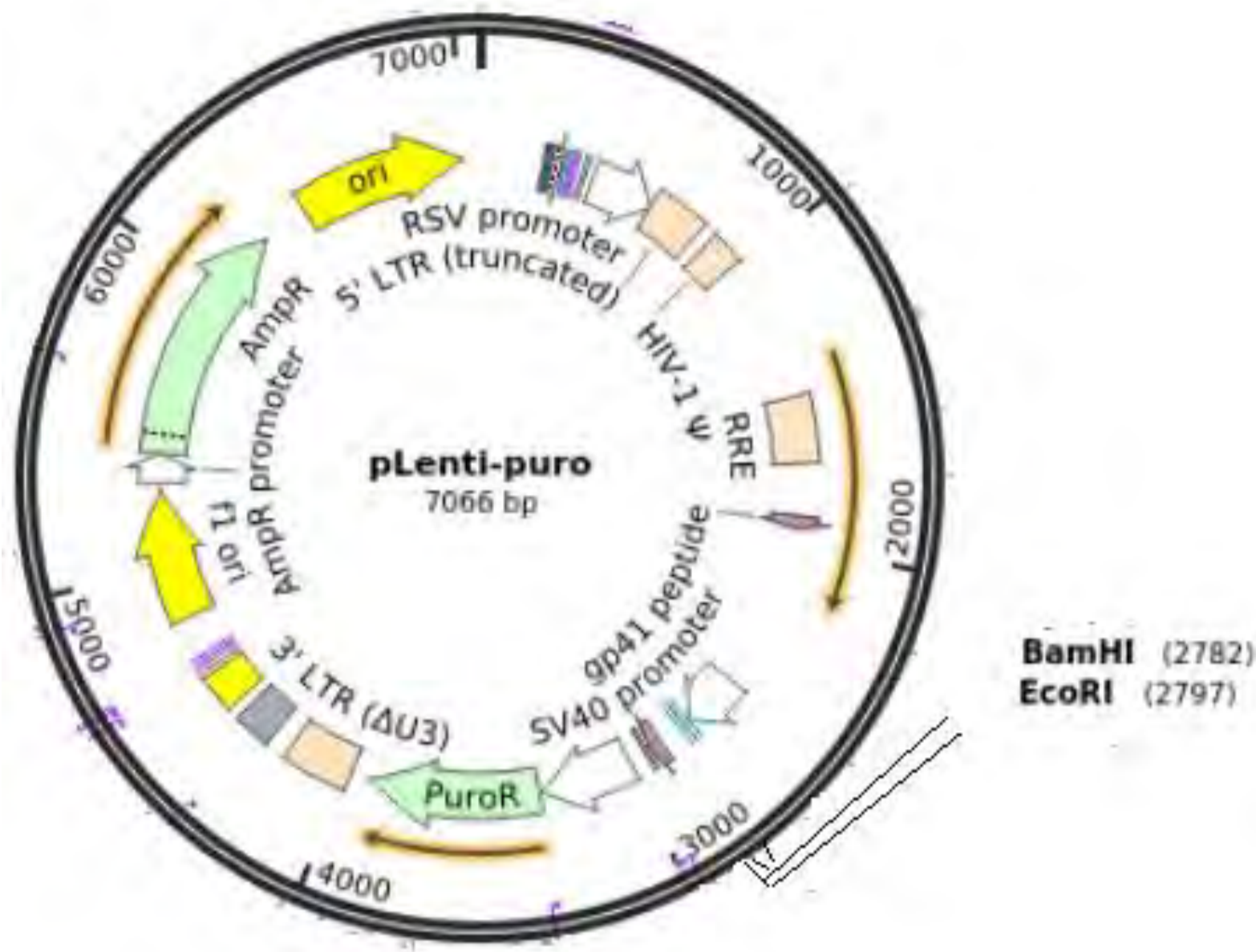


Fig.1 Mapa del plásmido pLenti-puro

Clonación de vector lentiviral

Se extrajo mRNA de células B16 OVA (células de melanoma murino que expresan ovoalbúmina), se hizo cDNA y se usó como molde para amplificar la secuencia de OVA. El plásmido pLenti-puro se cortó con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se colocó en una reacción de ligación con la secuencia de la ovoalbúmina.

Se necesitan 3 plásmidos para producir un lentivirus

1)pPAX
"plásmido de empaquetamiento" codifica para la cápside, polimerasa, genes virales.

2)pCAG-Eco
Codifica para la envoltura del virus que le permite infectar un amplio rango de células hospederas.

3) Vector de expresión
Usamos el plásmido pLenti-puro para poder seleccionar las células con puromicina.

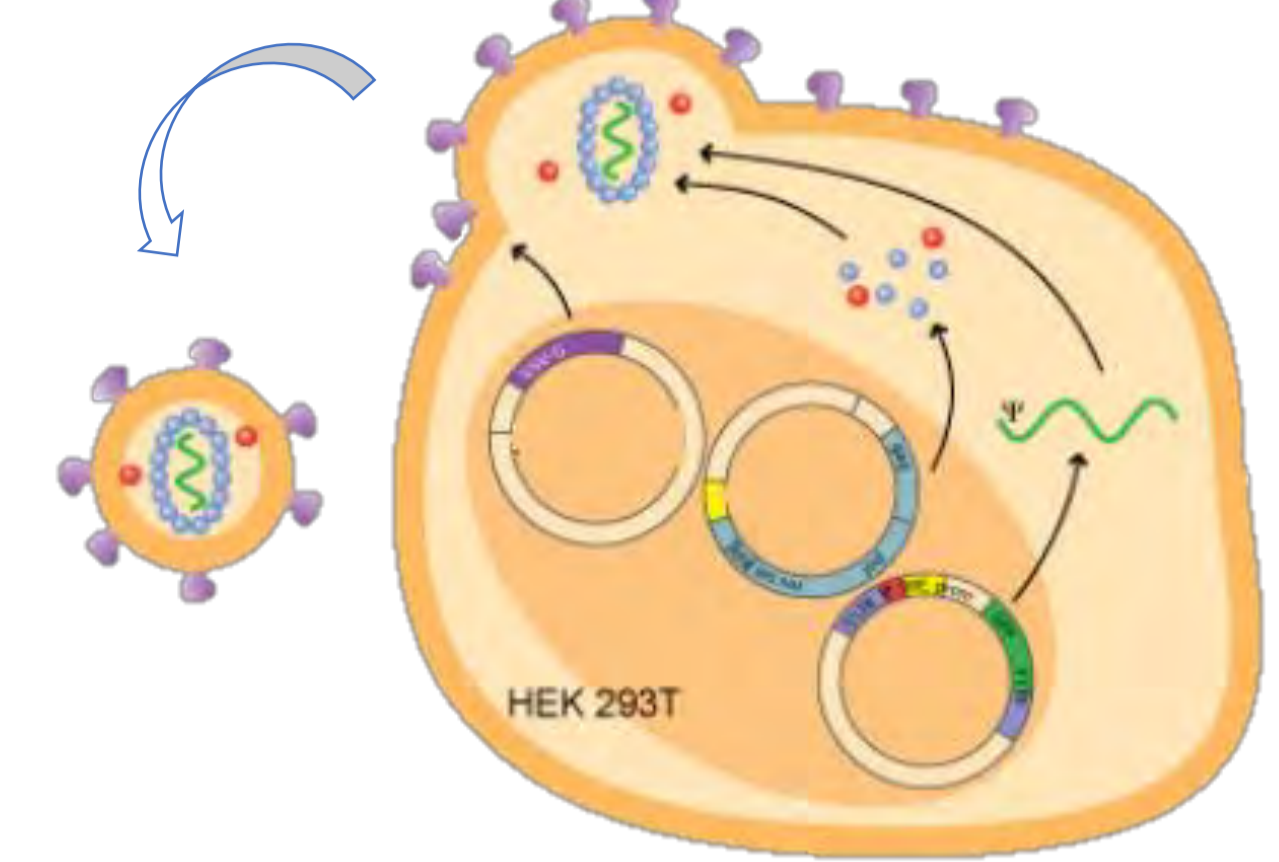


Fig. 2. Producción de lentivirus

Se sembró un plato con células HEK y cuando estuvieron al 80% de confluencia, se agregó lipofectamina y la mezcla de los plásmidos con OptiMEM a la placa de cultivo. Se incubaron toda la noche a 37 °C

Al día siguiente se cambió el medio a DMEM y durante 2 o 3 días se recolecta el sobrenadante que contiene el virus replicado por la maquinaria de las células HEK.

Se transdujo las líneas celulares MC38 y EL4 usando polibreno. Al tercer día empezamos a seleccionar con puromicina.

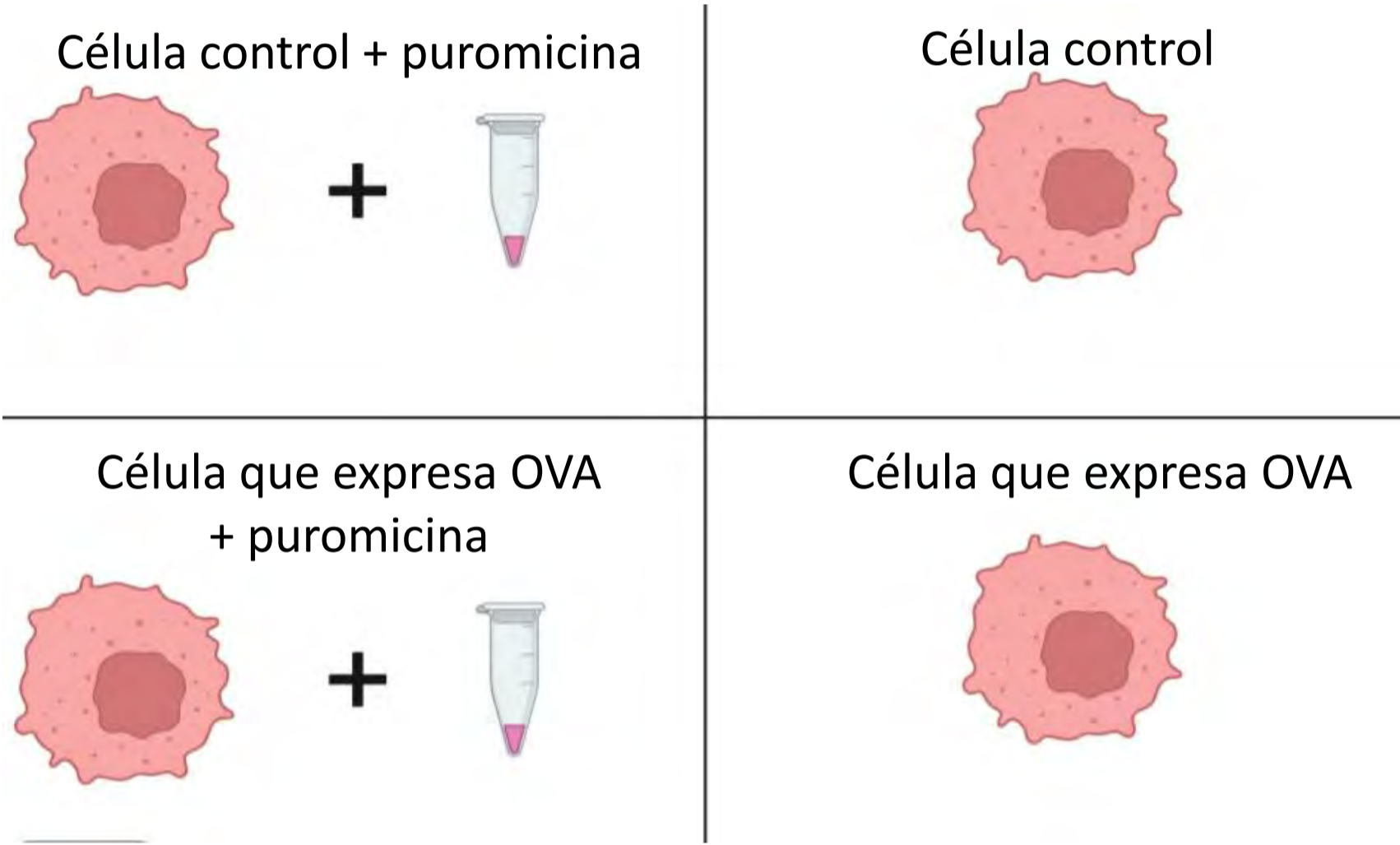


Fig.3 Condiciones de cultivo por cada línea celular

Se seleccionó manualmente las células MC38 OVA con puromicina haciendo diluciones limitantes. Obtuvimos 2 clonas a las cuales llamamos MC38 A10 y F11.

Se extrajo RNA de las clonas MC38 A10, MC38 F11, MC38 control y B16 OVA (células de melanoma que ya están editadas para expresar la ovoalbúmina) para hacer cDNA y realizar una PCR de punto final.

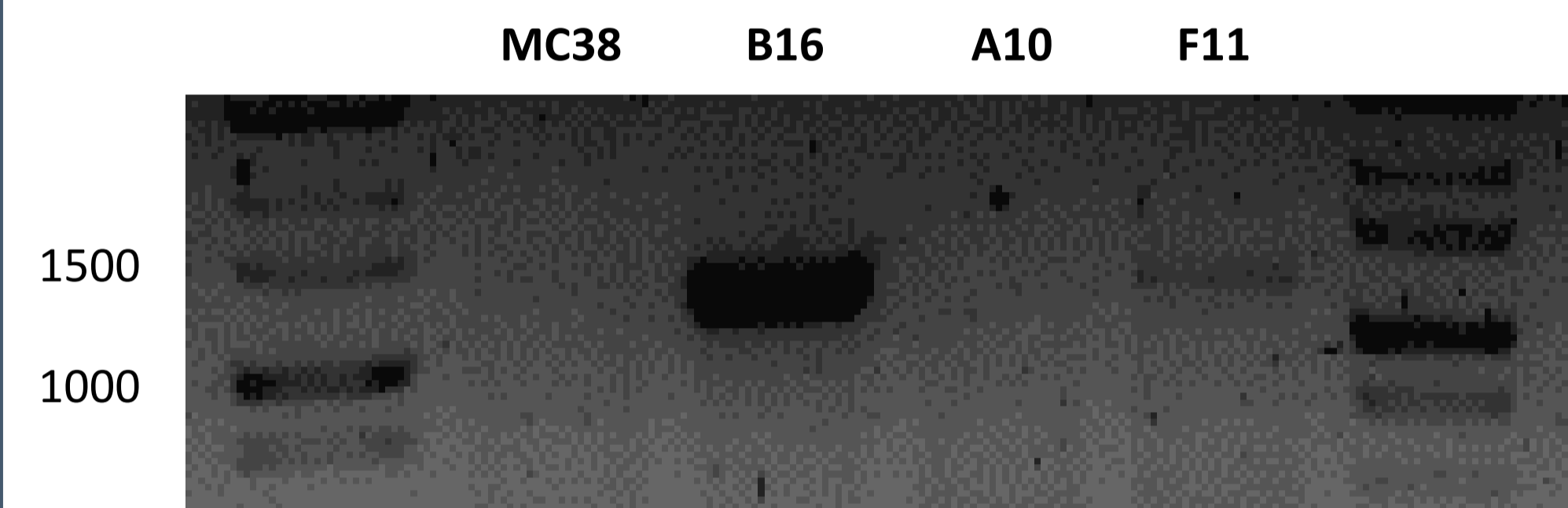


Fig. 4 - Expresión de la ovoalbúmina en diferentes líneas celulares

Se usó un anticuerpo anti-H-2Kb-SIINFEKL para ver si las clonas MC38 expresan MHC-I (complejo mayor de histocompatibilidad, por sus siglas en inglés) cargado con el péptido derivado de ovoalbúmina.

Se evaluaron 2 condiciones, células sin tratamiento y células estimuladas con INF γ, sólo a las MC38 se le agregó SIINFEKL además de INF γ

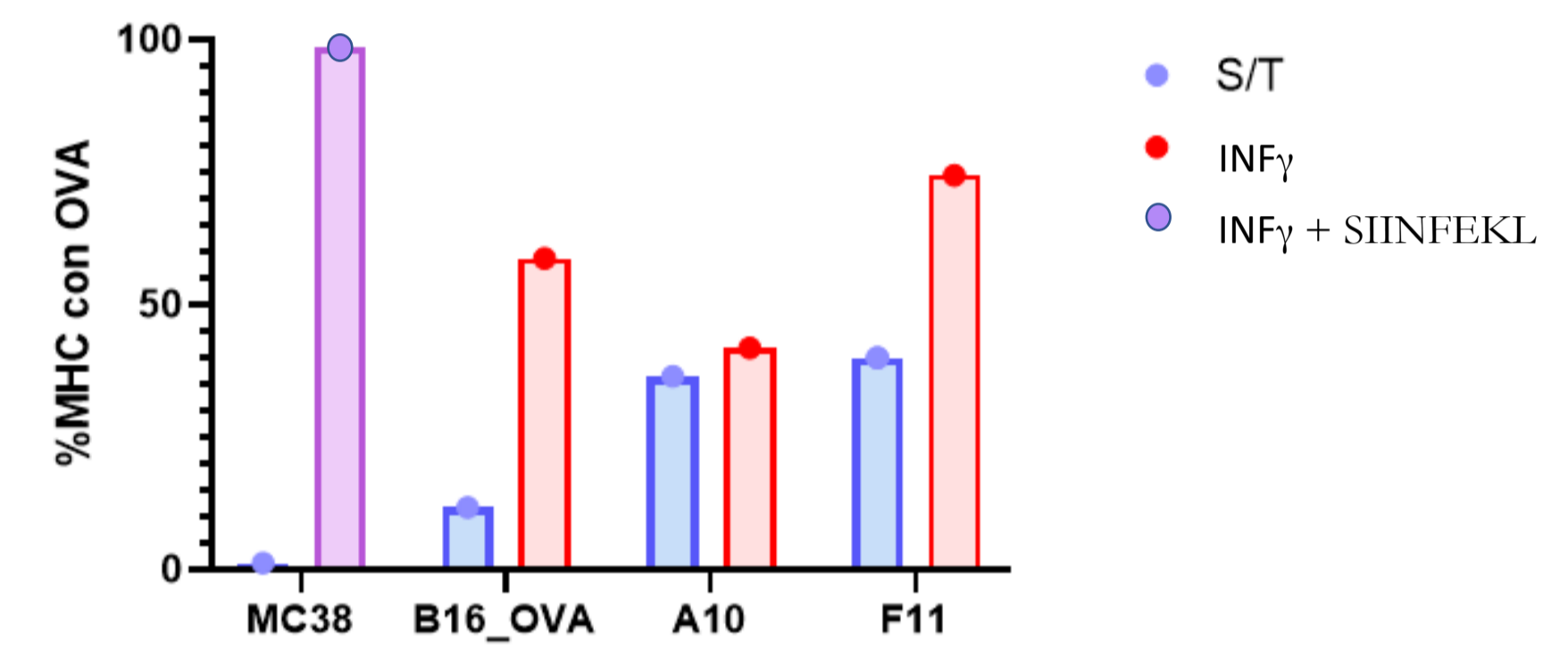


Fig. 5 - Detección del MHC-I cargado con el péptido SIINFEKL

Ensayo de citotoxicidad

Se resuspendieron las CTLs para que quedaran 1x10⁶/mL y se usaron las siguientes relaciones CTLs a Target

CTLs	Target
2	1
1	1
0.5	1
0	1

Se purificaron células de ganglios linfáticos inguinales y axilares de un ratón OTI y las colocamos en una placa de activación, previamente incubada con αCD3/αCD28.

Durante 9 días se añadió más medio e IL-2 y las células OTI se diferenciaron a CTLs (Linfocitos citotóxicos por sus siglas en inglés).

El control negativo MC38 se tiñó con Cell Trace Far Red y las demás líneas celulares con Cell Trace Violet

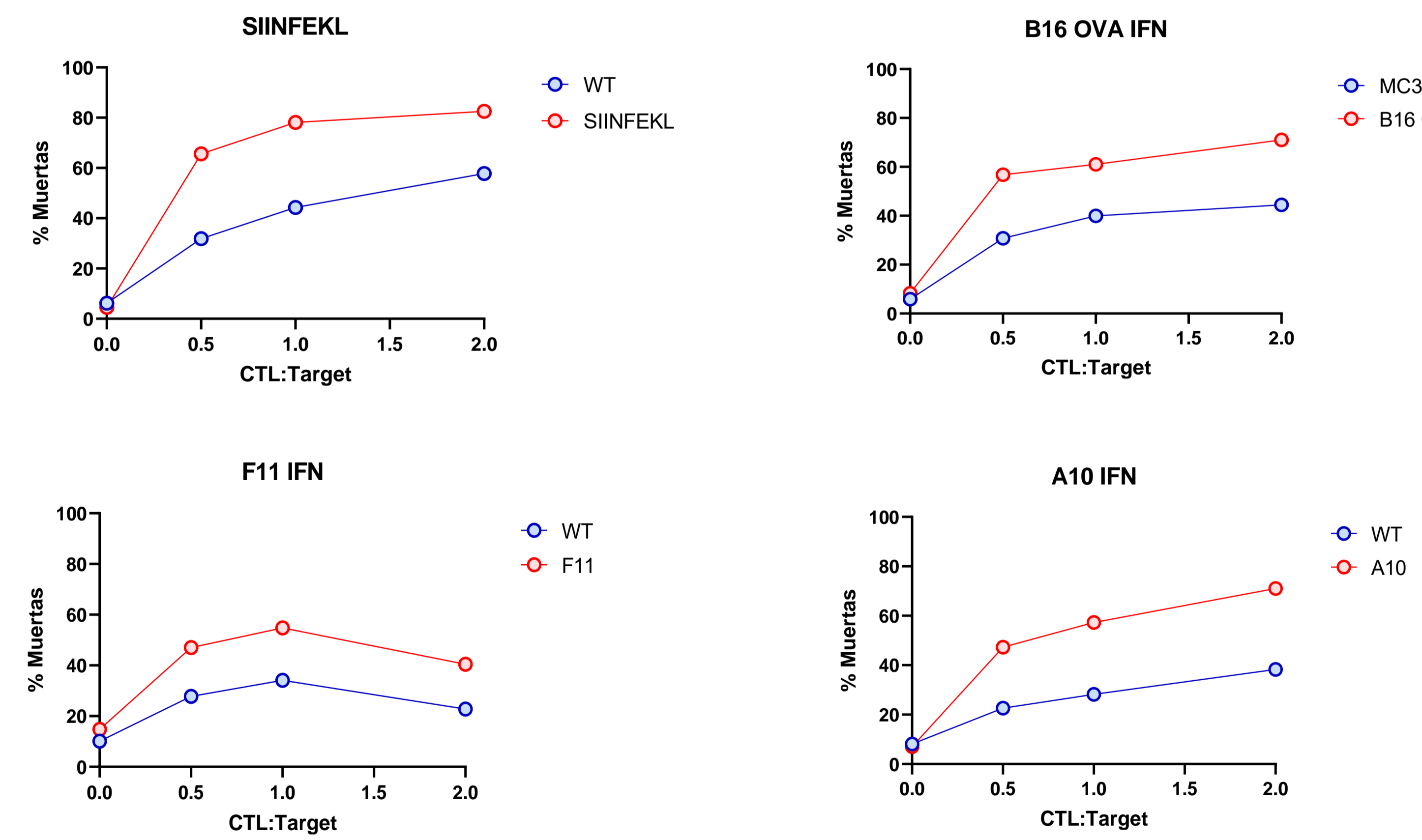
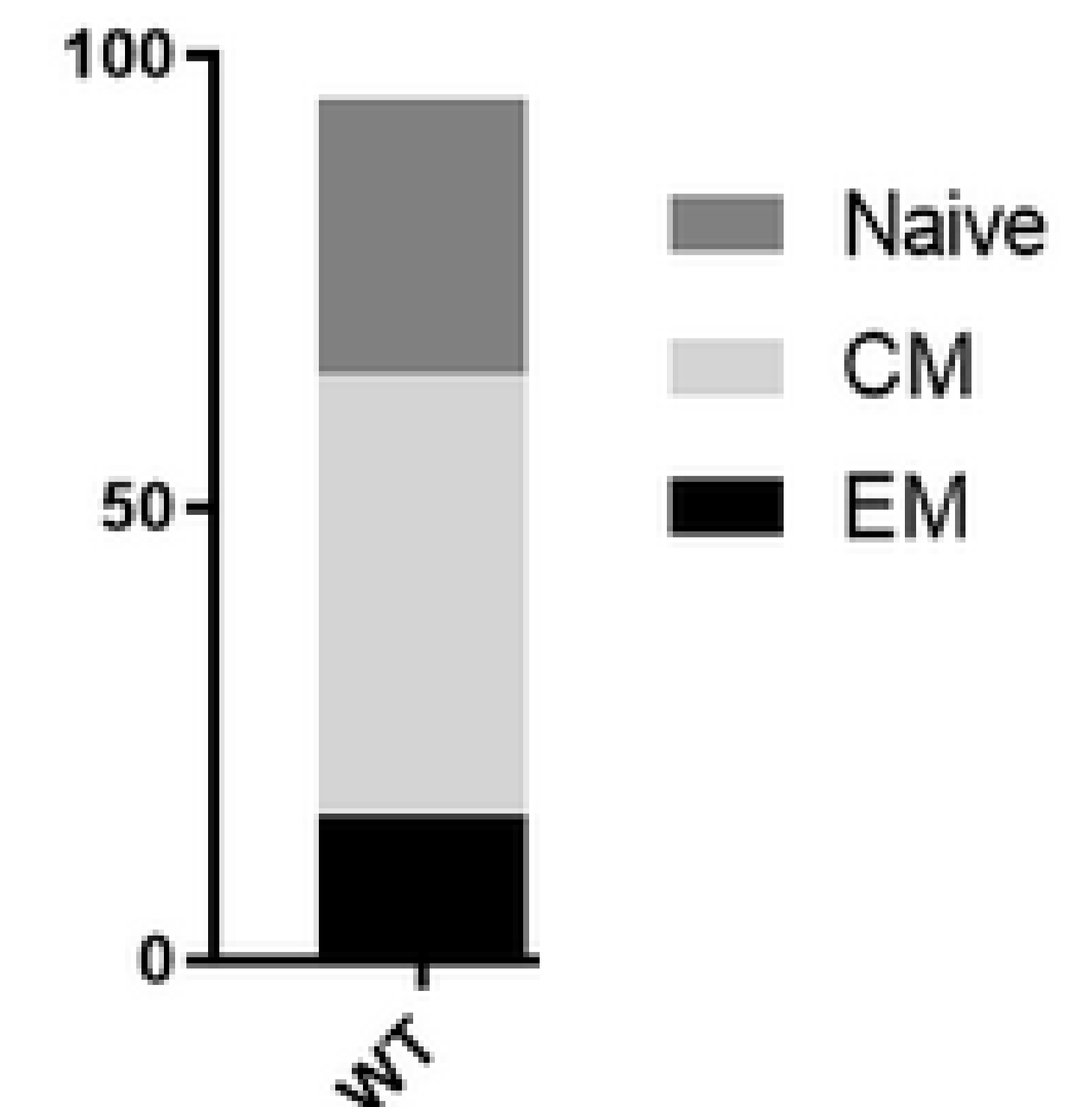
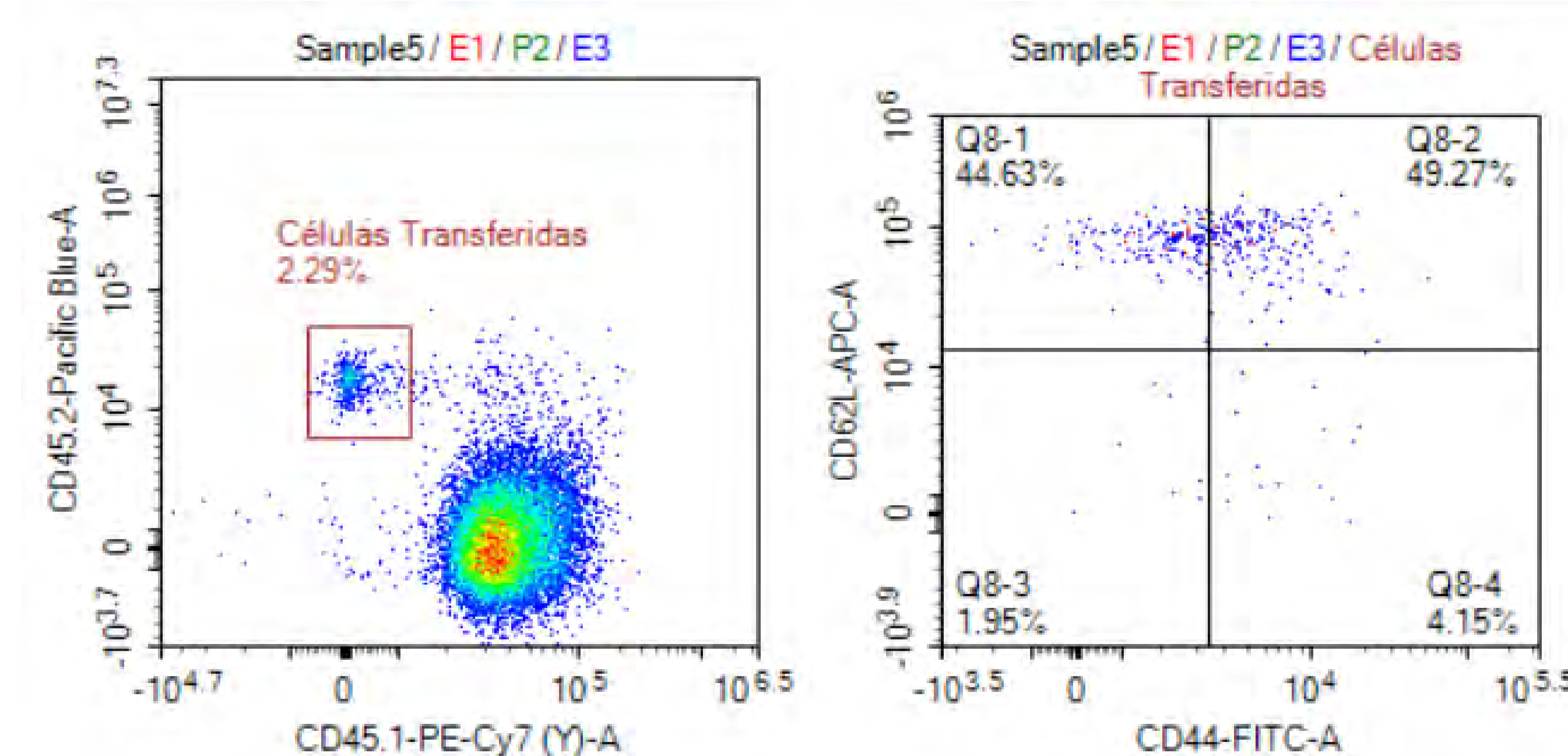


Fig. 6

Se inyectaron 1x10⁶ células OTI con un marcador congénico CD45.2 a ratones receptores B6 CD45.1 y al día siguiente se les inyectó 1.3x10⁵ células MC38 clona F11 por ratón en 100μL de PBS.

A los 28 días post-inyección de las células tumorales, se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales y axilares.

Se hizo una tinción para ver a través de citometría de flujo las células OTI y la inducción por memoria.



- Memoria central (CM) definido como CD44+ y CD62L+
- Memoria efectora (EM) definido como CD44+ CD62L-
- Células vírgenes (naive) definido como CD44- CD62L+